

**VNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACVLTADE BIOLGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLGÍA ANIMAL, PARASITOLGÍA, ECOLGÍA,  
EDAFOLGÍA Y QVÍMICA AGRÍCOLA**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización molecular y funcional de proteínas de  
*Schistosoma bovis* implicadas en la regulación de los mecanismos  
hemostáticos del hospedador**

**EDUARDO DE LA TORRE ESCUDERO**

**Salamanca, 2013**

---

*Fotografía de portada: paisaje de dehesa, hábitat de Schistosoma bovis en la provincia de Salamanca. Autor: Rubén Rosales.*

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC).

D. Eduardo de la Torre Escudero ha disfrutado de una ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI), concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través de los proyectos AGL2007-60413 (2007-2010) y AGL2010-18163 (2011-2013).



Los Drs. ANA OLEAGA PÉREZ y RICARDO PÉREZ SÁNCHEZ, Investigadores Científicos del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC),

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada “**Caracterización molecular y funcional de proteínas de *Schistosoma bovis* implicadas en la regulación de los mecanismos hemostáticos del hospedador**”, presentada por D. EDUARDO DE LA TORRE ESCUDERO, Licenciado en Biología, ha sido desarrollado en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) bajo nuestra dirección y cumple las condiciones para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a los efectos legales, firman y sellan el correspondiente certificado en Salamanca a \_\_\_\_ de Noviembre de 2012.

Fdo. Dra. Ana Oleaga Pérez

Fdo. Dr. Ricardo Pérez Sánchez



El Dr. FERNANDO SIMÓN MARTÍN, Catedrático de Parasitología en el Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca,

**CERTIFICA:**

Que D. EDUARDO DE LA TORRE ESCUDERO, ha realizado el trabajo titulado: **“Caracterización molecular y funcional de proteínas de *Schistosoma bovis* implicadas en la regulación de los mecanismos hemostáticos del hospedador”**, bajo la dirección de los Drs. ANA OLEAGA PÉREZ y RICARDO PÉREZ SÁNCHEZ, y estima como tutor que el mencionado trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como tesis doctoral.

Y para que así conste, a los efectos legales, firma y sella el correspondiente certificado en Salamanca a \_\_\_\_ de Noviembre de 2012.

Fdo. Dr. Fernando Simón Martín





## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría aprovechar este espacio para agradecer sinceramente su colaboración a todas aquellas personas e instituciones que de alguna manera han contribuido directa o indirectamente a la realización de esta Tesis Doctoral o me han acompañado en el camino.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores, los Drs. Ana Oleaga y Ricardo Pérez, investigadores del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca por brindarme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación científica y formar parte de su equipo. Agradezco la confianza depositada en mí durante estos años para desempeñar, bajo su tutela, las distintas tareas científicas que han tenido como fruto, entre otros, este trabajo y sobre todo el esfuerzo y dedicación demostrados a la hora de elaborar esta Tesis Doctoral.

Quiero agradecer también al Dr. Fernando Simón Martín, Catedrático de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca, por desempeñar la tutoría reglamentaria para la presentación de este trabajo.

Trabajar a diario en el “semisótano” del IRNASA no habría sido una experiencia tan agradable sin las personas que me han acompañado durante este tiempo. Siempre recordaré con especial cariño el gran apoyo que me prestó Ana durante los primeros meses, cuando la producción de proteínas recombinantes parecía algo inabarcable. También a Rocío y Olga, quienes fueron mis maestras primero y un apoyo imprescindible más tarde. Vero, gracias por tu paciencia cada vez que recurrí a ti para desahogarme de los imprevistos experimentales. María y José, nos enseñaron a todos el significado de trabajar con alegría y revolucionaron los cumpleaños en el laboratorio. Por último Juan, que nunca se queja, ha sido un gran apoyo para que todos podamos dedicar más tiempo a nuestros experimentos (ya no puedes decir que no te cito en mi Tesis). A todos ellos, les agradezco tanto su apoyo científico, como el compañerismo y los buenos momentos transcurridos.

También quiero agradecer a los Drs. Mar Siles y Raúl Manzano, no sólo por su orientación científica, especialmente en las técnicas de biología molecular, sino sobre todo, por su buena disposición a la hora de escuchar y aconsejarme en cada cuestión que pude requerir de ellos.

No quisiera olvidarme de Vicente Ramajo, quien en el breve tiempo que compartimos, intentó transmitirme gran parte de sus conocimientos y me aconsejó sobre el mantenimiento del ciclo de *S. bovis*.

Gracias también a los que me acompañaron durante esta etapa. A los “jóvenes del IRNA” y los compañeros del café, con los que he pasado buenos momentos “haciendo instituto” dentro y fuera del mismo. A los compañeros del Grupo de Dirofilariosis de la Universidad de Salamanca: Isa, Rodrigo y Javi, con quienes he compartido tanto horas de laboratorio, como viajes a congresos y jornadas científicas. A toda la pandilla de amigos de Salamanca y por supuesto a mi familia, especialmente a mis padres porque sin su apoyo en mi formación académica habría sido imposible llegar hasta aquí.

Asimismo me gustaría agradecer la colaboración prestada por aquellos investigadores del IRNASA o ajenos a él que nos prestaron su apoyo mediante la cesión del equipamiento o material necesario para llevar a cabo algunas partes de este trabajo.

Agradezco finalmente el soporte económico y científico del programa de Becas FPI del MICINN y al IRNASA-CSIC, cuyas infraestructuras, aunque a menudo criticadas, poco tienen que envidiar a las de algunas universidades de gran prestigio.

A mis padres y abuelos,  
por empujarme hacia  
delante



## LISTADO DE ABREVIATURAS:

- $\epsilon$ ACA:** Ácido  $\epsilon$ -aminocaproico
- 2PG:** 2-fosfoglicerato
- ANOVA:** Análisis de la varianza
- ANX:** Anexina de *Schistosoma bovis*
- AUC:** Área bajo la curva
- BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool
- BSA:** Albúmina de suero bovino
- CAA:** Antígeno circulante anódico
- CCA:** Antígeno circulante catódico
- CI:** Intervalo de confianza
- C-term:** Extremo carboxilo terminal
- DAF:** "Decay accelerating factor", factor acelerador de la degradación
- DO:** Densidad óptica
- E/S:** Extracto de excreción-secreción
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético
- ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay
- FABP:** Proteína unidora de ácidos grasos
- FBA:** Fructosa aldolasa-1,6-bisfosfato
- Fc:** Fracción constante de las inmunoglobulinas
- FhE/S:** antígeno excretor-secretor de *Fasciola hepatica*
- GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
- GPI:** Glicosil fosfatidil inositol
- GST:** Glutation-S-transferasa
- HSPs:** Proteínas de choque térmico
- Ig:** Inmunoglobulina
- IPTG:**  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo
- IRNASA:** Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca
- IS:** Índice serológico
- LC-MS/MS:** Cromatografía líquida acoplada a sistema de espectrometría de masas en tandem
- NCBI:** National Center for Biotechnology Information
- N-term:** Extremo amino terminal
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- OPD:** Orto-fenil-diamina

**p.i.:** Postinfección

**PAI:** Inhibidores de la activación del plasminógeno

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PBST:** PBS con Tween-20 al 0,05%

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDB:** Protein Data Bank

**pI:** Punto isoeléctrico

**PM:** Peso molecular

**rANX:** Anexina recombinante de *S. bovis*

**rENO:** Enolasa recombinante de *S. bovis*

**rFBA:** Fructosa bisfosfato aldolasa recombinante de *S. bovis*

**rGAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa recombinante de *S. bovis*

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear

**ROC:** Receiver Operator Characteristic

**rSb22.6:** Antígeno de 22.6 kDa recombinante de *S. bovis*

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa.

**Sb22.6:** Antígeno de 22.6 kDa de *S. bovis*

**Sb28GST:** Glutación-S-transferasa de 28 kDa de *S. bovis*

**SbC:** Fracción soluble del extracto de vermes adultos de *S. bovis*

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**Sj22.6:** Antígeno de 22.6 kDa de *S. japonicum*

**Sm22.6:** Antígeno de 22.6 kDa de *S. mansoni*

**SpSEN:** Enolasa superficial de *Streptococcus pneumoniae*

**TBE:** Tris-Borato-EDTA

**TBS:** Tampón tris salino

**TBST:** Tampón tris salino con Tween-20 al 0,05 %

**TG:** Extracto de tegumento

**Th1:** Linfocitos T helper de tipo 1

**Th2:** Linfocitos T helper de tipo 2

**TP:** tiempo de protrombina

**t-PA:** Activador tisular de plasminógeno

**TTPa:** tiempo parcial de tromboplastina activada

**u-PA:** Activador de plasminógeno de tipo urokinasa

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	1
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
<b>1. SCHISTOSOMA BOVIS Y ESQUISTOSOMOSIS ANIMAL</b> .....	9
1.1. Hospedadores y distribución geográfica.....	11
1.2. Ciclo biológico.....	12
1.3. Patología y clínica .....	14
1.4. Respuesta inmunitaria.....	16
1.5. Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria.....	18
1.6. Diagnóstico .....	21
1.7. Tratamiento, prevención y control.....	23
<b>2. INTERFASE PARÁSITO-HOSPEDADOR</b> .....	25
2.1. Productos de excreción-secreción .....	25
2.2. Tegumento.....	28
2.2.1. Estructura .....	28
2.2.2. Composición.....	30
<b>3. INTERACCIÓN ENTRE SCHISTOSOMA SP. Y EL SISTEMA HEMOSTÁTICO DEL HOSPEDADOR</b> .....	35
3.1. Agregación plaquetaria y coagulación.....	35
3.2. Sistema fibrinolítico .....	37
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	43
<b>1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MATERIAL PARASITARIO</b> .....	45
1.1. Animales de experimentación .....	45
1.2. Parásitos .....	46
1.3. Mantenimiento del ciclo biológico de <i>S. bovis</i> .....	46
1.4. Infecciones experimentales y obtención de vermes adultos y esquistosómulas .....	47
1.5. Preparación de extractos proteicos de vermes adultos de <i>S. bovis</i> .....	48
<b>2. MÉTODOS MOLECULARES</b> .....	49
2.1. Clonación y secuenciación del cDNA codificante de enolasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, anexina y antígeno 22.6 de <i>S. bovis</i> ...	49
2.1.1. Extracción de RNA total de vermes adultos y amplificación por RT-PCR de los correspondientes cDNAs.....	49
2.1.2. Purificación de los productos de PCR.....	52
2.1.3. Clonación en el vector de secuenciación pSC-A.....	52
2.1.4. Análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos .....	53
2.2. Producción de las proteínas recombinantes.....	54

2.2.1. Subclonación del cDNA en un vector de expresión .....	56
2.2.2. Expresión de las proteínas recombinantes .....	61
2.2.3. Purificación de las proteínas recombinantes.....	62
2.3. Métodos de electroforesis de proteínas .....	64
2.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	64
2.3.2. Western blot.....	65
3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PROFIBRINOLÍTICA Y ANTICOAGULANTE DE LAS PROTEÍNAS DE <i>S. BOVIS</i> .....	66
3.1. Unión del plasminógeno a las proteínas rENO, rGAPDH, rFBA, rANX y rSb22.6 .....	66
3.1.1. ELISA.....	66
3.1.2. Western blot con plasminógeno .....	67
3.2. Ensayos de activación de plasminógeno.....	67
3.3. Identificación de los motivos de unión a plasminógeno en la secuencia de la enolasa.....	68
3.4. Evaluación de la actividad anticoagulante de las proteínas rANX y rSb22.6.....	69
4. ENSAYOS DE INMUNOLocalIZACIÓN EN VERMES ADULTOS Y ESQUISTOSÓMULAS... ..	70
4.1. Obtención de los sueros hiperinmunes frente a las proteínas rENO, rGAPDH, rANX y rSb22.6 .....	70
4.1.1. ELISA.....	71
4.1.2. Western blot.....	71
4.2. Inmunofluorescencia .....	71
4.2.1. Estudio en cortes de vermes adultos .....	72
4.2.2. Estudio en vermes enteros: adultos y esquistosómulas.....	73
5. UTILIDAD DE LA PROTEÍNA rSb22.6 PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR <i>S. BOVIS</i> .....	73
5.1. Sueros analizados.....	73
5.2. Protocolo de ELISA.....	74
5.3 Análisis de los resultados de los sueros bovinos.....	75
<b>RESULTADOS</b> .....	77
1. SECUENCIAS CODIFICANTES (cDNA) Y AMINOACÍDICAS DE LAS PROTEÍNAS ENO, GAPDH, FBA, ANX Y Sb22.6 DE <i>S. BOVIS</i> .....	79
2. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE <i>S. BOVIS</i> EN FORMA RECOMBINANTE .....	83
2.1. Expresión de la Sb22.6 en el vector p-GEX.....	83
2.2. Expresión de ENO, GAPDH, FBA y ANX en el vector pQE-30.....	84
3. INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS DE <i>S. BOVIS</i> Y EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO DEL HOSPEDADOR.....	87
3.1. Unión de plasminógeno .....	87
3.2 Activación de plasminógeno y generación de plasmina.....	90



4. TÍTULO Y ESPECIFICIDAD DE LOS SUEROS HIPERINMUNES.....	92
5. EXPRESIÓN TISULAR DE LAS PROTEÍNAS ENO, GAPDH, FBA, ANX, Y Sb22.6 EN LOS VERMES ADULTOS Y LAS ESQUISTOSÓMULAS PULMONARES.....	94
5.1. Inmunofluorescencia en secciones de vermes adultos .....	94
5.2. Inmunofluorescencia en esquistosómulas pulmonares.....	98
5.3. Inmunofluorescencia en vermes adultos enteros.....	100
6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ENOLASA DE <i>S. BOVIS</i> .....	105
6.1. Análisis bioinformático de la secuencia de la ENO.....	105
6.2. Identificación de los motivos de unión a plasminógeno en la secuencia de la enolasa.....	111
7. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ANEXINA DE <i>S. BOVIS</i> .....	113
7.1. Análisis bioinformático de la secuencia de la ANX.....	113
7.2. Actividad anticoagulante de la rANX.....	117
8. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA rSb22.6 Y VALORACIÓN DE SU UTILIDAD COMO ANTÍGENO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR <i>S. BOVIS</i> .....	120
8.1 Análisis bioinformático de la secuencia de Sb22.6 .....	120
8.2. Actividad anticoagulante de la rSb22.6.....	122
8.3. Utilidad de la proteína rSb22.6 para la detección, mediante ELISA, de anticuerpos anti- <i>S. bovis</i> .....	122
<b>DISCUSIÓN</b> .....	129
<b>CONCLUSIONES</b> .....	147
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	151
<b>ANEXO: PUBLICACIONES</b> .....	167



# INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

---



Los trematodos del género *Schistosoma* constituyen una de las principales causas de enfermedad en los animales domésticos y el hombre en numerosos países tropicales y subtropicales. Hay tres especies principales de esquistosomas que parasitan a las personas –*Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*- y al menos otras 10 que parasitan a rumiantes domésticos.

Entre estas últimas especies destaca *S. bovis* por ser el principal causante de la esquistosomosis animal. Esta parasitosis, que afecta a unos 160 millones de animales en Asia y África, y también está presente en nuestro país, provoca pérdidas significativas en las explotaciones ganaderas. Estas pérdidas son consecuencia de la reducción de las tasas de crecimiento de los animales infectados, del aumento de su susceptibilidad a otras enfermedades y de la muerte de los animales en los casos de infección masiva. Por otra parte, *S. bovis* tiene también interés como modelo para el estudio de la esquistosomosis humana, debido a su proximidad filogenética con los esquistosomas que infectan a las personas, y en particular con *S. haematobium*.

Las infecciones por los esquistosomas son generalmente crónicas y de larga duración, y aunque los vermes adultos permanecen durante años en los vasos sanguíneos de los animales infectados, éstos raramente muestran alteraciones hemostáticas. Este fenómeno es llamativo si tenemos en cuenta que, dado su tamaño, la simple presencia de los vermes adultos en las venas del hospedador podría obstaculizar el flujo de sangre y provocar alteraciones circulatorias en los vasos más pequeños. Por otra parte, la exposición al torrente sanguíneo de una superficie extraña, como es la superficie tegumental de dichos vermes, podría provocar no sólo la activación de las plaquetas y la consiguiente formación de trombos, sino también desencadenar procesos de coagulación intravascular. Dado que, de hecho, en el hospedador infectado no ocurre nada de lo anterior, cabe suponer que el parásito se ha adaptado al hábitat intravascular desarrollando mecanismos de modulación de la respuesta hemostática de su hospedador (Wu et al., 2007).

Resulta igualmente llamativa la constatación de que son muy pocos los trabajos que han abordado el estudio de la interacción entre los esquistosomas y el sistema hemostático de sus hospedadores, aun a pesar de la importancia que puede tener esta interacción en la biología del parásito y del interés de su conocimiento en la identificación de dianas parasitarias para el desarrollo de nuevos fármacos y vacunas

anti-esquistosoma. Esta falta de estudios afecta no sólo a las especies de esquistosomas de animales, que tradicionalmente han recibido una menor atención, sino también a las especies que infectan a humanos, las cuales, por su patogenicidad y abundancia, han sido intensamente estudiadas.

Los escasos trabajos que han investigado la interacción esquistosoma-sistema hemostático se han recopilado en la Revisión Bibliográfica de la presente memoria y se refieren básicamente a *S. mansoni*, especie en cuya superficie tegumental se han identificado una ATP-difosfo hidrolasa (o apirasa) y una proteína inhibidora de trombina (el antígeno Sm22.6), las cuales permiten al parásito la inhibición de la agregación plaquetaria y de la coagulación sanguínea (DeMarco et al., 2003; Lin y He, 2006).

A los anteriores estudios hay que añadir los de nuestro grupo de investigación, en los que se observó que los vermes adultos de *S. bovis* pueden interactuar con el sistema hemostático del hospedador mediante la fijación y activación de plasminógeno sobre su superficie tegumental, lo que les permitiría evitar la formación de coágulos o disolver los ya formados (Ramajo-Hernández et al., 2007b). En este estudio se identificaron 10 proteínas del tegumento del parásito con capacidad para unir plasminógeno del hospedador, aunque no se llegó a determinar cuáles de ellas podrían tener una función real como receptores fisiológicos de plasminógeno *in vivo*, función que requiere que dichas proteína sean expresadas en la superficie del tegumento, en contacto con la sangre del hospedador.

Entre las proteínas fijadoras de plasminógeno identificadas en el tegumento de *S. bovis*, la consulta de la bibliografía reveló que la enolasa y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa ya habían sido citadas en otros organismos por su capacidad para fijar y activar plasminógeno, y que la enolasa es la que mejor caracterizada está como receptor de plasminógeno en la superficie de diversos microorganismos (Bergmann et al., 2001; Pancholi, 2001; Jong et al., 2003; Vanegas et al., 2007; Mundodi et al., 2008). Igualmente, la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, entre otras, ha sido identificada en la pared de *Candida albicans*, donde también une plasminógeno (Crowe et al., 2003). Esto sugiere que en *S. bovis* estas tres proteínas también podrían desempeñar una función en la superficie del tegumento como receptores fisiológicos de plasminógeno.

Por su parte, otra proteína de *S. bovis* identificada tanto en el proteoma tegumental como entre los productos de excreción-secreción de los vermes adultos fue el antígeno Sb22.6 (Pérez-Sánchez et al., 2006, 2008). Esta proteína no está entre las 10 unidoras de plasminógeno antes mencionadas, pero se trata de una proteína homóloga a la Sm22.6 de *S. mansoni*, que es una de las escasas proteínas de esquistosomas que se sabe que interactúa con el sistema hemostático del hospedador (Lin y He, 2006). En concreto, la Sm22.6 inhibe la acción de la trombina y actúa *in vitro* como anticoagulante alargando significativamente el tiempo de coagulación. Por este motivo, cabe suponer que la Sb22.6 de *S. bovis* pueda desempeñar también alguna actividad anti-hemostática en la interacción parásito-hospedador.

Finalmente, otra proteína de interés identificada por nuestro grupo en la interfase *S. bovis*-hospedador, y por otros investigadores en varias especies de *Schistosoma*, es un miembro de la familia de las anexinas (Pérez-Sánchez et al., 2006; Hoffmann et al., 2010). Las anexinas constituyen una familia multigénica muy conservada en eucariotas y sus miembros están implicados en numerosos procesos biológicos, entre los que se encuentran la coagulación y la fibrinólisis (Gerke y Moss, 2002; Moss y Morgan, 2004; Draeger et al., 2011). Concretamente, se ha demostrado que las anexinas A2 y A5 humanas y las anexinas B1 y B2 de *Taenia solium* poseen actividad anticoagulante y profibrinolítica (Hajjar et al., 1998; Gerke y Moss, 2002; Wang et al., 2006; Winter et al., 2006). Cabe por tanto suponer que la anexina de *S. bovis* podría desempeñar similares actividades anti-hemostáticas en la interacción con el hospedador.

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de la presente tesis doctoral fue la caracterización molecular y funcional de estas cinco proteínas de *S. bovis*, por su interés como potenciales reguladores de los mecanismos hemostáticos del hospedador. Las cinco proteínas seleccionadas son: la enolasa (ENO), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FBA) por su previsible función profibrinolítica como ligandos de plasminógeno, y la anexina (ANX) y el antígeno Sb22.6 (Sb22.6) por sus potenciales funciones anticoagulantes.

Para llevar a cabo este estudio hemos definido los siguientes objetivos concretos:

1. El clonaje y secuenciación de los cDNAs codificantes de ENO, GAPDH, FBA, ANX y Sb22.6 de *S. bovis* y el análisis bioinformático de la estructura molecular de las correspondientes proteínas.
2. La obtención de dichas proteínas en forma recombinante.
3. El análisis de la expresión tisular de las proteínas en vermes adultos y esquistosómulas pulmonares.
4. El estudio de su posible actividad profibrinolítica y anticoagulante.

Como objetivo adicional, y por los motivos que se detallan en el apartado correspondiente, se incluyó la evaluación de la proteína recombinante Sb22.6 como antígeno para el diagnóstico serológico de la infección por *S. bovis*.



# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---



## 1. *SCHISTOSOMA BOVIS* Y ESQUISTOSOMOSIS ANIMAL

La esquistosomosis es una enfermedad que puede afectar al hombre y a los animales domésticos y silvestres, constituyendo un importante problema sanitario y veterinario en muchas zonas tropicales y subtropicales del mundo.

Los esquistosomas son vermes planos (Platelmintos) pertenecientes a la familia Schistosomatidae y al género *Schistosoma*. Son trematodos dioicos y, como todos los miembros de este grupo, precisan un hospedador intermediario (un molusco) y un hospedador definitivo (un vertebrado) para completar su ciclo biológico. Los vermes adultos viven en el sistema vascular de sus hospedadores vertebrados, colonizando las venas perivesicales (*S. haematobium*), nasales (*S. nasale*), hepáticas y mesentéricas (resto de las especies).

En la actualidad hay descritas 20 especies, de las cuales 5 son parásitas de humanos. En la tabla 1 se recoge un listado con las especies de *Schistosoma*, indicando en la misma su distribución geográfica, sus hospedadores vertebrados y los géneros de los caracoles que actúan como hospedadores intermediarios (De Bont y Vercruysse, 1998; Ramajo Martín y Muro, 1999; Attwood et al., 2002).

La esquistosomosis del hombre constituye uno de los mayores problemas de salud pública en zonas tropicales y subtropicales, donde es endémica en más de 70 países, en los que se estima que hay más de 200 millones de personas afectadas y 780 millones viven en zonas de riesgo (Steinmann et al., 2006). La infección humana se debe mayoritariamente a *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. japonicum*, motivo por el cual son las especies que han sido el objeto de la mayor parte de los estudios llevados a cabo. Por el contrario, las especies que afectan a los animales han sido mucho menos estudiadas, a pesar de ser una infección parasitaria frecuente, principalmente en bovinos de África y Asia, donde se calcula que hay al menos 165 millones de animales afectados (De Bont y Vercruysse, 1997). Concretamente, de las 10 especies que afectan a rumiantes, las únicas que han recibido alguna atención, debido a su mayor importancia veterinaria, han sido *S. mattheei* y *S. bovis* (Vercruysse y Gabriel, 2005).

Entre dichas especies de rumiantes *S. bovis* se ha tomado como especie modelo por los siguientes motivos. En primer lugar, por su patogenicidad para los bovinos y ovinos domésticos, en los cuales provoca normalmente una enfermedad crónica de

**Tabla 1.** Especies del género *Schistosoma*, hospedadores y distribución geográfica.

Grupo	Especies	Género de caracol	Hospedadores definitivos	Distribución
HAEMATOBIIUM	<i>S. haematobium</i>	<i>Bulinus</i>	Hombre, primates	África
	<i>S. mattheei</i>	<i>Bulinus</i>	Hombre, rumiantes, primates	África
	<i>S. bovis</i>	<i>Bulinus</i> <i>Planorbarius</i>	Rumiantes	África, Asia, Península Ibérica, Islas mediterráneas
	<i>S. curassoni</i>	<i>Bulinus</i>	Rumiantes	África
	<i>S. margrebowiei</i>	<i>Bulinus</i>	Rumiantes, primates	África central
	<i>S. leiperi</i>	<i>Bulinus</i>	Rumiantes	África central
	<i>S. intercalatum</i>	<i>Bulinus</i>	Hombre	África
INDICUM	<i>S. indicum</i>	<i>Indoplanorbis</i>	Rumiantes	India
	<i>S. spindale</i>	<i>Indoplanorbis</i>	Rumiantes	India
	<i>S. nasale</i>	<i>Indoplanorbis</i>	Rumiantes, roedores	India
	<i>S. incognitum</i>	<i>Limnea radix</i>	Rumiantes, primates, roedores, cerdo, perro	India, Tailandia
JAPONICUM	<i>S. japonicum</i>	<i>Oncomelania</i>	Hombre, rumiantes, cerdo, perro, gato, roedores	Japón, China, Filipinas
	<i>S. mekongi</i>	<i>Tricula</i>	Hombre, perro	Laos, Camboya, Filipinas
	<i>S. sinensium</i>	<i>Tricula</i>	Roedores	Este de Asia
	<i>S. malayensis</i>	<i>Robertsiella</i>	Roedores	Este de Asia
	<i>S. ovuncatum</i>	<i>Tricula</i>	Roedores	Este de Asia
MANSONI	<i>S. mansoni</i>	<i>Biomphalaria</i>	Hombre, primates, perro, gato, roedores	África, Sudamérica, Caribe
	<i>S. rodhaini</i>	<i>Biomphalaria</i>	Roedores, perro	África
	<i>S. edwardiense</i>	<i>Biomphalaria</i>	Hipopótamo	África
	<i>S. hippopotami</i>	<i>Biomphalaria</i>	Hipopótamo	África

curso subclínico que a largo plazo causa notables descensos en las tasas de crecimiento y productividad, y en casos de infección masiva la muerte de los animales, todo lo cual se traduce en pérdidas significativas en las explotaciones ganaderas (De Bont y Vercruyssen, 1998; Monrad et al., 2006). En segundo lugar, por su extensa distribución geográfica (África, Oriente Medio y gran parte de la cuenca mediterránea, incluida la Península Ibérica), que convierte a este parásito en un problema veterinario ampliamente extendido (Ramajo y Muro, 1997; Monrad et al., 2006). Y en tercer lugar, por las analogías inmunológicas y genéticas entre *S. bovis* y *S. haematobium* (Agnew et al., 1989; Webster et al., 2006), que hacen de *S. bovis* un modelo válido para el estudio de *S. haematobium*.

### 1.1. Hospedadores y distribución geográfica

*S. bovis* utiliza como hospedadores definitivos a rumiantes, esencialmente vacas, ovejas y cabras, aunque también se ha encontrado en équidos, suidos, cánidos, camélidos, roedores y primates (Ramajo Martín, 1972). Los hospedadores intermediarios son caracoles acuáticos. Ramajo Martín (1972) señaló que el molusco que hace de hospedador intermediario en España de manera exclusiva es *Planorbarius metidjensis* (Planorbinae), mientras que en otras zonas del mundo son especies del género *Bulinus* (Bulininae). Los hábitats preferidos por los *Planorbarius* son pequeños ríos, arroyos de aguas claras, manantiales superficiales y abrevaderos artificiales.

La distribución geográfica de *S. bovis* está determinada principalmente por la distribución de los hospedadores intermediarios. *S. bovis* se encuentra en prácticamente todo el continente africano, Asia sudoccidental (Israel, Irán, Irak, Siria, Turquía), islas del Mediterráneo (Córcega, Cerdeña, Sicilia) y España (Ramajo Martín y Muro, 1999; Moné et al., 1999).

En España fue hallado por primera vez en ovejas de la provincia de Ávila (Sánchez Botija, 1954), más tarde en bovinos, ovinos y caprinos de Salamanca (Simón Vicente, 1969) y también posteriormente en ganado bovino y ovino de Zamora, Córdoba, Badajoz y Cáceres (Simón Vicente y Ramajo, 1982; Mayoral et al., 1989). En los últimos años se ha seguido comprobando la endemidad de la esquistosomosis en rumiantes de Salamanca, sobre todo en bovinos (Ramajo et al., 1995; López-Abán et al., 2004). A este respecto, en un estudio serológico realizado por nuestro grupo en 190 explotaciones de ganado de lidia de la provincia de Salamanca se detectó, tras el análisis por ELISA de 5.600 sueros, la presencia del parásito en el 25 % de las explotaciones (Oleaga et al., 2004).

Como norma general, en las áreas endémicas, la distribución de la esquistosomosis es muy focal debido no sólo a la distribución de los hospedadores intermediarios, los cuales colonizan hábitats muy concretos, sino también al restringido movimiento del ganado entre explotaciones (De Bont y Vercruyse, 1998).

## 1.2. Ciclo biológico

El ciclo evolutivo completo de *S. bovis* fue descubierto por Brumpt (1930). Los vermes adultos son alargados, de 13-44 mm de longitud, y poseen una cutícula resistente formada por un tegumento sincitial con una membrana externa, multilaminada, dotada de pequeñas espinas. En el apartado 2.2. se describe con detalle la estructura y función del tegumento.

Los machos son más gruesos y robustos que las hembras, a las que alojan en un canal ventral o hendidura (*schisto*) que el propio macho posee en su cuerpo (*soma*), de aquí el nombre de *schistosoma*. El macho dispone de 3-6 testículos situados en su tercio anterior y la hembra de un ovario tubular en la mitad posterior, normalmente repleto de huevos. El acoplamiento entre machos y hembras es indispensable para la maduración somática y sexual de ambos sexos.

Las parejas de vermes adultos viven en las venas mesentéricas del hospedador, donde las hembras realizan la puesta de huevos. El huevo, que tiene una espina terminal característica, atraviesa la pared vascular e intestinal, alcanza la luz intestinal y sale al exterior con las heces del hospedador. No está del todo claro qué mecanismo utilizan los huevos para atravesar el endotelio vascular, aunque parece ser que intervienen tanto determinadas enzimas líticas secretadas por el miracidio contenido en los huevos, como otros factores liberados por las plaquetas como consecuencia de la respuesta inmune e inflamatoria del hospedador y determinadas moléculas de adhesión expresadas en las células endoteliales (Ngaiza y Doenhoff, 1990; De Bont y Vercruyssen, 1998; Lejoly-Boisseau et al., 1999).

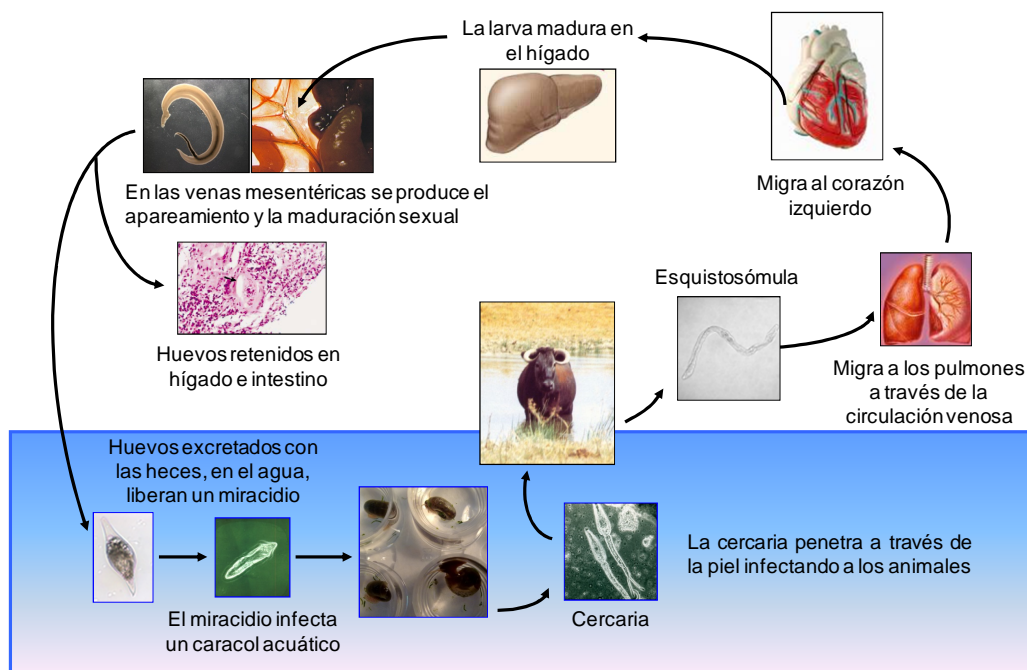
Una vez que el huevo ha salido al exterior, es preciso que se encuentre en un medio acuático, donde la luz y temperaturas de 20-30 °C propician la eclosión de dicho huevo y la liberación del miracidio en menos de 30 minutos. El miracidio es una larva ciliada y móvil que, en el medio acuático, nada libremente durante algunas horas hasta alcanzar un molusco adecuado en el que penetra activamente. Durante el desarrollo intramolusco tiene lugar un proceso de multiplicación asexual en el que se forman esporocistos primarios en la glándula digestiva y secundarios en el hepatopáncreas. Estos últimos dan origen a nuevas larvas, las cercarias, que una vez maduras abandonarán el molusco estimuladas por la temperatura y la luz. Este período de

desarrollo intramolusco dura entre 17 y 120 días dependiendo de la temperatura del agua.

La cercaria, del tipo furcocercaria (cola bifurcada), una vez liberada en el medio acuático nada activamente durante unas horas, hasta encontrar un hospedador definitivo adecuado que haya tomado contacto con el agua contaminada. La cercaria puede permanecer viable hasta 40 horas, aunque su infectividad disminuye rápidamente. La vía natural de acceso activo más común es la percutánea, a través de la piel de las extremidades u otras partes sumergidas y del entorno peribucal, pero puede hacerlo también de forma pasiva por la vía peroral o ingestión (Oleaga y Ramajo Martín, 2004).

Al atravesar la piel, la cercaria pierde la cola, elimina el glicocálix y se transforma en esquistosómula. Esta nueva fase evolutiva migra por las vías vascular y linfática hasta el pulmón y corazón izquierdo, desde donde se distribuye por la circulación arterial hasta el sistema porta-hepático y desde allí a las venas mesentéricas, donde se produce el apareamiento y la maduración sexual. El tiempo que tardan en alcanzar el estadio adulto y, en consecuencia, el comienzo de la puesta de huevos es de 40-45 días desde el inicio de la infección. En hospedadores altamente receptivos (vaca, oveja, cabra) pueden alcanzar el estadio adulto hasta un 60-70 % de las cercarias infectantes.

**Cuadro 1 - Ciclo biológico de *Schistosoma bovis*.**



### 1.3. Patología y clínica

La esquistosomosis por *S. bovis* es una enfermedad crónica que causa importantes pérdidas en las explotaciones ganaderas por su efecto a largo plazo sobre el crecimiento y la productividad de los animales y también por aumentar la susceptibilidad de los animales infectados a otras enfermedades parasitarias y bacterianas (De Bont y Vercruysse, 1998). En las áreas endémicas, esta parasitosis presenta altas prevalencias, pero las infecciones suelen ser de baja o moderada intensidad, cursando en la mayoría de los casos de forma subclínica (Vercruysse et al., 1985).

La gravedad de las lesiones, y en consecuencia de los síntomas, es proporcional a la intensidad de la infección (De Bont y Vercruysse, 1998). En los rumiantes la infección por *S. bovis* se caracteriza habitualmente por una exposición continua a un pequeño número de cercarias, aunque también pueden darse casos de infecciones masivas que llegan a producir la muerte de los animales (Lindberg et al., 1995).

La patogénesis de la esquistosomosis está causada por los huevos que quedan alojados en los tejidos. Aunque algunos vermes adultos pueden morir en pulmones e hígado y originar lesiones focales, éstas en la mayor parte de los casos son poco numerosas y tienen una limitada importancia clínica comparada con la lesión causada por los millones de huevos producidos durante el curso de la infección.

La penetración de las cercarias y la migración de las esquistosómulas causan infiltración celular en torno a los puntos de contacto, intensa reacción linfocitaria y, ocasionalmente, hemorragias y granulomas incipientes en torno a esquistosómulas muertas.

Los efectos patógenos posteriores al período prepatente se deben fundamentalmente al paso de los huevos a través del hígado, tracto alimentario, pulmón y otros órganos (Ferrerías et al., 1998; Ramajo Martín y Muro, 1999; Ferrerías et al., 2000). Los huevos que quedan atrapados en los diferentes órganos y tejidos secretan diversos antígenos que producen una intensa reacción inflamatoria en torno a ellos que conduce a la formación de granulomas. Estos granulomas son áreas de intensa infiltración celular consistentes, principalmente, en infiltrados de eosinófilos, macrófagos, fibroblastos y linfocitos (El-Ansary, 2003). Cuando el huevo muere, el



granuloma se resuelve dejando placas fibróticas en los órganos afectados. La mayor parte de las lesiones producidas por los huevos se localizan en la pared del intestino y en el hígado aunque en ocasiones, particularmente en infecciones masivas, se ven afectados otros órganos como pulmones, páncreas, estómago y abomaso (Hussein et al., 1975).

Paradójicamente, los granulomas que se forman en torno a los huevos también pueden tener un efecto protector. En ratones inmunodeprimidos, en los que no se desarrollan los granulomas, se ha comprobado que tras la infección por *S. mansoni* los animales sufren un severo daño hepático. Este fenómeno parece estar ocasionado por hepatotoxinas secretadas por los huevos, productos que en animales inmunocompetentes son neutralizadas por anticuerpos y secuestradas en el interior de los granulomas (Pearce y MacDonald, 2002).

En los animales afectados, el hígado se muestra endurecido y fibroso, con múltiples nódulos granulomatosos y venas portales dilatadas como consecuencia de la obstrucción circulatoria. En el parénquima hepático y alrededor de los vasos sanguíneos se observan numerosas células mononucleares y polimorfos, así como zonas de degeneración celular en torno a los granulomas, fibrosis perilobular y una intensa reacción inflamatoria del tracto portal (Hussein, 1971).

En el tracto alimentario las lesiones se producen principalmente en intestino y recto. Los depósitos de huevos en la pared intestinal producen enteritis e infiltrados y granulomas en la mucosa, y en ocasiones en la serosa, con múltiples hemorragias. En el intestino delgado se produce una enteritis aguda caracterizada por un intenso exudado mucoso que contiene numerosos huevos y hematíes. Los ganglios mesentéricos presentan hipertrofia e hiperplasia linfo-reticular (Saad et al., 1980).

Cuando resultan afectados, los pulmones también pueden desarrollar granulomas, que aparecen acompañados por inflamaciones perivasculares y peribronquiales. Igualmente, el páncreas puede desarrollar granulomas parenquimatosos con degeneración de acinis (Hussein, 1971).

Clínicamente se distinguen dos síndromes, uno intestinal de evolución frecuentemente aguda y otro hepático con tendencia a la cronicidad.

La forma intestinal aparece a las pocas semanas de la infección, ocurre en el periodo de mayor eliminación de huevos en las heces y se atribuye al paso de un número

elevado de huevos a través de la pared del intestino. Los animales muestran abatimiento, profusa diarrea, dolor abdominal, anorexia y pérdida de peso. Simultáneamente se registra anemia, eosinofilia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipoproteinemia. Se ha observado, sin embargo, que la severidad de la diarrea no disminuye con el número de huevos eliminados, por lo que parece ser que también puede ser consecuencia de otros factores como una respuesta hiperreactiva del hospedador (Saad et al., 1980). Estos mismos autores atribuyen la anemia y la hipoalbuminemia a la intensa hemorragia intestinal. Los elevados niveles de globulinas séricas son indicativos de una estimulación antigénica y el nivel de eosinófilos refleja el grado de respuesta inflamatoria provocada por el parásito (Lawrence, 1977).

El síndrome crónico hepático se manifiesta acrecentando la sintomatología de la forma intestinal excepto en la diarrea. Se añaden además signos nerviosos, ictericia y nuevas alteraciones hematológicas como bilirrubinemia, uremia y elevaciones de las tasas de los indicadores de la funcionalidad hepática (Lawrence, loc. cit.).

#### **1.4. Respuesta inmunitaria**

Como ocurre con otros aspectos, la mayor parte de los estudios sobre la inmunología de la esquistosomosis se han realizado con las especies de *Schistosoma* sp. que infectan a humanos, *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*, siendo muy escasos los trabajos efectuados con las especies de animales.

Aunque la información disponible sobre la inmunología de la infección por esquistosomas de humanos es muy abundante (ver las revisiones de Secor, 2005; Pearce y MacDonald, 2002), por no tener una relación directa con el objetivo de nuestro estudio, a continuación sólo describimos brevemente el modelo de respuesta inmunitaria que se produce en estas infecciones. Según se señala en la revisión de Pearce y MacDonald (2002), la respuesta inmunitaria que inducen las infecciones por *Schistosoma* sp. progresa a través de tres fases y la describen de la siguiente manera. Durante las 3-5 primeras semanas, en las que el hospedador está expuesto a la migración de las fases inmaduras, la respuesta inmunitaria es tipo Th1. A las 5-6 semanas de la infección, que es cuando el parásito madura, se empareja y comienza a producir huevos, el tipo de respuesta cambia drásticamente: disminuyen los componentes propios de las respuestas Th1 y, al mismo tiempo, aparece una intensa

respuesta Th2 inducida por los antígenos secretados por los huevos. Por último, a partir de la semana 12, la infección entra en una fase crónica, en la que la respuesta Th2 disminuye en intensidad y los granulomas que se forman en torno a los nuevos huevos son de menor tamaño que los de las fases precedentes.

Respecto a la respuesta inmunitaria que inducen las infecciones por *S. bovis* se conocen algunas particularidades que señalamos a continuación.

La exposición continua al parásito induce en los rumiantes cierto grado de resistencia natural inmunomediada, que se traduce, por un lado, en descensos de la fertilidad de los vermes, disminuyendo así el número de huevos en las heces y en los tejidos, y por otro, en una mayor resistencia a la re-infección. No obstante, a pesar de la importancia que esta resistencia adquirida tiene en la regulación de la intensidad de las infecciones en el campo, apenas se sabe nada de los antígenos involucrados y de los mecanismos inmunológicos subyacentes (Vercruysse y Gabriel, 2005). Lo único que se conoce es que esta resistencia está mediada por anticuerpos y que no desaparece tras la eliminación de los vermes con praziquantel (Monrad et al., 1995, 2006).

También se ha comprobado, mediante la determinación de citocinas e isotipos/subclases de anticuerpos, que la respuesta inmunitaria frente a las infecciones por *S. bovis* en modelo murino es del tipo Th2, lo que coincide con lo indicado antes. Así mismo, y a diferencia de lo que ocurre en las infecciones por *S. mansoni*, en la inducción de la respuesta tipo Th2 intervienen además de los antígenos de los huevos otros procedentes de los vermes adultos (Viana da Costa et al., 1998).

En los animales infectados con *S. bovis* se da una transferencia de la inmunidad al feto y, en consecuencia, una mayor resistencia a las infecciones en los recién nacidos. Existe un traspaso prenatal, vía placentaria, y postnatal, vía el calostro, de antígenos y anticuerpos específicos. Este fenómeno también se ha observado en *S. mattheei* y *S. japonicum* (Vercruysse y Gabriel, 2005).

En varios trabajos se pone de manifiesto la existencia de una intensa respuesta humoral y se describe la cinética de anticuerpos en rumiantes frente a diferentes extractos antigénicos. En infecciones experimentales en cabras y ovejas se observa que el nivel de anticuerpos frente a los antígenos de adultos se elevó significativamente desde la semana 3-4 de la infección y frente a los de los huevos desde la semana 8. Esta

respuesta humoral aumentó drásticamente después del tratamiento de los animales, lo que indica una estimulación inmune adicional por parte de los antígenos liberados por los vermes muertos (Johansen et al., 1996; Rodríguez Osorio et al., 1999). No obstante, hasta la fecha, no se ha llegado a caracterizar a los antígenos del parásito implicados en estas respuestas.

Sobre los antígenos de *S. bovis* lo único que se conoce, ya desde hace tiempo, es que comparte antígenos con otras especies de esquistosomas, especialmente con *S. haematobium* (Agnew et al., 1989; Losada et al., 2005). En relación con este hecho, en trabajos recientes se ha demostrado la utilidad de los antígenos de *S. bovis* para el diagnóstico de infecciones por *S. mansoni* y *S. intercalatum* (Belo et al., 2002; Pardo et al., 2004).

También se sabe que *S. bovis* tiene similitud antigénica con *Fasciola hepatica* (Hillyer et al., 1987) y que dicha semejanza da lugar al desarrollo de resistencia en infecciones cruzadas de ambos parásitos (Rodríguez Osorio et al., 1993).

### **1.5. Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria**

A pesar de la intensa respuesta inmunitaria que desencadenan, los esquistosomas adultos, lejos de ser aniquilados o expulsados, viven durante años en el lecho vascular de su hospedador definitivo. Esto es debido, entre otras razones, a que el parásito ha desarrollado diversos mecanismos y moléculas con los que neutraliza o manipula a los efectores inmunitarios del hospedador.

La mayor parte de estos mecanismos parasitarios están asociados con su cubierta exterior o tegumento. A continuación destacamos algunos de los más importantes (ver Cuadro 2), todos ellos descritos a partir de las especies de esquistosomas que infectan a humanos (Han et al., 2009).

- Recambio del membranocálix

La continua eliminación y recambio de esta capa externa puede servir al parásito para deshacerse de los anticuerpos y componentes del sistema del complemento adheridos a su superficie y evitar así los efectos deletéreos ocasionados por estos efectores inmunes (Pearce et al., 1986). No obstante, recientemente se ha sugerido que el recambio del membranocálix, o de algunos de sus componentes, puede tardar varios días, lo cual no sería lo suficientemente rápido para eliminar los efectores inmunes aludidos (Schroeder et al., 2009).

- Baja inmunogenicidad del membranocálix por enmascaramiento molecular y mimetismo antigénico

El parásito incorpora en su superficie tegumental diversas moléculas del hospedador. En diversos trabajos se ha demostrado la presencia de antígenos sanguíneos como A, B, H y grupos Lewis, productos del complejo mayor de histocompatibilidad, inmunoglobulinas, componentes del complemento,  $\beta_2$ -microglobulina,  $\alpha_2$ -macroglobulina y una molécula similar al DAF humano (decay accelerating factor) (Loukas et al., 2001). De esta forma los antígenos parasitarios expuestos en la superficie quedan enmascarados y protegidos frente a la repuesta inmunitaria. Al mismo tiempo, la presencia del DAF en la superficie del tegumento puede servir para prevenir la amplificación de la cascada del complemento (Pearce et al., 1990).

Además de adquirir moléculas del hospedador, el parásito también es capaz de sintetizar moléculas similares a las del hospedador, como por ejemplo similares a la  $\alpha_2$ -macroglobulina del hospedador (Abath y Werkhauser, 1996). Como resultado la superficie del tegumento resulta muy poco inmunogénica y no atrae efectores inmunes (Schroeder et al., 2009).

- Presencia de moléculas inmunomoduladoras

Los esquistosomas expresan en su superficie diversas moléculas capaces de neutralizar a los mecanismos efectores del sistema inmunitario como los anticuerpos, el sistema del complemento, diversos mediadores proinflamatorios y enzimas liberadas en

reacciones de citotoxicidad celular. Algunas de estas moléculas inmunomoduladoras parasitarias mejor conocidas son las siguientes:

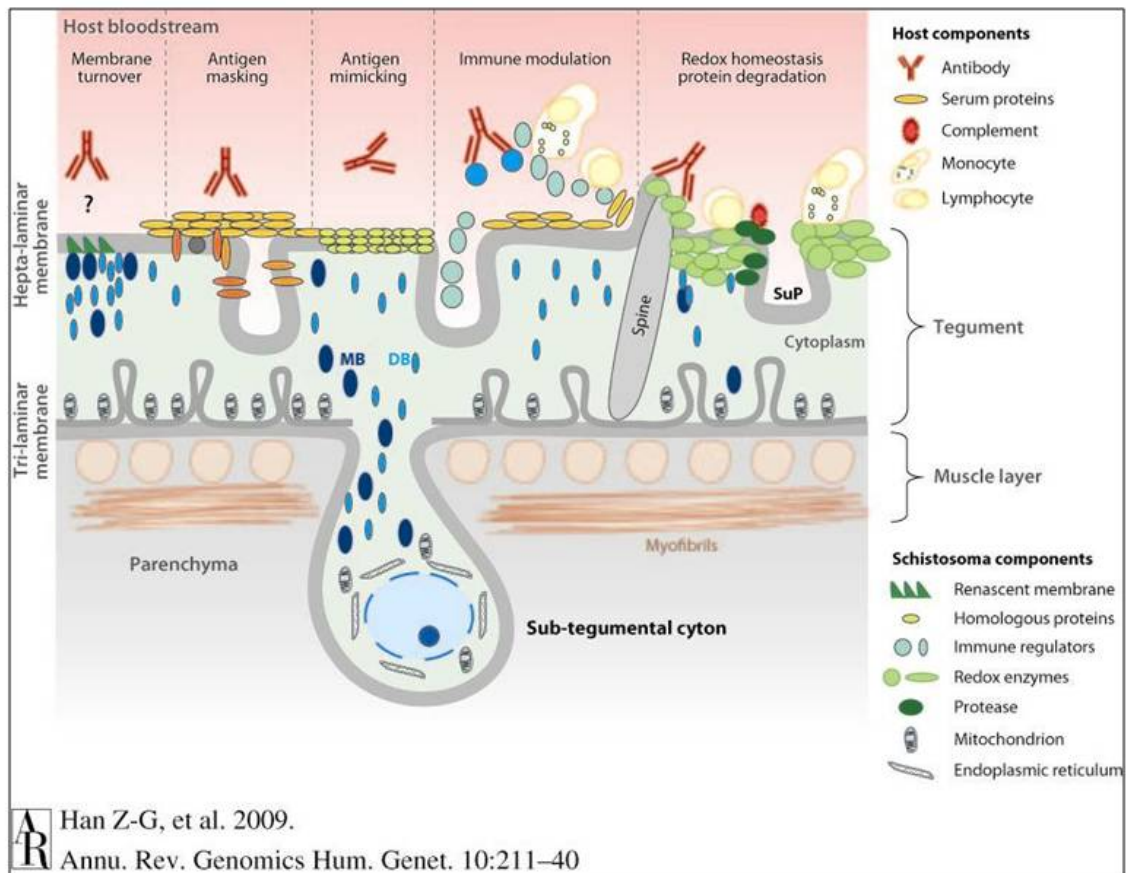
Receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas, que permiten al parásito secuestrar los anticuerpos anulando así los mecanismos efectores mediados por los mismos. Una de estas proteínas es la paramiosina, que forma parte del citoesqueleto de los esquistosomas y ha sido ampliamente estudiada por su interés como antígeno vacunal. Esta proteína no sólo actúa como receptor para la fracción Fc de los anticuerpos (Loukas et al., 2001), también puede unirse al componente C1q del complemento inhibiendo su activación (Laclette et al., 1992). También se ha observado que el parásito tiene capacidad para hidrolizar las inmunoglobulinas secuestradas en su superficie y que, además, en este proceso se libera un tripéptido que interfiere con varias funciones de los macrófagos, como las reacciones de citotoxicidad mediadas por IgE, y con la formación del granuloma (Auriault et al., 1985).

Entre los inhibidores del sistema del complemento (revisados por Fishelson, 1995 y Schroeder et al., 2009) destacan: una molécula de 28 kDa, que degrada los componentes iC3b, C3b y C9 y restringe el ataque de las células efectoras que utilizan receptores de complemento para identificar sus dianas; la P70 (70 kDa), que se une al componente C3b y bloquea la activación a nivel del C3; y la SCP-1 (94 kDa), que se une a los componentes C8 y C9 e impide la formación del complejo de ataque a la membrana.

En relación con las moléculas neutralizadoras se conocen dos: la proteína Sm60, unidora de manosa, que tiene propiedades anti-inflamatorias e induce *in vitro* la migración de los neutrófilos y la desgranulación de los mastocitos (Coelho-Castelo et al., 2002), y la Smpi56, un inhibidor de serina proteasas que bloquea la actividad proteolítica de la elastasa de los neutrófilos (Fishelson, 1995).

#### - Presencia de enzimas anti-oxidantes

Los esquistosomas también expresan en su tegumento enzimas con actividad oxido-reductasa, como la Glutación-S-transferasa, la tioredoxin peroxidasa y la superóxido dismutasa que utilizan para protegerse del estrés oxidativo desencadenado en la respuesta inmune celular (Han et al., 2009).

**Cuadro 2** - Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador.

## 1.6. Diagnóstico

Las infecciones por esquistosomas no presentan, por lo general, unos síntomas característicos que sirvan para diferenciarlas de otros procesos infecciosos o parasitarios. Por lo tanto, la valoración del cuadro clínico no pasa de tener un valor orientativo.

El diagnóstico de la esquistosomosis animal se realiza habitualmente mediante técnicas coprológicas, identificando los huevos del parásito en muestras de heces. El recuento de los huevos es indicativo del nivel de infección. Aunque los métodos de diagnóstico coprológicos resultan bastante laboriosos son unas herramientas muy utilizadas en el campo veterinario (Olaechea et al., 1990). Sus principales inconvenientes son, por una parte, que su sensibilidad disminuye con la edad de los hospedadores, hecho atribuido a la reducción inmunomediada de la fecundidad de los vermes, y por otra, su ineficacia durante el periodo prepatente (Ramajo Martín y Muro, 1999).

Las técnicas serológicas han sido ampliamente utilizadas para el diagnóstico de la esquistosomosis humana, habiéndose desarrollado diferentes pruebas para la detección tanto de anticuerpos como de antígenos circulantes (Mahmoud, 2001). Para la detección de anticuerpos frente a la infección se han utilizado diversos métodos, como la inmunofluorescencia, la hemaglutinación indirecta, la fijación del complemento y el ensayo de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), con buenos resultados en general, aunque la sensibilidad depende en cada caso del antígeno utilizado. Hay que señalar que uno de los inconvenientes que presentan las técnicas de diagnóstico serológico basadas en la detección de anticuerpos es que no permiten discriminar entre infecciones pasadas e infecciones activas y, en consecuencia, no son útiles para evaluar la eficacia de los tratamientos (Jin et al., 2010). Por ello para el diagnóstico de las infecciones humanas resulta más adecuado la detección de antígenos parasitarios en sangre u orina (Gentile et al., 2011). Sin embargo, en la esquistosomosis animal esta cuestión no es tan importante, ya que, por lo general, las infecciones son crónicas y los animales no suelen ser tratados. En este contexto, el principal objetivo no es el diagnóstico individual, sino la detección de los focos o explotaciones donde se encuentra el parásito para poder aplicar en esos lugares las oportunas medidas de control.

También se han desarrollado test serológicos para la detección de los antígenos circulantes anódico y catódico (CAA, CCA), que son antígenos intestinales de esquistosoma que se liberan a la circulación con el vómito del parásito. Estos tests, basados en la técnica de ELISA, muestran una elevada sensibilidad y tienen la ventaja de que el nivel de los antígenos que se detecta en el suero refleja la carga parasitaria. No obstante, un aspecto a tener en cuenta es que los niveles de antígenos circulantes siguen un modelo estacional, con un aumento significativo de los mismos cuando los animales están sometidos a estrés físico o nutricional, lo que implica que en estas situaciones los resultados pueden ser de difícil interpretación (De Bont y Vercruyssen, 1998).

Los estudios más recientes están dirigidos al desarrollo de métodos moleculares para el diagnóstico específico del parásito en los hospedadores intermediarios y en los definitivos. Estos métodos están basados en la amplificación y detección de fragmentos de secuencias genéticas específicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sandoval et al., 2006; Abbasi et al., 2007).



### 1.7. Tratamiento, prevención y control

La prevención y control deben integrar medidas quimioterapéuticas con otras diseñadas para evitar la consecución del ciclo biológico del parásito (lucha contra intermediarios), así como el contacto de los hospedadores con las fases infectantes.

Obviamente, en muchas ocasiones es difícil evitar el contacto de los animales con aguas contaminadas, por lo que para reducir el riesgo de infección se pueden aplicar medidas que disminuyan o eliminen las poblaciones de caracoles. Estas medidas van dirigidas a la introducción de cambios ambientales en los hábitats de los caracoles (drenaje de charcas), la utilización de métodos de control biológico (otros caracoles competidores) o la aplicación de molusquicidas (niclosamida) (Webbe y Jordan, 1993).

En cuanto al tratamiento de la esquistosomosis, antes del lanzamiento al mercado del praziquantel, hace más de 30 años, se utilizaron, en animales, diversos fármacos con probado efecto esquistosomicida pero que presentaban graves inconvenientes como la toxicidad o importantes efectos secundarios. Algunos de estos fueron los antimoniales, la lucanthona e hycanthona, los isocianatos y el triclorfón (neguvon o metrifonato) (De Bont y Vercruyssen, 1998).

Actualmente, en el tratamiento de la esquistosomosis el praziquantel es el fármaco de elección. Es eficaz frente a todas las especies, apenas presenta efectos secundarios y se administra oralmente en una única dosis de 20-30 mg por kilo de peso (Cioli et al., 1995). El praziquantel aumenta el flujo de calcio a través del tegumento y provoca en el parásito una intensa contracción muscular y parálisis. En los vermes se observan alteraciones y daños en la superficie externa del tegumento lo que provoca que, tras el tratamiento, determinadas moléculas parasitarias queden expuestas a los efectores de la respuesta inmune. El fármaco actúa en colaboración con la respuesta inmunitaria del hospedador, siendo ineficaz en ausencia de anticuerpos. En este sentido, se ha comprobado que el tratamiento con praziquantel induce cambios en el perfil antigénico reconocido por el sistema inmune del hospedador (Mutapi et al., 2005).

El desarrollo de algunas resistencias frente al praziquantel, debido a los continuos y masivos tratamientos, y el afán de disponer de fármacos alternativos hace que la búsqueda de nuevos fármacos sea un área de intensa investigación. Un ejemplo

son los derivados de la artemisina cuya administración ha demostrado ser efectiva frente a las fases inmaduras, esquistosómulas y pre-adultos (Liu et al., 2011).

Por otra parte, el coste del tratamiento farmacológico de los animales y su ineficacia en algunas zonas endémicas debido a las altas tasas de reinfección (Geerts y Gryseels, 2000) ha impulsado desde hace años la búsqueda de nuevos métodos de control.

Por este motivo, la búsqueda de una vacuna eficaz ha sido el objetivo de diversos estudios. Aunque se han logrado importantes avances, su desarrollo aún se encuentra en fase experimental. Los primeros trabajos demostraron la eficacia del control inmunológico tras la inmunización de bovinos, en condiciones experimentales y de campo, con cercarias irradiadas de *S. bovis*. En estos ensayos se lograron reducciones del 60-80 % en el número de huevos en heces y tejidos y en el recuento de vermes adultos (Bushara et al., 1978; Majid et al., 1980).

En los últimos años el interés se ha centrado fundamentalmente en la identificación de antígenos protectores definidos, por ser más fáciles de estandarizar y de administrar que las cercarias irradiadas. Una de las primeras moléculas estudiadas ha sido la glutatión-S-transferasa de 28 kDa de *S. bovis* (Sb28GST) (Capron et al., 1994). La inmunización con la Sb28GST, tanto nativa como recombinante, ha proporcionado resultados muy variables, aunque ambas han demostrado ser efectivas en la protección de vacas sometidas a infecciones leves con *S. bovis*. En este sentido, se ha comprobado que la vacunación con la Sb28GST tiene un efecto anti-fecundidad lográndose notables reducciones en el número de huevos en heces (89 %) y en la tasa de huevos viables (93 %). Resultados similares también se han obtenido frente a otras especies de esquistosomas animales, como *S. mattheei* y *S. japonicum* (ver revisión de Vercruyse y Gabriel, 2005).

Otra molécula recientemente ensayada ha sido la proteína 14-3-3 de *S. bovis*. Esta molécula interviene en importantes procesos de señalización celular y ya se ha comprobado que los homólogos de esta proteína producen, en ratones, diversos grados de protección frente a infecciones por *S. mansoni* (25-46 %) (Schechtman et al., 2001), *S. japonicum* (34-45 %) (Zhang et al., 2000) y *Echinococcus multilocularis* (97 %) (Siles-Lucas y Gottstein, 2003). La inmunización de ratones con la proteína 14-3-3 de *S. bovis*,

administrada con diferentes inmunomoduladores, proporciona una protección del 36-61 % frente a infecciones por este parásito (Uribe et al., 2007).

Por último, también se ha demostrado la protección cruzada que proporciona la inmunización con moléculas de otros parásitos. Tal es el caso de las proteínas fijadoras de ácidos grasos (Fatty Acid Binding Protein, FABP) de *F. hepatica*, con las que se han conseguido protecciones homólogas frente a *F. hepatica* y heterólogas frente a *S. bovis*. Tanto la proteína nativa de 12 kDa (Fh12) como la recombinante de 15 kDa (Fh15) inducen, en modelos experimentales, mecanismos efectores que reducen la carga parasitaria y la fecundidad de las hembras (López-Abán et al., 1999, 2000).

## **2. INTERFASE PARÁSITO-HOSPEDADOR**

La interfase esquistosoma-hospedador está constituida, por parte del parásito, por sus productos de excreción-secreción y por su tegumento. En estos compartimentos se expresan las moléculas parasitarias que regulan las relaciones con el hospedador, incluidas las que regulan la interacción con el sistema hemostático.

Por la importancia de estos compartimentos en relación con el objetivo de este estudio, a continuación se describen sus principales características.

### **2.1. Productos de excreción-secreción**

Los esquistosomas, durante su estancia en el hospedador vertebrado, son metabólicamente activos y liberan/secretan moléculas desde sus superficies epiteliales. Los componentes excretados-secretados por el parásito son, por una parte, las moléculas liberadas a partir del tegumento y, por otra, el vómito, que contiene enzimas digestivas y productos de la digestión (Cutts y Wilson, 1997). Los vermes adultos regurgitan el contenido intestinal después de la digestión junto con constituyentes de la membrana intestinal.

La excreción-secreción (E/S) de las cercarias, esquistosómulas y huevos ha sido objeto de diversos estudios (Harrop y Wilson, 1993; Knudsen et al., 2005; Curwen et al., 2006; Cass et al., 2007), a diferencia de lo que ocurre con los vermes adultos, sobre los

que la información es más escasa. En los adultos, como veremos más adelante, la mayor parte de los trabajos, y en especial los más recientes, se han centrado en las moléculas que forman parte del tegumento, independientemente de que éstas sean o no liberadas al medio.

Los mayores problemas que presenta el estudio de los componentes excretados-secretados derivan de la dificultad del cultivar adecuadamente, *in vitro*, a los vermes adultos y del escaso material que se libera al medio. Además, los protocolos de cultivo empleados en estos estudios han sido muy variados, lo que ha originado bastante disparidad en el material liberado y, en consecuencia, en los resultados obtenidos de su análisis (Cutts y Wilson, 1997).

Parece ser que la mayor parte de las proteínas excretadas-secretadas tras el cultivo *in vitro* de vermes adultos proceden del tegumento (Lewis y Strand, 1991). Cutts y Wilson (1997) identifican, en un sistema *in vivo*, 12 antígenos con pesos moleculares de 14-208 kDa, de los cuales 4 son liberados a partir del tegumento y otros 4 a partir de la gastrodermis. En los últimos años, aplicando técnicas de proteómica se han caracterizados los proteomas de un extracto E/S de vermes adultos de *S. japonicum* (Liu et al. 2009) y de la fracción procedente del intestino (“vómito”) de *S. mansoni* (Planchart et al., 2007; Hall et al., 2011).

En relación con la composición del extracto E/S de *S. bovis*, solamente dos trabajos han abordado su estudio, ambos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación. En el primero de ellos se construyó el mapa proteómico del extracto E/S de los vermes adultos y se identificó en él a las proteínas más abundantes y a las proteínas antigénicas (Pérez-Sánchez et al., 2006). En el segundo trabajo se identificaron las proteínas glicosiladas y se analizó la composición de sus grupos glicánicos (Ramajo-Hernández et al., 2007a). En conjunto, se identificaron 14 proteínas parasitarias (Tabla 2), 7 de las cuales presentaban una o varias isoformas antigénicas (fueron reconocidas por sueros de corderos infectados con *S. bovis*), 8 eran glicoproteínas y las 5 restantes (ni antigénicas, ni glicosiladas) fueron seleccionadas por su abundancia en el extracto.

**Tabla 2.** Proteínas identificadas por espectrometría de masas en el extracto E/S de vermes adultos de *S. bovis*.

Proteína	Nº de isoformas	Antigenicidad	Grupo glicánico
SMA22.6	3	+	-
Glutation S-transferasa	4	+	-
Enolasa	2	+	Fuca1-3GlcNAc, Fuca1-2Gal $\beta$
Proteína de superficie	8	+	Fuca1-3GlcNAc, Man $\alpha$ (1-3, 6, 2)Man, GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc (LDN)
GAPDH	4	+	Fuca1-3GlcNAc, Fuca1-2Gal $\beta$ , LeX, LeY
Serpina	3	+	Man $\alpha$ (1-3, 6, 2)Man, GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc (LDN)
Catepsina B	2	+	Fuca1-3GlcNAc
ATP: guanidino quinasa	4	-	Fuca1-3GlcNAc, Fuca1-2Gal $\beta$ , LeX, LeY
FBA	5	-	Fuca1-3GlcNAc, Fuca1-2Gal $\beta$
FABP	1	-	-
Superóxido dismutasa	1	-	-
Anexina	1	-	-
Lisozima	1	-	-
TGR	1	-	-

FABP, proteína unidora de ácidos grasos; FBA, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; LeX, lewis X; LeY, lewis Y; Man, manosa; SMA22.6, antígeno de tegumento; TGR, tioredoxina glutatión reductasa

## 2.2. Tegumento

El tegumento o cubierta externa del parásito es la principal interfase entre este organismo y el medio externo. Dependiendo de la fase evolutiva del parásito, este medio externo puede ser el agua, el interior del caracol y los tejidos o el torrente sanguíneo del hospedador definitivo. La existencia de estos hábitats tan diferentes exige que el tegumento sea una estructura dinámica y adaptable a las diferentes condiciones y requerimientos, y que su estructura y composición varíen en las distintas fases evolutivas del parásito.

Describimos a continuación la estructura y composición del tegumento de los vermes adultos por su importancia en las relaciones con el hospedador vertebrado.

### 2.2.1. Estructura

La superficie de los vermes adultos presenta un aspecto externo arrugado e irregular, con pequeñas protuberancias, estrías y pliegues, así como prominentes espinas superficiales.

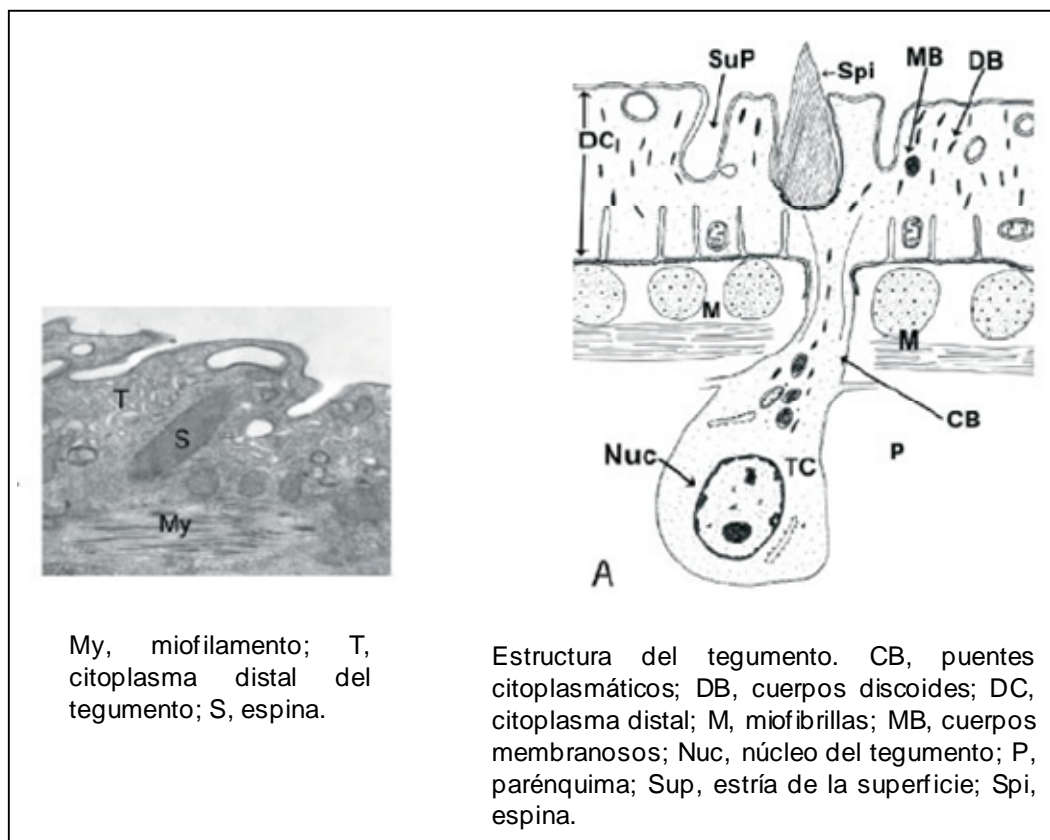
El tegumento de los vermes adultos consiste en un citoplasma sincitial limitado externamente por una membrana (Cuadro 3). Esta membrana externa cubre completamente toda la superficie del tegumento, incluidas las espinas, y consiste en dos bicapas lipídicas estrechamente unidas, que al microscopio electrónico tienen el aspecto de una membrana heptalaminada. Esta doble bicapa lipídica está recubierta por un membranocálix secretado. El citoplasma del tegumento está formado por una matriz libre de ribosomas, que contiene alguna mitocondria y numerosas estructuras vesiculares, tales como los cuerpos elongados o discoides y los cuerpos multilaminares. Una membrana basal separa el sincitio citoplasmático de una capa de células musculares. El núcleo y los ribosomas del sincitio tegumental están en los cuerpos celulares, los cuales se localizan debajo de la capa muscular y se conectan con el sincitio citoplasmático a través de conexiones citoplasmáticas (Skelly y Wilson, 2006; van Hellemond et al., 2006).

Estos cuerpos celulares son responsables de la síntesis de los cuerpos membranosos, los cuales desempeñan un papel importante en la formación y reemplazo

de la doble membrana externa (MacGregor et al., 1988). El cambio o renovación *in vivo* de esta membrana externa se produce continuamente y según Saunders et al. (1987) tiene una vida media de 5 días.

La lámina basal, localizada entre el sincitio y la capa muscular, comparte muchas características estructurales con la de determinados tipos de células de mamíferos, tales como los glomérulos renales, lo que sugiere que tiene funciones de filtración (Gobert et al., 2003). La matriz sincitial alberga el citoesqueleto, el cual conecta la membrana superficial externa con la lámina basal, lo que asegura la suficiente flexibilidad a la superficie de los esquistosomas. Además, el citoesqueleto constituye la base de las espinas que se encuentran en la superficie del tegumento (Jones et al., 2004).

**Cuadro 3** - Estructura del tegumento de *Schistosoma* sp. reproducido a partir de Jones et al. (2004).



La doble membrana externa (doble bicapa lipídica) es una estructura inusual, propia de la familia Schistosomatidae y de otras dos familias de trematodos sanguíneos, Aporocotylidae (parásitos de peces) y Spirorchiidae (parásitos de tortugas). Por el contrario, en las especies de trematodos que viven en el intestino y otras cavidades corporales, la membrana externa es diferente y está formada por una única bicapa lipídica. En consecuencia, se supone que esta particular estructura del tegumento de los esquistosomas es una adaptación para poder sobrevivir en el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado (Abath y Werkhauser, 1996; Skelly y Wilson, 2006).

### 2.2.2. Composición

Dada la importancia del tegumento para la supervivencia del parásito, numerosos trabajos han abordado su caracterización molecular y, en particular, la identificación de sus proteínas. La mayor parte de esos estudios se han llevado a cabo en *S. mansoni* y *S. japonicum*, de los cuales, los más recientes han proporcionado grandes avances en la identificación de las proteínas tegumentales (van Balkom et al., 2005; Braschi et al., 2006a, 2006b; Braschi y Wilson, 2006; Hellemond et al., 2006; Skelly y Wilson, 2006; Mulvenna et al., 2010; Castro-Borges et al., 2011a, 2011b). Típicamente, estos estudios han consistido en el análisis proteómico de todo el tegumento o de parte del mismo tras su fraccionamiento utilizando técnicas diversas, como, por ejemplo, la biotilación de sus proteínas superficiales y posterior purificación de las mismas en cromatografía de afinidad con avidina. El rápido desarrollo de las técnicas de proteómica basadas en la espectrometría de masas, junto con la reciente secuenciación del transcriptoma y del genoma de *S. mansoni* y *S. japonicum* (Verjovski-Almeida et al., 2003; Zhou et al., 2009), han facilitado enormemente dichas identificaciones.

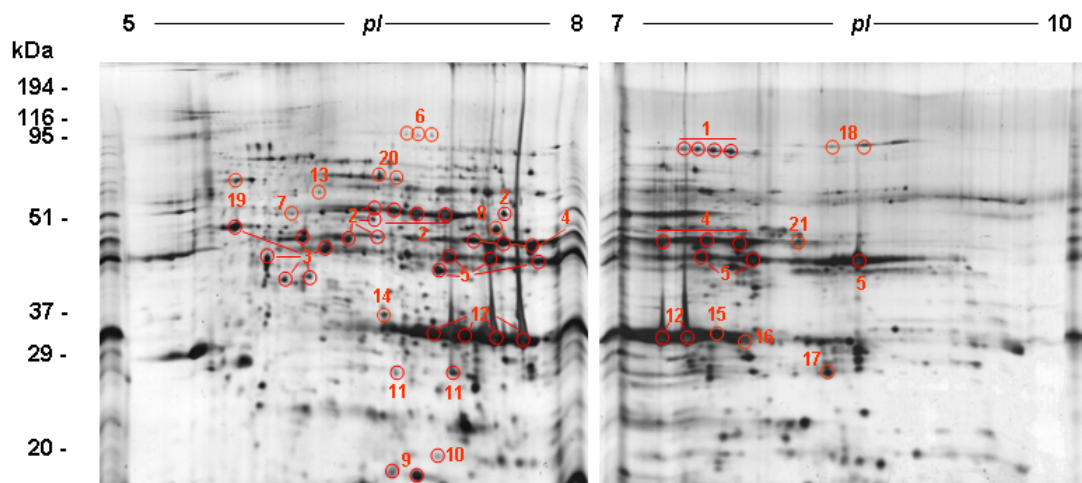
En relación con el tegumento de *S. bovis*, solamente tres estudios han abordado el análisis de su composición, todos ellos llevados a cabo recientemente por nuestro grupo de investigación.

En los dos primeros se construyó el mapa proteómico del tegumento de los vermes adultos (sin distinguir entre sexos) y se identificó en dicho mapa a las proteínas más abundantes, a las proteínas antigénicas y a las proteínas glicosiladas (Pérez-Sánchez et al., 2006; Ramajo-Hernández et al., 2007a). Para ello se obtuvo un extracto proteico del tegumento, el cual se analizó por electroforesis bidimensional (2D) y por



western blot utilizando sueros de corderos infectados y un conjunto de lectinas y anticuerpos anti-glicanos. Los spots más abundantes y los reconocidos por los sueros y/o las lectinas se cortaron a partir de geles teñidos con plata (Cuadro 4) y se analizaron por espectrometría de masas, lo cual permitió la identificación de 21 proteínas, algunas de las cuales presentaban múltiples isoformas.

**Cuadro 4** - Proteoma del tegumento de *S. bovis*. Geles 2D teñidos con plata en los que se señalan los spots cortados e identificados por espectrometría de masas.



En total se identificaron 21 proteínas tegumentales (Tabla 3). De ellas, 5 presentaban una o más isoformas antigénicas (enolasa, antígeno de tegumento Sb22.6, GST, actina y GAPDH); 9 eran glicoproteínas (ATP: guanidino quinasa, enolasa, actina, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, GAPDH, proteína similar a la aconitasa, HSP60, fosfoglucomutasa y fosfoglicerato quinasa) y las 10 restantes fueron seleccionadas para su identificación por su abundancia en el extracto (glucógeno fosforilasa, proteína similar al inhibidor de la disociación del Rab-GDP, precursor de citrato sintasa, proteína de unión a ácidos grasos -FABP-, superóxido dismutasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glioxalasa I, fosfoglicerato mutasa, triosa fosfato isomerasa y adenilato quinasa).

**Tabla 3.** Proteínas identificadas por espectrometría de masas a partir del tegumento de vermes adultos de *S. bovis*.

Spot	Proteína	Nº de isoformas	Antigenicidad	Grupo glicánico
11	Sb22.6	2	+	-
12	Glutación S-transferasa	4	+	-
2	Enolasa	8	+	Fuca1-3GlcNAc, Fuca1-2Gal $\beta$
3	Actina	6	+	Fuca1-3GlcNAc
5	GAPDH	6	+	Fuca1-3GlcNAc, Fuca1-2Gal $\beta$ , LeX, LeY
1	ATP: guanidino quinasa	4	-	Fuca1-3GlcNAc, Fuca1-2Gal $\beta$ , LeX, LeY
4	FBA	3	-	Fuca1-3GlcNAc, Fuca1-2Gal $\beta$
18	Proteína similar a la aconitasa	2	-	Fuca1-3GlcNAc, Fuca1-2Gal $\beta$
19	HSP60	1	-	Fuca1-3GlcNAc
20	Fosfoglucomutasa	2	-	Fuca1-2Gal $\beta$
21	Fosfoglicerato quinasa	1	-	Fuca1-2Gal $\beta$
6	Glucógeno fosforilasa	3	-	-
7	Similar al inhibidor de la disociación de Rab GDP	1	-	-
8	Precursor de citrato sintasa	1	-	-
9	FABP	2	-	-
10	Superóxido dismutasa	1	-	-
13	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	1	-	-
14	Glioxalasa I	1	-	-
15	Fosfoglicerato mutasa	1	-	-
16	Triosa fosfato isomerasa	1	-	-
17	Adenilato quinasa	1	-	-

FABP, proteína unidora de ácidos grasos; FBA, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; HSP60, proteína de choque térmico 60 kDa; LeX, lewis X; LeY, lewis Y; Sb22.6, antígeno de tegumento de *S. bovis*

El tercer trabajo tuvo como objetivo la identificación de las proteínas expresadas en la superficie del tegumento de los vermes adultos por ser éstas las que están expuestas a los tejidos del hospedador y por lo tanto las que previsiblemente desempeñan diversas funciones inmunosupresoras y antihemostáticas necesarias para la supervivencia del verme (Pérez-Sánchez et al., 2008). En este trabajo se analizaron machos y hembras por separado para comprobar si existían diferencias entre ambos sexos en el proteoma de la superficie del tegumento. Para ello, machos y hembras enteros se sometieron por separado a una digestión suave con tripsina con objeto de liberar péptidos de las proteínas expresadas en la superficie, los cuales fueron inmediatamente analizados por espectrometría de masas (LC-MS/MS) para su identificación.

Este tipo de análisis no se había utilizado anteriormente con ninguna especie de esquistosoma y nos permitió: (i) identificar un amplio conjunto de proteínas tegumentales, la mayoría de las cuales no habían sido identificadas previamente en *S. bovis*, y (ii) comprobar que existen diferencias en la composición proteica del tegumento entre machos y hembras (Tabla 4).

Cabe señalar que la digestión trípica liberó péptidos no sólo de proteínas expresadas en la superficie, sino también de proteínas expresadas en capas más internas del tegumento. Por este motivo, para algunas de las proteínas identificadas se comprobó por inmunofluorescencia y microscopía confocal que eran expresadas en la superficie del tegumento. En concreto, se verificó que actina y GAPDH son expresadas en la superficie tanto por los machos como por las hembras y que enolasa solo es expresada en la superficie por los machos.

Más recientemente nuestro equipo también ha llevado a cabo un estudio comparativo del proteoma tegumental de las esquistosómulas pulmonares de *S. bovis* y de las formas juveniles recién desenquistadas de *Fasciola hepática* aplicando en ambos parásitos el mismo el mismo tipo de análisis, esto es, digestión trípica suave de los vermes enteros y análisis por LC-MS/MS de los péptidos liberados. En este estudio se identificó un conjunto de proteínas compartidas por ambos trematodos, y por tanto de potencial utilidad en el diseño de estrategias para el control simultáneo de ambos parásitos (De la Torre-Escudero et al., 2011).

**Tabla 4.** Proteínas identificadas en machos y hembras de *S. bovis* ordenadas en función de su localización subcelular (Pérez-Sánchez et al., 2008).

Localización celular	Proteína	Vermes macho	Vermes hembra
Citoesqueleto	Actinas	X	X
Citoesqueleto	Miosina, cadena pesada	X	X
Citoesqueleto	Miosina, cadena ligera	X	
Citoesqueleto	Paramiosina	X	
Citoesqueleto	Tubulina cadena alfa	X	
Citoesqueleto	Tubulina cadena beta	X	X
Citosol	Proteína 14-3-3	X	
Citosol	Antígeno tegumental 22.6 kDa	X	X
Citosol	Calpaina	X	
Citosol	Calponina	X	
Citosol	Proteína chaperona htpG		X
Citosol	Clon ZZD263 mRNA	X	
Citosol	Factor de Elongación 1-alfa		X
Citosol	Enolasa	X	
Citosol	Factor 3 de iniciación de translación		X
Citosol	Proteína unidora de ácidos grasos 15	X	
Citosol	Fructosa aldolasa	X	
Citosol	Glutation S-transferasa 28 kDa	X	
Citosol	Glicer aldehído-3-fosfato dehidrogenasa	X	X
Citosol	Proteína de choque térmico, 70 kDa	X	X
Citosol	Proteína de choque térmico, 86 kDa	X	X
Citosol	Proteína de choque térmico 60 kDa		X
Citosol	Similar a troponina	X	X
Citosol	Antígeno del huevo p40		X
Citosol	Fosfoglicerato quinasa	X	
Citosol	Similar a glicogeno fosforilasa	X	
Citosol	Tropomiosina (TMII y TMII)	X	
Núcleo	Histonas		X
Membrana Plasmática	Similar a inmunoglobulina	X	
Membrana Tegumental	Antígeno SM20	X	
-	Proteína MF3	X	
-	SJCHGC02374 (Q5DHK2)	X	
-	Proteína de superficie	X	
-	tRNA pseudouridina 5S sintasa	X	

### 3. INTERACCIÓN ENTRE *SCHISTOSOMA SP.* Y EL SISTEMA HEMOSTÁTICO DEL HOSPEDADOR

*S. bovis*, al igual que los esquistosomas que infectan a las personas, vive durante años en los vasos sanguíneos de su hospedador definitivo sin ser eliminado por la respuesta defensiva de éste (inmunitaria y hemostática). Como hemos mencionado, los mecanismos desarrollados por estos parásitos para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador han sido intensamente investigados. Por el contrario, son muy pocos los estudios que han investigado la interacción entre los esquistosomas y los mecanismos hemostáticos de dicho hospedador, a pesar de la gran importancia que puede tener esta interacción en la biología del parásito. En estos estudios se analiza la influencia de los esquistosomas en la agregación plaquetaria y la coagulación y, en los más recientes, la interacción con el sistema fibrinolítico.

#### 3.1. Agregación plaquetaria y coagulación

DeMarco et al. (2003) caracterizaron una ATP-difosfo hidrolasa (apirasa) en la superficie de la cercaria, esquistosómula y adulto de *S. mansoni*. Esta enzima está implicada en la trombo-regulación al promover la hidrólisis de ADP e inhibir la agregación plaquetaria. Paralelamente, Stanley et al. (2003) demostraron que las plaquetas son un mecanismo innato de defensa frente a la infección por *S. mansoni* y que la trombocitopenia que se produce durante la infección puede ser una estrategia desarrollada por el parásito para evadir este mecanismo defensivo. En relación con estos hallazgos, Ruppel et al. (2002) sugieren que esta trombocitopenia podría explicar parcialmente el porqué no se forman coágulos de sangre alrededor de los vermes adultos.

Recientemente, también se ha demostrado que un antígeno tegumental de *S. mansoni*, la proteína Sm22.6, inhibe a la trombina humana y actúa *in vitro* como anticoagulante retrasando el tiempo de coagulación hasta 3-4 veces (Lin y He, 2006). También se ha comprobado que esta proteína tiene interés vacunal, puesto que los niveles de IgE frente a ella están en relación directa con la resistencia a la reinfección (Li et al., 2000) y, además, se ha observado que utilizada en forma recombinante induce protecciones parciales frente a *S. mansoni* (Pacífico et al., 2006). En relación con esta

proteína, nuestro grupo ha identificado su ortólogo en *S. bovis*, la denominada Sb22.6, de la cual se han identificado 3 isoformas, las 3 presentes tanto en el tegumento como en los productos de excreción-secreción del verme adulto (Pérez-Sánchez et al., 2006).

Otra proteína con potencial papel anti-hemostático identificada por nuestro grupo en la interfase *S. bovis*-hospedador ha sido una anexina. Las anexinas son proteínas de membrana unidoras de calcio y fosfolípidos que forman una familia multigénica muy conservada presente en todas las células eucariotas. Las anexinas humanas están implicadas en numerosos procesos biológicos tales como la fusión y el transporte a través de membranas, anti-coagulación, fibrinólisis, interacción con proteínas del citoesqueleto y transducción de señales (Gerke y Moss, 2002; Moss y Morgan, 2004; Draeger et al., 2011). En relación con las funciones anti-hemostáticas, la anexina A2 tiene propiedades anticoagulantes y la anexina A5 actúa como receptor para el plasminógeno en la superficie de las células endoteliales (Hajjar y Krishnan, 1999; Gerke y Moss, 2002; Cederholm y Frostegard, 2007).

En los esquistosomas se han identificado anexinas en la superficie tegumental de *S. mansoni* (Braschi y Wilson, 2006), en la de *S. japonicum* (Mulvenna et al., 2010) y en los productos de excreción-secreción de *S. bovis* (Pérez-Sánchez et al., 2006). Recientemente en el análisis del genoma de *S. mansoni* y *S. japonicum* (<http://www.schistodb.org>), Hoffmann et al. (2010) identifican 14 anexinas en *S. mansoni*, 6 en *S. japonicum* y 1 en *S. haematobium*. De éstas, se ha demostrado que las anexinas 1, 3 y 5 de *S. mansoni* se expresan en la superficie del tegumento de los vermes adultos (Braschi y Wilson, 2006; Mulvenna et al., 2010). Las funciones de las anexinas de los esquistosomas aún se desconocen y se especula que, puesto que se expresan abundantemente en el tegumento, podrían intervenir en mantener la integridad de la membrana plasmática y el membranocalix tegumentales (Braschi y Wilson, 2006).

### 3.2. Sistema fibrinolítico

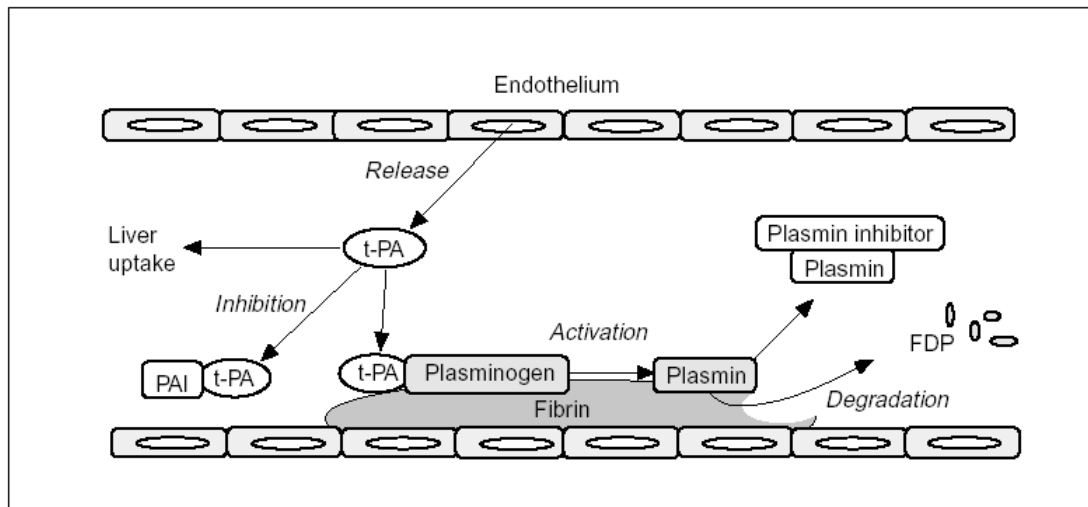
Es un hecho que los vermes adultos de los esquistosomas no inducen la formación de coágulos mientras permanecen en el lecho vascular de sus hospedadores, por lo que cabe suponer que han desarrollado mecanismos para evitar su formación o para disolver los que pudieran formarse. Un mecanismo que podría prevenir la formación de coágulos en la superficie de los vermes es la activación del sistema fibrinolítico.

El sistema fibrinolítico, en el cual el plasminógeno desempeña un papel central, tiene dos importantes funciones que son fundamentales en el mantenimiento de la hemostasia y en la migración celular. Estas funciones son la disolución de los coágulos de fibrina y la desintegración de la matriz extracelular.

El plasminógeno es una glicoproteína de cadena sencilla, con una masa molecular de 92 kDa, sintetizada principalmente en el hígado y presente en la sangre y en otros fluidos extravasculares. El plasminógeno es una proenzima que tras su activación se convierte en plasmina, que es una serina proteasa. La diana principal de la plasmina es la fibrina y también varias proteínas de la matriz extracelular tales como laminina, fibronectina y vitronectina. Igualmente, se ha visto que esta enzima convierte algunos precursores de hormonas y citocinas en sus formas activas y parece ser que también está implicada en la metástasis de ciertos tipos de cáncer (Plow et al., 1995).

En condiciones fisiológicas (Cuadro 5), la activación del plasminógeno y su conversión en plasmina están rigurosamente reguladas. Los mamíferos tienen dos activadores de plasminógeno, el activador de plasminógeno tisular (t-PA) y la urokinasa (u-PA). El t-PA es el principal activador del plasminógeno en la sangre y el u-PA en la matriz extracelular.

Además de las funciones reguladoras de los activadores de plasminógeno (t-PA, u-PA), los inhibidores de la activación del plasminógeno (PAI) y los inhibidores directos de la plasmina, las superficies desempeñan funciones vitales en la regulación de la activación del plasminógeno. Nos referimos tanto a la superficie de la fibrina como a los receptores de plasminógeno de la superficie celular.

**Cuadro 5** - Esquema de la fisiología de la fibrinólisis.

La unión del plasminógeno a sus receptores se lleva a cabo a través de sus cinco dominios específicos denominados “dominios kringle”, los cuales tienen afinidad por los residuos de lisina. La mayor parte de las proteínas identificadas como receptores de plasminógeno tienen residuos de lisina en el extremo carboxilo terminal (Plow et al., 1995), si bien también se han identificado otros motivos internos que intervienen en la activación del plasminógeno (Bergmann et al., 2003).

Los receptores de plasminógeno están presentes, además de en la red de fibrina, en diversos tipos de células, tales como monocitos, macrófagos, células endoteliales, células neuronales, fibroblastos, plaquetas y células cancerosas (Hawley et al., 2000).

También se han identificado receptores de plasminógeno en la superficie de diversas bacterias, hongos, protozoos y helmintos. La interacción entre algunas especies de bacterias y hongos (estreptococos del grupo A, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pestis*, *Borrelia burgdorferi*, *Lactobacillus crispatus*, *Leptospira interrogans* y *Candida albicans*) y el sistema plasminógeno/plasmina ha sido extensamente estudiada. Diversos autores han comprobado que la activación del plasminógeno es una estrategia utilizada por estos patógenos para facilitar la infección en el hospedador y favorecer su diseminación por el organismo (Goguen et al., 2000; Lähteenmäki et al., 2001; Crowe et al., 2003; Hurmalainen et al., 2007; Vieira et al., 2010). Entre los receptores de plasminógeno identificados hasta la fecha en esos patógenos se encuentran, curiosamente, dos enzimas glucolíticas, la enolasa y la GAPDH, cuyas isoformas expresadas en la superficie fijan el



plasminógeno del hospedador y potencian su activación (Hurmalaínen et al., 2007; Bergmann y Hammerschmidt, 2007).

Del mismo modo, y al parecer con el mismo fin, los protozoos *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi* fijan y activan plasminógeno, siendo capaces, además, de potenciar la activación inducida por el t-PA (Avilán et al., 2000; Almeida et al., 2004; Mundodi et al., 2008). Recientemente se ha demostrado que la enolasa de la superficie de los promastigotes de *L. mexicana* y de los trofozoítos de *T. vaginalis* es la molécula que actúa como receptor del plasminógeno (Vanegas et al., 2007; Mundodi et al., 2008).

En helmintos también se han identificado dos proteínas fijadoras de plasminógeno: la enolasa en *F. hepatica* y *Onchocerca volvulus* y la GAPDH en *O. volvulus*, si bien, hasta la fecha, no se ha estudiado el significado biológico de esta interacción (Jolodar et al., 2003; Bernal et al., 2004; Erttmann et al., 2005).

En esquistosomas, las únicas investigaciones acerca de la posible interacción de estos vermes con el sistema fibrinolítico de su hospedador son las llevadas a cabo por nosotros con *S. bovis*. El primer indicio que encontramos acerca de la interacción entre *S. bovis* y el sistema fibrinolítico fue la identificación, en el proteoma del tegumento de los vermes adultos, de varias isoformas de enolasa y de GAPDH (Pérez-Sánchez et al., 2006), dos proteínas que, como acabamos de mencionar, son utilizadas por diversos patógenos para fijar y activar plasminógeno.

En un trabajo posterior (Ramajo-Hernández et al., 2007b) se comprobó que el extracto de tegumento de vermes adultos de *S. bovis* une plasminógeno y que dicha unión activa la generación de plasmina tanto en presencia como en ausencia del activador fisiológico t-PA. También se demostró, por inmunofluorescencia y microscopía confocal, que el plasminógeno se une a la superficie del tegumento de los machos, pero no al de las hembras, y que la unión del plasminógeno tanto al extracto de tegumento como a la superficie de los machos era inhibida por un análogo de lisina, el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico ( $\epsilon$ -ACA). Por último, en este trabajo se identificaron 10 proteínas del extracto de tegumento con capacidad para unir plasminógeno. Este fue el primer estudio en el que se demostró que una especie de esquistosoma interactúa con el sistema fibrinolítico del hospedador, prestando mayor solidez a la hipótesis de que los

esquistosomas adultos utilizan el plasminógeno del hospedador para evitar la formación de coágulos en su superficie, mecanismo que podría resultar nocivo para el parásito.

De las 10 proteínas fijadoras de plasminógeno identificadas en el tegumento de los vermes adultos de *S. bovis*, las mayoritarias corresponden a diferentes isoformas de enolasa, GAPDH y actina. De éstas, la que está mejor caracterizada como receptor de plasminógeno en otros organismos es la enolasa.

La enolasa es una proteína glucolítica multifuncional incluida en una nueva clase de proteínas de superficie que no utilizan la maquinaria clásica para su transporte a la superficie celular (Pancholi, 2001). Como hemos mencionado, se ha observado que actúa como ligando de plasminógeno en la superficie de bacterias (Bergmann et al., 2001), hongos (Jong et al., 2003) y protozoos Trypanosomatidae (Vanegas et al., 2007; Avilán et al., 2011), y además se ha encontrado en diversos tejidos de *O. volvulus* (Jolodar et al., 2003), en los productos de excreción-secreción de *F. hepatica* (Bernal et al., 2004) y de algunos insectos (*Aphidius ervi*, Falabella et al., 2009), así como en la saliva de garrapatas (Díaz-Martín et al., 2012). Nuestro grupo identificó en el tegumento de *S. bovis* hasta 8 isoformas de enolasa que fijan plasminógeno, de las cuales 4 son reconocidas por anticuerpos de corderos infectados con este parásito.

La GAPDH, al igual que la enolasa, es también una enzima glucolítica que se ha identificado en la superficie de células bacterianas y fúngicas, en las que fija y activa el plasminógeno (Crowe et al., 2003; Bergmann et al., 2004). Erttmann et al. (2005) también evidencian que una forma recombinante de la GAPDH de *O. volvulus* une plasminógeno. En el tegumento de *S. bovis* se han identificado tres isoformas de GAPDH que fijan plasminógeno, de las cuales dos son antigénicas.

La enolasa y la GAPDH se han identificado también en extractos de tegumento de *S. mansoni* y *S. japonicum* (Braschi et al., 2006; Liu et al., 2006), aunque no hay estudios que verifiquen su expresión en la superficie del tegumento. En el caso de la GAPDH, esta proteína se ha localizado por técnicas proteómicas (De la Torre-Escudero et al., 2011) e inmunohistoquímicas en la superficie de las esquistosómulas (Charrier-Ferrara et al., 1992; Tallima y El Ridi, 2008), aunque otros autores opinan que este hallazgo es un artefacto consecuencia de la eliminación de la cubierta, ya que las enzimas glucolíticas tegumentales se encuentran en el subtegumento (Braschi et al., 2006).

Respecto a la actina, se sabe desde hace tiempo que se une a plasminógeno y acelera la generación de plasmina activada por el t-PA (Lind y Smith, 1991). En esquistosomas, esta proteína forma parte de las miofibrillas del tegumento y es el componente mayoritario de las espinas presentes en la superficie de los vermes (Jones et al., 2004). En *S. bovis* se han identificado seis isoformas de actina, cuatro de las cuales fijan plasminógeno.

Las otras proteínas fijadoras de plasminógeno identificadas en el tegumento de *S. bovis* han sido: ATP: guanidino quinasa, triosa-fosfato isomerasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glioxalasa I, adenilato quinasa, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa y fosfoglicerato mutasa (Ramajo-Hernández et al., 2007b). Las dos últimas también han sido identificadas en la pared de *Candida albicans*, donde unen plasminógeno (Crowe et al., 2003).

Por el momento se desconoce cuál o cuáles de las proteínas unidoras de plasminógeno, identificadas en el extracto de tegumento de *S. bovis*, pueden tener relevancia biológica como receptores de plasminógeno *in vivo*, para lo que, en principio, es preciso que se expresen en la superficie externa del tegumento, en contacto con la sangre del hospedador.



# MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MATERIAL PARASITARIO

### 1.1. Animales de experimentación

Para la realización del presente trabajo se han utilizado las siguientes especies animales: ovino, hámster, conejo y caracoles acuáticos de la especie *Planorbarius metidjensis*.

Los ovinos fueron corderos de raza castellana procedentes de la explotación experimental del IRNASA (Código ES37040000027), en cuyas instalaciones se mantuvieron durante el tiempo que requirieron los experimentos. Esta especie es un hospedador natural de *S. bovis* y soporta una carga parasitaria elevada, por lo que resulta más productivo que otros modelos experimentales en la obtención de material parasitario permitiendo reducir al mínimo el número de animales necesarios. Por estos motivos se utilizaron corderos como hospedador definitivo tanto para el mantenimiento rutinario del ciclo biológico de *S. bovis* como para la obtención de material parasitario de vermes adultos.

Los hámsteres (*Mesocricetus auratus*) se adquirieron a Charles River Laboratories y se mantuvieron en el animalario del IRNASA (Nº de Registro, P.A.E.-SA.002) alimentados con pienso concentrado (Harlan), zanahorias y agua *ad libitum*. Estos animales fueron utilizados para la obtención de esquistosómulas pulmonares y para la producción de sueros anti-*S. bovis*.

Los conejos usados, de raza New Zealand White, se adquirieron a la Granja Cúncula San Bernardo S.L. y se mantuvieron en el animalario del IRNASA alimentados con pienso (Agricentro, S.L.) y agua *ad libitum*. Estos conejos se utilizaron para la obtención de sueros hiperinmunes frente a las proteínas recombinantes de *S. bovis*.

Los caracoles de la especie *P. metidjensis* se emplearon como hospedadores intermediarios naturales para el desarrollo del ciclo parasitario. Estos caracoles fueron recogidos en cursos acuáticos de la provincia de Salamanca y con ellos se ha establecido una colonia de laboratorio, que se mantiene en acuarios alimentada con algas y berros.

## 1.2. Parásitos

Los estudios descritos en esta memoria se han llevado a cabo utilizando una cepa autóctona de *Schistosoma bovis*. Esta cepa fue registrada en 1970 en el “Internacional Register of Living Helminths Species and Strains” de la OMS con el nombre de “*Schistosoma bovis*: Villar de la Yegua-Salamanca (Spain) strain”.

## 1.3. Mantenimiento del ciclo biológico de *S. bovis*

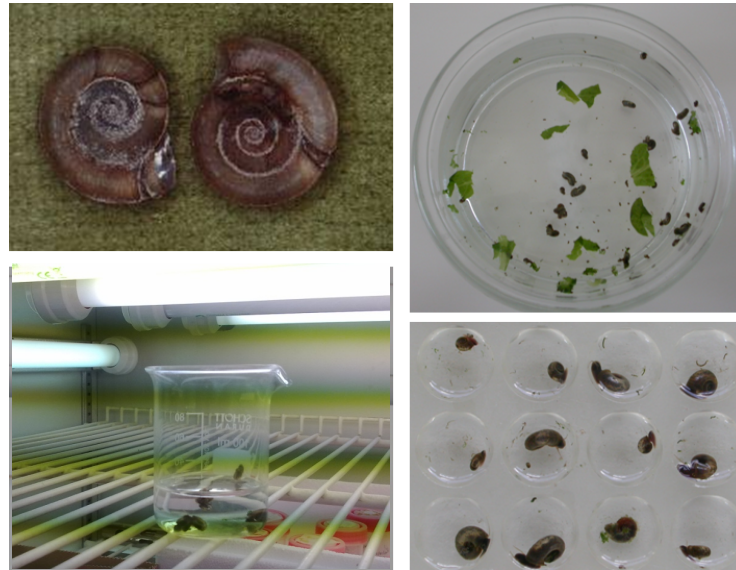
El ciclo parasitario se reproduce rutinariamente en corderos, hámsteres y caracoles.

Los miracidios de *S. bovis* se obtienen a partir de huevos eliminados con las heces por corderos previamente infectados. Para ello, las heces frescas se suspenden en agua y se filtran por un tamiz de 350  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro a fin de retirar el material más grueso. El filtrado obtenido se filtra de nuevo por un tamiz de 40  $\mu\text{m}$  en el que, por su tamaño (200  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ ), quedan retenidos los huevos de *S. bovis*. Los huevos se recogen en placas de Petri con agua y, acto seguido, se induce su eclosión mediante incubación en cámara de simulación ambiental a 25 °C y exposición a la luz durante 30 minutos. Los miracidios recién eclosionados se utilizan inmediatamente para infectar caracoles.

Los caracoles se infectan individualmente utilizando placas de metacrilato de 24 pocillos. Para ello, cada caracol es colocado en un pocillo junto con 5 miracidios y 3 mL de agua y, acto seguido, la placa se incuba a 25 °C y luz intensa durante 3-4 horas.

Una vez infectados, los caracoles se trasladan a pequeños acuarios de 2 litros en los que se mantienen a 28 °C, en oscuridad, durante 25-28 días, período a partir del cual comienzan a emitir cercarias cuando son expuestos a la luz. Para inducir la emisión de cercarias, los caracoles infectados se distribuyen en lotes de unos 15 individuos, depositándolos en vasos de precipitados con 50 mL de agua y exponiéndolos a una luz intensa durante dos horas a temperatura ambiente (20-25 °C). Las cercarias recién emitidas se utilizan entonces para infectar nuevos hospedadores definitivos, principalmente corderos y, en ocasiones, hámsteres, como se describe en el siguiente apartado.





*Planorbarius metidjensis*: acuario y placa multipocillo en la que se realiza la infección con miracidios, vaso de precipitados con caracoles infectados emitiendo cercarias.

#### 1.4. Infecciones experimentales y obtención de vermes adultos y esquistosómulas

Con el fin de obtener vermes adultos, los corderos se infectaron percutáneamente con 2.000 cercarias cada uno. Para ello se sumergió una extremidad anterior del animal en 150 mL de la suspensión de cercarias durante 30 minutos. A los 6 meses de la infección, los corderos fueron sedados con 10 mg de ketamina por kg de peso y después sacrificados por desangrado tras seccionarles la vena yugular. Los vermes adultos se recogieron mediante disección de las venas mesentéricas, se depositaron en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 a 37 °C y se lavaron cuidadosamente cambiando el medio varias veces. A continuación se examinaron microscópicamente para comprobar que estaban vivos e intactos y se procesaron inmediatamente para la obtención de los extractos proteicos (apartado 1.5), la extracción de ARN (apartado 2.1.1) o para los análisis por inmunofluorescencia y microscopía confocal (apartado 4.2).

Las esquistosómulas pulmonares se obtuvieron a partir de hámsteres siguiendo el procedimiento descrito por Gui et al. (1995). Para ello estos animales se infectaron por vía percutánea con 1.000 cercarias, mediante el procedimiento de baño individual durante 1 hora y se sacrificaron a los 6 días post-infección. Sus pulmones fueron extraídos, troceados finamente e incubados en medio RPMI durante 2 horas a 37 °C en agitación. A continuación, la solución con el tejido pulmonar se filtró y las

esquistosómulas se recogieron a partir de este filtrado, libres de restos de tejido, con la ayuda de una lupa binocular. Acto seguido se fijaron y conservaron a 4 °C para los estudios por inmunofluorescencia.

Con el fin de disponer de sueros anti-*S. bovis* y evaluar el comportamiento diagnóstico del antígeno Sb22.6 (ver apartado 5), un grupo de 6 hámsteres fueron infectados con 150 cercarias cada uno mediante el mismo procedimiento de baño individual. De todos estos animales se tomaron muestras de sangre antes de la infección y a las 4, 8, 12 y 16 semanas post-infección. Los sueros correspondientes fueron separados y conservados a -80 °C. En la decimosexta semana los hámsteres fueron sacrificados y los vermes adultos desarrollados en la vena porta fueron recogidos comprobándose así la viabilidad e intensidad de las infecciones.

### **1.5. Preparación de extractos proteicos de vermes adultos de *S. bovis***

Se han utilizado dos tipos de extractos proteicos de vermes adultos de *S. bovis*: la fracción soluble de un extracto de vermes adultos (SbC) y un extracto de su tegumento (TG).

El extracto SbC, se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito por Oleaga y Ramajo (2004). Los vermes adultos se suspendieron en PBS con inhibidores de proteasas (ver más adelante) y la suspensión fue homogenizada inicialmente con un homogeneizador de vidrio y a continuación por sonicación en hielo a 60 vatios, en 3 ciclos de 2 minutos, con pausas de 1 minuto. El homogenado se centrifugó a 100.000 g durante 1 hora a 4 °C y el sobrenadante se recogió y dializó durante 24 horas a 4 °C frente a PBS.

El extracto de tegumento (TG) se obtuvo siguiendo el protocolo descrito por Pérez-Sánchez et al. (2006), que detallamos a continuación.

Los vermes adultos recién extraídos se lavaron dos veces en tampón Tris salino (TBS) y se incubaron en Triton X-100 al 1 % en TBS a 4 °C, con agitación suave, durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se recuperó el medio de esta incubación, al que denominamos extracto TG.

Una vez separados los vermes, se añadió también una mezcla de inhibidores de proteasas siguiendo las indicaciones de Maizels et al. (1991). Dichos inhibidores y la concentración a la que se usaron fueron los siguientes:

Inhibidor	Concentración
EDTA	1 mM
N-Etilmaleimida	1 mM
Sulfofluoruro de metilfenilo (PMSF)	1 mM
Pepstatina A	0,1 $\mu$ M
N-tosilamida-L-fenilalanina clorometilcetona (TPCK)	0,1 mM

El extracto TG, fue clarificado por centrifugación a 10.000 g y 4 °C durante 30 minutos y el sobrenadante se dializó durante 24 horas.

La concentración proteica de cada extracto se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## 2. MÉTODOS MOLECULARES

### 2.1. Clonación y secuenciación del cDNA codificante de enolasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, anexina y antígeno 22.6 de *S. bovis*

#### 2.1.1. Extracción de RNA total de vermes adultos y amplificación por RT-PCR de los correspondientes cDNAs

El RNA total se purificó a partir de vermes adultos recién extraídos de corderos. Para ello se utilizó el kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante.

Este RNA total se utilizó directamente, sin purificar el RNA mensajero (mRNA), para la síntesis de la primera cadena del DNA complementario (cDNA). La reacción de transcripción reversa (RT) se llevó a cabo utilizando el kit 1<sup>st</sup> Strand cDNA Síntesis (Roche) y el oligo-p(dT)<sub>15</sub> como cebador. La mezcla de reacción, detallada en la tabla siguiente, se incubó 10 minutos a 25 °C, 60 minutos a 42 °C, 5 minutos a 99 °C y 5

minutos a 4 °C. El cDNA monocatenario resultante se almacenó a -80 °C hasta el momento de ser utilizado.

<b>Componente</b>	<b>Volumen (µL)</b>
Buffer de reacción 10x	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4
dNTPs	2
Oligo-p(dT) <sub>15</sub>	2
Inhibidor de RNAsa	1
Transcriptasa reversa AMV	1
RNA	8
<b>Volumen total</b>	<b>20</b>

La amplificación de las secuencias codificantes de cDNA de enolasa (ENO), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa (FBA), anexina (ANX) y antígeno 22.6 (Sb22.6) se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se diseñaron cinco pares de cebadores degenerados a partir de las secuencias consenso obtenidas por alineamiento de los correspondientes cDNAs de las proteínas homólogas de otras especies de *Schistosoma*, concretamente de *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*.

En la tabla siguiente se muestran los nombres y secuencias de los cebadores utilizados para cada proteína, junto con los códigos de identificación en la base de datos GeneBank de las secuencias de *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium* empleadas para diseñar dichos cebadores.

Proteína	<i>S. mansoni</i> (GeneBank)	<i>S. japonicum</i> (GeneBank)	<i>S. haematobium</i> (GeneBank)	Nombre y secuencia del cebador	
ENO	AAC46886	P33676		EnoFw	ATGKCMATTWTARCGATYCACG
				EnoRv	TYAKTYTTKRGGATGGCGG
GAPDH	M92359	U75511		GapdhFw	ATGTCGAGAGCAAAGGTTGG
				GapdhRv	TTATGCATGGTCGACTTTATGC
FBA	AF026805	DQ497791		FBAFw	ATGYCACGMTTCCMACCTTAYC
				FBARv	TTAATAAGCATGATTAGCAAC
ANX	AF065599	AY813612		ANXFw	ATGGCYAAWRTTCTGRATTTGG
				ANXRv1	TTATTGTTCTTCATTATATATTC
				ANXRv2	TTATTCACCTAGACCACATAATG
Sb22.6	DQ059818		AAW49250	22.6Fw	ATGKCAACCGARACGARATTRAG
				22.6Rv	TTACTGAGATGGTGTCTCC

Las letras “consenso” utilizadas para indicar las posiciones degeneradas son las recomendadas por la “Unión Internacional de Química Pura y Aplicada” y la “Unión Internacional de Bioquímica” (IUPAC/IUB) (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac>). ENO, enolasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; FBA, fructosa bisfosfato aldolasa; ANX, anexina; Sb22.6, antígeno 22.6.

La mezcla de reacción y las condiciones en las que se llevaron a cabo las distintas PCRs fueron las siguientes:

Componente	Volumen (µL)
Tampón Taq 10X	2,5
dNTPs 25 mM	2,5
Cebador Fw 50 µM	1
Cebador Rv 50 µM	1
DNA Taq (Takara)	0,1
cDNA	3
Agua	12
<b>Volumen final</b>	<b>25</b>

Condiciones de la PCR: 5 ciclos (94 °C durante 40 s, 42 °C durante 40 s y 72 °C durante 90 s) + 30 ciclos (94 °C durante 40 s, 48 °C durante 40 s y 72 °C durante 90 s) + 72 °C durante 7 minutos.

En cada amplificación se incluyó un control negativo en el que el cDNA fue sustituido por agua ultrapura (Milli-Q).

### 2.1.2. Purificación de los productos de PCR

Los fragmentos de cDNA amplificados en estas PCRs se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en Tris-Borato-EDTA (TBE) con 0,005 % de bromuro de etidio.

Las bandas correspondientes a los productos de PCR se cortaron de los geles de agarosa y se purificaron con el kit StrataPrep DNA gel extraction (Stratagene) siguiendo el protocolo del fabricante. Los cDNAs purificados se resuspendieron en agua ultrapura estéril y su concentración se determinó por espectrofotometría en el NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc.).

### 2.1.3. Clonación en el vector de secuenciación pSC-A

Tras su purificación, los productos de PCR se clonaron en el vector plasmídico pSC-A, utilizando el kit StrataClone PCR Cloning kit (Stratagene) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las construcciones cDNA-pSC-A resultantes se utilizaron para transformar células competentes (*Escherichia coli* SoloPack) suministradas en el kit. Tras la transformación, las células se sembraron en placas de agar con 100 µg/mL de ampicilina y 80 µL/placa de X-gal al 2 %. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y al día siguiente se seleccionaron varias colonias recombinantes (de color blanco) de cada una de las transformaciones y se inocularon en cultivos de 5 mL de medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina (100 µg/mL). Estos cultivos se incubaron a 37 °C, en agitación, hasta el día siguiente.

Las células de los distintos cultivos se recuperaron por centrifugación, se lisaron y se extrajo su DNA plasmídico utilizando el kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel). La presencia de inserto en los plásmidos purificados se verificó mediante digestión con la enzima de restricción EcoRI (Takara).

Para la digestión, las mezclas de reacción indicadas en la tabla se incubaron a 37 °C durante 2 horas y los productos resultantes se analizaron en geles de agarosa al 1 %.

Componente	Volumen (µL)
DNA plasmídico	10
Buffer H (10x)	2
EcoRI	1
Agua	7
<b>Volumen total</b>	<b>20</b>

Los plásmidos recombinantes se secuenciaron en ambas cadenas con los cebadores T3 y T7 en el servicio de secuenciación automática de la Universidad de Salamanca. Las secuencias obtenidas fueron analizadas, depuradas y alineadas utilizando las aplicaciones Chromas 1.45 y Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

En el caso del cDNA de la ENO, para completar la secuencia de la zona central de la molécula fue preciso realizar una secuenciación adicional empleando dos cebadores internos diseñados *ad hoc* sobre los extremos de la zona central no secuenciada.

Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Posición
ENOintFwd	TATCCCCGTAAGTACCAAG	243-262
ENOintRev	TGCATCAGGACTAAGCCAGG	810-790

La correcta identidad de todas las secuencias nucleotídicas obtenidas se confirmó mediante un análisis BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), y las correspondientes secuencias aminoacídicas se obtuvieron con la aplicación “Translate” del servidor ExPaSy (<http://web.expasy.org/translate/>).

#### 2.1.4. Análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos

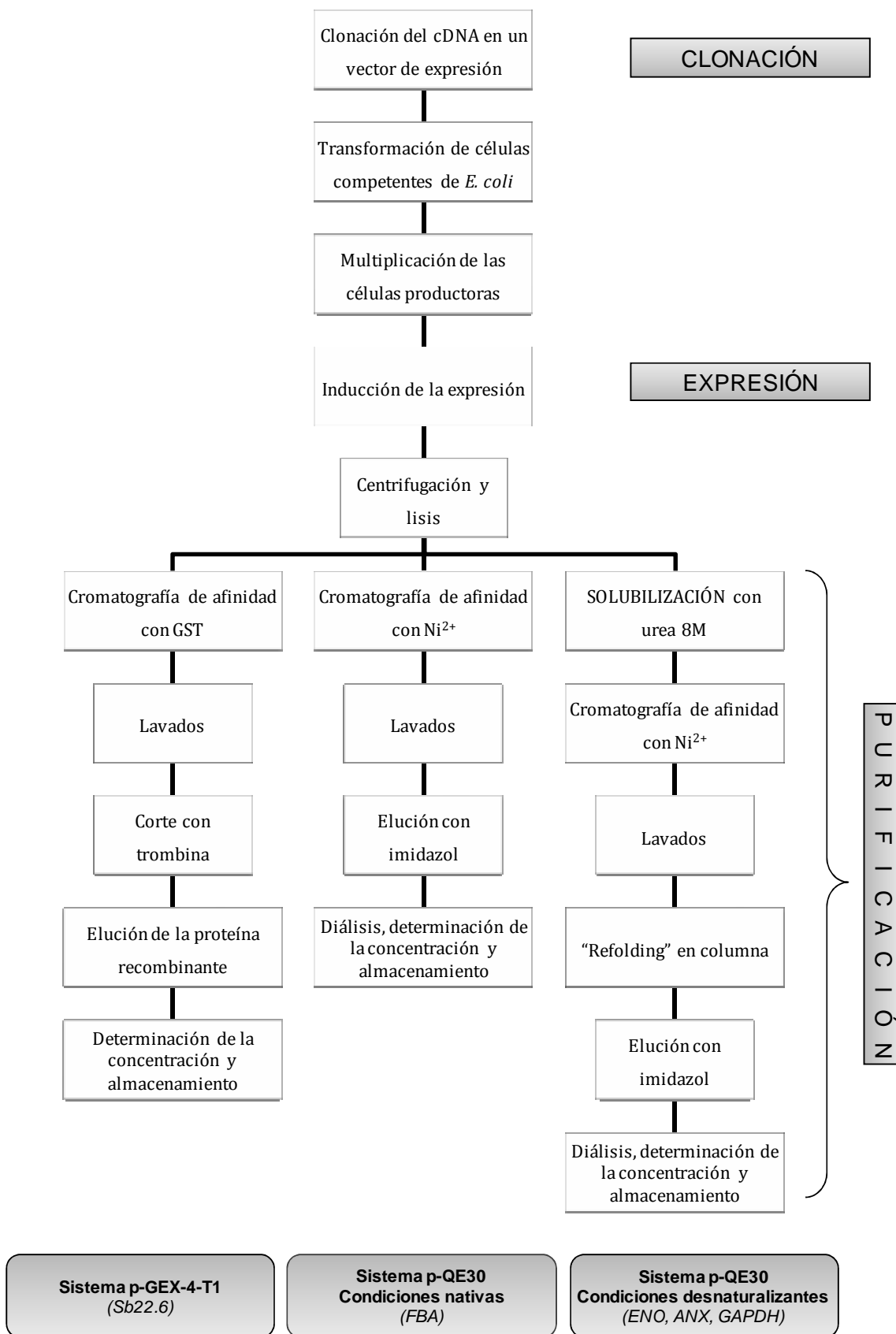
Las secuencias aminoacídicas se sometieron a un análisis *in silico* utilizando las siguientes herramientas bioinformáticas: búsqueda por BLAST de secuencias homólogas en las bases de datos NCBI, Swissprot/Uniprot y SchistoDB (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.uniprot.org/>, <http://www.genedb.org/Homepage/>); análisis de dominios conservados con SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>); cálculo del punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (PM) ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)); predicción de dominios

transmembrana con TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>); predicción de la existencia de péptido señal con SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>); búsqueda de dominios GPI de anclaje a la membrana con big-PI Predictor (Eisenhaber et al., 2000) ([http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html)); alineamientos múltiples con ClustalW 2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>); análisis filogenético con Mega 5.05 (Tamura et al., 2011); predicción de la estructura secundaria y modelado tridimensional con Swiss-Model (Arnold et al., 2006) (<http://swissmodel.expasy.org/>). El modelo tridimensional de la molécula se visualizó con la aplicación Pymol package (DeLano, 2002).

## **2.2. Producción de las proteínas recombinantes**

La producción de las distintas proteínas recombinantes se llevó a cabo en tres pasos: subclonación en un vector de expresión adecuado, inducción de la expresión y purificación de la proteína, tal como se indica de forma esquemática en el siguiente diagrama.





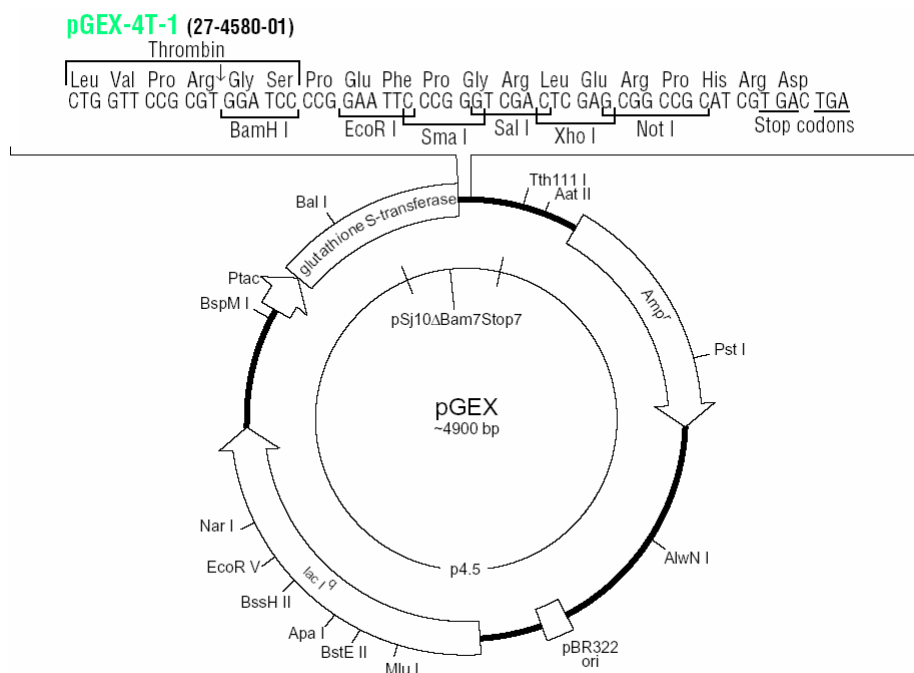
Como el procedimiento utilizado con cada proteína varió en lo referente al vector de expresión y las condiciones específicas de purificación, a continuación detallamos las distintas estrategias seguidas.

### 2.2.1. Subclonación del cDNA en un vector de expresión

Para la producción de proteínas en forma recombinante el primer paso es insertar el cDNA codificante en un vector de expresión adecuado. En este estudio se han utilizado dos vectores de expresión: pGEX-4T-1 (Amersham) para la subclonación del antígeno Sb22.6 y pQE-30 (Qiagen) para la subclonación de la ENO, GAPDH, FBA y ANX.

#### 2.2.1.1. Subclonación de Sb22.6 en pGEX-4T-1

La finalidad de esta subclonación es obtener una construcción plasmídica que una vez introducida en células adecuadas permita la expresión de Sb22.6 como proteína de fusión con glutatión S-transferasa (GST), incluyendo entre ambas un sitio de corte para trombina (ver figura a continuación). De este modo la proteína recombinante Sb22.6 puede ser capturada mediante cromatografía de afinidad con glutatión-sefarosa y posteriormente eluida tras la incubación con trombina.



En este caso se empleó la subclonación directa desde pSC-A a pGEX-4T-1 utilizando el sitio EcoRI presente en ambos vectores y tras comprobar con el programa NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) que la secuencia de Sb22.6 no presentaba ningún sitio de corte interno para esta enzima.

Las condiciones de reacción para la digestión de la construcción pSC-A-Sb22.6 y del vector pGEX con EcoRI fueron las descritas en el apartado 2.1.3.

Los productos de la digestión se separaron en gel de agarosa. Las bandas que contenían el cDNA de Sb22.6 y el vector pGEX digeridos se cortaron, purificaron y cuantificaron por espectrometría (Nanodrop). A continuación se llevó a cabo la reacción de ligación.

De acuerdo con los protocolos de clonaje en pGEX (Amersham), la ligación inserto-vector se hizo en proporción molecular 5:1. Dicha reacción se llevó a cabo durante 24 horas a 4 °C, incluyendo una ligación sin inserto como control negativo. La mezcla de reacción se indica en la siguiente tabla:

	<b>Ligación</b>	<b>Control negativo</b>
<b>Componente</b>	<b>Volumen (µL)</b>	<b>Volumen (µL)</b>
Buffer ligasa (10x)	4,0	4,0
pGEX digerido (20 ng/µL)	5,0	5,0
cDNA (5,8 ng/µL)	19,5	-
Agua	9,5	29,0
T4 DNA ligasa	2,0	2,0
<b>Volumen total</b>	<b>40</b>	<b>40</b>

- *Transformación de células competentes Escherichia coli BL21 Codon Plus con la construcción pGEX-Sb22.6*

El producto de la ligación anterior (pGEX-Sb22.6) se utilizó para transformar células hospedadoras que soportaran la expresión de la proteína recombinante, en este caso con células *E. coli* BL21 Codon Plus. Para ello se siguió el procedimiento de choque térmico detallado a continuación.

En primer lugar se añadieron 2 µL de una dilución 1:10 de β-mercaptoetanol a 100 µL de células BL21 competentes previamente descongeladas y la mezcla se incubó

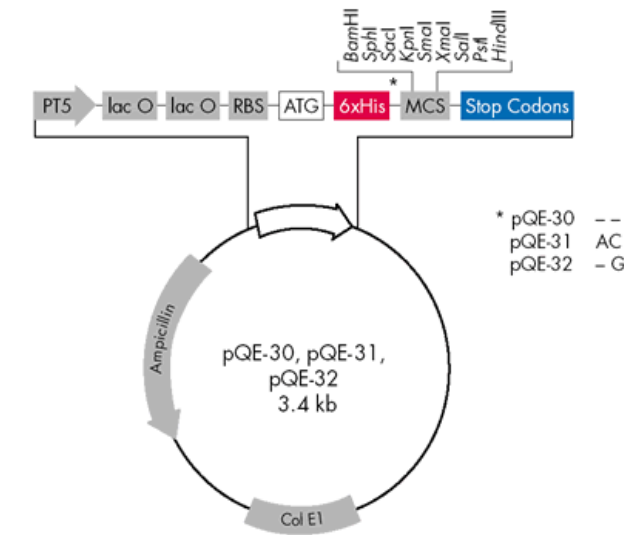
en hielo durante 10 minutos. A continuación, tras añadir 5  $\mu$ L de la reacción de ligación e incubar la mezcla 30 minutos en hielo, las células se sometieron a un choque térmico de 20 segundos a 42 °C, volviéndose a incubar 2 minutos en hielo. Tras este tratamiento, las células se incubaron en 900  $\mu$ L de medio SOC (20 g/L triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl, 20 mM de glucosa y 10 mM  $MgCl_2$ , pH 7) previamente atemperado, durante una hora a 37 °C y en agitación. Por último, tras una centrifugación de 5 minutos a 4.000 g, las células sedimentadas se resuspendieron en 200  $\mu$ L de medio SOC y se sembraron en placas de agar con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina y 50  $\mu$ g/mL de cloranfenicol, las cuales fueron incubadas a 37 °C hasta el día siguiente.

*- Amplificación, verificación y almacenamiento de los clones recombinantes*

Se seleccionaron varias colonias de la placa sembrada con la ligación y se inocularon en 5 mL de medio LB con ampicilina, incubándolas a 37 °C hasta el día siguiente. Se tomó una alícuota de cada cultivo para su almacenamiento en 15 % glicerol a -80 °C y el resto del cultivo se utilizó para purificar el DNA plasmídico y secuenciar el inserto a fin de verificar si la secuencia, la orientación y el marco de lectura eran los correctos. Los clones verificados se almacenaron a -80 °C hasta el momento de ser utilizados para la expresión y purificación de la proteína recombinante (ver más adelante).

2.2.1.2. Subclonación de ENO, GAPDH, FBA y ANX en pQE30

La finalidad de la subclonación en este vector de expresión fue obtener una construcción plasmídica que una vez introducida en células adecuadas exprese la proteína recombinante con un péptido de hexahistidina en su extremo amino terminal para facilitar su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad en resina de níquel.



Para llevar a cabo estos clonajes, los cDNAs codificantes de ENO, GAPDH, FBA y ANX se amplificaron por PCR a partir de las correspondientes construcciones en pSC-A. Con ese fin se diseñaron cebadores específicos que incluían sitios de corte para una enzima de restricción. Dicha enzima se seleccionó, para cada proteína, entre las incluidas en el “polylinker” del vector pQE-30 (ver mapa en la figura anterior), tras comprobar con NEBcutter V2.0 que la secuencia codificante de la proteína no poseía sitios internos de corte para la enzima elegida. En el diseño de los cebadores se incluyeron también un par de nucleótidos adicionales en el extremo 5' para aumentar la eficiencia de la enzima de restricción ([http://www.neb.com/nebecomm/tech\\_reference/restriction\\_enzymes/cleavage\\_olignucleotides\\_old.pdf](http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/cleavage_olignucleotides_old.pdf)).

La tabla siguiente muestra los cebadores diseñados para cada proteína con la secuencia del sitio de restricción correspondiente resaltada en gris y los nucleótidos adicionales subrayados.

Proteína	Enzima de restricción	Cebador
ENO	BamHI	Fwd <u>GGGGATCC</u> ATGTCCATTATAGCGATCCACG
		Rev <u>GGGGATCC</u> TATATTTTTAGGATGGCGG
FBA	BamHI	Fwd <u>GGGGATCC</u> ATGTCACGATTCCCACCTTACC
		Rev <u>GGGGATCC</u> TTAATAAGCATGATTAGCAACG
GAPDH	KpnI	Fwd <u>GGGGTACC</u> TGTCGAGAGCAAAGGTTGG
		Rev <u>GGGGTACC</u> TTATGCATGGTCGACTTTATGC
ANX	KpnI	Fwd <u>GGGGTACC</u> TGGCTAATGTTTCTGAATTTGG
		Rev <u>GGGGTACC</u> TTATTCACCAAGTAGAACAC

Para estas amplificaciones las mezclas de reacción fueron similares a la indicada previamente en el apartado 2.1.1. y las condiciones de la PCR fueron en todos los casos las siguientes: 35 ciclos, a 94 °C durante 15 segundos, 64 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 40 segundos, seguidos de un paso de extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 0,8 % y se purificaron con el kit StrataPrep DNA Gel Extraction (Stratagene). A continuación, a fin de generar extremos cohesivos y permitir la reacción de ligación con el vector de expresión, los cDNAs y el vector pQE-30 fueron digeridos con la enzima de restricción correspondiente en las condiciones indicadas en la tabla.

Enzima	Volumen	Tiempo	Temperatura
KpnI (Roche)	25 µL	1h 30min	37 °C
BamHI (Roche)	25 µL	2h 30min	37 °C

Tras la digestión, los productos fueron separados en geles de agarosa y purificados a partir de dichos geles como en ocasiones anteriores.

La ligación inserto-vector se llevó a cabo en proporción molecular 5:1, en las mismas condiciones que las descritas en el apartado 2.2.1.1. Estas ligaciones se utilizaron para transformar células *E. coli* M15 (Qiagen) en las condiciones siguientes. A 100 µL de células M15 competentes previamente descongeladas se añadieron 5 µL de reacción de ligación y la mezcla se incubó en hielo durante 20 min. A continuación las células se sometieron a un choque térmico durante 90 segundos a 42 °C, tras el cual se cultivaron en 500 µL de medio Psi (LB, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCl) durante una hora a 37 °C en agitación. Finalmente se sembraron en placa de LB-agar con 25 µg/mL de kanamicina y 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C durante la noche.

Al igual que con las células BL21, se seleccionaron varias colonias de cada transformación, se crecieron en medio LB con kanamicina y ampicilina y tras purificar el DNA plasmídico se comprobó, mediante secuenciación, la correcta orientación y marco de lectura de los insertos.

### 2.2.2. Expresión de las proteínas recombinantes

#### A. Expresión de la proteína rSb22.6 clonada en pGEX-4T-1

El protocolo seguido para la expresión de la rSb22.6-GST fue el siguiente:

Se inoculó una alícuota del clon pGEX-4T-1-Sb22.6 (en células BL21) en medio 2xYT (16 g/L triptona, 10 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl) con 100 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de cloranfenicol y se incubó toda la noche a 37 °C en agitación a 160 rpm. Este preinóculo se diluyó en un volumen de medio 100 veces superior y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a 595 nm de 0,8-1, momento en el que se indujo la expresión añadiendo β-D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) a una concentración final de 0,1 mM. Se mantuvo la expresión de la proteína durante 3 horas, tras las cuales las células se recogieron por centrifugación a 15.000 g durante 10 minutos.

Acto seguido, las células se resuspendieron en PBS a 4 °C y se lisaron por sonicación mediante 5 ciclos de 40 segundos. El lisado se incubó con Tritón X-100 al 1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. La muestra se centrifugó a 45.000 g durante 30 minutos, recogándose el sobrenadante y el sedimento por separado. Ambas fracciones se analizaron por SDS-PAGE para comprobar si la expresión de la rSb22.6 recombinante se había producido de forma soluble o insoluble.

#### B. Expresión de las proteínas rENO, rGAPDH, rFBA y rANX clonadas en pQE-30

Tanto la expresión como la purificación de estas proteínas se efectuaron, en líneas generales, siguiendo el protocolo descrito en el manual del fabricante del vector pQE (The QIA expressionist, Qiagen), que, en esencia, fue el siguiente.

Una alícuota de cada clon (en células M15) se inoculó en medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 25 µg/mL de kanamicina, y se incubaron a 37 °C en agitación a 180 rpm durante toda la noche. El preinóculo se diluyó en un volumen 50 veces superior de ese mismo medio y se incubó en idénticas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. En ese momento se indujo la expresión con 1 mM de IPTG durante 4 horas manteniendo las mismas condiciones de cultivo. Trascorrido ese tiempo las células se recogieron por centrifugación a 15.000 g durante 10 minutos y

se resuspendieron en el tampón de lisis (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,9). Las células se sonicaron durante 5 ciclos de 30 segundos y el lisado se centrifugó a 45.000 g durante 30 minutos, recogiendo el sobrenadante y el sedimento por separado. Ambas fracciones se analizaron por SDS-PAGE.

### *2.2.3. Purificación de las proteínas recombinantes*

#### A. Purificación de la proteína de fusión rSb22.6-GST

Esta purificación está basada en la afinidad de la GST por su ligando, el glutatión, que se encuentra inmovilizado en una resina. Se empleó la resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) y se siguió el protocolo descrito por el fabricante.

Como previamente se había comprobado que aproximadamente el 50 % de la rSb22.6-GST recombinante se expresaba en la fracción soluble (ver resultados, apartado 2.1), la purificación de esta proteína se realizó en condiciones nativas a partir de dicha fracción.

El procedimiento fue el siguiente:

La fracción soluble del lisado celular se incubó con la resina durante 30 minutos, en agitación, a temperatura ambiente, empleando 1 mL de resina, equilibrada en PBS, por cada litro de cultivo inicial. Tras esta incubación, la resina con la rSb22.6-GST se lavó tres veces con PBS. Para escindir la rSb22.6 de la GST, la suspensión de resina se incubó con 50 unidades de trombina en PBS durante 16 horas, a temperatura ambiente y en agitación. Acto seguido se centrifugó y se recogió el sobrenadante que fue analizado por SDS-PAGE.

#### B. Purificación de las proteínas rENO, rGAPDH, rFBA y rANX expresadas con marcaje de hexahistidina

La purificación de estas proteínas recombinantes se realizó mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni<sup>2+</sup>.

Como se indica en el apartado 2.2 del capítulo de Resultados, la proteína rFBA se expresó en forma soluble y su purificación pudo efectuarse en condiciones nativas. Por el contrario, las proteínas rENO, rGAPDH y rANX se expresaron en forma insoluble,



obligándonos a solubilizarlas previamente con urea y a llevar a cabo su purificación en condiciones desnaturalizantes. A continuación se indica el procedimiento seguido en cada caso.

#### - Purificación en condiciones nativas de la proteína rFBA

Para la cromatografía se empleó una columna HisTrap FF crude y el sistema ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones suministradas por el fabricante.

Todos los reactivos empleados en la purificación y la fracción soluble del lisado celular (la que contenía la rFBA soluble) se filtraron a través de filtros de 0,45 µm de tamaño de poro. La muestra filtrada se introdujo en el puerto de inyección de muestra y se seleccionó el programa "Histidine-tag purification", que realiza de forma automática el equilibrado de la columna, la inyección de la muestra, el lavado con el tampón de unión (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7.4) y una elución en gradiente de la proteína recombinante con el tampón de elución (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 0.5 M imidazol, pH 7.4). Tras el análisis del correspondiente cromatograma, se recogieron las fracciones eluidas y se analizaron en gel de poliacrilamida.

#### - Purificación en condiciones desnaturalizantes de las proteínas rENO, rGAPDH y rANX

La fracción de proteína insoluble, presente en el sedimento del lisado celular, se solubilizó en un tampón de solubilización con alta concentración de urea (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, pH 7,9) y posteriormente se procedió a su purificación como se indica a continuación.

La cromatografía de afinidad con Ni<sup>2+</sup> se realizó en columnas empaquetadas con 1 mL de resina comercial (His-Select Nickel Affinity Gel, Sigma) que se equilibró mediante el paso secuencial de los siguientes reactivos: 3 mL de agua destilada desionizada y 5 mL de tampón de solubilización con urea 8 M.

Una vez preparada la columna, se filtró 1 mL de la fracción solubilizada. Posteriormente, a fin de favorecer el plegamiento de las proteínas unidas a la columna, se efectuaron lavados en serie, con 5 mL/lavado del tampón de solubilización con cantidades decrecientes de urea (6 M, 4 M, 2 M y 0 M). Por último, las proteínas fueron

eluídas de la columna con 250 mM de imidazol en tampón 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 M NaCl (pH 7,9). Se realizaron 6 eluciones consecutivas con 0,5 mL de este tampón y las fracciones se analizaron en gel de poliacrilamida.

Previo a la determinación de la concentración de las proteínas purificadas se eliminó el imidazol y el exceso de sales mediante diálisis frente a PBS.

En todos los casos, tras la purificación de cada una de las proteínas recombinantes, la cuantificación de la concentración proteica se realizó con el kit DC Protein Assay (Bio-Rad) y mediante espectrofotometría a 280 nm en el NanoDrop.

Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

### **2.3. Métodos de electroforesis de proteínas**

Para analizar la eficiencia en la producción y purificación de las proteínas recombinantes se emplearon técnicas clásicas de electroforesis y western blot a las que se hace referencia en distintas partes del texto y cuyas condiciones generales se describen en esta sección.

#### *2.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)*

Las electroforesis se llevaron a cabo en minigeles utilizando el sistema Mini Protean cell (Bio-Rad). Se utilizó un sistema discontinuo de geles similar al descrito por Laemmli (1970). La concentración de acrilamida del gel de carga fue del 3 % y la del gel separador del 12 %. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras se hirvieron durante 5 minutos en tampón desnaturizante (Tris-HCl 31,25 mM pH 6,8, SDS 2 %, glicerina 10 % y 2-mercaptoetanol 5 %). Los geles se cargaron con una cantidad de 5-10 µg de proteína por pocillo y junto con las muestras se incluyó en cada gel, como referencia para la valoración de pesos moleculares, una mezcla de proteínas preteñidas (Bio-Rad). Las electroforesis se realizaron a 30-45 mA/gel.

Una vez completada la electroforesis los geles fueron teñidos con azul de coomassie o bien transferidos a membranas de nitrocelulosa.

Los geles teñidos se digitalizaron con el escáner ImageScanner (Amersham).

### 2.3.2. Western blot

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa siguiendo el método descrito por Towbin et al. (1979). La transferencia se realizó a 400 mA y 4 °C durante 90 minutos en tampón Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.

El protocolo general empleado para desarrollar los western blots en dichas membranas es el que se resume a continuación:

Las membranas se lavaron con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con BSA al 1 % en PBS durante 1 hora a 37 °C. Tras realizar 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con Tween-20 al 0,05 % en PBS (PBST), se incubaron con el primer anticuerpo diluido en tampón diluyente (PBST con 0,5 % de BSA), durante 1 hora a 37 °C. Después de 3 lavados, las membranas se incubaron con el oportuno anticuerpo secundario marcado con peroxidasa durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, las membranas fueron reveladas con 4-cloro-1-naftol (metanol 20 %, 4-Cl-1-naftol 0,05 % y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,02 % en PBS).

Al igual que los geles de acrilamida, las imágenes de las membranas fueron escaneadas y digitalizadas.

### **3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PROFIBRINOLÍTICA Y ANTICOAGULANTE DE LAS PROTEÍNAS DE *S. BOVIS***

Esta parte del trabajo tuvo como objetivo determinar cuáles de las proteínas recombinantes obtenidas interactúan con el sistema hemostático del hospedador, en particular con el sistema fibrinolítico mediante ensayos de fijación y activación de plasminógeno, y también con el sistema de la coagulación mediante ensayos de actividad anticoagulante.

#### **3.1. Unión del plasminógeno a las proteínas rENO, rGAPDH, rFBA, rANX y rSb22.6**

La unión de plasminógeno a las proteínas recombinantes de *S. bovis* se evaluó mediante ELISA y western blot.

##### *3.1.1. ELISA*

El protocolo seguido es el siguiente.

Las placas multipocillo se tapizaron con 0,5 µg/pocillo de cada proteína recombinante en 100 µL de tampón carbonato pH 9,6 durante 14-16 horas a 4 °C y se post-tapizaron con 1 % de BSA en PBS. A continuación se incubaron con cantidades crecientes (desde 0 a 3 µg/pocillo) de plasminógeno humano (Acris Antibodies, BA522). Como anticuerpo secundario se empleó Goat anti-human plasminogen-HRP (Cedarlane, CL20085 AHP) diluido 1/2000. El revelado se realizó con orto-fenil-diamina (OPD, Sigma P-1526) y la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N. La lectura de la densidad óptica se llevó a cabo a 492 nm en un espectrofotómetro (Multiskan GO, Thermo Scientific).

Todas las incubaciones se desarrollaron durante 1 hora a 37 °C en un volumen final de 100 µL y empleando como tampón diluyente PBS con BSA al 0,5 %. Los lavados entre incubaciones se realizaron con PBST.

En paralelo se realizaron análisis idénticos al anterior pero incluyendo, en el paso de incubación con plasminógeno, al ácido ε-aminocaproico (εACA) (Sigma, A-2504), que es un análogo de lisina que inhibe competitivamente la unión del plasminógeno a su receptor. De forma general, el εACA se empleó a una concentración fija de 40 mM y, adicionalmente, con la rANX también se valoró el grado de inhibición de la unión de

plasminógeno en presencia de cantidades crecientes de  $\epsilon$ ACA, desde 10 mM hasta 60 mM.

En todas las placas se incluyeron como control negativo una serie de pocillos carentes de proteína, tapizados sólo con BSA, y como control positivo una serie de pocillos tapizados con 1  $\mu$ g/pocillo de extracto TG.

### 3.1.2. Western blot con plasminógeno

Se resolvió 1  $\mu$ g de cada recombinante por SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en las condiciones descritas en el apartado 2.3.2.

Para el western blot, la nitrocelulosa se cortó en tiras de 4 mm de ancho y se incubaron con 35  $\mu$ g/mL de plasminógeno humano. La unión de plasminógeno se verificó incubando con 0,5  $\mu$ g/tira del anticuerpo Goat anti-human plasminogen-HRP y revelando con 4-Cl-1-naftol. Como control positivo se incluyó una tira con plasminógeno humano y como control negativo otra sin antígeno.

## 3.2. Ensayos de activación de plasminógeno

Para comprobar si las proteínas recombinantes de *S. bovis* activan el plasminógeno y generan plasmina, se efectuó un ensayo en el que se midió la actividad amidolítica de la plasmina generada sobre un substrato cromogénico, en concreto el S2251 (Sigma, V0882). El protocolo de este ensayo se adaptó a partir del descrito por Mundodi et al. (2008).

El ensayo se hizo en placas multipocillo incubando a 37 °C en un volumen de 150  $\mu$ l de PBS los reactivos siguientes:

- 2  $\mu$ g de plasminógeno.
- 3  $\mu$ g de substrato cromogénico S2251.
- 1  $\mu$ g de proteína recombinante de *S. bovis*.
- 15 ng de t-PA (Sigma, T4825-1VL).

El t-PA es un activador fisiológico del plasminógeno y se añadió en último lugar para iniciar la reacción de activación del plasminógeno. En ensayos paralelos se midió la generación de plasmina en ausencia del activador t-PA y en ausencia de proteína.

La generación de plasmina se monitorizó cuantificando la hidrólisis del sustrato mediante la medida de la absorbancia, a 405 nm, cada 30 minutos durante 2 horas desde el momento en que se inició la reacción.

### **3.3. Identificación de los motivos de unión a plasminógeno en la secuencia de la enolasa**

El objetivo de este experimento fue identificar, en la secuencia aminoacídica de la enolasa, a los motivos de unión al plasminógeno. Para ello se diseñó un macroarray de péptidos solapantes en el que la secuencia completa de la enolasa se dividió en 141 péptidos de 15 aminoácidos cada uno con un solapamiento de 3 aminoácidos. Dicho array fue ensamblado sobre membranas de celulosa en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid.

El protocolo seguido para la detección de las secuencias fijadoras de plasminógeno, adaptado de Frank y Dübel (2006), fue el siguiente.

Tras humedecer las membranas en metanol, se hidrataron mediante 3 lavados con TBS (50 mM Tris, 0,9 % NaCl, pH 7) durante 10 min y se bloquearon a 4 °C durante toda la noche con el tampón de bloqueo (5 % de leche en polvo, 5 % sacarosa y 0,05 % de Tween 20 en TBS). A continuación, se incubó con 10 µg/mL de plasminógeno durante 5 horas a temperatura ambiente. La detección del plasminógeno unido se realizó incubando el array durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo de oveja anti-plasminógeno humano (Acris, BP749) diluido 1/1000. A continuación, la membrana se incubó otras dos 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo de burro anti-oveja IgG-peroxidasa (Sigma, A-3415) diluido 1/1000 y posteriormente con luminol (Immun-Star HRP Substrate, Bio-Rad) durante 5 minutos. La señal luminosa se capturó utilizando el equipo Fluor-S Multimager System (Bio-Rad) mediante exposiciones acumulativas de 3 minutos durante un total de 15 minutos.

Las incubaciones con los distintos anticuerpos se hicieron en el tampón de bloqueo y tras cada incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBST. Antes del revelado con luminol la membrana se lavó durante una hora.

Para determinar las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos empleados, la membrana se incubó con los anticuerpos primario y secundario sin haber incubado previamente con plasminógeno. El ensayo se realizó por duplicado.

### **3.4. Evaluación de la actividad anticoagulante de las proteínas rANX y rSb22.6**

La actividad anticoagulante de estas dos proteínas se analizó en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca mediante dos ensayos clínicos de monitorización general de las vías de coagulación, como son el tiempo de protrombina (TP) y tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa). Ambos ensayos miden el tiempo de formación del coágulo tras añadir un iniciador de la coagulación a la muestra de plasma (respectivamente, STA neoplastin plus y STA aPTT; Roche Diagnostics). El TP detecta alteraciones de la vía extrínseca de la coagulación y el TTPa variaciones de la vía intrínseca.

La sangre utilizada en nuestro ensayo se obtuvo a partir de corderos sanos.

Como durante la purificación de la proteína rSb22.6 se emplea una trombina comercial para romper la unión a GST, la solución de rSb22.6 se pasó por una columna HiTrap Benzamidine FF (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta columna, empleada para purificar serina proteasas, retiene la trombina que pudiese quedar en solución y permite recuperar la proteína rSb22.6 libre de contaminantes que pudiesen interferir en los ensayos de coagulación.

El análisis se llevó a cabo en 500  $\mu$ L de plasma de cordero a los que se añadieron concentraciones crecientes de rANX o rSb22.6 (desde 0 a 80  $\mu$ g/mL) utilizando el equipo STA-R Evolution® analyser (Diagnóstica Stago, Inc.). Cada muestra se analizó por duplicado y el ensayo se repitió dos veces.

En paralelo, como controles, se analizaron también unas muestras de plasma con cantidades crecientes de BSA (desde 0 a 80  $\mu$ g/mL) y otras muestras de plasma el que se

incluyeron volúmenes equivalentes de los tampones en los que estaban diluidas la rANX (250 mM imidazol/ 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ 0,3 M NaCl dializado) y la rSb22.6 (PBS).

Los resultados de los ensayos de TP y TTPa se sometieron en primera instancia al test ANOVA de una vía y cuando se encontraron diferencias significativas se aplicó un análisis posterior mediante el test de Tukey, para conocer la procedencia de dicha diferencia. De manera similar se analizaron las posibles diferencias significativas debidas a la cantidad de proteína del parásito añadida a la muestra de plasma para, en su caso, establecer la concentración de proteína del parásito a la que se obtienen resultados significativos.

#### **4. ENSAYOS DE INMUNOLocalIZACIÓN EN VERMES ADULTOS Y ESQUISTOSÓMULAS**

Para llevar a cabo estos ensayos comenzamos obteniendo sondas específicas para cada proteína diana, esto es, sueros hiperinmunes específicos frente a cada una de las proteínas recombinantes.

##### **4.1. Obtención de los sueros hiperinmunes frente a las proteínas rENO, rGAPDH, rFBA, rANX y rSb22.6**

Para la obtención de los sueros frente a las proteínas rGAPDH, rFBA, rANX y rSb22.6 se inmunizaron 2 conejos con cada proteína. Cada animal recibió tres dosis subcutáneas de 100 µg de proteína emulsionada con los adyuvantes de Freund, completo e incompleto en la primera y segunda dosis, y sin adyuvante en la tercera.

En el caso de la rENO el protocolo de inmunización fue diferente y consistió en la administración subcutánea de 3 dosis quincenales de 50 µg de proteína acompañados de 200 µg de saponina.

Los conejos se sangraron a partir de la vena marginal de la oreja antes de administrar la primera dosis de antígeno, una semana después de la segunda (para evaluar el progreso de la inmunización) y a los 15 días de la última dosis.



La positividad de los sueros y el título de anticuerpos se determinaron mediante un ensayo de ELISA. Su especificidad frente a las proteínas recombinantes y frente al extracto de tegumento (TG), que contiene isoformas nativas de las proteínas estudiadas, se determinó mediante western blot.

#### *4.1.1. ELISA*

Se empleó un protocolo estándar, similar al descrito con detalle más adelante (sección 5.2). Para la titulación se tapizaron placas de 96 pocillos con 0,5 µg de proteína recombinante y se analizaron los sueros de conejo por duplicado en diluciones seriadas (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 y 1/6400). Como anticuerpo secundario se empleó un anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma, A-0545), diluido 1/4000. La reacción se reveló con OPD y la densidad óptica se leyó a 492 nm.

#### *4.1.2. Western blot*

Las muestras de TG y las proteínas recombinantes, previamente separadas por SDS-PAGE y transferidas a nitrocelulosa, fueron analizadas en las condiciones habituales con el suero hiperinmune frente a cada recombinante. La dilución de los sueros hiperinmunes se determinó para cada uno de ellos en función de su título de anticuerpos. Como anticuerpo secundario se empleó un anti-conejo IgG (Sigma, A-0545), diluido 1/600, marcado con peroxidasa. La reacción se reveló con 4-cloro-1-naftol.

## **4.2. Inmunofluorescencia**

El estudio se llevó a cabo en vermes adultos y esquistosómulas fijadas en formol tamponado al 4 % y en cortes de vermes adultos incluidos en parafina.

Los vermes adultos y las esquistosómulas pulmonares de 6 días se obtuvieron a partir de corderos y hámsteres infectados tal y como se señala en el apartado 1.4. Una vez comprobada la integridad de los parásitos, estos se fijaron en formol al 4 % en PBS, durante 24 horas los vermes adultos y durante 5 horas las esquistosómulas. Al cabo de este tiempo se lavaron en PBS y se mantuvieron en ese tampón a 4 °C hasta su utilización.

Como sondas específicas se utilizaron los sueros hiperinmunes de conejo descritos en el apartado anterior y como segundo anticuerpo un anti-conejo IgG-Alexa Fluor 594 (Invitrogen) incluyendo como tinción de contraste Faloidina-Alexa Fluor 488 (Invitrogen), que se une específicamente a filamentos de actina. Las imágenes se analizaron por microscopía confocal (Leica TCS NT).

#### *4.2.1. Estudio en cortes de vermes adultos*

Los vermes adultos, tras su deshidratación y aclarado, se incluyeron en bloques de parafina. La deshidratación consistió en 4 pases, de una hora cada uno, por etanol de 70 %, 80 %, 95 % y 100 %; el aclarado consistió en 2 pases por xilol de 30 minutos cada uno. Las secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor se obtuvieron con un microtomo Microm HM 310. La adhesión de los cortes a los portaobjetos de vidrio se facilitó manteniéndolos durante una hora en la estufa a 37 °C. Una vez adheridos, los cortes se desparafinaron con xilol y se rehidrataron mediante pases de 5 minutos en soluciones de etanol de concentración decreciente (100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %), agua y PBS. Tras la rehidratación se bloquearon con 1 % de BSA en PBST durante una hora a 37 °C. Posteriormente, cada porta se incubó con 200  $\mu\text{l}$  del suero correspondiente diluido 1/50 en tampón de bloqueo durante una hora a 37 °C y después otra hora a 37 °C con 200  $\mu\text{L}$  de anti-conejo IgG-Alexa Fluor 594 diluido 1/400 en tampón de bloqueo al que se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de Faloidina-Alexa Fluor 488. Por último se realizó el montaje de las muestras con el reactivo Prolong Gold Antifade (Invitrogen) y se analizaron en el microscopio confocal.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda y en oscuridad. Entre incubaciones se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBST y antes del montaje se lavó durante media hora.

Como controles negativos se incluyeron secciones incubadas con un suero negativo de conejo (pre-inmune) y otras en las que se omitió la incubación con el suero hiperinmune con el fin de valorar las posibles uniones inespecíficas del segundo anticuerpo al tejido del parásito.

#### 4.2.2. Estudio en vermes enteros: adultos y esquistosómulas

En este estudio se analizaron los vermes enteros fijados siguiendo un protocolo similar al descrito en el apartado anterior.

La reacción se realizó en tubos eppendorf, en un volumen total de 300  $\mu$ L por tubo, y se procesaron lotes de 100 esquistosómulas o de 5 parejas de adultos por tubo. La incubación con el suero hiperinmune de conejo se llevó a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La incubación con el anti-conejo IgG-Alexa Flour 594 (diluido a 1/300) y Faloidina-Alexa Fluor 488 se hizo a 37 °C durante una hora. Las muestras de los vermes adultos se montaron con PBS y las de las esquistosómulas con el reactivo Prolong Gold antifade.

Como controles negativos se incluyeron lotes de vermes adultos y de esquistosómulas incubadas en las mismas condiciones que los controles descritos en el apartado anterior.

### 5. UTILIDAD DE LA PROTEÍNA rSb22.6 PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR *S. BOVIS*

El objetivo de esta parte del trabajo fue comparar el comportamiento de la proteína rSb22.6 y del extracto completo de vermes adultos (SbC) como antígenos diagnósticos para la detección por ELISA de anticuerpos anti-*S. bovis*. Para ello se analizaron sueros anti-*S. bovis* procedentes de infecciones experimentales y de infecciones naturales y se efectuaron pruebas de reactividad cruzada con otros trematodos, en concreto con *Fasciola hepática*.

#### 5.1. Sueros analizados

Para hacer este análisis se emplearon tres tipos de sueros: sueros de hámsteres infectados experimentalmente con *S. bovis*, sueros de bovinos procedentes de explotaciones ganaderas en extensivo y sueros de corderos infectados experimentalmente con *F. hepática*. Todos estos sueros fueron analizados por ELISA frente a los antígenos SbC y rSb22.6.

Los sueros de los hámsteres fueron los obtenidos según se describe en el apartado 1.4.

Los sueros bovinos procedían de los utilizados en un estudio epidemiológico previo llevado a cabo por Oleaga-Pérez et al. (2004) en el que se evaluó la prevalencia de *S. bovis* en explotaciones bovinas de la provincia de Salamanca analizando por ELISA, con el extracto SbC como antígeno, un total de 5.665 sueros procedentes de 191 explotaciones bovinas. De esos sueros, para el presente estudio se seleccionaron, como controles negativos, 46 sueros procedentes de animales no infectados y, como controles positivos, los sueros de 35 animales que en la serología realizada en el estudio de Oleaga et al. (2004) habían presentado una alta reactividad frente al antígeno SbC. También se analizaron otros 281 sueros de bovinos procedentes de 11 explotaciones diferentes.

Los sueros de los corderos infectados experimentalmente con *F. hepática* procedían de un estudio previo en el que se infectaron seis animales con 100 metacercarias de *F. hepática* por animal y se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos post-infección (Martínez-Fernández et al., 2004). Estos sueros ovinos se analizaron por ELISA, además de con los antígenos SbC y rSb22.6, con un antígeno excretor-secretor de *F. hepatica* (FhE/S), el cual había sido obtenido también en el mencionado trabajo de Martínez-Fernández et al., (2004).

## 5.2. Protocolo de ELISA

La detección de anticuerpos anti-*S. bovis* con los antígenos SbC y rSb22.6 y los anticuerpos anti-*F. hepatica* con el antígeno FhE/S se realizó como se describe a continuación.

Se tapizaron placas de poliestireno (Corning) con el antígeno FhE/S, SbC o rSb22.6 en 100 µL de tampón carbonato pH 9,6 durante toda la noche a 4 °C. Se empleó 1 µg/pocillo de SbC y FhE/S para todos los sueros, mientras que se usaron placas tapizadas con 0,2 µg/pocillo de rSb22.6 para los ensayos con los sueros bovinos y otras tapizadas con 0,2 y 0,5 µg/pocillo para analizar los sueros de hámster. Se realizó un post-tapizado con 200 µL/pocillo de BSA al 1 % en PBS. Los sueros de hámster y cordero se analizaron diluidos 1/100 mientras que los sueros bovinos se analizaron diluidos a 1/50. Todos los sueros se analizaron en pocillos duplicados en un volumen de

100 µL/pocillo. Los anticuerpos frente a *S. bovis* o frente a *F. hepatica* se detectaron con un anti-bovine IgG (Sigma, A5295) diluido 1/1000; con un anti-hámster IgG (Serotec, STAR79P) diluido 1/4000 o bien con un anti-sheep IgG (Sigma, A3415) diluido 1/6000 (todos conjugados con peroxidasa). Finalmente se revelaron las placas en oscuridad con 100 µL/pocillo de la solución de revelado (0,6 mg/mL de orto-fenilendiamina -OPD-, 0,4 µL/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampón citrato pH 5,0), se detuvo la reacción con 50 µL/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N y se leyó la densidad óptica a 492 nm en un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific). Todas las incubaciones se llevaron a cabo durante 1 hora a 37 °C y tras cada una de ellas se realizaron 3 lavados con 200 µL de PBST.

### 5.3 Análisis de los resultados de los sueros bovinos

Para analizar los resultados de los sueros bovinos y poder comparar los resultados de las distintas placas, cada densidad óptica (DO) se transformó en índice serológico (IS) aplicando la siguiente fórmula:  $[(CN - S)/(CN - CP)] \times 100$ , donde CN y CP son, respectivamente, las DOs de los sueros controles negativos y positivos y S la DO de los sueros analizados. El IS se calculó para cada suero bovino con cada antígeno (SbC y rSb22.6).

Para ambos antígenos se construyeron las correspondientes curvas ROC (Receiver-Operator Characteristic), utilizando los IS de los 35 sueros bovinos positivos y los 46 sueros bovinos negativos utilizados como controles. Las curvas ROC se utilizaron para establecer el umbral de positividad de cada antígeno. Este umbral se definió como el valor de IS que presentaba la mayor eficacia diagnóstica, calculada como la suma de la sensibilidad y la especificidad dividida entre dos. Estos valores se emplearon para clasificar como positivo/negativo cada uno de los 281 sueros bovinos analizados con ambos antígenos (rSb22.6 y SbC).

La proporción entre los sueros clasificados como positivos o negativos con cada antígeno se comparó con un test Z. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS v17.



## RESULTADOS

---



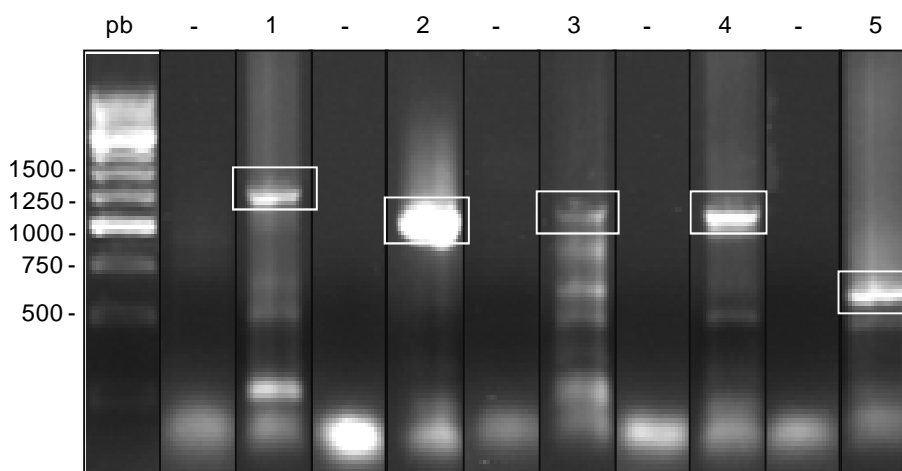


## 1. SECUENCIAS CODIFICANTES (cDNA) Y AMINOACIDICAS DE LAS PROTEINAS ENO, GAPDH, FBA, ANX Y Sb22.6 DE *S. BOVIS*

El primer objetivo del presente trabajo fue la clonación de los cDNAs codificantes de estas proteínas de *S. bovis* y la obtención de sus secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.

Para ello, se amplificaron los correspondientes cDNAs mediante la técnica de RT-PCR. Al desconocer *a priori* las secuencias específicas de estas proteínas de *S. bovis*, para llevar a cabo dichas amplificaciones se utilizaron cebadores diseñados sobre secuencias consenso, que fueron obtenidas mediante alineamiento múltiple de las proteínas homólogas de especies próximas, como *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*.

Los productos de las amplificaciones con dichos cebadores mostraron un tamaño compatible con el esperado para los correspondientes cDNAs (Figura 1).



**Figura 1** - Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Productos de la amplificación por RT-PCR de los cDNA de (1) ENO, 1.300 pb; (2) GAPDH, 1.020 pb; (3) FBA, 1.100 pb; (4) ANX, 1.080 pb y (5) Sb22.6, 570 pb. Se incluyen los correspondientes controles negativos (-).

Los productos de PCR se purificaron a partir de los geles de agarosa, se clonaron en el vector de secuenciación pSC-A y se secuenciaron en su totalidad. El análisis por BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) de las secuencias nucleotídicas obtenidas corroboró la correcta identidad de los cDNAs amplificados.

El tamaño, en pares de bases, de dichas moléculas y el número de acceso con el que se depositaron en la base de datos GenBank se resumen en la tabla 1, mientras que las secuencias específicas de estos cDNAs se presentan en la tabla 2. Las correspondientes secuencias aminoacídicas se obtuvieron utilizando el programa Translate, disponible en el portal ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>), y se muestran en la tabla 3.

Un primer análisis bioinformático de la secuencia de estas proteínas con las herramientas disponibles en dicho portal mostró que todas ellas carecen de péptido señal, de hélices transmembrana y de puntos de anclaje tipo glicosil-fosfatidil inositol (GPI).

**Tabla 1** – Tamaño en pares de bases (pb) de los cDNAs y códigos de acceso en la base de datos GenBank

<b>cDNA</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Nº de acceso (GenBank)</b>
ENO	1305	EU595759
GAPDH	1017	EU595761
FBA	1092	EU595760
ANX	1080	EU595758
Sb22.6	573	EU595756

**Tabla 2 - Secuencias nucleotídicas completas de los cDNAs codificantes de ENO, GAPDH, FBA, ANX y Sb22.6 de *S. bovis*.**

**ENO**

ATGTCATTATAGCGATCCACGCCCGTCAAATTTTCGATAGCCGGGGAAACCCACAGTTGAGGTGGATTTAAAAACATCTAAAGGTTTATTCC  
GCGTGCCTTCCAAGTGGCGCTTCGACAGGTGTCATGAGGCTCTTGTAGTTACGTGATACCAAGTCAAAGGCTTATATGGGAAAGGGGTTT  
AACAGCAGTCAGTAATGTGAATACAATCATGCTCCAGCTCTAATTCAAAAAATATCCCGTAACTGACCAAGCAGCTATTGACAGATTATG  
ATTGAACTTGATGGCACGGAAAAACAAGAAAACTCGGGGCAATGCTATATTGGGAGTATCTTTGGCTGTGTGCAAAGCTGGTGCAGCTGAAG  
CCGTTTACCTCTCTATAGGTATATGCGAAGTTAGCTGGGCACGAAAATGTTATAATGCCTGTCCAGCATCAATGTCATTAATGGTGGCAG  
CCATGCCGGCAACAAGCTAGCCATGCAAGAATTCATGATTCTGCCTACTGGGGCCAGCTCTTTACTGAAGCAATGAAGATCGGTTCTGAGGTG  
TACCACAATTTAAAGCTGTAATCAAACGTGAATATGGATTTGGATGCGTGCACAAAGCTTTGGTACGAGGGTGGTTTGTGACCGAATATACAGGATA  
ATATGAAAGGCTTTCAGCTGCTTGAAGAAGCCATAAAAAATGCTGGCTATACTGGAAAAAAGAGATCGGTATGGATTGTGCGGCTTCTGAGTT  
TCACAAGAATGGGAAGTATGATTTGGATTTCAAGAACCCTCATTCTGCAGAACTGCCTGGCTTAGTCTGATGCAATGACAAATGTGTACAAG  
GAAATGATAAGCAATATCCAATAGTGAGCATTGAAGATCCAGTTGATCAGGATGATGGGAAACATGGCCTAAACTAACTGCTTCAACAAACA  
TTCAAATTTGGTGGAGCAGTTGACTGTTACCAATCCAAAGCGCATTTAAAAAGGCCATTTCTTCAAAGGCTTGGATAATGCTCTTTTGAAGT  
AAACCAGATAGGTTCAATTAACCGAGTCCATTGAGGCTTGCAAGTTAGCACAAAACCCAGGTTGGGGTGTGATGGTTTACATCGATCTGGTGA  
ACGGAAGATACTTTTCAATGCTGATCTAGTTGTTGGCTTTGCACTGGACAGATAAAAGCCGGTGCACCATGTCGTTCTGATCGTTTGGCCAAAT  
ACAACCACTTTTACGTATTGAAGAAGAGTTGGGAGCAGCAGAAAAATATGCCGGAAAAACTTCCGCCATCTAAAAAATAA

**GAPDH**

ATGTCGAGAGCAAAGGTTGGTATTAACGGTTTCGGTCTGATCGGGAGACTTGTGCTCCGCGCAGCTTTCAAAAAGAACACCGTGGATATAGTT  
CAGTGAATGACCCCTTCATAAATTTAGAGTACATGGTGTACATGATTAACCGTGTATCCACCCATGGGAATTTTCAAGGCGAGGTGTCCGCAGA  
AGACGGAAAATTTAAAGTCAATGGAAAGTTAATATCTGTTCAATTTTGAAGGGATCCAAGAAACATCCCATGGGATAAGGACGGGGCTGAATAT  
GTCGTAGAGTCCACTGGAGTCTTTACGACCATTGATGCAGCTAAAGCTCATACTGAAAATAATCGAGCTAAAAGGTTATAATATCTGCACCTT  
CTGCAGACGCCCATGTTGCTGTTGGTGTGAATGAAAATTCGTACGATAAGTCAATGTCTGTGGTTTCTAATGCATCATGTACAACCAATG  
TTTAGCACCCCTGGCTAAGGTTATTCATGATAACTTCGAATAGTTGAGGCTTAATGACCACTGTGCACCTATTACGGCTACGCAAAAAGTT  
GTAGACGGACCATCTTCAAATTTATGGCGAGATGGTGTGGAGCGATGCAAAAATATCATTCCAGCTTCTACTGGTGTGCAAAAAGCTGTAGGAA  
AAGTCATCCAGCATTAAATGGAAAATTGACGGGAATGGCTTTCCGCGTACCACACCGGACGTTTTCAGTCGTTGATCTGACATGCAGATTAGG  
GAAGAAAGCTACCTATGATCAAATTAAGGCTGTGGTCAAAGCAGCTGCATCTGGACCAATGAAGGGGATTTTGAATAACAGTGTATGAGGTC  
GTCAGTTCGGACTTTATTGGAAATAGCAGTTTATCCATATTTGATGCGAAGGCTGGGATATCTCTTAAACGACAACCTTCGTGAAATTAATTTTCAT  
GGTACGATAATGAGTTTGGATACAGTTGTCTGCGTAGTTGATCTCATCACGCACATGCATAAAGTCGACCATGCATAA

**FBA**

ATGTCACGATTTCCACCTTACCTAACTGAAGCTCAAGAGAATGACCTACGCCGAATCGTCAAGCTATTTGTGCTCTGGTAAAGGAATCCTAG  
CAGCTGACGAAAGCACAGCCACGATGGGTAAAAGGCTTCAACAAATCGGCGTTGAAAATAACGAAAGAAAATCGTCTGTCACCGCCAGCTACT  
TTTTAGTGTGACCAACAATGGCCGAAAATATCTCTGGAGTAAATATTTTGAAGAGACACTTTCATCAAAAGTCGGACGATGGAAAGACTCTT  
CCTACTCTACTGGCCGAAACGAAACATCATACCAGGAATAAAGGTTGACAAAGGCGTTGTTCCACTTGCAGGCACAGATAATGAGACAACAATC  
AGGGTCTTGATGATCTTGCCTCACGCTGTGCTGAATATTAATAACTTGGATGCGGCTTTGCTAAGTGGCGTTGCGTTTTGAAGATCTCTCCACA  
CACCCATCATATCAAGCTATGCTCGAAAATGCCAATGTACTTGCACGTTATGCTTCCATCTGTGACAGAAATGGTTGGTACCAATCGTTGAA  
CCTGAGGTGCTTCTGATGGTGTATGATTTACTAAGTCTCAAAGAGTAAACAGAAAGTTTTGGCATTCGTGTACAAGGCTTTAGCCGATC  
ATCATGTTTTATTGGAAGGAACGCTTTTAAACCCAAATATGGTCACTGCTGGACAGGCCTGCAAAAAGCTTACACACCGCAGGAAAATGCTCT  
AGCAACTGTGAGAGCCCTTACGCGCACAGTCCCTCCAGCTGTCCAGGTATCACATTTTTATCTGGAGGTCAATCAGAATTTGACGCTACTAAA  
AATCTGAAACAAAATCAACAAGATTCGGGACCAAGCCATGGCCACTCAGTTTGGTTCGCTGTACAGGCTTCAAGTTTGGTTCGCTGTGCAAGT  
GGAAGGAAAGAAAGAAAATGTTTATGCGGCTCAGGAAGAGCTATTGAAATTTGCCAAAGCAATGGTGTGCTGCAAGTGGCAATTTGAAG  
AAATATGGAACTGCTTTGGGAGACAAATCATTATCGTTGCTAATCATGCTTATTAA

**ANX**

ATGGTAAATGTTTCTGAATTTGAAATAACAGTTCATTAATTCATGCATTTGATCCACATGGTAAACATTACACACCAACAATTAACCAACAA  
CTGGTTTTTTCAGCGTCAGCTGATGTGAACGATTACATCGAGCTATGAAAGGTCAGGCACAGATGAAACAGCAATTTATCAACATATTGGCAG  
TAGACAATAATGAAAGTCAAGAATTTATGTCGATCATAAAAAGTTTATATAAACATGATCTAAAAGACGATTTGAAATCGGAGACTAGTGG  
GATTTTCTGTAAGGTTTTATGTCAGCTAGTTGTTGATACACCTTATATGTTGGCTAAATCATTATATTATGCAATGAAAGGCTTAGGAACAAATG  
ATCGTGTACTTATTGAAATATTTACCACATTTATGGAATGATGAAACAAGAGCTGTAGCTGATGCTTATAAACAAAGTACTCAAAGACAAAGGGAT  
TGAAGAATCAGAAGCTTCAATAGTTACTGATATGAAAAAGAAAATGAGCGGTGATTTAATGAAATATGCATTAATGTTGTTTCAAGCTGACCGT  
GATGAGATACCAGTATTACAATTTGAAAGCAATACCTGAAAAGGATCAATTTCAATCATTAATCATGAATTTAGCTGAAGCTGATGCTAAAGATC  
TATATGCTTCCAGGAGTTGGTCCGGTTGGTACTAGTGAAAAACGATTTACACGGGTTATATGCAACAGAACCCATATCAATTTGATTTAACATC  
TGAAATCTATTTCAAATGATGGTAAACTTTTATGGAACATATGAAATCGGAGACATCAGGTGATTTATCGTAAACTTCTTGTGCTATCTTA  
CGATATGCAATCGATCGTCCCGGCTAATTTGCTGAATGGTTACATGATTTCAATGGCTGGTTTAGGAACAAAAGATTTATGCATTAATCGGTTTAT  
TAATTACAGTTCTGAGATTGATCTTCAAGATATAATGAATCCATATGAATCAATTTATGGTAAATCATTATGAAATGCAGTAATAGATGATAC  
ATCTGGTATATTATCGTCAACATTATGTTTCTACTTGGTGAATAA

**Sb22.6**

ATGTCACCCGAGACGAAATGAGTTCAATGGAAGAGTTTATTAGAGCATTTTTAGAAATGGATGCAGATAACAATGAAATGATTGATAAACAAAG  
AATTAATTAATACTGTCAAAAAATCGTTTGGATATGAGATTGATCGACCCATGGATAGCGAGGTTTGGATACTGATAAAGATAATAAATCAG  
TATAGAAGAGTTCTGCCGTGGATTCCGTTTAAAGTATCAGAAAATCGACGCTGAAAAGAAAGAAATTAATAAAGAAAAGGATGGCAAGGTTTCT  
AAACTTCCACCAATGTTGAAATTTATGCGACAACCATGTCAAAAACAAAACAATATGATATATGTCATCAATTTAAAGAATATATTGATAATA  
GTAGTCGAAACAAAATAATGATATAAAAAGAGGTGGCAATAAATAAAGCAATTTATGGATAATACTTATGGTCTGTATGGCAAGTGGTTATATT  
AACTGGTTTCAATTTGGATGAATTTTCCATGAACCATTTTTATCAATACAATTTCAAGTATAAATAATTTATGCTGTTTAGCATGGAGAACCA  
TCTCAGTAA

**Tabla 3** – Secuencias aminoacídicas de las proteínas ENO, GAPDH, FBA, ANX y Sb22.6 de *S. bovis*: número de acceso en la base de datos GenBank, número de aminoácidos (aa), peso molecular en kDa (PM) y punto isoeléctrico (pI) teóricos.

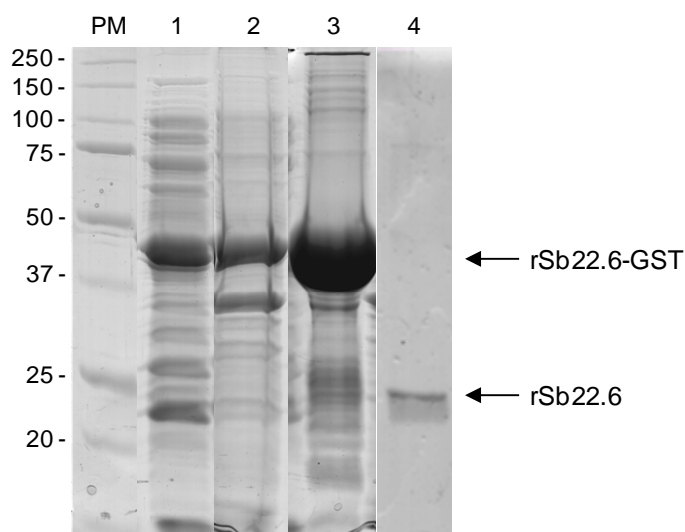
Proteína (Nº Acceso)	Secuencia	aa	PM	pI
ENO (ACC78611)	MSIIAIIHARQIFDSRGNPTVEVDLKTSGKLFRAAVPSGASTGVH EAELELRDTKSKAYMGKGVLTAVSNVNTIIAPALIQKNI PVTDQA AIDRFMIELDGTENKEKLGANA ILGVSLAVCKAGAAEAGLPLYR YIAKLAGHENVIMPVPAFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGAS SFTEAMKIGSEVYHNLKAVIKREYGLDACNVGDEGGFAPNIQDN MKGLQLLEEAIKIAGYTGKKEIGMDCAASEFHKNKGYDLDFKNP HSAESA W LSPDAMTNVYKEMISKYPIVSI ED PVDQDDWETWPKL TASTNIQIVGDDLTVTNPKRIKKAISSKACNCLLLKVNQIGSLT ESIEACKLAQNAGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKA GAPCRSDRLAKYNQLLRIEEELGAAAKYAGKNFRHPKK	434	46,8	6,77
GAPDH (ACC78613)	MSRAKVGINGFGRIGRLVLRAAFQKNTVDIVSVNDPFINLEYMV YMIKRSTHGNFQGEVSAEDGKLVNGKLISVHFERDPRNIPWD KDGAEYVVESTGVFTTIDA AKAHTENNRKAKV IISAPSADAPMF VVGVNENSYDKSMSVVSNASCTTNCLAPLAKVIHDNFEIVEGLM TTVHSFTATQKVVDGPPSSKLRWDGRGAMQNIIPASTGAAKAVGK VIPALNGKLTGMAFRVPTPDVSVVDLTCRLGKKATYDQIKAVVK AAASGPMKGILEYSDDDEVVSSDFIGNSSSIFDAKAGISLNDNF VKLISWYDNEFGYSCRVVDLITHMHKVDHA	338	36,6	7,68
FBA (ACC78612)	MSRFPPYLTEAQENDLRRIAQAI CAPGKGILAADESTATMGKRL QQIGVENNEENRRLYRQLLFSADHKLAENISGVILFEETLHQKS DDGKTLPTLLAERNIIPGIKVDKGVVPLAGTDNETTTQGLDDLA SRCAEYYKLGCRFAKWRCVLKISPHTPSYQAMLENANVLARYAS ICQONGLVPIVEPEVLPDGDHDLTAQRVTEEVLA FVYKALADH HVYLEGTLKPNMVTAGQACKKAYTPQENALATVRALQRTVPPA VPGITFLSGGQSEL DATKNLNEINKIPGPKPWALTF SFGRALQA SVLATWKGKKENVHAAQEELLKLAKANGAAAVGKFEGNMGTALG DKSLFVANHAY	363	39,6	7,08
ANX (ACC78610)	MANVSEFGITRSLIHAFDPHGKHYTPTIKPTTGFSASADAERLH RAMKGPGTDETAIINILARRTNYERQELCRSYKSLYKHDLKDDL KSETSGDFRKVLCQLVVDTPYMLAKSLYYAMKGLGTNDRVLEI FTTLWNDETRAVADAYKQVLKDKGIEESERSLV TDMKKEISGDY EYALLCLVQADRDEIPVLQLKAIPEKGINSIINHELAEADAKDL YASGVGRVGTSEKRITRVICNRTPYQLYLTSEIYFKMYGKTLLE HIESETSGDYRKLLVAILRYAIDRPGLIAEWLHDSMAGLGTKDY ALMRLLI TRSEIDLQDIMNPYESIYGKSLNNAVIDDTSGDYRRT LCVLLGE	359	40,6	5,84
Sb22.6 (ACC78608)	MSTETKLSMEEFIRAFLEMDADNNEMIDKQELIKYCQKNRLDM RLIDPWIARFDTDKDNKISIEEF CRGFGLKVSEIRREKEELKKE KDGVSKLPPNVEIIAATMSKTKQYDICHQFKEYIDNSSRTNND IKEVANKMKTLLDNTYGRVWQVVILTGSYWMNFSHEPFLSIQFK YNNYVCLAWRTPSQ	190	22,5	6,75

## 2. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE *S. BOVIS* EN FORMA RECOMBINANTE

Una vez conocidas las secuencias de las proteínas ENO, GAPDH, FBA, ANX y Sb22.6 el siguiente paso fue obtenerlas en forma recombinante. Este objetivo lo abordamos empleando células procariotas (*Escherichia coli*) y dos vectores de expresión diferentes.

### 2.1. Expresión de la rSb22.6 en el vector p-GEX

En este sistema la proteína recombinante se expresa como proteína de fusión con GST. En las condiciones empleadas, la rSb22.6-GST se expresó tanto en forma soluble como insoluble y en similares proporciones. La purificación de la proteína de fusión rSb22.6-GST se llevó a cabo a partir de la fracción soluble del lisado celular mediante cromatografía de afinidad con glutatión. La rSb22.6 se eluyó, tras la digestión con trombina, obteniéndose pura con un rendimiento de 0,82 mg/L de cultivo (Figura 2).



**Figura 2** - Gel de poliacrilamida al 12 % teñido con azul de coomassie. Expresión de la rSb22.6-GST en el vector pGEX-4T-1 y células BL21-Codon Plus. **1** y **2**, respectivamente, sobrenadante y sedimento del lisado celular; **3**, resina de Glutación-sefarosa tras la incubación con el sobrenadante del lisado celular; **4**, rSb22.6 eluida tras digerir la proteína de fusión con trombina. PM, marcador de pesos moleculares y valores de éstos expresados en kDa.

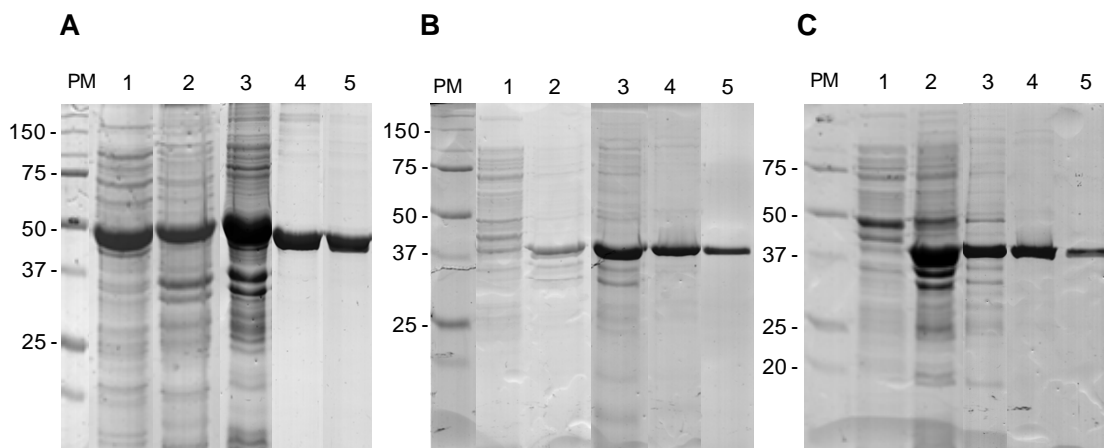
## 2.2. Expresión de rENO, rGAPDH, rFBA y rANX en el vector pQE-30

En este vector la proteína recombinante se expresa unida a un péptido de seis histidinas en su extremo amino terminal, de modo que puede purificarse mediante cromatografía de afinidad en resinas de sefarosa cargadas con  $\text{Ni}^{2+}$  sin que la afinidad por el  $\text{Ni}^{2+}$  pueda verse comprometida por los cambios estructurales de la molécula. Este sistema permite purificar las proteínas recombinantes tanto en condiciones nativas como desnaturizantes, a diferencia de lo que ocurre con el sistema pGEX, en el que la conformación de la molécula de GST es determinante para su unión a la resina.

En las condiciones utilizadas en nuestros experimentos, las proteínas rGAPDH y rANX se expresaron únicamente en forma insoluble, mientras que rENO y rFBA se expresaron tanto en forma soluble como insoluble en similar proporción.

La purificación de la rENO se intentó primero en condiciones nativas a partir de la fracción soluble del lisado celular. Tras su elución de la resina de  $\text{Ni}^{2+}$ , se observaron signos de degradación y precipitación. Estos problemas persistieron a lo largo de varios intentos adicionales de purificación en los que se variaron las condiciones de expresión y purificación (resultados no mostrados), por lo que, finalmente, se recurrió a purificar la forma insoluble de la proteína. En consecuencia, las proteínas rENO, rGAPDH y rANX se purificaron a partir de la fracción insoluble en condiciones desnaturizantes y la rFBA a partir de la fracción soluble en condiciones nativas.

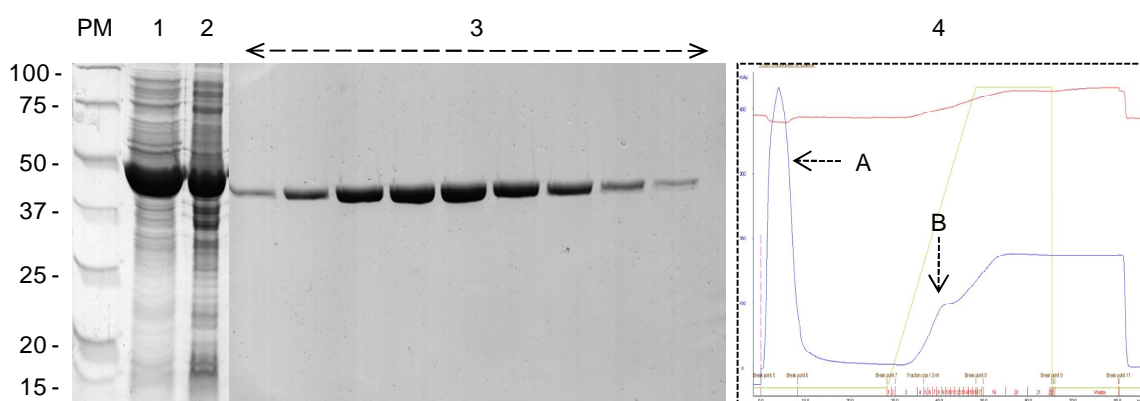
Para ello, las proteínas insolubles se sometieron a un proceso de solubilización con urea 8 M que fue eliminada progresivamente durante el proceso de purificación. En la figura 3 se muestran los resultados de la expresión y purificación de rENO, rANX y rGAPDH en estas condiciones.



**Figura 3** – Gel de poliacrilamida al 12 % teñido con azul de coomassie. Expresión de las proteínas rENO (A), rGAPDH (B) y rANX (C) en el vector pQE-30 y células *E. coli* M15. 1 y 2, sobrenadante y sedimento del lisado celular respectivamente; 3, sedimento solubilizado con urea 8 M; 4, resina tras la incubación con la muestra solubilizada con urea 8 M; 5, proteína eluida. PM, marcador de pesos moleculares y valores expresados en kDa.

La rFBA expresada en forma soluble no presentó ninguno de los inconvenientes observados con la rENO y fue posible purificarla mediante un sistema de cromatografía automatizado (ÄKTA PrimePlus).

La figura 4 muestra el patrón de expresión de la recombinante, las fracciones de rFBA eluida así como el cromatograma del proceso de purificación.



**Figura 4** – Gel de poliacrilamida al 12 % teñido con azul de coomassie. Expresión de rFBA en el vector pQE-30 y células *E. coli* M15. 1 y 2, sobrenadante y sedimento del lisado celular respectivamente; 3, fracciones correspondientes al pico de elución de la recombinante; 4, cromatograma de la purificación en el cual el pico A corresponde a la inyección del sobrenadante del lisado celular y el pico B a la elución de la proteína. PM, marcador de pesos moleculares y valores expresados en kDa.

La tabla 4 muestra el rendimiento final, en miligramos de proteína pura por litro de cultivo, de la expresión y purificación de estas proteínas.

**Tabla 4** – Rendimiento de las proteínas recombinantes de *S. bovis* expresadas en el vector pQE-30 (expresado en mg de proteína pura/ litro de cultivo).

Proteína	Rendimiento (mg/L)
<b>ENO</b>	2,38
<b>GAPDH</b>	8,0
<b>FBA</b>	9,6
<b>ANX</b>	5,7



### 3. INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS DE *S. BOVIS* Y EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO DEL HOSPEDADOR

Esta parte del trabajo tuvo como objetivo comprobar si las proteínas recombinantes obtenidas tienen capacidad para fijar el plasminógeno y, además, verificar si pueden activarlo induciendo la generación de plasmina.

#### 3.1. Unión de plasminógeno

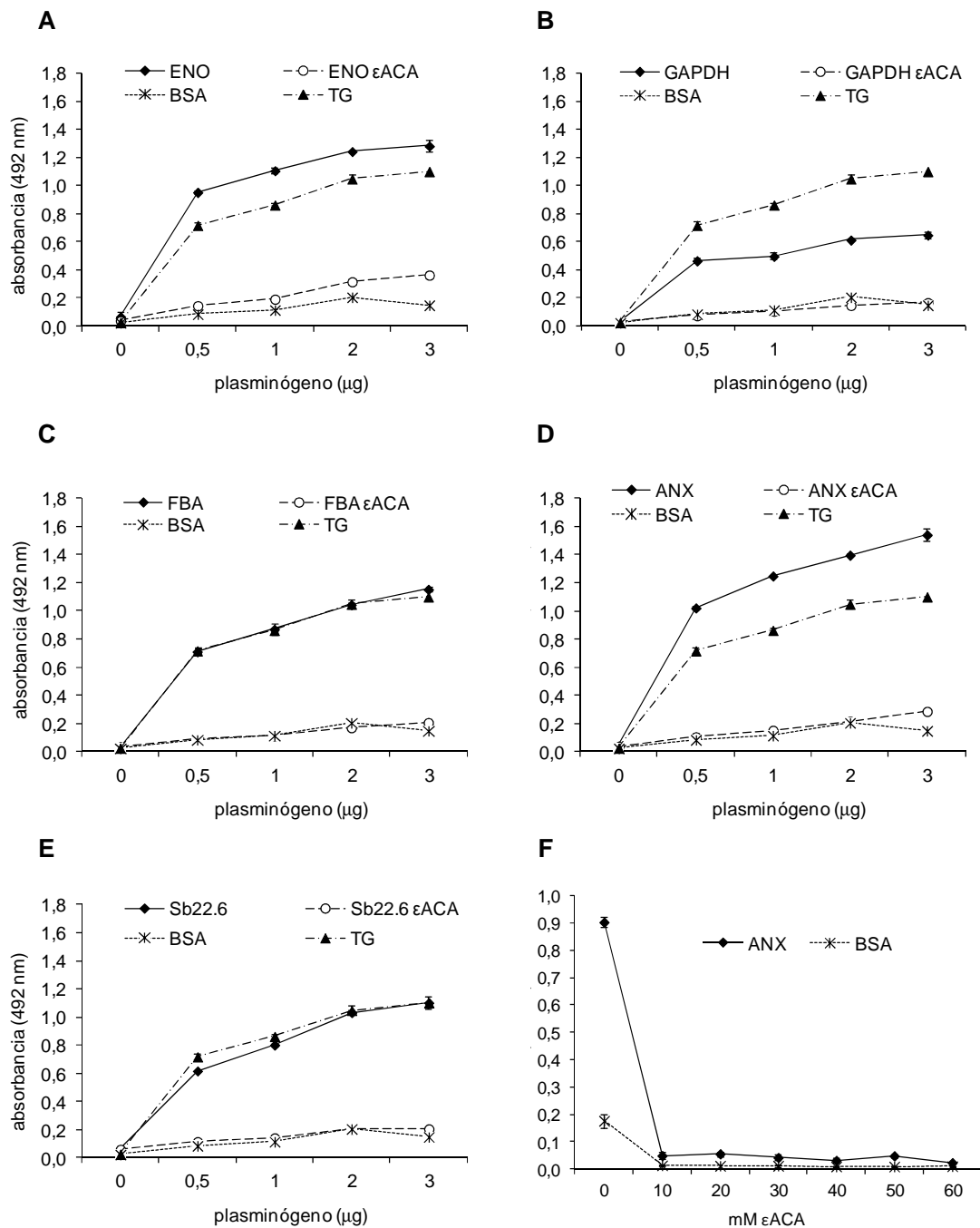
Los ensayos de fijación de plasminógeno se hicieron por ELISA y western blot.

Los resultados de la prueba de ELISA muestran que todas las proteínas recombinantes analizadas fijan plasminógeno y que la cantidad de plasminógeno que se une a 0,5  $\mu\text{g}$  de proteína aumenta a medida que se incrementa la cantidad de plasminógeno añadido a la reacción, de forma similar a lo que se observa con el extracto TG, que fue incluido en el ensayo como control positivo (Figura 5).

Las proteínas recombinantes unieron plasminógeno con distinta afinidad: rENO y rANX mostraron los valores de absorbancia más altos, superiores a los del extracto TG; rFBA y rSb22.6 igualaron al extracto TG y rGAPDH mostró valores de absorbancia inferiores al TG. En los pocillos control negativo, únicamente tapizados con BSA, no se observó unión inespecífica de plasminógeno (Figura 5).

En los experimentos de competición, la inclusión de 40 mM del análogo de lisina,  $\epsilon\text{ACA}$ , en la reacción inhibió casi por completo la unión del plasminógeno a cada una de las proteínas ensayadas.

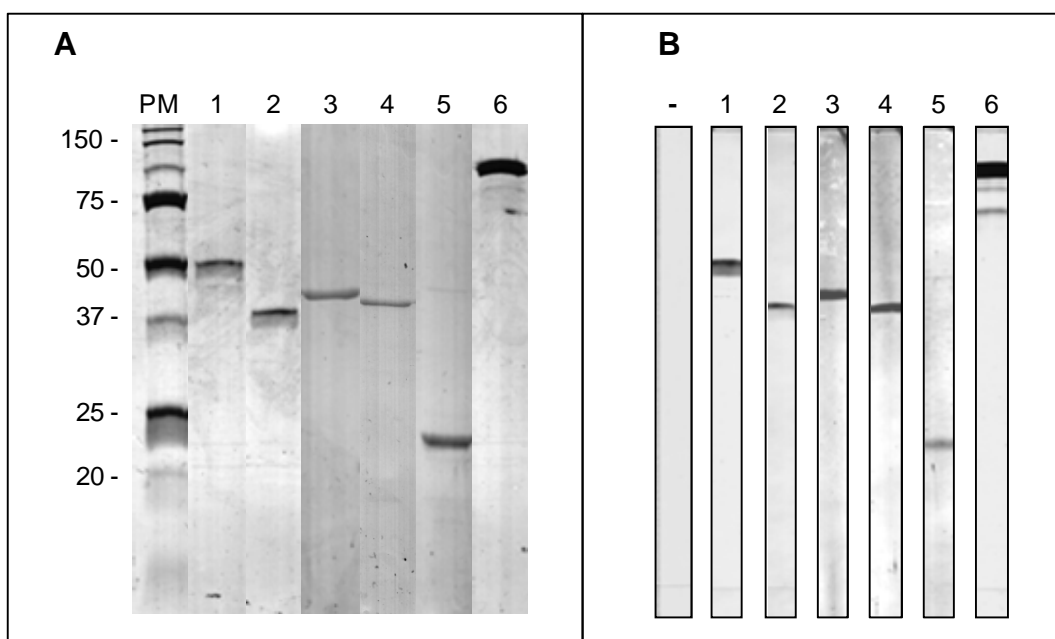
En estos ensayos de inhibición el  $\epsilon\text{ACA}$  se empleó rutinariamente a una concentración de 40 mM, excepto con la proteína rANX en la que se hizo también una valoración del grado de inhibición de la unión del plasminógeno en presencia de concentraciones crecientes de  $\epsilon\text{ACA}$ . Como puede verse en la figura 5F una concentración de 10 mM de  $\epsilon\text{ACA}$  es suficiente para inhibir totalmente la unión de 0,5  $\mu\text{g}$  de plasminógeno a 0,5  $\mu\text{g}$  de rANX.



**Figura 5 – ELISA.** (◆) Unión de cantidades crecientes de plasminógeno a 0,5 µg de rENO (A), rGAPDH (B), rFBA (C), rANX (D) y rSb22.6 (E). (○) Ensayo de competición en el que se incluye 40 mM de εACA durante la incubación con el plasminógeno. (▲) Control positivo, los pocillos se tapizaron con 1 µg de extracto TG. (×) Control negativo, los pocillos se tapizaron sólo con BSA. (F), Ensayo de competición de la unión del plasminógeno a la rANX con concentraciones crecientes εACA. Cada punto representa la media ± la desviación estándar de cuatro pocillos.

Tras comprobar por ELISA que todas las proteínas recombinantes de *S. bovis* unen plasminógeno, pasamos a confirmar dicha interacción mediante western blot.

La figura 6A muestra las proteínas recombinantes separadas en geles de poli(acrilamida) y teñidas con azul coomassie. Geles similares se transfirieron a nitrocelulosa y se incubaron con plasminógeno y anti-plasminógeno, revelándose la unión con un substrato cromogénico. Como se observa en la figura 6B, el plasminógeno se fijó a todas las proteínas recombinantes transferidas a la membrana de nitrocelulosa (tiras 1-5). En la tira control negativo (-), sin recombinante ni plasminógeno, no se revelaron uniones inespecíficas del anticuerpo anti-plasminógeno a la membrana de nitrocelulosa. La tira 6 es el propio plasminógeno transferido a la membrana de nitrocelulosa, que se incluyó en el ensayo como control positivo.



**Figura 6 - A**, Gel de acrilamida al 12 % teñido con azul coomassie y cargado con 1  $\mu$ g de las siguientes proteínas: 1, rENO; 2, rGAPDH, 3, rFBA; 4, rANX; 5, rSb22.6 y 6, plasminógeno. **B**, Western blot de unión a plasminógeno: —, Control negativo; 1, rENO; 2, rGAPDH, 3, rFBA; 4, rANX; 5, rSb22.6; 6, control positivo con plasminógeno. PM, marcador de pesos moleculares expresados en kDa.

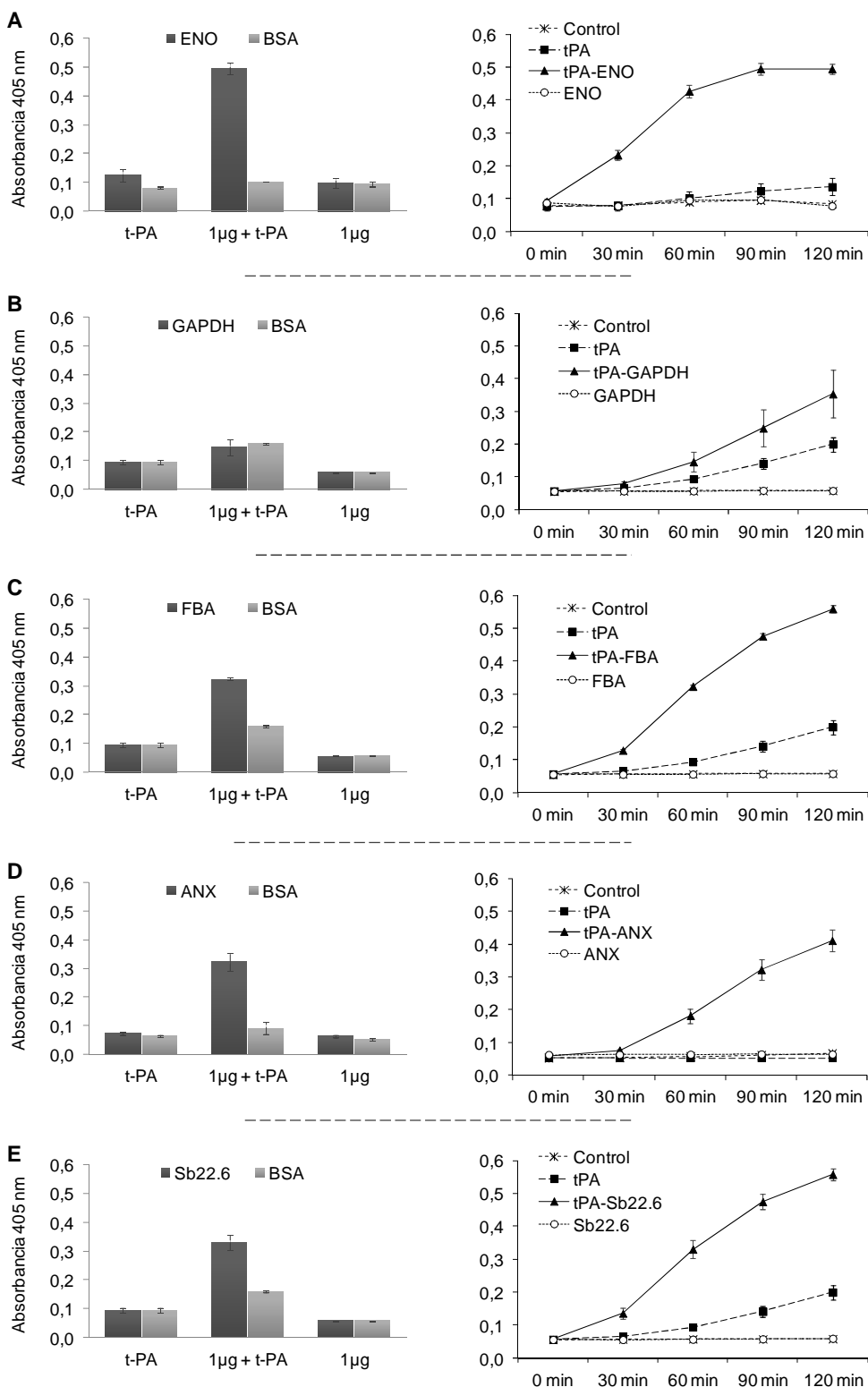
### 3.2. Activación de plasminógeno y generación de plasmina

En este ensayo investigamos si las proteínas de *S. bovis* eran capaces de modificar la activación del plasminógeno inducida por un activador fisiológico, como el t-PA, y, al mismo tiempo, si por sí mismas (en ausencia de activador), tienen capacidad para activar el plasminógeno y generar plasmina.

Para hacer estas comprobaciones, se añadió 1 µg de cada proteína a una mezcla de plasminógeno con o sin el activador (t-PA), y a continuación se midió la cantidad de plasmina generada en la reacción. En paralelo, como proteína control, también se hizo el ensayo con 1 µg de BSA.

La cantidad de plasmina generada en presencia de t-PA aumentó significativamente con la adición de rENO, rFBA, rANX y rSb22.6 (Figura 7 A, C, D, E), lo que indica que estas proteínas potencian la conversión de plasminógeno en plasmina inducida por el t-PA. Por el contrario, la rGAPDH (Figura 7B) no incrementó de forma clara el nivel de plasmina inducido por el t-PA. Ninguna de las proteínas mostró capacidad para activar el plasminógeno por sí mismas, puesto que en ausencia de t-PA, ninguna de ellas originó niveles detectables de plasmina.

En la figura 7 se muestran los diagramas de barras correspondientes a los 60 minutos de reacción para las proteínas rGAPDH, rFBA y rSb22.6 y los correspondientes a 90 minutos de reacción para las rENO y rANX. Se han seleccionado estos tiempos porque en ellos se observó la máxima discriminación entre los controles positivos y negativos.

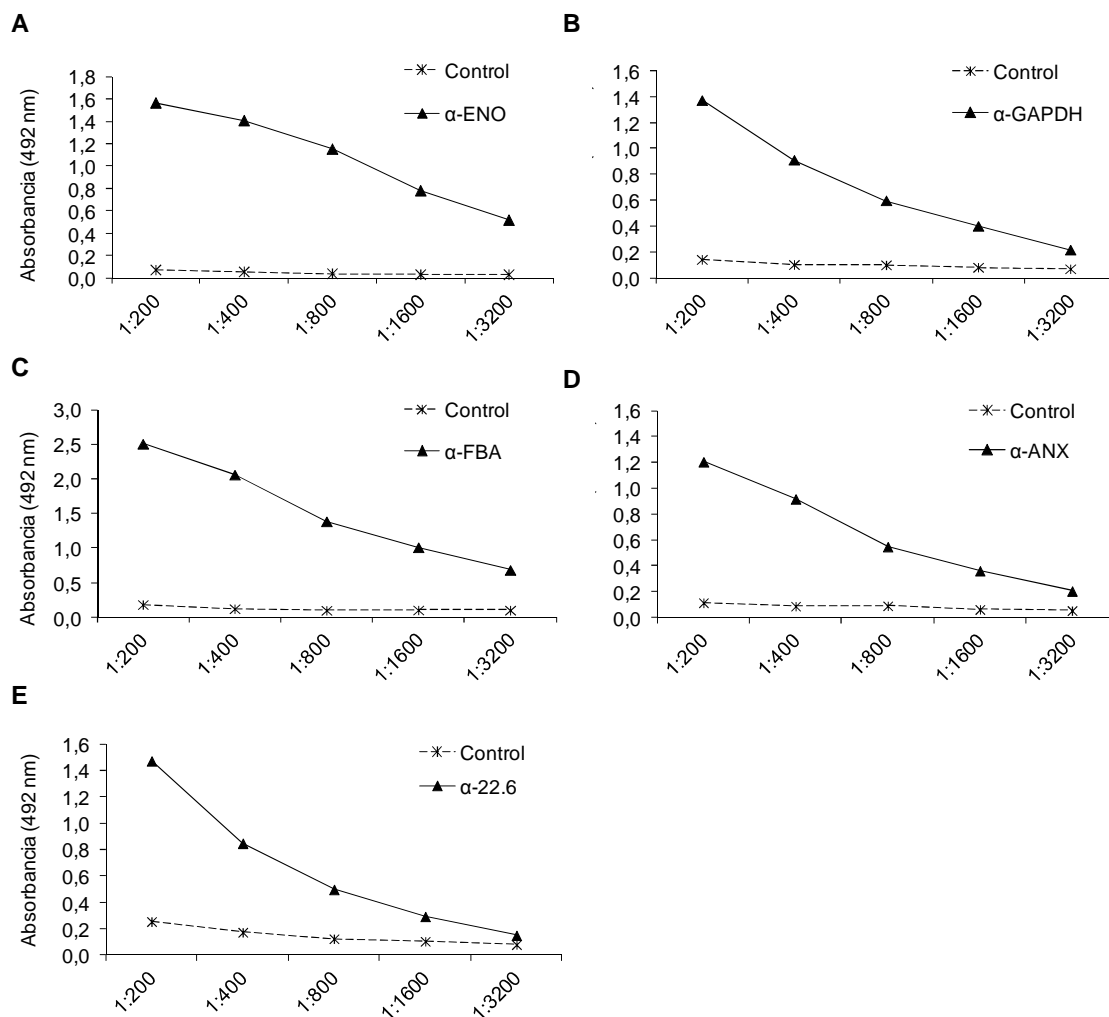


**Figura 7** – Ensayo de activación de plasminógeno. En la columna de la izquierda se representan la generación de plasmina a los 90 (A, D) o 60 (B, C, E) minutos de reacción en presencia y ausencia de t-PA e incluyendo BSA como control negativo. A la derecha se representa la generación de plasmina a lo largo del tiempo, en presencia y ausencia de t-PA e incluyendo como control negativo pocillos incubados sólo con el sustrato. A, rENO; B, rGAPDH; C, rFBA; D, rANX; E, rSb22.6. Cada punto representa la media ± la desviación estándar de cuatro pocillos idénticos.

#### 4. TÍTULO Y ESPECIFICIDAD DE LOS SUEROS HIPERINMUNES

La reactividad y especificidad de los sueros hiperinmunes obtenidos frente a cada una de las proteínas recombinantes se analizó antes de ser utilizados en los estudios de inmunolocalización.

Los sueros de los conejos inmunizados con cada una de las proteínas recombinantes resultaron claramente positivos a los 15 días de la tercera dosis presentando todos ellos un título de anticuerpos superior a 1/1.600 (Figura 8).

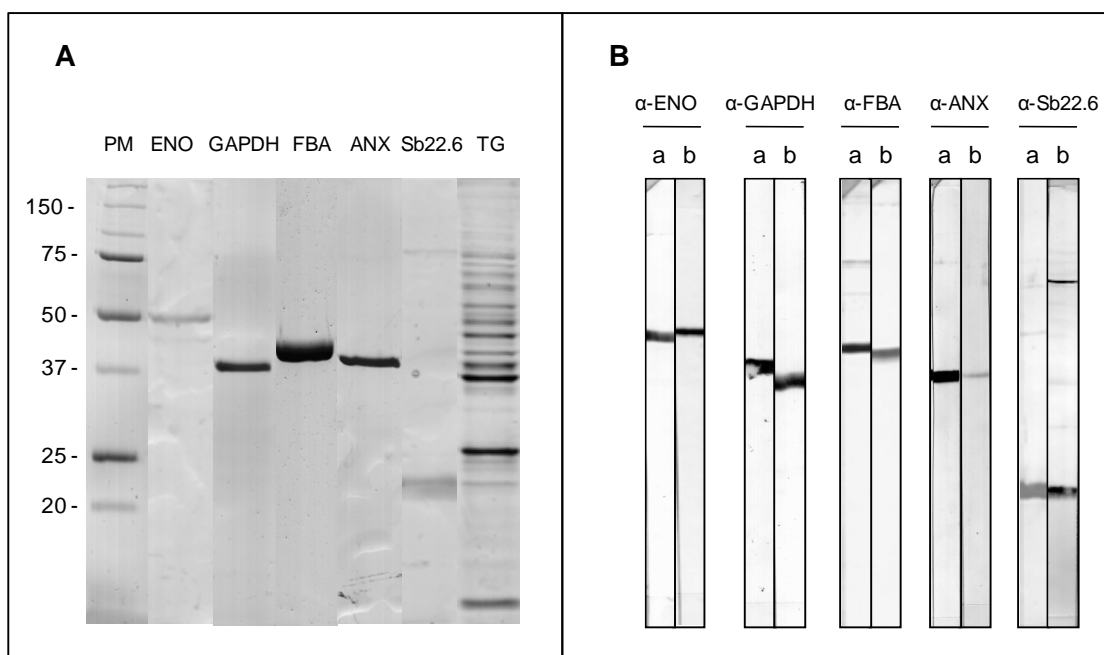


**Figura 8** - Titulación de los sueros procedentes de conejos inmunizados con cada una de las proteínas recombinantes, tomados a los 15 días de la tercera y última dosis antigénica. **A**, rENO; **B**, rGAPDH; **C**, rFBA; **D**, rANX; **E**, rSb22.6.

Una vez comprobados por ELISA la positividad y el título de los sueros hiperinmunes frente a cada una de las proteínas recombinantes, comprobamos también su especificidad por western blot.

La figura 9A muestra cada una de las proteínas recombinantes y el extracto TG separados en geles de poliacrilamida. Estas proteínas y el extracto TG se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con los respectivos sueros hiperinmunes. Como se observa en la figura 9B, dichos sueros reaccionaron intensamente con cada recombinante (carril a) y también reconocieron específicamente a las correspondientes isoformas nativas presentes en el extracto TG de los vermes adultos de *S. bovis* (carril b).

Los sueros control negativo (preinmunes) no reaccionaron con ninguna proteína recombinante ni con ningún componente del extracto TG (resultados no mostrados).



**Figura 9 – A**, Electroforesis de poliacrilamida al 12 % teñido con azul de coomassie. **B**, Western blot en el que cada proteína recombinante (a) junto con el extracto TG (b) se incubaron con el suero hiperinmune homólogo. PM, marcador de pesos moleculares expresados en kDa.

## **5. EXPRESIÓN TISULAR DE LAS PROTEÍNAS ENO, GAPDH, FBA, ANX, Y Sb22.6 EN LOS VERMES ADULTOS Y LAS ESQUISTOSÓMULAS PULMONARES**

En este apartado se exponen los resultados obtenidos en las pruebas de inmunofluorescencia llevadas a cabo para la localización tisular de las cinco proteínas estudiadas. Se exponen primero los ensayos realizados en cortes de vermes adultos incluidos en parafina y, posteriormente, los ensayos con ejemplares enteros, esto es, esquistosómulas de 6 días y vermes adultos.

La fluorescencia verde corresponde al marcaje de la actina con Faloidina-Alexa Fluor 488, que se utilizó como fluorocromo de contraste, y la fluorescencia roja al marcaje específico de cada proteína con el suero hiperinmune homólogo y con un anticuerpo anti-conejo marcado con el fluorocromo Alexa Fluor 594.

### **5.1. Inmunofluorescencia en secciones de vermes adultos**

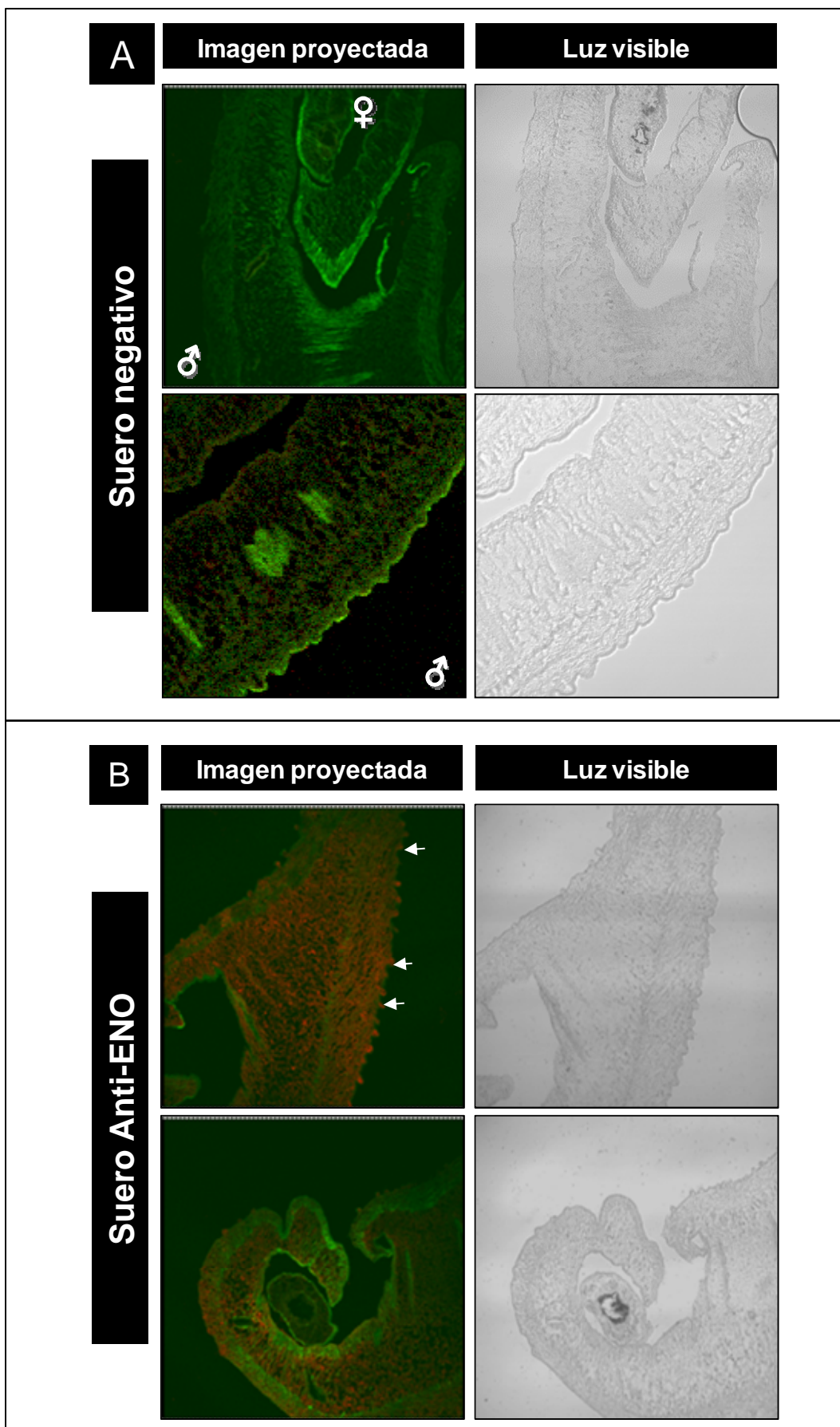
En las secciones de los vermes incubadas con el suero control negativo (preinmune) se aprecia únicamente la fluorescencia verde correspondiente a la actina (Figura 10A).

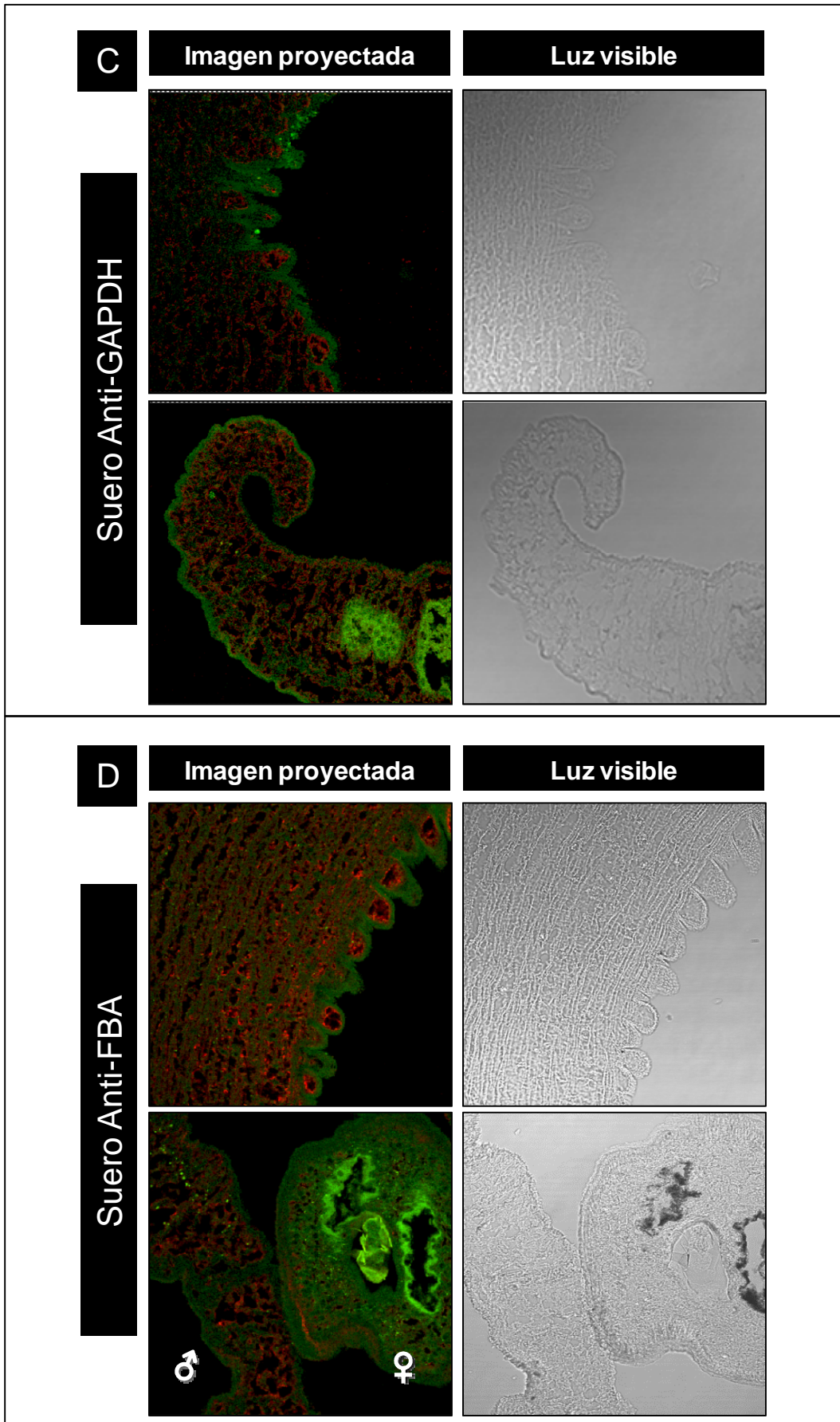
En las secciones incubadas con el suero anti-rENO se observó, además de la fluorescencia verde de la actina, una abundante fluorescencia roja, indicativa de que la enolasa es expresada profusamente en los tejidos internos, detectándose también en zonas más externas y aparentemente superficiales del tegumento de los vermes adultos (Figura 10B).

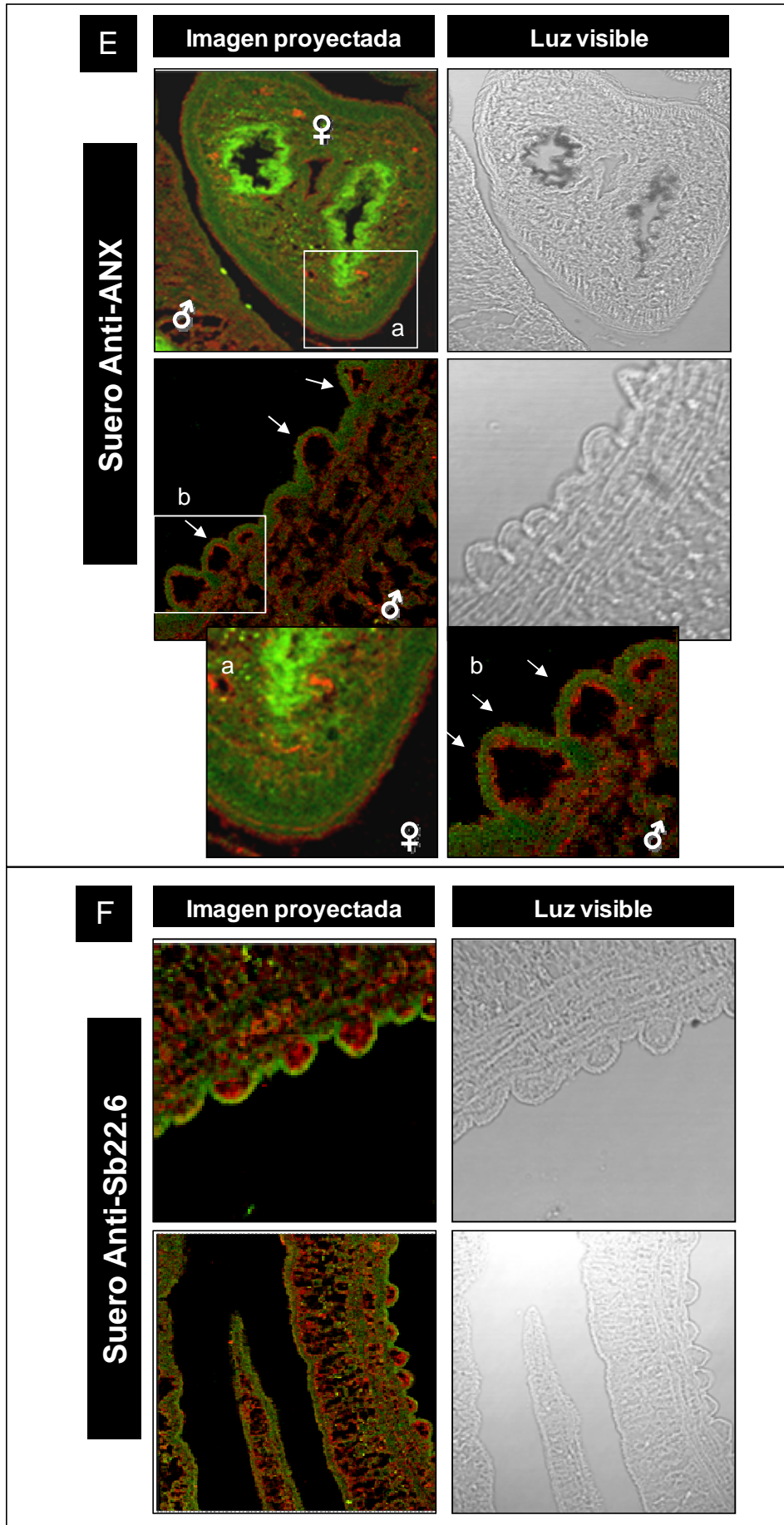
De forma semejante, se observa abundante fluorescencia roja en los tejidos internos de los cortes incubados con los sueros anti-rGAPDH, anti-rFBA y anti-Sb22.6, así como en la zona interna de las protuberancias del tegumento. Sin embargo, ninguna de estas dos proteínas parece expresarse en la superficie externa del mismo (Figuras 10C, 10D y 10F).

Por su parte, en las secciones incubadas con el suero anti-rANX, la abundante señal roja indica que la anexina se expresa abundantemente en los tejidos internos y también en la superficie del tegumento. En la superficie tegumental de los machos la señal roja aparece de forma discontinua a modo de parches, mientras que en las hembras la señal roja aparece de forma continua en todo el contorno (Figura 10E, a y b).









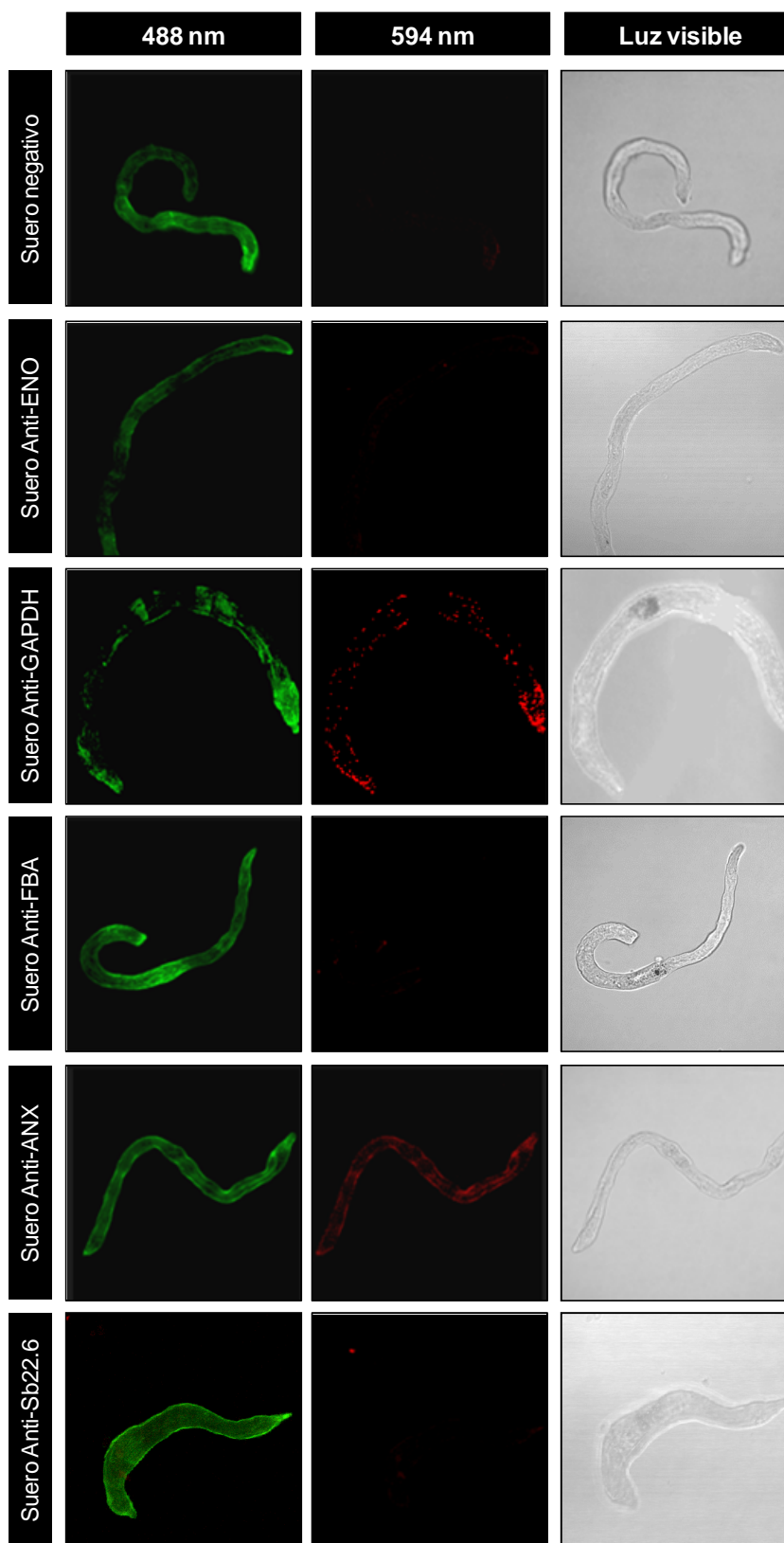
## 5.2. Inmunofluorescencia en esquistosómulas pulmonares

Las esquistosómulas incubadas con el suero preinmune (control negativo) únicamente mostraron la fluorescencia verde correspondiente a la actina (Figura 11).

No se evidenció la expresión de ENO, FBA o Sb22.6 en la superficie del tegumento de estas fases inmaduras (Figura 11). Por el contrario, las esquistosómulas incubadas con los sueros anti-rANX y anti-rGAPDH mostraron señal fluorescente roja, que indica la presencia de anexina y GAPDH en su superficie tegumental. La ANX aparece distribuida de forma bastante continua y regular por todo el tegumento, mientras que la GAPDH aparece con un patrón de distribución más disperso y puntual (Figura 11). En la figura 11, las imágenes correspondientes a cada uno de los fluorocromos se han presentado por separado ya que la superposición de ambas imágenes dificulta la interpretación de los resultados.

---

**Figura 10** – Localización por inmunofluorescencia y microscopia confocal de las cinco proteínas en cortes de vermes adultos de *S. bovis*. **A**, cortes incubados con suero negativo. **B-F**, cortes incubados con los distintos sueros hiperinmunes. Las fotografías de la izquierda muestran superpuestas las imágenes proyectadas obtenidas con los fluoróforos Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594 y las de la derecha muestran las correspondientes imágenes de luz transmitida. Las flechas indican la señal fluorescente de la ENO y ANX expresadas en la superficie del tegumento.



**Figura 11** – Localización por inmunofluorescencia y microscopía confocal de las cinco proteínas estudiadas en la superficie de esquistosómulas pulmonares de *S. bovis*. Se muestran por separado las imágenes correspondientes a cada fluorocromo.

### 5.3. Inmunofluorescencia en vermes adultos enteros

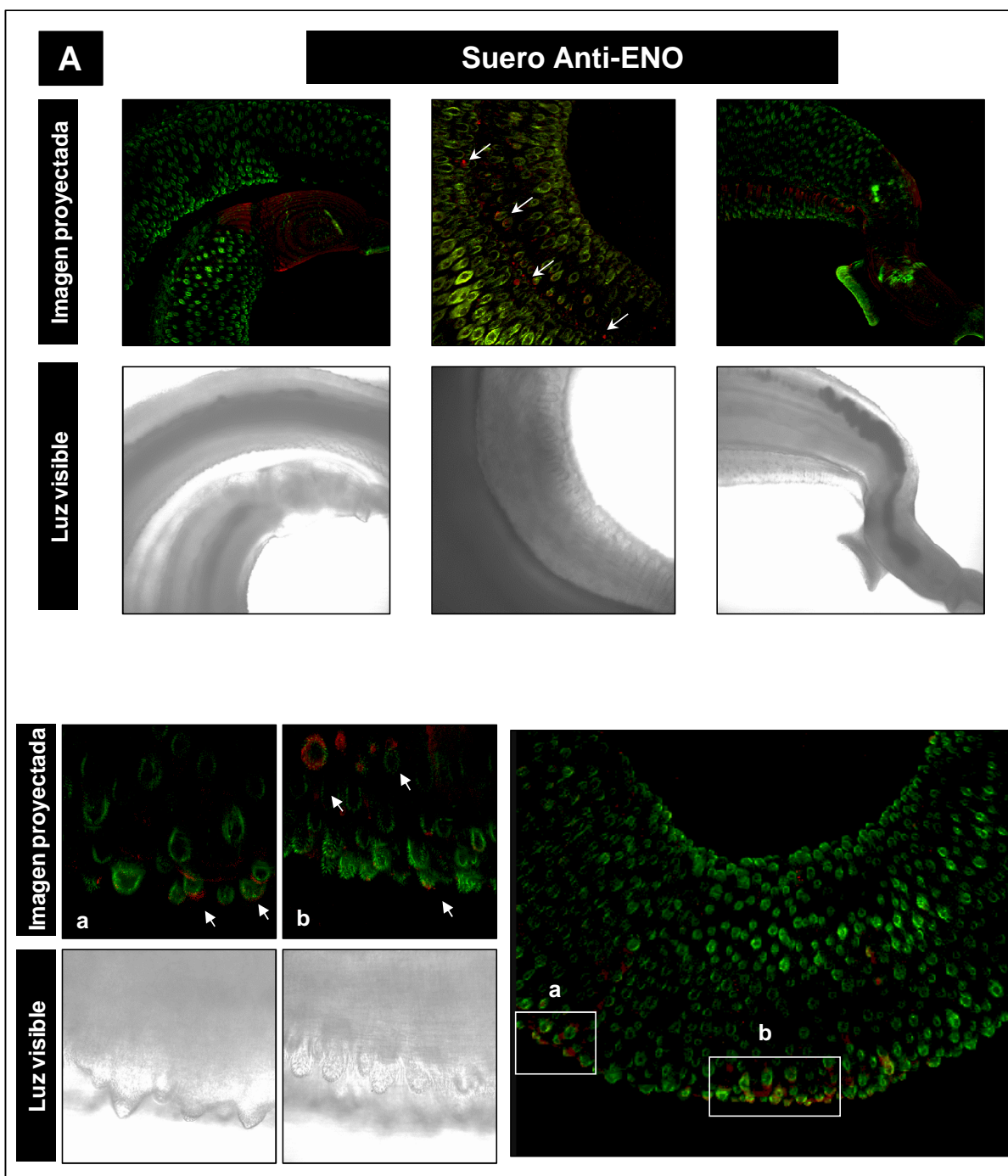
Los ensayos de inmunofluorescencia llevados a cabo en los vermes adultos enteros confirmaron los resultados previos obtenidos en el estudio de las secciones e indican que de las cinco proteínas estudiadas, únicamente la ENO y la ANX se expresan en la superficie del tegumento.

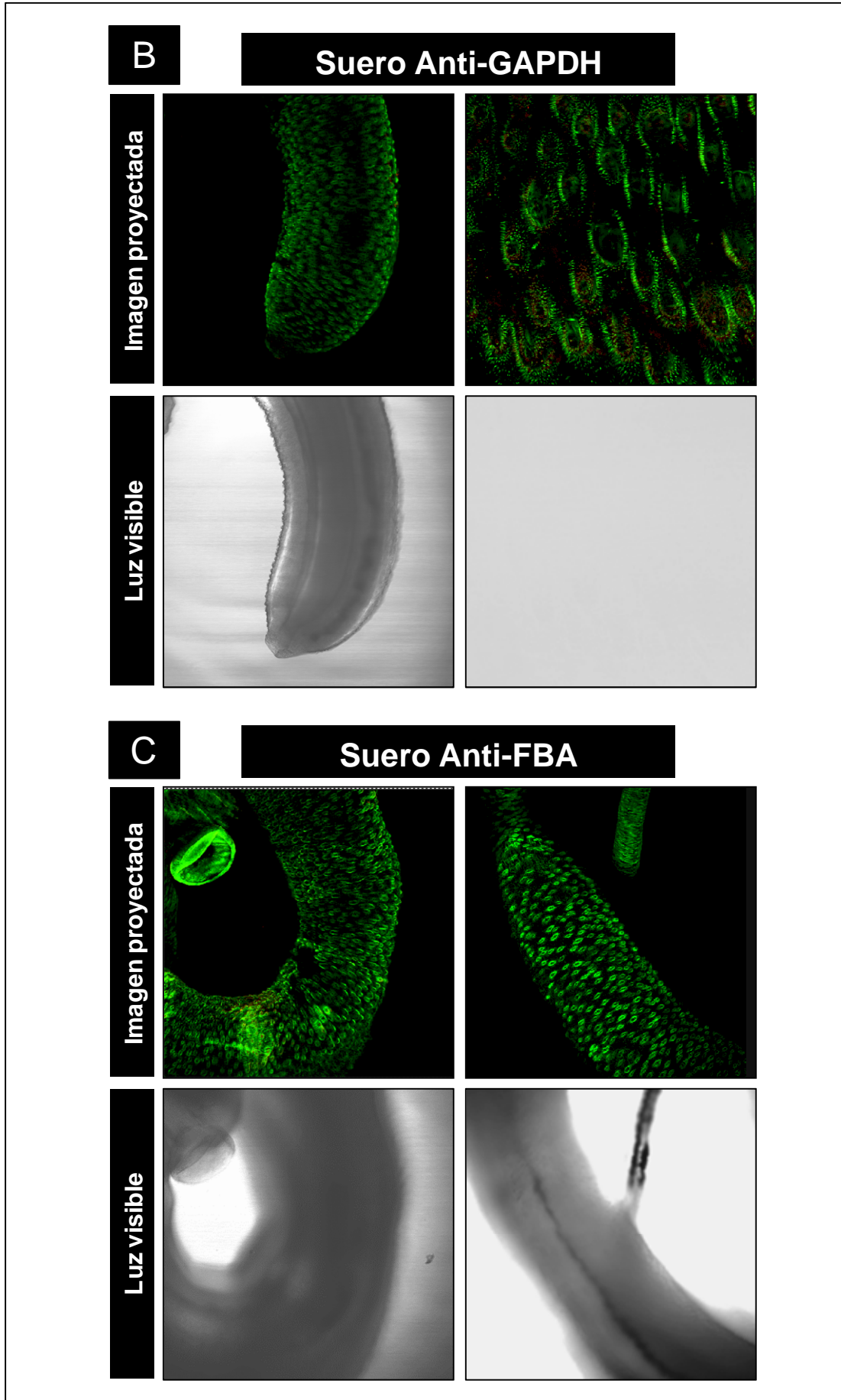
Como muestra la figura 12A, la señal fluorescente roja correspondiente a la ENO se localiza claramente en el extremo anterior y de forma más escasa y puntual en la zona central del cuerpo del verme. En esta misma figura, los recuadros marcados como a y b muestran con más detalle la localización de enolasa en la superficie externa del tegumento de los machos, observándose claramente la fluorescencia roja en el extremo de las protuberancias y pliegues. En dichas protuberancias también se distinguen las espinas de actina.

En cuanto a la ANX, los vermes macho incubados con el suero anti-rANX presentaron un patrón de fluorescencia roja puntual y poco abundante en la zona más externa del tegumento, mientras que en las hembras se confirmó una distribución bastante más abundante (Figura 12D).

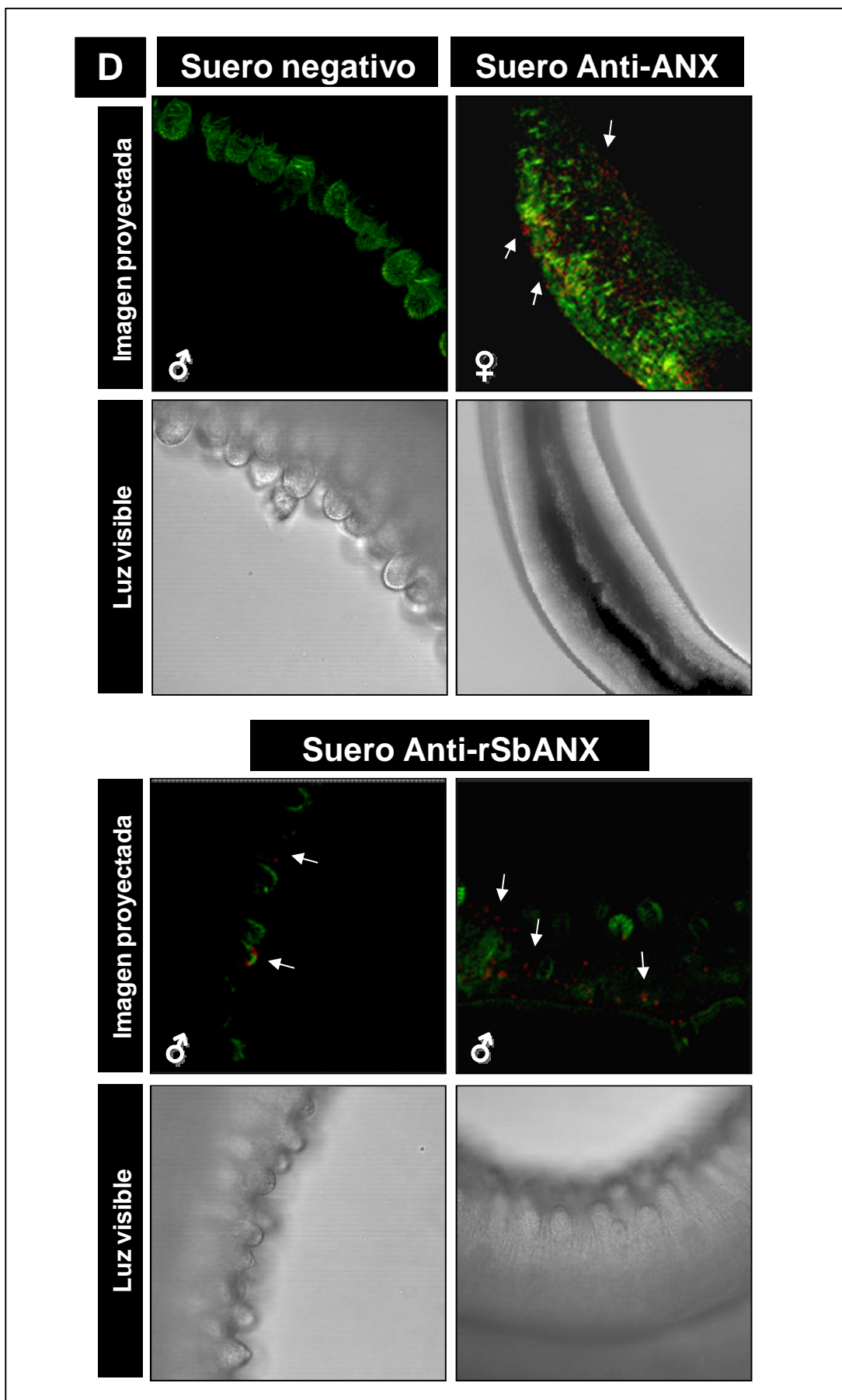
Por su parte, los ensayos para determinar la localización de la GAPDH, FBA y Sb22.6 en el tegumento de los vermes adultos mostraron únicamente fluorescencia verde debida a la presencia de actina, sin revelarse ninguna reactividad roja específica (Figuras 12B, C y E).

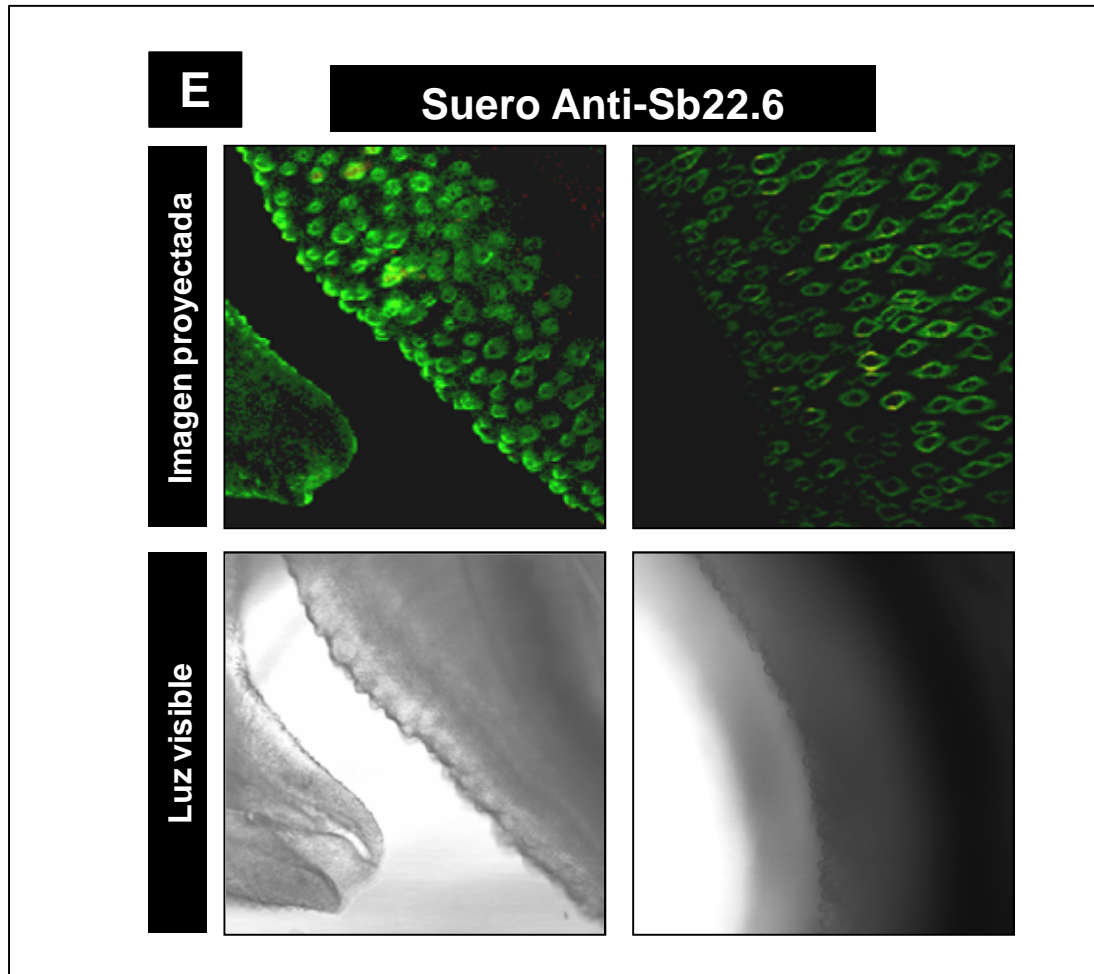
En conjunto, estos ensayos señalaron que, de las cinco proteínas estudiadas, sólo la ENO y la ANX son expresadas la superficie del tegumento, posibilitando su interacción con los componentes de la sangre del hospedador, motivo por el cual ambas moléculas fueron seleccionadas para llevar a cabo estudios adicionales cuyos resultados se describen más adelante.











**Figura 12** – Localización por inmunofluorescencia y microscopía confocal de las proteínas en la superficie de los vermes adultos de *S. bovis*. En la fila superior se muestran las imágenes proyectadas y en la inferior las correspondientes imágenes de luz transmitida. Las flechas indican la señal fluorescente de la ENO y ANX expresadas en la superficie del tegumento.

## 6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ENOLASA DE *S. BOVIS*

Los ensayos anteriores han demostrado que la enolasa de *S. bovis* es una molécula con actividad profibrinolítica y que, además, es expresada en la superficie de los vermes, en contacto con la sangre, condiciones ambas necesarias para que pueda actuar como un receptor fisiológico del plasminógeno y participar así en la activación del sistema fibrinolítico del hospedador. Teniendo en cuenta el interés de esta molécula en las relaciones *S. bovis*-hospedador, se llevaron a cabo estudios adicionales de caracterización molecular e identificación de los motivos de secuencia que intervienen en la unión con el plasminógeno.

### 6.1. Análisis bioinformático de la secuencia de la ENO

La secuencia aminoacídica de la enolasa de *S. bovis* se alineó, utilizando el programa ClustalW 2.0, con las secuencias de enolasa de 11 organismos próximos: dos especies de *Schistosoma* (*S. mansoni* y *S. japonicum*), otros dos trematodos (*Fasciola hepatica* y *Echinostoma caproni*), dos cestodos (*Taenia asiatica* y *Echinococcus granulosus*) y cinco nematodos (*Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Anisakis simplex*, *Caenorhabditis elegans* y *Trichinella spiralis*).

Los resultados de dicho alineamiento se muestran en la tabla 5 y en las figuras 13 y 14. En todos estos organismos la enolasa es una proteína altamente conservada, con mínimas variaciones en el tamaño (entre 431 y 437 aminoácidos), y con un porcentaje de identidad de secuencia respecto a la enolasa de *S. bovis* entre el 70 y el 93 % (Tabla 5).

**Tabla 5** - Porcentaje de identidad de secuencia entre la ENO de *S. bovis* y las enolasas de otros helmintos. Tamaño (número de aminoácidos) y código de acceso en la base de datos UniProt de las enolasas incluidas en el alineamiento de la figura 13.

<b>Especie</b>	<b>Nº acceso</b>	<b>Nº aminoácidos</b>	<b>% de identidad</b>
<i>S. bovis</i>	B2LXU1	434	-
<i>S. mansoni</i>	Q27877	434	93
<i>S. japonicum</i>	P33676	434	88
<i>F. hepatica</i>	B3CJ61	431	80
<i>E. caproni</i>	A1J8J9	431	80
<i>T. asiatica</i>	C9V487	433	73
<i>E. granulosus</i>	D0VLV3	433	75
<i>C. elegans</i>	Q27527	434	74
<i>T. spiralis</i>	Q967U0	437	72
<i>B. malayi</i>	A8PFE3	436	71
<i>O. volvulus</i>	Q7YZX3	435	70
<i>A. simplex</i>	Q8MU59	436	70

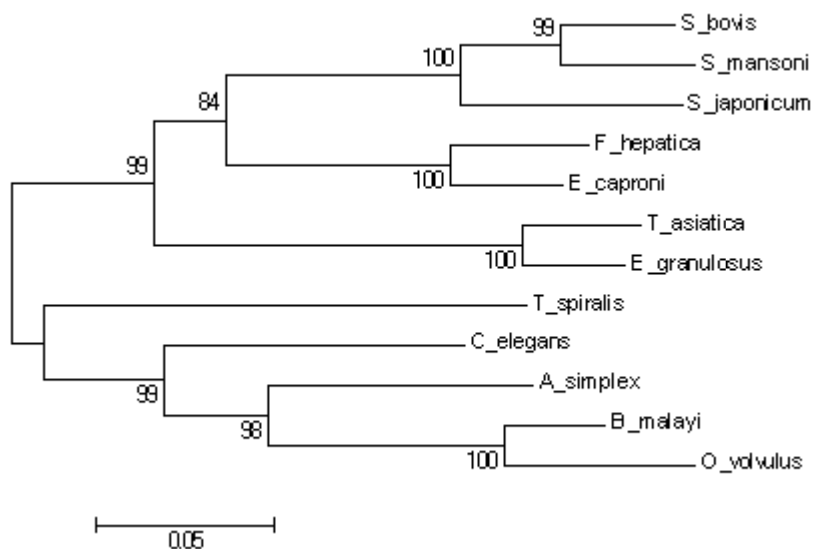
La figura 13 muestra que en estas 12 enolasas están perfectamente conservados los siguientes motivos: (i) los 4 aminoácidos que constituyen los sitios de unión a  $Mg^{2+}$  (S, D, E, D; en la ENO de *S. bovis* en las posiciones 37, 245, 294, 321); (ii) los 7 aminoácidos que forman el sitio de unión al sustrato, el 2-fosfoglicerato (H, E, K, H, R, S, K; en la ENO de *S. bovis* en las posiciones 158, 210, 346, 374, 375, 376, 397); y (iii) los 14 aminoácidos que forman el dominio firma de la enolasa (LLLKVNQIGSLTES, en *S. bovis* posiciones 341-354).

Por su parte, el filograma derivado de este alineamiento (Figura 14) muestra que las enolasas de estos 12 organismos se agrupan en dos grandes clados correspondientes, por una parte, a trematodos+cestodos (99 %) y, por otra, a la mayoría de los nematodos (99 %).

<i>S.bovis</i>	MSIIAIIHARQIFDSRGNPTVEVDLKTSGKLFRAAVPSGASTGVHEALELRDTSKAYMGK	60
<i>S.mansoni</i>	MSILTIHARQIFDSRGNPTVEVDLKTSGKLFRAAVPSGASTGVHEALELRDTSKAYMCK	60
<i>S.japonicum</i>	MAIIAIIHARQIFDSRGNPTVEVDLKTAKGLFRAAVPSGASTGVHEALELRDTSKAYMCK	60
<i>F.hepatica</i>	MAIKAIHARQIFDSRGNPTVEVDVTTAKGLFRAAVPSGASTGVHEALELRDG-PPGYMGK	59
<i>E.caproni</i>	MAIKSIHARQIFDSRGNPTVEVDVTTAKGLFRAAVPSGASTGVHEALELRDG-PPGYMGK	59
<i>T.asiatica</i>	MSIQI HARQIFDSRGNPTVEVDLTTAKGMFRAAVPSGASTGVHEAVELRDGDKNAYMGK	60
<i>E.granulosus</i>	MSILKIHARQIFDSRGNPTVEVDLTTSGKLFRAAVPSGASTGVHEAVELRDADKNAYMGK	60
<i>B.malayi</i>	MPITRVHARPIYDSRGNPTVEVDLTTDKGIFRAAVPSGASTGVHEALELRDNDKAVNHGK	60
<i>O.volvulus</i>	MPITRVHARPIYDSRGNPTVEVDLTTTEKGI FRAAVPSGASTGIHEALELRDNDKAVNHGK	60
<i>A.simplex</i>	MPITRIHARQIYDSRGNPTVEVDLTTTEKGVFRAAVPSGASTGVHEALELRDGDKAVNHGK	60
<i>C.elegans</i>	MPITKI HARQIYDSRGNPTVEVDLFTTEKGVFRAAVPSGASTGVHEALELRDGDKAVHLGK	60
<i>T.spiralis</i>	MSILDIHARQIFDSRGNPTVEVDLRTNRGIFRAAVPSGASTGIHEALELRDGDKSQYMGK	60
	*.* :*** *:*****: * :*:*****:***:**** *	
<i>S.bovis</i>	GVLTA VSNVNTIIAPALIQKNIPVTDQAAIDRFMIELDGTENKEKLGANAILGVSLAVCK	120
<i>S.mansoni</i>	GVLTA VSNVNKIIAPALINKNIPVTNQAAIDKYMIDL DGTENKEKLGANAILGVSLAVCK	120
<i>S.japonicum</i>	GVLTA VSNVNNIIAPALLKKQIPVTNQSEVDQFMIELDGKENKGNLGNANAILGVSLAVCK	120
<i>F.hepatica</i>	GVLKAVANVNSQIAPNLIKSGINVTQAAVDKFM LDDL DGT PNKEKLGANAILGVSLAVCK	119
<i>E.caproni</i>	GVLKAVSNVNNQIAPGLLKGIPVTDQAGIDNFMLQLDGT PNKEKLGANAILGVSLAVCK	119
<i>T.asiatica</i>	GVLNAVKNVNEVIAPALLKEKFI VTDQEKIDEFMIKLDGSPNKGLGNANAILGVSLAVCK	120
<i>E.granulosus</i>	GVLNAVKNVNEVIAPALIKEKFFVTDQQRIDEFMIKLDGSPNKGLGNANAILGVSLAVCK	120
<i>B.malayi</i>	GVLKAVRNVNEHIGPALVAKNFCPTQQREIDHFMLELDGTENKAKLGANAILGVSLAVCK	120
<i>O.volvulus</i>	GVLQAVGNVNEQIGPALVAKNFCPTQQREIDL FMLQLDGTENKAKLGANAILGVSLAVCK	120
<i>A.simplex</i>	SVLKAVANINDKIAPAI VAKNFCSTQQKEIDQFMLDMDGTANKANLGANAILGVSLAVAK	120
<i>C.elegans</i>	GVLKAVSNINEKIAPALIAKGFVDVTAQKDI DDFMMALDGSSENKGNLGNANAILGVSLAVAK	120
<i>T.spiralis</i>	GVSKAVKNINEVIAPSLIAKNFEVTEQSLIDNFMLSLDGTENKSVLGNANAILGVSLAVCK	120
	.* ** *: * *. * : : * * : * : : : * . ** ***** *	
<i>S.bovis</i>	AGAAEAGLPLYRYIAKLAGHENVIMPVP AFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGASSFTE	180
<i>S.mansoni</i>	AGAAEAGLPLYRYIARLAGHEDVIMPVP AFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGASSFTE	180
<i>S.japonicum</i>	AGAAELNPLRYRYIAKLAGHKDVIMPVP AFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGASSFTE	180
<i>F.hepatica</i>	AGAAEKGLPLYKYIATLAGNKVIMPVPSFN VINGGSHAGNKLAMQEFMIMPTGASSFTE	179
<i>E.caproni</i>	AGAAEKGLPLYKYIASLAGNNDVMPVPSFN VINGGSHAGNKLAMQEFMIMPTGASSFAE	179
<i>T.asiatica</i>	AGAAEKGVPLYRHIADLAGNKDVLPVPSFN VINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGAKNFTE	180
<i>E.granulosus</i>	AGAAEKGVPLYRHVADLAGNKDVLPVPSFN VINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGAKSFSE	180
<i>B.malayi</i>	AGAVHKGMPLYKYIAELAGTKQIVLPVP AMNVINGGSHAGNKLAMQEFMIMPIGASSFSE	180
<i>O.volvulus</i>	AGAVHKGMPLYKYIAELAGTRQIVLPVP AMNVINGGSHAGNKLAMQEFMIMPVIGASSFSE	180
<i>A.simplex</i>	AGAVHKGMPLYKYIAELAGVQVMPVPSFN VINGGSHAGNKLAMQEFMIMPVIGAKNFTE	180
<i>C.elegans</i>	AGAVHKGMPLYKYIAELAGTKVLPVP AFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVIGASSFAE	180
<i>T.spiralis</i>	AGAVHKGVSPLYRYIADLAGVDKVI MPVP AFNVINGGSHAGNKLAMQEFMLLPVIGASNFKE	180
	***. . . : * : : * * * : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>S.bovis</i>	AMKIGSEVYHNLKAVIKREYGLDACNVGDEGGFAPNIQDNMKG LQLLEEAIKIAGYTGKK	240
<i>S.mansoni</i>	AMQIGTEVYHNLKAVIKREYGLDACNVGDEGGFAPNIQDNMKG LQLLEEAIKIAGYTGKV	240
<i>S.japonicum</i>	AMQMGSEVYHNLKAVIKREFGLDACNVGDEGGFAPNIQDNMKG LQLLEEAIKIAGYTGKV	240
<i>F.hepatica</i>	AMKIGSEVYHNLRAVIKSKYGLDACNVGDEGGFAPSIQDNLEGLELLRTAIDKAGYTGKV	239
<i>E.caproni</i>	AMKIGSEVYHHLKAVIKGKYGLDACNVGDEGGFAPNIQDNLEGLELLRTAIEKAGYTGKV	239
<i>T.asiatica</i>	AMKMGTEVYHHLKSVIKGKYGLDACNVGDEGGFAPNIQEHMEGLELLKTAIDRAGYTGKV	240
<i>E.granulosus</i>	AMKMGTEVYHHLKSVIKGKYGLDACNVGDEGGFAPNIQDNMEGLELLKTAIDKAGYTGKV	240
<i>B.malayi</i>	AMRMGSEIYHYLKAIEIKRYGLDATAVGD EGGFAPNIQDNREGDLLNTAIIATAGYTGKV	240
<i>O.volvulus</i>	AMRMGSEIYHYLKAIEIKRYGLDATAVGD EGGFAPNIQDNKEGLDLLNTAIIATAGYTGKV	240
<i>A.simplex</i>	AMRMGSEIYHHLKAEIKRYGLDATAVGD EGGFAPNIQDNREGDLLNTAIIALAGYTGKV	240
<i>C.elegans</i>	AMRMGSEVYHHLKAEIKRYGLDATAVGD EGGFAPNIQDNKEGLDLLNTAIDKAGYTGKI	240
<i>T.spiralis</i>	AMRMGSEVYHHLKNCIKARYGLDATAVGD EGGFAPNIQDNKEALELLKAEIGKAGYEGKV	240
	*: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>S.bovis</i>	EIGMDCAASEFHKNG--KYDLDFKNPHSAESAWLSPDAMT NVYKEMISKYPIVSIEDPVD	298
<i>S.mansoni</i>	EIGMDCAASEFHKNG--KYDLDFKNPHSAESTWLS PDAMANMYQMI SKFPVSIEDPFD	298
<i>S.japonicum</i>	EIGMDCAASEYKKG--KYDLDFKNPQSAESHWLSPDEMANVYKEMIQKYPIVSIEDPFD	298
<i>F.hepatica</i>	XIAMDCAASEFYKEG--KYDLDFKNPKSQASSWITSDAMADVKKMMSTYPIVSIEDPFD	297
<i>E.caproni</i>	KIAMDSAASEFYKEG--KYDLDFKNPKSPASSWISSDAMADVKKMMSTYPIVSIEDPFD	297
<i>T.asiatica</i>	KIGMDVAASEFYQNG--KYNLDFKNPAAVASSIVPGSKLAEIYLEMLSKYPIVSIEDPFD	298
<i>E.granulosus</i>	KIGMDVAASEFYQDG--NYNLDKFNPKAAASSIVSGSKLSDIYSEMISKYPIVSIEDPFD	298
<i>B.malayi</i>	SIAMDCAASEYMEKADKLYDLDFKNPNSGKTQWK TGDQMMN-FQSF IKEYPVVSIEDWFH	300
<i>O.volvulus</i>	SIAMDCAASEFYKADKLYDLDFKNPNSGKTQWK TGDQMLAEIYHSFVKEYPIVSIEDAFD	300
<i>A.simplex</i>	SIAMDVAASEFYKADKLYDLDFKNPNSGKTQWK TGDQMLAEIYHSFVKEYPIVSIEDAFD	300
<i>C.elegans</i>	SIGMDVAASEFFKDG--KYDLDFKNPASDSSKWL SGEQLTELYQSFIKEYPVVSIEDAFD	298
<i>T.spiralis</i>	KIGMDIAASEFYKSKELYDLDFKNPESNAKDWKNGEQMLELYKDFVTNYPIVSIEDGYD	300
	*.* ** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

<i>S. bovis</i>	QDDWETWPKLTASTNIQIVG <b>DDL</b> TVTNPKRIKKAISSKACN <b>LLLKVNQIGSLTES</b> IEAC 358
<i>S. mansoni</i>	QDDWETWPKLTSSTNIQIVG <b>DDL</b> TVTNPKRIKQAIASKACN <b>LLLKVNQIGSLTES</b> IEAC 358
<i>S. japonicum</i>	QDDWDAWPKLTASTNIQIVG <b>DDL</b> TVTNPKRIEKAIKVKACN <b>LLLKVNQIGSITES</b> IEAC 358
<i>F. hepatica</i>	QDDWPAWTKLTGECKIQIVG <b>DDL</b> TVTNPLRVQKAIDQKACN <b>LLLKVNQIGSVSES</b> IKAC 357
<i>E. caproni</i>	QDDWPAWTKLTGECKIQIVG <b>DDL</b> TVTNPLRVQKAIDQKACN <b>LLLKVNQIGSVTES</b> IQAC 357
<i>T. asiatica</i>	QDDWAAWTAFAKAGIQIVG <b>DDL</b> TVTNPERVQQAIDKKACN <b>LLLKVNQIGSVTES</b> IKAC 358
<i>E. granulosus</i>	QDDWAAWTEFNAKAGIQIVG <b>DDL</b> TVTNPERVQQAIDRKACN <b>LLLKVNQIGSVTES</b> IKAC 358
<i>B. malayi</i>	QDDWENWTKALANTHIQIVG <b>DDL</b> TVTNPKRIAMAAEKKACN <b>LLLKVNQIGSVTES</b> IDAA 360
<i>O. volvulus</i>	EDDWHNWPGLAKTNIQIVG <b>DDL</b> TVTNPKRIALAAEKKACN <b>LLLKVNQIGSVTES</b> IDAA 359
<i>A. simplex</i>	QDDWENWTKFKSTLNIQLVGD <b>DDL</b> TVTNRERIQMAIDKKACD <b>LLLKVNQIGSVTES</b> IEAA 360
<i>C. elegans</i>	QDDWDNWKGFHGATSISQLVGD <b>DDL</b> TVTNPKRIQTAIDKKSCN <b>LLLKVNQIGSVTES</b> IEAA 358
<i>T. spiralis</i>	QDDWDNWKMCSELKIQIVG <b>DDL</b> TCTNPKRIQQAIDKKACN <b>LLLKVNQIGSVTES</b> IQAC 360
	:*** * . **:* ** . * *: * *:: *****:***.*.
<i>S. bovis</i>	KLAQNAGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKAGAPCRSDRLAKYNQLLRIEEEL 418
<i>S. mansoni</i>	KLAQDSGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPCRSDRLAKYNQLLRIEEEL 418
<i>S. japonicum</i>	KMAQKAGWGMVSHRSGETEDNF IADLVVGLCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEEL 418
<i>F. hepatica</i>	KMAQEAGWGMVSHRSGETEDNF IADLVVGLRTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEDL 417
<i>E. caproni</i>	KMAQSAGWGMVSHRSGETEDNF IADLVVGLRTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEDL 417
<i>T. asiatica</i>	KMSRAAGWGMVSHRSGETEDSTIADIVVGLRTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEEL 418
<i>E. granulosus</i>	KMSRAAGWGMVSHRSGETEDSTIADIVVGLRTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEEL 418
<i>B. malayi</i>	NLARKNGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLATGQIKTGAPCRSERLAKYNQILRIEEL 420
<i>O. volvulus</i>	NLARKNGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLAAGQIKTGAPCRSERLAKYNQILRIEEL 419
<i>A. simplex</i>	KLARANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLAVGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEEL 420
<i>C. elegans</i>	KLSRANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLATGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEEL 418
<i>T. spiralis</i>	QLSRKNGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLATGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEEL 420
	::: ***** . **:* ** . ****:*****:*****:*****:*
<i>S. bovis</i>	G--AAAKYAGKNFRHPKK 434
<i>S. mansoni</i>	G--TAAKYAGKNFRHPKV 434
<i>S. japonicum</i>	G--STAKYAGKHFRHPQI 434
<i>F. hepatica</i>	G--GAAKYAGENFRP-- 431
<i>E. caproni</i>	G--SAAKYAGENFRP-- 431
<i>T. asiatica</i>	G--FKAVYAGEHFRNPL- 433
<i>E. granulosus</i>	G--PKAVYAGEHFRNPL- 433
<i>B. malayi</i>	G--SAAIYAGQKFRNPQA 436
<i>O. volvulus</i>	G--SAAVYAGQKFRNPQA 435
<i>A. simplex</i>	G--SAAVYAGEKFRNPQA 436
<i>C. elegans</i>	G--ADAVYAGHNFRNPQV 434
<i>T. spiralis</i>	ERQGI AKYAGENFHNQP- 437
	* **.*:*.*

**Figura 13** - Alineamiento múltiple de la secuencia de las enolasas de *S. bovis* y de otras dos especies de esquistosomas, otros dos trematodos, dos cestodos y cinco nematodos. Los aminoácidos conservados en las doce secuencias se indican con un asterisco, con 2 puntos se señalan las sustituciones conservativas y con un punto las semi-conservativas. Los motivos de unión a Mg<sup>2+</sup> se indican en sombreado negro, el dominio firma de enolasa se indica dentro de un recuadro y los motivos implicados en la unión al sustrato se somborean en gris.

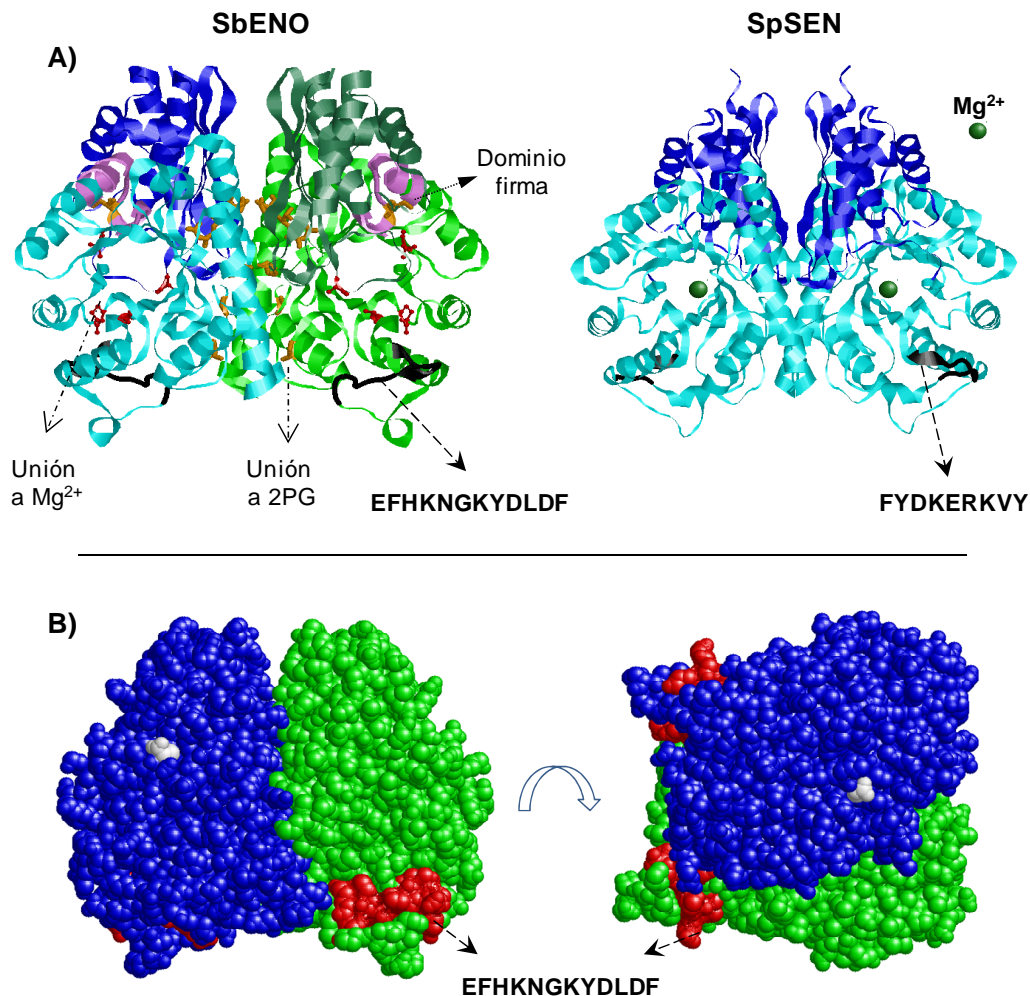


**Figura 14** – Filograma obtenido a partir del alineamiento múltiple de las enolasas de los 12 vermes incluidos en la figura 13.

La predicción de la estructura secundaria y el modelado tridimensional de la ENO de *S. bovis* se llevó a cabo utilizando el servidor Swiss-Model y la  $\alpha$ -enolasa humana (P06733) como molde, por ser ésta la enolasa con estructura 3D conocida con la que presenta una mayor identidad (74,48 %). El modelo tridimensional resultante se muestra en la figura 15A, junto con la de la enolasa de la superficie de *Streptococcus pneumoniae* (SpSEN, Q97QS2), con la que presenta características estructurales y funcionales similares. La enolasa de *S. pneumoniae* se expresa en la superficie bacteriana, donde desempeña un papel fundamental para la diseminación de las bacterias ya que participa en la degradación de la matriz extracelular a través de la fijación y activación del plasminógeno. En dicha interacción se ha demostrado que interviene el motivo interno de unión a plasminógeno, FYKERKVY (Bergmann et al., 2003; Ehinger et al., 2004; Cork et al., 2009).

Como muestra la figura 15A, la ENO de *S. bovis*, al igual de la SpSEN, es una estructura dimérica formada por dos subunidades idénticas orientadas de forma antiparalela. Cada unidad (coloreadas en azul y verde, respectivamente) presenta la estructura típica de las enolasas, constituida por un dominio amino terminal pequeño (de color oscuro) formado por 3 láminas  $\beta$  seguidas de 4 hélices  $\alpha$  ( $\beta_3\alpha_4$ ) y un dominio carboxilo terminal de mayor tamaño (de color claro) con una estructura de barril formada por 8 láminas  $\beta$  y 8 hélices  $\alpha$  ( $\beta\beta\alpha(\beta\alpha)_6$ ). En esta figura se señalan los aminoácidos que intervienen en la unión a magnesio, la posición del dominio firma, de

los dominios de unión al sustrato y del motivo de unión a plasminógeno identificado en el array de péptidos descrito en el siguiente apartado. En la figura 15B se ha representado la superficie molecular del dímero de la ENO de *S. bovis* donde puede observarse que este motivo de unión a plasminógeno se localiza en posiciones accesibles en los dos monómeros de la molécula (en rojo).



**Figura 15 – A**, Modelos tridimensionales (3D) de las enolasas de *S. bovis* (SbENO) y *S. pneumoniae* (SpSEN); los aminoácidos del centro activo que unen  $Mg^{2+}$  se han representado con bolas y bastones rojos y los que intervienen en la unión del sustrato (el 2-fosfoglicerato, 2PG) con bastones de color naranja; el dominio firma de la SbENO se ha coloreado de rosa y los dominios de unión a plasminógeno se resaltan en negro. **B**, Predicción de la superficie molecular de la SbENO; señalada en rojo la localización del dominio interno de unión a plasminógeno y en blanco los residuos de las lisinas carboxi-terminales.



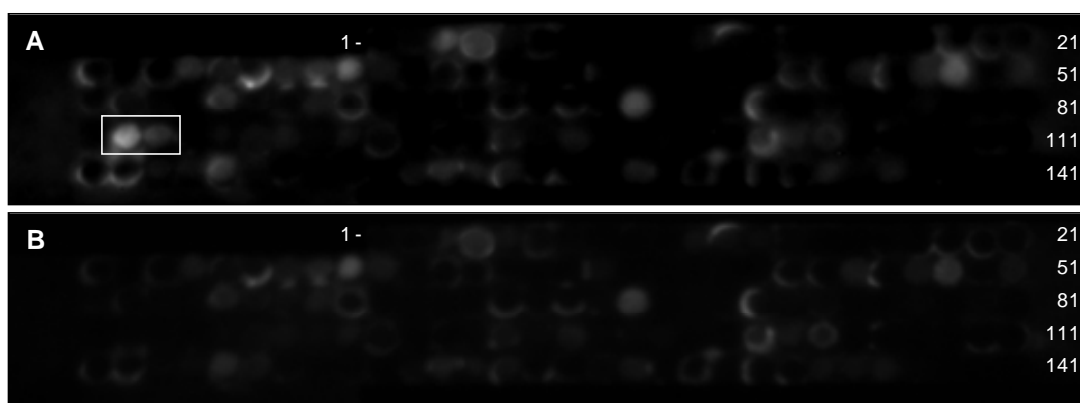
## 6.2. Identificación de los motivos de unión a plasminógeno en la secuencia de la enolasa

Con el objeto de identificar en la secuencia de la enolasa a los aminoácidos que intervienen en la unión a plasminógeno se construyó un array de 141 péptidos, de 15 aminoácidos cada uno, que representaba la secuencia completa de la proteína.

El screening del array con plasminógeno permitió identificar dos péptidos consecutivos, correspondientes a los spots 83 y 84, que unían plasminógeno de forma específica (Figura 16A). Las secuencias de estos péptidos son AASEFHKNGKYDLDF y EFHKNGKYDLDFKNP, con una secuencia común de 11 aminoácidos, <sup>250</sup>EFHKNGKYDLDF<sup>261</sup>, que en su totalidad o en parte será la responsable de la unión del plasminógeno a la enolasa.

Como puede observarse en la membrana control de la figura 16B, el anticuerpo anti-plasminógeno se unió inespecíficamente a otros péptidos (spots) del array. Por el contrario, no se produjo ningún tipo de unión inespecífica del anticuerpo secundario a la membrana (no mostrado).

Se observa también que, a diferencia de lo descrito en otros receptores de plasminógeno de la superficie celular, las dos lisinas del extremo carboxilo terminal (correspondientes al spot número 141) de la enolasa de *S. bovis* no intervienen en la unión de plasminógeno.



**Figura 16** – Array de péptidos de la ENO de *S. bovis*. **A**, membrana incubada con 10 µg/mL de plasminógeno y revelada con sustrato quimioluminiscente; **B**, membrana control incubada únicamente con el tampón diluyente, sin plasminógeno. Cada spot se corresponde con un péptido de 15 aminoácidos. En el recuadro blanco se señalan los péptidos 83 y 84 a los que se ha unido el plasminógeno.

Tras su identificación en la secuencia de la enolasa de *S. bovis*, el motivo interno de unión a plasminógeno se comparó con el de las enolasas de otros organismos, concretamente *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Leishmania mexicana* y *Homo sapiens* ( $\alpha$ -enolasa) (Tabla 6). La secuencia de la ENO de *S. bovis* mostró la mayor identidad con el de la enolasa humana (74 %) y la menor con los de los *Streptococcus* sp. (48 %). Únicamente las enolasas de *S. bovis*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* cuentan con dos lisinas carboxi-terminales, a las que inicialmente se atribuyó la capacidad de la enolasa para unir plasminógeno es estos organismos (Bergmann et al., 2001).

**Tabla 6** – Motivos internos de unión a plasminógeno en la enolasa de *S. bovis* y en las enolasas de distintos organismos. % de identidad respecto a la secuencia de ENO de *S. bovis*. Se han sombreado en gris las secuencias que intervienen en la unión de plasminógeno y en negrita, se resalta la secuencia mínima unidora de plasminógeno de *S. bovis* deducida tras el alineamiento. Se indican los aminoácidos del extremo carboxilo terminal, destacándose en negrita los residuos de lisina.

Especie	Motivo interno	Extremo C-terminal	% Identidad	Nº de acceso
<i>S. bovis</i>	<b>EFHKNGK</b> -- <b>YDLDF</b>	<b>KK</b>	--	B2LXU1
<i>S. pneumoniae</i>	EFYDKER--KVYDY	<b>KK</b>	48 %	Q935W7
<i>S. pyogenes</i>	EFYDKER--KVYDY	<b>KK</b>	48 %	P69949
<i>L. mexicana</i>	EAYDAERKMYNLT <b>F</b>	WA	60 %	Q3HL75
<i>H. sapiens</i>	EFFRSGK--YDLDF	<b>AK</b>	74 %	P06733

Parte de los estudios llevados a cabo con la enolasa han sido publicados en el siguiente artículo (ver anexo):

de la Torre-Escudero, E., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R., Siles-Lucas, M. & Oleaga, A. (2010). Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Veterinary Parasitology*, 173: 76-84.

## 7. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ANEXINA DE *S. BOVIS*

Al igual que la enolasa, la anexina de *S. bovis* mostró actividad fijadora de plasminógeno y expresión en la superficie de los vermes, lo que le permite entrar en contacto con la sangre del hospedador y la convierte en un potencial regulador de sus respuestas hemostáticas.

Por este motivo y dado su interés, se han efectuado estudios adicionales para su caracterización molecular y funcional. En concreto, se han comparado *in silico* su secuencia y estructura con las de determinadas anexinas de otros organismos que son conocidas por poseer actividad anticoagulante y profibrinolítica, como las B1 y B2 de *T. solium* y las A2 y A5 humanas, y se ha analizado experimentalmente la actividad anti-coagulante de esta proteína.

### 7.1. Análisis bioinformático de la secuencia de la ANX

En primer lugar se ejecutó la búsqueda en las bases de datos de proteínas homólogas a la ANX de *S. bovis*. En SWISS-Prot se encontraron los mayores porcentajes de identidad con las anexinas de *S. mansoni* (Q9XY89) y *S. japonicum* (Q5DFR2), mostrando una identidad de secuencia del 91 y 86 %, respectivamente. A continuación, en la base de datos SchistoDB (<http://www.genedb.org>) se encontraron, además de la ya mencionada Q9XY89 (equivalente a la Sm 074150 en SchistoDB), otras 13 secuencias de anexinas de *S. mansoni*, aunque con porcentajes de identidad sensiblemente menores, entre el 37 al 23 % (Tabla 7).

**Tabla 7-** Anexinas identificadas en el género *Schistosoma*. % de identidad con la anexina de *S. bovis*.

Especie	Código	Nº aminoácidos	% identidad
<i>S. bovis</i>	B2LXU0	359	-
<i>S. japonicum</i>	Q5DFR2	359	86
<i>S. mansoni</i>	Q9XY89	365	91
	Smp_074150	331	37
	Smp_045560	344	37
	Smp_162160	340	34
	Smp_077720	487	34
	Smp_074140	287	33
	Smp_146690	706	32
	Smp_164100	352	29
	Smp_045500	545	28
	Smp_077880	349	27
	Smp_045490	508	25
	Smp_155580.1	398	24
	Smp_155580.2	398	24
	Smp_146680	849	23

Tras la identificación de las secuencias homólogas en otros esquistosomas, se comparó la estructura y la secuencia de la ANX de *S. bovis* con las de las anexinas B1 y B2 de *T. solium* y A5 y A2 humanas, que poseen actividades profibrinolíticas y/o anticoagulantes.

Este análisis mostró, primero, que la ANX de *S. bovis* presenta unos porcentajes de identidad del 42 % y 36 % con las anexinas B1 y B2 de *T. solium* y del 37 y 32 % con las A5 y A2 humanas y, en segundo lugar, que la ANX de *S. bovis* presenta las características estructurales típicas, muy conservadas en los miembros de la familia de las anexinas (Figura 17).

En la ANX de *S. bovis* dicha estructura consistió en un dominio central conservado de 309 aminoácidos y un dominio amino terminal variable de 50 aminoácidos. El dominio central contenía a su vez cuatro repeticiones, típicas de la superfamilia, cada una de ellas de 52 a 60 aminoácidos, que se correspondían con los segmentos 51–103, 123–183, 229–281 y 304–356. En cada repetición se encontraron sitios de unión a Ca<sup>2+</sup> de tipo II y III, que se corresponden, respectivamente, con los residuos sombreados en

amarillo o los subrayados (Figura 17). Los dominios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo II mostraron la típica secuencia M-K/R-G/R-X-G-T-(38 residuos)-D/E, y los de tipo III la secuencia conservada G-X-G-T-D/E.

La secuencia de la ANX también mostró el motivo KGLGT en la repetición II del dominio central, que está presente en las anexinas B1 de *T. solium* y A2 humana (indicado con un recuadro en la figura 17). En esta última, este motivo, junto con el aspártico 162 ( $\text{D}^{162}$ ), son los responsables de la interacción de la anexina con los fosfolípidos de la superficie celular (Hajjar y Krishnan, 1999).

La ANX de *S. bovis* posee igualmente el motivo  $^{100}\text{LCQL}^{103/114}\text{SL}^{115}$ , que es similar a la secuencia  $^8\text{LCKLSL}^{13}$  de la anexina humana A2 y al motivo  $^{38}\text{LCK}^{40/69}\text{SL}^{70}$  de la anexina B2 de *T. solium* (indicados en rojo en la figura 17). En la anexina humana A2 este motivo es el responsable de la interacción con el t-PA (Hajjar et al., 1998). En el modelo 3D de la anexina humana A2 (figura 18), este último motivo no aparece señalado ya que el modelo de esta molécula se generó a partir del aminoácido 32 y, por lo tanto, no incluye el segmento amino terminal que contiene dicha secuencia.

Una diferencia importante de la ANX de *S. bovis* y las B1 y B2 de *T. solium* con las anexinas humanas, es la existencia de un fragmento de secuencia adicional en la zona de unión entre las repeticiones II y III (Figuras 17 y 18). Este fragmento es una característica que se ha encontrado únicamente en las anexinas de parásitos.

Como se observa en las figuras 17 y 18 la predicción de las estructuras secundaria y terciaria, obtenidas con el programa SwissModel, mostró que la anexina de *S. bovis* está formada principalmente por hélices  $\alpha$ , aunque contiene también 4 láminas  $\beta$ . La figura 17 muestra que los 4 dominios repetidos y las hélices  $\alpha$  coinciden en las 5 secuencias, de manera que las estructuras secundaria y terciaria de las cinco anexinas analizadas están muy conservadas a pesar de que los porcentajes de identidad de secuencia primaria sean bajos.

En el modelo tridimensional de la anexina de *S. bovis* y la A2 humana, las cuatro repeticiones se pliegan formando una estructura discoidal, con una superficie ligeramente convexa, en la cual se localizan los dominios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que los extremos amino terminal y carboxilo terminal se encuentran en el lado opuesto (Figura 18).

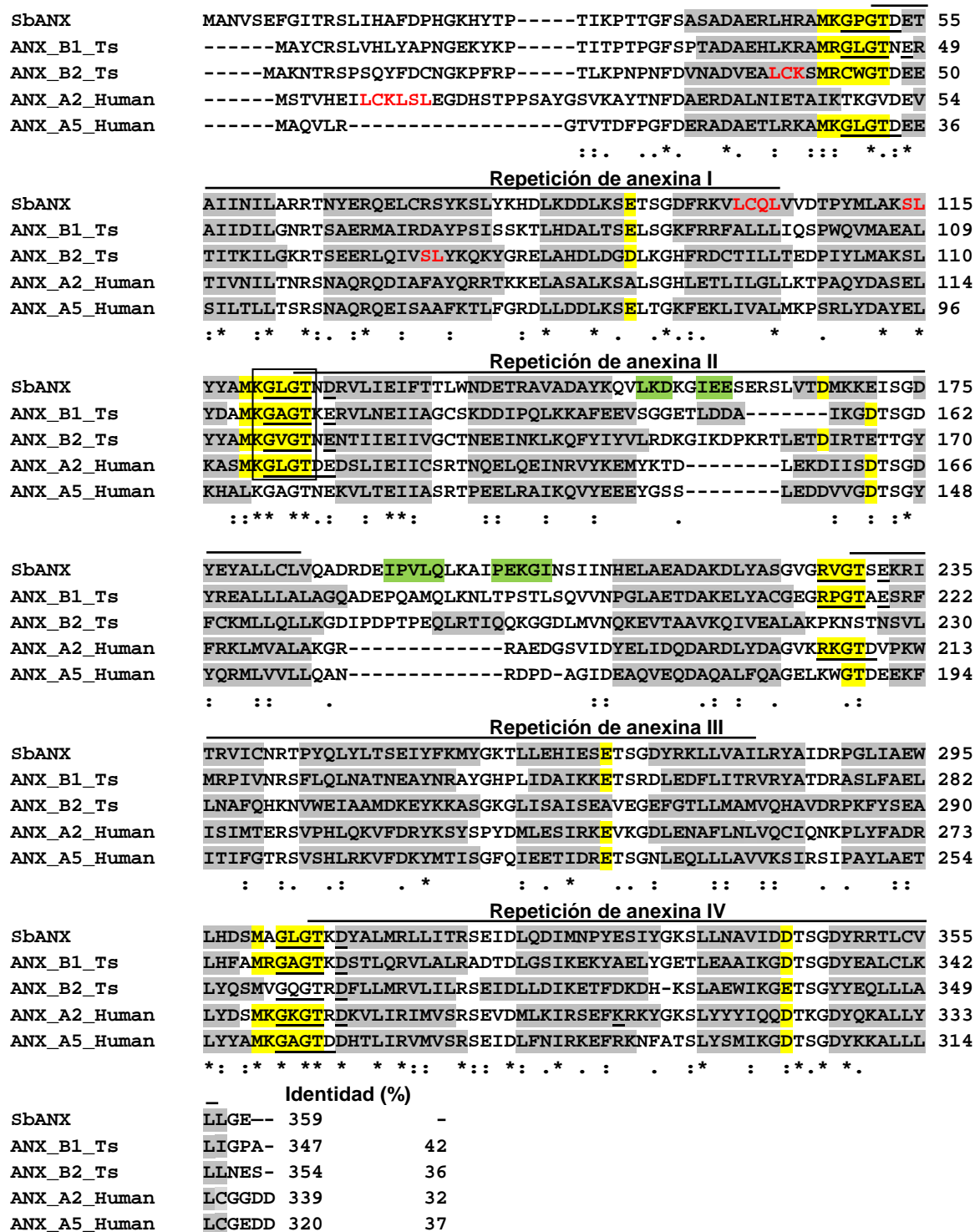
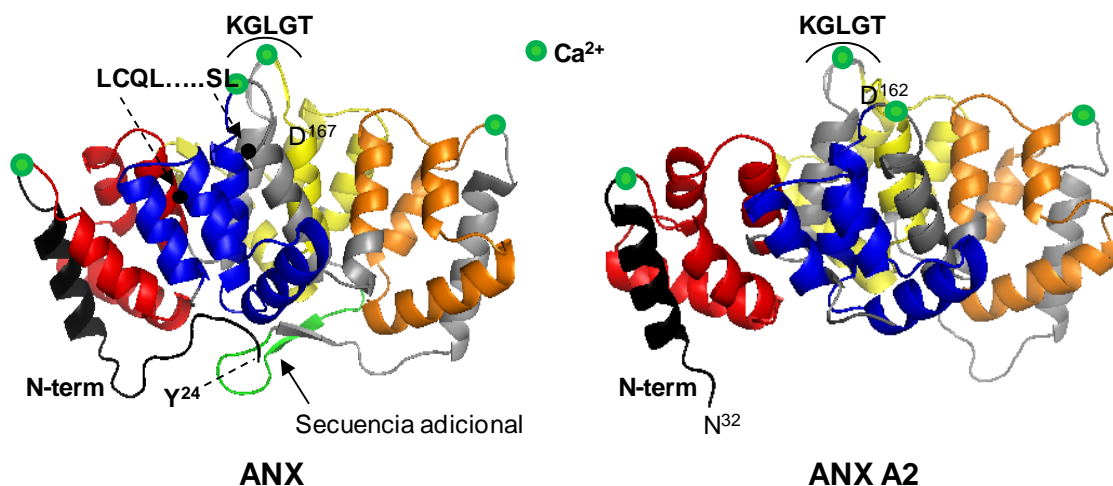


Figura 17 - Alineamiento de la anexina de *S. bovis* (B2LXU0) con las anexinas B1 (Q9XZL9) y B2 (Q52MU2) de *T. solium* y las humanas A2 (P07355) y A5 (P08758), incluyendo predicción de estructura secundaria. Los aminoácidos conservados se han marcado con asterisco; las substituciones conservativas y semiconservativas están indicadas con dos o un punto, respectivamente. Las hélices α se han sombreado en gris y las láminas β en verde. Los cuatro dominios repetitivos se han marcado con una línea en la parte superior de la zona conservada. El sombreado amarillo corresponde a los dominios de unión a Ca<sup>2+</sup> de Tipo II, mientras que los de Tipo III se muestran subrayados. Los dominios de unión a t-PA de la anexina humana A2, de la ANX de *S. bovis* y de la B2 de *T. solium* se han resaltado en rojo. El dominio de unión a fosfolípidos identificado en la ANX A2 humana se encuentra recuadrado.



**Figura 18** - Modelos tridimensionales de la anexina de *S. bovis* y la A2 humana. Se ha coloreado en negro la región N-terminal variable; los dominios repetidos I, II, III y IV se muestran en rojo, amarillo, naranja y azul, respectivamente. La secuencia adicional en la zona de unión de las repeticiones II y III, exclusiva de las anexinas de parásitos, se ha coloreado en verde. Los motivos de unión a calcio se indican con puntos de color verde.

## 7.2. Actividad anticoagulante de la rANX

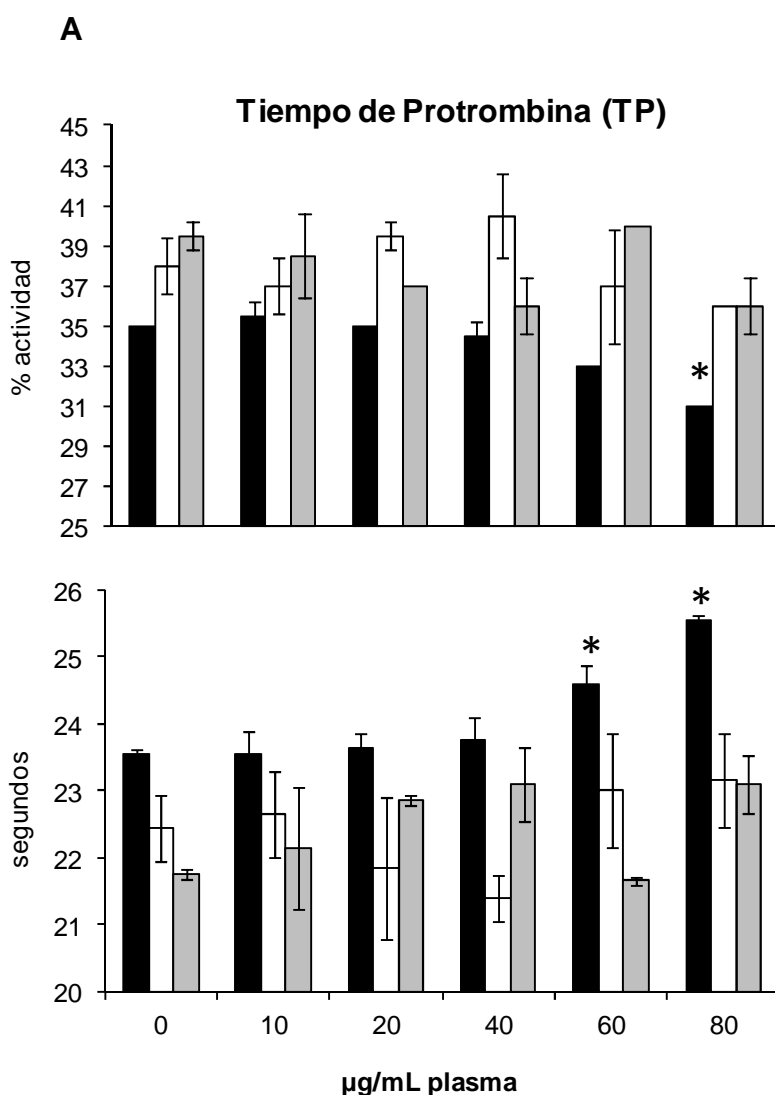
Los dos ensayos empleados para evaluar la actividad anticoagulante de la anexina de *S. bovis*, Tiempo de Protrombina (TP) y Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa), determinan el tiempo transcurrido hasta el inicio de la formación del coágulo. Los resultados del ensayo TP se pueden expresar en tiempo o como porcentaje de la actividad normal.

Ambos ensayos mostraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre las muestras de plasma que contenían rANX y los controles (con BSA en lugar de rANX o solamente con el tampón en que se encuentra disuelta la proteína). Entre los dos tipos de muestras control, BSA o tampón, no hubo diferencias significativas (Figura 19).

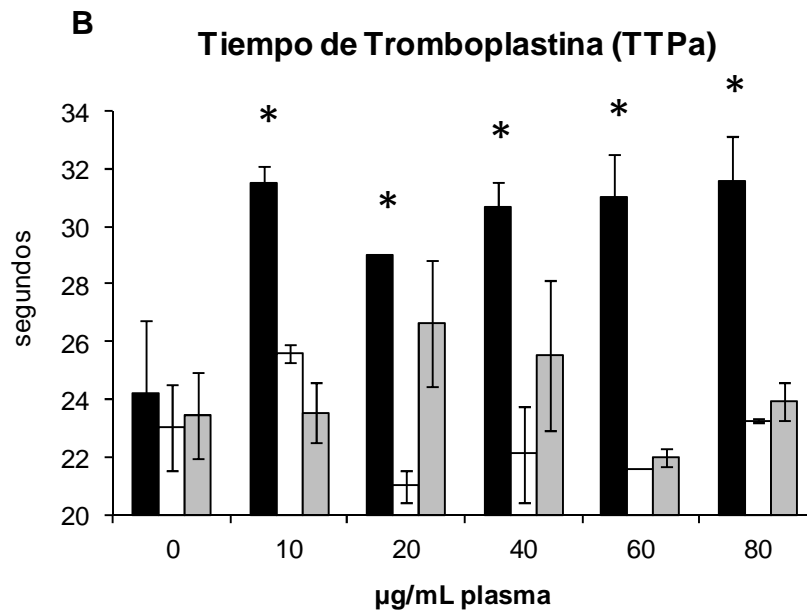
En el ensayo TP, el porcentaje de actividad en las muestras con rANX fue menor que en los controles y esta actividad disminuyó claramente a medida que aumentaba la concentración de anexina. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ), respecto de la actividad normal registrada en las muestras control, en las muestras que contienen una concentración de 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anexina. Igualmente, cuando se determinó el tiempo de coagulación en este ensayo, se observó que la rANX tiene un efecto

inhibitorio de la coagulación, prolongándose el tiempo a medida que aumenta la concentración de rANX en la muestra. Este tiempo fue significativamente mayor a partir de concentraciones de rANX iguales o superiores a 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 19A).

En los ensayos de TTPa, la rANX mostró un efecto anticoagulante considerablemente más potente, puesto que los tiempos de coagulación se incrementaron significativamente ( $p < 0.01$ ) a partir de concentraciones iguales o superiores a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína recombinante (Figura 19B).







**Figura 19** – Ensayos de coagulación en muestras de plasma con concentraciones crecientes de rANX (0–80 µg/mL). **A**, Tiempo de protrombina (TP) expresado en porcentaje de actividad y en segundos. **B**, Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa) expresado en segundos. (■) rANX, (□) BSA y (■) buffer. Cada punto corresponde a la media de dos réplicas ± la desviación estándar. Este experimento se repitió dos veces. \*  $p < 0.001$ .

Los resultados de los estudios llevados a cabo con la anexina han sido publicados en el siguiente artículo (ver anexo):

de la Torre-Escudero, E., Manzano-Román, R., Siles-Lucas, M., Pérez-Sánchez, R., Moyano, J.C., Barrera, I. & Oleaga, A. (2012). Molecular and functional characterization of a *Schistosoma bovis* annexin: Fibrinolytic and anticoagulant activity. *Veterinary Parasitology*, 184: 25-36.

## **8. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA rSb22.6 Y VALORACIÓN DE SU UTILIDAD COMO ANTÍGENO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *S. BOVIS***

Otra de las proteínas sobre la que se realizaron estudios adicionales fue el antígeno 22.6 de *S. bovis*.

En primer lugar se analizaron su secuencia y su estructura secundaria y terciaria, comparándolas con las de sus proteínas homólogas en *S. haematobium*, *S. mansoni* y *S. japonicum* y con las de otros helmintos. En segundo lugar se investigó su actividad anticoagulante debido a que su homóloga en *S. mansoni* (Sm22.6) presenta actividad inhibidora de la trombina. Por último, dado que determinadas características de la molécula Sb22.6, como son su antigenicidad, ausencia de residuos glicánicos y escasa homología con otras proteínas parasitarias, sugerían su posible utilidad como antígeno para el diagnóstico de la infección por *S. bovis*, en consecuencia evaluamos y demostramos dicha utilidad enfrentando la proteína recombinante (rSb22.6), por ELISA, con un panel de sueros de animales infectados experimentalmente y de forma natural.

### **8.1. Análisis bioinformático de la secuencia de Sb22.6**

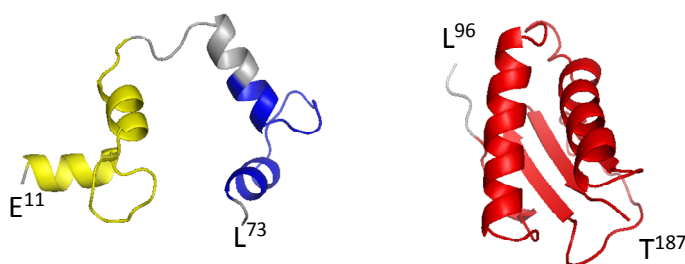
El análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de la Sb22.6 evidenció la presencia de dos dominios “EF-hand” localizados en el extremo amino terminal de la proteína (correspondientes a los aminoácidos 12-39 y 50-71), así como un dominio tipo cadena ligera de dineína situado en el extremo carboxilo terminal (residuos 100-187) (Figura 20).

En este caso fue necesario realizar un modelado *de novo* de la estructura tridimensional de la molécula con el servidor SwissModel, debido a la ausencia de moléculas caracterizadas por Cristalografía de Rayos X o RMN en la base de datos Protein Data Bank (PDB) que compartiesen suficiente homología de secuencia con la Sb22.6. Este estudio predijo la estructura de dos fragmentos de la secuencia, los comprendidos entre los aminoácidos 11-72 y 96-187 respectivamente. El primero corresponde a la zona de la secuencia donde se encuentran los dominios “EF-hand”, con la estructura típica en “hélice  $\alpha$ -bucle-hélice  $\alpha$ ”. El segundo fragmento modelado es el que contiene el dominio tipo cadena ligera de dineína formado por 2 hélices  $\alpha$  y 4 láminas  $\beta$  (Figura 20).

```

                                EF-hand
MSTETKLSMEEFIRAFLEMDADNNEMIDKQELIKYCQKNRLDMRLIDPW 50
                                EF-hand
IARFDTDKDNKISIEEFCRGLKLVSEIRREKEELKKEKDGKVS KLPPNV 100
                                Dynein light chain domain
EIIAATMSKTKQYDICHQFKEYIDNSSRTNNDIKEVANKMKTLLDNTYGR 150
VWQVVILTGSYWMNFSHEPFLSIQFKYNNYVCLAWRTPSQ 190

```

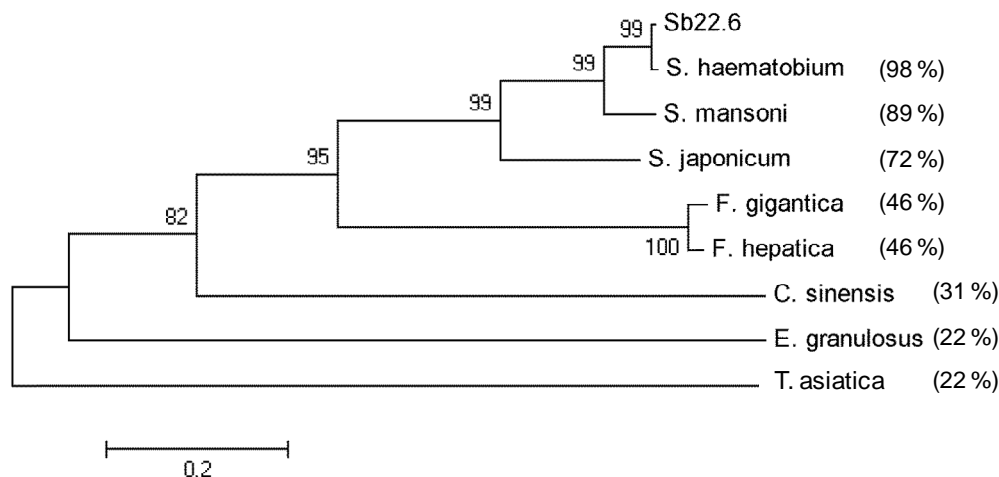


**Figura 20** – Secuencia aminoacídica y modelo 3D del antígeno de 22.6 kDa de *S. bovis* (Sb22.6). Los motivos EF-hand se han representado de color amarillo y azul y el motivo tipo cadena ligera de dineína en rojo.

La búsqueda mediante BLAST de secuencias homólogas a la Sb22.6 en la base de datos de Swiss-Prot evidenció unos elevados porcentajes de identidad con las proteínas homólogas de *S. haematobium*, *S. mansoni* y *S. japonicum* (98 %, 89 % y 72 % respectivamente), así como con otros miembros de la familia de antígenos tegumentales de 20-23 kDa del género *Schistosoma*.

Al hacer la comparación con las proteínas de otros helmintos los porcentajes de identidad fueron mucho menores (entre el 46 % y el 22 %, Figura 21). De éstas segundas, las secuencias con mayor homología fueron proteínas tegumentales transportadoras de calcio de *Fasciola gigantica*, *F. hepatica*, *Clonorchis sinensis* y *Taenia asiatica*, así como una secuencia parcial de *Echinococcus granulosus* correspondiente a un antígeno de tegumento.

El alineamiento y estudio filogenético de estas secuencias mostró dos clados bien definidos, correspondientes a los géneros *Schistosoma* (99 %) y *Fasciola* (100 %). El resto de los helmintos incluidos en este análisis no forman un grupo evidente y se han considerado como grupo externo.



**Figura 21** – Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de Sb22.6 (B2LXT8) y sus homólogas en *S. haematobium* (A5A6F6), *S. mansoni* (Q4TTW6), *S. japonicum* (O44372), *F. gigantica* (Q45TR6), *F. hepatica* (O46121), *C. sinensis* (Q2PMV7), *E. granulosus* (Q5BU38) y *T. asiatica* (A3F4Y1). Entre paréntesis se muestra el porcentaje de identidad de cada proteína con la secuencia de Sb22.6. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Poisson y los números en los nodos indican el % fiabilidad de la ramificación.

## 8.2. Actividad anticoagulante de la rSb22.6

La actividad anticoagulante de esta proteína se analizó en ensayos de TP y TTPa idénticos a los descritos para la rANX, en los cuales a las muestras de plasma se añadieron concentraciones crecientes de rSb22.6, desde 0 a 25 µg/ml. En estas condiciones no se observó ningún efecto en los tiempos de coagulación atribuible a la rSb22.6 en ninguno de los dos ensayos (resultados no mostrados).

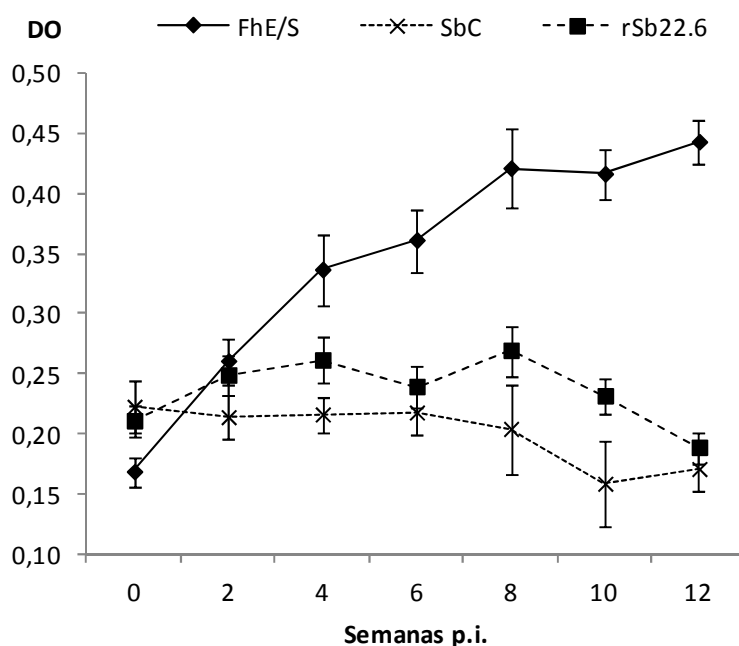
## 8.3. Utilidad de la proteína rSb22.6 para la detección, mediante ELISA, de anticuerpos anti-*S. bovis*

Valoramos la utilidad de la proteína rSb22.6 como antígeno diagnóstico comparando su comportamiento en ELISA con el del extracto SbC. Este es un extracto proteico de vermes adultos (Materiales y métodos, apartado 5) que ha sido utilizado para diagnosticar infecciones por *S. bovis* en vacas y ovejas, e infecciones por *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. intercalatum* en humanos.

A) Reactividad de los antígenos rSb22.6 y SbC con los anticuerpos anti-*F. hepatica*.

Puesto que en muchas áreas coexisten *S. bovis* y *F. hepatica* parasitando al ganado ovino y bovino, comenzamos analizando la reactividad de la rSb22.6 y del SbC con los anticuerpos anti-*F. hepatica* presentes en sueros de corderos infectados experimentalmente con este parásito.

Estos sueros se analizaron frente a los dos antígenos de *S. bovis* (SbC y rSb22.6) y frente a un antígeno excretor-secretor de *F. hepatica* (FhE/S). En la figura 22 se observa que el nivel de anticuerpos anti-*F. hepatica* aumenta claramente desde la semana 2 a la 12 postinfección. Estos anticuerpos no reaccionaron ni con el rSb22.6 ni con el extracto SbC, mostrando la ausencia de reactividad cruzada con este trematodo (Figura 22).



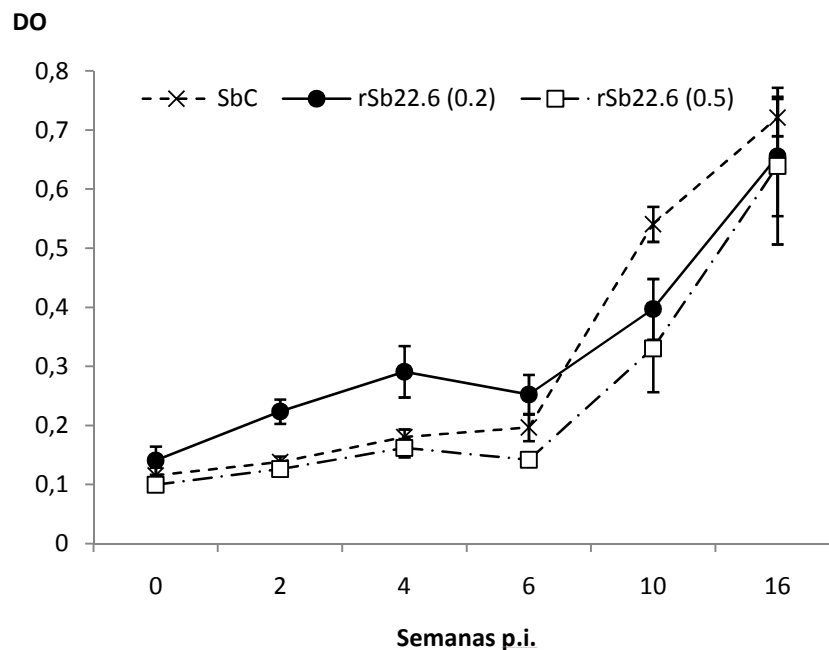
**Figura 22** – ELISA de los sueros de 6 corderos infectados experimentalmente con *F. hepatica* frente al antígeno excretor/secretor de *F. hepatica* (E/S), al extracto SbC y al antígeno rSb22.6. Cada punto representa la densidad óptica media  $\pm$  error estándar de 6 animales.

B) Comparación en ELISA del antígeno rSb22.6 y el extracto SbC para la detección de anticuerpos anti-*S. bovis*

El análisis se realizó primero con sueros de hámsteres infectados experimentalmente con *S. bovis* y posteriormente con sueros de bovinos con y sin infecciones naturales.

Los sueros de hámsteres infectados experimentalmente mostraron la misma reactividad con el extracto SbC y con el antígeno rSb22.6, mostrando la utilidad de la recombinante para la detección de anticuerpos anti-*S. bovis* (Figura 23).

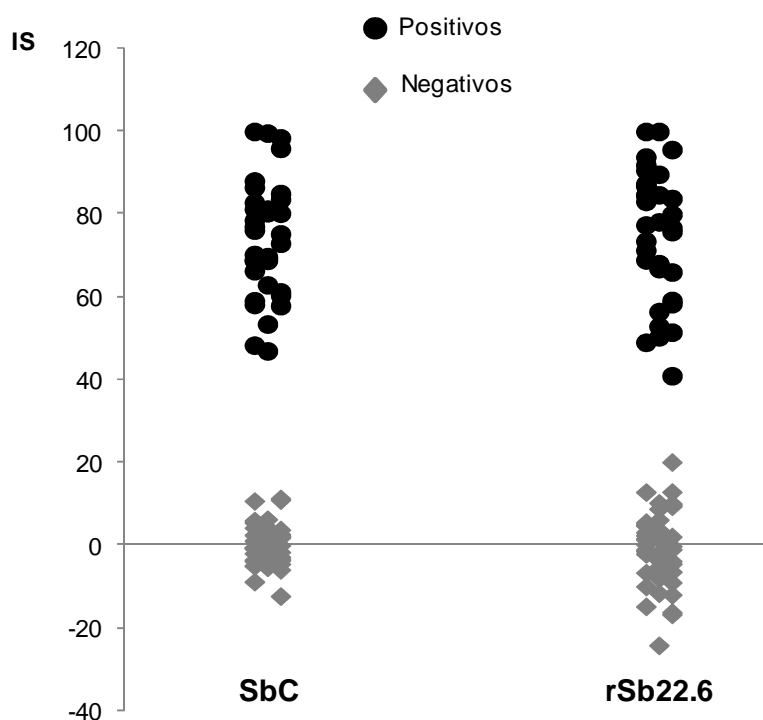
En estos ensayos también observamos que el antígeno rSb22.6 mostraba una mayor reactividad cuando se utilizaba en menor concentración (0,2 µg/pocillo en lugar de 0,5 µg/pocillo). Por este motivo, los sueros bovinos se analizaron empleando 0,2 µg/pocillo de rSb22.6.



**Figura 23** - ELISA con el extracto SbC (1 µg/pocillo) y rSb22.6 (0,2 y 0,5 µg/pocillo) para la detección de anticuerpos frente a *S. bovis* en muestras de suero procedentes de hámsteres infectados experimentalmente. Cada punto representa la densidad óptica media  $\pm$  el error estándar de 6 animales.

Una vez demostrada la utilidad del antígeno rSb22.6 para detectar anticuerpos anti-*S. bovis* en animales infectados experimentalmente, evaluamos su comportamiento con sueros de bovinos infectados naturalmente. Para ello se han utilizado sueros bovinos procedentes de explotaciones en extensivo por ser éstas un excelente modelo para evaluar el test diagnóstico en condiciones naturales, ya que esos animales han podido entrar en contacto de forma natural no sólo con *S. bovis*, sino también con otros parásitos o patógenos.

En estos ensayos, los valores de densidad óptica se transformaron en Índice Serológico (IS). Como muestra la figura 24, los valores de los índices serológicos (IS) de los 35 sueros control positivo y los 46 sueros control negativos fueron muy similares con los dos antígenos.



**Figura 24** – Índice serológico (IS) de 35 sueros control positivos y 46 negativos procedentes de ganado bovino extensivo analizados por ELISA con los antígenos SbC y rSb22.6.

El análisis de dichos IS mediante curvas ROC permitió establecer el umbral de positividad/negatividad para cada antígeno: 23,56 % para SbC y 23,84 % para rSb22.6. La sensibilidad y especificidad fue del 100 % para el extracto SbC y del 100 % y 94,9 %, respectivamente, para el antígeno rSb22.6 (Tabla 8).

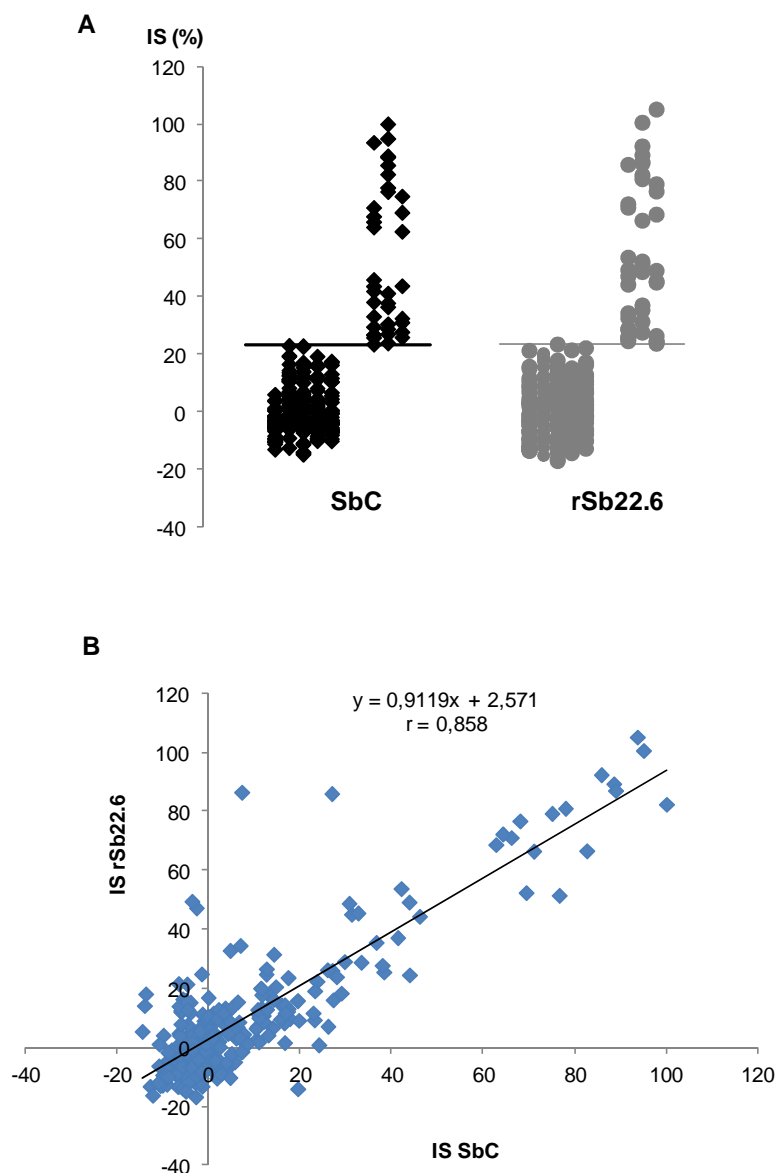
**Tabla 8** - Análisis ROC del valor diagnóstico de los antígenos rSb22.6 y SbC para la detección de anticuerpos anti-*S. bovis*. Área bajo la curva  $\pm$  error estándar (AUC  $\pm$  SE), intervalo de confianza (CI), umbral, sensibilidad, especificidad y valor diagnóstico de cada antígeno (= sensibilidad + especificidad / 2).

Antígeno	AUC $\pm$ SE	CI (95 %)	Umbral	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor diagnóstico
SbC	1,000 $\pm$ 0,000	0,00-1,00	23,56	100	100	100
rSb22.6	0,999 $\pm$ 0,001	0,00-1,00	23,84	100	94,9	97,5

La aplicación de estos umbrales de positividad/negatividad al análisis de las 281 muestras de sueros bovinos procedentes de explotaciones en extensivo mostró que ambos antígenos, el extracto SbC y la recombinante rSb22.6, proporcionaron los mismos resultados con el 96,1 % de los sueros analizados. En concreto, el SbC y la rSb22.6 detectaron, respectivamente, 38 y 41 animales infectados, todos ellos procedentes de las mismas 5 granjas.

Estas diferencias en la proporción de animales positivos detectados con cada antígeno no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Figura 25A). La recta de regresión entre los IS obtenida tras el análisis de los 281 sueros problema con ambos antígenos reveló una fuerte correlación ( $r = 0,858$ ) entre ambas pruebas (Figura 25B).





**Figura 25 – A,** Índice serológico (IS) de los 281 sueros de ganado bovino extensivo tras su análisis por ELISA frente a los antígenos SbC y rSb22.6. **B,** Recta de correlación entre los valores de los IS obtenidos con cada antígeno para los 281 sueros problema analizados.

Los resultados de los estudios llevados a cabo con el antígeno Sb22.6 han sido publicados en el siguiente artículo (ver anexo):  
de la Torre-Escudero, E., Raúl Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R., Barrera, I., Siles-Lucas, M., Oleaga, A. (2012). Molecular cloning, characterization and diagnostic performance of the *Schistosoma bovis* 22.6 antigen. *Veterinary Parasitology*, 190, 530-540.



## DISCUSIÓN

---



El objetivo general de la presente tesis doctoral fue la caracterización molecular y funcional de cinco proteínas del tegumento de *S. bovis* cuyo interés radicaba en su posible función reguladora de los mecanismos hemostáticos del hospedador. Estas proteínas han sido: enolasa (ENO), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FBA), anexina (ANX) y el antígeno Sb22.6 (Sb22.6). Las tres primeras habían sido identificadas en trabajos previos como ligandos de plasminógeno en un extracto de tegumento del parásito, mientras que la anexina y el antígeno Sb22.6 son moléculas cuya función anticoagulante ha sido demostrada en otras especies y están presentes en el tegumento y en los productos de excreción-secreción de *S. bovis* (Ramajo-Hernández et al., 2007b; Pérez-Sánchez et al., 2006, 2008).

La estrategia experimental planteada para llevar a cabo este estudio consistió primero en el clonaje y secuenciación de los cDNAs codificantes de cada una de las proteínas y su posterior obtención en forma recombinante. Las proteínas recombinantes se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de fijación y activación del plasminógeno y las pruebas adicionales de coagulación en el caso de la anexina y el antígeno Sb22.6.

Las proteínas recombinantes también se emplearon para la obtención de sueros hiperinmunes frente a cada una de ellas, los cuales fueron posteriormente utilizados como sondas específicas en ensayos de inmunofluorescencia y microscopia confocal. Estos ensayos nos permitieron determinar cuáles de las proteínas estudiadas se expresan en la superficie del parásito, en contacto con la sangre del hospedador, condición ésta imprescindible para que puedan desempeñar una función fisiológica como agentes profibrinolíticos y/o anticoagulantes en la regulación *in vivo* de las respuestas hemostáticas del hospedador.

Tras abordar con éxito los dos primeros objetivos específicos del presente trabajo, esto es, la obtención de las secuencias de cDNA codificante de esas cinco proteínas y su producción y purificación en forma recombinante, pasamos a estudiar si dichas proteínas interactúan con el sistema hemostático del hospedador.

Para ello comenzamos analizando la potencial actividad profibrinolítica, como receptores de plasminógeno, de cada una de las proteínas recombinantes mediante ensayos de fijación de plasminógeno por ELISA y western blot similares a los llevados a cabo en estudios previos con el extracto de tegumento (TG) de *S. bovis* (Ramajo-

Hernández et al., 2007b). Estos ensayos mostraron claramente que las cinco recombinantes fijan plasminógeno y que, en todos los casos, la unión al plasminógeno es inhibida por un análogo de lisina, el  $\epsilon$ ACA, lo cual indica que en dicha unión intervienen residuos de lisina, coincidiendo con lo descrito para los receptores de plasminógeno en otros organismos (Plow et al., 1995; Avilan et al., 2000; Crowe et al., 2003; Hurmalainen et al., 2007; Vieira et al., 2010; Díaz-Martín et al., 2012).

A continuación analizamos si, además de fijar plasminógeno, las proteínas recombinantes podían inducir o modular su activación y transformación en plasmina. Estos ensayos demostraron que todas las proteínas, salvo la GAPDH, potencian la activación del plasminógeno -y la consiguiente generación de plasmina- inducida por el activador fisiológico t-PA, pero también que ninguna de ellas tiene capacidad para activar el plasminógeno por sí mismas, en ausencia de t-PA. Estos resultados revelaron una diferencia respecto a lo descrito para el extracto TG, el cual también puede activar al plasminógeno sin la intervención del t-PA (Ramajo-Hernández et al., 2007b). Desconocemos el motivo de esta diferencia; tal vez las proteínas nativas poseen esta capacidad y las recombinantes no, o bien el hecho observado simplemente indica que en el tegumento, además de estas proteínas, hay otras moléculas que intervienen en la activación del sistema fibrinolítico del hospedador.

Una vez demostrado que las cinco proteínas eran capaces de fijar plasminógeno y que al menos cuatro de ellas también potencian su activación, pasamos a comprobar cuáles son expresadas en la superficie de los vermes adultos y de las esquistosómulas pulmonares, por ser éste un requisito imprescindible para que puedan actuar como receptores de plasminógeno *in vivo*. Para ello se obtuvieron sueros hiperinmunes frente a cada una de dichas proteínas y se comprobó por western blot que dichos sueros reconocieron específicamente no sólo a la correspondiente proteína recombinante, sino también a las isoformas nativas de dicha proteína presentes en el extracto TG.

Los análisis por inmunofluorescencia y microscopia confocal de los cortes histológicos y de los vermes enteros mostraron que únicamente la ENO y la ANX son expresadas en la superficie tegumental de los vermes adultos y que la ANX también es expresada en la superficie de las esquistosómulas. Por tanto, de las cinco proteínas analizadas, sólo estas dos reúnen las condiciones necesarias para actuar como receptores profibrinolíticos de plasminógeno, esto es, la capacidad de fijarlo y facilitar

su activación en la superficie del parásito. En consecuencia, estas dos proteínas fueron objeto de estudios adicionales con el fin de obtener un mayor conocimiento acerca de sus características moleculares y funcionales. Los resultados de estos estudios se discuten con detalle más adelante.

El análisis de la localización tisular por inmunofluorescencia también mostró que la GAPDH es expresada en la superficie de las esquistosómulas, resultado que corrobora lo descrito por nuestro grupo en estudios previos, en los que se identificó GAPDH en el proteoma de la superficie tegumental de las esquistosómulas pulmonares (De la Torre-Escudero et al., 2011). Este resultado coincide con lo observado en otras especies de esquistosoma, en concreto en *S. mansoni*, en el que también se ha demostrado la presencia de GAPDH en la superficie de las fases larvianas (Goudot-Crozel et al., 1989; Charrier-Ferrara et al., 1992; Tallima y El Ridi, 2008). No obstante, y pese a su demostrada localización superficial, la incapacidad de la rGAPDH de *S. bovis* para potenciar la activación del plasminógeno le restaría, *a priori*, interés como molécula clave en la modulación del sistema fibrinolítico del hospedador. Por otra parte, teniendo en cuenta lo descrito para la GAPDH en otros organismos, es posible que la GAPDH de *S. bovis* sí pueda desempeñar algún tipo de función profibrinolítica. De hecho, para la GAPDH de varias especies de estreptococos (de los grupos A, B y neumococos) se ha demostrado que aunque interacciona débilmente con el plasminógeno, es capaz de unir su forma activa, la plasmina, con gran afinidad (Broder et al., 1991; Lottemberg et al., 1992; Bergmann et al., 2004). En ocasiones también se ha descrito que la participación de un tercer componente, el fibrinógeno, favorece la unión plasminógeno-GAPDH actuando la propia GAPDH como receptor de fibrinógeno y que la unión plasmina-GAPDH protege a la plasmina de la acción inhibitoria de la antiplasmina  $\alpha 2$  (Magalhães et al. 2007; Lama et al., 2009). Dado el interés de este fenómeno, en relación con la GAPDH de *S. bovis* se requieren estudios adicionales para determinar si existe alguna posible interacción con el sistema plasminógeno/plasmina similar a la descrita para los estreptococos.

La FBA es una proteína que no ha recibido tanta atención como las anteriores en relación con su posible interacción con el sistema fibrinolítico. Pese a lo anterior, existen algunas evidencias que sugieren que la FAB podría actuar como receptor de plasminógeno en *Candida albicans* (Crowe et al, 2003). Más recientemente ha sido

descrita una FBA de clase II en la superficie de *Mycobacterium tuberculosis* que es capaz de fijar plasminógeno y de proteger al complejo FBA-plasmina de la acción inhibitoria de la antiplasmina  $\alpha 2$  (de la Paz Santangelo et al, 2011). La rFBA de *S. bovis* ha demostrado ser capaz de unir y activar plasminógeno *in vitro*. Sin embargo, y pese a haber sido identificada en el proteoma del tegumento de *S. bovis* (Pérez-Sánchez, 2006, 2008), el análisis por inmunofluorescencia no la ha detectado en la superficie de los vermes adultos ni de las esquistosómulas, lo que, en principio, la descarta como receptor.

La Sb22.6 mostró una evidente actividad fibrinolítica aunque, a diferencia de la Sm22.6 de *S. mansoni* (Lin y He, 2006), no mostró actividad anticoagulante, y tampoco se demostró que fuera expresada en la superficie tegumental, por lo que en principio, y teniendo en cuenta el principal objetivo de este trabajo, carecería de interés. No obstante, el análisis molecular llevado a cabo tras su secuenciación reveló determinadas características que sugerían una posible utilidad como antígeno diagnóstico. Así pues, además de los estudios señalados, se llevaron a cabo una serie de ensayos, que incluimos en la presente tesis doctoral, que demostraron la validez de la Sb22.6 como antígeno para el diagnóstico de la infección por *S. bovis*. Estos resultados se comentan detalladamente en el apartado final de la discusión.

Debemos señalar también que, aunque en este estudio nos hemos centrado en la búsqueda de receptores de superficie capaces de explicar el reclutamiento de plasminógeno en la superficie de los vermes, el hecho de que estas enzimas también sean liberadas al medio sanguíneo formando parte de los productos de excreción-secreción del verme, deja abierta la posibilidad de una interacción con los sistemas fibrinolítico y/o de la coagulación en el entorno de los vermes, como recientemente se ha descrito en *Dirofilaria immitis* (González-Miguel et al., 2012).

Con el fin de centrar la discusión en los aspectos más relevantes del presente trabajo, a continuación comentamos por separado los resultados obtenidos en los estudios llevados a cabo con la ENO, la ANX y el antígeno Sb22.6.



## CARACTERIZACIÓN DE LA ENOLASA Y VALORACIÓN DE SU ACTIVIDAD PROFIBRINOLÍTICA

Tras el clonaje y la secuenciación de la ENO obtuvimos una proteína con un alto grado de identidad de secuencia (93 % y 88 %) con las enolasas de los organismos más próximos, *S. mansoni* y *S. japonicum*, pero también con las enolasas de otros helmintos (entre el 80 % y 70 %) (Figura 13 y Tabla 5). Esto confirma la observación de Pancholi (2001) de que la enolasa, al igual que ocurre con otras enzimas glucolíticas, es una proteína muy conservada en estos organismos.

El análisis bioinformático de su secuencia de aminoácidos mostró que carece de péptido señal, de dominios transmembrana y de puntos de anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) en su extremo carboxilo terminal, es decir, de los motivos habituales que determinan el transporte y la expresión de las proteínas en la superficie celular. La ausencia de estos motivos deja inexplicado el cómo es transportada esta proteína a la superficie tegumental. De hecho, la enolasa se ha incluido en una nueva clase de proteínas que utilizan vías “no clásicas” para su transporte a la superficie celular y/o su secreción al medio extracelular (Pancholi, 2001; Avilán et al., 2011). Un posible mecanismo para llevar la enolasa a la superficie celular fue propuesto por Bergmann et al. (2001) para *Streptococcus pneumoniae*. Estos autores comprobaron que la bacteria expresa enolasa en su superficie e indican que dicha enolasa, primero es secretada al medio y después sufre un proceso de reasociación a la superficie bacteriana a través de interacciones proteína-proteína. Aunque se desconoce el mecanismo particular de reasociación de las proteínas secretadas con la superficie celular, éste parece ser un fenómeno bastante general, por cuanto ha sido observado con un creciente número de enzimas citoplasmáticas tanto bacterianas como eucariotas (Pancholi y Chatwal, 2003). De hecho, la enolasa humana y la mayoría de las enolasas de artrópodos hematófagos comparten un péptido hidrofóbico (AAVPSGASTGI) al que se atribuye un posible papel en la reasociación de dichas enolasas con la membrana celular (Pancholi, 2001; Díaz-Martín et al., 2012). No obstante es difícil que este mecanismo ocurra en esquistosomas ya que su tegumento es una estructura muy diferente de la pared bacteriana. En cuanto a las vías “no clásicas” de secreción utilizadas por la enolasa, recientemente se han definido algunas, como la vía de secreción auxiliar SecA2 en *Listeria monocytogenes* (Lenz et al., 2003) y el transporte mediado por vesículas

extracelulares en *Borrelia burgdorferi* (Toledo et al., 2012) o por exosomas en *Echinostoma caproni* y *F. hepática* (Marcilla et al., 2012).

Como ya se ha indicado, mediante ELISA y western blot, verificamos que la rENO fija el plasminógeno al igual que ocurre con la enolasa de otros parásitos como *Tripanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana*, *Trichomonas vaginales*, *F. hepática* o las garrapatas del género *Ornithodoros* (Avilan et al., 2000; Almeida et al., 2004; Bernal et al., 2004; Mundodi et al., 2008; Avilán et al., 2011; Díaz-Martín et al., 2012).

En relación con la unión del plasminógeno a sus receptores parecía estar plenamente establecido, y así había quedado demostrado en numerosos trabajos, que el plasminógeno se une a las lisinas del extremo C-terminal de las moléculas receptoras (Plow et al., 1995; Bergmann et al., 2001; Derbise et al., 2004; Jones y Holt, 2007; Cork et al., 2009). Sin embargo, un estudio más exhaustivo de la enolasa de *S. pneumoniae* (SpSEN) reveló la existencia de un motivo interno de unión a plasminógeno constituido por 9 aminoácidos (FYDKERKVVY) y situado entre los aminoácidos 248 y 256 (Bergmann et al., 2003). También se observó que las lisinas carboxi-terminales desempeñaban un papel más relevante en el mantenimiento de la estructura cuaternaria de la molécula que en la interacción con el plasminógeno (Ehinger et al., 2004). El bloqueo de las lisinas carboxi-terminales de la SEN de *S. pyogenes* con un hexapéptido de histidinas no alteró la unión de plasminógeno confirmando la idea de que el dominio interno es el verdadero responsable de la unión con plasminógeno (Kornblatt et al. 2011). En la ENO de *S. bovis* podría suceder algo similar ya que en el array de péptidos el plasminógeno únicamente reconoció a un motivo interno, localizado entre los aminoácidos 250 y 261 (EFHKNGKYDLDF), en la misma zona de la molécula que el motivo identificado en la SpSEN. Además, en el modelo 3D de la ENO se observa como este motivo se localiza en una zona expuesta de la molécula y, por tanto, accesible para el plasminógeno.

La enolasa de *S. bovis* cumple, por lo tanto, el primer requisito para ser un receptor fisiológico de plasminógeno, al haber demostrado que fija plasminógeno y además potencia su activación y transformación en plasmina. Pero, tal como se ha mencionado, para que una proteína unidora y activadora de plasminógeno pueda tener relevancia biológica como receptor de plasminógeno *in vivo*, es preciso que además se exprese en la superficie externa del tegumento, en contacto con la sangre del hospedador (Hawley et al., 2000).

Algunas evidencias previas ya sugerían que la enolasa de los esquistosomas también cumple este segundo requisito. Se había identificado enolasa en extractos de tegumento y de membranas tegumentales de vermes adultos de *S. mansoni* (van Balkom et al., 2005; Braschi et al., 2006) y, también, en un extracto de tegumento de *S. bovis* (Pérez-Sánchez et al., 2006). Sin embargo, el hecho de que la enolasa se encuentre formando parte del tegumento no implica necesariamente que se encuentre expuesta en la superficie del mismo, asunto éste que requiere una demostración fehaciente. Dicha demostración la obtuvieron Mulvenna et al. (2010) para la enolasa de *S. japonicum*. Estos autores marcaron selectivamente las proteínas superficiales de los vermes adultos de *S. japonicum* con biotina y purificaron las proteínas marcadas mediante cromatografía de afinidad con estreptavidina; posteriormente las analizaron por espectrometría de masas y lograron identificar 54 proteínas de la superficie del tegumento, entre las que se encontraba la enolasa. Para *S. bovis* nuestro grupo había obtenido indicios de que la enolasa se expresaba en la superficie del tegumento al identificarla en una fracción enriquecida en las proteínas más superficiales del tegumento de los vermes machos (Pérez-Sánchez et al., 2008). En este trabajo se practicó una digestión suave con tripsina de los péptidos superficiales de los vermes. El análisis de los péptidos trípsicos identificó a la enolasa en el tegumento de machos y no en el de hembras. Estos resultados fueron también confirmados por inmunofluorescencia y microscopía confocal, aunque en estas pruebas no se empleó como sonda un anticuerpo frente a la enolasa de *S. bovis*, sino que se utilizó uno comercial, tras comprobar previamente que también reconocía a la forma nativa de la enolasa de *S. bovis*.

En el presente trabajo hemos verificado la expresión de enolasa en la superficie del tegumento de los vermes utilizando una sonda específica, como es el suero hiperinmune frente a la rENO de *S. bovis*. Con este suero el análisis por inmunofluorescencia de los cortes histológicos de vermes adultos mostró no sólo una abundante expresión de enolasa en los tejidos internos, como era de esperar tratándose de una proteína citosólica implicada en la glucólisis, sino también la expresión de enolasa en la superficie de los vermes machos (Figura 10). Por otra parte, el análisis por inmunofluorescencia de vermes enteros mostró la ausencia de expresión de enolasa en la superficie de las esquistosómulas (Figura 11), pero confirmó la expresión de enolasa en la superficie de los machos adultos (Figuras 12).

En conjunto esto indica que esta enolasa superficial puede actuar como receptor fisiológico de plasminógeno y, en consecuencia, participar en la activación del sistema fibrinolítico del hospedador, previsiblemente para evitar la formación de coágulos sobre la superficie del verme. Esta es la primera demostración fehaciente de dicha función de la enolasa en una especie del género *Schistosoma*.

Además, estos resultados convierten a la enolasa de *S. bovis* en una interesante diana vacunal o farmacológica ya que su bloqueo mediante fármacos o anticuerpos podría comprometer la supervivencia del parásito. En relación con la utilidad de la rENO como antígeno en el desarrollo de vacunas anti-esquistosoma, el único ensayo llevado a cabo hasta la fecha ha evaluado el valor protector de la enolasa de *S. japonicum* con resultados poco prometedores (Yang et al., 2010). Sin embargo, aunque la molécula completa no ha demostrado capacidad protectora, no se puede descartar su utilidad ya que es posible que una vacuna compuesta por una mezcla de péptidos seleccionados sí pueda ser efectiva. Un ejemplo de lo anterior es la vacuna frente a *Staphylococcus aureus* compuesta por varios péptidos de enolasa, que ha sido recientemente patentada (Macneelly et al., 2012).

## CARACTERIZACIÓN DE LA ANEXINA Y VALORACIÓN DE SU ACTIVIDAD PROFIBRINOLÍTICA Y ANTICOAGULANTE

Desde hace tiempo se conoce que las anexinas humanas A2 y A5 y las anexinas B1 y B2 de *Taenia solium* muestran actividades anticoagulantes y profibrinolíticas (Hajjar et al., 1998; Gerke y Moss, 2002; Wang et al., 2006; Winter et al., 2006). Teniendo en cuenta la trascendencia que estas funciones pueden tener en la supervivencia de los esquistosomas, nos propusimos comprobar si la anexina de *S. bovis* se comportaba de forma similar.

Tras clonar y secuenciar el cDNA de la anexina de *S. bovis* obtuvimos una secuencia peptídica de 359 aminoácidos que poseía las características estructurales típicas de la familia de las anexinas: esto es, un extremo N-terminal muy variable y un dominio central conservado que incluye cuatro regiones repetidas que son propias de esta familia (Gerke y Moss, 2002). De este modo, se confirma el hecho observado en las anexinas de vertebrados de que estas proteínas, a pesar de no mostrar una elevada identidad de secuencia entre ellas, tienen una estructura secundaria y terciaria muy conservadas (Moss y Morgan, 2004).

Una particularidad de la secuencia de la ANX de *S. bovis* es la existencia de un fragmento de secuencia, entre las regiones repetidas II y III, más largo que el que presentan las anexinas humanas. Esta característica también se puede observar en la secuencia de las anexinas de otros esquistosomas y en las de *T. solium* (Wang et al., 2006; Hofmann et al., 2010; Tararam et al., 2010). Como señalan Hofmann et al. (2010), esta característica estructural, que es exclusiva de las anexinas parasitarias, junto con las propiedades inmunogénicas de algunas de ellas y la existencia de determinados epítomos específicos–ausentes en anexinas de mamíferos–, convierte a las anexinas en potenciales antígenos vacunales.

El análisis de la secuencia revela que la ANX carece también de motivos para su transporte y expresión en la superficie celular (péptido señal, dominios transmembrana o anclajes GPI), a pesar de estar presente en la superficie de las esquistosómulas y de los vermes adultos. Este hecho no es un fenómeno aislado, ya que también se ha observado con otras anexinas; en particular con la anexina humana A2, que se expresa constitutivamente en la superficie de las células endoteliales y para la que se desconoce

el mecanismo de transporte y expresión en la superficie celular. Se ha descrito que la anexina humana A2 interacciona con los fosfolípidos de la superficie celular a través de un motivo de unión dependiente de calcio, que incluye los residuos  $^{119}\text{KGLGT}^{123}$  y el ácido aspártico que se encuentra en la posición 162 ( $\text{D}^{162}$ ) (Figura 17) (Hajjar y Krishnan, 1999). En la anexina de *S. bovis* encontramos el mismo motivo en los residuos 120-124 ( $^{120}\text{KGLGT}^{124}$ ) así como un ácido aspártico en posición 167 ( $\text{D}^{167}$ ). En consecuencia, es posible que este motivo sea el responsable de la interacción entre la anexina de *S. bovis* y los fosfolípidos de la membrana plasmática de la superficie del tegumento.

Los ensayos de unión y activación de plasminógeno indican que la anexina de *S. bovis* posee actividad profibrinolítica similar a la descrita para la anexina humana A2 (Hajjar et al., 1998). Al igual que el resto de las proteínas recombinantes ensayadas, la rANX se une al plasminógeno a través de residuos de lisina y potencia la activación del plasminógeno inducida por el t-PA. Esta es la primera vez que se demuestra que una anexina de un parásito, y en particular de una especie de esquistosoma, tiene actividad profibrinolítica.

La anexina humana A2 interacciona con el t-PA a través del motivo  $^8\text{LCKLSL}^{13}$  presente en el extremo amino terminal (Hajjar et al., 1998). En la secuencia de la ANX de *S. bovis* se ha identificado también un motivo similar ( $^{100}\text{LCQL}^{103}/^{114}\text{SL}^{115}$ ), con una identidad de secuencia del 50 % con el de la humana A2. Sin embargo, a pesar de esta similitud, nos parece improbable que dicho motivo sea el responsable de la interacción con el t-PA en el caso de *S. bovis*, ya que el modelo tridimensional de la ANX de *S. bovis* predice una localización muy poco accesible para dicho motivo (Figura 18).

La anexina humana A5, que es extracelular, muestra unas propiedades anticoagulantes que dependen de su unión, regulada por iones  $\text{Ca}^{2+}$ , a los fosfolípidos de la superficie de las plaquetas activadas o de las células endoteliales (Gerke y Moss, 2002). En relación con esta actividad, las únicas anexinas parasitarias en las que se ha demostrado que presentan propiedades anticoagulantes son las anexinas B1 y B2 de *T. solium* (Wang et al., 2006). En *S. bovis*, el resultado de los ensayos de coagulación TP y TTPa muestran claramente que la rANX inhibe la vía extrínseca y, más intensamente, la vía intrínseca. Para lograr la inhibición de la vía extrínseca se precisaron unas elevadas concentraciones de rANX (60-80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), que, además, fueron superiores a las

empleadas con la anexina B2 de *T. solium* para lograr el mismo efecto (40 µg/ml). Por el contrario, la inhibición de la vía intrínseca se alcanzó con una concentración de rANX bastante más baja (10 µg/ml), también menor que la utilizada con la anexina B1 de *T. solium* (60 µg/ml) (Wang et al., 2006).

Estos resultados constituyen los primeros datos acerca de las propiedades anticoagulantes de una anexina en una especie de esquistosoma. Por otro lado, teniendo en cuenta las diferentes funciones que tienen las anexinas de los vertebrados no podemos descartar que la anexina que hemos caracterizado en *S. bovis* pueda desempeñar funciones adicionales, y especialmente algún tipo de actividad inmunomoduladora, tal y como se ha descrito para la anexina B1 de *T. solium* (Gao et al., 2007; Yan et al., 2008).

Como ya se ha mencionado, en diversos estudios sobre el tegumento de los esquistosomas, la anexina ha sido identificada en la superficie tegumental de los vermes adultos (Braschi y Wilson, 2006; Mulvena et al., 2010; Tararam et al., 2010) y en la de las esquistosómulas de *S. japonicum* (Tararam et al., 2010). Los ensayos de inmunolocalización de la ANX en adultos y esquistosómulas de *S. bovis* confirman que ambas fases evolutivas expresan esta proteína en su superficie. Las esquistosómulas de *S. bovis* muestran un patrón de expresión de anexina similar a las de *S. japonicum*, mientras que en la superficie de los adultos de *S. bovis* la anexina se expresa de forma bastante menos abundante que en *S. japonicum* (Tararam et al., 2010). Por otra parte, la anexina de *S. bovis* es homóloga a otra de *S. mansoni* (Smp\_074150), la cual fue detectada por espectrometría de masas en el material liberado tras la digestión suave con tripsina de vermes vivos de *S. mansoni* (Castro-Borges et al., 2011), lo que apoya la idea de su localización en la superficie del tegumento.

Teniendo en cuenta estos resultados, llama la atención que la anexina, pese a ser expresada en la superficie del tegumento y encontrarse también en los productos de excreción-secreción y, por tanto, expuesta al sistema inmune, no resulte inmunogénica en las infecciones naturales por *Schistosoma sp.* (Mutapi et al., 2005; Pérez-Sánchez et al., 2006). Queda por comprobar si una vez forzado su reconocimiento mediante vacunación, el sistema inmune del hospedador reconoce la forma nativa de la molécula y valorar si los efectos de ese reconocimiento son perjudiciales para el parásito.

En conclusión, los resultados de nuestros ensayos *in vitro* demuestran que la rANX posee actividad profibrinolítica y anticoagulante; también que la anexina nativa es expresada en la superficie tegumental de adultos y esquistosómulas y que, en consecuencia, está en contacto directo con la sangre del hospedador. Todo ello sugiere que esta anexina podría ser utilizada por *S. bovis*, junto con otras proteínas tegumentales de probada actividad profibrinolítica -como la enolasa-, para evitar la formación de trombos y otras alteraciones hemostáticas que podrían ser letales para la supervivencia del parásito en el torrente sanguíneo. Esto convierte a la anexina de *S. bovis* en una posible diana para el desarrollo de vacunas y nuevos fármacos anti-esquistosoma.



## CARACTERIZACIÓN DE LA Sb22.6 Y VALORACIÓN DE SU ACTIVIDAD PROFIBRINOLÍTICA Y ANTICOAGULANTE Y DE SU UTILIDAD PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *S. BOVIS*

En trabajos previos, nuestro equipo de investigación abordó la identificación y caracterización molecular y funcional de las proteínas de *S. bovis* que forman parte de la interfase parásito-hospedador (Pérez-Sánchez et al., 2006, 2008; Ramajo-Hernández et al., 2007a, 2007b; De la Torre-Escudero et al., 2010, 2011). Una de las proteínas que se identificó en el proteoma tegumental y en el extracto de los productos de excreción-secreción de los vermes adultos de *S. bovis* fue el antígeno Sb22.6 (Pérez-Sánchez et al., 2006, 2008). Se trata de una proteína bastante estudiada en otras especies de *Schistosoma*, pero hasta la fecha se desconoce su función. Como ya se ha comentado, Lin y He (2006) habían demostrado que su homólogo en *S. mansoni*, la proteína Sm22.6, inhibe a la trombina humana y actúa *in vitro* como anticoagulante retrasando el tiempo de coagulación hasta 3-4 veces. Por este motivo pensamos en la posibilidad de que la Sb22.6 pudiera desempeñar alguna actividad antihemostática en la interfase parásito hospedador.

Tras el clonaje y secuenciación del cDNA, el análisis de la secuencia aminoacídica de la Sb22.6 mostró una alta homología con las proteínas ortólogas de las otras especies de esquistosomas observándose, además, que esta homología es incluso más elevada en determinados dominios como los motivos EF-hand y el motivo homólogo a la cadena ligera de la dineína (Fitzsimmons et al. 2004). La gran identidad de secuencia del antígeno Sb22.6 con su homólogo de *S. haematobium* (se diferencian únicamente en 2 aminoácidos) confirma la cercanía filogenética de estas dos especies. El modelo tridimensional de la molécula (Figura 20) muestra, como es habitual, que el motivo EF-hand es una doble hélice (Fitzsimmons et al., 2004). Al igual que las proteínas homólogas de *Schistosoma* sp. y las proteínas tegumentales unidoras de calcio de otros trematodos, la Sb22.6 carece de péptido señal y motivos de anclaje a la membrana lo que sugiere que puede tratarse de una proteína citoplasmática soluble (Vichasri-Grams et al., 2006).

Los resultados de nuestros estudios de inmunolocalización mostraron que la Sb22.6 se expresa en el tegumento y en los tejidos internos de los vermes adultos pero no se encuentra expuesta en la superficie tegumental. Estos resultados coinciden con lo

observado en *S. japonicum* y *S. mansoni* en estudios similares, en los que se demostró expresión de la Sj22.6 y la Sm22.6 en el citoplasma tegumental, y de la Sm22.6 también en el sistema protonefridial, pero no en la superficie tegumental (Dunne et al. 1997; Li et al. 2000). Otros estudios llevados a cabo en *S. mansoni* también corroboran estos resultados (Braschi y Wilson, 2006). En este trabajo los autores no identificaron a la Sm22.6 en la superficie tegumental, ni siquiera después de tratar los vermes con biotina a fin de marcar y posteriormente purificar, por cromatografía de afinidad, a las proteínas que se encuentran accesibles en la superficie tegumental. Por el contrario, Mulvenna et al. (2010) aplicando la misma metodología en vermes adultos de *S. japonicum* sí identificaron a la Sj22.6 entre las proteínas biotiniladas. No obstante, los propios autores señalan la posibilidad de que se hayan podido biotinilar proteínas internas debido a daños producidos en el tegumento.

Nuestros estudios de inmunolocalización también revelaron la ausencia de Sb22.6 en la superficie de las esquistosómulas pulmonares, confirmándose así los resultados obtenidos recientemente en un estudio del proteoma de la superficie de las esquistosómulas, en el que no se llegó a identificar a la Sb22.6 entre los péptidos liberados tras una digestión suave con tripsina de larvas intactas recién obtenidas (De la Torre-Escudero et al., 2011).

En cualquier caso, los ensayos *in vitro* mostraron que la rSb22.6 tiene actividad profibrinolítica aunque, en contra de lo esperado, no mostró actividad anticoagulante, quizás como consecuencia de haber sufrido algún cambio conformacional que pudiera haber afectado a su actividad, a pesar de haberse purificado en condiciones nativas. No obstante, al no estar expuesta en la superficie externa de los vermes descartamos su papel como receptor de plasminógeno en la superficie tegumental, si bien, no se puede descartar que pueda ejercer algún tipo de actividad anti-hemostática en el lecho vascular, tal y como se ha propuesto para *Dirofilaria immitis* a través de sus productos de excreción-secreción (González-Miguel et al., 2012).

Por otro lado, los estudios señalados anteriormente sobre el proteoma de *S. bovis* mostraron que las isoformas del antígeno Sb22.6 son reconocidas por anticuerpos de la clase IgG presentes en sueros de animales infectados con *S. bovis* (Pérez-Sánchez et al., 2006) y que ninguna de ellas está glicosilada, lo que reduce la posibilidad de reacciones cruzadas por anticuerpos frente a epítomos carbohidratados (Ramajo-Hernández et al.,

2007a). Además, el análisis de su secuencia indica que Sb22.6 y sus homólogas en otras especies de esquistosomas, tienen poca similitud con proteínas de otros helmintos, lo que, en principio, disminuye también la posibilidad de reacciones cruzadas con otros helmintos.

Todos estos datos sugerían que el antígeno Sb22.6 podría ser una herramienta con la especificidad y sensibilidad adecuadas para el diagnóstico serológico de la infección por *S. bovis*. En consecuencia, pasamos a valorar la utilidad de la proteína rSb22.6 para ser utilizada en ELISA como antígeno para la detección en suero de anticuerpos anti-*S. bovis*, comparando su comportamiento con el del extracto de vermes adultos (SbC), el cual ha sido utilizado previamente para diagnosticar la infección por *S. bovis* en ganado ovino y bovino (López-Abán et al., 2004; Oleaga et al., 2004) así como las infecciones humanas por *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. intercalatum* (Roffi y Lemasson, 1981; Pardo et al., 2004, 2007; Belo et al., 2009).

Los resultados de los ELISAs con los sueros de los hámsteres infectados experimentalmente demostraron que el antígeno rSb22.6 detecta los anticuerpos anti-*S. bovis* con una sensibilidad comparable a la del extracto SbC. Además, los resultados del análisis de los sueros bovinos procedentes de explotaciones con y sin el parásito indican que ambos antígenos tienen un comportamiento similar. Se debe señalar que aunque el análisis ROC llevado a cabo utilizando estos sueros bovinos no es válido para cuantificar la sensibilidad y especificidad real de los test con rSb22.6 y SbC, dicho análisis nos ha permitido establecer el umbral de positividad para cada uno de ellos y poder así comparar los sueros positivos y negativos detectados con cada antígeno.

Por su parte, el análisis de los sueros de los corderos infectados con *F. hepática* mostró que el antígeno rSb22.6 no reacciona con los anticuerpos frente a este parásito. Los motivos por los que se realizó este análisis fueron: (i) la existencia de cierta homología entre la secuencia de la proteína Sb22.6 y sus ortólogos en *Fasciola* spp lo que podría dar lugar a epítomos comunes y (ii) la coexistencia de ambos parásitos en muchas zonas pudiendo parasitar simultáneamente al ganado ovino y bovino (Dalton, 1998; Moné et al., 1999).

En conclusión, el antígeno rSb22.6 muestra una sensibilidad y especificidad comparable (comportamiento similar) a la del SbC, sin embargo su utilización tiene la

ventaja de que se puede producir de forma estandarizada y reproducible en gran cantidad. Por otra parte, no debemos olvidar que el objetivo de los programas de vigilancia y control de *S. bovis* es la detección de focos endémicos y de explotaciones ganaderas donde se encuentre el parásito y no el diagnóstico individual de animales infectados. Teniendo esto en cuenta, podemos concluir que el antígeno rSb22.6 constituye una prometedora herramienta para ser utilizada en los programas de vigilancia epidemiológica, con el resultado de permitir la detección de focos que albergan el parásito y aplicar en ellos las oportunas medidas de control.

## CONCLUSIONES

---



**Primera**

Las proteínas enolasa, fructosa bisfosfato aldolasa, anexina y Sb22.6 de *Schistosoma bovis* muestran actividad profibrinolítica. Todas ellas fijan plasminógeno y potencian su transformación en plasmina en presencia de activadores fisiológicos de plasminógeno, como el t-PA, pero carecen de la capacidad de activar al plasminógeno por sí solas.

**Segunda**

De estas cuatro proteínas con actividad profibrinolítica, la enolasa y la anexina son las únicas que se expresan en la superficie tegumental de los vermes adultos, y la anexina también en la superficie de las esquistosómulas. En esa localización pueden actuar como receptores fisiológicos de plasminógeno participando así en la activación del sistema fibrinolítico del hospedador, previsiblemente para evitar la formación de coágulos sobre la superficie de los vermes. Estos hallazgos constituyen la primera demostración de dicha función para estas proteínas en una especie del género *Schistosoma*.

**Tercera**

Además de su actividad profibrinolítica, la anexina también es un anticoagulante que bloquea ambas vías de la coagulación, aunque más intensamente a la vía intrínseca. Esta es la primera demostración de las propiedades anticoagulantes de una anexina del género *Schistosoma*, la cual previsiblemente es utilizada para evitar alteraciones hemostáticas que pudieran comprometer la supervivencia de *S. bovis* en el torrente sanguíneo.

**Cuarta**

La GAPDH también puede fijar plasminógeno pero es incapaz de promover su activación, lo que le resta interés como molécula clave en la modulación del sistema fibrinolítico del hospedador, a pesar de ser expresada en la superficie de las esquistosómulas. No obstante, por lo descrito para la GAPDH de otros organismos, no se descarta que pueda tener otro tipo de interacciones con el sistema plasminógeno/plasmina.

### **Quinta**

Las proteínas Sb22.6 y FBA no se encuentran expuestas en la superficie de los vermes, lo que anula su papel como receptores de plasminógeno en el tegumento. No obstante, dado que estas proteínas son liberadas al medio sanguíneo con los productos de excreción-secreción, es posible que ejerzan algún tipo de actividad anti-hemostática en el lecho vascular, en el entorno de los vermes.

### **Sexta**

La forma recombinante de la proteína Sb22.6 es un antígeno de utilidad para el diagnóstico serológico de la infección por *S. bovis*, puesto que presenta una sensibilidad y especificidad comparables a las del extracto SbC y, además, puede ser producido en grandes cantidades de forma estandarizada y reproducible. En consecuencia, el antígeno rSb22.6 constituye una herramienta válida para ser utilizada en programas de vigilancia epidemiológica encaminados a la detección y control de los focos del parásito.

### **Séptima**

La caracterización molecular y funcional de estas proteínas supone un avance importante en el conocimiento de la biología parasitaria y de sus relaciones con el hospedador y, además, puesto que la neutralización de estas moléculas anti-hemostáticas podría comprometer la supervivencia del parásito, se abren nuevas perspectivas para el desarrollo de vacunas o fármacos frente a *S. bovis*.



## BIBLIOGRAFÍA

---



- Abath, F.G.C. & Werkhauser, R.C. (1996). The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. **Parasite Immunology**, **18**: 15-20.
- Abbasi, I., King, C.H., Sturrock, R.F., Kariuki, C., Muchiri, E. & Hamburger, J. (2007). Differentiation of *Schistosoma haematobium* from related schistosomes by PCR amplifying an inter-repeat sequence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **76**: 950-955.
- Afaf, E.-A. (2003). Biochemical and immunological adaptation in schistosome parasitism. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, **136**: 227-243.
- Agnew, A.M., Murare, H.M., Lucas, S.B. & Doenhoff, M.J. (1989). *Schistosoma bovis* as an immunological analogue of *S. haematobium*. **Parasite Immunology**, **11**: 329-340.
- Almeida, L., Vanegas, G., Calcagno, M., Concepción, J.L. & Avilan, L. (2004). Plasminogen interaction with *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **99**: 63-67.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, **22**: 195-201.
- Attwood, S.W., Panasoponkul, C., Upatham, E.S., Meng, X.H. & Southgate, V.R. (2002). *Schistosoma ovuncatum* n. sp. (Digenea: Schistosomatidae) from northwest Thailand and the historical biogeography of Southeast Asian *Schistosoma* Weinland, 1858. **Systematic Parasitology**, **51**: 1-19.
- Auriault, C., Joseph, M., Tartar, A., Bout, D., Tonnel, A.B. & Capron, A. (1985). Regulatory role of a tripeptide (TPK) from the second constant domain of immunoglobulin G.I. Inhibition of rat and human macrophage activities. **International Journal of Immunopharmacology**, **7**: 73-79.
- Avilan, L., Calcagno, M., Figuera, M., Lemus, L., Puig, J. & Rodriguez, A.M. (2000). Interaction of *Leishmania mexicana* promastigotes with the plasminogen-plasmin system. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **110**: 183-193.
- Avilán, L., Gualdrón-López, M., Quiñones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P.A. & Concepción, J.-L. (2011). Enolase: A Key Player in the Metabolism and a Probable Virulence Factor of Trypanosomatid Parasites-Perspectives for Its Use as a Therapeutic Target. **Enzyme Research**, **2011**. doi:10.4061/2011/932549
- Belo, S., Gracio, M.A.A., Ramajo, V. & Oleaga, A. (2002). Usefulness of a 22 kDa *Schistosoma bovis* antigen for the diagnosis of *S. intercalatum* infection. **Proceeding of the Third European Congress on Tropical Medicine and International Health, Lisboa. (Portugal), 2002**.
- Belo, S., Rompao, S., Costa e Sousa, B., GonC, alves, L., Ramajo, V., Oleaga, A. & Gracio, A. (2009). Diagnostic potential of IgG4/ELISA in schistosomiasis intercalatum infection. **Tropical Medicine and International Health**, **14**: 193.
- Dyrløv Bendtsen, J., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. (2004). Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, **340**: 783-795.
- Bergmann, S. & Hammerschmidt, S. (2007). Fibrinolysis and host response in bacterial infections. **Thrombosis and Haemostasis**, **98**: 512-520.

- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S. & Hammerschmidt, S. (2001).  $\alpha$ -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. **Molecular Microbiology**, **40**: 1273-1287.
- Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G.S. & Hammerschmidt, S. (2003). Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed  $\alpha$ -enolase of *Streptococcus pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, **49**: 411-423.
- Bergmann, S., Rohde, M. & Hammerschmidt, S. (2004). Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* Is a Surface-Displayed Plasminogen-Binding Protein. **Infection and Immunity**, **72**: 2416-2419.
- Bernal, D., de la Rubia, J.E., Carrasco-Abad, A.M., Toledo, R., Mas-Coma, S. & Marcilla, A. (2004). Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory–secretory products of *Fasciola hepatica*. **FEBS Letters**, **563**: 203-206.
- Braschi, S., Curwen, R.S., Ashton, P.D., Verjovski-Almeida, S. & Wilson, A. (2006). The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis after differential extraction. **Proteomics**, **6**: 1471-1482.
- Braschi, S. & Wilson, R.A. (2006). Proteins Exposed at the Adult Schistosome Surface Revealed by Biotinylation. **Molecular & Cellular Proteomics**, **5**: 347-356.
- Broder, C.C., Lottenberg, R., von Mering, G.O., Johnston, K.H. & Boyle, M.D. (1991). Isolation of a prokaryotic plasmin receptor. Relationship to a plasminogen activator produced by the same micro-organism. **Journal of Biological Chemistry**, **266**: 4922-4928.
- Brumpt, E. (1930). Cycle évolutif complet de *Schistosoma bovis*. Infecction naturelle en Corse et infection expérimentale de *Bulinus contortus*. **Annales de Parasitologie**, **8**: 17-50.
- Bushara, H.O., Hussein, M.F., Saad, A.M., Taylor, M.G., Dargie, J.D., Marshall, T.F.D.C. & Nelson, G.S. (1978). Immunization of calves against *Schistosoma bovis* using irradiated cercariae or schistosomula of *S. bovis*. **Parasitology**, **77**: 303-311.
- Capron, A., Riveau, G., Grzych, J.M., Boulanger, D., Capron, M. & Pierce, R. (1994). Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. **Tropical and Geographical Medicine**, **46**: 242-246.
- Cass, C.L., Johnson, J.R., Califf, L.L., Xu, T., Hernandez, H.J., Stadecker, M.J., Yates Iii, J.R. & Williams, D.L. (2007). Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **155**: 84-93.
- Castro-Borges, W., Dowle, A., Curwen, R.S., Thomas-Oates, J. & Wilson, R.A. (2011a). Enzymatic Shaving of the Tegument Surface of Live Schistosomes for Proteomic Analysis: A Rational Approach to Select Vaccine Candidates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **5**: e993.
- Castro-Borges, W., Simpson, D.M., Dowle, A., Curwen, R.S., Thomas-Oates, J., Beynon, R.J. & Wilson, R.A., (2011b). Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QconCAT proteomics. **Journal of Proteomics**, **74**: 1519-1533.
- Cederholm, A., & Frostegard, J. (2007). Annexin A5 as a Novel Player in Prevention of Atherothrombosis in SLE and in the General Population. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1108**: 96-103.

- Charrier-Ferrara, S., Caillol, D. & Goudot-Crozel, V. (1992). Complete sequence of the *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene encoding a major surface antigen. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **56**: 339-343.
- Cioli, D., Pica-Mattocchia, L. & Archer, S. (1995). Antischistosomal drugs: Past, present ... and future? **Pharmacology & Therapeutics**, **68**: 35-85.
- Coelho-Castelo, A.A.M., Panunto-Castelo, A., Moreno, A.N., Dias-Baruffi, M., Jamur, M.C., Oliver, C., Roque-Barreira, M.C. & Rodrigues, V. (2002). Sm60, a mannose-binding protein from *Schistosoma mansoni* with inflammatory property. **International Journal for Parasitology**, **32**: 1747-1754.
- Cork, A.J., Jergic, S., Hammerschmidt, S., Kobe, B., Pancholi, V., Benesch, J.L.P., Robinson, C.V., Dixon, N.E., Aquilina, J.A. & Walker, M.J. (2009). Defining the Structural Basis of Human Plasminogen Binding by Streptococcal Surface Enolase. **Journal of Biological Chemistry**, **284**: 17129-17137.
- Crowe, J.D., Sievwright, I.K., Auld, G.C., Moore, N.R., Gow, N.A.R. & Booth, N.A. (2003). *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. **Molecular Microbiology**, **47**: 1637-1651.
- Curwen, R.S., Ashton, P.D., Sundaralingam, S. & Wilson, R.A. (2006). Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. **Molecular & Cellular Proteomics**, **5**: 835-844.
- Cutts, L. & Wilson, R.A. (1997). The protein antigens secreted in vivo by adult male *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, **114**: 245-255.
- Dalton, J.P. (Ed.), 1999. Fasciolosis. CAB International, Oxon, UK, 544 p.
- De Bont, J. & Vercruyssen, J. (1997). The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. **Parasitology Today**, **13**: 255-262.
- De Bont, J. & Vercruyssen, J. (1998). Schistosomiasis in Cattle, In: **J.R. Baker, R.M., Rollinson, D. (Eds.) Advances in Parasitology. Academic Press, pp. 285-364.**
- de la Paz Santangelo, M., Gest, P.M., Guerin, M.E., Coinçon, M., Pham, H., Ryan, G., Puckett, S.E., Spencer, J.S., Gonzalez-Juarrero, M., Daher, R., Lenaerts, A.J., Schnappinger, D., Therisod, M., Ehrt, S., Sygusch, J. & Jackson, M. (2011). Glycolytic and Non-glycolytic Functions of *Mycobacterium tuberculosis* Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase, an Essential Enzyme Produced by Replicating and Non-replicating Bacilli. **Journal of Biological Chemistry**, **286**: 40219-40231.
- de la Torre-Escudero, E., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R., Siles-Lucas, M. & Oleaga, A. (2010). Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. **Veterinary Parasitology**, **173**: 76-84.
- de la Torre-Escudero, E., Manzano-Román, R., Siles-Lucas, M., Pérez-Sánchez, R., Moyano, J.C., Barrera, I. & Oleaga, A. (2012). Molecular and functional characterization of a *Schistosoma bovis* annexin: Fibrinolytic and anticoagulant activity. **Veterinary Parasitology**, **184**: 25-36.
- de la Torre Escudero, E., Manzano-Román, R., Valero, L., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., Hernández-González, A. & Siles-Lucas, M. (2011). Comparative proteomic analysis of

- Fasciola hepatica* juveniles and *Schistosoma bovis* schistosomula. **Journal of Proteomics**, **74**: 1534-1544.
- DeLano, W.L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.
- DeMarco, R., Kowaltowski, A.T., Mortara, R.A. & Verjovski-Almeida, S. (2003). Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **307**: 831-838.
- Derbise, A., Song, Y.P., Parikh, S., Fischetti, V.A. & Pancholi, V. (2004). Role of the C-Terminal Lysine Residues of Streptococcal Surface Enolase in Glu- and Lys-Plasminogen-Binding Activities of Group A Streptococci. **Infection and Immunity**, **72**: 94-105.
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Oleaga, A., Encinas-Grandes, A. & Pérez-Sánchez, R. (2012). Cloning and characterization of a plasminogen-binding enolase from the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata*. **Veterinary Parasitology**. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.09.019.
- Draeger, A., Monastyrskaya, K. & Babiychuk, E.B. (2011). Plasma membrane repair and cellular damage control: The annexin survival kit. **Biochemical Pharmacology**, **81**: 703-712.
- Dunne, D.W., Webster, M., Smith, P., Langley, J.G., Richardson, B.A., Fulford, A.J.C., Butterworth, A.E., Sturrock, R.F., Kariuki, H.C. & Ouma, J.H. (1997). The isolation of a 22 kDa band after SDS-PAGE of *Schistosoma mansoni* adult worms and its use to demonstrate that IgE responses against the antigen(s) it contains are associated with human resistance to reinfection. **Parasite Immunology**, **19**: 79-89.
- Ehinger, S., Schubert, W.-D., Bergmann, S., Hammerschmidt, S. & Heinz, D.W. (2004). Plasmin(ogen)-binding  $\alpha$ -Enolase from *Streptococcus pneumoniae*: Crystal Structure and Evaluation of Plasmin(ogen)-binding Sites. **Journal of Molecular Biology**, **343**: 997-1005.
- Eisenhaber, B., Bork, P., Yuan, Y., Löffler, G. & Eisenhaber, F. (2000). Automated annotation of GPI anchor sites: case study *C. elegans*. **Trends in Biochemical Sciences**, **25**: 340-341.
- Erttmann, K.D., Kleensang, A., Schneider, E., Hammerschmidt, S., Büttner, D.W. & Gallin, M. (2005). Cloning, characterization and DNA immunization of an *Onchocerca volvulus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Ov-GAPDH). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, **1741**: 85-94.
- Falabella, P., Riviello, L., De Stradis, M.L., Stigliano, C., Varricchio, P., Grimaldi, A., de Eguileor, M., Graziani, F., Gigliotti, S. & Pennacchio, F. (2009). *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **39**: 801-813.
- Fishelson, Z. (1995). Novel mechanisms of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **90**: 289-292.
- Fitzsimmons, C.M., Stewart, T.J., Hoffmann, K.F., Grogan, J.L., Yazdanbakhsh, M. & Dunne, D.W. (2004). Human IgE response to the *Schistosoma haematobium* 22.6 kDa antigen. **Parasite Immunology**, **26**: 371-376.

- Frank, R., & Dübel, S. (2006). Analysis of Protein Interactions with Immobilized Peptide Arrays Synthesized on Membrane Supports. **Cold Spring Harbor Protocols 2006, pdb.prot4566.**
- Gao, Y.-J., Yan, H.-L., Ding, F.-X., Lu, Y.-M., Sun, S.-H., (2007). Annexin B1 at the host-parasite interface of the *Taenia solium* cysticercus: Secreted and associated with inflammatory reaction. **Acta Tropica, 101: 192-199.**
- Geerts, S. & Gryseels, B. (2000). Drug Resistance in Human Helminths: Current Situation and Lessons from Livestock. **Clinical Microbiology Reviews, 13: 207-222.**
- Gentile, R., Gonçalves, M.M.L., da Costa Neto, S.F., da Costa, M.M., Peralta, R.H.S. & Peralta, J.M. (2011). Evaluation of immunological, parasitological and molecular methods for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection before and after chemotherapy treatment with praziquantel in experimentally infected *Nectomys squamipes*. **Veterinary Parasitology, 180: 243-249.**
- Gerke, V. & Moss, S.E. (2002). Annexins: From Structure to Function. **Physiological Reviews, 82: 331-371.**
- Gobert, G.N., Stenzel, D.J., McManus, D.P. & Jones, M.K. (2003). The ultrastructural architecture of the adult *Schistosoma japonicum* tegument. **International Journal for Parasitology, 33: 1561-1575.**
- Goguen, J.D., Bugge, T. & Degen, J.L. (2000). Role of the Pleiotropic Effects of Plasminogen Deficiency in Infection Experiments with Plasminogen-Deficient Mice. **Methods, 21: 179-183.**
- González-Miguel, J., Morchón, R., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. & Simón, F. (2012). Excretory/secretory antigens from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system involving the vascular endothelium. **Molecular and Biochemical Parasitology, 181: 134-140.**
- Goudot-Crozal, V., Caillol, D., Djabali, M. & Dessein, A.J. (1989). The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37-kD glyceraldehyde-3P-dehydrogenase. **The Journal of Experimental Medicine, 170: 2065-2080.**
- Gui, M., Kusel, J.R., Shi, Y.E. & Ruppel, A. (1995). *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni*: comparison of larval migration patterns in mice. **Journal of Helminthology, 69: 19-25.**
- Hajjar, K.A. & Krishnan, S. (1999). Annexin II: A Mediator of the Plasmin /Plasminogen Activator System. **Trends in Cardiovascular Medicine, 9: 128-138.**
- Hajjar, K.A., Mauri, L., Jacovina, A.T., Zhong, F., Mirza, U.A., Padovan, J.C. & Chait, B.T. (1998). Tissue Plasminogen Activator Binding to the Annexin II Tail Domain. **Journal of Biological Chemistry, 273: 9987-9993.**
- Hall, S.L., Braschi, S., Truscott, M., Mathieson, W., Cesari, I.M. & Wilson, R.A. (2011). Insights into blood feeding by schistosomes from a proteomic analysis of worm vomitus. **Molecular and Biochemical Parasitology, 179: 18-29.**
- Han, Z.G., Brindley, P.J., Wang, S.Y. & Zhu, C. (2009). Schistosoma Genomics: New Perspectives on Schistosome Biology and Host-Parasite interaction, **Annual Review of Genomics and Human Genetics, 10: 211-240.**

- Harrop, R. & Wilson, R.A. (1993). Protein synthesis and release by cultured schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, **107**: 265-74.
- Hawley, S.B., Green, M.A. & Miles, L.A. (2000). Discriminating between cell surface and intracellular plasminogen-binding proteins: Heterogeneity in profibrinolytic plasminogen-binding proteins on monocytoid cells. **Thrombosis and Haemostasis**, **84**: 882-890.
- Hillyer, G.V., Garcia-Rosa, M., Simón Vicente, F. & Ramajo Martín, V. (1987). Antígenos cruzantes entre *Fasciola hepatica* y *Schistosoma bovis*. **V Congreso Nacional de Parasitología. Salamanca (España). Libro de resúmenes**, 439-440.
- Hofmann, A., Osman, A., Leow, C.Y., Driguez, P., McManus, D.P. & Jones, M.K. (2010). Parasite annexins – New molecules with potential for drug and vaccine development. **BioEssays**, **32**: 967-976.
- Hurmalainen, V., Edelman, S., Antikainen, J., Baumann, M., Lähteenmäki, K. & Korhonen, T.K. (2007). Extracellular proteins of *Lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen. **Microbiology**, **153**: 1112-1122.
- Hussein, M.F. (1971). The pathology of experimental schistosomiasis in calves. **Research in veterinary science**, **12**: 246-252.
- Hussein, M.F., Tartour, G., Imbabi, S.E. & Ali, K.E. (1975). The pathology of naturally-occurring bovine schistosomiasis in the Sudan. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **69**: 217-25.
- Jin, Y.-m., Lu, K., Zhou, W.-F., Fu, Z.-Q., Liu, J.-M., Shi, Y.-J., Li, H. & Lin, J.-J. (2010). Comparison of Recombinant Proteins from *Schistosoma japonicum* for Schistosomiasis Diagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, **17**: 476-480.
- Johansen, M.V., Fillie, Y., Monrad, J., Christensen, N.O. & Deelder, A. (1996). Experimental *Schistosoma bovis* infection in goats. Circulating antigens and antibody responses to eggs and adult worm antigens during infection following treatment with praziquantel. **Parasitology**, **113**: 367-375.
- Jolodar, A., Fischer, P., Bergmann, S., Büttner, D.W., Hammerschmidt, S. & Brattig, N.W., (2003). Molecular cloning of an  $\alpha$ -enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, **1627**: 111-120.
- Jones, M.K., Gobert, G.N., Zhang, L., Sunderland, P. & McManus, D.P. (2004). The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. **BioEssays**, **26**: 752-765.
- Jones, M.N., & Holt, R.G. (2007). Cloning and characterization of an  $\alpha$ -enolase of the oral pathogen *Streptococcus mutans* that binds human plasminogen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **364**: 924-929.
- Jong, A.Y., Chen, S.H.M., Stins, M.F., Kim, K.S., Tuan, T.-L. & Huang, S.-H. (2003). Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, **52**: 615-622.



- Knudsen, G.M., Medzihradzky, K.F., Lim, K.-C., Hansell, E. & McKerrow, J.H. (2005). Proteomic Analysis of *Schistosoma mansoni* Cercarial Secretions. **Molecular & Cellular Proteomics**, **4**: 1862-1875.
- Kornblatt, M.J., Kornblatt, J.A. & Hancock, M.A. (2011). The Interaction of Canine Plasminogen with *Streptococcus pyogenes* Enolase: They Bind to One Another but What Is the Nature of the Structures Involved? **PLoS ONE**, **6**: e28481.
- Laclette, J., Shoemaker, C., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D. & Nicholson-Weller, A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. **The Journal of Immunology**, **148**: 124-128.
- Lama, A., Kucknoor, A., Mundodi, V. & Alderete, J.F. (2009). Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is a Surface-Associated, Fibronectin-Binding Protein of *Trichomonas vaginalis*. **Infection and Immunity**, **77**: 2703-2711.
- Lawrence, J.A. (1977). *Schistosoma mattheei* in the ox: clinical pathological observations. **Research in Veterinary Science**, **23**: 280-287.
- Lähteenmäki, K., Kuusela, P. & Korhonen, T.K. (2001). Bacterial plasminogen activators and receptors. **FEMS Microbiology Reviews**, **25**: 531-552.
- Lejoly-Boisseau, H., Appriou, M., Seigneur, M., Pruvost, A., Tribouley-Duret, J. & Tribouley, J. (1999). *Schistosoma mansoni*: In Vitro Adhesion of Parasite Eggs to the Vascular Endothelium. Subsequent Inhibition by a Monoclonal Antibody Directed to a Carbohydrate Epitope. **Experimental Parasitology**, **91**: 20-29.
- Lenz, L.L., Mohammadi, S., Geissler, A. & Portnoy, D.A. (2003). SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **100**: 12432-12437.
- Lewis, S.A. & Strand, M. (1991). Characterization of proteins and immunogens released by adult *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Parasitology**, **77**: 263-71.
- Li, Y., Auliff, A., Jones, M.K., Yi, X. & McManus, D.P. (2000). Immunogenicity and immunolocalization of the 22.6 kDa antigen of *Schistosoma japonicum*. **Parasite Immunology**, **22**: 415-424.
- Lin, Y.-L. & He, S. (2006). Sm22.6 antigen is an inhibitor to human thrombin. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **147**: 95-100.
- Lind, S.E. & Smith, C.J. (1991). Actin accelerates plasmin generation by tissue plasminogen activator. **Journal of Biological Chemistry**, **266**: 17673-17678.
- Lindberg, R., Monrad, J., Johansen, M.V., Christensen, N.O. & Nansen, P. (1995). Tissue response of goats to single or repeated low-level doses and to a massive challenge dose of *Schistosoma bovis*. **Research in Veterinary Science**, **58**: 56-60.
- Liu, F., Lu, J., Hu, W., Wang, S.-Y., Cui, S.-J., Chi, M., Yan, Q., Wang, X.-R., Song, H.-D., Xu, X.-N., Wang, J.-J., Zhang, X.-L., Zhang, X., Wang, Z.-Q., Xue, C.-L., Brindley, P.J., McManus, D.P., Yang, P.-Y., Feng, Z., Chen, Z. & Han, Z.-G. (2006). New Perspectives on Host-Parasite Interplay by Comparative Transcriptomic and Proteomic Analyses of *Schistosoma japonicum*. **PLoS Pathogens**, **2**: e29.

- Liu, F., Cui, S.-J., Hu, W., Feng, Z., Wang, Z.-Q. & Han, Z.-G. (2009). Excretory/Secretory Proteome of the Adult Developmental Stage of Human Blood Fluke, *Schistosoma japonicum*. **Molecular & Cellular Proteomics, 8: 1236-1251.**
- Liu, Y., Brindley, P.J., Zeng, Q., Li, Y., Zhou, J., Chen, Y., Yang, S., Zhang, Z., Liu, B., Cai, L. & McManus, D.P. (2011). Identification of phage display peptides with affinity for the tegument of *Schistosoma japonicum* schistosomula. **Molecular and Biochemical Parasitology, 180: 86-98.**
- López-Abán, J., Ramajo, V., Pérez Arellano, J.L., Oleaga, A., Hillyer, G.V. & Muro, A. (1999). A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/BL mice infected with *Schistosoma bovis*. **Veterinary Parasitology, 83: 107-121.**
- López-Abán, J., Oleaga, A., Ramajo, V., Casanueva, P., Pérez Arellano, J.L., Hillyer, G.V. & Muro, A. (2000). Vaccination of mice against *Schistosoma bovis* with a recombinant fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology, 91: 33-42.**
- López-Abán, J., Ramos, S., Ramajo, V., Oleaga, A. & Muro, A. (2004). Seroepidemiological study of infection by *Fasciola hepatica* and *Schistosoma bovis* in cattle and sheep in western Spain. **Research and Reviews in Parasitology, 64: 41-47.**
- Losada, S., Chacón, N., C.Colmenares, Bermúdez, H., Lorenzo, A., Pointier, J.P., Theron, A., Alarcón de Noya, B. & Noya, O. (2005). *Schistosoma*: Cross-reactivity and antigenic community among different species. **Experimental Parasitology, 111: 182-190.**
- Lottenberg, R., Broder, C.C., Boyle, M.D., Kain, S.J., Schroeder, B.L. & Curtiss, R. (1992). Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a streptococcal plasmin receptor. **Journal of Bacteriology, 174: 5204-5210.**
- Loukas, A., Jones, M.K., King, L.T., Brindley, P.J. & McManus, D.P. (2001). Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. **Infection and Immunity, 69: 3646-3651.**
- MacGregor, A.N., Kusel, J.R. & Wilson, R.A. (1988). Isolation and characterisation of discoid granules from the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research, 74: 250-254.**
- Magalhães, V., Veiga-Malta, I., Almeida, M.R., Baptista, M., Ribeiro, A., Trieu-Cuot, P. & Ferreira, P. (2007). Interaction with human plasminogen system turns on proteolytic activity in *Streptococcus agalactiae* and enhances its virulence in a mouse model. **Microbes and Infection, 9: 1276-1284.**
- Mahmoud, A.F. (2001). Schistosomiasis. **Tropical Medicine, Science and Practice, Vol. 3. Ed. Geoffrey Pasvol & Stephen L Hoffman. Imperial College Press.**
- Maizels, R.M., Blaxter, M.L., Robertson, B.D. & Selkirk, M.E. (1991). Parasite antigen parasite genes: A laboratory manual for molecular Parasitology. **Cambridge University Press, Cambridge.**
- Majid, A.A., Bushara, H.O., Saad, A.M., Hussein, M.F., Taylor, M.G., Dargie, J.D., de C. Marshall, T.F. & Nelson, G.S. (1980). Observations on cattle Schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 29: 452-455.**
- 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. & Bernal, D. (2012). Extracellular Vesicles

- from Parasitic Helminths Contain Specific Excretory/Secretory Proteins and Are Internalized in Intestinal Host Cells. **PLoS ONE**, **7**: e45974.
- 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.
- Mayoral, A., Nieto, C., Serrano, F., Habela, M., Breña, M. & Reina, D. (1989). Nuevas aportaciones al conocimiento de la parasitofauna de Cáceres. **VI Congreso Nacional de Parasitología. Cáceres (España). Libro de resúmenes**, pp. 180.
- McNeelly, T.B., Cope, L., Smith, S., Joshi, A., Pak, I. & Fridman, A. (2012). Enolase peptide conjugate vaccines against *Staphylococcus aureus*. WO 2012/065034 A1. (C07K 7/00; A61K 39/085). 18 May 2012.
- Moné, H., Mouahid, G. & Morand, S. (1999). The Distribution of *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 in Relation to Intermediate Host Mollusc-Parasite Relationships, In: **J.R. Baker, R.M., Rollinson, D. (Eds.) Advances in Parasitology. Academic Press**, pp. 99-138.
- Monrad, J., Christensen, N.Ø., Nansen, P., Johansen, M.V. & Lindberg, R. (1995). Acquired resistance against *Schistosoma bovis* after single or repeated low-level primary infections in goats. **Research in veterinary science**, **58**: 42-45.
- Monrad, J., Sörén, K., Johansen, M.V., Lindberg, R. & Ørnbjerg, N. (2006). Treatment efficacy and regulatory host responses in chronic experimental *Schistosoma bovis* infections in goats. **Parasitology**, **133**: 151-158.
- Moss, S. & Morgan, R. (2004). The annexins. **Genome Biology**, **5**: 219.
- Mulvenna, J., Moertel, L., Jones, M.K., Nawaratna, S., Lovas, E.M., Gobert, G.N., Colgrave, M., Jones, A., Loukas, A. & McManus, D.P. (2010). Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. **International Journal for Parasitology**, **40**: 543-554.
- Mundodi, V., Kucknoor, A.S. & Alderete, J.F. (2008). Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated  $\alpha$ -enolase of *Trichomonas vaginalis*. **Infection and Immunity**, **76**: 523-531.
- Mutapi, F., Burchmore, R., Mduluza, T., Foucher, A., Harcus, Y., Nicoll, G., Midzi, N., Turner, C.M. & Maizels, R.M. (2005). Praziquantel treatment of individuals exposed to *Schistosoma haematobium* enhances serological recognition of defined parasite antigens. **Journal of Infectious Diseases**, **192**: 1108-1118.
- Olaechea, F.V., Christensen, N.Ø. & Henriksen, S.A. (1990). A comparison of the filtration, concentration, and thick smear techniques in the diagnosis of *Schistosoma bovis* infection in cattle and goats. **Acta Tropica**, **47**: 217-221.
- Oleaga, A., & Ramajo, V. (2004). Efficiency of the oral, intramuscular and subcutaneous routes for the experimental infection of hamster and sheep with *Schistosoma bovis*. **Veterinary Parasitology**, **124**: 43-53.
- Oleaga, A., Ramajo-Hernández, A., Pérez-Sánchez, R. & Ramajo-Martín, V. (2004). Prevalence and distribution of the bullfighting cattle farms infected with *Schistosoma bovis* in the province of Salamanca (Spain). In: **Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Esteban, J.G., Valero,**

**M.A. (Eds.), Multidisciplinarity for parasites, vectors and parasitic diseases Artes gráficas Aguilar S.L., Valencia, pp: 283-284.**

- Pacífico, L.G.G., Fonseca, C.T., Chiari, L. & Oliveira, S.C. (2006). Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. **Immunobiology, 211: 97-104.**
- Pancholi, V. (2001). Multifunctional  $\alpha$ -enolase: its role in diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences, 58: 902-920.**
- Pancholi, V. & Chhatwal, G.S. (2003). Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology, 293: 391-401.**
- Pardo, J., Carranza, C., Turrientes, M.C., Pérez Arellano, J.L., López Vélez, R., Ramajo, V. & Muro, A. (2004). Utility of *Schistosoma bovis* adult worm antigens for diagnosis of human Schistosomiasis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Electroimmunotransfer Blot techniques. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 11: 1165-1170.**
- Pearce, E.J. & MacDonald, A.S. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews. Immunology, 2: 499-511.**
- Pearce, E.J., Basch, P.F. & Sher, A. (1986). Evidence that the reduced surface antigenicity of developing *Schistosoma mansoni* schistosomula is due to antigen shedding rather than host molecule acquisition. **Parasite Immunology, 8: 79-89.**
- Pearce, E., Hall, B. & Sher, A. (1990). Host-specific evasion of the alternative complement pathway by schistosomes correlates with the presence of a phospholipase C- sensitive surface molecule resembling human decay accelerating factor. **The Journal of Immunology, 144: 2751-2756.**
- Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Hernández, A., Ramajo-Martín, V. & Oleaga, A. (2006). Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. **Proteomics, 6: S226-S236.**
- Pérez-Sánchez, R., Valero, M.L., Ramajo-Hernández, A., Siles-Lucas, M., Ramajo-Martín, V. & Oleaga, A. (2008). A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms. **Molecular and Biochemical Parasitology, 161: 112-123.**
- Planchart, S., Incani, R. & Cesari, I. (2007). Preliminary characterization of an adult worm "vomit" preparation of *Schistosoma mansoni* and its potential use as antigen for diagnosis. **Parasitology Research, 101: 301-309.**
- Plow, E., Herren, T., Redlitz, A., Miles, L. & Hoover-Plow, J. (1995). The cell biology of the plasminogen system. **The FASEB Journal, 9: 939-945.**
- Ramajo-Hernández, A., Oleaga, A., Ramajo-Martín, V. & Pérez-Sánchez, R. (2007a). Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted glycoproteins of adult *Schistosoma bovis* worms. **Veterinary Parasitology, 144: 45-60.**
- Ramajo-Hernández, A., Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Martín, V. & Oleaga, A. (2007b). *Schistosoma bovis*: Plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. **Experimental Parasitology, 115: 83-91.**

- Ramajo Martín, V. (1972). Contribución al estudio epizootiológico de la esquistosomiasis bovina (*Schistosoma bovis*) en la provincia de Salamanca. **Anales de la Facultad de Veterinaria de León, 18: 151-214.**
- Ramajo Martín, V. y Muro Álvarez, A. (1999). Parasitosis de los rumiantes. Parasitosis hemáticas. Esquistosomosis. En: **Parasitología Veterinaria. (Coord. Cordero del Campillo, M. y cols). Ed. Interamericana. División de Ciencias de la Salud de Mc Graw-Hill/ Interamericana de España. pp: 310-318.**
- Ramajo Martín, V., López-Abán, J., Serrano, A.E., Oleaga, A. & Muro, A. (1995). A long-term study on the prevalence of gastrointestinal, hepatic and pulmonary parasitism in adult cattle from Salamanca province, western Spain. **Research and Reviews in Parasitology, 55: 231-234.**
- Rodríguez Osorio, M., Gómez García, V., Rojas González, J., Ramajo Martín, V., Manga González, Y. & González Lanza, C. (1993). Resistance to *Schistosoma bovis* in sheep induced by an experimental *Fasciola hepatica* infection. **The Journal of Parasitology, 79: 223-225.**
- Rodríguez-Osorio, M., Gómez-García, V., Rojas, J. & Ramajo-Martín, V. (1999). Humoral immune response and antigenemia in sheep experimentally infected with *Schistosoma bovis*. Cross-reactivity with *Fasciola hepatica*. **The Journal of Parasitology, 85: 585-587.**
- Roffi, J. & Lemasson, J.M. (1981). Use of a heterologous antigen (*Schistosoma bovis*) for the immunoenzymatic serodiagnosis of urinary bilharziasis. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales, 74: 532-545.**
- Ruppel, A., Kennedy, M.W., Kusel, J.R., (2002). Schistosomiasis immunology, epidemiology and diagnosis. **Trends in Parasitology, 18: 50-52.**
- Saad, A.M., Hussein, M.F., Dargie, J.D., Taylor, M.G. & Nelson, G.S. (1980). *Schistosoma bovis* in calves: the development and clinical pathology of primary infections. **Research in Veterinary Science, 28: 105-111.**
- Sánchez-Botija, R. (1954). Sobre la presencia de la schistosomiasis ovina en España. **Revista del Patronato de Biología Animal, 1: 31-36.**
- Sandoval, N., Siles-Lucas, M., Pérez-Arellano, J.L., Carranza, C., Puente, S., López-Abán, J. & Muro, A. (2006). A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. **Parasitology, 133: 581-587.**
- Saunders, N., Wilson, R.A. & Coulson, P.S. (1987). The outer bilayer of the adult schistosome tegument surface has a low turnover rate in vitro and in vivo. **Molecular and Biochemical Parasitology, 25: 123-131.**
- Schechtman, D., Tarrab-Hazdai, R. & Arnon, R. (2001). The 14-3-3 protein as a vaccine candidate against schistosomiasis. **Parasite Immunology, 23: 213-217.**
- Schroeder, H., Skelly, P.J., Zipfel, P.F., Losson, B. & Vanderplasschen, A. (2009). Subversion of complement by hematophagous parasites. **Developmental Comparative Immunology, 33: 5-13.**
- Secor, W.E. (2005). Immunology of human schistosomiasis: off the beaten path. **Parasite Immunology, 27: 309-316.**

- Siles-Lucas, M., & Gottstein, B. (2003). The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. **Trends in Parasitology**, **19**: 575-581.
- Simón Vicente, F. (1969). Esquistosomiasis en el ganado de algunas provincias del oeste de España (Schistosomiasis in the live stock of some spanish west provinces). **Suplemento Científico del Boletín Informativo del Consejo General de Colegios Veterinarios de España**, **187**: 41-52.
- Simón Vicente, F. & Ramajo Martín, V. (1982). Present epizootiological stats of bovine schistosomiasis in Spain. **Revista Ibérica de Parasitología**, Vol. extra: 423-429.
- Skelly, P.J. & Alan Wilson, R. (2006). Making sense of the Schistosome surface, In: J.R. Baker, R.M., Rollinson, D. (Eds.) **Advances in Parasitology**. Academic Press, pp. 185-284.
- Stanley, R.G., Ngaiza, J.R., Wambayi, E., Lewis, J. & Doenhoff, M.J. (2003). Platelets as an innate defence mechanism against *Schistosoma mansoni* infections in mice. **Parasite Immunology**, **25**: 467-473.
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M. & Utzinger, J. (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, **6**: 411-425.
- Tallima, H. & Ridi, R.E. (2008). *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a lung-stage schistosomula surface membrane antigen. **Folia Parasitologica**, **55**: 180-186.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, **28**: 2731-2739.
- Tararam, C.A., Farias, L.P., Wilson, R.A. & Leite, L.C.d.C. (2010). *Schistosoma mansoni* Annexin 2: Molecular characterization and immunolocalization. **Experimental Parasitology**, **126**: 146-155.
- Toledo, A., Coleman, J.L., Kuhlow, C.J., Crowley, J.T. & Benach, J.L. (2012). The Enolase of *Borrelia burgdorferi* Is a Plasminogen Receptor Released in Outer Membrane Vesicles. **Infection and Immunity**, **80**: 359-368.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **76**: 4350-4.
- Uribe, N., Siles-Lucas, M., López-Abán, J., Esteban, A., Suarez, L., Martínez-Fernández, A., del Olmo, E. & Muro, A. (2007). The Sb14-3-3 $\zeta$  recombinant protein protects against *Schistosoma bovis* in BALB/c mice. **Vaccine**, **25**: 4533-4539.
- van Balkom, B.W.M., van Gestel, R.A., Brouwers, J.F.H.M., Krijgsveld, J., Tielens, A.G.M., Heck, A.J.R. & van Hellemond, J.J. (2005). Mass Spectrometric Analysis of the *Schistosoma mansoni* Tegumental Sub-proteome. **Journal of Proteome Research**, **4**: 958-966.
- Van Hellemond, J.J., Retra, K., Brouwers, J.F.H.M., van Balkom, B.W.M., Yazdanbakhsh, M., Shoemaker, C.B. & Tielens, A.G.M. (2006). Functions of the tegument of schistosomes: Clues from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology**, **36**: 691-699.

- Vanegas, G., Quiñones, W., Carrasco-López, C., Concepción, J., Albericio, F. & Avilán, L. (2007). Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. **Parasitology Research**, **101**: 1511-1516.
- Vercruyse, J. & Gabriel, S. (2005). Immunity to schistosomiasis in animals: an update. **Parasite Immunology**, **27**: 289-295.
- Vercruyse, J., Sothgate, V.R. & Rollinson, D. (1985). The epidemiology of human and animal schistosomiasis in the Senegal River Basin. **Acta Tropica**, **42**: 249-259.
- Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E.A.L., Guimaraes, P.E.M., Ojopi, E.P.B., Paquola, A.C.M., Piazza, J.P., Nishiyama, M.Y., Kitajima, J.P., Adamson, R.E., Ashton, P.D., Bonaldo, M.F., Coulson, P.S., Dillon, G.P., Farias, L.P., Gregorio, S.P., Ho, P.L., Leite, R.A., Malaquias, L.C.C., Marques, R.C.P., Miyasato, P.A., Nascimento, A.L.T.O., Ohlweiler, F.P., Reis, E.M., Ribeiro, M.A., Sa, R.G., Stukart, G.C., Soares, M.B., Gargioni, C., Kawano, T., Rodrigues, V., Madeira, A.M.B.N., Wilson, R.A., Menck, C.F.M., Setubal, J.C., Leite, L.C.C. & Dias-Neto, E. (2003). Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature Genetics**, **35**: 148-157.
- Viana da Costa, A., Gaubert, S., Fontaine, J., Lafitte, S., Seixas, A., Sampaio Silva, M.L., Capron, A. & Grzych, J.M. (1998). Murine *Schistosoma bovis* infection: analysis of parasitic and immune parameters. **Parasite Immunology**, **20**: 143-453.
- Vichasri-Grams, S., Subpipattana, P., Sobhon, P., Viyanant, V. & Grams, R. (2006). An analysis of the calcium-binding protein 1 of *Fasciola gigantica* with a comparison to its homologs in the phylum Platyhelminthes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **146**: 10-23.
- Wang, K., Guo, Y., Li, K., Lu, Y., Zhang, Y., Sun, S., Yan, H. & Zhang, S. (2006). Molecular characterization and anticoagulant activity of a novel annexin derived from the *Taenia solium*. **Acta Tropica**, **99**: 165-172.
- Webbe, G. & Jordan, P. (1993). Control. In: Human Schistosomiasis. P. Jordan, G. Webbe and R.F. Sturrock, eds, pp.405-451. Wallingford: CAB International.
- Webster, B.L., Southgate, V.R. & Littlewood, D.T.J. (2006). A revision of the interrelationships of *Schistosoma* including the recently described *Schistosoma guineensis*. **International Journal for Parasitology**, **36**: 947-955.
- Winter, A., Yusof, A.M., Gao, E., Yan, H.-L. & Hofmann, A. (2006). Biochemical characterization of annexin B1 from *Cysticercus cellulosae*. **FEBS Journal**, **273**: 3238-3247.
- Wu, Y.P., Lenting, P.J., Tielens, A.G.M., De Groot, P.G. & Hellemond, J.J.V. (2007). Differential platelet adhesion to distinct life-cycle stages of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, **5**: 2146-2148.
- Yan, H.-l., Xue, G., Mei, Q., Ding, F.-x., Wang, Y.-z. & Sun, S.-h. (2008). Calcium-dependent proapoptotic effect of *Taenia solium* metacestodes annexin B1 on human eosinophils: A novel strategy to prevent host immune response. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, **40**: 2151-2163.
- Yang, J., Qiu, C., Xia, Y., Yao, L., Fu, Z., Yuan, C., Feng, X. & Lin, J. (2010). Molecular cloning and functional characterization of *Schistosoma japonicum* enolase which is highly expressed at the schistosomulum stage. **Parasitology Research**, **107**: 667-677.

- Zhang, Y., Bickle, Q.D. & Taylor, M.G. (2000). Cloning of *Schistosoma japonicum* 14-3-3 epsilon (Sj14-3-3ε), a new member of the 14-3-3 family of proteins from schistosomes. **International Journal for Parasitology**, **30**: 991-994.
- Zhou, Y., Zheng, H., Chen, Y., Zhang, L., Wang, K., Guo, J., Huang, Z., Zhang, B., Huang, W., Jin, K., Dou, T., Hasegawa, M., Wang, L., Zhang, Y., Zhou, J., Tao, L., Cao, Z., Li, Y., Vinar, T., Brejova, B., Brown, D., Li, M., Miller, D.J., Blair, D., Zhong, Y., Chen, Z., Liu, F., Hu, W., Wang, Z.Q., Zhang, Q.H., Song, H.D., Chen, S., Xu, X., Xu, B., Ju, C., Huang, Y., Brindley, P.J., McManus, D.P., Feng, Z., Han, Z.G., Lu, G., Ren, S., Wang, Y., Gu, W., Kang, H., Chen, J., Chen, X., Yan, J., Wang, B., Lv, X., Jin, L., Pu, S., Zhang, X., Zhang, W., Hu, Q., Zhu, G., Wang, J., Yu, J., Yang, H., Ning, Z., Beriman, M., Wei, C.L., Ruan, Y., Zhao, G. & Wang, S. (2009). The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. **Nature**, **460**: 345-351.