

**UNIVERSITAT DE  
VALÈNCIA**



**FACULTAT DE  
FARMÀCIA**

---

PROGRAMA DE DOCTORADO EN PARASITOLOGÍA HUMANA Y ANIMAL  
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I PARASITOLOGIA  
FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**TESIS DOCTORAL**

**ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES  
PARÁSITO-HOSPEDADOR EN EL MODELO *ECHINOSTOMA*  
*CAPRONI*-ROEDOR, CON ÉNFASIS EN LOS FACTORES QUE  
DETERMINAN EL CURSO DE LA INFECCIÓN**

por

**ALBA CORTÉS CARBONELL**

Director

**Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO**

Profesor Titular de Parasitología

Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia

Facultat de Farmàcia, Universitat de València

Valencia, 2015





---

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I PARASITOLOGIA  
Avda. Vicent Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot  
Tlf. 963 544 298 Fax: 963 544 769

El abajo firmante, Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO, Profesor Titular de Parasitología del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València, por la presente:

CERTIFICA: que Doña ALBA CORTÉS CARBONELL ha realizado íntegramente el trabajo experimental titulado "ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES PARÁSITO HOSPEDADOR EN EL MODELO *ECHINOSTOMA CAPRONI*-ROEDOR, CON ÉNFASIS EN LOS FACTORES QUE DETERMINAN EL CURSO DE LA INFECCIÓN." en el Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València, dentro del Programa de Doctorado en Parasitología Humana y Animal, con el fin de optar al grado de Doctora.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Valencia a 30 de abril de 2015.

Fdo. Dr. Rafael Toledo Navarro



**Aprender es como remar a contracorriente,  
en cuanto se deja, se retrocede.**

*Edward Benjamin Britten*

*(Compositor, director de orquesta y pianista)*



**CORTÉS CARBONELL, ALBA (2015).**- ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES PARÁSITO-HOSPEDADOR EN EL MODELO *ECHINOSTOMA CAPRONI*-ROEDOR, CON ÉNFASIS EN LOS FACTORES QUE DETERMINAN EL CURSO DE LA INFECCIÓN. TESIS DOCTORAL (DIR. Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO), FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, VALENCIA, 533 pp.

En la presente Tesis Doctoral se analizan diferentes parámetros implicados en las relaciones parásito-hospedador en helmintiasis intestinales mediante la utilización del modelo experimental *Echinostoma caproni*-roedor. Con esta finalidad se estudian diversos aspectos inmunológicos, además de las alteraciones intestinales inducidas por la infección en dos sistemas parásito-hospedador: *E. caproni*-ratón y *E. caproni*-rata. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el IFN- $\gamma$  y el óxido nítrico son mediadores fundamentales en el desarrollo de infecciones crónicas en ratón, induciendo disfunción mitocondrial en las células del epitelio intestinal e hiperplasia tisular. No obstante, se sugiere además una función importante de estos mediadores en la protección del hospedador frente al desarrollo de las formas más severas de la enfermedad. En ratas, en cambio, la renovación y regeneración tisular mediadas por IL-13 aparecen como los mecanismos más relevantes para la protección del hospedador. Otras alteraciones en la función de las células epiteliales intestinales y el aumento de la motilidad intestinal mediado por IL-17A pueden contribuir a la expulsión de los vermes. Respecto al papel de la mucosidad intestinal en la protección del hospedador cabe señalar que se han observado aumentos en la producción y secreción de moco asociados a la infección crónica en ratón. Sin embargo, determinadas proteínas liberadas en los productos de excreción/secreción del parásito, como las catepsinas, pueden ejercer un papel importante en la resistencia a este mecanismo efector. Por otra parte, la utilización del modelo de coinfección *Syphacia muris*-*E. caproni* en rata ha puesto de manifiesto que mecanismos como las alteraciones en la glicosilación de las mucinas intestinales y las respuestas locales de anticuerpos, los cuales no son efectivos en la protección frente a infecciones primarias, pueden tener un papel importante en el desarrollo de resistencia

en infecciones secundarias. En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen al conocimiento de los factores implicados en la generación de resistencia frente a las helmintiasis intestinales y de las consecuencias que estas infecciones pueden tener en el hospedador.

**Palabras clave:** *Trematoda, Echinostomatidae, Echinostoma caproni, Nematoda, Oxyuridae, Syphacia muris, helminto intestinal, rata, ratón, cepas de ratón, relaciones parásito-hospedador, expulsión, infección crónica, resistencia, Th17, IFN- $\gamma$ , iNOS, signos clínicos, mucina, lectina, glicosilación, catepsina, células epiteliales intestinales, proteínas, 2D-DIGE, disfunción mitocondrial, hiperplasia tisular, regeneración, apoptosis, 5-bromo-2-desoxiuridina, renovación epitelial, infección superpuesta, inmunidad protectora, anticuerpos, reactividad cruzada, proteínas inmunogénicas, proteoma.*



**CORTÉS CARBONELL, ALBA (2015).**- ANALYSIS OF HOST-PARASITE INTERACTIONS IN THE *ECHINOSTOMA CAPRONI*-RODENT MODEL, WITH EMPHASIS ON THE FACTORS THAT DETERMINE THE COURSE OF THE INFECTION. PhD THESIS (DIR. Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO), FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, VALENCIA, 533 pp.

In the present PhD Thesis, different parameters involved in the host-parasite relationships in intestinal helminth infections are analyzed using the *Echinostoma caproni*-rodent model. For this purpose, several immunological aspects and the infection-induced intestinal alterations were investigated in two host-parasite systems: *E. caproni*-mouse and *E. caproni*-rat. The results show that IFN- $\gamma$  and nitric oxide are key mediators for the development of chronic infections in mice, which induce mitochondrial dysfunction in the intestinal epithelial cells and tissue hyperplasia. Nevertheless, an additional important role of these mediators is suggested in the protection of the host against the development of the most severe forms of the disease. In rats, however, the tissue renewal and regeneration mediated by IL-13 appear as the main mechanisms involved in host protection. Other alterations in the function of the intestinal epithelial cells and an increase in the intestinal motility mediated by IL-17A may contribute to the expulsion of worms in this host. It is worth noting that, as regards the role of the intestinal mucus in the host protection, increases in the mucus production and secretion were found to be associated with the establishment of chronic infections in mice. However, certain proteins released in the excretory/secretory products, such as cathepsins, may play an important role in the parasite resistance against this effector mechanism. Moreover, the study of the co-infection model *Syphacia muris*-*E. caproni* in rat has shown that some mechanisms such as the changes in the glycosylation status of intestinal mucins and the local antibody responses, which are not effective in the host protection in primary infections, may play an important role in the development of resistance against secondary infections. Overall, the results obtained in the present study contribute to the understanding of those factors involved in the generation of resistance against intestinal helminthiasis and the consequences that these infections may have in the host.

**Key words:** *Trematoda, Echinostomatidae, Echinostoma caproni, Nematoda, Oxyuridae, Syphacia muris, intestinal helminth, rat, mouse, mouse strain, host-parasite relationships, expulsion, chronic infection, resistance, Th17, IFN- $\gamma$ , iNOS, clinical signs, mucin, lectin, glycosylation, cathepsin, intestinal epithelial cells, proteins, 2D-DIGE, mitochondrial dysfunction, tissue hyperplasia, regeneration, apoptosis, 5-bromo-2-deoxyuridine, epithelial renewal, superimposed infection, protective immunity, antibodies, cross-reactivity, immunogenic proteins, proteome.*

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>31</b>
<b>ABREVIATURAS. ABBREVIATIONS</b>	<b>39</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>47</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO I: ESTADO ACTUAL DE CONOCIMIENTOS</b>	<b>61</b>
<b>1.1. ECHINOSTOMA CAPRONI</b>	<b>63</b>
1.1.1. CICLO BIOLÓGICO	65
1.1.2. <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> EN EL HOSPEDADOR DEFINITIVO	72
1.1.2.1. El Modelo <i>Echinostoma caproni</i> -Roedor	72
1.1.2.2. Especificidad, Establecimiento y Desarrollo en el Hospedador Definitivo	74
1.1.2.3. Patología de la Infección	76
1.1.2.4. Aspectos Inmunológicos	79
a) Respuestas de Anticuerpos	79
b) Respuestas de Citoquinas	82
c) Respuesta Celular	83
<b>1.2. SYPHACIA MURIS</b>	<b>84</b>
1.2.1. CICLO BIOLÓGICO	85
1.2.2. INFECCIÓN EN ANIMALES DE LABORATORIO	88
1.2.2.1. Efectos de la Infección sobre Investigaciones no Relacionadas	89
1.2.2.2. Tratamiento y Estrategias de Erradicación	91
<b>1.3. EXPULSIÓN DE HELMINTOS INTESTINALES</b>	<b>95</b>
1.3.1. RESPUESTA INMUNITARIA INTESTINAL: INMUNIDAD FRENTE A HELMINTOS	96
1.3.1.1. Respuestas Th2 frente a Helmintos Intestinales	97

<b>1.3.1.2. Participación de Otras Poblaciones de Linfocitos T CD4+</b>	<b>100</b>
a) <i>Respuestas Th17</i>	101
b) <i>Respuestas Treg</i>	102
<b>1.3.2. MECANISMOS EFECTORES</b>	<b>104</b>
<b>1.3.2.1. Efectos Incapacitantes</b>	<b>105</b>
<b>1.3.2.2. Efectos Degradantes</b>	<b>107</b>
<b>1.3.2.3. Efectos de Desplazamiento</b>	<b>111</b>
a) <i>Células Mucosecretoras y Mucosidad Intestinal</i>	113
b) <i>Renovación del Epitelio Intestinal</i>	118
c) <i>Contractilidad Intestinal</i>	120
d) <i>Otros Mecanismos de Desplazamiento</i>	122
<b>1.4. COINFECCIONES PARASITARIAS</b>	<b>125</b>
1.4.1. TIPOS DE INTERACCIONES	125
1.4.2. COINFECCIONES EXPERIMENTALES CON ECHINOSTOMAS	127
1.4.2.1. Coinfecciones con Echinostomas Heterólogos	127
1.4.2.2. Coinfecciones con Otros Trematodos	129
1.4.2.3. Coinfecciones con Cestodos	131
1.4.2.4. Coinfecciones con Nematodos	131
<b>CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>133</b>
<b>2.1. MATERIAL PARASITOLÓGICO Y DE HOSPEDADORES DEFINITIVOS</b>	<b>135</b>
2.1.1. PARÁSITOS Y MATERIAL PARASITOLÓGICO	135
<b>2.1.1.1. <i>Echinostoma caproni</i></b>	<b>135</b>
a) <i>Mantenimiento del Ciclo Biológico de Echinostoma caproni en el Laboratorio</i>	135
b) <i>Antígenos Completos de Individuos Adultos de Echinostoma caproni</i>	139
c) <i>Antígenos de Excreción/Secreción de Individuos Adultos de Echinostoma caproni</i>	139
d) <i>Cortes Histológicos de Individuos Adultos de Echinostoma caproni</i>	139

<b>2.1.1.2. <i>Syphacia muris</i></b>	<b>140</b>
a) <i>Identificación Específica</i>	140
b) <i>Mantenimiento del Ciclo Biológico de Syphacia muris en el Laboratorio</i>	141
c) <i>Antígenos Completos de Individuos Adultos de Syphacia muris</i>	143
<b>2.1.2. HOSPEDADORES DEFINITIVOS Y MATERIAL DE HOSPEDADORES</b>	<b>143</b>
<b>2.1.2.1. Mantenimiento de Hospedadores Definitivos</b>	<b>144</b>
a) <i>Condiciones Especiales de Mantenimiento y Manipulación</i>	145
b) <i>Sacrificio de los Animales</i>	145
<b>2.1.2.2. Material de Hospedadores Definitivos</b>	<b>145</b>
a) <i>RNA Total de Tejidos</i>	146
b) <i>Muestras de Suero</i>	146
c) <i>Lavados Intestinales</i>	146
d) <i>Cortes Histológicos de Intestino</i>	146
e) <i>Extracto Proteico de Células Epiteliales Intestinales</i>	147
<b>2.2. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA</b>	<b>147</b>
2.2.1. <i>EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL</i>	147
2.2.2. <i>OBTENCIÓN DE cDNA: RETROTRANSCRIPCIÓN</i>	148
2.2.3. <i>PCR A TIEMPO REAL: CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA</i>	148
<b>2.3. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS</b>	<b>151</b>
2.3.1. <i>PREPARACIÓN DE LOS ANTÍGENOS</i>	151
2.3.1.1. <i>Antígenos Completos de Individuos Adultos de Echinostoma caproni</i>	152
2.3.1.2. <i>Antígenos de Excreción/Secreción de Individuos Adultos de Echinostoma caproni</i>	152
2.3.1.3. <i>Antígenos Completos de Individuos Adultos de Syphacia muris</i>	152
2.3.2. <i>OBTENCIÓN DE SUEROS Y LAVADOS INTESTINALES</i>	153
2.3.2.1. <i>Muestras de Suero</i>	153
2.3.2.2. <i>Lavados Intestinales</i>	154

2.3.3. ELISA INDIRECTO _____	154
2.3.3.1. Protocolo General _____	155
2.3.3.2. Puesta a Punto de la Técnica _____	155
<b>2.4. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS HISTOPATOLÓGICOS _____</b>	<b>156</b>
2.4.1. OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS _____	156
2.4.2. TINCIONES HISTOLÓGICAS _____	156
2.4.2.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina _____	157
2.4.2.2. Tinción con Giemsa _____	157
2.4.2.3. Tinción con Azul de Toluidina _____	158
2.4.2.4. Tinción con Azul Alcían _____	158
2.4.3. RECUENTO CELULAR _____	158
2.4.4. MEDIDA DE LA LONGITUD DE LAS CRIPTAS Y VELLOSIDADES INTESTINALES _____	159
<b>2.5. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN Y GLICOSILACIÓN DE MUCINAS _____</b>	<b>159</b>
2.5.1. HISTOQUÍMICA CON LECTINAS _____	160
2.5.2. MICROSCOPIA CONFOCAL Y EVALUACIÓN DEL MARCAJE _____	162
2.5.3. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE MUCINAS _____	162
<b>2.6. MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE CATEPSINAS EN LA FASE ADULTA DE ECHINOSTOMA CAPRONI _____</b>	<b>164</b>
2.6.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS _____	164
2.6.1.1. Obtención de los Antígenos de Excreción/Secreción _____	164
a) Liofilización _____	165
b) Reconstitución de los Antígenos _____	165
2.6.1.2. Obtención de Cortés Histológicos del Parásito _____	166
2.6.2. ENSAYO FLUOROMÉTRICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA _____	166

2.6.3. <i>BLOTTING</i> CON DCG-04 _____	167
2.6.4. <i>WESTERN BLOT</i> FRENTE A CATEPSINA L _____	169
2.6.5. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA LOCALIZACIÓN DE CATEPSINA L _____	169
<b>2.7. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DEL RACAMBIO DEL EPITELIO INTESTINAL</b> _____	<b>170</b>
2.7.1. MARCAJE CON 5-BROMO-2-DESOXIURIDINA (BrdU) _____	171
2.7.1.1. Diseño Experimental y Protocolo de Administración de BrdU _____	171
2.7.1.2. Inmunohistoquímica para la Detección de Células Marcadas con BrdU _____	172
2.7.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y RECUENTO CELULAR _____	173
<b>2.8. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS</b> _____	<b>174</b>
2.8.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS _____	174
2.8.1.1. Aislamiento de las Células Epiteliales Intestinales _____	174
2.8.1.2. Extracción de la Fracción Proteica _____	175
2.8.2. CUANTIFICACIÓN Y MARCAJE DE PROTEÍNAS _____	176
2.8.2.1. Cuantificación de Proteínas _____	176
2.8.2.2. Precipitación de Proteínas con <i>2-D Clean-Up Kit</i> _____	177
2.8.2.3. Marcaje de Proteínas _____	177
2.8.3. ELECTROFORESIS DIFERENCIAL EN GELES BIDIMENSIONALES (2D-DIGE) _____	178
2.8.3.1. Diseño Experimental _____	178
2.8.3.2. Electroforesis Bidimensional en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) para 2D-DIGE _____	181
2.8.4. ANÁLISIS DE IMAGEN _____	181
2.8.5. TINCIÓN DE LOS GELES CON PLATA _____	182
<b>2.9. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA GLICOSILACIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS</b> _____	<b>184</b>

2.9.1. CUANTIFICACIÓN Y PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA) _____	184
2.9.2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) ____	185
2.9.3. ELECTROTRANSFERENCIA Y <i>BLOTTING</i> CON LECTINAS _____	186
2.9.4. TINCIÓN DE LOS GELES CON <i>SYPRO® RUBY</i> _____	188
<b>2.10. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS _____</b>	<b>189</b>
2.10.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DEL HOSPEDADOR _____	189
<b>2.10.1.1. Preparación de las Muestras _____</b>	<b>190</b>
<b>2.10.1.2. Espectrometría de Masas Seguida de Espectrometría de Masas en Tándem (MS-MS/MS) _____</b>	<b>190</b>
<b>2.10.1.3. Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS) _____</b>	<b>191</b>
2.10.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA EL ESTUDIO DEL PROTEOMA DE LA FASE ADULTA DE <i>SYPHACIA MURIS</i> _____	192
<b>2.10.2.1. Preparación de las Muestras _____</b>	<b>192</b>
<i>a) Precipitación de Proteínas con Cloroformo/Metanol _____</i>	<i>192</i>
<i>b) Digestión Triptica _____</i>	<i>193</i>
<i>c) Preparación de la Muestra Fraccionada _____</i>	<i>193</i>
<i>d) Preparación de la Muestra No Fraccionada _____</i>	<i>193</i>
<b>2.10.2.2. Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS) _____</b>	<b>194</b>
2.10.3. BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS _____	195
<b>2.10.3.1. Identificación de Proteínas del Hospedador _____</b>	<b>195</b>
<b>2.10.3.2. Estudio del Proteoma de la Fase Adulta de <i>Syphacia muris</i> _____</b>	<b>195</b>
<b>2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS _____</b>	<b>196</b>
2.11.1. TEST <i>T</i> DE STUDENT _____	197



2.11.2. ANOVA DE DOS FACTORES _____	198
2.11.3. ANÁLISIS <i>POST-HOC</i> _____	199
2.11.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS DE 2D-DIGE _____	199
2.11.4.1. Análisis de Componentes Principales (PCA) _____	200
2.11.4.2. Análisis de Patrones por Agrupamiento Jerárquico _____	203
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS _____</b>	<b>205</b>
<b>3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA TH17 FRENTE A ECHINOSTOMA CAPRONI EN RATÓN Y RATA INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE _____</b>	<b>207</b>
3.1.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL _____	207
3.1.2. CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS IMPLICADAS EN LA RESPUESTA TH17 _____	208
3.1.2.1. Expresión Relativa de IL-17A _____	209
3.1.2.2. Expresión Relativa de TGF- $\beta$ _____	209
3.1.2.3. Expresión Relativa de IL-23 _____	212
<b>3.2. ESTUDIO DEL PAPEL DEL IFN-<math>\gamma</math> EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON ECHINOSTOMA CAPRONI EN RATÓN _____</b>	<b>212</b>
3.2.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL _____	214
3.2.2. SUPERVIVENCIA DEL HOSPEDADOR _____	215
3.2.3. PORCENTAJES DE INFECCIÓN _____	215
3.2.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PATOLOGÍA INTESTINAL Y OTROS SIGNOS CLÍNICOS _____	217
3.2.4.1. Evolución del Peso Corporal a lo Largo de la Infección _____	217
3.2.4.2. Signos Clínicos y Observaciones Patológicas Macroscópicas _____	219
3.2.4.3. Alteraciones Histopatológicas _____	221
3.2.4.4. Expresión Génica de iNOS en Tejido Intestinal _____	221
3.2.4.5. Expresión Génica de Mucinas a Nivel Intestinal _____	224

3.2.5. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS _____	228
<b>3.2.5.1. Respuesta Sistémica de Anticuerpos</b> _____	<b>228</b>
<b>3.2.5.2. Cinética de la Expresión Génica de Citoquinas</b> _____	<b>236</b>
a) <i>Expresión Relativa de Citoquinas en Bazo</i> _____	237
b) <i>Expresión Relativa de Citoquinas en Nódulos Linfáticos Mesentéricos</i> _____	237
c) <i>Expresión Relativa de Citoquinas en Placas de Peyer</i> _____	241
d) <i>Expresión Relativa de Citoquinas en Tejido Intestinal</i> _____	245
<b>3.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y GLICOSILACIÓN DE MUCINAS A NIVEL</b>	
<b>INTESTINAL EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON ECHINOSTOMA</b>	
<b>CAPRONI</b> _____	<b>248</b>
3.3.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL _____	249
3.3.2. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE MUCINAS EN EL ÍLEON DE RATÓN Y RATA	
INFECTADOS CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> _____	250
<b>3.3.2.1. Expresión Relativa de Mucinas Propias del Epitelio Intestinal</b> _____	<b>250</b>
<b>3.3.2.2. Expresión Relativa de Muc5ac</b> _____	<b>252</b>
3.3.3. PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE MUCINAS SOLUBLES EN EL ÍLEON DE RATÓN Y RATA	
INFECTADOS CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> _____	254
3.3.4. PATRONES DE GLICOSILACIÓN DE MUCINAS EN EL ÍLEON DE RATÓN Y RATA	
INFECTADOS CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> _____	257
<b>3.3.4.1. Marcaje con WGA</b> _____	<b>258</b>
<b>3.3.4.2. Marcaje con SNA</b> _____	<b>260</b>
<b>3.3.4.3. Marcaje con DBA</b> _____	<b>261</b>
<b>3.3.4.4. Marcaje con UEA-I</b> _____	<b>262</b>
<b>3.3.4.5. Marcaje con PNA</b> _____	<b>263</b>
<b>3.4. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE CATEPSINAS EN LA FASE ADULTA DE</b>	
<b>ECHINOSTOMA CAPRONI</b> _____	<b>264</b>

3.4.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL _____	264
3.4.2. ENSAYO FLUORIMÉTRICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA _____	265
3.4.3. UNIÓN DE DCG-04 AL SITIO ACTIVO DE CISTEÍN-PEPTIDASAS _____	267
3.4.4. WESTERN BLOT ANTI-CATEPSINA L _____	267
3.4.5. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA LOCALIZACIÓN DE CATEPSINA L _____	268
<b>3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y GLICOSILACIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DEL EPITELIO INTESTINAL INDUCIDAS POR LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON ECHINOSTOMA CAPRONI _____</b>	<b>269</b>
3.5.1. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS _____	271
3.5.1.1. Fundamento Experimental _____	271
3.5.1.2. Expresión Diferencial de Proteínas en el Intestino de Ratones Infeccionados con <i>Echinostoma caproni</i> _____	271
a) Resultado de los Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de Patrones por Agrupamiento Jerárquico _____	273
b) Identificación por Espectrometría de Masas de las Proteínas Diferencialmente Expresadas _____	278
3.5.1.3. Expresión Diferencial de Proteínas en el Intestino de Ratas Infeccionadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	286
a) Resultado de los Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de Patrones por Agrupamiento Jerárquico _____	287
b) Identificación por Espectrometría de Masas de las Proteínas Diferencialmente Expresadas _____	290
3.5.2. GLICOSILACIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS _____	297
3.5.2.1. Fundamento Experimental _____	297
3.5.2.2. Glicosilación Diferencial en el Intestino de Ratas Infeccionadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	299
<b>3.6. ESTUDIO DE LA RENOVACIÓN DEL EPITELIO INTESTINAL EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON ECHINOSTOMA CAPRONI _____</b>	<b>302</b>
3.6.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL _____	303

3.6.2. RENOVACIÓN DEL EPITELIO INTESTINAL EN RATÓN Y RATA INFECTADOS CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i>	303
<b>3.6.2.1. Niveles de Proliferación de las Células Epiteliales Intestinales y Distribución Posicional de las Células Marcadas con BrdU</b>	<b>304</b>
<b>3.6.2.2. Tasa de Renovación del Epitelio Intestinal en el Íleon de Ratón y Rata Infectados con <i>Echinostoma caproni</i></b>	<b>310</b>
3.6.3. LONGITUD DE LAS CRIPTAS Y VELLOSIDADES INTESTINALES EN RATÓN Y RATA INFECTADOS CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i>	313
<b>3.7. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN EXPERIMENTAL ENTRE ECHINOSTOMA CAPRONI Y SYPHACIA MURIS EN RATA</b>	<b>316</b>
3.7.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL	317
3.7.2. TASAS DE INFECCIÓN CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i> EN RATAS INFECTADAS CON <i>SYPHACIA MURIS</i>	320
3.7.3. PATOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON <i>SYPHACIA MURIS</i>	321
<b>3.7.3.1. Patología Intestinal</b>	<b>322</b>
<b>3.7.3.2. Cinética de Anticuerpos en Suero y Mucosa Intestinal de Ratas durante las Primeras Semanas de Infección con <i>Syphacia muris</i></b>	<b>322</b>
<i>a) Respuesta de Anticuerpos en Suero</i>	323
<i>b) Respuesta de Anticuerpos en Mucosa Intestinal</i>	325
<i>c) Reactividad Cruzada Frente a los Antígenos de <i>Echinostoma caproni</i></i>	328
<b>3.7.3.3. Cinética de la Expresión Génica de Citoquinas durante las Primeras Semanas de Infección con <i>Syphacia muris</i></b>	<b>331</b>
<i>a) Expresión Relativa de Citoquinas en Bazo</i>	332
<i>b) Expresión Relativa de Citoquinas en Nódulos Linfáticos Mesentéricos</i>	332
<i>c) Expresión Relativa de Citoquinas en Placas de Peyer</i>	335
<i>d) Expresión Relativa de Citoquinas en Tejido Intestinal</i>	337

3.7.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MUCINAS EN EL ÍLEON DE RATAS DURANTE LAS PRIMERAS SEMANAS DE INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON <i>SYPHACIA MURIS</i>	341
<b>3.7.4.1. PERFIL DE EXPRESIÓN RELATIVA DE MUCINAS</b>	<b>341</b>
<b>3.7.4.2. PATRÓN DE GLICOSILACIÓN DE MUCINAS</b>	<b>343</b>
a) Marcaje con UEA-I	344
b) Marcaje con WGA	345
c) Marcaje con DBA	347
d) Marcaje con SNA	349
e) Marcaje con PNA	349
<b>3.8. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA FASE ADULTA DE <i>SYPHACIA MURIS</i> Y COMPARACIÓN CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i></b>	<b>350</b>
3.8.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL	350
3.8.2. PROTEOMA DEL ESTADIO ADULTO DE <i>SYPHACIA MURIS</i>	351
3.8.3. COMPARACIÓN CON <i>ECHINOSTOMA CAPRONI</i>	374
3.8.3.1. Comparación con el Producto de Excreción/Secreción de <i>Echinostoma caproni</i>	375
3.8.3.2. Comparación con el Transcriptoma de <i>Echinostoma caproni</i>	380
<b>CHAPTER IV: DISCUSSION</b>	<b>383</b>
<b>CONCLUSIONS. CONCLUSIONES</b>	<b>445</b>
<b>REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS</b>	<b>553</b>



<b>FIGURAS</b>	_____
<b>Capítulo I</b>	_____
<b>Figura 1.1.-</b> Ciclo biológico de <i>Echinostoma</i> spp.	_____ 66
<b>Figura 1.2.-</b> Ciclo biológico de <i>Syphacia muris</i>	_____ 86
<b>Capítulo II</b>	_____
<b>Figura 2.1.-</b> Material parasitológico de <i>Syphacia muris</i>	_____ 142
<b>Capítulo III</b>	_____
<b>Figura 3.1.-</b> Expresión de IL-17A en ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i>	_____ 210
<b>Figura 3.2.-</b> Expresión de TGF- $\beta$ en ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i>	_____ 211
<b>Figura 3.3.-</b> Expresión de IL-23 en ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i>	_____ 213
<b>Figura 3.4.-</b> Supervivencia del hospedador en la infección con <i>Echinostoma caproni</i>	216
<b>Figura 3.5.-</b> Tasas de infección con <i>Echinostoma caproni</i> en diferentes cepas de ratón	_____ 216
<b>Figura 3.6.-</b> Evolución del peso corporal en diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i>	_____ 218
<b>Figura 3.7.-</b> Signos clínicos y observaciones patológicas macroscópicas de la infección con <i>Echinostoma caproni</i> en diferentes cepas de ratón	_____ 220
<b>Figura 3.8.-</b> Histología del intestino delgado de ratones control e infectados con <i>Echinostoma caproni</i>	_____ 222
<b>Figura 3.9.-</b> Longitud de las vellosidades intestinales y criptas de Lieberkühn en diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i>	_____ 223

<b>Figura 3.10.-</b> Población de mastocitos y células mucosecretoras en el íleon de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	223
<b>Figura 3.11.-</b> Expresión intestinal de iNOS en diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	224
<b>Figura 3.12.-</b> Expresión de mucinas en el íleon de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	226
<b>Figura 3.13.-</b> Cinética de inmunoglobulina M en el suero de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	231
<b>Figura 3.14.-</b> Cinética de inmunoglobulina A en el suero de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	232
<b>Figura 3.15.-</b> Cinética de inmunoglobulina G total en el suero de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	233
<b>Figura 3.16.-</b> Cinética de inmunoglobulina G1 en el suero de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	234
<b>Figura 3.17.-</b> Cinética de inmunoglobulina G2a en el suero de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	235
<b>Figura 3.18.-</b> Cinética de inmunoglobulina G3 en el suero de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	236
<b>Figura 3.19.-</b> Citoquinas con expresión diferencial en el bazo de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	238
<b>Figura 3.20.-</b> Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en el bazo de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	239
<b>Figura 3.21.-</b> Citoquinas con expresión diferencial en los nódulos linfáticos mesentéricos de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	240
<b>Figura 3.22.-</b> Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en los nódulos linfáticos mesentéricos de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> ____	242



<b>Figura 3.23.-</b> Citoquinas con expresión diferencial en las placas de Peyer de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	243
<b>Figura 3.24.-</b> Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en las placas de Peyer de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	244
<b>Figura 3.25.-</b> Citoquinas con expresión diferencial en el intestino de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	246
<b>Figura 3.26.-</b> Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en el intestino de diferentes cepas de ratón infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	247
<b>Figura 3.27.-</b> Expresión de mucinas en el íleon de ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i> _____	251
<b>Figura 3.28.-</b> Expresión de Muc5ac en el íleon de ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i> _____	253
<b>Figura 3.29.-</b> Doble inmunofluorescencia con DBA y anti-Muc2 en el íleon de ratones infectados con <i>Echinostoma caproni</i> _____	255
<b>Figura 3.30.-</b> Doble inmunofluorescencia con DBA y anti-Muc2 en el íleon de ratas infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	257
<b>Figura 3.31.-</b> Marcaje con WGA en el íleon de ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i> _____	260
<b>Figura 3.32.-</b> Marcaje con SNA en el íleon de ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i> _____	261
<b>Figura 3.33.-</b> Marcaje con DBA en el íleon de ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i> _____	262
<b>Figura 3.34.-</b> Marcaje con UEA-I en el íleon de ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i> _____	263
<b>Figura 3.35.-</b> Ensayo fluorimétrico de la actividad catepsina _____	266
<b>Figura 3.36.-</b> <i>Blotting</i> con DCG-04 _____	268

<b>Figura 3.37.-</b> Western blot anti-catepsina L _____	269
<b>Figura 3.38.-</b> Inmunohistoquímica anti-catepsina L sobre adultos de <i>Echinostoma caproni</i> _____	270
<b>Figura 3.39.-</b> Criterios de selección para la identificación de los <i>spots</i> diferencialmente expresados en el íleon de ratones control e infectados con <i>Echinostoma caproni</i> __	273
<b>Figura 3.40.-</b> Análisis de componentes principales (PCA) de las proteínas del íleon de ratones control e infectados con <i>Echinostoma caproni</i> resueltas mediante 2D-DIGE 275	
<b>Figura 3.41.-</b> Agrupamiento jerárquico de las proteínas del íleon de ratones control e infectados con <i>Echinostoma caproni</i> resueltas mediante 2D-DIGE _____	276
<b>Figura 3.42.-</b> Análisis de componentes principales (PCA) de las proteínas diferencialmente expresadas en el íleon de ratones control e infectados con <i>Echinostoma caproni</i> _____	278
<b>Figura 3.43.-</b> Agrupamiento jerárquico de las proteínas diferencialmente expresadas en el íleon de ratones control e infectados con <i>Echinostoma caproni</i> _____	279
<b>Figura 3.44.-</b> Imagen representativa del gel 2D-DIGE de las proteínas aisladas del íleon de ratones control e infectados con <i>Echinostoma caproni</i> _____	280
<b>Figura 3.45.-</b> Criterios de selección para la identificación de los <i>spots</i> diferencialmente expresados en el íleon de ratas control e infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> ____	288
<b>Figura 3.46.-</b> Análisis de componentes principales (PCA) de las proteínas del íleon de ratas control e infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> resueltas mediante 2D-DIGE __	289
<b>Figura 3.47.-</b> Análisis de componentes principales (PCA) de las proteínas diferencialmente expresadas en el íleon de ratas control e infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	290
<b>Figura 3.48.-</b> Agrupamiento jerárquico de las proteínas diferencialmente expresadas en el íleon de ratas control e infectadas con <i>Echinostoma caproni</i> _____	291

<b>Figura 3.49.-</b> Imagen representativa del gel 2D-DIGE de las proteínas aisladas del íleon de ratas control e infectadas con <i>Echinostoma caproni</i>	292
<b>Figura 3.50.-</b> Glicosilación diferencial de proteínas del íleon de rata inducida por la infección con <i>Echinostoma caproni</i> detectada con la lectina DSA	300
<b>Figura 3.51.-</b> Glicosilación diferencial de proteínas del íleon de rata inducida por la infección con <i>Echinostoma caproni</i> detectada con la lectina MAA	301
<b>Figura 3.52.-</b> Glicosilación diferencial de proteínas del íleon de rata inducida por la infección con <i>Echinostoma caproni</i> detectada con la lectina SNA	301
<b>Figura 3.53.-</b> Glicosilación diferencial de proteínas del íleon de rata inducida por la infección con <i>Echinostoma caproni</i> detectada con la lectina PNA	302
<b>Figura 3.54.-</b> Inmunohistoquímica anti-5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) en el íleon de ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i>	305
<b>Figura 3.55.-</b> Niveles de proliferación de las células epiteliales intestinales en el íleon de ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i>	306
<b>Figura 3.56.-</b> Distribución posicional de las células marcadas con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU <sup>+</sup> ) en el íleon de ratones infectados con <i>Echinostoma caproni</i>	308
<b>Figura 3.57.-</b> Distribución posicional de las células marcadas con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU <sup>+</sup> ) en el íleon de ratas infectadas con <i>Echinostoma caproni</i>	309
<b>Figura 3.58.-</b> Velocidad de desplazamiento de las células epiteliales intestinales en el íleon de ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i>	311
<b>Figura 3.59.-</b> Longitud de las vellosidades intestinales y las criptas de Lieberkühn en el íleon de ratones y ratas infectados con <i>Echinostoma caproni</i>	314
<b>Figura 3.60.-</b> Protocolo para las infecciones individuales y superpuestas con <i>Echinostoma caproni</i> y <i>Syphacia muris</i>	319
<b>Figura 3.61.-</b> Recuento de varias poblaciones celulares en el íleon de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i>	323

<b>Figura 3.62.-</b> Respuesta sistémica de anticuerpos en ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i>	325
<b>Figura 3.63.-</b> Respuesta local de anticuerpos en ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i>	327
<b>Figura 3.64.-</b> Reactividad del suero de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i> frente a los antígenos de <i>Echinostoma caproni</i>	329
<b>Figura 3.65.-</b> Reactividad de los lavados intestinales de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i> frente a los antígenos de <i>Echinostoma caproni</i>	330
<b>Figura 3.66.-</b> Citoquinas con expresión diferencial en el bazo de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i>	333
<b>Figura 3.67.-</b> Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en el bazo de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i>	334
<b>Figura 3.68.-</b> Citoquinas con expresión diferencial en los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i>	335
<b>Figura 3.69.-</b> Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i>	336
<b>Figura 3.70.-</b> Citoquinas con expresión diferencial en las placas de Peyer de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i>	337
<b>Figura 3.71.-</b> Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en las placas de Peyer de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i>	338
<b>Figura 3.72.-</b> Citoquinas con expresión diferencial en el íleon de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i>	339
<b>Figura 3.73.-</b> Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en el íleon de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i>	340
<b>Figura 3.74.-</b> Expresión de mucinas en el íleon de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i>	342

**Figura 3.75.-** Marcaje con UEA-I en el íleon de ratas infectadas con *Syphacia muris* \_346

**Figura 3.76.-** Marcaje con WGA en el íleon de ratas infectadas con *Syphacia muris* \_347

**Figura 3.77.-** Marcaje con DBA en el íleon de ratas infectadas con *Syphacia muris* \_\_348

**Figura 3.78.-** Marcaje con SNA en el íleon de ratas infectadas con *Syphacia muris* \_\_349

**Figura 3.79.-** Clasificación funcional de las proteínas identificadas en el antígeno completo de *Syphacia muris* \_\_\_\_\_373

**TABLAS** \_\_\_\_\_

**Capítulo II** \_\_\_\_\_

**Tabla 2.1.-** Detalles de identidad de los ensayos *TaqMan*<sup>®</sup> \_\_\_\_\_150

**Tabla 2.2.-** Lectinas utilizadas en histoquímica \_\_\_\_\_161

**Tabla 2.3.-** Diseño de los experimentos 2D-DIGE \_\_\_\_\_180

**Tabla 2.4.-** Lectinas utilizadas en *blotting* \_\_\_\_\_187

**Capítulo III** \_\_\_\_\_

**Tabla 3.1.-** Diluciones utilizadas en ELISA indirecto: suero de ratón frente a antígeno de *Echinostoma caproni* \_\_\_\_\_229

**Tabla 3.2.-** Lectinas utilizadas en histoquímica: Concentración de trabajo (I) \_\_\_\_\_258

**Tabla 3.3.-** Marcaje en histoquímica con lectinas (I) \_\_\_\_\_259

**Tabla 3.4.-** Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el íleon de ratones infectados con *Echinostoma caproni* \_\_\_\_\_281

**Tabla 3.5.-** Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el íleon de ratas infectadas con *Echinostoma caproni* \_\_\_\_\_293

**Tabla 3.6.-** Identificación de proteínas diferencialmente glicosiladas en el íleon de ratas infectadas con *Echinostoma caproni* \_\_\_\_\_298

**Tabla 3.7.-** Resultados de coinfección con *Syphacia muris* y *Echinostoma caproni* \_\_321

<b>Tabla 3.8.-</b> Diluciones utilizadas en ELISA indirecto: suero/mucosa de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i> frente a antígenos de <i>Syphacia muris</i> _____	324
<b>Tabla 3.9.-</b> Diluciones utilizadas en ELISA indirecto: suero/mucosa de ratas infectadas con <i>Syphacia muris</i> frente a antígenos de <i>Echinostoma caproni</i> _____	324
<b>Tabla 3.10.-</b> Lectinas utilizadas en histoquímica: Concentración de trabajo (II) ____	344
<b>Tabla 3.11.-</b> Marcaje en histoquímica con lectinas (II) _____	345
<b>Tabla 3.12.-</b> Proteínas del antígeno completo de adultos de <i>Syphacia muris</i> identificadas con <i>MASCOT</i> _____	352
<b>Tabla 3.13.-</b> Proteínas del antígeno completo de adultos de <i>Syphacia muris</i> identificadas con <i>ProteinPilot™</i> _____	367
<b>Tabla 3.14.-</b> Proteínas del antígeno completo de <i>Syphacia muris</i> con péptido señal	377
<b>Tabla 3.15.-</b> Homología de secuencia con <i>BLASTp 2 sequences</i> _____	379

# Agradecimientos

---





Hay un proverbio chino que dice: *Cuando bebas agua, recuerda la fuente*. En cada una de estas páginas ha sido difícil no recordar a tantas personas que de una u otra manera han formado parte de este proyecto, por lo que me gustaría aprovechar estas líneas para mostrar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que de manera directa o indirecta me han prestado su apoyo para la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Rafael Toledo Navarro, Profesor Titular de Parasitología del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València, por haber aceptado la dirección de esta Tesis y darme la oportunidad de participar en este proyecto con el que he podido crecer, no solo a nivel científico, sino también humano. Gracias por haberme tenido en cuenta, por haber contado conmigo y especialmente por todo lo que he aprendido y que me has enseñado. Gracias también por el trabajo y el esfuerzo dedicados, sobre todo en los últimos meses, a la elaboración de esta memoria.

Me gustaría agradecer también al Dr. José Guillermo Esteban Sanchís, Profesor Titular de Parasitología del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València, por haber depositado en mí su confianza. Gracias también por haber despertado en mí el *gusanillo* de la parasitología al compartir tus amplios conocimientos tanto dentro como fuera del aula.

A la Dra. Carla Muñoz Antolí-Candela, Profesora Titular de Parasitología del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València, le agradezco la valiosa ayuda que me ha brindado desde el principio y, sobre todo, en la última parte de la presente Tesis Doctoral. Gracias también por el apoyo que me has mostrado siempre, por tu entusiasmo y tu enorme capacidad de trabajo.

Un recuerdo especial al Dr. Javier Sotillo Gallego, de la mano de quien empecé en este laboratorio y con el que compartí muchas horas de trabajo. Gracias por tu paciencia y tu buen humor.

Me gustaría expresar también mi agradecimiento al Dr. Petr Horák y al Dr. Libor Mikeš, Profesores del Departamento de Parasitología de la Univerzita Karlova v Praze (Praga) por aceptar mi estancia en su Departamento, ofreciéndome su tiempo y sus conocimientos e iniciándome en el estudio de las catepsinas de trematodos. Asimismo, me gustaría extender mi agradecimiento a todo el Laboratorio de Helmintología de este Departamento por la cálida acogida y la preocupación que mostraron por mí durante toda la estancia. Igualmente, me gustaría agradecer al Dr. Richard K. Grencis, Profesor de Inmunología de la University of Manchester, y a todo el Manchester Immunology Group por aceptar mi estancia en su laboratorio así como por toda la ayuda profesional que me ofrecieron.

Asimismo, agradecer al resto de Profesores de Parasitología del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València: Dr. Antonio Marcilla Díaz, Dra. María Trelis Villanueva, Dra. M<sup>a</sup> Adela Valero Aleixandre, Dra. M<sup>a</sup> Dolores Bargues Castelló, Dra. M<sup>a</sup> Teresa Galán Puchades, Dr. Màrius Fuentes i Ferrer y Dr. Santiago Mas Coma. Gracias por todos los conocimientos y experiencia transmitidos.

Me gustaría hacer una mención especial a los Profesores de Biología Celular de este Departamento, el Dr. Emilio Varea López y el Dr. José Miguel Blasco Ibáñez por su ayuda y asesoramiento en la puesta a punto de diferentes técnicas histológicas e histoquímicas realizadas en esta Tesis Doctoral.

Por supuesto, sería imposible haber realizado toda esta labor sin la colaboración del personal de secretaría, Clemente Bañuls Rodilla, y la técnica de laboratorio, Araceli Terrones Simal, que además de facilitarnos enormemente el trabajo del día a día están dispuestos a echar una mano, sino las dos, siempre que se les necesita.

No me puedo olvidar del personal de los diferentes servicios del SCSIE, con los que he podido contar en todo momento. En primer lugar me gustaría destacar la labor de todo personal del animalario de la Facultat de Farmàcia y dar las gracias, especialmente, a Inmaculada Noguera, Jesús Dehesa e Ilra Renata Komoda por su disponibilidad para ayudarnos en todo momento. Por supuesto, a las Dras. Laura Cantero-Salazar y Luz Valero, de la Unitat de Proteòmica, por el procesamiento de los geles 2D-DIGE y la identificación de proteínas pero, sobre todo, por el tiempo que han dedicado a transmitirme parte de sus conocimientos sobre proteómica. También me gustaría agradecer a todo el grupo de la Secció de Microscòpia, en especial a M<sup>a</sup> Teresa Mínguez, por correr para que las muestras estuvieran siempre a tiempo, y a Enrique Navarro y Toni Ibáñez por introducirme en el mundo de la microscopía confocal pero, sobre todo, por las incontables horas que hemos pasado frente al microscopio. Gracias a todos por su amabilidad, profesionalidad y capacidad de trabajo.

El día a día en la facultad no habría sido lo mismo sin mis “parasitologas” preferidas: María J. Irisarri, Ángela L. Debenedetti, Lucía Mateo, Vivian Chagas, Carla Quesada, Alicia Galiano, Dra. Elena Madrid, Lis Retana, Raquel Peixoto, M<sup>a</sup> Ángeles Martínez y Sonia Adam. En vosotras he encontrado a las mejores compañeras, además de buenas amigas. Gracias por los consejos (los científicos y los no tan científicos), por tantos buenos momentos pero, sobre todo, gracias por la mejor de las terapias de grupo: las risas.

Me gustaría nombrar también al resto de compañeros: Dr. Messaud Kouhbane, Dr. Patricio Artigas y Ros Mary Flores, así como a los que han seguido su camino fuera del Departamento, Dra. Melissa Higón, Dr. Ignacio Pérez y Amparo Vidal por sus valiosos consejos y porque hacen, o hicieron en su día, más ameno el trabajo diario.

También me gustaría agradecer a los estudiantes de Máster y Grado que han pasado por el laboratorio en estos años, porque con sus inocentes preguntas he aprendido mucho. Gracias: Sandrine Isaac, Violeta Rausell, Anabel Bolado, Marta Belló, Carla Martín, Laura Llácer, Amparo Ramón y Miguel García.

*No puc acabar aquestes línies sense agrair profundament a la meua família la confiança, el suport i l'estima que m'han donat sempre. En aquestos anys he après moltes coses, però són ells els qui m'han ensenyat el més important, que és intentar donar el millor de tu mateix en cada cosa que fas. Per això, i per moltes més coses, gràcies.*

En cumplimiento del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, en su Artículo 15. Mención Internacional en el Título de Doctor, una parte de la presente Tesis Doctoral ha sido redactada en inglés (concretamente el capítulo Cuarto y las Conclusiones). Asimismo, la doctoranda cumple el requisito de haber realizado una estancia en una institución de enseñanza superior fuera de España, habiendo realizado trabajos de investigación en la University of Manchester y la Univerzita Karlova v Praze.

Para la realización de la presente Tesis Doctoral he tenido la ocasión de disfrutar de un contrato de técnico superior de soporte a la investigación a cargo del proyecto de investigación Caracterización de proteínas implicadas en la relación con el hospedador en el modelo *Echinostoma caproni-roedor*, 2009/081, que se enmarca dentro del programa PROMETEO para grupos de investigación de excelencia de la Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana y, posteriormente, de un contrato predoctoral Atracció de Talent de la Universitat de València, lo que me ha proporcionado la oportunidad de colaborar e iniciarme en las tareas docentes del Departamento, realizar una parte del trabajo experimental en otros Centros de Investigación y dedicarme plenamente al desarrollo de esta Tesis.

El presente trabajo ha sido llevado a cabo gracias a la financiación obtenida de las siguientes Ayudas y Proyectos:

- PROMETEO/2009/081 de la Conselleria d'Educació, Generalitat Valenciana (Comunidad Valenciana, España).
- PROMETEO2014-083 Fase II de la Conselleria d'Educació, Generalitat Valenciana (Comunidad Valenciana, España).
- BFU2013-41040-P del Ministerio de Economía y Competitividad (Madrid, España).
- No. RD12/0018/0013, Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales RICET, IV National Program of I+D+i 2008-2011, ISCIII – Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa y FEDER del Ministerio de Sanidad y Consumo (Madrid, España).



# **Abreviaturas**

---

## ***Abbreviations***





**ABC:** Bicarbonato amónico

**ACN:** Acetonitrilo

**ACY1:** Aminoacilasa 1/*Aminoacylase 1*

**ADP:** Adenosín difosfato/*Adenosine diphosphate*

**AMC:** Aminometilcumarina

**ANOVA:** Análisis de la varianza

**Apo A-I:** Apolipoproteína A-I/*Apolipoprotein A-I*

**AP-1:** *Activator protein 1*

**Arg:** Arginina/*Arginine*

**Asn:** Asparagina

**ATP:** Adenosín trifosfato/*Adenosine triphosphate*

**AVR:** *Average volume ratio*

**BrdU:** 5-bromo-2-desoxiuridina/*5-bromo-2-deoxyuridine*

**BrdU\*:** Célula marcada con 5-bromo-2-desoxiuridina

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**BVA:** *Biological variation analysis*

**CAPE:** *Caffeic acid phenethyl ester*

**CA-074:** N-(L-3-trans-policarbamoiloxirano-2-carbonil). Inhibidor irreversible de catepsina B

**CCL11:** Quimioquina 11 motivo C-C/*Chemokine 11 C-C motif*

**CcO:** Citocromo c oxidasa/*Cytochrome c oxidase*

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico copia

**CHCA:** Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico

**CoA:** *Coenzyme A*

**CPB:** Tampón citrato-fosfato

**Ct:** Ciclo umbral

**CXCL10:** Quimioquina 10 motivo C-X-C/*Chemokine 10 C-X-C motif*

**Cys:** Cisteína

**DBA:** Aglutinina de *Dolichos biflorus*/*Dolichos biflorus agglutinin*

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DCG-04:** Análogo biotinilao del inhibidor irreversible de cisteín-peptidasas E-64

**DSA:** Aglutinina de *Datura stramonium*/*Datura stramonium agglutinin*

**DIA:** *Difference in-gel analysis*

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico/*Deoxyribonucleic acid*

**DO:** Densidad óptica

**dpi:** Días postinfección

**ds:** Desviación estándar

**DTT:** 1,4-ditiotreitól

**ECM:** Matriz extracelular/*Extracellular matrix*

**EDA:** *Extended data analysis*

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EFhd2:** *EF-hand domain-containing protein 2 (Swiprosin-1)*

**ELISA:** Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

**ENTPDase:** *Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase*

**ER:** *Endoplasmic reticulum*

**ES:** Excreción/secreción

**ESP:** Producto de excreción/secreción/*Excretory/secretory product*

**ETC:** Cadena de transporte electrónico/*Electron transport chain*

**ETF:** Flavoproteína transferidora de electrones/*Electron transfer flavoprotein*

**E-64:** N-trans-(epox-isuccinil)-L-leucina 4 guanidinobutilamida. Inhibidor irreversible de cisteín-peptidasas.

**FABP:** *Fatty acid-binding protein*

**FCS:** Suero de ternera fetal

**FDR:** *False discovery rate*

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**Fuc:** Fucosa/*Fucose*

**FR:** Benzoilcarbonil-fenilalanina-arginina

**Gal:** Galactosa

**GalNAc:** N-acetilgalactosamina/*N-acetyl-galactosamine*

**Gal2:** Galectina 2/*Galectin 2*

**GlcNAc:** N-acetilglucosamina/*N-acetyl-glucosamine*

**Gln:** Glutamina

**GNA:** Aglutinina de *Galanthus nivalis*/*Galanthus nivalis agglutinin*

**HIF-1 $\alpha$ :** *Hypoxia inducible factor 1 alpha*

**HSP:** Proteína de choque térmico/*Heat shock protein*

**HBSS:** Solución salina equilibrada de Hank

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia

**iCL:** Inhibidor irreversible de catepsina L

**IDH3:** Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>/*NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase 3*

**IEC:** *Intestinal epithelial cells*

**IEE:** Isoelectroenfoque

**IFABP:** *Intestinal fatty acid-binding protein*

**IFN- $\gamma$** : Interferón gamma/*Interferon gamma*

**Ig**: Inmunoglobulina/*Immunoglobulin*

**IL**: Interleuquina/*Interleukin*

**IL-4R**: Receptor de IL-4/*IL-4 receptor*

**IL-4R $\alpha$** : Cadena alfa del IL-4R

**iNOS**: Óxido nítrico sintasa inducible/*Inducible nitric oxide synthase*

**IPG**: Gradiente de pH inmovilizado

**iTreg**: Linfocitos T reguladores inducidos/*Induced regulatory T cells*

**K**: Queratina/*Keratin*

**LC-MS/MS**: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

**LDH**: Lactato deshidrogenasa/*Lactate dehydrogenase*

**LFABP**: *Liver fatty acid-binding protein*

**Lys**: Lisina

**MAA**: Aglutinina de *Maackia amurensis*/*Maackia amurensis agglutinin*

**MALDI**: Matrix-assisted laser desorption/ionization

**Man**: Manosa

**Met**: Metionina

**MLNs**: *Mesenteric lymphatic nodes*

**MMC**: Mastocitos de la mucosa

**MnSod**: Manganeso superóxido dismutasa/*Manganese superoxide dismutase*

**mRNA**: RNA mensajero/*Messenger RNA*

**MS**: Espectrometría de masas/*Mass spectrometry*

**MS-MS/MS**: Espectrometría de masas seguida de espectrometría de masas en tándem

**Muc**: Mucina/*Mucin*

**m/z**: Relación masa/carga

**NAD(+)/H**: Nicotinamida adenina dinucleótido/*Nicotinamide adenine dinucleotide*

**NAFTc**: *Nuclear factor of activated T cells*

**NCBI**: *National Center for Biotechnology Information*

**NeuNAc**: Ácido N-acetilneramínico

**NK- $\kappa$ B**: *Nuclear factor kappa B*

**NLM**: Nódulos linfáticos mesentéricos

**NO**: Óxido nítrico/*Nitric oxide*

**OAT**: Ornitina aminotransferasa/*Ornithine aminotransferase*

**OCT**: *Ornithine carbamoyltransferase*

<b>ODC:</b> <i>Ornithine decarboxylase</i>	<b>PSMA1:</b> Subunidad alpha tipo 1 del proteasoma/ <i>Proteasome subunit alpha type 1</i>
<b>ONOO<sup>-</sup>:</b> <i>Peroxynitrite</i>	<b>PVDF:</b> Fluoruro de polivinilideno
<b>OPD:</b> Ortofenildiamina	<b>qPCR:</b> <i>Quantitative PCR</i>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b> <i>Superoxide anion</i>	<b>rDNA:</b> DNA ribosomal
<b>PBS:</b> Tampón fosfato salino	<b>RELM-β:</b> Molécula tipo resistina beta
<b>PBS-T:</b> PBS con Tween <sup>®</sup> -20 al 0,05%	<b>RNA:</b> Ácido ribonucleico
<b>PBS-TX:</b> PBS con Triton <sup>™</sup> X-100 al 0,2%	<b>RNS:</b> <i>Reactive nitrogen species</i>
<b>PC:</b> Componente principal	<b>ROS:</b> <i>Reactive oxygen species</i>
<b>PCA:</b> Análisis de componentes principales	<b>RQ:</b> Cantidad relativa
<b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa	<b>RT-PCRrt:</b> Retrotranscripción y PCRrt
<b>PCRrt:</b> PCR a tiempo real	<b>Ser:</b> <i>Serina/Serine</i>
<b>PDH:</b> Piruvato deshidrogenasa/ <i>Piruvate dehydrogenase complex</i>	<b>SCSIE:</b> Servei Central de Suport a la Investigació Experimental de la Universitat de València
<b>PDIA3:</b> Proteína disulfuro isomerasa 3/ <i>Protein disulfide isomerase A3</i>	<b>SDS:</b> Dodecilsulfato sódico
<b>pi:</b> Postinfección	<b>SDS-PAGE:</b> (Electroforesis en) gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>pl:</b> Punto isoeléctrico	<b>SNA:</b> Aglutinina de <i>Sambucus nigra</i> / <i>Sambucus nigra agglutinin</i>
<b>PM:</b> Peso molecular	<b>spi:</b> Semana postinfección
<b>PMSF:</b> Fluoruro de metilfenilsulfóxido	<b>spip:</b> Semana postinfección primaria
<b>PNA:</b> Aglutinina de cacahuete ( <i>Arachis hypogaea</i> )/ <i>Peanut agglutinin</i> ( <i>Arachis hypogaea</i> )	<b>spip:</b> Semana postinfección secundaria
<b>Prdx:</b> <i>Peroxiredoxin</i>	<b>STAT:</b> Transductor de señales y activador de la transcripción/ <i>Signal</i>

*transducer and activator of transcription*

**SULT1B1:** *Sulfotransferase 1B1*

**TBS:** Tampón tris salino

**TBS-T:** TBS con Tween®-20 al 0,05%

**TCA:** Ácido tricloroacético

**TFA:** Ácido trifluoroacético

**TFE:** 2,2,2-trifluoroetanol

**TGF-β:** Factor transformador del crecimiento beta/*Transforming growth factor beta*

**Thr:** Treonina/*Threonine*

**TNF-α:** Factor de necrosis tumoral alfa/*Tumor necrosis factor alpha*

**Treg:** Linfocitos T reguladores/*T regulatory lymphocytes*

**Tris:** Tris(hidroximetil)aminometano

**TSLP:** Linfopoyetina estromal tímica

**TUFM:** *Mitochondrial elongation factor Tu*

**UEA-I:** Aglutinina de *Ulex europaeus*/*Ulex europaeus agglutinin*

**UVC:** Unidad vellosidad-cripta

**WGA:** Aglutinina de germen de trigo (*Triticum vulgare*)/*Wheat agglutinin* (*Triticum vulgare*)

**wpi:** *Week post infection*

**wppi:** *Week post primary infection*

**2D:** Bidimensional

**2D-DIGE:** Electroforesis diferencial en geles bidimensionales/*Two-dimensional differential in gel electrophoresis*



# Introducción

---





Entre las enfermedades infecciosas que afectan a al ser humano, las enfermedades parasitarias y, más concretamente, las helmintiasis intestinales destacan por la gran morbilidad que ocasionan. Actualmente, más de 1.000 millones de personas en todo el mundo se encuentran afectadas por al menos una especie de helminto intestinal y en algunas regiones la prevalencia de infección alcanza al 100% de la población, siendo particularmente graves en niños y mujeres embarazadas (WHO, 2013, 2015). Estas helmintiasis ocasionan además un número elevado de muertes anuales, bien de forma directa o indirecta, (Fürst & Utzinger, 2010) y, en términos de morbilidad, causan: anemia, retraso en el crecimiento, malnutrición, desarreglos en la función cognitiva, obstrucción intestinal y prolapso rectal o problemas respiratorios, entre otros trastornos (Drake *et al.*, 2000; Bethony *et al.*, 2006; WHO, 2008; Hotez *et al.*, 2009). Las pérdidas medidas en años de vida potencialmente perdidos ("*disability-adjusted life year*" o DALY) cada año como consecuencia de las helmintiasis intestinales se estiman en más 5 millones (Hotez *et al.*, 2014). Asimismo, los helmintos intestinales son capaces de interferir con el sistema inmunitario del hospedador, pudiendo alterar la respuesta generada frente a otros patógenos o inducir inmunopatología adicional (Maizels & Yazdanbakshs, 2003; Maizels *et al.*, 2004). Además de su interés en salud pública, los helmintos intestinales tienen también una gran repercusión a nivel veterinario, originando grandes pérdidas económicas tanto por la disminución de la productividad como por el gasto en tratamientos anti-helmínticos (Hotez *et al.*, 2008). Estimaciones recientes hablan de un gasto anual de más de 10.000 millones de dólares solo en anti-helmínticos, sin incluir los gastos derivados de la implantación de medidas de control ni las pérdidas de producción (Roeber *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de que por lo general los tratamientos frente a estas helmintiasis son efectivos, las prevalencias de parasitación continúan creciendo y la aparición de resistencias frente a los anti-helmínticos dificulta el control de estas infecciones (Steppek *et al.*, 2006). En este contexto, la utilización de vacunas parece la medida de control más adecuada si bien, a pesar de los innumerables trabajos realizados en este sentido, no existen aún hoy vacunas frente a helmintos intestinales. En los últimos

años se viene señalando que una de las principales causas a la que se atribuye la ausencia de resultados en este campo son las estrategias empleadas para el diseño de las vacunas (Vercruysse *et al*, 2004; Elliott & Weinstock, 2012). Las estrategias más utilizadas se han basado en retos en animales de laboratorio, empleando antígenos seleccionados de manera poco menos que aleatoria, lo que ha supuesto una gran inversión de tiempo y dinero sin una contrapartida en resultados. En diversos foros científicos se viene señalando que una de las razones que puede explicar la falta de resultados es el desconocimiento de los mecanismos que determinan la expulsión natural de estos helmintos. Como consecuencia, se viene postulando la necesidad de profundizar en el estudio de estos mecanismos para, de esta forma, desarrollar nuevas estrategias que permitan dirigir las herramientas de control sobre la base del conocimiento de las alteraciones en el hospedador que conducen al control de los parásitos, permitiendo un ahorro importante de tiempo y dinero (Vercruysse *et al.*, 2004; Harris, 2011).

Todo lo expuesto pone de manifiesto la necesidad de mejorar nuestro conocimiento acerca de los factores que determinan tanto el establecimiento como la expulsión de los helmintos intestinales, para de esta manera poder desarrollar estrategias que permitan diseñar nuevas herramientas de control con un consumo de tiempo y dinero razonables. Los helmintos intestinales están sometidos a alteraciones fenotípicas inducidas por el hospedador y, asimismo, los parásitos inducen respuestas fenotípicas diferentes en cada hospedador. Conjuntamente, estas alteraciones determinan que una especie de helminto ocasione infecciones crónicas en unos hospedadores mientras que en otros sea expulsada rápidamente. El conocimiento de las alteraciones recíprocas entre parásito y hospedador, y de cómo estas se producen, resulta fundamental para poder establecer mecanismos de control frente a este grupo de helmintos. A pesar del interés que suscitan estos procesos, su estudio resulta complejo debido a la necesidad de modelos experimentales adecuados. En este contexto, se ha mostrado muy útil el desarrollo de modelos que permitan analizar cómo las condiciones particulares (fisiológicas, inmunológicas, etc.) de ambientes distintos (hospedadores) afectan a un mismo genotipo

(helminto), induciendo una diferenciación fenotípica que conduce a la expulsión natural del parásito o a su establecimiento crónico.

En este contexto se enmarca una de las líneas de investigación que se viene desarrollando desde hace años en el Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València. Esta línea está dedicada al estudio de las relaciones parásito-hospedador en helmintiasis intestinales, con énfasis en los factores que determinan el desarrollo de infecciones crónicas o que, por el contrario, generan resistencia frente a la infección. Para ello se ha empleado el modelo *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae)-roedor. La especie *E. caproni* se desarrolla bien en roedores, si bien en ratones ocasiona infecciones crónicas, mientras que en ratas el parásito es expulsado de forma natural al poco tiempo de la infección. El estudio de la evolución de *E. caproni* en cada uno de estos hospedadores, así como de sus interacciones con el hospedador, está aportando datos muy valiosos en cuanto a los factores que determinan el curso de las helmintiasis intestinales y los componentes implicados en la resistencia de un hospedador. Así pues, este hecho está abriendo significativamente el campo de la investigación sobre las relaciones parásito-hospedador y los elementos que determinan la generación de respuestas eficientes frente a un parásito.

Los estudios realizados en esta línea han puesto de manifiesto la importancia de la especie hospedadora en los cambios fenotípicos del helminto parásito, los cuales conducen a su expulsión natural o al desarrollo de infecciones crónicas (Toledo *et al.*, 2004a, 2006a, b, 2009; Toledo & Fried, 2005). Estas diferencias se ven reflejadas en la respuesta inmunitaria generada en cada hospedador (Toledo *et al.*, 2003, 2004a, b, 2005, 2009; Sotillo *et al.*, 2007, 2011; Trelis *et al.*, 2011). Los estudios histopatológicos realizados en estos hospedadores durante el curso de la infección con *E. caproni* pusieron de manifiesto la gran influencia de los procesos inflamatorios locales y la desigual penetración de moléculas del parásito en los tejidos de los hospedadores (Toledo *et al.*, 2006a; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007). Asimismo, los primeros resultados de identificación y caracterización del transcriptoma y de algunas proteínas del parásito, incluyendo las más inmunogénicas

y los isotipos de inmunoglobulinas que las reconocen, han sido obtenidos mediante técnicas de inmunoproteómica (Bernal *et al.*, 2006; Marcilla *et al.*, 2007; Higón *et al.*, 2008; Sotillo *et al.*, 2008; Garg *et al.*, 2013). Otro aspecto de gran interés es la descripción, por primera vez en trematodos digénidos, de la emisión de vesículas extracelulares, las cuales se ha visto que contienen proteínas y son internalizadas por las células del hospedador (Marcilla *et al.*, 2012). Este hecho resulta fundamental para explicar las interacciones parásito-hospedador en este y otros sistemas. Asimismo, se ha estudiado el proteoma del producto de excreción/secreción de los adultos de *E. caproni*, identificándose un total de 39 proteínas (Sotillo *et al.*, 2010). Todos estos estudios han permitido establecer el hecho de que el desarrollo de infecciones crónicas se asocia con la generación de respuestas locales de tipo Th1, con predominio de IFN- $\gamma$  y una marcada inflamación local caracterizada por una expresión elevada del enzima óxido nítrico sintasa inducible. Por el contrario, la expulsión del parásito se relaciona con el desarrollo de un fenotipo local de tipo Th2, en el que los incrementos en la expresión de IL-13 parecen ser fundamentales (Trelis *et al.*, 2011; Sotillo *et al.*, 2011). Esta citoquina parece inducir cambios en el moco producido en el intestino de la rata, lo cual daría como resultado la expulsión del parásito. Así pues, el estudio de las alteraciones inducidas por el parásito en cada hospedador, así como de las variaciones fenotípicas del parásito que favorecen uno u otro tipo de respuesta, puede ser fundamental para el establecimiento de mecanismos de control de las helmintiasis intestinales. Todos estos resultados están incrementando las posibilidades que ofrece el modelo experimental empleado.

En la presente Tesis Doctoral, se analizan diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria generada frente a *E. caproni* en hospedadores definitivos de alta y baja compatibilidad con el parásito (ratón y rata, respectivamente). De este modo, se pretende dilucidar los mecanismos efectores implicados en esta respuesta, haciendo especial hincapié en los cambios inducidos a nivel intestinal. Este estudio permitirá conocer con mayor detalle los mecanismos que contribuyen eficazmente al establecimiento de infecciones de larga duración en el hospedador o, en cambio, a la generación de resistencia frente a la misma. Además, se podrán extraer también conclusiones de interés

acerca de los factores que determinan la inmunopatología asociada a las helmintiasis intestinales. Otro aspecto abordado en el presente trabajo son las interacciones que tienen lugar entre distintas especies de helmintos en un mismo hospedador, lo cual puede contribuir a un mayor conocimiento de los mecanismos implicados en la generación de resistencias. Todos estos resultados pueden resultar de gran interés para una mejor comprensión de los mecanismos que rigen el curso de las helmintiasis intestinales.



# Objetivos

---





El presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto más amplio en el que se pretende analizar con detalle las relaciones parásito-hospedador en el contexto de las helmintiasis intestinales, empleando para ello el modelo experimental *E. caproni*-roedor. El objetivo general de esta Tesis Doctoral es profundizar en el conocimiento de la respuesta inmunitaria generada frente a esta infección intestinal y estudiar diferentes alteraciones locales que puedan ser determinantes para la evolución de la infección en cada sistema parásito-hospedador. Para ello, los objetivos específicos que nos planteamos a la hora de empezar este trabajo fueron los siguientes:

- 1.-** Estudiar las respuestas Th17 en hospedadores de diferente compatibilidad (ratón y rata) a fin de determinar la participación de esta respuesta y de las citoquinas relacionadas en el curso de las infecciones con *E. caproni*.
- 2.-** Analizar el papel del IFN- $\gamma$  en el establecimiento de infecciones crónicas por *E. caproni* en ratón. Para ello se emplearon varias cepas de ratón con diferente fondo inmunológico con la finalidad de analizar en cada una de ellas:
  - a)** La compatibilidad con *E. caproni* y la evolución del curso de la infección.
  - b)** La patología y alteraciones estructurales del tejido intestinal inducidas por la presencia del parásito.
  - c)** La respuesta inmunitaria generada frente a la infección mediante el análisis de la respuesta sistémica de anticuerpos y la producción de citoquinas tanto a nivel sistémico como local.
  - d)** La expresión de mucinas solubles y transmembrana en el lugar de la infección.
- 3.-** Estudiar el papel de las mucinas intestinales sobre el curso de la infección en hospedadores de alta y baja compatibilidad (ratón y rata, respectivamente) puesto que las alteraciones en la producción de estas glicoproteínas han sido descritas como un mecanismo efector, mediado por el sistema inmunitario, eficaz en la expulsión de

numerosos helmintos intestinales. Con la finalidad de caracterizar las alteraciones inducidas por *E. caproni* sobre estas glicoproteínas se estudiaron:

**a)** Los cambios cuantitativos en la expresión y producción de mucinas solubles y transmembrana.

**b)** Los cambios cualitativos inducidos sobre la glicosilación de estas mucinas.

**4.-** Estudiar el proceso de renovación del epitelio intestinal en respuesta a la infección por *E. caproni* en el íleon de ratones y ratas por su capacidad de actuar como mecanismo efector para la expulsión de helmintos alojados en la luz intestinal.

**5.-** Caracterizar las alteraciones proteómicas inducidas por la infección con *E. caproni* sobre las células del epitelio intestinal de ratas y ratones con la finalidad de determinar las consecuencias de la infección sobre el tejido intestinal e identificar aquellas proteínas directamente implicadas en la respuesta a la infección, las cuales contribuyen a la expulsión de los vermes del lumen intestinal o, por el contrario, favorecen el establecimiento de infecciones duraderas. Con este objetivo se analizaron:

**a)** Los cambios inducidos por la infección a nivel de la expresión de proteínas en el íleon de ratones y ratas infectados.

**b)** Los cambios inducidos por la infección sobre el estatus de glicosilación de estas proteínas en las células epiteliales intestinales aisladas de ratas.

**6.-** Estudio retrospectivo de la interacción antagonista entre *E. caproni* y el nematodo intestinal *S. muris* con el fin de identificar algunos de los mecanismos que pueden estar implicados en la generación de resistencias frente a infecciones secundarias con helmintos intestinales. Para ello se analizó:

**a)** Los cambios inducidos por *S. muris* en el íleon de ratas infectadas.

**b)** La respuesta de anticuerpos generada frente a *S. muris* tanto a nivel sistémico como local, en la mucosa del intestino delgado.

**c)** La producción de citoquinas a nivel sistémico y local (en el íleon) durante las primeras semanas de infección con *S. muris*.

**d)** Las alteraciones inducidas por *S. muris* sobre la producción y glicosilación de mucinas en el lugar de infección para *E. caproni*.

**7.-** Analizar el proteoma de la fase adulta de *S. muris* y compararlo con los datos proteómicos y transcriptómicos disponibles para *E. caproni* con la finalidad de identificar las principales similitudes que existen entre ambas especies parásitas a nivel proteómico.

Para abordar estos objetivos la presente Tesis Doctoral ha sido dividida en varios capítulos:

- En el Capítulo I se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica en la que se intenta recopilar los antecedentes en el estudio de las relaciones parásito-hospedador empleando el modelo *E. caproni*-roedor, así como especies del género *Syphacia*. Asimismo, se revisan los principales mecanismos conocidos que participan en la expulsión de los helmintos intestinales.
- En el Capítulo II se describen los materiales y métodos utilizados para el desarrollo experimental de esta Tesis.
- En el Capítulo III se exponen los resultados obtenidos.
- El Capítulo IV está dedicado a la discusión de los resultados, relacionándolos con datos experimentales publicados.
- Finalmente se presentan las Conclusiones que se han podido extraer de este estudio.
- Las referencias bibliográficas citadas a lo largo de este texto se recogen en un apartado final.



# Capítulo I

---

**ESTADO ACTUAL DE CONOCIMIENTOS** SOBRE LOS MECANISMOS  
DE EXPULSIÓN DE HELMINTOS INTESTINALES, CENTRADO EN LAS  
RELACIONES ENTRE *ECHINOSTOMA CAPRONI* Y *SYPHACIA MURIS*  
CON SU HOSPEDADOR DEFINITIVO



En este capítulo se pretende llevar a cabo una actualización sobre el estado de conocimientos en relación con los principales aspectos abordados en la presente Tesis Doctoral. Con esta finalidad, el capítulo ha sido estructurado en cuatro grandes apartados. Los dos primeros están dedicados exclusivamente a cada una de las especies parásitas empleadas: *E. caproni*, que ha constituido el modelo de estudio para la realización de este trabajo; y *S. muris*, utilizada para el estudio de la coinfección y que, más allá de su utilidad como modelo experimental, reviste especial interés por ser un parásito habitual y recurrente en las colonias de animales de laboratorio. A continuación, de forma más general, se abordan diferentes aspectos de la inmunología frente a helmintos intestinales y los mecanismos efectores implicados en la expulsión de estos parásitos. Finalmente, puesto que el estudio de la interacción entre *E. caproni* y *S. muris* constituye una parte importante del trabajo incluido en el presente texto, el último apartado se dedica a las coinfecciones parasitarias y, especialmente, a los antecedentes en la utilización de los echinostomas como modelos para el estudio de estos fenómenos tan habituales en la naturaleza.

---

### **1.1. ECHINOSTOMA CAPRONI**

---

*Echinostoma caproni* Richard, 1964 fue descrito originalmente en la isla de Madagascar parasitando a un ave de presa, *Falco newtoni*, como hospedador definitivo y al gasterópodo pulmonado *Biomphalaria pfeifferi* como primer hospedador intermediario. Las metacercarias se encontraron enquistadas en otros moluscos y en el riñón de un anfibio, *Ptychadena mascareniensis*. Posteriormente, su ciclo biológico pudo reproducirse experimentalmente en el laboratorio empleando especies hospedadoras diferentes a las observadas en la naturaleza (Richard & Brygoo, 1978).

En general, los echinostomas son parásitos intestinales en su fase adulta que se clasifican dentro del phylum Platyhelmyntes, clase Trematoda, subclase Digenea (adultos mayoritariamente con dos ventosas: oral y ventral) y familia Echinostomatidae. Su principal característica es la presencia de un collar alrededor de la ventosa oral que está formado por una o dos coronas de espinas, interrumpidas ventralmente, y cuya disposición es esencial para la clasificación taxonómica de las especies (Kostadinova & Jones, 2005). Sin embargo, la clasificación sistemática de los echinostomas resulta aún problemática debido a la homogeneidad interespecífica en las características morfológicas de las fases adultas, la identificación errónea de algunas especies o la falta de una mayor precisión en la descripción de otras (Kostadinova & Gibson, 2000). Esta controversia ha supuesto que este grupo de digénidos se vea sometido a continuas revisiones sistemáticas (Iskova 1985; Kanev 1985, 1994; Kanev *et al.*, 1995a, b; Kostadinova 1995, 1999; Kostadinova & Gibson, 2000; Toledo *et al.*, 2000, 2009; Fried & Toledo, 2004; Esteban & Muñoz-Antolí, 2009).

La especie *E. caproni*, empleada en este trabajo, se incluye dentro del género *Echinostoma* Rudolphi, 1809 en el conocido como complejo "revolutum", que agrupa las especies con collar de 37 espinas. Las últimas revisiones de este grupo reconocen, de acuerdo con los estudios publicados hasta la fecha, la existencia de 10 especies diferentes (Fried & Graczyk, 2004; Fried & Toledo, 2004; Esteban & Muñoz-Antolí, 2009; Toledo *et al.*, 2009). Estos autores coinciden en que aparte de los aspectos morfológicos y biológicos apuntados por Kostadinova & Gibson (2000), para la clasificación y descripción de nuevas especies en este grupo es necesaria, además, la realización de análisis comparativos apropiados. En este escenario, la caracterización molecular se presentó como una alternativa a los estudios morfológicos clásicos, la cual puede ser útil en el estudio de las especies crípticas, los complejos de especies y sus relaciones filogenéticas. No obstante, Kostadinova *et al.* (2003) y Esteban & Muñoz-Antolí (2009) pusieron de manifiesto que esta aproximación está igualmente sujeta a la problemática inherente al grupo "revolutum", ya que muchas de las secuencias de DNA depositadas en las bases de datos proceden de ejemplares inadecuadamente clasificados. Asimismo, existe cierto grado



de variabilidad intraespecífica en las secuencias de algunos marcadores moleculares empleados para la clasificación sistemática de este grupo taxonómico, como las regiones ITS (espaciador transcrito interno) del DNA ribosomal (rDNA) o el gen ND1 (subunidad 1 de la nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa) (Sorensen *et al.*, 1998; Detwiler *et al.*, 2010; Noikong *et al.*, 2014). De tal manera, el análisis molecular requeriría igualmente la caracterización fenotípica del material estudiado. En esta línea, Detwiler *et al.* (2012) y Georgieva *et al.* (2013) mostraron la utilidad y necesidad de llevar a cabo nuevos estudios, basados en la combinación de análisis moleculares y morfológicos, que permitan identificar y analizar los patrones de variación interespecíficos para avanzar en el conocimiento de las relaciones taxonómicas dentro del grupo "revolutum".

A pesar de la controversia asociada a la identificación específica en el grupo "revolutum", cabe señalar en este punto que la especie *E. caproni* es una de las que ha suscitado menor confusión y su validez ha sido aceptada por la mayoría de estos autores.

### **1.1.1. CICLO BIOLÓGICO**

Los echinostomátidos presentan un ciclo biológico complejo, que se caracteriza por la alternancia de siete fases distintas (adulto, huevo, miracidio, esporocisto, redia, cercaria y metacercaria) y la intervención de tres hospedadores, denominados hospedador definitivo y primer y segundo hospedador intermediario (Figura 1.1.). Los hospedadores definitivos son animales vertebrados en los que se desarrolla la forma adulta del parásito a nivel del intestino delgado. Como primer hospedador intermediario pueden actuar moluscos gasterópodos acuáticos. Por último, los segundos hospedadores intermediarios son invertebrados y algunos anfibios en los que se establecen las metacercarias, que constituyen la forma infectiva para el hospedador definitivo. Los aspectos relacionados con la biología de los echinostomas han sido revisados por Esteban & Muñoz-Antolí (2009).

En la naturaleza, el ciclo de vida de estos digénidos se mantiene por aves y mamíferos hospedadores que liberan en sus heces huevos del parásito en lagos, estanques o arroyos. Los huevos fértiles no están embrionados en la puesta y necesitan un tiempo



forma de metacercaria. Los hospedadores definitivos se infectan al ingerir un segundo hospedador intermediario que albergue metacercarias enquistadas. Los vermes juveniles no realizan ninguna migración intraorgánica en el hospedador definitivo y los adultos se establecen directamente en el intestino delgado. Numerosos vertebrados, incluyendo al ser humano, pueden actuar como hospedadores definitivos de los echinostomas. La eliminación de huevos por el hospedador definitivo comienza entre los 10 y 16 días postinfección (dpi) y, aunque es continua desde el inicio del periodo patente, se han detectado variaciones significativas a lo largo del curso de la infección en la cantidad de huevos eliminados (Christensen *et al.*, 1990; Toledo *et al.*, 2004a; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007).

Este ciclo evolutivo, tal y como se ha descrito, se corresponde con el ciclo general que siguen de las diferentes especies del género *Echinostoma*. A continuación se describen, de forma más concreta, las características más destacadas de cada una de las fases evolutivas citadas anteriormente, haciendo hincapié en la especie *E. caproni*, empleada para la realización de la presente Tesis Doctoral.

**Huevos y miracidios.** Los huevos de *E. caproni* miden alrededor de 122x75  $\mu\text{m}$  (Fujino *et al.*, 2000) e, igual que los de otras especies de echinostomas, tienen forma ovalada y color blanco o amarillento. Como la mayoría de los huevos de trematodos, se caracterizan por presentar un opérculo en uno de sus extremos, que se abre para permitir la salida del miracidio. En el momento de la puesta, los huevos no están embrionados y en su interior solo albergan un óvulo fertilizado rodeado por gránulos de yema. Estos huevos necesitan de un periodo de maduración en el agua, de entre 8 y 12 días aproximadamente, bajo determinadas condiciones de temperatura (26-28 °C) y salinidad, para desarrollar en su interior el siguiente estadio evolutivo, el miracidio (Jeyarasasingam *et al.*, 1972).

Los miracidios son una de las dos fases de vida libre en el ciclo evolutivo de los echinostomas. Miden alrededor de 100-120  $\mu\text{m}$  de longitud, están ensanchados anteriormente y se van estrechando hacia la parte posterior hasta acabar en un extremo romo. Se caracterizan por presentar un tegumento ciliado, con un número variable de

placas epidérmicas ciliadas y papilas argentofílicas. Presentan además dos manchas oculares formadas por dos pares de cuerpos pigmentados que se localizan a ambos lados en la parte anterior del miracidio.

La eclosión de los huevos está inducida por diferentes estímulos entre los cuales la luz es el más importante en el caso de *E. caproni*, que muestra un estricto patrón diurno entre las 11.00 y 16.00 h. Tras la eclosión, los miracidios nadan activamente en busca del primer hospedador intermediario, guiados por estímulos ambientales. Los miracidios de *E. caproni* muestran geotaxia negativa y fototaxia positiva (Haas *et al.*, 2000). En la búsqueda del hospedador, se orientan también por señales químicas del mismo. Aunque estas señales aún no están bien definidas, se sabe que los miracidios pueden detectar y utilizar compuestos macromoleculares que difunden desde la superficie de moco que recubre el manto del caracol para localizar hospedadores potenciales en el medio acuático. Sin embargo, esta quimiotaxis parece no ser específica, es decir, existen evidencias de que no son capaces de discriminar entre especies de caracol compatibles y no compatibles (Haberl *et al.*, 2000).

**Esporocistos y redias.** Los esporocistos y las redias son los estadios parasitarios que se desarrollan en el interior del primer hospedador intermediario, gasterópodos de los géneros *Biomphalaria* y *Bulinus* en el caso de *E. caproni*, tras la infección y transformación de los miracidios. Los miracidios penetran habitualmente a través del pie del caracol, pierden sus placas ciliadas y se transforman en esporocistos en el lugar de penetración. No obstante, estos esporocistos se desarrollan y migran en el interior del caracol hasta alojarse en el ventrículo y la aorta. Se trata de estructuras de tipo saco, de unos 100  $\mu\text{m}$  de longitud, cuyas masas germinales localizadas caudalmente, son las responsables de la multiplicación y desarrollo de los elementos germinativos de todas las generaciones siguientes. Durante el desarrollo del esporocisto de *E. caproni*, cada célula germinal primaria da lugar a un embrión redial, mientras que las células indiferenciadas pueden dar lugar tanto a células somáticas como a células germinativas secundarias. La

producción de redias empieza al cabo de 5-8 días generando, cada esporocisto, alrededor de 15 redias de primera generación, o redias madre (Ataev *et al.*, 1997).

Las redias, más activas que los esporocistos, son estructuras alargadas con boca anterior y faringe, una cavidad digestiva de tipo saco, una estructura tegumentaria a modo de collar en el extremo anterior y dos yemas ambulatorias localizadas posteriormente. Las redias de primera generación, formadas a partir de los esporocistos, solo producen embriones rediales que dan lugar a las redias hija, o de segunda generación. Estas, al principio de su vida, generarán nuevos embriones rediales y, posteriormente, pasarán a formar las cercarias.

**Cercarias.** Las cercarias de *E. caproni* son típicamente distómidas, gimnocéfalas y presentan un collar oral de espinas, no siempre visible, y una cola simple. Aunque la diferencia de tamaño, a nivel de cercarias, es habitual entre las distintas especies, la información que proporcionan el número y la distribución de las papilas tegumentarias ha demostrado tener valor taxonómico para la identificación específica dentro del género *Echinostoma*. La tinción con nitrato de plata y el posterior estudio al microscopio óptico de cercarias de *E. caproni* reveló la siguiente distribución de las papilas tegumentarias: entre el collar de espinas; alrededor de la ventosa oral; asociadas a la ventosa ventral; en las superficies laterales del cuerpo y en la cola (Nakano *et al.*, 2003).

Las cercarias constituyen la segunda fase de vida libre del ciclo, aunque su supervivencia en el exterior no es superior a las 48 h y se ve muy influenciada, igual que su capacidad infectiva, por la temperatura. Son liberadas al medio acuático por el primer hospedador intermediario, transcurridas entre 4 y 6 semanas desde la infección miracidial y, aunque los patrones de emisión cercariana han sido poco estudiados, parece que el ritmo está sincronizado con los ciclos de luz/oscuridad. Platt *et al.* (2009) analizaron la influencia de la luz y la gravedad sobre la transmisión experimental de las cercarias de *E. caproni*, observando la existencia de fenómenos de geotaxia y fototaxia preferentemente negativos. Probablemente, esto es debido a que los hospedadores naturales del parásito se acumulan cerca de la superficie del agua, en zonas oscuras o sombrías. No obstante, el

número de metacercarias enquistadas encontradas en los hospedadores situados por debajo de los emisores y expuestos a la luz también fue sustancial. Cabe señalar, además, que la especificidad de los echinostomátidos respecto al segundo hospedador intermediario es baja aunque, igual que los miracidios, las cercarias siguen señales químicas para orientarse en la búsqueda del hospedador. Estas señales son diferentes a las utilizadas por los miracidios, pues las cercarias responden de forma no específica a moléculas de pequeño tamaño, por ejemplo aminoácidos (Haberl *et al.* 2000). En este sentido, los resultados de Platt *et al.* (2009) sugieren que las respuestas cercarianas a la luz y la gravedad son suficientemente flexibles como para asegurar la transmisión de la infección entre un amplio rango de hospedadores intermediarios.

**Metacercarias.** Las metacercarias se forman al enquistarse las cercarias en el interior del segundo hospedador intermediario. Este proceso, aunque poco conocido, parece requerir la coordinación de los sistemas sensorial, nervioso y muscular de la cercaria con el conjunto de glándulas cistógenas que esta fase larvaria presenta por todo su cuerpo (Keeler & Huffman, 2009).

En el caso de *E. caproni*, la metacercaria tiene forma esférica, mide alrededor de 155  $\mu\text{m}$  de diámetro y el grosor de la pared quística es de unos 7,5  $\mu\text{m}$  (Frazer & Fried, 1998). La larva que contienen en su interior es transparente cuando está viva.

Las metacercarias de *E. caproni* se alojan fundamentalmente en las gónadas de los renacuajos y en el riñón y cavidades pericárdicas de moluscos gasterópodos de agua dulce, donde pueden permanecer viables durante meses (Huffman & Fried, 1990).

**Adultos.** Los hospedadores definitivos de los echinostomas son animales vertebrados, aves y mamíferos, que adquieren la infección al ingerir segundos hospedadores intermediarios que albergan metacercarias en su interior. En el hospedador definitivo, el desarrollo de los echinostomas comprende una sucesión de procesos tales como el desenquistamiento de las metacercarias, su establecimiento, la selección del

hábitat, el desarrollo de los adultos, el apareamiento y la liberación de huevos (Toledo, 2009a).

Las metacercarias se desenquistan normalmente en el duodeno y en las 4 horas siguientes los vermes juveniles se establecen en el intestino delgado, donde maduran gradualmente a adultos. Diferentes factores dependientes del hospedador como el pH, los componentes biliare, el CO<sub>2</sub>, la presencia de determinadas enzimas o la disponibilidad de glucosa pueden influir en el desenquistamiento de las metacercarias y el posterior establecimiento de los vermes recién emergidos en la mucosa intestinal (Fried, 1994; Fried *et al.*, 2004). Fried *et al.* (2004) observaron que un entorno ácido con pepsina podía ser perjudicial para la supervivencia de la metacercaria desenquistada. En cambio, la supervivencia se prolongaba en medio básico, en presencia de tripsina y sales biliare, lo que facilitaría el establecimiento en la mucosa del intestino delgado. Además demostraron, *in vitro*, que la adición de glucosa exógena al medio de incubación aumentaba la supervivencia de las metacercarias desenquistadas, probablemente porque supone una fuente de energía para los gusanos juveniles. Con relación al establecimiento, es bien conocido que los echinostomátidos presentan nichos específicos dentro del intestino delgado de su hospedador definitivo (Nollen *et al.*, 1996). En las fases iniciales de la infección los vermes están normalmente dispersos, pero posteriormente tienden a concentrarse en una pequeña área del intestino. En roedores, los adultos de *E. caproni* se establecen a nivel del íleon (Odaibo *et al.*, 1988, 1989; Yao *et al.*, 1991), aunque recientemente se ha demostrado que presentan patrones de migración dentro de esta región anatómica, alojándose más hacia la parte posterior del intestino delgado durante el día que durante la noche y las primeras horas de la mañana (Platt *et al.*, 2010).

El curso de la infección depende en gran medida de factores propios del hospedador. Aunque las relaciones parásito-hospedador se describen de forma detallada más adelante en este capítulo, en este punto resulta importante señalar la existencia de diferentes tipos de hospedadores definitivos. En los hospedadores altamente compatibles las infecciones se establecen de manera crónica, mientras que los adultos son

rápidamente expulsados en los denominados hospedadores de baja compatibilidad, afectándose también su desarrollo y crecimiento, así como la fertilidad y emisión de huevos (Toledo & Fried, 2005).

### **1.1.2. ECHINOSTOMA CAPRONI EN EL HOSPEDADOR DEFINITIVO**

Los echinostomátidos suelen presentar un amplio rango de hospedadores intermediarios y definitivos, por lo que durante años han sido empleados como modelos experimentales en parasitología para el estudio de las relaciones parásito-hospedador entre los helmintos y sus hospedadores, tanto invertebrados como vertebrados. En este apartado se recogen únicamente los estudios referidos al desarrollo de las formas adultas del parásito en el hospedador definitivo y, más concretamente, los antecedentes descritos en el modelo *E. caproni-roedor*, que ha sido el empleado para el desarrollo de este trabajo.

#### **1.1.2.1. EL MODELO ECHINOSTOMA CAPRONI-ROEDOR**

El conocimiento de las relaciones parásito-hospedador es un aspecto de gran importancia en parasitología y, en el campo de la helmintología, resulta fundamental para comprender los factores implicados en el establecimiento o expulsión de los helmintos intestinales. El estudio de estos fenómenos requiere el desarrollo de modelos experimentales que permitan realizar estudios comparativos sobre el desarrollo de una especie parásita en especies hospedadoras diferentes. En este contexto, los echinostomas, y particularmente la especie *E. caproni*, constituyen un buen modelo. Numerosos estudios han demostrado que la evolución de la infección y sus características están fuertemente condicionadas por factores propios del hospedador. Así pues, el modelo *E. caproni-roedor* permite el estudio de una especie parásita en diferentes hospedadores experimentales en los que el curso de la infección es marcadamente diferente. De este modo, ofrece la posibilidad de estudiar y determinar aquellos factores relacionados con el parásito que afectan al curso de la infección permitiendo, a su vez, establecer las variables dependientes del hospedador que determinan que los parásitos sean expulsados del intestino o, por el contrario, se establezcan de forma crónica. Además, este modelo presenta otras ventajas como que el ciclo se puede mantener fácilmente el laboratorio o



el hecho de no presentar fases de migración intraorgánica en el hospedador definitivo, lo que facilita el manejo experimental y la interpretación de los resultados (Toledo & Fried, 2005).

La realización de estudios comparativos con diferentes roedores experimentales en los que curso de la infección es marcadamente distinto se puede abordar siguiendo tres estrategias (Toledo, 2009b): (I) la utilización de ratones inmunocompetentes e inmunocomprometidos, bien genéticamente o por la administración de tratamientos inmunosupresores (Fujino *et al.*, 1993, 1998a, b; Frazer *et al.*, 1999; Ryang *et al.*, 2007); (II) la utilización de diferentes cepas de ratón (Lee *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2007; Ryang *et al.*, 2007); y (III) el uso de especies hospedadoras distintas (Toledo *et al.*, 2004a, b, 2006a, b; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Sotillo *et al.*, 2007; Trelis *et al.*, 2011). Las tres aproximaciones han proporcionado mucha información en relación con la inmunobiología de las infecciones con echinostomátidos. No obstante, las dos primeras presentan la limitación de que los ratones desarrollan infecciones crónicas con *E. caproni*, lo que limita su uso para el estudio de los factores que determinan la expulsión del parásito de la luz intestinal. Por el contrario, la tercera aproximación resulta muy útil en el estudio de los factores dependientes del hospedador que son responsables de la expulsión y pueden resultar determinantes para definir las características biológicas, inmunológicas y patológicas de la infección en cada especie hospedadora.

Asimismo, el estudio de los aspectos inmunológicos en las infecciones por echinostomas tiene especial interés por el hecho de que se han descrito numerosas manifestaciones de resistencia (Toledo, 2009b). Tales manifestaciones dependen de las propiedades de la respuesta inmunitaria generada por el hospedador frente al parásito y pueden resumirse en: (I) incremento en la carga parasitaria tras la inmunosupresión del hospedador (Fujino *et al.*, 1993; McMaster *et al.*, 1995; Fried *et al.*, 1997; Ryang *et al.*, 2007); (II) expulsión natural de infecciones primarias (Hansen *et al.*, 1991; Weinstein & Fried, 1991; Muñoz-Antolí *et al.*, 2004; Toledo *et al.*, 2004a, 2006b); (III) generación de resistencia a infecciones secundarias, homólogas y heterólogas (Sirag *et al.*, 1980;

Christensen *et al.*, 1986; Hosier *et al.*, 1988); (IV) reducción de la fecundidad de los echinostomas (Franco *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 2004; Muñoz-Antolí *et al.*, 2004; Toledo *et al.*, 2004a, 2006c); y (V) cambios en la morfología de los adultos (Fujino *et al.*, 1997; Fried *et al.*, 1997; Frazer *et al.*, 1999). Los mecanismos responsables de estas manifestaciones, así como sus características y consecuencias en el curso de la infección con *E. caproni* en especies hospedadoras distintas se describen más adelante en diferentes puntos de este capítulo.

#### **1.1.2.2. ESPECIFICIDAD, ESTABLECIMIENTO Y DESARROLLO EN EL HOSPEDADOR DEFINITIVO**

Los echinostomas son parásitos cosmopolitas capaces de infectar a un amplio rango de hospedadores vertebrados, tanto en la naturaleza como en el laboratorio. Esta escasa especificidad respecto al hospedador definitivo es el resultado de las relaciones filogenéticas, fisiológicas y ecológicas entre el parásito y sus hospedadores a lo largo de un proceso dinámico de coevolución (Huffman & Fried, 1990; Fried & Huffman, 1996; Graczyk, 2000). Sin embargo, la capacidad de infectar a diferentes hospedadores no implica que el curso de la infección sea similar en todas las especies sino que, como se comentó anteriormente, el curso y las características de la infección están muy condicionados por el hospedador. Esta característica ha llevado a la diferenciación entre dos categorías de hospedadores: los de alta y baja compatibilidad. Las diferencias entre ambos se reflejan principalmente en el establecimiento y crecimiento de los adultos, la emisión de huevos, la fecundidad de los vermes adultos y la supervivencia de los mismos (Toledo, 2009b).

El curso de la infección con *E. caproni* ha sido estudiado con detalle en diferentes especies de roedores. Los ratones y hámsteres se consideran hospedadores altamente compatibles, mientras que las ratas y los jerbos son hospedadores de baja compatibilidad (Toledo & Fried, 2005). Los primeros muestran tasas de infección de aproximadamente el 100%, independientemente de la dosis infectiva utilizada, y las infecciones se establecen de manera crónica, pudiendo llegar más allá de las 25 semanas postinfección (spi).

Además, el número de adultos recuperados en estas especies hospedadoras es elevado a lo largo de toda la infección (Odaibo *et al.*, 1988, 1989; Christensen *et al.*, 1990; Hosier & Fried, 1991; Toledo *et al.*, 2004a; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007). Por el contrario, en los hospedadores de baja compatibilidad, los parásitos son expulsados rápidamente de la luz intestinal (Hansen *et al.*, 1991; Toledo *et al.*, 2004a). En un estudio comparativo, Toledo *et al.* (2004a) mostraron que el 100% de las ratas expuestas experimentalmente a *E. caproni* resultaron infectadas, si bien el número de vermes recuperados semanalmente fue significativamente menor que el obtenido en hámsteres. Además, todas las ratas resultaron desparasitadas entre las 7 y 8 *spi*.

El crecimiento y desarrollo de *E. caproni* también se ve afectado por la especie hospedadora. Toledo *et al.* (2004a) llevaron a cabo un estudio comparativo sobre el desarrollo de *E. caproni* en hospedadores de diferente compatibilidad, hámsteres y ratas. Este estudio demostró que la especie hospedadora ejerce un gran efecto sobre la mayoría de las características morfométricas analizadas, entre ellas el área corporal, la anchura del collar y las áreas ováricas, testiculares y de la ventosa ventral. En todos los casos, los valores fueron significativamente mayores en hámsteres que en ratas. Además, se detectaron interacciones tiempo-hospedador para numerosas variables, indicando que la cinética de crecimiento de los vermes es diferente en cada caso.

Más recientemente, Sotillo *et al.* (2010) compararon mediante microscopía electrónica de superficie la topografía del tegumento de los adultos de *E. caproni* recuperados de ratones y ratas, encontrando diferencias en la forma y densidad de las espinas. Los adultos procedentes de ratón mostraron un descenso en la densidad de espinas tegumentarias en las áreas de las ventosas oral y ventral. En cambio, el número de espinas en el área de la ventosa oral aumentó con el tiempo en los adultos recuperados a partir de ratas. Además, las espinas del tegumento eran más grandes y romas en los ejemplares aislados de ratón, mientras que en los adultos procedentes de ratas infectadas estas eran afiladas y no estaban cubiertas por tegumento. Estos hechos, junto con una mayor expresión génica de actina en los adultos procedentes de rata, sugieren que los

hospedadores de baja compatibilidad inducen un incremento del recambio de las espinas tegumentarias, el cual puede deberse a la incapacidad de los adultos de permanecer fijados al intestino de este hospedador.

Finalmente, numerosos estudios han demostrado que la especie hospedadora juega también un papel importante en la liberación de huevos, siendo mayor, por lo general, en los hospedadores altamente compatibles que en los de baja compatibilidad. Mahler *et al.* (1995) demostraron que el número de huevos liberados por los adultos de *E. caproni* era significativamente mayor en hámsteres que en jerbos. Toledo *et al.* (2004a) compararon el número de huevos liberados en hámsteres y ratas infectados experimentalmente con *E. caproni* y observaron que, si bien la cinética de liberación de huevos era similar en ambas especies de hospedadores, el número de huevos liberados era significativamente mayor en hámsteres que en ratas. Recientemente, Muñoz-Antolí *et al.* (2013) analizaron la influencia de la especie hospedadora sobre la viabilidad de los huevos (en términos de eclosión) y la capacidad infectiva de los miracidios liberados, observando que los huevos obtenidos a partir de hámsteres y ratones eran más viables que los obtenidos de adultos procedentes de ratas infectadas. No obstante, la capacidad infectiva de los miracidios no se vio afectada por la variable hospedador.

### **1.1.2.3. PATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN**

Más allá de su utilidad como modelos experimentales en el estudio de las relaciones parásito-hospedador los echinostomas, como muchos otros trematodos intestinales, son agentes causales de enfermedad. En términos generales, los trematodos intestinales son una de las infecciones parasitarias más comunes en humanos y animales y, aunque están menos asociados con la mortalidad que otros grupos de parásitos, son responsables de una morbilidad significativa. Además, un gran número de estas trematodosis se incluyen en el grupo de las enfermedades transmitidas por alimentos y se encuentran entre las enfermedades tropicales más olvidadas (Chai, 2009; Fürst *et al.*, 2012; Toledo *et al.*, 2012).

La patología de las infecciones por echinostomas engloba un conjunto de reacciones diversas y complejas que dependen de una amplia variedad de factores, entre los que se incluyen las características de las diferentes especies de echinostomas y la naturaleza de la especie hospedadora. Aunque en principio un único verme adulto es suficiente para inducir daño, se observan grandes variaciones en función de la intensidad de la infección. Así pues, las respuestas fisiopatológicas y la clínica dependen de la carga parasitaria, siendo las principales manifestaciones en infecciones severas: debilidad, diarrea acuosa, pérdida de peso y retraso en el crecimiento (Huffman & Fried, 1990; Toledo *et al.*, 2006a; Toledo, 2009a). No obstante, la patología de las infecciones por echinostomas en la naturaleza ha sido poco estudiada y la mayoría de conocimientos sobre este aspecto de la infección provienen de estudios experimentales con diferentes hospedadores experimentales. Dado que este trabajo ha sido realizado empleando ratones y ratas como hospedadores definitivos, en esta sección se describe fundamentalmente la patología desarrollada en estos hospedadores los cuales, por otra parte, han sido los más empleados en el estudio de este modelo experimental.

Numerosos estudios han demostrado que las infecciones por *E. caproni* persisten más allá de las 25 spi en hospedadores de alta compatibilidad como ratones y hámsteres (Odaibo *et al.*, 1988, 1989; Christensen *et al.*, 1990). En estas infecciones, los efectos histopatológicos se observan mayoritariamente en aquellas zonas donde los adultos se encuentran anclados a la mucosa intestinal. Así pues, el intestino de los ratones infectados experimentalmente muestra una dilatación marcada en las zonas en que se localizan la mayoría de los adultos (Muñoz-Antolí *et al.*, 2007). Además, se produce atrofia de las vellosidades, con fusión y erosión de las mismas, e hiperplasia de las criptas de Lieberkühn. El grosor total de la mucosa intestinal aumenta simultáneamente con una atrofia de la túnica muscular. En las criptas hiperplásicas, la tasa de mitosis está aumentada y el número de células de Paneth es menor. Sin embargo, las regiones no dilatadas del intestino delgado no muestran alteraciones histológicas con respecto a los controles no

infectados (Bindseil & Christensen, 1984<sup>1</sup>; Weinstein & Fried, 1991; Fujino & Fried, 1993a). En ratas, que son hospedadores de baja compatibilidad en los que la infección tiene un curso agudo y los adultos de *E. caproni* son expulsados del intestino a partir de la 4 spi, no se observa erosión y destrucción de las vellosidades intestinales en las primeras semanas de la infección y estas alteraciones se hacen patentes a partir del inicio de la expulsión de los adultos (Toledo *et al.*, 2006b).

En términos generales, las especies del género *Echinostoma* inducen cambios a nivel celular en el intestino que pueden tener importancia en la regulación de la carga parasitaria y pueden resumirse en (I) mastocitosis; (II) infiltración eosinofílica; (III) aumento en el número de células mucosectoras; y (IV) incremento en el número de neutrófilos en la mucosa intestinal y de células inflamatorias mononucleares en el mesenterio (Toledo *et al.*, 2006a; Toledo, 2009a). En el caso de *E. caproni* se han puesto de manifiesto los siguientes resultados en cuanto a los recuentos de diferentes poblaciones celulares en el intestino de diferentes hospedadores. En ratas infectadas destaca el incremento en el número de células caliciformes y eosinófilos a lo largo de la infección (Toledo *et al.*, 2006b). Por su parte, en los ratones infectados experimentalmente se observa infiltración de linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas en la lámina propia y submucosa (Weinstein & Fried, 1991; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007), así como un incremento en las fibras de colágeno y fibroblastos por debajo del epitelio en las vellosidades atrofiadas (Bindseil & Christensen, 1984; Fujino & Fried, 1993a). El recuento de mastocitos muestra incrementos similares a los detectados en rata a las 2 y las 4 spi (Toledo *et al.*, 200b; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007). El número de eosinófilos aumenta rápidamente, alcanzando el máximo a las 2 spi, y el recuento de células mucosectoras también se ve aumentado a lo largo de la infección crónica en ratón (Bindseil & Christensen, 1984; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007). El número de neutrófilos en la mucosa intestinal es significativamente mayor en ratones que en ratas, lo que sugiere que

---

<sup>1</sup> En el trabajo original la especie *E. caproni* aparece denominada como *E. revolutum*.

incrementos en esta población celular pueden estar asociados con una mayor supervivencia de los vermes adultos en el hospedador. Más aún, teniendo en cuenta que este recuento es todavía mayor en hámsteres, en los que las infecciones son más longevas que en ratón (Toledo *et al.*, 2006b; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007).

A pesar de que las alteraciones patológicas generadas en las infecciones por echinostomas han sido bien caracterizadas, los mecanismos responsables son poco conocidos. Los estudios citados en este apartado apuntan que las alteraciones en la mucosa intestinal pueden (I) deberse a un daño mecánico causado por la alimentación de los vermes y la irritación mecánica por la presencia de los adultos; (II) tratarse de un daño de naturaleza química, ocasionado por la liberación de sustancias tóxicas; y/o (III) estar inducidas por estímulos de tipo antigénico y ser consecuencia de la respuesta inmunitaria generada frente al parásito (Toledo *et al.*, 2006a).

#### **1.1.2.4. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS**

En esta sección se recogen los antecedentes en el estudio de la respuesta inmunitaria generada frente a *E. caproni* en hospedadores de alta y baja compatibilidad. Estos conocimientos se presentan como un resumen descriptivo de las características de la respuesta generada en cada tipo de hospedador. La trascendencia de cada respuesta en el curso de la infección será analizada con más detalle en el segundo apartado de este capítulo, dedicado a los mecanismos implicados la expulsión de helmintos intestinales. Por otra parte, tampoco se incluyen en este punto las respuestas histopatológicas, que fueron descritas en el apartado anterior (1.1.2.3).

##### ***a) Respuestas de Anticuerpos***

El estudio de las respuestas de anticuerpos en infecciones primarias por echinostomas ha puesto de manifiesto que la generación de dichas respuestas depende de la especie hospedadora. En el caso de *E. caproni*, Sotillo *et al.* (2007) analizaron de forma comparada la cinética de inmunoglobulina (Ig) M, IgA y diferentes subclases de IgG en el suero y la mucosa intestinal de ratones y ratas infectados. Los resultados mostraron

respuestas tempranas e intensas de IgM en suero, con máximos en la primera y segunda spi en ambos hospedadores. La generación de este tipo de respuestas sugiere la existencia de antígenos timo-independientes que interactúan rápidamente con el sistema inmunitario. Esto se ve apoyado por el desarrollo de respuestas intensas de IgG3 en los ratones infectados, las cuales están relacionadas con antígenos timo-independientes de tipo carbohidrato, que pueden inducir un cambio de isotipo hacia la producción de esta clase de IgG (Snapper *et al.*, 1992).

La respuesta sérica de IgG total fue significativamente mayor en ratones que en ratas infectadas, siendo diferentes también las cinéticas de IgG1 e IgG2a entre las dos especies. En ratones infectados se detectaron niveles significativos de IgG total a partir de la 2 spi. En este hospedador, los resultados sugirieron además el desarrollo de respuestas sistémicas polarizadas hacia un fenotipo Th2, al estar caracterizadas por una intensa producción de IgG1 desde la 3 spi. En hámsteres, que son igualmente hospedadores de alta compatibilidad, los incrementos de IgG detectados en suero fueron aún mayores que los observados en ratones, si bien la respuesta era más lenta (Simonsen *et al.*, 1991; Toledo *et al.*, 2004b). En cambio, en las ratas infectadas solo se detectaron incrementos leves, aunque significativos, de IgG total a partir de la 7 spi. En este caso predominaron inicialmente las respuestas de IgG2a. No obstante, a partir de la 7 spi, coincidiendo con el inicio de la desparasitación de los animales, se detectaron ligeros incrementos en la producción de IgG1, que apuntan a que la expulsión podría estar asociada a respuestas sistémicas balanceadas Th1/Th2.

La cinética de IgA sérica también mostró diferencias entre hospedadores, incrementándose progresivamente a lo largo de la infección en ratón, mientras que en rata solo se detectaron incrementos estadísticamente significativos en la 1 y 2 spi, volviendo después a valores similares a los de los controles negativos (Sotillo *et al.*, 2007).

Los antígenos diana de los anticuerpos circulantes fueron estudiados por Sotillo *et al.* (2008) siguiendo una aproximación inmunoproteómica. Estos autores encontraron, en los antígenos de excreción/secreción (ES) de *E. caproni*, cuatro proteínas que eran



reconocidas por diferentes isotipos de inmunoglobulina presentes en el suero de ratones infectados, aunque el perfil de reconocimiento fue diferente para cada una de ellas. Las proteínas reconocidas fueron: enolasa, actina, proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) y aldolasa. La enolasa era reconocida a dos alturas diferentes por isotipos distintos: siete *spots* aparecieron a 46 kDa, su peso esperado, y fueron reconocidos por IgA, IgG o por IgG e IgG1 simultáneamente; mientras que un octavo *spot*, a 72 kDa, resultó ser una forma glicosilada de la proteína la cual era reconocida por IgM. Este resultado indica que las formas glicosiladas de la enolasa podrían estar implicadas en la generación de respuestas tempranas, de tipo timo-independiente, mediadas por IgM. También se encontraron respuestas de IgM frente a actina y HSP70, sugiriendo que estas proteínas se exponen tempranamente al hospedador y pueden tener importancia en el establecimiento del parásito. Por otra parte, HSP70 y aldolasa estaban reconocidas por IgA, lo que podría estar relacionado con el estrecho contacto de estas proteínas con la mucosa del hospedador.

En lo que se refiere a la respuesta de anticuerpos a nivel local, en la mucosa intestinal, Sotillo *et al.* (2007) solo detectaron respuestas positivas de IgM en ratones infectados a partir de la 8 spi. Las respuestas locales de IgG1 e IgG2a fueron más lentas y de menor intensidad que en suero en ambos hospedadores, con incrementos ligeros de IgG1 e IgG2a en ratón, mientras que en rata únicamente se detectaron niveles significativos de IgG2a que alcanzaron el máximo en la 7-8 spi, coincidiendo con la expulsión de los adultos de la luz intestinal. Finalmente, solo se detectó IgA local en el intestino de ratones infectados entre la 2 y la 8 spi.

Recientemente, Sotillo *et al.* (2014) demostraron que las respuestas de anticuerpos en el hospedador de alta compatibilidad (ratón) pueden ser atribuidas mayoritariamente a la presencia de antígenos de tipo carbohidrato en el producto de ES (ESP) del parásito. El tratamiento del antígeno de ES con O-glicosidasa, N-glicosidasa o ambas resulta en una reducción significativa e incluso en la pérdida de reconocimiento antigénico por diferentes isotipos y clases de inmunoglobulinas presentes el suero de

animales infectados. La respuesta de IgG1 fue la más afectada por la deglicosilación del antígeno, sugiriendo que la respuesta frente a *E. caproni* mediada por esta clase de inmunoglobulina se debe casi exclusivamente a antígenos de tipo carbohidrato y, por tanto, que los glicanos presentes en el ESP son los principales responsables de la polarización de la respuesta sistémica hacia un fenotipo Th2 en este hospedador. La deglicosilación de los antígenos también afectó, aunque en menor medida, al reconocimiento por IgG total e IgG3 séricas. No obstante, observaron que la reactividad de IgM frente a los antígenos deglicosilados era mayor que frente al producto nativo, no tratado. Este resultado pone de manifiesto que los carbohidratos son capaces de enmascarar antígenos peptídicos, lo que puede constituir un mecanismo del parásito para evadir la respuesta humoral del hospedador.

#### **b) Respuestas de Citoquinas**

La caracterización de las respuestas de citoquinas tiene especial interés para el conocimiento de los mecanismos implicados en las infecciones helmínticas. Los primeros trabajos llevados a cabo en esta línea con el trematodo intestinal *E. caproni* fueron realizados por Brunet *et al.* (2000). Estos autores estudiaron la respuesta generada en ratón durante las fases iniciales de la infección, analizando la producción de citoquinas en células de bazo y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) mediante ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima). Los esplenocitos no respondieron a la estimulación antigénica. En cambio, las células de NLM expresaron interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y, en menor cantidad, interleuquina (IL)-4 e IL-5, por lo que los autores sugirieron el desarrollo de un fenotipo balanceado Th1/Th2 a nivel local.

Más recientemente, Trelis *et al.* (2011) caracterizaron, mediante retrotranscripción y PCR a tiempo real (RT-PCRrt), las cinéticas de expresión de citoquinas generadas *in vivo* frente a *E. caproni* en hospedadores de alta y baja compatibilidad (ratones y ratas, respectivamente). A nivel del bazo, en ratones se pudo observar el predominio de una respuesta Th1 mediada por IFN- $\gamma$ , mientras que en ratas se detectó un fenotipo Th2 caracterizado por incrementos en la expresión de IL-13, IL-5 y, en menor

medida, de IL-10. En los sitios de estimulación de la respuesta intestinal, placas de Peyer y NLM, los perfiles de citoquinas también fueron diferentes entre las dos especies. En ratas, se detectaron aumentos en la expresión de citoquinas de tipo Th2, como IL-13 e IL-4, además de ligeros incrementos en la expresión del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). En ratones se observó un fenotipo balanceado Th1/Th2, con incrementos en la expresión de citoquinas de ambos tipos (IL-4, IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), sin un predominio claro en ninguna dirección. A nivel del tejido intestinal, la respuesta fue notablemente diferente entre ratones y ratas. En este último hospedador se detectaron respuestas locales de tipo Th2, con aumentos importantes en la expresión de IL-13, IL-5 e IL-6. Por el contrario, en ratones, el establecimiento de infecciones crónicas fue asociado con el desarrollo de respuestas locales de tipo Th1 con una expresión elevada de IFN- $\gamma$ .

A pesar de que, como se describe más adelante en este capítulo, el paradigma clásico Th1/Th2 ha sido enriquecido recientemente con la participación de nuevas poblaciones celulares que parecen ejercer un rol importante en la modulación y el desarrollo de respuestas efectivas frente a este tipo de patógenos, la inducción de respuestas Th2 se sigue asociando, y es fundamental, para la rápida expulsión de los helmintos. Por el contrario, el desarrollo de respuestas Th1 está vinculado al establecimiento de infecciones crónicas y al aumento de la inmunopatología asociada a la infección. En este sentido, los resultados de Trelis *et al.* (2011) sugieren que el modelo *E. caproni*- roedor se ajusta a este viejo paradigma. Los mecanismos efectores a través de los cuales la citoquinas de tipo Th2 son capaces de inducir la expulsión de los vermes alojados en la luz intestinal y su trascendencia en el curso de la infección con *E. caproni* se describen de forma detallada en el Apartado 1.3. de este capítulo, dedicado a la expulsión de helmintos intestinales.

### ***c) Respuesta Celular***

La respuesta celular frente a *E. caproni* en infecciones crónicas fue estudiada por Sotillo *et al.* (2012), en un trabajo en el que se analizaron la cinética de las poblaciones circulantes de linfocitos B (CD19+) y T (CD3+) y los perfiles de los diferentes fenotipos de

células T en ratones infectados experimentalmente. Los resultados mostraron una alteración de las poblaciones de linfocitos circulantes a lo largo de la infección, caracterizada por un descenso en el porcentaje de células CD3+ que puede atribuirse a un aumento simultáneo en la población de linfocitos CD19+. El ratio CD4+/CD8+ también se vio significativamente afectado debido a un incremento temprano y progresivo en la población CD8+, al tiempo que la población CD4+ se mantuvo estable. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Brunet *et al.* (2000), en los que no se detectaron cambios en estas poblaciones celulares a nivel de los NLM de ratones infectados con *E. caproni*.

Puesto que los linfocitos T CD8+ circulantes constituyen una de las principales fuentes de IFN- $\gamma$  (Szabo *et al.*, 2002), los resultados aportados por Sotillo *et al.* (2012) sugieren que estas células pueden estar directamente implicadas en el establecimiento y supervivencia de *E. caproni* en el hospedador de alta compatibilidad a través de la producción de esta citoquina proinflamatoria.

## **1.2. SYPHACIA MURIS**

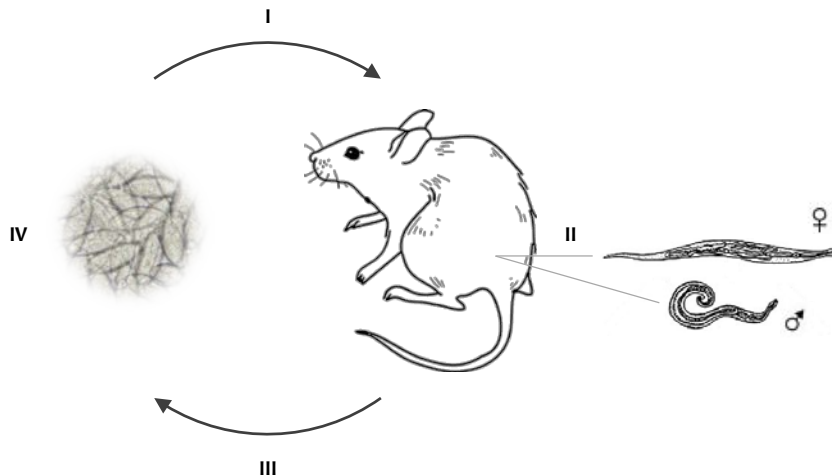
---

*Syphacia muris* Yamaguti, 1941, el oxyúrido común de las ratas, fue descrito inicialmente por Yamaguti (1935) como *Enterobius muris*, por la similitud de las hembras aisladas del ciego de ratas albinas con las de *Enterobius vermicularis*. Posteriormente, en 1941, este mismo autor describió los machos y cambió la clasificación original de *E. muris* al género *Syphacia* Seurat, 1916. De esta manera, la especie *S. muris* queda clasificada en el phylum Nematoda, que agrupa a los gusanos redondos, orden Oxyurida y familia Oxyuridae, que alberga 11 géneros parasitarios de mamíferos, entre ellos el género *Syphacia*, con más de 60 especies parásitas de roedores y lagomorfos (Adamson, 1994), que van aumentando con nuevas identificaciones más recientes (véase, como ejemplos más recientes: Robles & Navone, 2007a, 2007b, 2010; Weaver & Smales, 2008, 2010; Dewi & Hasegawa, 2010; Herrera *et al.*, 2011).

Dentro de la familia Oxyuridae, los miembros de la subfamilia *Syphaciinae*, en la que se incluye el género *Syphacia*, presentan en general una gran especificidad por su hospedador (Hugot, 1990; Robles, 2010) y a menudo se han considerado como marcadores de los procesos de especiación de sus hospedadores (Weaver & Smales, 2008, 2010). Sin embargo, estudios filogenéticos basados en marcadores moleculares como el gen de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa mitocondrial (CO1) (Okamoto *et al.*, 2007) o el gen 28S del rDNA (Okamoto *et al.*, 2009) han puesto de manifiesto que las relaciones coevolutivas entre las especies de oxyúridos y sus hospedadores roedores pueden no ser tan estrictas y que el cambio de hospedador ha podido suceder de forma frecuente durante el curso de la evolución. En este sentido, varios estudios sobre las poblaciones de helmintos intestinales que afectan a los animales de laboratorio han reportado la existencia de transmisión experimental y natural de especies del género *Syphacia* entre roedores de laboratorio (Wightman *et al.*, 1978; Ross *et al.*, 1980; Kellogg & Wagner, 1982; Pinto *et al.*, 2003). Más recientemente, Hasegawa *et al.* (2008) encontraron nuevas asociaciones *Syphacia* spp.-hospedador en hámsteres criados como animales de compañía. Estos autores sugieren que la cría de diferentes especies de roedores, igual que la estabulación, genera unas condiciones que facilitan el intercambio de oxyúridos entre especies hospedadoras distintas, dando lugar a parasitismos poco habituales en la naturaleza.

### **1.2.1. CICLO BIOLÓGICO**

El ciclo biológico de *S. muris* es monoxeno directo y se completa rápidamente utilizando a la rata como único hospedador (Figura 1.2.). Stahl (1963) describió detalladamente el ciclo en animales de laboratorio. Las ratas adquieren la infección al ingerir huevos embrionados que eclosionan en el duodeno y las larvas emergentes migran a lo largo del intestino delgado hasta llegar al intestino grueso. La maduración de estas larvas es rápida y a las 72 h, tras haber sufrido 3 mudas, ya están sexualmente diferenciadas. Transcurridos 4 días desde la infección ya se pueden encontrar hembras fecundadas en el ciego de los animales parasitados, las cuales son grávidas a los 6 dpi. Los adultos de *S. muris* residen en el ciego y colon anterior de sus hospedadores, donde se



**Figura 1.2.- Ciclo biológico de *Syphacia muris*.** I. Ingestión de huevos embrionados; II. Eclosión de los huevos en el duodeno, migración de las larvas al intestino grueso y maduración hasta vermes adultos machos y hembras; III. Puesta de huevos en los márgenes perianales; IV. Diseminación y maduración de los huevos en el ambiente.

alimentan de las bacterias presentes en el lumen y, en ningún caso, de tejidos del hospedador. Una vez grávidas, las hembras parásitas migran periódicamente hacia el ano y depositan los huevos, cubiertos por una capa adhesiva, en los márgenes perianales. El periodo prepatente es relativamente corto, tiene una duración de solo 7 u 8 días, y las hembras grávidas pueden albergar entre 450 y 550 huevos en su útero. Estos huevos se vuelven infectivos entre las 5 y 20 horas siguientes a la puesta y son altamente resistentes en condiciones ambientales. Las características del ciclo hacen que, además de la sencillez con que se disemina esta infección, sea frecuente la autoinfección exógena de los animales, lo que dificulta su erradicación. En algunos casos, además, se han encontrado estadios larvarios del parásito en el colon, por lo que se ha sugerido la posibilidad de que se den fenómenos de retroinfección como sucede en el caso de *E. vermicularis*, el oxyúrido humano más habitual.

*S. muris* es una especie dioica con un claro dimorfismo sexual. Además de las diferencias morfológicas entre machos y hembras, de las que se hablará a continuación, es importante resaltar que estos parásitos presentan un tipo de reproducción característico, la haplodiploidía. Los oxyúridos son los únicos nematodos que presentan este tipo de reproducción particular, el cual implica que mientras que los machos provienen de huevos no fertilizados y son haploides, las hembras descienden de huevos fertilizados y son organismos diploides (Adamson, 1994).

Pinto *et al.* (2001) llevaron a cabo un estudio morfométrico de los adultos de *S. muris* aislados a partir de ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus* cepa Wistar) en Brasil. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias respecto a las descripciones anteriores realizadas por Yamaguti (1935, 1940) y Quentin (1971) en Japón y Francia, respectivamente. Los adultos de *S. muris* son pequeños, finos y de color blanquecino cuando están vivos. Tanto machos como hembras presentan aletas cefálicas evidentes, aunque el dimorfismo sexual es acusado. Como sucede en la mayoría de los oxyúridos, los machos son de menor tamaño y tienen una vida más corta que las hembras. Los machos de los oxyúridos son pedomorfos, es decir, su morfología es similar a la de las hembras juveniles en muchas características, en parte porque maduran más rápidamente que estas (Adamson, 1994). Miden aproximadamente 1 mm de longitud y presentan tres mamelones en la cara ventral de la porción posterior del cuerpo. La boca está formada por tres labios. Los dos labios subventrales presentan una estructura en forma de papila, mientras que el labio dorsal presenta dos estructuras similares, una a cada lado. El esófago es oxiuriforme y el anillo nervioso periesofágico. En la parte posterior del cuerpo, poseen una única espícula y gubernáculo con gancho accesorio distal. En el extremo posterior presentan además tres pares de papilas caudales, la abertura cloacal y un apéndice caudal. Las hembras son de mayor tamaño, superior a los 2 mm, y más gruesas. La boca y el esófago tienen las mismas características que en los machos. El anillo nervioso también es periesofágico y el poro excretor anterior. La vulva se localiza al final del tercio anterior del cuerpo. Finalmente, los huevos son ovalados, con un lateral aplanado y un tamaño aproximado de 69x29  $\mu\text{m}$ .

### 1.2.2. INFECCIÓN EN ANIMALES DE LABORATORIO

Los nematodos parásitos pertenecientes al orden Oxyurida están muy extendidos y son causantes de infecciones comunes en colonias de roedores de laboratorio, incluso en aquellas específicamente libres de patógenos. Este orden incluye nematodos parásitos de ratones, como *Syphacia obvelata* y *Aspiculuris tetraptera*; de ratas, *S. muris*; de jerbos, *Dentostomella translucida*; de hámsteres, *Syphacia mesocriceti* y de cobayas, *Paraspidodera uncinata* (Taffs, 1976; Pritchett & Johnston, 2002). Estas infecciones no pueden ser transmitidas al ser humano (Marx, 1991).

Los miembros de este orden presentan ciclos monoxenos muy similares al de *S. muris*, descrito anteriormente, por lo que la transmisión directa de estas infecciones por medio del alimento, el agua o el lecho de las jaulas es frecuente en condiciones de estabulación. Esto resulta en una reexposición continua de los animales al parásito, transformándose en un parasitismo habitual que puede afectar a los resultados experimentales en estudios de diversa índole. De hecho, los huevos de estos nematodos se consideran como contaminantes ambientales persistentes en los animalarios, por lo que a menudo se aplican medidas de saneamiento dirigidas a la eliminación de los huevos en las instalaciones donde se estabulan los animales de experimentación. Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que el polvo de los animalarios, las jaulas sucias y los propios trabajadores actúan como factores de transmisión que contribuyen significativamente a la diseminación de estas infecciones en este tipo de instalaciones (Lytvynets *et al.*, 2013). Estos autores detectaron huevos de *S. muris* en un 28,7% de los agujeros del sistema de ventilación del animalario y en aproximadamente la mitad (50,8%) de las jaulas usadas (antes de lavarlas), mientras que el 37,9% del personal técnico tenía huevos adheridos a sus manos.

La prevalencia de oxyúridos en una población de roedores infectada depende de numerosos factores, incluyendo la carga ambiental, el género, la cepa y el estatus inmunitario del animal (King & Cosgrave, 1963; Eaton, 1972; Jacobson & Reed, 1974; Taffs, 1976; Derothe *et al.*, 1997). Por lo general, se alcanzan cargas parasitarias más elevadas



en machos que en hembras (Eaton, 1972; Behnke, 1975; Taffs, 1976; Derothe *et al.*, 1997) y el número de vermes adultos disminuye al aumentar la edad del hospedador (Panter, 1969; Eaton, 1972; Behnke, 1976; Taffs, 1976). Además, los animales pueden estar infectados con más de uno de estos parásitos al mismo tiempo (véase, por ejemplo: Eaton, 1972; Taffs, 1976; MacArthur & Wood, 1978; Scott, 1986; Pinto *et al.*, 2003; Hasegawa *et al.*, 2008).

#### **1.2.2.1. EFECTOS DE LA INFECCIÓN SOBRE INVESTIGACIONES NO RELACIONADAS**

Al referirse al estatus microbiológico de los animales de laboratorio se debe tener en cuenta que infección no es sinónimo de enfermedad. El término infección hace referencia a la presencia de agentes infecciosos, los cuales pueden ser patógenos, oportunistas o comensales, siendo los dos últimos los más comunes. Pocos agentes encontrados hoy en los animales de laboratorio causan enfermedades clínicas manifiestas, por lo que no se suele considerar la posibilidad de que afecten a los resultados de las investigaciones. Sin embargo, animales que aparentemente están normales y sanos pueden resultar inadecuados debido a los efectos locales y/o sistémicos, inapreciables pero significativos, causados por posibles infecciones víricas, bacterianas o parasitarias (Baker, 1998).

Los oxyúridos son un buen ejemplo de este tipo de infecciones (Peréc-Matysiak *et al.*, 2006). A pesar de que las infecciones por estos parásitos suelen ser subclínicas, cargas parasitarias elevadas han sido asociadas con prolapso rectal, enteritis mucoide u obstrucción e intususcepción intestinal (Taffs, 1976; Baker, 1998). Además, se ha demostrado que las especies del género *Syphacia* pueden tener efectos importantes sobre el crecimiento de las ratas (Wagner, 1988).

Hay pocos trabajos publicados que reflejen el efecto de estas infecciones sobre la investigación con animales portadores. No obstante, existen algunos artículos que ponen de manifiesto cómo infecciones no controladas por especies del género *Syphacia* han afectado a los resultados experimentales obtenidos en estudios no relacionados. El primer reporte sobre la reducción de los efectos de la artritis en roedores infectados con

helmintos fue publicado por Pearson & Taylor (1975) al observar el efecto de una infección no controlada con *S. obvelata* sobre un grupo de ratas a las que se les había inducido la enfermedad. Los resultados mostraron que los animales infectados presentaban una incidencia menor de artritis y una menor severidad de la enfermedad que los animales que habían sido tratados de la infección antes de inducirles la patología. Por otra parte, Lübcke *et al.* (1992) demostraron que la infección con *S. muris* alteraba la absorción de agua y electrolitos en el intestino en un modelo de ratas hipertensas y normotensas.

Más recientemente, Michels *et al.* (2006) observaron que la infección con *S. obvelata* tenía un efecto importante sobre la respuesta alérgica a los antígenos alimentarios, viendo que los ratones infectados desarrollaban choques anafilácticos más severos cuando se inmunizaban contra la ovoalbúmina. Estos mismos autores mostraron que la infección con *S. obvelata* inducía una respuesta transitoria de tipo Th2, con incrementos en la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 y aumento en la producción de IgG1 específica. Por el contrario, en ratones deficientes en IL-13, IL-4/13 o la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-4 (IL-4R) se aumentaba la producción de IFN- $\gamma$  e IgG2a específica y presentaban cargas parasitarias hasta más de cien veces superiores. Previamente, Sato *et al.* (1995) estudiaron la respuesta de anticuerpos frente a *S. obvelata* en ratones AKR/J, poniendo de manifiesto la reactividad cruzada de estos anticuerpos con los antígenos de otras especies del género *Syphacia*. Estos autores observaron también que la infección alteraba la respuesta humoral frente a antígenos de naturaleza no parasitaria, indicando que podría modular el sistema inmunitario del hospedador y afectar a experimentos no relacionados.

La infección con *S. obvelata* induce también alteraciones hematopoyéticas, caracterizadas por una eritropoyesis y mielopoyesis aumentadas y una sensibilidad alterada de los progenitores mieloides y eritroides a la IL-17 (Bugarski *et al.*, 2006). Los efectos de la infección sobre las células de la médula ósea se manifiestan también a nivel molecular, con la alteración de varias vías de transducción de señales y aumento en la expresión del RNA mensajero (mRNA) de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Ilić *et*

*al.*, 2010). Los resultados aportados por estos trabajos ponen de manifiesto la importancia de mantener los animales de experimentación bajo condiciones libres de oxyúridos, lo que hace necesario el desarrollo de métodos de control de estos parásitos y un mejor conocimiento de sus relaciones con el hospedador.

### **1.2.2.2. TRATAMIENTO Y ESTRATEGIAS DE ERRADICACIÓN**

Pritchett & Johnston (2002) llevaron a cabo una revisión exhaustiva de los tratamientos empleados hasta entonces para la erradicación de oxyúridos en colonias de roedores de laboratorio, en base a lo cual propusieron una serie de recomendaciones para la aplicación de los mismos y el manejo de las colonias infectadas, las cuales se resumen al final de este apartado.

Los grupos farmacológicos que se han empleado tradicionalmente y aún están en uso para el tratamiento de las infecciones por *S. muris* en colonias de ratas de laboratorio son las avermectinas y los benzimidazoles. Las avermectinas son un grupo de lactonas macrocíclicas, cuyo componente más utilizado es la ivermectina, que tienen actividad antihelmíntica debido a que originan la apertura de los canales de Cl<sup>-</sup> acoplados al receptor de glutamato causando la entrada de Cl<sup>-</sup> en las células, con la consiguiente hiperpolarización y parálisis muscular del verme (Köhler, 2001). Varios autores han demostrado la efectividad del uso de ivermectina oral, a una dosis de 2,0 mg/kg/día, administrada directamente mediante una sonda o a través del agua de bebida, en las infecciones por *S. muris* en animalarios (Battles *et al.*, 1987; Huerkamp, 1993; Kerrick *et al.*, 1995). Estudios más recientes han evaluado la efectividad de otras lactonas macrocíclicas, doramectina y moxidectina, administradas a través de la dieta mediante el uso de piensos medicamentosos, observando que el uso de doramectina fue eficaz para erradicar la infección, pero no en cambio el tratamiento con moxidectina (Öge *et al.*, 2000). También se ha testado la efectividad de selamectina tópica, si bien los resultados obtenidos han puesto de manifiesto su escasa utilidad, presentando unos niveles de inefectividad del 100% y 51,61% en los dos estudios publicados al respecto (Hill *et al.*, 2006; Esatgil *et al.*, 2008). Sevimli *et al.* (2009) evaluaron la eficacia de una dosis única de

doramectina, eprinomectina y selamectina en el tratamiento de la infección por *S. muris* y obtuvieron valores de efectividad del 99,32%, 100% y 98,77%, respectivamente, a los 7 días postratamiento.

Los benzimidazoles son un grupo farmacológico empleado como antihelmíntico por su capacidad de unirse a la  $\beta$ -tubulina de los nematodos e inhibir la formación de microtúbulos (Köhler, 2001). El más utilizado es probablemente el fenbendazol, el cual ha mostrado su eficacia en numerosos estudios, incluso sin necesidad de aplicar medidas de descontaminación ambiental (Coghlan *et al.*, 1993; Huerkamp *et al.*, 2000, 2004; Barlow *et al.*, 2005). Además, presenta las ventajas de ser un fármaco seguro y de fácil administración en animalarios a través del uso de piensos que contienen el principio activo (Pritchett & Johnston, 2002).

La eficacia de los agonistas nicotínicos también ha sido testada frente a las infecciones con *S. muris*. Ince *et al.* (2010) evaluaron los efectos del levamisol frente a esta infección. Los fármacos de este grupo son agonistas colinérgicos, capaces de unirse a receptores nicotínicos en la membrana de las células somáticas musculares de los nematodos, induciendo la despolarización y parálisis espástica de la musculatura del verme (Köhler, 2001). Los resultados mostraron una eficacia del 98,34% frente a los adultos de *S. muris*.

A pesar de la variedad de tratamientos disponibles para combatir las infecciones por oxyúridos en condiciones de estabulación, la mejor medida es siempre evitar la contaminación de las colonias de animales de laboratorio. Más allá de su eficacia, el uso de fármacos para la eliminación de estos agentes infecciosos puede llevar efectos adversos asociados y/o alterar la fisiología de los animales, interfiriendo igualmente en las investigaciones. En este sentido, algunos de los antihelmínticos citados en este apartado han demostrado tener capacidad para modular la actividad del sistema inmunitario (Baker, 1998; Sajid *et al.*, 2006). La ivermectina ha demostrado tener propiedades inmunoestimuladoras en ratón, al alterar la función de los linfocitos T cooperadores y aumentar la producción de anticuerpos frente a antígenos timo-dependientes (Blakley &

Rousseaux, 1991). El levamisol, además de su actividad antihelmíntica, ha sido ampliamente utilizado por su acción inmunoestimuladora como coadyuvante en el desarrollo de vacunas frente a diferentes patógenos (Wang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; de-la-Rosa-Arana *et al.*, 2012) o como adyuvante en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (Dillman, 2011), entre otras patologías. Por el contrario, el fenbendazol ha mostrado suprimir la capacidad proliferativa de los linfocitos B y T en respuestas inmunitarias secundarias en algunas especies animales, si bien los estudios disponibles no han reportado mielosupresión asociada al tratamiento en roedores (Villar *et al.*, 2007). Cray *et al.* (2008) evaluaron los efectos del tratamiento con fenbendazol en ratones y no observaron diferencias significativas respecto de los animales no tratados en los siguientes parámetros: recuento de células sanguíneas, bioquímica sanguínea, proliferación de esplenocitos inducida por mitógenos de células T y B, ensayos de formación de colonias con células de la médula ósea, rechazo de injertos de piel ni respuestas humorales primarias ni secundarias. Sin embargo, Landin *et al.* (2009) sugieren que este tratamiento puede alterar la sensibilidad inmunitaria al reducir la expresión de E2A, un factor de transcripción crucial para los linfocitos B, en los precursores activados de linfocitos B obtenidos de la médula ósea y el bazo de ratones tratados.

En cuanto a las medidas de descontaminación ambiental en el tratamiento de las infecciones por oxyúridos en los animalarios, hay que señalar que la utilidad de su aplicación es controvertida. En los estudios que analizan la efectividad de los tratamientos antihelmínticos la aplicación de estas medidas es variada, por lo que resulta difícil extraer conclusiones que permitan evaluar su utilidad. Algunos de los trabajos citados anteriormente hacen hincapié en la efectividad del tratamiento sin necesidad de descontaminación ambiental (Coghlan *et al.*, 1993; Huerkamp *et al.*, 2000, 2004; Barlow *et al.*, 2005). Sin embargo, la utilidad de estas medidas debe apreciarse no solo en términos de eliminación de la infección, sino también en lo que se refiere a limitar su diseminación y prevenir la reintroducción. Por estos motivos, son necesarios nuevos estudios que evalúen la sensibilidad de los huevos a los detergentes y agentes de saneamiento ambientales habituales, así como la efectividad de las diferentes modalidades

de jaulas y estanterías en el control de la diseminación de estas formas de resistencia. Solo de esta manera se podrá determinar su utilidad y eficacia en el mantenimiento de unas condiciones libres de oxyúridos (Pritchett & Johnston, 2002).

De acuerdo con lo expuesto en este apartado, queda probada la importancia y necesidad de mantener los animalarios bajo condiciones óptimas, que eviten no solo la contaminación con oxyúridos, sino la necesidad de someter a los animales a ciclos reiterados de tratamiento farmacológico para el control y erradicación de estas infecciones. Con esta finalidad, por último se proponen un conjunto de recomendaciones para el manejo de colonias de animales de experimentación, basadas en las realizadas por Pritchett & Johnston (2002), y que pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Control del personal y de los animales que entran en el animalario.
- Educación del personal investigador y técnico en relación a este grupo de contaminantes y, si es posible, evitar el contacto con roedores externos.
- En caso de contaminación, seleccionar el tratamiento más adecuado (fármaco, dosis, vía y forma de administración). Pritchett & Johnston (2002) recomiendan, para el tratamiento de los oxyúridos en general, la utilización de piensos medicamentosos con fenbendazol (150 ppm) durante al menos tres períodos de una semana, alternados con una semana de dieta normal. Estos autores aconsejaban el fenbendazol frente a la ivermectina por su actividad ovicida, larvicida y adulticida, su amplio margen terapéutico y la menor interferencia documentada con los resultados de investigación. Los estudios posteriores han avalado la eficacia de este principio activo en el tratamiento de las infecciones por *S. muris* (Huerkamp *et al.*, 2004; Barlow *et al.*, 2005), si bien su capacidad de no interferir en los resultados de investigación es aún hoy controvertida (Cray *et al.*, 2008; Landin *et al.*, 2009).
- Considerar las posibles resistencias al antihelmíntico seleccionado antes de iniciar el tratamiento.

- Tratar a todos los animales del área contaminada.
- Evaluar la efectividad del tratamiento.
- A pesar de la controversia, es recomendable la realización de al menos un ciclo de descontaminación ambiental, preferentemente tras completar la primera semana de tratamiento.

### **1.3. EXPULSIÓN DE HELMINTOS INTESTINALES**

---

En el contexto de las helmintiasis intestinales, la respuesta local generada por el hospedador resulta fundamental para determinar la evolución de la infección. En este apartado se abordan diferentes aspectos de la respuesta intestinal generada frente a este grupo de parásitos, desde las principales poblaciones de células inmunitarias que intervienen, hasta los mecanismos efectores, que son los responsables últimos de la expulsión de los helmintos de la luz intestinal. Sin perder de vista el objeto de la presente Tesis Doctoral y, si bien en apartados anteriores se han descrito las características más relevantes con relación a los aspectos inmunológicos e inmunopatológicos en las infecciones por *E. caproni*, en los siguientes apartados se analiza además la trascendencia que estas respuestas pueden tener sobre el curso de la infección con este trematodo.

El tracto gastrointestinal constituye la mayor superficie de contacto entre el organismo y el medio externo, convirtiéndose en la principal vía de entrada de patógenos al organismo. Asimismo, este tejido está continuamente expuesto a una gran variedad de antígenos alimentarios y de la microbiota comensal que necesitan ser tolerados para garantizar la homeostasis intestinal. Teniendo en cuenta estos requisitos, no resulta sorprendente que el sistema gastrointestinal constituya el órgano linfoide más extenso de todo el organismo, con una amplia red de órganos linfoides secundarios y poblaciones enormes de linfocitos. Por otra parte, el epitelio intestinal no funciona únicamente como

una barrera física, sino que actúa también como regulador de las respuestas innatas y adaptativas generadas frente a sustancias extrañas y agentes infecciosos. Así pues, el mantenimiento de la función barrera en este órgano es multifactorial y requiere la participación de componentes tanto de la inmunidad natural como adquirida. Estas características permiten al sistema inmunitario intestinal responder de forma rápida y localizada, el cual tras su activación es capaz de inducir una gran variedad de mecanismos efectores de respuesta cuya finalidad es garantizar la protección del hospedador (Izcue *et al.*, 2009; Bulek *et al.*, 2010).

En los siguientes apartados se abordan las características más destacadas en lo que se refiere a la generación de respuestas para la protección del hospedador frente a helmintos intestinales. No obstante, es importante tener en consideración que la participación y trascendencia de cada uno de estos mecanismos en la expulsión depende de cada sistema parásito-hospedador. La mayoría de los mecanismos a los que se hace referencia en este punto han sido descritos y ampliamente estudiados en modelos de infección con nematodos parásitos, por lo que en muchos casos solo se refiere la información disponible para este grupo de helmintos. Finalmente, cabe resaltar que algunos de los mecanismos descritos a continuación han sido objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral.

### **1.3.1. RESPUESTA INMUNITARIA INTESTINAL: INMUNIDAD FRENTE A HELMINTOS**

El sistema gastrointestinal está asociado a diferentes tipos de órganos linfoides secundarios, conocidos en conjunto como tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal o GALT, por sus siglas en inglés (*gut-associated lymphoid tissue*). Entre estos órganos linfoides destacan las placas de Peyer, con una estructura similar a la de los nódulos linfáticos, con grandes folículos de células B y áreas de células T. Estas estructuras están recubiertas por un epitelio especializado en el transporte de antígenos exógenos, cuya función consiste en ponerlos en contacto con células presentadoras de antígenos como las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Esta función la realizan las denominadas



células M, células epiteliales especializadas, morfológica y funcionalmente diferenciadas de los enterocitos, que se encargan de recoger los antígenos presentes en el lumen intestinal y transferirlos a las células inmunitarias subyacentes. Cuando son activados, los linfocitos T y B inmaduros se transforman en células efectoras o de memoria y migran desde las placas de Peyer a los NLM a través de los conductos linfáticos aferentes. A continuación, a través del conducto torácico pasan a sangre periférica, desde donde son extravasados a los sitios efectoras de la mucosa. Este proceso está dirigido por el perfil de moléculas de adhesión y quimioquinas expresadas a nivel de la microvasculatura intestinal, de modo que las células endoteliales ejercen un papel destacado en la inmunidad de mucosas. La lámina propia constituye el sitio efector en el intestino, albergando diferentes poblaciones de células inmunitarias como linfocitos B, células plasmáticas productoras de anticuerpos, células T CD4+, CD8+ y linfocitos T  $\gamma\delta$ , además de poblaciones de células de la inmunidad innata como los granulocitos, entre otras (Brandtzaeg, 2009; Izcue *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2009). En este escenario, no hay que olvidar el destacado papel que el epitelio intestinal ejerce en la activación y regulación de la inmunidad de la mucosa, actuando como un mediador clave en la interacción entre las respuestas innata y adaptativa a este nivel (Bulek *et al.*, 2010).

### **1.3.1.1. RESPUESTAS TH2 FRENTE A HELMINTOS INTESTINALES**

En la mayoría de modelos de helmintiasis intestinales se desencadenan respuestas protectoras de tipo Th2, caracterizadas por la producción de determinadas citoquinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Patel *et al.*, 2009; Allen & Maizels, 2011; Filbey *et al.*, 2014). La producción de citoquinas Th2 se induce rápidamente tras la infección por helmintos, antes de que se desarrollen respuestas patógeno-específicas. Así pues, a pesar de que la expulsión final de los vermes requiere respuestas adaptativas específicas, el desarrollo de respuestas polarizadas tempranas resulta fundamental para limitar inicialmente la infección. En este contexto, las células del epitelio intestinal juegan un papel importante. Tras la infección, las células epiteliales producen y liberan citoquinas como IL-25, IL-33 y TSLP (linfopoyetina estromal tímica) capaces de activar a varias poblaciones de células de la inmunidad innata, las cuales responden produciendo

citoquinas de tipo 2 (Bulek *et al.*, 2010; Koyasu & Moro, 2011; Maizels *et al.*, 2012; Grecnis *et al.*, 2014).

La TSLP se considera una citoquina inductora de Th2 por su capacidad de modular a las células dendríticas para que dirijan la diferenciación de los linfocitos T CD4+ inmaduros a células Th2. Las células dendríticas activadas de esta manera producen además un conjunto de quimioquinas atrayentes de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos Th2 al lugar de infección (Soumelis *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 2005). La IL-25, por su parte, es un miembro de la familia de la IL-17 producida por linfocitos Th2 y mastocitos, además de por células epiteliales (Ikeda *et al.*, 2003). La administración de esta citoquina induce producción de IgE, eosinofilia y aumento en la producción de IL-4, IL-5 y IL-13 en ratón (Fort *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). Además, ratones deficientes en IL-25 han mostrado dificultades en el desarrollo de respuestas Th2 efectivas en el control de la infección y la eliminación de los adultos de *Nippostrongylus brasiliensis* y *Trichuris muris* (Hurst *et al.*, 2002; Fallon *et al.*, 2006). Finalmente, la IL-33 es un miembro de la familia de la IL-1 que se expresa en diferentes tipos celulares como fibroblastos, células endoteliales y epiteliales. Esta citoquina es habitualmente nuclear, donde actúa como represor de la transcripción. Cuando se inicia la apoptosis celular, ciertas caspasas cortan la proteína dejándola inactiva. Por el contrario, en las células que mueren de forma necrótica, la IL-33 es liberada al exterior sin fragmentar, donde actúa como una alarmina, estimulando a varios tipos celulares, mastocitos y basófilos entre ellos (Cayrol & Girard, 2009; Yang *et al.*, 2013). La administración de IL-33 induce la producción de citoquinas Th2 (Hung *et al.*, 2013; Zais *et al.*, 2013), además de cambios fisiológicos asociados como producción de IgE, eosinofilia e hiperplasia de células caliciformes (Iikura *et al.*, 2007; Humphreys *et al.*, 2008; Smithgall *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2012). No obstante, a pesar de que la IL-33 es un potente inductor de las respuestas Th2 innatas y es capaz de promover la expulsión de helmintos intestinales, esta citoquina no siempre es necesaria para generar protección (Townsend *et al.*, 2000; Humphreys & Grecnis, 2009; Scalfone *et al.*, 2013)

Diferentes poblaciones de células de la inmunidad innata son capaces de responder a las señales de las células epiteliales y contribuyen a la producción de citoquinas Th2, desde basófilos y mastocitos, a otros tipos celulares descritos más recientemente como nuocitos, células cooperadoras naturales o cooperadores innatos de tipo 2 (Neill *et al.*, 2010; Ohnmacht *et al.*, 2010; Sáenz *et al.*, 2010). Hasta el momento, la relación entre estos tipos celulares no ha sido esclarecida y entre ellos se observan algunas diferencias y similitudes (Koyasu & Moro, 2011). Una característica interesante es que, si bien las respuestas Th2 adaptativas están muy relacionadas con la producción de IL-4, estas células parecen no producir dicha citoquina. En cambio, liberan fundamentalmente IL-5 e IL-13, sugiriendo que esta última sería suficiente para la señalización de las células T inmaduras a través de los IL-4R de tipo 2 (Price *et al.*, 2010). Por el contrario, los basófilos y mastocitos estimulados de la misma manera sí producen IL-4, aunque esta no parece tener un papel fundamental en el desarrollo de respuestas adaptativas efectivas. Se postula pues que la IL-4 con origen en la inmunidad innata puede apoyar la diferenciación a Th2 o bien actuar de forma redundante, junto con la IL-4 liberada por las células T cooperadoras de tipo 2 (Voehringer, 2009).

En cualquier caso, las citoquinas Th2 con origen en la inmunidad innata no solo actúan en la polarización de la respuesta adaptativa, intervienen además en la inducción de mecanismos efectores esenciales para garantizar la protección del hospedador. Sin embargo, y a pesar de que algunos de los mecanismos activados por estas respuestas iniciales pueden ser redundantes a los generados por la inmunidad específica, el desarrollo de una respuesta inmunitaria efectiva frente a helmintos requiere la puesta en marcha de respuestas adaptativas dirigidas por linfocitos T específicos (Phythian-Adams *et al.*, 2010). Así pues, la inmunidad frente a los helmintos debe entenderse como la interdependencia y cooperación entre ambos tipos de inmunidad: natural y adquirida (Allen & Maizels, 2011).

La capacidad de reconocer y distinguir entre diferentes tipos de patógenos es esencial para el desarrollo de respuestas inmunitarias apropiadas. En este sentido, las

células dendríticas son las principales células presentadoras de antígenos del sistema inmunitario, especializadas en reconocer y responder específicamente a los patógenos y dirigir la diferenciación apropiada de los linfocitos T. Phythian-Adams *et al.* (2010) demostraron que la activación de las células dendríticas no solo es suficiente para la diferenciación a Th2 en respuesta a las infecciones por helmintos, como se desprendería de estudios anteriores (Perona-Wright *et al.*, 2006). Estos autores, comprobaron además que estas células presentadoras de antígenos no eran redundantes, sino necesarias para el proceso de polarización, aunque los mecanismos precisos son aún poco conocidos. Observaron, en ratones infectados con *Schistosoma mansoni*, que la depleción de células dendríticas afectaba a la polarización de la respuesta hacia un fenotipo Th2, detectándose además una desviación hacia la producción de IFN- $\gamma$  por poblaciones celulares diferentes a los linfocitos T CD4+. Estas alteraciones se producían a pesar de que la depleción de células dendríticas no era total (alcanzaba el 70-80%), lo que sugiere que otras células presentadoras de antígenos no pueden suplir esta función. Del mismo modo, y aunque el nivel de requerimiento de las células dendríticas para la inducción de respuestas Th2 puede ser variable dependiendo del sistema de estudio, cabe resaltar que se han observado resultados similares en infecciones por *N. brasiliensis* y *Heligmosomoides polygyrus* (Ohnamacht *et al.*, 2009; León *et al.*, 2012).

### **1.3.1.2. PARTICIPACIÓN DE OTRAS POBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4+**

La capacidad de las células del sistema inmunitario de adaptar su función dependiendo del tipo de patógeno que invade el organismo representa una gran ventaja evolutiva. En este sentido los helmintos, parásitos multicelulares relativamente grandes, requieren mecanismos efectores que difieren de las respuestas necesarias para controlar infecciones ocasionadas por otros agentes infecciosos. Los microorganismos intracelulares estimulan habitualmente el desarrollo de respuestas de tipo Th1, caracterizadas por la producción de INF- $\gamma$ , en las que los macrófagos, linfocitos T CD8+, células *natural killer* y neutrófilos son las primeras en intervenir. En este contexto, los macrófagos se activan por la vía clásica para regular al alza el enzima iNOS, que genera óxido nítrico (NO), y junto con los neutrófilos se consideran los primeros respondedores en las respuestas de tipo Th1

(Patel *et al.*, 2009). Así pues, el desarrollo de respuestas adecuadas en función del tipo de patógeno resulta fundamental para garantizar la protección del hospedador. No obstante, el paradigma clásico de respuesta, planteado inicialmente desde una perspectiva bipolar Th1/Th2, ha sido enriquecido recientemente con la identificación y definición de nuevas poblaciones de células T CD4+ que ejercen un papel importante en el desarrollo de respuestas efectivas frente a patógenos de diferente naturaleza.

Al menos cuatro subtipos principales de linfocitos T cooperadores pueden diferenciarse a partir de los precursores inmaduros en los tejidos linfoides secundarios: Th1, Th2, Th17 y linfocitos T reguladores (Treg) inducidos (iTreg), también denominados Treg de tipo 1. Además se ha sugerido la existencia de otras poblaciones diferenciadas tales como Th9 (Veldhoen *et al.*, 2008; Stassen *et al.*, 2012), Th22 (Liang *et al.*, 2006; Duhon *et al.*, 2009) y Thf (células T cooperadoras foliculares) (Crotty, 2011). Sin embargo, aunque se acepta su uso, a falta de un mayor conocimiento sobre sus características fenotípicas, funcionales y/o de diferenciación, aún no se ha podido establecer claramente si estas últimas constituyen poblaciones totalmente diferenciadas o más bien son ramas dentro de las principales familias de linfocitos T cooperadores aceptadas hasta el momento (Basu *et al.*, 2013). A continuación, se describen brevemente las características más destacadas de las poblaciones de linfocitos definidas más recientemente, Th17 y Treg, las cuales se ha demostrado que pueden tener trascendencia en las respuestas frente a helmintos.

#### **a) Respuestas Th17**

Las células Th17 están implicadas en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. Además, participan en la defensa del hospedador dirigiendo la eliminación de bacterias y hongos extracelulares de forma indirecta, al inducir y activar los neutrófilos mediante la producción de citoquinas efectoras características (IL-17A, IL-17F e IL-22); y promoviendo el cambio de isotipo en los linfocitos B para producir IgG opsonizantes (Basu *et al.*, 2013).

La participación de poblaciones de células Th17 y sus citoquinas en las respuestas frente a helmintos en general ha sido ampliamente demostrada en diferentes modelos

experimentales. Por ejemplo, Rutitzky *et al.* (2005, 2008) observaron que una población de células T productoras de IL-17 estaba implicada en el desarrollo de la patología hepática severa causada por la schistosomiasis y que la IL-23, a pesar de no ser necesaria para la inducción de esta población celular, era esencial para el desarrollo de la inmunopatología hepática ocasionada por los huevos de *S. mansoni*. En el modelo experimental de *T. muris* en ratón, la producción de IL-17A ha sido asociada al desarrollo de infecciones crónicas. Sin embargo, la neutralización *in vivo* de esta citoquina no ha demostrado tener efecto sobre la carga parasitaria ni la respuesta inmunitaria generada durante a la infección crónica, al no afectar a la producción sistémica de otras citoquinas (IFN- $\gamma$  e IL-13) (Levison *et al.*, 2010; Grecis *et al.*, 2014).

#### **b) Respuestas Treg**

En el contexto de las helmintiasis intestinales, los linfocitos Treg, caracterizados por la expresión del factor de transcripción Foxp3, tienen un papel destacado en el desarrollo de mecanismos inmunosupresores e inmunorreguladores. Asimismo, diferentes modelos animales han puesto de manifiesto que algunos helmintos, intestinales y no intestinales, inducen respuestas Treg naturales y específicas (iTreg) capaces de limitar la inmunopatología asociada a la infección al inhibir la inflamación (Taylor *et al.*, 2005; Finney *et al.*, 2007; McSorley *et al.*, 2008; Blankenhaus *et al.*, 2011, 2014). No obstante, estos linfocitos frenan también la respuesta Th2, lo que conlleva cierto grado de inmunosupresión del hospedador y permite garantizar la supervivencia del parásito a largo plazo (Taylor *et al.*, 2012).

Las dos poblaciones diferenciadas de linfocitos Treg son fenotípicamente diferentes, tienen origen distinto y responden también de forma distinta, aunque pueden ejercer funciones diferentes o solapadas. Los linfocitos iTreg se inducen de manera antígeno-específica por células dendríticas en los órganos linfoides secundarios, se desarrollan más lentamente y desempeñan su función supresora a través de la producción de IL-10 y TGF- $\beta$  (factor transformador del crecimiento  $\beta$ ), fundamentalmente (Adkiss & Adkiss, 2009; Izcue *et al.*, 2009).

La IL-10 es una citoquina supresora de la proliferación de linfocitos T y de la producción de citoquinas (Taylor *et al.*, 2007, 2009). Por otro lado, además de actuar directamente sobre los linfocitos T, ejerce también efectos inhibidores sobre otras poblaciones celulares (Punnonen *et al.*, 1993; Marshall *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 2001). Schopf *et al.* (2002) observaron que esta citoquina ejercía un papel fundamental en la polarización de la respuesta hacia Th2 y la generación de resistencia frente a la infección con *T. muris* en ratón. Asimismo, resultaba esencial para el mantenimiento de la función barrera en el colon y la reducción de la morbilidad y mortalidad asociadas a la infección, consecuencia de una sobreproducción de TNF- $\alpha$ . Del mismo modo, esta citoquina ha demostrado ejercer un papel esencial en el control de la patogénesis asociada a la schistosomiasis, evitando el desarrollo de respuestas fuertemente polarizadas, tanto a Th1 como a Th2, y reduciendo los efectos patológicos asociados a ambos tipos de respuesta (Hoffmann *et al.*, 2000).

Por su parte, el TGF- $\beta$ , en ausencia de IL-6, promueve la conversión de los linfocitos T inmaduros a células iTreg al inducir la expresión de Foxp3 y, al mismo tiempo, suprime de manera específica las células Th1, Th2 y Th17 (Huber *et al.*, 2004). Datos recientes sugieren que en algunas infecciones parasitarias crónicas, la inducción de linfocitos Treg Foxp3+ dependiente de TGF- $\beta$  es importante para la supresión de la inmunidad protectora y el desarrollo de infecciones crónicas. Por ejemplo, en la infección con *Strongyloides ratti* en ratón, la eliminación de los linfocitos Treg Foxp3+ ha sido asociada a un aumento de la respuesta Th2 y a la expulsión de los vermes (Blankenhaus *et al.*, 2011, 2014). Asimismo, varios estudios llevados a cabo en modelos de infección con *H. polygyrus* han mostrado incrementos de esta población celular asociados al establecimiento de infecciones de carácter crónico (Finney *et al.*, 2007; Redpath *et al.*, 2013). No obstante, en este modelo, el papel de las células T reguladoras en la supresión de la expulsión de los vermes y la limitación de patología asociada a la infección no resulta tan evidente tras el bloqueo o depleción *in vivo* de esta población de linfocitos (Rausch *et al.*, 2009). En cualquier caso, resulta especialmente interesante la habilidad de *H. polygyrus* de secretar un análogo de TGF- $\beta$  capaz de inducir la producción de células Treg

Foxp3+ *in vitro*, si bien los mecanismos que operan *in vivo* son aún poco conocidos (Grainger *et al.*, 2010).

De manera similar, estudios llevados a cabo en el modelo de infección con *T. muris* en ratón han puesto de manifiesto que no se producen incrementos significativos en la población de Treg Foxp3+ como consecuencia de la infección (D'Elia *et al.*, 2009). Empleando un modelo de trichuriasis crónica, Worthington *et al.* (2013) observaron que durante el desarrollo temprano de la infección se producía la regulación de células T CD4+ mediada por TGF- $\beta$  y que el bloqueo de esta citoquina *in vivo* protegía al ratón de la infección. No obstante, esta protección no estaba asociada a un descenso en la población de linfocitos Treg Foxp3+, la cual permaneció invariable durante todo el experimento. En cambio, estos autores pusieron de manifiesto un nuevo mecanismo en el que la función del TGF- $\beta$  durante la infección crónica con *T. muris* está controlada por una población de células dendríticas intestinales, capaces de expresar en su superficie una proteína denominada integrina  $\alpha\beta 8$ , activadora de TGF- $\beta$ . La ausencia de esta integrina impide la activación del TGF- $\beta$ , que no puede actuar sobre los linfocitos T, permitiendo al hospedador desarrollar una respuesta protectora de tipo Th2 que resulta efectiva para la eliminación del parásito.

### **1.3.2. MECANISMOS EFECTORES**

A pesar de tener un papel esencial en el desarrollo de la inmunidad protectora frente a helmintos, las células T cooperadoras no son capaces de actuar directamente sobre este grupo de parásitos, sino que actúan como orquestadores de la respuesta inmunitaria y dirigen el ataque a los helmintos a través de mecanismos efectores diversos. Recientemente, Maizels *et al.* (2012) agruparon estos mecanismos en tres categorías en función del efecto que ejercen sobre el parásito, clasificándolos en efectos incapacitantes, degradantes y de desplazamiento o desalojo. En los siguientes apartados se utiliza esta clasificación para agrupar y describir los mecanismos implicados en la expulsión de los helmintos intestinales, haciendo hincapié cuando sea posible en la trascendencia que



estos mecanismos tienen sobre el curso de las infecciones con especies del género *Echinostoma*.

### 1.3.2.1. EFECTOS INCAPACITANTES

Los efectos incapacitantes son aquellos que interfieren en el crecimiento y motilidad del parásito, afectando a su condición física general y a su capacidad de reproducción. Estos efectos pueden estar mediados por anticuerpos, que neutralizan funciones fisiológicas esenciales para el parásito, o por moléculas innatas tipo defensinas, como RELM- $\beta$  (molécula tipo resistina  $\beta$ ), que parecen confundir los estímulos sensoriales del parásito, entre otros mecanismos.

RELM- $\beta$ , también denominada FIZZ2 (del inglés, *found in inflammatory zone*), se considera una molécula efectora de la inmunidad de tipo Th2. Es producida y secretada por las células mucosectoras del aparato gastrointestinal en respuesta a IL-4 e IL-13, mientras que el IFN- $\gamma$  bloquea su producción, favoreciendo con ello el desarrollo de infecciones crónicas. Los mecanismos de acción de esta molécula han sido estudiados fundamentalmente en nematodos y no se han encontrado trabajos que definan su papel en el contexto de las trematodosis intestinales. En cualquier caso, RELM- $\beta$  es capaz de unirse al aparato quimiosensorial de los vermes e interferir *in vitro* en los procesos de quimiotaxis de los mismos (Artis *et al.*, 2004). Esta alteración de las funciones biológicas sensoriales del parásito puede afectar, entre otros procesos, a la alimentación de los helmintos que residen en el lumen intestinal, como *N. brasiliensis* o *H. polygyrus* (Herbert *et al.*, 2009). En cambio, en aquellos nematodos que viven total o parcialmente incluidos en el epitelio intestinal, como *Trichinella spiralis* y *T. muris*, la producción de RELM- $\beta$  no contribuye a la protección del hospedador o, al menos, no resulta un mecanismo fundamental para la expulsión de los mismos (Nair *et al.*, 2008; Herbert *et al.*, 2009).

Además de su papel protector frente a helmintos parásitos, a esta molécula se le ha asociado un papel patogénico en la promoción de inflamación en modelos de colitis e ileitis (Hogan *et al.*, 2006; Barnes *et al.*, 2007). De acuerdo con esto, Nair *et al.* (2008) observaron, en un modelo de infección crónica con *T. muris*, que los animales RELM- $\beta^{-/-}$

exhibían una expresión reducida de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y que, a diferencia de la cepa salvaje, no desarrollaban inflamación intestinal como consecuencia de la infección. Comprobaron además que la RELM- $\beta$  recombinante era capaz de activar *in vitro* a los macrófagos para expresar moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y secretar IL-12/23p40, incrementando así su habilidad para iniciar respuestas antígeno-específicas que inducen la producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos T cooperadores.

Con relación a los anticuerpos, se trata de moléculas capaces de unirse directamente tanto a antígenos solubles (ESP) como a estructuras específicas del parásito, pudiendo afectar a diferentes aspectos de su biología como el adecuado desarrollo de los vermes, su capacidad de migración dentro del hospedador o la función quimiosensorial de los mismos (Inaba *et al.*, 2003; McCoy *et al.*, 2008).

En las infecciones causadas por echinostomas, el papel que juegan los anticuerpos no es del todo conocido, aunque parece ser poco relevante, al menos en infecciones primarias (Toledo, 2009a). La influencia de los anticuerpos sistémicos en el control de estas infecciones es desconocida, ya que las respuestas más intensas se desarrollan, precisamente, en aquellas especies en que la infección es más duradera. Ello sugiere que las respuestas de anticuerpos circulantes podrían constituir únicamente una consecuencia colateral de la infección intestinal (Toledo *et al.*, 2006a; Toledo, 2009a). En este sentido, las respuestas locales de anticuerpos tendrían más importancia en la protección del hospedador ya que pueden actuar directamente sobre el parásito (Agger *et al.*, 1993; Sotillo *et al.*, 2007). No obstante, Andresen *et al.* (1989) observaron que, aunque los anticuerpos presentes en el suero de ratones infectados con *E. caproni* se unían a la superficie de los vermes, estos anticuerpos eran rápidamente eliminados como consecuencia de la renovación de los antígenos superficiales, indicando que este mecanismo puede constituir una estrategia del parásito para evitar el ataque mediado por estas moléculas (Andresen *et al.*, 1989; Simonsen *et al.*, 1990). Además, Sotillo *et al.* (2014) detectaron que la reactividad de IgM frente a los antígenos de ES deglicosilados era mayor que frente al producto nativo, no tratado, sugiriendo que los carbohidratos son capaces

de enmascarar antígenos peptídicos. Este hecho puede constituir un mecanismo del parásito para evadir la respuesta humoral del hospedador, tal y como se ha descrito en otros modelos experimentales (Maizels *et al.*, 1993), que junto con los resultados de Andersen *et al.* (1989) y Simonsen *et al.* (1990) puede contribuir a explicar, al menos parcialmente, la resistencia de los vermes adultos a las intensas respuestas de anticuerpos que se generan en el hospedador de alta compatibilidad, también a nivel local (Agger *et al.*, 1993; Sotillo *et al.*, 2007).

### **1.3.2.2. EFECTOS DEGRADANTES**

Los efectos degradantes son ocasionados por daño acumulativo sobre la integridad del parásito debido fundamentalmente al ataque de los granulocitos, el cual puede estar dirigido por anticuerpos específicos y/o amplificado por componentes del sistema de complemento y otros factores séricos. Así pues los anticuerpos, a los que nos referimos en el punto anterior por su capacidad de unirse y neutralizar los antígenos de los parásitos, pueden actuar también indirectamente a través de la activación del sistema de complemento por la vía clásica y el reclutamiento de varias poblaciones de células inmunitarias, capaces de ejercer efectos directos sobre el parásito por desgranulación (Harris & Gause, 2011).

Sotillo *et al.* (2007) detectaron un incremento tardío en la producción de IgM en el intestino de hospedadores de alta compatibilidad (ratones), el cual podría estar implicado en la reducción de la carga parasitaria que se observa en esta especie hospedadora a partir las 8 spi (Muñoz-Antolí *et al.*, 2007). La activación del sistema de complemento mediada por anticuerpos fue sugerida, por Simonsen & Andersen (1986), como uno de los mecanismos implicados en la protección frente a las infecciones por echinostomas y, al mismo tiempo, la IgM es una de las principales clases de anticuerpos que participan en la fijación del complemento. Sin embargo, dado que la efectividad del sistema de complemento a nivel intestinal parece ser limitada y que la expulsión temprana del parásito en hospedadores de baja compatibilidad (ratas) tiene lugar en ausencia de

una respuesta local de IgM (Sotillo *et al.*, 2007), el papel de esta inmunoglobulina en la expulsión de *E. caproni* sería secundario (Toledo, 2009b).

Como se describió anteriormente, determinadas poblaciones de granulocitos (basófilos, eosinófilos y mastocitos), tempranamente reclutadas al lugar de infección y los NLM adyacentes, contribuyen a generar y mantener una respuesta apropiada a través de la producción de citoquinas de tipo Th2. Estos tipos celulares, fundamentalmente eosinófilos y mastocitos, pueden actuar también como poblaciones efectoras en la protección frente a helmintos, bien a través de mecanismos de toxicidad celular mediada por anticuerpos o alterando la fisiología intestinal para activar mecanismos efectores eficaces en la protección frente a helmintos intestinales (Cadman & Lawrence, 2010; Makepeace *et al.*, 2012).

La eosinofilia es considerada, junto a niveles elevados de IgE y mastocitosis, como una de las características más destacadas de las infecciones por helmintos. Los eosinófilos se forman y maduran en la médula ósea, estimulados por IL-5, IL-3 y el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), mientras que su liberación a la circulación sanguínea está mediada por IL-5. Desde aquí, los eosinófilos son reclutados a los tejidos por quimioquinas como la eotaxina-1/CCL11 (quimioquina 11 motivo C-C), especialmente importante en la atracción de estas células hacia el tracto gastrointestinal (Tominaga *et al.*, 1991; Rothemberg *et al.*, 2001). Los eosinófilos almacenan en sus gránulos cuatro proteínas tóxicas, específicas de este tipo celular: proteína básica principal 1 (MBP-1), eosinófilo peroxidasa (EPO), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) y la proteína catiónica de eosinófilos (ECP). MBP-1, EDN y ECP son potentes toxinas frente a helmintos y MBP-1, además, puede inducir la liberación de histamina por parte de los mastocitos. Estos gránulos contienen también citoquinas como IL-4 e IL-13 y quimioquinas preformadas, las cuales pueden ser liberadas de forma rápida y selectiva (Whals, 2001; Gessner *et al.*, 2005). La desgranulación se desencadena fundamentalmente por la unión de complejos antígeno-anticuerpo a receptores para la fracción constante presentes en la superficie celular, si bien numerosas citoquinas (IL-3, IL-5, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , INF- $\beta$  y el factor

activador de plaquetas) pueden potenciar o desencadenar directamente este proceso (Melo *et al.*, 2008).

A pesar de que la eosinofilia es característica de las helmintiasis, el papel que desempeña esta población celular puede ser diferente en infecciones causadas por especies parásitas distintas (Ramalingam *et al.*, 2005; Swartz *et al.*, 2006; Knott *et al.*, 2007). En general, en las infecciones por *Echinostoma* spp. se ha observado eosinofilia e incremento de la infiltración de eosinófilos a nivel de la mucosa intestinal, sugiriendo la participación de esta población celular en la respuesta frente a la infección (Bindsen & Christensen, 1984; Hansen *et al.*, 1991; Toledo 2006b; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Ryang *et al.*, 2007;). La utilización del modelo *E. caproni*-roedor ha permitido la comparación de la infiltración eosinofílica en especies hospedadoras que muestran diferente compatibilidad con el parásito, pudiéndose observar que la carga parasitaria parece estar relacionada con el grado de infiltración eosinofílica en cada especie hospedadora. Los niveles más elevados de eosinófilos se detectaron en ratas, que expulsan rápidamente el parásito. Asimismo, se observaron niveles más altos en ratones que en hámsteres, coincidiendo con una menor carga parasitaria en el primer hospedador (Toledo *et al.*, 2006b; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007). Los citados estudios ponen de manifiesto la participación de los eosinófilos en los mecanismos reguladores frente a las infecciones por echinostomas. Sin embargo, los resultados derivados de otros trabajos llevados a cabo con este grupo de parásitos han sugerido la necesidad de otros mecanismos que contribuyan a la respuesta protectora pues: (I) aunque el aumento en el recuento de eosinófilos en la mucosa intestinal es común en ratones infectados con *E. caproni* y *Echinostoma trivolvis*, la longevidad de la infección con cada especie es marcadamente diferente (Fujino *et al.*, 1996a, b); (II) el tratamiento inmunosupresor inhibe la eosinofilia sin generar cambios significativos en el número de adultos recuperados (Fujino *et al.*, 1996a; Ryang *et al.*, 2007); y (III) el recuento de eosinófilos normalmente alcanza el máximo a las 1 o 2 spi, mientras que la expulsión sucede algo más tarde en la mayoría de los casos.

Los mastocitos son células de origen hematopoyético que maduran en tejidos periféricos y especialmente cerca de superficies epiteliales. Se distinguen principalmente dos poblaciones de mastocitos, siendo los mastocitos de las mucosas (MMC) los más implicados en la respuesta frente a helmintos. A nivel intestinal, los MMC pueden localizarse en la lámina propia o el epitelio. Los mastocitos intraepiteliales se consideran el último estadio efector, posicionado para descargar sus productos al lumen intestinal y afectar de esa manera al parásito y su entorno, con mínimos efectos sobre el tejido subyacente. Los MMC son dependientes de células T y su desarrollo está condicionado por citoquinas Th2 como IL-13, IL-4, IL-9 e IL-10. Además, expresan en su superficie un receptor de alta afinidad para IgE. La unión de complejos IgE-antígeno a este receptor desencadena la desgranulación, mientras que la unión de IgE libre, en ausencia de antígeno, puede promover la supervivencia celular y la liberación de citoquinas. Con la desgranulación se liberan moléculas capaces de actuar directamente sobre el parásito (Morimoto & Utsumiya, 2011) y de alterar su microhábitat a través de acciones locales como: inflamación, contracción de la musculatura lisa, secreción de moco y remodelación tisular (Williams & Galli, 2000; Cadman & Lawrence, 2010). Los mecanismos implicados en la alteración del nicho de los parásitos con la finalidad de promover su expulsión se analizan con detalle en el siguiente apartado, por lo que en este punto tan solo se hace referencia a la cinética de mastocitos en las infecciones con *Echinostoma* spp., sin entrar a valorar los mecanismos de acción precisos que, por otra parte, no han sido estudiados hasta el momento en este género parasitario.

Si bien el desarrollo de mastocitosis está íntimamente asociado a las infecciones por helmintos intestinales, en muchas de estas parasitosis los MMC no resultan necesarios para la eliminación de los vermes (Uber *et al.*, 1980; Betts & Else, 1999). La hiperplasia de mastocitos en el intestino ha sido descrita en diferentes especies de echinostomas (Fujino *et al.*, 1993; Fujino *et al.*, 1998a, b; Kim *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2005). Sin embargo, como sucede en otros modelos, los resultados disponibles en relación con el papel de los mastocitos en el curso de la infección son controvertidos. A pesar de que en algunas especies, como *E. trivolvis*, la expulsión de los vermes coincide con el pico de mastocitosis,

se necesitan además otros mecanismos para explicar dicha expulsión (Fujino *et al.*, 1993; Fujino *et al.*, 1998a). En el modelo *E. caproni*-roedor, se han observado incrementos en la población de MMC durante la primera semana de infección en todas las especies hospedadoras estudiadas. Asimismo, los recuentos de MMC en ratones y hámsteres mostraron una cinética similar a la observada en ratas, a pesar de que la supervivencia del parásito difiere marcadamente entre estas especies hospedadoras (Toledo *et al.*, 2006b; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007).

### **1.3.2.3. EFECTOS DE DESPLAZAMIENTO**

Por último, los efectos de desplazamiento o desalojo consisten en inducir alteraciones en el nicho del parásito con la finalidad de que el establecimiento se haga insostenible y favorecer de ese modo su expulsión. Estos mecanismos son especialmente importantes en la respuesta frente a los helmintos intestinales.

La barrera intestinal está formada, esencialmente, por una única capa de células epiteliales que separa el lumen intestinal de la lámina propia, donde residen las células responsables de la inmunidad de las mucosas. Este epitelio no consiste en una población celular homogénea, sino que está formado por cuatro tipos principales de células: enterocitos, células mucosecretoras, células endocrinas y células de Paneth. Cada una de estas poblaciones celulares presenta funciones altamente especializadas en la absorción y transporte de nutrientes o en la secreción de sustancias de diferente naturaleza, esenciales para mantener la funcionalidad y homeostasis intestinales. No obstante, a pesar de su diversidad morfológica y funcional todas comparten un origen común: las células madre epiteliales y las células progenitoras proliferativas, también denominadas células de amplificación transitoria, localizadas en las criptas de Lieberkühn (van der Flier & Clevers, 2009).

Las células epiteliales intestinales forman una monocapa impermeable, que recubre la lámina propia subyacente, y exhiben numerosas adaptaciones físicas y bioquímicas destinadas a mantener la función barrera del epitelio. Por ejemplo, las uniones de oclusión garantizan el sellado entre las células epiteliales e impiden el trasiego

de moléculas, incluso de pequeño tamaño, entre las dos superficies del epitelio; las microvellosidades son extensiones de la membrana, ricas en actina, que incrementan no solo la superficie de absorción, sino también el contacto con el contenido intestinal; o el glicocáliz, rico en polisacáridos, que junto con el moco intestinal que recubre este epitelio ejerce una doble función protectora, mecánica y frente a patógenos. Asimismo, las células del epitelio intestinal pueden producir y liberar sustancias peptídicas con actividad antimicrobiana (Liévin-Le Moal & Servin, 2006; Shen & Turner, 2006). No obstante, el epitelio intestinal es mucho más que una mera barrera en términos de inmunidad protectora del hospedador y, además de su capacidad para influir sobre la inmunidad celular tanto innata como adaptativa, esta estructura puede funcionar como un tejido efector que actúa bajo el control del sistema inmunitario adaptativo. En efecto, en muchos modelos de helmintiasis intestinales se ha observado que la expulsión de los vermes está directamente asociada con alteraciones en el microhábitat del parásito, que vuelven el entorno local inapropiado para su supervivencia, más que con la actividad citotóxica directa inducida por las células inmunitarias o las moléculas secretadas (Anthony *et al.*, 2007; Artis & Grencis, 2008; Grencis, 2015).

Muchos de los mecanismos de los que se hablará a continuación dependen, al menos en gran medida, de IL-4 e IL-13. Estas citoquinas están muy relacionadas y constituyen los principales mediadores de las respuestas de tipo Th2 frente a helmintos (Finkelman *et al.*, 2004). La señalización a través de estas citoquinas depende de su unión a complejos receptores heterodiméricos, los cuales comparten una subunidad denominada cadena  $\alpha$  del IL-4R. La IL-4 se une al complejo receptor formado por IL-4R $\alpha$  y la cadena  $\gamma$  común ( $\gamma$ c), que se asocian para formar los conocidos como receptores de tipo I. Además, tanto la IL-4 como la IL-13 se unen al complejo receptor de tipo II, formado por las subunidades IL-4R $\alpha$  e IL-13R $\alpha$ 1. En cualquier caso, la unión ligando-receptor resulta en la iniciación de vías de señalización que activan el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT) 6 induciendo, en último término, la puesta en marcha de los mecanismos efectores característicos de las respuestas Th2. Los STATs son proteínas citoplasmáticas latentes que, en respuesta a la exposición a citoquinas en el ambiente



externo de la célula, son fosforiladas en determinadas tirosinas por quinasas Janus (JAKs). Así pues, la unión de IL-4 e IL-13 a sus respectivos receptores resulta en una señalización común, fundamental para el desarrollo de las respuestas Th2 características de las respuestas antiparasitarias (Urban *et al.*, 2000). Una vez fosforilado, STAT6 es transportado al núcleo, donde regula la expresión génica en varios tipos celulares. Dependiendo del tipo de célula, STAT6 regula perfiles de expresión completamente diferentes en respuesta a la estimulación por IL-4/IL-13. Por ejemplo, en linfocitos B induce la expresión de IgE y CD23, mientras que en linfocitos T estimula la expresión de genes de diferenciación a Th2 y en macrófagos promueve la activación alternativa de los mismos (Walford & Doherty, 2013).

#### **a) Células Mucosecretoras y Mucosidad Intestinal**

El epitelio gastrointestinal está recubierto por una mucosidad viscosa y deslizante, como un gel, que ejerce una función protectora sobre el epitelio subyacente. Las células mucosecretoras, que forman parte del epitelio intestinal entre otros epitelios, son glándulas unicelulares especializadas en la producción y secreción del principal componente macromolecular de esta mucosidad: las mucinas y, más concretamente en el caso del intestino, de la mucina (Muc)2. Se conocen también como células caliciformes por su morfología característica, estrecha en la base y marcadamente ensanchada en su parte apical, donde se acumulan los gránulos de mucina. Estas proteínas se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso y son transportadas al aparato de Golgi para su glicosilación antes de ser acumuladas en forma de gránulos en el ápice de la célula, desde donde son liberadas a la luz intestinal de forma constitutiva o en respuesta a un estímulo adecuado (Specian & Oliver, 1991; McGuckin *et al.*, 2011).

Por otra parte, las células epiteliales intestinales presentan en su superficie luminal un denso glicocálix, compuesto fundamentalmente por mucinas transmembrana que extienden sus dominios altamente glicosilados hacia la luz intestinal. De este modo, las mucinas del sistema gastrointestinal se clasifican, en función de su estructura y localización, en dos grupos: las mucinas solubles, secretadas o formadoras de gel y las

mucinas transmembrana. En conjunto, las mucinas secretadas y transmembrana forman la base estructural de una barrera defensiva, regulada por la inmunidad innata y adaptativa, que es capaz de responder a las infecciones entéricas mediante la alteración de la tasa de producción, los constituyentes y/o las propiedades biofísicas de la mucosidad gastrointestinal (Linden *et al.*, 2008; McGuckin *et al.*, 2011). Además las mucinas transmembrana, a través de su extremo intracitoplasmático rico en determinados dominios de fosforilación, ejercen un papel fundamental en la transducción de señales externas al interior de las células del epitelio intestinal (Singh & Hollingsworth, 2006).

Las mucinas son glicoproteínas de gran tamaño constituidas por una fracción proteica central (apomucina) que contiene múltiples dominios de tipo mucina, formados habitualmente por repeticiones en tándem de secuencias ricas en prolina (Pro), treonina (Thr) y/o serina (Ser), cuyos grupos hidroxilo se encuentran altamente sustituidos con O-oligosacáridos. Esta estructura confiere a las mucinas un elevado peso molecular del cual, entre el 70 y el 80% es debido a los carbohidratos. La elevada densidad de oligosacáridos sirve para proteger el núcleo proteico de la actividad de las proteasas, garantizando así su integridad y la de toda la estructura. Además, les otorga una conformación extendida que en el caso de las mucinas formadoras de gel es fundamental para la organización polimérica del moco intestinal y les proporciona una alta densidad carga negativa que permite la hidratación de toda esta estructura (Dharmani *et al.*, 2009; Moran *et al.*, 2011). Las mucinas formadoras de gel se caracterizan además por presentar extremos N- y C-terminal poco glicosilados con dominios ricos en residuos de cisteína (Cys). Estos dominios están implicados en la formación de puentes disulfuro intermoleculares que son esenciales para la formación del moco extracelular, dando lugar a una matriz estructurada y estable que garantiza sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Además, otras interconexiones covalentes y no covalentes entre las mucinas y otros componentes del moco son posibles (Johansson *et al.*, 2011; McGuckin *et al.*, 2011).

Tanto la diferenciación como la función de las células caliciformes están reguladas por el sistema inmunitario y, dado que constituyen la principal fuente de producción de

mucinas, está regulación afecta directamente a las propiedades de la barrera de moco del intestino, lo cual es fundamental para su dinamismo en la respuesta. La hiperplasia de células mucosecretoras así como la hipersecreción de moco son mecanismos fundamentales en la protección del hospedador frente a helmintos. Experimentos de transferencia de linfocitos sensibilizados llevados a cabo por Ishikawa *et al.* (1997) pusieron de manifiesto que las células Th2 estaban directamente implicadas en la diferenciación de las células madre intestinales en células mucosecretoras y que tras la infección con *T. spiralis* se produce un incremento en número de esta población celular. Otros estudios han demostrado cómo la producción de citoquinas de tipo Th2, fundamentalmente IL-13 e IL-4, resulta esencial para dirigir estos mecanismos, así como la correlación que existe entre la expresión de estas citoquinas y la expulsión de los helmintos intestinales (Khan *et al.*, 2001; Webb *et al.*, 2007; Hasnain *et al.*, 2011a; Lee *et al.*, 2013). Sin embargo, Turner *et al.* (2013) demostraron que la IL-22, aunque inicialmente asociada a la protección frente a infecciones intestinales de origen bacteriano, es también un mediador fundamental en la inmunidad frente a helmintos. Este grupo observó que tanto en ratones infectados con *N. brasiliensis* como con *T. spiralis*, la ausencia de IL-22 afectaba a la expulsión de los vermes. Comprobaron además que ello se correlacionaba con una escasa hiperplasia de células mucosecretoras y la expresión reducida de mucinas y otros marcadores de células caliciformes, poniendo en evidencia que esta interleuquina juega un papel fundamental en la activación de las células caliciformes y, consecuentemente en la inmunidad frente a helmintos. Por otra parte, Shekels *et al.* (2001) reportaron un aumento en la expresión de las mucinas Muc2 y Muc3 durante la infección con *T. spiralis* en el intestino de ratones deficientes en IL-4. Igualmente, Marillier *et al.* (2008) observaron que los ratones infectados con *S. mansoni* eran capaces de desarrollar hiperplasia de células mucosecretoras de manera independiente de IL-4/IL-13, sugiriendo la existencia de otras vías implicadas en la regulación de este mecanismo.

Además de los cambios en su producción y secreción, la glicosilación de las mucinas también se ve alterada con el progreso de la infección, por lo que el tipo y grado de glicosilación de las cadenas terminales de las mucinas pueden tener un papel

importante en el establecimiento y/o expulsión de los helmintos intestinales (Ishikawa *et al.*, 1993; Ishikawa, 1994; Maruyama *et al.*, 2002; Yamauchi *et al.*, 2006; Mullaly *et al.*, 2013). Estos cambios pueden ser debidos a perturbaciones en el proceso biosintético de las mucinas o a cambios en la expresión de glicosiltransferasas. No obstante, también pueden tener su origen en la actividad glicosidasa del propio parásito. En cualquier caso, y a pesar de que el papel protector de la glicosilación específica aún no está bien definido, se especula que las alteraciones acaecidas a este nivel pueden inducir la expulsión de los parásitos de la luz intestinal por diferentes mecanismos: (I) alterando la permeabilidad de la mucosidad intestinal y afectando así las propiedades bioquímicas del moco o (II) proporcionando ligandos específicos para moléculas de superficie de los parásitos. Estas alteraciones, junto con un aumento en la producción y/o secreción de mucinas, pueden facilitar que los helmintos sean atrapados en el moco intestinal, inhibiendo su capacidad de movimiento y alimentación e induciendo, en última instancia, su expulsión de la luz del intestino (Thornton *et al.*, 2008; Hasnain *et al.*, 2013).

En el caso de las infecciones por echinostomas, varios trabajos han demostrado que los aumentos en la producción de moco, asociados a una hiperplasia de las células caliciformes, estarían implicados en la expulsión de los vermes adultos. Los estudios realizados con las especies *E. trivolvis* y *E. hortense* empleando diferentes cepas de ratón como hospedadores definitivos mostraron que el aumento en el recuento de células caliciformes coincidía con la expulsión de los parásitos de la luz intestinal (Fujino *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2005). Además, el tratamiento de los ratones con dexametasona o ketotifeno, dos principios activos que afectan a la población de células mucosecretoras y/o a la producción de moco, retrasaron la expulsión de los parásitos (Fujino *et al.* 1996a, 1997, 1998b; Ryang *et al.* 2007). Por otra parte Fujino *et al.* (1996c), empleando un modelo de coinfección nematodo-trematodo, sugirieron que el aumento en la secreción de moco ocasionado por la hiperplasia de células caliciformes en ratones infectados con *N. brasiliensis* era el responsable de la expulsión temprana de los adultos de *E. trivolvis* y *E. caproni* en infecciones secundarias.

No obstante, varios trabajos han puesto de manifiesto que la realidad es mucho más compleja y que la expulsión no puede explicarse solamente en términos de recuento de células caliciformes. La infección crónica con *E. caproni* en hámster coincide con un número reducido de células caliciformes a nivel intestinal. Sin embargo, la infección induce un incremento progresivo, y de magnitud comparable, en el recuento de células productoras de moco en el intestino de ratones y ratas infectados, siendo la compatibilidad con el parásito claramente diferente entre ambas especies hospedadoras (Toledo *et al.*, 2006b; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Trelis *et al.*, 2011). Frazer *et al.* (1999) observaron un fuerte incremento en la población de células caliciformes en el intestino de ratones deficientes en RAG-2 (gen activador de la recombinación 2) infectados con *E. caproni* y, sin embargo, la supervivencia de los adultos fue similar a la observada en ratones CD1. Por otra parte Park *et al.* (2005), si bien comprobaron que los aumentos en el recuento de esta población celular estaban relacionados con la expulsión de *E. hortense* en diferentes cepas de ratón, observaron que no existe relación entre la magnitud de este incremento y su trascendencia sobre la expulsión. En este contexto, diferentes trabajos han puesto de manifiesto que la alteración de la función de las células mucosecretoras mediante la modificación de los residuos terminales de los oligosacáridos de las mucinas puede afectar a la supervivencia de los adultos de *Echinostoma* spp. en el intestino de sus hospedadores. Fujino & Fried (1993b) estudiaron los patrones de marcaje con lectinas en el intestino de ratones infectados con *E. trivolvis* y con *E. caproni*, observando, en cada caso, una marcada diferencia tanto en la distribución de los glicoconjugados como en la intensidad de marcaje. En los ratones infectados con *E. caproni* se observó una reducción en el marcaje a nivel de las vellosidades intestinales, coincidiendo con un menor número de células caliciformes. En los animales infectados con *E. trivolvis*, en cambio, la expulsión estuvo asociada a hiperplasia de células caliciformes junto con una fuerte expresión de diferentes glicoconjugados en la superficie de las vellosidades y el contenido de las células caliciformes. Por el contrario, en hámsteres infectados con *E. trivolvis* el desarrollo de infecciones crónicas coincide con la ausencia de hiperplasia de células caliciformes y de aumento de glicanos a nivel intestinal (Fujino & Fried, 1996).

### ***b) Renovación del Epitelio Intestinal***

El epitelio gastrointestinal está sometido a un proceso de renovación continua. En este sentido, este tejido presenta unas propiedades únicas en cuanto a que los mecanismos de proliferación, diferenciación celular y apoptosis suceden de manera ordenada a lo largo del eje cripta-vellosidad. Así pues, el epitelio intestinal puede dividirse en dos compartimentos diferentes. Las vellosidades intestinales constituyen el compartimento funcional, formado por células epiteliales diferenciadas y especializadas según cada tipo celular. El compartimento proliferativo se refiere a las criptas de Lieberkühn, que contienen células madre adultas caracterizadas por su capacidad para generar distintos tipos de células diferenciadas, al tiempo que mantienen su capacidad de auto-renovación. De este modo, esta región del epitelio es la encargada de mantener la renovación celular y al mismo tiempo, de proporcionar un nicho protector para las células madre epiteliales. En el intestino delgado las células madre se localizan y dividen en la base de las criptas, dando lugar a las denominadas células de amplificación transitoria, que ocupan la porción media de estos compartimentos, y las cuales se expanden a través de múltiples rondas de división. A medida que se van desplazando a lo largo de la superficie interna de la cripta, las células recién formadas se van diferenciando en células epiteliales especializadas. Este proceso de migración continúa a lo largo del eje de la vellosidad en dirección al lumen intestinal, hasta que finalmente las células mueren y son descamadas cuando alcanzan el extremo de la vellosidad (Yen & Wright, 2006; Simons & Clevers, 2011).

El ciclo celular y la longevidad de las células epiteliales intestinales están marcados por la duración del proceso de migración desde su formación en la base de las criptas hasta que, ya como células totalmente diferenciadas, alcanzan el extremo de las vellosidades. En este punto, las células epiteliales (enterocitos, células mucosecretoras y enteroendocrinas) son liberadas a la luz intestinal por un mecanismo aún poco conocido. La extrusión de las células requiere su separación de la matriz extracelular, lo que da lugar a una forma específica de apoptosis, inducida por el desprendimiento, que se conoce como anoikis (Potten & Allen, 1977). No obstante, estudios realizados en modelos murinos con alteraciones genéticas en diferentes componentes de la cascada apoptótica no

muestran defectos en la estructura del epitelio intestinal (Watson & Pritchard, 2000), sugiriendo que el recambio normal de este epitelio puede incluir mecanismos de muerte celular no basados en apoptosis (Yuan & Kroemer, 2010; Günther *et al.*, 2013). En cualquier caso, la proliferación, diferenciación y muerte celular en el epitelio intestinal deben estar estrictamente reguladas para garantizar la homeostasis estructural del tejido, de modo que irregularidades en estos procesos pueden ser causa de patología (Mehlen & Puisieux, 2006; Maloy & Powrie, 2011, Kandasamy *et al.*, 2014). De esta manera, la integridad estructural del intestino y su eficacia como órgano barrera solo se mantienen si las tasas de proliferación y muerte celular están bien controladas. En condiciones normales, raramente se produce la muerte celular espontánea de células localizadas a lo largo de las vellosidades sino que, habitualmente, se concentra en el extremo de las mismas. No obstante, se ha descrito que esporádicamente este proceso puede tener lugar de forma espontánea a nivel de las criptas (Watson, 1995; Renehan *et al.*, 2001; Edelblum *et al.*, 2006).

El papel del recambio epitelial como mecanismo de desplazamiento de los helmintos intestinales fue puesto de manifiesto por Cliffe *et al.* (2005) en el modelo de infección por *T. muris* en ratón. Estos autores advirtieron importantes cambios en la tasa de renovación celular en la mucosa del ciego durante el proceso de expulsión de los vermes. Las cepas de ratón capaces de expulsar al parásito mostraron una tasa de renovación al menos dos veces superior a la observada en los animales que desarrollaban infecciones de carácter crónico, en los que solo se observó un ligero incremento del recambio epitelial. Además, mostraron que este mecanismo está regulado por el sistema inmunitario a través de la IL-13 y la quimioquina CXCL10 (quimioquina 10 motivo C-X-C).

La IL-13 regula numerosas respuestas epiteliales relacionadas con la expulsión de helmintos intestinales, como la diferenciación y maduración de las células mucossecretoras o la producción de RELM- $\beta$ , que ya han sido tratadas en este apartado. Cliffe *et al.* (2005) pusieron de manifiesto que dicha interleuquina participa también en la regulación del proceso de renovación celular en el intestino, al observar que los ratones IL-13<sup>-/-</sup>, incapaces

de expulsar al parásito, mostraban tasas de renovación similares a las observadas en las cepas naturalmente susceptibles a la infección. Por su parte, CXCL10 es una quimioquina inducida por IFN- $\gamma$  a la cual se le ha atribuido la capacidad de aumentar la supervivencia celular y reducir el recambio epitelial en un modelo de colitis en ratón (Sasaki *et al.*, 2002). En los modelos de infección con *T. muris*, el establecimiento de infecciones crónicas se asocia al desarrollo de respuestas Th1, con producción predominantemente de IFN- $\gamma$  (Else & Grencis, 1991; Else *et al.*, 1992), el cual juega un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular durante la inflamación crónica asociada a la infección (Artis *et al.*, 1999). Cliffe *et al.* (2005), vieron que la neutralización *in vivo* de CXCL10 en los ratones susceptibles no tenía ningún efecto sobre la respuesta Th1 desarrollada en estos animales pero que, sin embargo, reducía de manera significativa la carga parasitaria. De acuerdo con esto, el IFN- $\gamma$  induce por una parte la proliferación celular, pero al mismo tiempo reduce el recambio epitelial a través de la inducción de CXCL10 lo que conduce, en este modelo, a una hiperplasia de las criptas a nivel del ciego.

Empleando el mismo modelo experimental, Cliffe *et al.* (2007) observaron que el desarrollo de infecciones crónicas inducía un aumento de la apoptosis en el lugar de la infección de forma independiente de la carga parasitaria. Estos autores detectaron un incremento en la tasa de apoptosis en las criptas del ciego, a nivel de la zona de las células madre. Asimismo, comprobaron que las citoquinas proinflamatorias IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , producidas durante la infección crónica, ejercían un papel importante en la inducción de este mecanismo, pues su neutralización reducía los niveles de apoptosis detectados. De acuerdo con estos resultados sugirieron que el aumento de la apoptosis supondría un efecto beneficioso para el hospedador ya que le permite regular el tamaño de las criptas, con la finalidad última de controlar la desregulación de la arquitectura del tejido intestinal.

### ***c) Contractilidad Intestinal***

Las alteraciones en la contractilidad intestinal constituyen también un mecanismo de desplazamiento destacado que ha demostrado tener un papel fundamental en la expulsión de algunos helmintos (Khan & Collins, 2004). Estudios llevados a cabo con



diferentes especies de nematodos como *N. brasiliensis*, *H. polygyrus* y *T. spiralis* han demostrado la capacidad de estas infecciones para inducir fenómenos de hipercontractilidad intestinal que, aunque parecen no ser suficientes en sí mismos, son fundamentales para la eliminación de la infección (Akiho *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Finkemlan *et al.*, 2004; Horsnell *et al.*, 2007). Las infecciones con *S. mansoni* también han sido asociadas a una contractilidad intestinal aumentada, con hiperproliferación de células musculares durante la fase aguda de la infección, que puede traducirse en cambios funcionales en la capa muscular del intestino durante la schistosomiasis crónica (Moreels *et al.*, 2001; El Zawawy *et al.*, 2006). Más recientemente, Marillier *et al.* (2010) observaron que dicha hipercontractilidad es necesaria para la protección del hospedador durante la schistosomiasis aguda, ya que permite aumentar la eliminación de los huevos del parásito y prevenir la mortalidad prematura asociada a la patología.

Del mismo modo que la mayoría de mecanismos efectores descritos en este apartado, los efectos sobre la contractilidad de la musculatura lisa intestinal están asociados también al desarrollo de respuestas de tipo Th2. Las células de la musculatura intestinal expresan IL-4R $\alpha$ , la subunidad común de los receptores heterodiméricos de IL-4 e IL-13. De esta manera, los aumentos en la contractilidad intestinal observados en algunas helmintiasis son ocasionados, fundamentalmente, por la respuesta de las fibras de la musculatura lisa longitudinal a IL-4 y IL-13, a través de su unión a IL-4R $\alpha$  y la activación de STAT6. Es decir, que las células musculares actúan como una extensión del sistema inmunitario de la mucosa intestinal y, bajo la señalización apropiada por parte de los linfocitos, pueden alterar su fisiología y contribuir a la defensa del hospedador (Akiho *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Finkelman *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2012). No obstante, trabajos más recientes han puesto de manifiesto que la interacción entre la respuesta generada frente a la infección, la respuesta de la musculatura lisa intestinal y la expulsión de los parásitos alojados en el intestino no es tan sencilla como se ha considerado tradicionalmente y que otras citoquinas, como la IL-25 (Zhao *et al.*, 2010), o los macrófagos activados alternativamente (Zhao *et al.*, 2008) podrían estar implicados en la regulación de este mecanismo.

Además del destacado papel de la IL-4 y la IL-13 en los efectos sobre la contractilidad de la musculatura lisa intestinal y su implicación en la expulsión de los helmintos intestinales, en este punto es importante hacer referencia también a la IL-6. Esta interleuquina es una citoquina pleiotrópica que participa en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa e interviene en la regulación de la inflamación intestinal crónica controlando el balance entre linfocitos Th17 y Treg. En este sentido, actúa como una citoquina proinflamatoria favoreciendo, junto al TGF- $\beta$ , la diferenciación de los linfocitos T a células Th17 e inhibiendo la diferenciación a linfocitos Treg inducida por este factor de crecimiento (Kimura & Kishimoto, 2010). Sin embargo, la IL-6 es también una mioquina, una citoquina producida por las fibras musculares en respuesta a la contracción, que ha sido asociada con la inhibición de la respuesta Th1 y la promoción de respuestas de tipo Th2 (Diehl *et al.*, 2002; Diehl & Rincón, 2002).

Los efectos de la infección con *Echinostoma* spp. en la contractilidad intestinal de sus hospedadores definitivos no han sido estudiados hasta el momento, por lo que se desconoce la trascendencia que este mecanismo puede tener en el curso de la infección. No obstante, en vista del perfil de citoquinas observado en hospedadores de alta y baja compatibilidad, Trelis *et al.* (2011) propusieron que un aumento en la contractilidad, inducido por la IL-13 expresada en el intestino de las ratas infectadas, y reflejado en un marcado incremento en la expresión de IL-6 a este nivel, podría ser un de los mecanismos implicados en la expulsión de los adultos de *E. caproni* del intestino de este hospedador.

#### **d) Otros Mecanismos de Desplazamiento**

Más allá de la percepción de la mucosa intestinal como una barrera defensiva frente a agentes externos, la integridad del epitelio intestinal es igualmente esencial para el mantenimiento de las funciones digestivas de este órgano, básicamente, la regulación de la absorción de agua y nutrientes. Los helmintos intestinales pueden inducir también modificaciones funcionales del epitelio intestinal, mediadas por respuestas de tipo Th2, cuya finalidad es promover la protección del hospedador afectando directamente al nicho de los parásitos.

Varios estudios han puesto de manifiesto que cambios en la homeostasis de los fluidos intestinales facilitan la expulsión de algunos nematodos. Concretamente, se ha observado como las infecciones con *N. brasiliensis*, *H. polygyrus* y *T. spiralis* alteran la permeabilidad intestinal, la absorción de glucosa dependiente de Na<sup>+</sup> y la secreción de Cl<sup>-</sup> en respuesta a mediadores solubles liberados por los mastocitos, como la histamina o la prostaglandina E<sub>2</sub>, o a ciertos neurotransmisores liberados por las neuronas del plexo submucoso. Estas alteraciones, que se traducen en un incremento del líquido intraluminal, tienen la finalidad de limitar el acceso del patógeno a la superficie de la mucosa, al tiempo que permiten diluir en el contenido intestinal las toxinas derivadas del parásito. Los mecanismos responsables de la perturbación de la función epitelial son dependientes de la activación del factor de transcripción STAT6 bien directamente, por la acción de la IL-4 y la IL-13 sobre las células del epitelio intestinal o, indirectamente, a través de los nervios entéricos (Shea-Donohue *et al.*, 2001; Madden *et al.*, 2002, 2004). Más recientemente, se ha podido evidenciar el papel de la IL-25 en la regulación de la función epitelial, si bien la IL-13 es necesaria para la protección inducida por esta citoquina (Zhao *et al.*, 2010).

El transporte a través del epitelio puede realizarse a través de las propias células epiteliales, por la llamada vía transcelular, o a través de los espacios intersticiales y las uniones oclusivas, vía paracelular. McDermott *et al.* (2003) demostraron que, en el modelo de infección por *T. spiralis* en ratón, los mastocitos tenían un papel fundamental en la regulación de la permeabilidad paracelular. Estos autores comprobaron que la infección con este nematodo inducía un incremento en este tipo de permeabilidad a nivel del yeyuno, el cual se correspondía con un descenso en la expresión de ocludina en las uniones adherentes entre enterocitos. En ausencia de mastocitos, o de proteasa-1 de mastocitos, esta permeabilidad aumentada quedaba bloqueada, al tiempo que se afectaba la eliminación de la infección. Más recientemente, Su *et al.* (2011) comprobaron que el nematodo *H. polygyrus*, que se establece en el yeyuno, era capaz de alterar la permeabilidad del epitelio del colon. Esta perturbación fue asociada de nuevo a cambios ultraestructurales en las uniones oclusivas entre las células epiteliales y en la expresión de

la proteína de unión intercelular E-cadherina y constataron que dichas alteraciones requerían la activación de la inmunidad adaptativa y del factor de transcripción STAT6.

Los efectos de las infecciones por *Echinostoma* spp. sobre la función epitelial han sido poco estudiados. Sin embargo, el análisis de la respuesta sistémica de anticuerpos durante la infección con *E. caproni* en diferentes hospedadores ha permitido intuir algunas alteraciones en este sentido. Es sabido que el paso de antígenos a través de la mucosa intestinal está mediado por la inflamación local y que diferencias en la respuesta inflamatoria a nivel de la mucosa pueden traducirse en diferencias en la respuesta sistémica de anticuerpos (Yu & Perdue, 2001). Aunque las respuestas de anticuerpos en la infección con *E. caproni* y su trascendencia en el curso de la misma ya han sido analizadas detalladamente en apartados anteriores de esta revisión bibliográfica, en este punto conviene recordar que en hospedadores de alta compatibilidad, ratones y hámsteres, la inflamación local coincide con niveles elevados de anticuerpos sistémicos y seroantígenos (Toledo *et al.*, 2004b, 2005; Sotillo *et al.*, 2007). Asimismo, Toledo *et al.* (2006b), en un estudio inmunohistoquímico con anticuerpos policlonales frente a los antígenos de ES de *E. caproni*, observaron una mayor unión de estos anticuerpos en el intestino de hámsteres que de ratas infectadas, confirmando el mayor paso de antígenos a través de la barrera intestinal en la primera especie hospedadora. Estos resultados sugieren que en hospedadores de alta compatibilidad la infección con *E. caproni* podría afectar a la estructura y/o funcionalidad de la barrera epitelial. No obstante, este mecanismo no parece ser efectivo en la expulsión de los vermes adultos. Puesto que dichas alteraciones son detectadas en aquellos hospedadores en los que la infección se establece de manera crónica, más bien debe tratarse de una consecuencia histopatológica de la respuesta inflamatoria generada en la mucosa intestinal (Toledo, 2009b).

## 1.4. COINFECCIONES PARASITARIAS

---

A pesar de que la tendencia de la mayoría de trabajos experimentales sobre enfermedades parasitarias es considerar cada especie parásita de manera aislada, la realidad y lo más habitual es que en un mismo hospedador puedan concurrir simultáneamente varios agentes infecciosos o, al menos, varios agentes capaces de estimular el sistema inmunitario. En la naturaleza, la mayoría de los animales y humanos parasitados son portadores de varias especies parásitas al mismo tiempo (Lello *et al.*, 2004; Bottomley *et al.*, 2005; Knowles *et al.*, 2013; Yakob *et al.*, 2013). Este hecho se conoce como coinfección o poliparasitismo y se define como el proceso en el que diferentes cepas o especies parásitas infectan a un mismo hospedador (May & Nowak, 1995). El estudio de las coinfecciones tiene un interés biológico especial ya que el resultado de las infecciones múltiples suele ser diferente del que se podría predecir si simplemente se superpusieran los efectos de cada infección por separado. En estos casos, el resultado no puede anticiparse mediante un modelo aditivo simple, sino que se requiere un conocimiento especial de las consecuencias de la coinfección para entender la dinámica de cada sistema parásito-hospedador. Así pues, las interacciones parásito-parásito presentan gran interés biológico por sus implicaciones para el manejo práctico de los casos de poliparasitismo en la naturaleza (Bradley & Jackson, 2008).

### 1.4.1. TIPOS DE INTERACCIONES

Las interacciones entre especies concomitantes pueden variar, desde la mera coincidencia de más de una especie en el mismo hospedador; a una especie alterando el ambiente dentro del hospedador de tal manera que beneficie o perjudique la supervivencia de otra especie; o a diferentes especies interactuando directamente, por ejemplo, a través de una competencia física por el hábitat de parasitación, los recursos nutricionales disponibles o bien a través de mediadores químicos. No obstante, la complejidad de las coinfecciones se ve aumentada por otros aspectos como el orden de exposición o el tipo de respuesta inmunitaria generada en el hospedador. Así pues, las interacciones entre especies pueden ser sinérgicas o positivas, cuando una especie

beneficia a otra o, por el contrario, antagónicas o negativas cuando la presencia de una especie afecta negativamente a la población de otra en el mismo hospedador (Behnke, 2008).

Si bien estas interacciones pueden estar causadas por una gran variedad de mecanismos de interferencia competitiva, incluyendo mecanismos de competencia positiva, lo más habitual es que estén mediadas por el sistema inmunitario del hospedador (Christensen *et al.*, 1987; Behnke *et al.*, 2001). Numerosos parásitos inducen respuestas inmunitarias polarizadas que se caracterizan por la activación y expansión de poblaciones de células T de tipo Th1, Th2, Th17 o Treg. Asimismo, el grado y tipo de polarización de la respuesta parece estar determinado por el tipo de parásito. De esta manera, la respuesta inmunitaria generada frente a un especie parásita puede afectar a otra especie concomitante, pudiendo ocasionar importantes consecuencias en términos de resistencia, susceptibilidad e inmunopatología (Graham *et al.*, 2007; Supali *et al.*, 2010). Behnke (2008) clasifica las interacciones mediadas por el sistema inmunitario en cinco grandes grupos, tres de ellos de carácter antagonista y otros dos de tipo sinérgico. Los primeros consisten en: (I) la expulsión interactiva no específica, esto es, que los mecanismos de respuesta que se generan frente a un parásito son eficaces para la expulsión de la otra especie; (II) la inmunidad cruzada, basada en el reconocimiento de antígenos heterólogos; y (III) la inducción de respuestas polarizadas que resultan efectivas frente a la segunda especie. Este tipo de interacción difiere del primero en que los mecanismos responsables de la expulsión no son los mismos que se inducen para eliminar a la especie parásita que los ha generado. En este caso la interacción interespecífica es debida a los efectos colaterales de las citoquinas. Es decir, las citoquinas generadas en la respuesta frente a un parásito pueden actuar sobre otros tipos celulares, distintos a las células diana, induciendo mecanismos de respuesta diferentes que resulten efectivos frente a la segunda especie parásita. Por su parte, las interacciones sinérgicas incluyen: (I) la inmunomodulación no específica, que implica la generación de cierto grado de inmunosupresión del hospedador por una especie parásita, favoreciendo el establecimiento de la especie concomitante; y

(II) la inducción de respuestas polarizadas que resulten inapropiadas para la inmunidad protectora frente a la otra especie.

#### **1.4.2. COINFECCIONES EXPERIMENTALES CON ECHINOSTOMAS**

En el campo de las coinfecciones parasitarias, los helmintos juegan un papel fundamental. Con la única finalidad de garantizar su supervivencia, estos parásitos tienen la capacidad de modular y suprimir la respuesta inmunitaria del hospedador y por ello son capaces de interferir en el desarrollo de respuestas protectoras frente a otras infecciones concomitantes (Helmbly, 2009; Allen & Maizels, 2011). Numerosas revisiones recogen estudios experimentales y epidemiológicos que ponen de manifiesto los efectos de las infecciones por helmintos sobre el sistema inmunitario del hospedador y sus consecuencias en la respuesta generada frente a coinfecciones de carácter variado, desde parásitos (helmintos y protozoos) a infecciones bacterianas y víricas (véase, por ejemplo, Abruzzi & Fried, 2011; Adegnika & Kremsner, 2012; Stelekati & Wherry, 2012; Webb *et al.*, 2012). No obstante, entrar a analizar los mecanismos que rigen este tipo de interacciones resultaría excesivo, al tiempo que se aleja de los objetivos principales de la presente Tesis Doctoral. Por este motivo, este apartado se centra en los trabajos que han estudiado las interacciones entre los echinostomas y otros helmintos, los cuales han sido revisados por Noland & Garczyk (2009). Si bien los miembros de este género han sido ampliamente empleados en el estudio de los fenómenos de coinfección en modelos animales, los trabajos disponibles son relativamente antiguos. Además, estos estudios se centran fundamentalmente en describir los resultados de la interacción en base al éxito de la infección, es decir, en términos de establecimiento de los adultos, crecimiento y fecundidad de los mismos o duración de las infecciones concomitantes. Sin embargo, en la mayoría de ellos no se analizan los mecanismos inmunológicos y/o fisiológicos responsables de la interacción observada.

##### **1.4.2.1. COINFECCIONES CON ECHINOSTOMAS HETERÓLOGOS**

Varios estudios han analizado el efecto de las infecciones simultáneas con especies heterólogas de echinostomas sobre el establecimiento, crecimiento y desarrollo

de los adultos. Huffman *et al.* (1988)<sup>2</sup> observaron que en la infección simultánea de hámsteres con metacercarias de *E. caproni* y *E. trivolvis*, *E. trivolvis* ejercía un efecto inhibitorio sobre el establecimiento de la otra especie, recuperándose alrededor de tres veces más adultos de *E. trivolvis* que de *E. caproni*. Además, se observó que los adultos de *E. trivolvis* estaban localizados en el yeyuno, en lugar de en la parte anterior del íleon, como sucede en las infecciones simples. Por el contrario, cuando esta infección simultánea se realizó en ratones ICR, la recuperación de adultos de *E. caproni* fue mayor que la de *E. trivolvis*, poniendo de manifiesto la importancia de la especie hospedadora en las características de la interacción (Iorio *et al.*, 1991). En este caso, no se detectaron diferencias en el lugar de establecimiento de los adultos, pero sí en el tamaño de los mismos, que en ambas especies tenían un tamaño menor que los adultos recuperados en infecciones simples. Finalmente, Meece & Nollen (1996) observaron que el establecimiento de *E. caproni* se ve significativamente reducido cuando se realizan coinfecciones simultáneas con *Echinostoma paraensei* en ratones, poniendo de manifiesto que las características de la interacción dependen también de las especies que intervienen en la misma.

En infecciones sucesivas, la primoinfección con echinostomas resulta normalmente en una inmunidad protectora frente a infecciones secundarias homólogas (Sirag *et al.*, 1980; Christensen *et al.*, 1984<sup>3</sup>). Sin embargo, Hoiser *et al.* (1988) detectaron que, mientras que la infección primaria con *E. trivolvis* ofrecía una protección casi completa frente a una infección secundaria homóloga en ratones ICR, la protección inducida frente a una infección posterior con *E. caproni* era escasa. En cambio, la infección primaria con *E. caproni* indujo una protección moderada frente a la infección secundaria homóloga, siendo más efectiva esta protección frente a la reinfección con *E. trivolvis*. Estos resultados se obtuvieron cuando la reinfección se realizó tras la eliminación de la infección

---

<sup>2</sup> En el trabajo original las especies *E. caproni* y *E. trivolvis* aparecen citadas como *E. liei* y *E. revolutum*, respectivamente.

<sup>3</sup> En los trabajos originales de Sirag *et al.* y Christensen *et al.* citados en los apartados 1.4.2.1. y 1.4.2.2. la especie *E. caproni* aparece referida como *E. revolutum*.



primaria. No obstante, la infección superpuesta con *E. trivolvis* en ratones parasitados por *E. caproni* también mostró una reducción en el número de adultos de *E. trivolvis* recuperados.

Fujino *et al.* (1996b) observaron que la infección de ratones C3H con *E. trivolvis* también inducía protección frente a la infección posterior con *E. caproni*, si bien la intensidad de la misma decaía con el tiempo postinfección primaria, sobre todo después de que se produjera la expulsión natural de los parásitos del intestino. Se propuso que esta protección podría estar mediada por un aumento en la producción de mucinas por parte de las células caliciformes, mecanismo implicado en la protección frente a *E. trivolvis* en infecciones primarias (Fujino *et al.*, 1993), si bien esta hipótesis no ha sido testada.

#### 1.4.2.2. COINFECCIONES CON OTROS TREMATODOS

Los modelos de coinfección con echinostomas y otros trematodos han consistido en el uso de diferentes especies del género *Schistosoma*. La utilización de estos modelos experimentales ha permitido detectar resistencias frente a la infección con *E. caproni* en ratones infectados con *S. mansoni* (Sirag *et al.*, 1980; Christensen *et al.*, 1981a). Estos autores encontraron que la resistencia parece depender de la producción de huevos de *Schistosoma* sp. ya que infecciones prepatentes o con adultos de un solo género no eran capaces de inducir protección frente a la infección secundaria con *E. caproni*. No obstante, esta protección se observó con cierto retraso respecto al inicio de la liberación de huevos. Así pues, la administración de las metacercarias en el inicio del periodo patente de la infección por *S. mansoni* no impedía el establecimiento de coinfecciones estables, en las que los adultos de *E. caproni* permanecían en el hospedador el mismo tiempo que en el caso de las infecciones sencillas. Christensen *et al.* (1981a) observaron que la respuesta antagonista frente a *E. caproni* empezaba a las 2 h desde la administración de las metacercarias y que todos los vermes eran expulsados del intestino de los ratones coinfectados en las 24 h siguientes. Estos resultados, ponen de manifiesto que los mecanismos responsables de la resistencia observada actúan sobre las fases iniciales de la infección, afectando al desenquistamiento de las metacercarias o atacando directamente

a los juveniles recién emergidos. Estudios posteriores pusieron de manifiesto que esta resistencia dependía también de la dosis y, en definitiva, de la carga parasitaria de los ratones infectados con *S. mansoni*. Christensen *et al.* (1985) no detectaron resistencia a *E. caproni* cuando la dosis infectiva de *S. mansoni* se reducía de 120 a 20 cercarias, aproximadamente. En este caso, en cambio, lo que se observó fue un retraso en la expulsión espontánea de los adultos de *E. caproni* en los animales coinfectados respecto de los que albergaban infecciones únicas.

Las coinfecciones con *Schistosoma bovis* también pusieron de manifiesto la importancia del tiempo postinfección primaria sobre el resultado de la interacción. La administración de las metacercarias de *E. caproni* a los 100 dpi con esta especie de *Schistosoma* resultó en una resistencia casi total a la infección secundaria (Christensen *et al.*, 1981a). En cambio, cuando el reto se realizó más tempranamente (56 dpi) no se observó resistencia frente a *E. caproni*, sino que se detectó un menor recuento de huevos de *S. bovis* en los tejidos de los ratones infectados (Sirag *et al.*, 1980).

El estudio de la influencia de infecciones patentes con *E. caproni* sobre infecciones secundarias con schistosomas mostró un aumento en el establecimiento de los adultos de *S. mansoni* (Christensen *et al.*, 1981b; Christensen *et al.*, 1988), si bien no parecía afectar al establecimiento de *Schistosoma haematobium* (Christensen *et al.*, 1988).

Más recientemente, Maldonado *et al.* (2001) analizaron experimentalmente un sistema de coinfección natural con *E. paraensei* y *S. mansoni* en la rata de agua *Nectomys squamipes*. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la existencia de infecciones patentes con *E. paraensei* reducían significativamente el establecimiento de los adultos de *S. mansoni* en este hospedador. Por el contrario, cuando se reprodujeron los experimentos empleando una cepa de *S. mansoni* mantenida en el laboratorio, no se observaron diferencias en el establecimiento de esta infección entre las ratas coinfectadas y las que presentaban la infección sencilla. Tampoco se obtuvieron diferencias cuando se emplearon ratones como hospedadores definitivos.

### 1.4.2.3. COINFECCIONES CON CESTODOS

Andreassen *et al.* (1990) estudiaron la coinfección con *E. caproni* e *Hymenolepis diminuta* y/o *Hymenolepis microstoma* en ratones NMRI. Los resultados obtenidos mostraron que la infección secundaria con *H. diminuta* causaba la desestrobilación y expulsión de este cestodo en ratones con infecciones patentes por *E. caproni*. En cambio, el establecimiento y crecimiento de *H. microstoma* no se veía afectado por la infección previa. La infección secundaria y simultánea con ambas especies de cestodos causó la expulsión de los dos parásitos del intestino de ratones infectados con *E. caproni*.

No se han encontrado estudios que evalúen la influencia de infecciones estables con cestodos sobre el establecimiento de infecciones secundarias por echinostomas.

### 1.4.2.4. COINFECCIONES CON NEMATODOS

En cuanto a la coinfección con nematodos, Fujino *et al.* (1996c) analizaron la influencia de la infección con *N. brasiliensis* sobre el establecimiento de infecciones secundarias con *E. caproni* y *E. trivolvis* en dos tiempos postinfección primaria diferentes. La infección de ratones C3H/HeN con unas 500 larvas L3 del nematodo intestinal *N. brasiliensis* indujo una resistencia total a la infección posterior con *E. caproni* y *E. trivolvis*, transcurridos 8 días desde la infección primaria. En cambio, cuando las metacercarias se administraron a los 16 dpi la resistencia observada no fue total, si bien el número de adultos de *E. caproni* y *E. trivolvis* recuperados fue menor en los animales coinfectados que en aquellos que presentaban infecciones sencillas con estos trematodos. Los ratones infectados con *N. brasiliensis* consiguen eliminar totalmente esta infección en un máximo de 11 dpi. En este tiempo, el número de células caliciformes en el intestino aumenta rápidamente tras la infección, alcanzando el máximo a los 9 dpi. Los resultados obtenidos en este estudio sugirieron que el aumento en la producción de moco ocasionado por la hiperplasia de células caliciformes asociada a la infección primaria con *N. brasiliensis* podría ser el responsable de la rápida expulsión de los echinostomas tras la infección secundaria.



# Capítulo II

---

## MATERIAL Y MÉTODOS



## **2.1. MATERIAL PARASITOLÓGICO Y DE HOSPEDADORES DEFINITIVOS**

---

En este apartado se describen los materiales empleados para el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral. Para ello se ha requerido la utilización tanto de materiales de origen parasitario, como de los diferentes hospedadores que intervienen en sus ciclos biológicos. Asimismo, se detallan los procedimientos seguidos para el mantenimiento de estos ciclos en el laboratorio, lo cual resulta indispensable para disponer de todo el material biológico necesario en cada experimento.

### **2.1.1. PARÁSITOS Y MATERIAL PARASITOLÓGICO**

Para la realización de este trabajo se han empleado dos especies parásitas diferentes, *E. caproni* y *S. muris*. Los materiales parasitológicos utilizados, así como los procedimientos seguidos para el mantenimiento del ciclo biológico de estas dos especies en el laboratorio se describen a continuación.

#### **2.1.1.1. ECHINOSTOMA CAPRONI**

La reproducción experimental del ciclo biológico de *E. caproni* fue posible gracias a las metacercarias cedidas originalmente por el Dr. Bernard Fried, del Departamento de Biología del Lafayette College (Easton, Pensilvania, EE.UU.). La cepa empleada ha sido descrita previamente por Fujino & Fried (1993a). A partir de este material se pudo establecer y mantener el ciclo biológico del parásito en nuestro laboratorio, permitiendo disponer de los diferentes estadios evolutivos del mismo.

##### ***a) Mantenimiento del Ciclo Biológico de Echinostoma caproni en el Laboratorio***

El ciclo biológico de *E. caproni* es triheteroxeno acuático, con la participación de un hospedador definitivo vertebrado y dos hospedadores intermediarios, que pueden ser distintas especies de animales de agua dulce. Concretamente, para la realización de este trabajo se han empleado diferentes especies de roedores experimentales como

hospedadores definitivos. Asimismo, se utilizó el gasterópodo pulmonado acuático *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, capaz de actuar tanto de primer como de segundo hospedador intermediario en el ciclo del parásito.

**Obtención de las metacercarias e infección de los hospedadores definitivos.** Las metacercarias, que constituyen la forma infectante para el hospedador definitivo, se obtienen de la región pericárdica y renal de ejemplares de *B. glabrata* infectados experimentalmente, mediante su cuidadosa disección bajo la lupa binocular. Con la ayuda una pipeta Pasteur, las metacercarias se agrupan en la dosis de infección adecuada según el hospedador y se recogen, en el menor volumen de agua posible, con una jeringa de 1 ml provista de una cánula metálica de 0,8x25 mm. En el presente trabajo, se utilizaron dosis de 75 metacercarias por ratón y 100 metacercarias por rata, administradas por vía oral al roedor correspondiente. Para comprobar que se había administrado el total de la dosis se realizaban varios lavados de la cánula, asegurando que no quedasen metacercarias en su interior. En tal caso, las metacercarias remanentes eran reagrupadas y se repetía el mismo proceso.

**Recuperación de los adultos y obtención y embrionación de los huevos.** Los adultos de *E. caproni* se encuentran alojados en el intestino delgado de los hospedadores definitivos. En el momento de la disección de estos hospedadores se procede a la apertura longitudinal del intestino delgado, ayudados por tijeras y pinzas de disección suficientemente finas, bajo la lupa binocular. Los adultos encontrados se recogen, con ayuda de un pincel fino, en una placa Petri con solución fisiológica [NaCl al 0,9% (p/v)].

Existen diferentes metodologías para la recuperación de los huevos del parásito que, en este caso, se obtuvieron por dilaceración del útero. Para ello, los ejemplares adultos se pasan a una placa Petri de vidrio con agua natural y, a la luz de la lupa binocular, se rasga la porción final del útero grávido empleando dos agujas enmangadas. De esta manera se obtienen todos los huevos contenidos en el útero del parásito, los cuales se encuentran en distintos estados de evolución, pues no todos habrán completado su ciclo de maduración en el interior del verme. Para la embrionación, los huevos se recogen en



viales de vidrio con agua natural, envueltos en papel de aluminio para evitar la entrada de luz y cerrados con tapas perforadas que permitan la entrada de oxígeno. Estos viales se disponen en una estufa oscura, donde se incuban a 25 °C durante al menos 15 días, hasta la formación del miracidio en su interior.

**Mantenimiento e infección de los hospedadores intermediarios.** Los gasterópodos pulmonados acuáticos juegan un papel fundamental en ciclo biológico de *E. caproni*, ya que pueden actuar como primer y segundo hospedador intermediario (Brygoo, 1965). Por ello aprovechamos este apartado para describir, además de la metodología para la infección de estos hospedadores, los métodos malacológicos para la cría y mantenimiento de los mismos en condiciones de laboratorio.

Para el establecimiento del ciclo del parásito es necesario disponer de poblaciones de moluscos libres de toda parasitación, nacidos y criados en el laboratorio a partir de ejemplares procedentes de la naturaleza. Los caracoles empleados en nuestro laboratorio fueron cedidos originalmente por el Dr. Pointier, del Laboratorio de Biología Marina y Malacología del Centro de Biología y Ecología Tropical y Mediterránea de la Universidad de Perpiñán (Francia).

Para el mantenimiento y cría de los moluscos en el laboratorio es necesario establecer unas condiciones lo más semejantes posible a las de su hábitat natural, de tal forma que los caracoles superen el período de aclimatación al nuevo ambiente, que suele ser de 24-48 h (Rondelaud & Barthe, 1978; Audousset *et al.*, 1989). Para ello se dispone de una cámara climática que permite adecuar y estandarizar, de forma constante, las condiciones de temperatura ( $20\pm 1$  °C), humedad (humedad relativa  $80\pm 5\%$ ), oxigenación (permanente) y fotoperiodo (12 h luz-12 h oscuridad, con una intensidad luminosa máxima de 3.500 lx). En esta cámara, los gasterópodos destinados a la cría se disponen en recipientes de plástico transparente, con un fondo fino y continuo de grava calcáreo-margoso, una capa de agua natural de 4-5 cm de altura y, como alimento, lechuga lavada en régimen *ad libitum* (Rondelaud & Barthe, 1978; Bouix-Busson *et al.*, 1985; Audousset *et al.*, 1989). Semanalmente se renueva el agua y se añade lechuga fresca en todos los

recipientes. Del mismo modo, de forma periódica se recolectan los grupos de huevos de gasterópodo, adheridos a las paredes del recipiente, y se trasladan a pequeños recipientes plásticos en los que no se renueva el agua hasta que se hayan desarrollado las crías, a fin de evitar posibles pérdidas.

Los gasterópodos empleados para la reproducción en el laboratorio del ciclo biológico de *E. caproni* se mantienen también en esta cámara climática. En el caso del primer hospedador intermediario, el miracidio penetra de forma activa a través del tegumento del caracol. La eclosión de los huevos embrionados y la liberación del miracidio se consigue mediante estimulación lumínica, vaciando el contenido de los viales en que se almacenan los huevos para su embrionación en la estufa, en placas Petri medianas (5 cm de diámetro) que se colocan a la luz de una lámpara de 60 W. Periódicamente, la placa se revisa para detectar miracidios recién emergidos, que son succionados individualmente con la ayuda de una pipeta Pasteur acoplada a una goma y depositados en una placa Petri pequeña (3 cm de diámetro) a la dosis miracidial requerida. Habitualmente, para el mantenimiento del ciclo biológico, se utilizan 5 miracidios por caracol. A continuación, en esta placa se introduce el gasterópodo, de una talla adecuada para la infección, y se añaden 2 ml de agua natural. Caracol y miracidios se dejan en contacto directo durante toda la noche, a 20 °C, con iluminación constante. Durante este período de exposición se debe asegurar el contacto miracidio-hospedador, impidiendo que este último salga del agua. Pasado este tiempo, el caracol se traslada a una placa Petri mediana con agua natural y un trozo de lechuga. El agua de las placas se revisa periódicamente con el fin de detectar la emisión cercariana que haga patente la infección.

En el caso del gasterópodo segundo hospedador intermediario, la infección se produce cuando se ponen en contacto el caracol primer hospedador intermediario, emisor de cercarias, con caracoles capaces de albergar la fase de metacercaria. En este caso, los caracoles primeros hospedadores intermediarios se individualizan en recipientes plásticos, con idénticas condiciones de agua y lechuga a las descritas anteriormente, debidamente etiquetados, indicando: la especie de gasterópodo, la especie parásita y la

fecha de infección. Junto a dicho caracol primer hospedador intermediario y, por tanto, emisor de cercarias, se dispone un segundo caracol capaz de albergar en su interior las metacercarias (segundo hospedador intermediario). Ambos caracoles se mantienen en contacto durante un periodo de 15 días para que almacenen la mayor cantidad posible de metacercarias. Transcurrido este tiempo se renueva el segundo gasterópodo, que se mantiene en un recipiente distinto hasta su disección para la obtención de las metacercarias.

Las técnicas empleadas para la infección experimental de moluscos pueden ser consultadas con más detalle en las obras de Toledo (1992), Muñoz-Antolí (1997), Pérez (1999) y Trelis (2004).

#### ***b) Antígenos Completos de Individuos Adultos de Echinostoma caproni***

Los antígenos son soluciones proteicas obtenidas a partir de productos del parásito. Más concretamente, los antígenos completos consisten en una mezcla heterogénea de proteínas obtenida a partir de la homogenización de ejemplares adultos del parásito entero. Estos antígenos se han utilizado para la realización de técnicas inmunológicas dirigidas a analizar la reactividad cruzada entre los anticuerpos generados por el hospedador frente al nematodo *S. muris* y los antígenos de *E. caproni*.

#### ***c) Antígenos de Excreción/Secreción de Individuos Adultos de Echinostoma caproni***

En este caso, la mezcla de proteínas proviene de los productos excretados y secretados por parásitos adultos vivos. Estos antígenos se emplearon también en técnicas inmunológicas para el estudio, en este caso, de la respuesta inmunitaria generada frente a *E. caproni* en diferentes cepas de ratón susceptibles a la infección. Asimismo, se llevó a cabo un estudio preliminar de las catepsinas contenidas en este producto.

#### ***d) Cortes Histológicos de Individuos Adultos de Echinostoma caproni***

Se emplearon cortes histológicos de vermes adultos para llevar a cabo experimentos de inmunohistoquímica que permitieran localizar la expresión de catepsinas en los tejidos del parásito.

### 2.1.1.2. *SYPHACIA MURIS*

La cepa de *S. muris* empleada en este trabajo fue aislada e identificada a partir de ratas de la cepa Wistar estabuladas en el animalario de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València que, accidentalmente, resultaron infectadas de forma natural con este nematodo. A partir de este material se consiguió establecer y mantener experimentalmente el ciclo biológico del parásito en el laboratorio.

#### **a) Identificación Específica**

Para identificar la especie de *Syphacia* aislada del intestino grueso de las ratas estabuladas se siguieron los criterios morfológicos descritos por Hussey (1957) y Lewis & D'Silva (1986). Si bien *S. obvelata* suele ser la especie más común de los ratones de laboratorio y *S. muris* la especie habitual de las ratas albinas, estas también pueden servir ocasionalmente como hospedadores de *S. obvelata*, y viceversa. Así pues, el hospedador no debe ser considerado como un criterio para la identificación. Las principales características morfológicas que distinguen a ambas especies y que, según Hussey (1957), resultan claves para su identificación diferencial son:

I) Los adultos, machos y hembras, de *S. muris* son ligeramente más pequeños que los de *S. obvelata* (longitud del cuerpo de los adultos de *S. muris*: ♂ 1,00-1,30 mm; ♀ 2,74-4,02 mm).

II) En ambos casos los huevos presentan un lateral aplanado, sin embargo, los de *S. muris* tienen una longitud de poco más de la mitad de los de *S. obvelata*, aunque la anchura es similar (tamaño del huevo de *S. muris*: 69-75x29 µm).

III) La posición del poro excretor en machos y hembras y de la vulva en las hembras es, con respecto al extremo anterior, más posterior en *S. muris* que en *S. obvelata* (distancia desde el extremo anterior al poro excretor en los adultos de *S. muris*: ♂ 357 µm; ♀ 558 µm).

IV) El gancho distal del macho de *S. muris* es más delgado y tiene una longitud de, aproximadamente, el doble del ancho de su cuerpo. En los machos de *S. obvelata* su longitud es aproximadamente igual a la anchura del cuerpo.

V) Los machos de ambas especies presentan tres proyecciones cuticulares ventrales o mamelones. En los machos de *S. muris* el mamelón anterior se localiza próximo a la mitad del cuerpo, mientras que en *S. obvelata* es el mamelón central el que ocupa esta posición.

La Figura 2.1. muestra imágenes de ejemplares adultos y huevos aislados de ratas infectadas naturalmente, a partir de los cuales se obtuvo el material necesario para el establecimiento del ciclo experimental del parásito en el laboratorio. Las imágenes se tomaron con un microscopio óptico Nikon *ECLIPSE 50i* acoplado a una cámara digital.

#### **b) Mantenimiento del Ciclo Biológico de *Syphacia muris* en el Laboratorio**

Para el establecimiento y mantenimiento del ciclo biológico del parásito en el laboratorio se siguió el protocolo descrito por Stahl (1961), con ligeras modificaciones. El ciclo biológico de este nematodo es monoxeno directo, por lo que su reproducción experimental resulta relativamente sencilla. En primer lugar se procede a la disección de los animales parasitados, cuya positividad se ha determinado previamente mediante la técnica de la cinta adhesiva o cinta de Graham. Esta técnica diagnóstica consiste en pasar una cinta adhesiva por los márgenes perianales del animal, la cual se pega a continuación sobre un portaobjetos y se examina al microscopio para buscar los huevos del nematodo, tal y como describen Hill *et al.* (2009). En la disección, se abre longitudinalmente el colon de los animales y se recogen cuidadosamente, con la ayuda de unas pinzas finas, las hembras grávidas que se encuentran migrando a través de esta porción del intestino grueso. De esta manera se asegura que los huevos obtenidos estén suficientemente maduros para continuar el ciclo, ya que las hembras migrantes se dirigen a liberar todo el contenido de su útero en los márgenes perianales del animal. Estas hembras se disponen individualmente en placas Petri pequeñas con solución fisiológica. En contacto con el aire, y estimulado por la manipulación de los vermes, algunas hembras



**Figura 2.1.- Material parasitológico de *Syphacia muris*.** Imágenes de microscopía óptica de ejemplares de *S. muris*, aislados de ratas estabuladas, utilizados en este trabajo para el establecimiento del ciclo experimental del parásito en el laboratorio. (A) adulto macho, (B) hembra grávida, (C) detalle de la porción cefálica del macho, (D) detalle del extremo posterior del macho y (E) huevo.

extruden espontáneamente el útero, liberando los huevos al exterior. En caso contrario, se puede favorecer la extrusión del útero y la consiguiente liberación de los huevos con ayuda de unas pinzas finas y una aguja enmangada.

Los huevos de *S. muris*, aunque embrionados en el momento de la puesta, requieren de un corto periodo de maduración en el ambiente antes de convertirse en infectantes para el hospedador definitivo. Stahl (1961) observó que estos huevos se convertían en infectantes tras incubarlos 30 min a temperatura ambiente, seguidos de 4 h a 37 °C. En nuestro caso, los huevos se incubaron durante al menos 8 h a una

temperatura constante de 20 °C, consiguiendo igualmente la maduración adecuada de los mismos, de manera que resultaban infectantes para los nuevos hospedadores experimentales. Los huevos infectantes eran recontados y agrupados en la dosis adecuada (500 huevos/rata) antes de ser administrados a los nuevos hospedadores. A la luz de la lupa binocular y con la ayuda de una micropipeta acoplada a una punta de 200 µl, se recogían los huevos en solución fisiológica y se administraban lentamente al animal por vía oral, asegurando la ingestión de todo el líquido así como la ausencia de huevos en la punta de pipeta mediante repetidos lavados de la misma.

**c) Antígenos Completos de Individuos Adultos de *Syphacia muris***

Del mismo modo que se ha descrito anteriormente para *E. caproni*, en este trabajo se utilizaron también soluciones proteicas complejas de *S. muris*, obtenidas a partir de la homogenización de ejemplares adultos del parásito. Estos antígenos se emplearon para el estudio de la respuesta inmunitaria generada en rata frente a la infección, así como para el estudio del proteoma de la fase adulta de este nematodo.

**2.1.2. HOSPEDADORES DEFINITIVOS Y MATERIAL DE HOSPEDADORES**

Numerosas especies de vertebrados, aves y mamíferos, pueden actuar como hospedadores naturales de *E. caproni*. A nivel de laboratorio, sin embargo, el número de hospedadores empleados es más limitado, habiéndose descrito la infección experimental en pollos y varias especies de micromamíferos (Brygoo, 1965). No obstante, lo más habitual es la utilización de distintas especies de roedores experimentales que muestran diferente compatibilidad con el parásito, permitiendo el estudio de las relaciones parásito-hospedador y de los factores dependientes del hospedador que determinan el curso y evolución de la infección (Toledo & Fried, 2005). En este sentido, los mayores éxitos de infección se han obtenido en ratones de la cepa ICR y en hámsteres, en los que el parásito se establece de forma crónica. En cambio en ratas, tanto la duración de la infección como la carga parasitaria son menores, siendo la cepa Wistar la más utilizada para el estudio de los factores determinantes de la expulsión de los adultos del intestino.

El presente trabajo se ha realizado empleando ratones y ratas como hospedadores definitivos de *E. caproni*. Concretamente, se han utilizado ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) de la cepa Wistar como hospedadores de baja compatibilidad. Asimismo, se han utilizado diferentes cepas de ratón (*Mus musculus* Linneaus, 1758). Se emplearon ratones ICR (CD-1®), descritos como hospedadores altamente compatibles con *E. caproni* (Hosier & Fried, 1991), además de ratones de la cepa BALB/c, que tienden a polarizar la respuesta inmunitaria hacia un fenotipo Th2 (Watanabe *et al.*, 2004), y una cepa de ratones *knock out*, deficientes en IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma^{-/-}$ ), generados sobre un fondo genético BALB/c.

La segunda especie parasitaria utilizada en este trabajo, *S. muris*, un es nematodo intestinal común en ratas de laboratorio, por lo que se han empleado ejemplares de *R. norvegicus* de la cepa Wistar. En ellos se estudió la respuesta del hospedador frente a la infección y el efecto de la misma sobre el establecimiento de una infección superpuesta con *E. caproni*.

#### **2.1.2.1. MANTENIMIENTO DE HOSPEDADORES DEFINITIVOS**

El desarrollo de la presente Tesis Doctoral ha requerido la utilización de numerosos ejemplares de las especies y cepas de hospedadores definitivos citadas anteriormente. El mantenimiento y la manipulación de los animales se llevó a cabo en cumplimiento de la normativa nacional (Ley 32/2007, modificada por la Ley 6/2013) y de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo). Asimismo, todos los procedimientos que implicaron la utilización de animales de experimentación fueron aprobados y autorizados por la Direcció General de Producció Agrícola i Ramadera de la Generalitat Valenciana y el Comité d'Ètica i Benestar Animal de la Universitat de València (procedimientos: 2014/008/UVEG/024 y A1326905320975, respectivamente).

Todos los animales utilizados procedían de laboratorios especializados en la cría y distribución de animales de experimentación (Charles River Laboratories o The Jackson Laboratory). Una vez recibidos en nuestro centro, los animales eran estabulados en el



animalario de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València [Secció de Producció Animal del SCSIE (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental)], donde eran mantenidos en jaulas de plástico, provistas de una cama seca de serrín, en régimen de alimentación *ad libitum* a base de pienso autoclavable (Harlan) y agua natural autoclavada.

#### ***a) Condiciones Especiales de Mantenimiento y Manipulación***

En algunos casos se requirieron condiciones de mantenimiento más específicas. Los animales infectados con *S. muris* eran mantenidos en jaulas cerradas con tapa filtrante y manipulados en cabinas de flujo laminar vertical (clase II), adecuadamente desinfectadas antes y después de la manipulación, con la finalidad de evitar la diseminación de la infección al resto de la colonia.

Por otra parte, uno de los experimentos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral requirió la administración de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) a un grupo de hospedadores definitivos. Debido a la citotoxicidad de este compuesto, los animales inoculados con esta sustancia se estabularon en jaulas específicas para este fin, utilizando cubetas desechables con viruta estéril y tapa filtrante, y se manipularon en cabinas de seguridad biológica de clase II siguiendo las medidas de protección personal y ambiental indicadas por el Servei de Prevenció i Medi Ambient de la Universitat de València.

#### ***b) Sacrificio de los Animales***

El sacrificio de los hospedadores definitivos se llevó a cabo de acuerdo con la normativa vigente, empleando isoflurano, un éter halogenado utilizando como anestésico inhalatorio que, vaporizado en aire, induce inicialmente la anestesia del animal, ocasionando posteriormente fallo cardiovascular, respiratorio y muerte por sobredosis.

#### **2.1.2.2. MATERIAL DE HOSPEDADORES DEFINITIVOS**

A partir de los hospedadores infectados y los correspondientes controles, tras la disección y necropsia, se obtuvieron diferentes materiales según los requerimientos de cada estudio.

### **a) RNA Total de Tejidos**

Los estudios basados en la expresión génica de citoquinas, mucinas y el enzima iNOS requirieron la extracción del RNA total de diferentes tejidos inmunoactivos (bazo, NLM, placas de Peyer e intestino) y de intestino, respectivamente. La fracción de mRNA fue posteriormente convertida a cDNA (DNA copia) y utilizada para la cuantificación relativa de la expresión génica mediante RT-PCRrt.

### **b) Muestras de Suero**

La respuesta humoral generada a nivel sistémico frente a la infección con *E. caproni* o *S. muris* fue estudiada mediante ELISA indirecto empleando muestras de suero, obtenidas antes y después de la infección.

### **c) Lavados Intestinales**

La presencia de anticuerpos frente a los antígenos de *E. caproni* o *S. muris* en la mucosa del intestino delgado fue igualmente analizada por ELISA indirecto, mediante la utilización de las secreciones intestinales recogidas de animales control e infectados con cada especie parásita.

### **d) Cortes Histológicos de Intestino**

Se emplearon cortes histológicos de íleon, de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, para la realización de diferentes técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas. Las secciones de intestino procedentes de animales infectados y no infectados fueron empleadas para el estudio de la patología intestinal inducida por la infección, mediante la observación de la estructura del tejido y el recuento de varias poblaciones celulares. También se utilizaron cortes histológicos para estudiar los cambios en la producción y secreción de mucinas solubles en la infección con *E. caproni*, así como las alteraciones en la glicosilación de mucinas, solubles y transmembrana, como consecuencia de la infección por *E. caproni* y *S. muris*, para lo cual se utilizó una batería de lectinas con diferente especificidad de ligando. Finalmente, se emplearon secciones de intestino delgado para analizar los

cambios en el recambio del epitelio intestinal inducidos por la infección con *E. caproni* en hospedadores de alta y baja compatibilidad.

### **e) Extracto Proteico de Células Epiteliales Intestinales**

Los cambios inducidos por la infección experimental con *E. caproni* sobre la expresión de proteínas en el íleon de ratones y ratas infectados fueron estudiados sobre una solución compleja de proteínas intestinales, preparada a partir del aislamiento y lisado de las células del epitelio intestinal de animales infectados y control. Asimismo, este material fue utilizado para estudiar los cambios inducidos sobre el estatus de glicosilación de estas proteínas en el intestino de ratas infectadas.

## **2.2. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA**

---

En el presente trabajo se ha analizado la cinética de expresión de citoquinas en varios tejidos inmunoactivos en respuesta a la infección con *E. caproni* y *S. muris* en los distintos hospedadores. Asimismo, se evaluaron los niveles de expresión de mucinas y del enzima iNOS en el íleon de estos hospedadores durante la infección con cada especie parásita. La cuantificación relativa de la expresión se llevó a cabo por RT-PCRrt, una variante de la PCR que permite la amplificación y cuantificación simultánea del producto amplificado, ya que la emisión de fluorescencia generada en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado y, por tanto, a la cantidad inicial de cDNA en la muestra.

### **2.2.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL**

Para la realización de diferentes estudios incluidos en la presente Tesis Doctoral se aisló el RNA total de bazo, NLM, placas de Peyer e íleon empleando el kit *Real Total ARN Spin Plus Kit* (Durviz), que permite la obtención de RNA total, libre de DNA, mediante la utilización de una membrana de sílica.

El aislamiento del RNA total se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. En líneas generales, el protocolo de extracción consiste en: (I) lisis celular por incubación con una solución que contiene agentes caotrópicos, que inactivan las RNasas y crean las condiciones de unión apropiadas para la adsorción del RNA a la membrana de sílica; (II) homogenización y filtración del lisado; (III) adsorción de los ácidos nucleicos libres sobre la membrana de sílica; (IV) eliminación del DNA contaminante por tratamiento con una solución de DNasa I, aplicada directamente sobre la membrana; y (V) elución del RNA total purificado con agua libre de nucleasas. Las sales, metabolitos y componentes celulares son eliminados por lavados con diferentes tampones durante el protocolo de extracción.

### **2.2.2. OBTENCIÓN DE cDNA: RETROTRANSCRIPCIÓN**

La retrotranscripción del mRNA a cDNA se llevó a cabo usando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®), que incluye todos los componentes necesarios para esta conversión: tampón de reacción, dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato), mezcla de cebadores aleatorios, enzima (transcriptasa reversa) e inhibidor de RNasas. La mezcla y la reacción de retrotranscripción se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con las siguientes condiciones del termociclador: un paso inicial de 10 min a 25 °C, seguido de 120 min a 37 °C y un paso de 5 min a 85 °C, antes de enfriar la muestra hasta 4 °C. Los productos de esta reacción se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

### **2.2.3. PCR A TIEMPO REAL: CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA**

Para las PCRs cuantitativas se añadieron 9 µl de cDNA, diluido 1/20 en agua estéril, a 10 µl de *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2x)* y 1 µl del *TaqMan® Gene Expression Assay* correspondiente (todos los productos de Applied Biosystems®), siendo el volumen final de reacción de 20 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en el *Abi Prism 7000* (Applied Biosystems®), con las siguientes condiciones del termociclador: un paso inicial de 2 min a 50 °C, seguido de 10 min a 95 °C y 40 ciclos de 15

s de desnaturalización a 95 °C y 1 min de templado/extensión a 60 °C. Las muestras se amplificaron en placas de 96 pocillos. En cada placa, los controles endógenos, las muestras y los controles negativos se analizaron por triplicado.

Todos los cebadores y sondas, excepto los de IL-6, están diseñados por Applied Biosystems® y se ofrecen como ensayos inventariados. La Tabla 2.1. recoge, para cada hospedador, los ensayos inventariados usados para la  $\beta$ -actina, las distintas citoquinas y mucinas analizadas en este trabajo y el enzima iNOS. Cada ensayo contiene dos cebadores no marcados y una sonda marcada [6-FAM™ (carboxifluoresceína) *dye-labeled*, TaqMan® MGB probe]. Los cebadores y la sonda fluorescente para la IL-6 se diseñaron a partir de secuencias publicadas usando el software *PrimerExpress*® v2.0 de Applied Biosystems® (Trelis *et al.*, 2011). Las secuencias de estos cebadores y de la sonda marcada con FAM™ son:

5'-ACCCACAACAGACCAGTATATACCA-3' (sentido)

5'-CATTCCAAGATCTCCCTGAGAACA-3' (antisentido)

5'-CACAAGTCGGAGGCTTA-3' (sonda)

Se calculó el ciclo umbral (Ct) para cada muestra, control endógeno y control negativo. Las diferencias en la extracción del RNA y/o la síntesis de cDNA entre las distintas muestras se normalizaron utilizando el gen de la  $\beta$ -actina como control endógeno. A fin de valorar la influencia de la infección en los niveles de expresión se empleó un método de cuantificación comparativo (método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Livak & Schmittgen, 2001), basado en que la diferencia entre los ciclos umbral ( $\Delta Ct$ ) del gen de interés y del control endógeno es proporcional al nivel de expresión del gen de interés. Para obtener la cuantificación relativa de los niveles de expresión en los animales infectados, expresada en términos de cantidad relativa (RQ), el cambio en la expresión del gen de interés se normalizó respecto al de la  $\beta$ -actina y se relativizó con respecto a su expresión a tiempo 0 (controles no infectados) (Klein, 2002). Los resultados se expresan como la RQ media, con su correspon-

**Tabla 2.1.-** Detalles de identidad de los ensayos *TaqMan*<sup>®</sup>

	<b>Rata</b>	<b>Ratón</b>
$\beta$ -actina	Rn00667869_m1	Mm01205647_g1
<b>CITOQUINAS</b>		
IL-4	Rn99999010_m1	Mm00445259_m1
IL-5	Rn01459975_m1	Mm99999063_m1
IL-6	<i>Custom Assay*</i>	Mm00446190_m1
IL-10	Rn00563409_m1	Mm00439614_m1
IL-13	Rn00587615_m1	Mm99999190_m1
IL-17A	Rn01757168_m1	Mm00439618_m1
IL-23A	Rn00590334_m1	Mm00518984_m1
IFN- $\gamma$	Rn01420317_m1	Mm99999071_m1
TGF- $\beta$	Rn00572010_m1	Mm001178820_m1
TNF- $\alpha$	Rn99999017_m1	Mm99999068_m1
Eotaxina/CCL11**	Rn00569995_m1	Mm00441238_m1
<b>MUCINAS</b>		
Muc1	Rn01462585_m1	Mm00449604_m1
Muc2	Rn01498197_m1	Mm01276696_m1
Muc3	Rn01481134_m1	Mm01207064_m1
Muc4	Rn01475265_m1	Mm00466886_m1
Muc5ac	Rn01451270_g1	Mm01276718_m1
Muc13	Rn00709919_m1	Mm00495397_m1
Muc15	Rn01747580_m1	Mm00662032_m1
Muc16	Rn01448094_m1	Mm01177118_m1
Muc20	Rn 01474963_m1	Mm00524818_m1
iNOS	Rn00561646_m1	Mm01309897_m1

\* Ensayo no inventariado.

\*\* Quimioquina 11 motivo C-C.

**Tabla 2.1.-** Ensayos inventariados de Applied Biosystems<sup>®</sup> para  $\beta$ -actina, las distintas citoquinas y mucinas y el enzima iNOS.

diente desviación estándar (ds), para cada semana postinfección, excepto cuando se indique explícitamente.

## 2.3. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS

---

Las respuestas humorales generadas a nivel sistémico y/o local frente a las infecciones por *E. caproni* y *S. muris* en el hospedador definitivo se analizaron mediante ELISA indirecto.

### 2.3.1. PREPARACIÓN DE LOS ANTÍGENOS

Como se comentó anteriormente, los antígenos son soluciones proteicas complejas que pueden ser obtenidas a partir de diferentes productos del parásito. A continuación se describe la metodología seguida para la obtención de los diferentes antígenos empleados en este trabajo para el estudio de las respuestas de anticuerpos. En todos los casos los productos fueron almacenados a -80 °C hasta su utilización, antes de lo cual se determinaba la concentración de proteínas en la muestra con *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad). Este ensayo está basado en el método de Bradford para la cuantificación de proteínas solubles (Bradford, 1976), de acuerdo con el cual el máximo de absorbancia de una solución ácida de azul de Coomassie cambia de 465 nm a 595 nm cuando el colorante se une a los residuos aminoácidos básicos y aromáticos, sobre todo argininas (Arg), presentes en las proteínas solubles.

La mezcla de reacción era preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación se procedía a la lectura espectrofotométrica de la absorbancia, a una longitud de onda de 595 nm, en un lector de placas de ELISA *iMark Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad), empleando el software *Microplate Manager™ 6.0*. La interpolación del resultado en una recta patrón, hallada en las mismas condiciones a partir de una serie de diluciones de concentración creciente y conocida de BSA (albúmina de suero bovino), permitía cuantificar la concentración de proteínas en la muestra problema.

### **2.3.1.1. ANTÍGENOS COMPLETOS DE INDIVIDUOS ADULTOS DE *ECHINOSTOMA CAPRONI***

Para la obtención del antígeno completo de *E. caproni* se recogieron ejemplares adultos del intestino delgado de animales infectados experimentalmente. Una vez extraídos, los adultos se lavaron varias veces en tampón fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KCl 2,7 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) y se introdujeron en un medio con PBS, antibióticos (100 U de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina) y cantidad suficiente de inhibidor de proteasas. Como inhibidor de proteasas se empleó la mezcla *cOplete, Mini, EDTA-free* (Roche), que inhibe la actividad de un amplio espectro de serín- y cisteín-proteasas de diferente naturaleza. Posteriormente, los vermes se homogenizaron en este medio con la ayuda de un pistón acoplado a un rotor eléctrico. Tras una primera centrifugación suave para eliminar las partículas de mayor tamaño, el sobrenadante se centrifugaba a 15.000 g durante 30 min a 4 °C y se filtraba por un poro de 0,22 µm de diámetro para su esterilización.

### **2.3.1.2. ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN DE INDIVIDUOS ADULTOS DE *ECHINOSTOMA CAPRONI***

Los ESP están constituidos por moléculas del parásito que son liberadas al medio de cultivo durante su incubación. Para su preparación, los adultos de *E. caproni* eran lavados e incubados en un medio con PBS, 100 U de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina e inhibidor de proteasas *cOplete, Mini, EDTA-free* (Roche) a la concentración adecuada. Los vermes se disponían a una concentración de 20 adultos/ml de medio y se incubaban durante 12 h en estufa a 37 °C con agitación suave. Transcurrido este tiempo se recogía el medio de cultivo, se centrifugaba a 15.000 g durante 30 min a 4 °C para eliminar las partículas de mayor tamaño y se filtraba por un poro de 0,22 µm de diámetro para su esterilización.

### **2.3.1.3. ANTÍGENOS COMPLETOS DE INDIVIDUOS ADULTOS DE *SYPHACIA MURIS***

Para la obtención del antígeno completo de *S. muris* se recogieron adultos, machos y hembras, del ciego y colon de ratas infectadas experimentalmente. Los adultos fueron recogidos cuidadosamente con ayuda de un pincel fino y se lavaron varias veces en



PBS antes de introducirlos en una solución de PBS, conteniendo 100 U de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina e inhibidor de proteasas *cOmplete, Mini, EDTA-free* (Roche) a la concentración indicada por el fabricante. A continuación, los adultos se homogenizaron por sonicación durante 2,5 min, aplicados en 5 pulsos de 30 s y dejando intervalos de 45 s entre ellos para evitar el calentamiento excesivo de la muestra. Seguidamente, el producto se sometía a una centrifugación suave para eliminar las partículas más groseras y el sobrenadante se centrifugaba a 15.000 g durante 30 min a 4 °C, antes de filtrarlo por un poro de 0,22 µm de diámetro para su esterilización.

### **2.3.2. OBTENCIÓN DE SUEROS Y LAVADOS INTESTINALES**

Las respuestas de anticuerpos generadas por los diferentes hospedadores frente a la infección con *E. caproni* o *S. muris* fueron estudiadas a nivel sistémico y/o local utilizando muestras de suero y mucosa intestinal, respectivamente, obtenidas tal y como se describe a continuación.

#### **2.3.2.1. MUESTRAS DE SUERO**

La respuesta humoral sistémica se evaluó empleando sueros obtenidos de hospedadores definitivos, antes y después de la infección. Para ello se extrajeron muestras sanguíneas de 100 µl y 300 µl de ratones y ratas, respectivamente. La vía de extracción fue diferente en cada caso, empleándose la más adecuada para cada animal de experimentación, de acuerdo con la normativa vigente y siguiendo los criterios de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de laboratorio (SECAL). En los ratones la extracción se realizó por punción del plexo submandibular, mientras que en las ratas las muestras se obtuvieron a partir de la vena safena. Cada muestra de sangre se dejó coagular durante 8 h en un tubo plástico de 1,5 ml a 4 °C. Posteriormente se sometió a una centrifugación a 10.000 g durante 5 min y se separó el suero, que se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

### 2.3.2.2. LAVADOS INTESTINALES

Para el estudio de las respuestas locales de anticuerpos se recogieron las secreciones intestinales de los animales correspondientes siguiendo el método descrito por Ben-Smith *et al.* (1999), ligeramente modificado por Sotillo *et al.* (2007). En las diferentes semanas de estudio, se sacrificaba un número determinado de animales control e infectados a los que se les extraía el intestino delgado. Tres mililitros de una solución 0,1 mg/ml de inhibidor de tripsina y quimotripsina (*Glycine max*) (Sigma-Aldrich®) en ácido etilendiamintetraacético (EDTA) 50 mM se hicieron pasar a través del intestino, masajeándolo ligeramente antes de recolectar el fluido. Las muestras se centrifugaron a 700 g durante 10 min, antes de añadir 30 µl de fluoruro de metilfenilsulfóxido (PMSF) 100 mM en etanol 96°. A continuación, se centrifugaron a 4 °C durante 15 min, a una velocidad de 3.000 g, y al sobrenadante se añadieron 20 µl de PMSF y 20 µl de azida de sodio al 1% (p/v). Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

### 2.3.3. ELISA INDIRECTO

La prueba de ELISA, acrónimo del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*, es una técnica inmunológica en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo acoplado a un enzima capaz de generar un producto de reacción medible. La técnica de ELISA indirecto, empleada en este trabajo, implica la utilización de dos anticuerpos diferentes: un anticuerpo primario, susceptible de reconocer el antígeno, que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario, conjugado con el enzima. De esta manera se puede evaluar la presencia de un anticuerpo particular en una muestra.

Esta técnica se utilizó para analizar la respuesta humoral, local y sistémica, generada en rata frente a la infección con *S. muris*, así como para evaluar la reactividad de estos anticuerpos frente a los antígenos de *E. caproni*. Por otra parte, se analizó la respuesta sistémica de anticuerpos en diferentes cepas de ratón infectadas con *E. caproni*. En los siguientes apartados se describen el protocolo general y la puesta a punto de la técnica. Las diluciones empleadas en cada experimento concreto se detallan en los apartados correspondientes del Capítulo III.

### 2.3.3.1. PROTOCOLO GENERAL

Los ensayos ELISA se llevaron a cabo en placas de poliestireno de 96 pocillos (Nalgene), siguiendo el protocolo descrito por Sotillo *et al.* (2007). Las placas microtítulo se sensibilizaron durante una noche a 4 °C con 100 µl/pocillo de una solución del antígeno correspondiente, a una concentración de 30 µg/ml, en una disolución tampón de carbonatos 0,1 M (1,52 g/l de CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>, 2,93 g/l de HCO<sub>3</sub>Na), pH 9,6. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS-Tween®-20 al 0,05% (v/v) (PBS-T) y los sitios no tapizados se bloquearon con una solución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en PBS-T. Tras una incubación de 1 h a 37 °C, las placas se lavaron y las muestras de suero o mucosa intestinal, a las diluciones adecuadas en PBS-T, se añadieron a cada pocillo. Se realizó una incubación de 1 h y 30 min en estufa a 37 °C con agitación suave y se lavaron nuevamente antes de añadir el anticuerpo secundario. Cien microlitros del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Nordic Immunological Laboratories), preparado a la dilución adecuada en PBS-T, se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 1 h en estufa a 37 °C. Finalmente, las placas se lavaron con PBS-T, tal y como se ha descrito, antes del revelado.

Posteriormente, se añadieron 100 µl por pocillo de una solución sustrato [0,4 mg/ml de ortofenildiamina (OPD) en tampón de citratos (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 0,1 M) y fosfatos (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M), pH 5,0, y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,04% (v/v) como agente oxidante] y se incubaron a temperatura ambiente, en oscuridad. Las reacciones enzimáticas se detuvieron con 50 µl por pocillo de HCl 3 N. Finalmente las placas se leyeron a 490 nm en un lector ELISA *iMark Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad), empleando el software *Microplate Manager™ 6.0*. Cada muestra fue examinada por triplicado y el resultado se expresó como la densidad óptica (DO) media con su correspondiente desviación estándar.

### 2.3.3.2. PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA

Para la puesta a punto de la técnica, en cada caso, se realizaron una serie de pruebas previas que permitieron establecer las concentraciones a utilizar de los diferentes inmunoreactivos. Para la determinación de la concentración óptima de antígeno se realizaron titulaciones frente a sueros positivos y negativos. La última dilución de antígeno

a la cual la DO no difería de la anterior fue seleccionada, fijándose en 3 µg por pocillo. Para la determinación de las diluciones óptimas de los anticuerpos primarios y secundarios, varias diluciones de sueros y mucosas de animales infectados y control fueron titulados con diferentes concentraciones de los conjugados. El par de diluciones con el que se observó una mayor diferencia de DO entre las muestras positivas y negativas fue el elegido para cada ensayo.

## **2.4. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS HISTOPATOLÓGICOS**

---

Tanto *E. caproni* como *S. muris* son helmintos parásitos del intestino de roedores. Con la finalidad de evaluar las alteraciones histológicas e inmunopatológicas inducidas por estas infecciones en el intestino del hospedador se llevaron a cabo diferentes tinciones histológicas generales y selectivas.

### **2.4.1. OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS**

Para la preparación de los cortes histológicos se obtuvieron segmentos de íleon, de 0,7-1 cm de longitud, a partir de animales control e infectados con *E. caproni* o *S. muris*, a diferentes tiempos postinfección. Estos segmentos se fijaron por inmersión en formalina al 4% (v/v) y, tras embeberlos en parafina, se cortaron secciones seriadas de 4 µm de espesor que se fijaron sobre portaobjetos *Apex™ Superior Adhesive Slide* (Leica Biosystems), cubiertos por un material adhesivo que proporciona una mayor hidrofilia, garantizando una cobertura más homogénea con colorantes y reactivos acuosos.

### **2.4.2. TINCCIONES HISTOLÓGICAS**

Con las secciones intestinales obtenidas de esta manera se llevaron a cabo tinciones histológicas, generales y selectivas, para el recuento de varias poblaciones celulares.

En todos los casos, antes de proceder a la tinción, los cortes se incubaron durante 30 min en estufa a 55 °C para extraer la parafina del tejido. A continuación, se pasaron por una cadena de hidratación que consistió en los siguientes pasos: 2 pasos de 5 min en xilol; un paso de 5 min en etanol 100°; un paso de 5 min en etanol 96°; un paso de 5 min en etanol 70°; y un último paso de 1 min en agua destilada, en agitación. Tras la tinción, las preparaciones (excepto las secciones teñidas con Giemsa) se sometieron a una cadena de deshidratación siguiendo los pasos siguientes: 3 min en etanol 70°; 3 min en etanol 96°; 3 min en etanol 100°; y un último paso de 5 min en xilol. Finalmente se montaron empleando el medio de montaje para microscopía óptica *Eukitt* (Sigma-Aldrich®).

Los cortes histológicos y la tinción de los mismos se realizaron en la Secció de Microscòpia del SCSIE (Universitat de València).

#### **2.4.2.1. TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA**

Para la tinción con hematoxilina-eosina se emplearon secciones intestinales de ratas y ratones control e infectados con *E. caproni* con la finalidad de analizar los cambios inducidos por la infección en la estructura del tejido intestinal. Una vez en medio acuoso, los cortes se tiñeron por inmersión en una solución comercial de hematoxilina durante 15 min y se lavaron en agua para eliminar el exceso de colorante. Se hizo un pase de un par de segundos en HCl al 3,25% (v/v) en etanol absoluto y se lavaron con agua corriente durante 5 min antes de teñirlos, por inmersión, con una solución comercial de eosina durante 10 min. Finalmente, los cortes se deshidrataron y montaron tal y como se ha descrito.

#### **2.4.2.2. TINCIÓN CON GIEMSA**

El recuento de las poblaciones de eosinófilos y neutrófilos en el intestino se realizó sobre cortes teñidos con Giemsa, que permite la diferenciación de los leucocitos en base a la morfología nuclear y la coloración de los gránulos citoplasmáticos. Los cortes histológicos, llevados a medio acuoso, se tiñeron por inmersión durante 2 h en una disolución acuosa de Giemsa, preparada a partir de una solución comercial. La

composición de la solución de trabajo fue la siguiente: tampón acetato [ácido acético glacial 0,96% (v/v) y acetato sódico 0,54% (p/v), pH 4] al 3% (v/v), acetona al 5% (v/v) y solución comercial de Giemsa al 4% (v/v). A continuación, las secciones se lavaron con agua destilada antes de deshidratar y montar. La deshidratación se realizó en 3 pasos, de 5 min cada uno, en acetona, acetona-xilol (1:1) y xilol, respectivamente.

#### **2.4.2.3. TINCIÓN CON AZUL DE TOLUIDINA**

Para el recuento de mastocitos se empleó la tinción con azul de toluidina a pH 5, que tiñe de color morado/violeta los gránulos metacrómicos de estas células. Las secciones, una vez en medio acuoso, se sumergieron en una disolución de azul de toluidina al 0,1% (p/v) en una solución de NaCl al 1% (p/v), durante 5 min. Seguidamente se lavaron con agua destilada y se procesaron, como se ha descrito anteriormente, para el montaje.

#### **2.4.2.4. TINCIÓN CON AZUL ALCIÁN**

Para la tinción selectiva de células caliciformes se empleó el colorante azul alción que, a pH 2,5, tiñe los mucopolisacáridos ácidos (sulfatados y carboxilados) presentes en estas células. El protocolo de tinción fue el siguiente: tras llevar las secciones a medio acuoso, se sumergieron durante 30 min en la solución colorante [azul alción al 1% (p/v) en ácido acético glacial al 3% (v/v)] ajustada a un pH de 2,5. A continuación, se lavaron con agua destilada y se contrastaron tiñendo los núcleos celulares con rojo nuclear al 1% (p/v) durante 1 min. Antes de proceder a la deshidratación y montaje, las secciones se lavaron con agua destilada.

#### **2.4.3. RECUESTO CELULAR**

En el presente trabajo se analizaron las poblaciones de eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y células caliciformes en la mucosa del intestino delgado de ratas parasitadas por *S. muris* durante las primeras semanas de infección. Los recuentos se expresaron en número de células por unidad vellosidad-cripta (UVC), que es la distancia entre las bases de dos criptas consecutivas, incluyendo la vellosidad que se extiende entre ellas. Para cada

tipo celular se analizaron un total de 30 UVC bien orientadas seleccionadas al azar a partir de 5 secciones intestinales diferentes para cada animal.

Asimismo, se recontaron las poblaciones de mastocitos y células caliciformes en el intestino de diferentes cepas de ratón infectadas con *E. caproni*. En este caso el recuento se expresó como número de células por campo (400x), analizándose igualmente un total de 30 campos seleccionados al azar a partir de 5 secciones distintas.

#### **2.4.4. MEDIDA DE LA LONGITUD DE LAS CRIPTAS Y VELLOSIDADES INTESTINALES**

Otro aspecto analizado fueron los cambios en la estructura del tejido intestinal inducidos por la infección con *E. caproni* en el intestino de ratas y de diferentes cepas de ratón. Para ello se midió la longitud de las criptas y vellosidades intestinales antes y después de la infección, lo cual fue llevado a cabo con ayuda del software de procesamiento de imagen digital *ImageJ* [NIH (National Institutes of Health)].

En primer lugar, se tomaron imágenes de las secciones intestinales teñidas con hematoxilina-eosina con un microscopio óptico Nikon *ECLIPSE 50i* (100x) acoplado a una cámara digital. Con ayuda del software antes indicado, para cada animal se midió la longitud de un total de 30 criptas y vellosidades intestinales bien orientadas, seleccionadas al azar a partir de 5 secciones diferentes. Se determinó también el ratio vellosidad/cripta, que no es más que el cociente entre ambas medidas, el cual fue calculado individualmente para cada UVC.

### **2.5. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN Y GLICOSILACIÓN DE MUCINAS**

---

Con la finalidad de estudiar las alteraciones inducidas por la infección con *E. caproni* sobre las propiedades de la mucosidad intestinal y su influencia sobre el curso de la infección en hospedadores de alta y baja compatibilidad, además de los cambios en la

expresión génica de mucinas (véase Apartado 2.2.), se llevaron a cabo diferentes técnicas inmunohistoquímicas para analizar los cambios en la producción y secreción de moco intestinal en el lugar de infección, así como las alteraciones cualitativas inducidas por la infección sobre el estatus de glicosilación de las mucinas. Asimismo, se analizaron los cambios en la glicosilación a nivel del íleon de ratas infectadas con *S. muris*.

### 2.5.1. HISTOQUÍMICA CON LECTINAS

Los cambios en la glicosilación del moco intestinal se determinaron empleando secciones de intestino procedentes de animales control e infectados, obtenidas tal y como se ha descrito anteriormente (véase Apartado 2.4.1.). En primer lugar, las muestras se desparafinaron incubándolas durante 30 min en estufa a 55 °C, se pasaron por una cadena de hidratación, siguiendo los pasos anteriormente descritos, y se incubaron durante 1 min en una solución de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) al 1% (p/v) para eliminar la autofluorescencia del tejido. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con una solución de BSA al 5% (p/v) en PBS, conteniendo *Triton™ X-100* al 0,2% (v/v) (PBS-TX), durante 1 h. El *Triton™ X-100* es un detergente que permite permeabilizar las membranas celulares, facilitando la penetración de los reactivos al interior de células y vesículas. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS entre ellas.

Tras el bloqueo, las secciones se incubaron con la disolución de lectina, a la concentración correspondiente en PBS-TX, durante 1 h y 30 min. Se utilizó una batería de lectinas con diferente especificidad de ligando: DBA (aglutinina de *Dolichos biflorus*), PNA (aglutinina de *Arachis hypogaea*), SNA (aglutinina de *Sambucus nigra*), UEA-I (aglutinina de *Ulex europeaus*) y WGA (aglutinina de *Triticum vulgare*), marcadas con biotina (Sigma-Aldrich®). La fuente y el residuo disacárido por el que presentan una mayor afinidad se especifican en la Tabla 2.2. A continuación, los cortes se incubaron durante 90 min con avidina-peroxidasa (Sigma-Aldrich®) diluida 1/1.000 en PBS-TX y se lavaron, tal como se ha descrito, antes de incubarlos con el anticuerpo fluorescente. Se empleó un anticuerpo anti-peroxidasa conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoRe-



**Tabla 2.2.- Lectinas utilizadas en histoquímica**

Lectina	Fuente	Residuo
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal $\beta$ 1-3NAcGal
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	NeuNAc $\alpha$ 2-6Gal
UEA-I	<i>Ulex europeaus</i>	Fuca $\alpha$ 1-2Gal $\beta$
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc

**Tabla 2.2.-** Lectinas empleadas en histoquímica sobre cortes histológicos de íleon para el estudio de la glicosilación de mucinas. Fuente y residuo disacárido por el que presentan una mayor afinidad.

search), generado en cabra, que tiene máximos de excitación y emisión a 494 nm y 520 nm, respectivamente. La incubación fue de 1 h en oscuridad, empleando una dilución 1/200 en PBS. Finalmente, las secciones se incubaron durante 1 min con DAPI (4',6-diamidino-fenilindol), diluido 1/1.000 en PBS, y se realizó un último lavado de 10 min antes de montarlas con *Fluoromount™* (Sigma-Aldrich®), un medio de montaje en acuoso para microscopía de fluorescencia. El DAPI es un marcador fluorescente, con máximos de excitación/emisión a 358/461 nm, utilizado para el marcaje de los núcleos celulares por su capacidad de unirse a regiones de DNA ricas en adenina y timina.

Con la finalidad de detectar posible autofluorescencia o unión inespecífica de la avidina-peroxidasa y/o el anticuerpo fluorescente a componentes tisulares, se llevaron a cabo controles negativos, los cuales se procesaron tal y como se ha descrito para las muestras, exceptuando el paso de incubación con lectina. Estos controles sirvieron además para ajustar los parámetros del láser para el análisis de las imágenes en el microscopio confocal.

Con esta técnica se analizaron los cambios en la glicosilación de mucinas inducidos por la infección con *E. caproni* en hospedadores de alta y baja compatibilidad (ratones y ratas, respectivamente), así como las alteraciones inducidas por la infección con

*S. muris* en la mucosa del intestino delgado de rata. Las diluciones óptimas para cada lectina y hospedador se determinaron mediante pruebas previas, seleccionándose la concentración más baja que ofrecía el mismo patrón e intensidad de marcaje, y se pueden consultar en los apartados correspondientes del Capítulo III.

### **2.5.2. MICROSCOPIA CONFOCAL Y EVALUACIÓN DEL MARCAJE**

El marcaje con lectinas se analizó con un microscopio confocal Olympus IX81 (400x en inmersión) acoplado a una cámara digital para la toma de imágenes. La utilización de microscopía confocal permite obtener información del marcaje en diferentes planos focales, lo que posibilita el análisis del marcaje en toda la profundidad del corte y, al mismo tiempo, la obtención de imágenes de mayor calidad.

Para evaluar los cambios inducidos por la infección en la glicosilación de mucinas se estudiaron un total de 5 secciones intestinales de cada animal, en las que se analizó el marcaje específico de la membrana apical de los enterocitos (mucinas transmembrana), las células caliciformes (células productoras de moco) y el moco extracelular (mucinas solubles formadoras de gel). El marcaje fue cuantificado tal y como describen Rinaldi *et al.* (2011) asignando, para cada una de estas estructuras, un grado de positividad de marcaje de acuerdo con el siguiente criterio: (-) ausente, (+) detectable, (++) positivo y (+++) fuertemente positivo.

### **2.5.3. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE MUCINAS**

Además de analizar los cambios en la expresión de los genes de mucinas por RT-PCR y las alteraciones inducidas por la infección sobre el estatus de glicosilación de estas glicoproteínas mediante histoquímica con lectinas, se analizaron también los cambios en la secreción y producción de mucinas solubles sobre cortes histológicos de intestino de ratones y ratas infectados con *E. caproni*. Para ello, las secciones histológicas se desparafinaron y rehidrataron tal y como se ha descrito anteriormente. Antes de proceder a la tinción inmunohistoquímica, las secciones fueron sometidas a un tratamiento para el desenmascaramiento de antígenos mediante calor siguiendo el protocolo descrito por

Arul *et al.* (2000) con algunas modificaciones. Este proceso es necesario en la mayoría de los tejidos fijados con formalina pues, durante el proceso de fijación, se forman puentes de metileno que forman enlaces cruzados entre las proteínas, los cuales pueden enmascarar los sitios antigénicos. Este tratamiento permite romper los enlaces y exponer los antígenos, que quedan accesibles a los anticuerpos. Para ello, las secciones se incubaron con tampón citrato 10 mM y Tween®-20 al 0,05% (pH 6), hirviendo en el microondas durante 15 min. A continuación, las muestras se atemperaron en agua corriente durante 10 min. Las secciones utilizadas para inmunohistoquímica anti-Muc2 se incubaron a 37 °C durante 30 min en tampón Tris/HCl 10 mM con DTT (1,4-ditiotreitol) 10 mM (pH 8,0) para inducir la rotura de los puentes disulfuro y permitir la unión del anticuerpo a los extremos no glicosilados de esta glicoproteína.

La inmunohistoquímica se realizó simultáneamente con la histoquímica con lectinas para poder colocalizar el marcaje. Tras el tratamiento con NaBH<sub>4</sub> y el bloqueo de las uniones específicas con BSA, las secciones intestinales se incubaron durante 1h y 30 min en una solución de DBA, a una concentración de 50 µg/ml en PBS-TX, seguida de una incubación con avidina-peroxidasa (1/1.000 en PBS-TX), tal y como se ha descrito (véase 2.5.1.). Tras los lavados, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario anti-mucina, durante 12 h aproximadamente, a 4 °C. Esta incubación se llevó a cabo en cámara húmeda y en agitación continua, para evitar la evaporación del líquido y la precipitación del anticuerpo. Se emplearon diferentes anticuerpos anti-mucina, todos ellos generados en conejo. Para la localización de Muc2 se utilizó un anticuerpo policlonal (Santa Cruz Biotechnology®) diluido 1/20 en PBS-TX. La detección de Muc5ac resultó más problemática, por lo que se probaron 2 anticuerpos diferentes (de Santa Cruz Biotechnology® y Bioss Antibodies), ambos policlonales, en un rango de concentraciones que fue de 1/50 a 1/10. Tras la incubación con el anticuerpo anti-mucina correspondiente, los cortes histológicos se lavaron, tal como se ha descrito, y se incubaron en oscuridad durante 1 h y 30 min con una mezcla de los anticuerpos secundarios fluorescentes, ambos de Jackson ImmunoResearch, diluidos en PBS-TX. Se empleó un anticuerpo anti-peroxidasa, generado en cabra y acoplado a FITC (dilución 1/200), para la detección de la

lectina; y un anticuerpo anti-IgG de conejo, también generado en cabra, pero acoplado al fluoróforo *Alexa Fluor*<sup>®</sup> 647 (máximos de excitación/emisión: 650 nm y 665 nm, respectivamente), para la localización de las mucinas (dilución 1/50). Finalmente, las secciones intestinales de ratones y ratas control e infectados con *E. caproni* se contrastaron con DAPI y se procesaron, tal y como se ha descrito en el Apartado 2.5.1., para el montaje con *Fluoromount*<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

## **2.6. MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE CATEPSINAS EN LA FASE ADULTA DE *ECHINOSTOMA CAPRONI***

---

Numerosas enzimas de patógenos son capaces de degradar diferentes componentes del moco extracelular, por ejemplo las glicosidasas, que digieren los glicanos de las mucinas, o las catepsinas, peptidasas capaces de cortar los extremos N- y/o C-terminal de estas proteínas, pudiendo afectar a la estructura macromolecular del moco intestinal (Hasnain *et al.*, 2013). En este contexto, con la finalidad de iniciar un estudio preliminar sobre las catepsinas de *E. caproni*, se realizó una estancia en el Laboratorio de Helmintología del Departamento de Parasitología de la Univerzita Karlova v Praze (Praga, República Checa) bajo la dirección del Dr. Libor Mikeš y el Profesor Petr Horák.

### **2.6.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Los experimentos realizados para la caracterización preliminar de las catepsinas en el estadio adulto de *E. caproni* requirieron la utilización de dos materiales diferentes: (I) antígenos de ES y (II) cortes histológicos de los vermes. La metodología seguida para la obtención de estos materiales se describe a continuación.

#### **2.6.1.1. OBTENCIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN**

Para la obtención de los ESP utilizados en este estudio los adultos de *E. caproni* eran lavados en solución fisiológica e incubados en medio RPMI 1640 (Roswell Park

Memorial Institute 1640 Medium), *GlutaMAX™* (Life Technologies™), conteniendo 100 U de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina. Este es un medio de cultivo acuoso a base de glucosa y sales minerales, enriquecido con aminoácidos y vitaminas, que incorpora glutatión como agente reductor. Los vermes se disponían a una concentración de 20 adultos/ml de medio y se incubaban durante 12 h en estufa a 37 °C con agitación suave. Transcurrido este tiempo se recogía el medio de cultivo, se centrifugaba durante 10 min a 15.000 g (4 °C) para eliminar las partículas de mayor tamaño y se filtraba por un poro de 0,22 µm de diámetro para su esterilización.

#### **a) Liofilización**

La liofilización es un método de desecación en el que se elimina el agua por congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío. Es decir, en condiciones de baja presión, al suministrar calor a la muestra el agua pasa directamente del estado sólido (hielo) a gaseoso (vapor), evitándose el paso por la fase líquida. La liofilización de los extractos proteicos incrementa su estabilidad, reduciendo la degradación química, por lo que se recurrió a este proceso para preservar la integridad de las muestras durante el transporte hasta el centro donde se realizó la estancia, asegurando su conservación en las mejores condiciones posibles.

Los antígenos se congelaron a -80 °C en viales de vidrio y se mantuvieron durante 24 h en un liofilizador *Hetosicc CD 4* (Hetolab Equipment), a una temperatura de -52±3 °C y 30 mBa de presión, hasta la desecación total del producto.

#### **b) Reconstitución de los Antígenos**

Los productos liofilizados fueron rehidratados en agua destilada y filtrados a través de una membrana *Amicon® Ultra-4* (diámetro del poro: 10 kDa) por centrifugación a 7.500 g durante 10 min a 4 °C. Este proceso se repitió una segunda vez, antes de lavar la muestra con 4 ml de un tampón citrato-fosfato [ $C_6H_8O_7$  25 mM y  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  50 mM (CPB)] pH 5,5, diluido al 10% (v/v) en agua destilada. Los lavados se realizaron por centrifugación a 7.500 g durante 12 min a 4 °C. De este modo se pudo concentrar la

muestra y eliminar los aminoácidos del medio de cultivo que pudieran interferir en la cuantificación de la proteína.

Tras ser reconstituidos, los antígenos de ES se cuantificaron con *Quant-IT™ Protein Assay Kit* (Invitrogen™). Este ensayo emplea un fluoróforo que se vuelve fluorescente cuando se une a las proteínas solubles, de manera que la intensidad de fluorescencia del complejo resultante depende directamente de la cantidad de proteína en la muestra. La mezcla de reacción era preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la intensidad de fluorescencia se leía en un espectrofotómetro *Infinite M200* (Tecan), empleando del software *Magellan v7.1* (Tecan), con unas longitudes de onda de excitación y lectura de 470 nm y 570 nm, respectivamente. La interpolación del resultado en una recta patrón, hallada en las mismas condiciones a partir de una serie de diluciones de concentración creciente y conocida de BSA, permitía cuantificar la concentración de proteínas en la muestra problema.

#### **2.6.1.2. OBTENCIÓN DE CORTÉS HISTOLÓGICOS DEL PARÁSITO**

Con la finalidad de localizar la catepsina L en los tejidos del adulto de *E. caproni*, se llevaron a cabo técnicas de inmunohistoquímica sobre secciones histológicas del parásito. Para ello, durante la disección del hospedador, los adultos eran retirados del intestino con la ayuda de un pincel fino y lavados un par de veces en solución fisiológica antes de fijarlos por inmersión en formalina al 4% (v/v). Tras embeberlos en parafina, se cortaron secciones seriadas de 4 µm de espesor que se fijaron sobre portaobjetos *Apex™ Superior Adhesive Slide* (Leica Biosystems).

#### **2.6.2. ENSAYO FLUOROMÉTRICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

La actividad peptidasa en el antígeno de ES de *E. caproni* fue medida empleando un sustrato peptídico sintético acoplado al fluoróforo aminometilcumarina (AMC) (Bachem). Concretamente, se utilizó el sustrato Z-fenilalanina-arginina-AMC (FR; Z: benzoiloxycarbonil, grupo bloqueante del grupo amino libre) que permite testar la actividad catepsina B y L. Los ensayos se llevaron a cabo en placas negras de 96 pocillos

(Nunc). En cada placa las distintas muestras se analizaron por triplicado. A cada pocillo se añadieron 200  $\mu$ l de una disolución 50  $\mu$ M de sustrato en CPB con DTT 2 mM y 5  $\mu$ g de proteína (antígeno de ES). La liberación del fluoróforo fue monitorizada durante 60 min a 30 °C en un espectrofotómetro *Infinite M200* (Tecan), utilizando el software *Magellan v7.1* (Tecan), a las longitudes de onda de excitación y lectura: 355 nm y 460 nm, respectivamente. La especificidad de la actividad peptidasa fue determinada mediante el uso de diferentes inhibidores, añadidos al tampón de incubación a una concentración final de 10  $\mu$ M. Se emplearon los inhibidores: CA-074 [N-(L-3-trans-propilcarbamoiloxirano-2-carbonil)], inhibidor irreversible selectivo de catepsinas B (Towatari *et al.*, 1991); y iCL (arginina-lisina-leucina-leucina-triptófano-NH<sub>2</sub>), inhibidor selectivo de catepsinas L.

Se examinó la actividad frente a FR en un rango de pH entre 4,0 y 6,0. Para esta determinación se emplearon muestras de antígeno de ES obtenidas de adultos de *E. caproni* aislados de ratones infectados a las 2 spi. A partir de este experimento se determinó el pH óptimo de actividad enzimática, la cual fue medida en los ESP de adultos obtenidos a partir de diferentes hospedadores en distintas semanas postinfección.

### 2.6.3. BLOTTING CON DCG-04

DCG-04 es un análogo biotinilado del inhibidor irreversible de cisteín-peptidasas E-64 [N-trans-(epox-isuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida], que se une covalentemente al centro activo de estas enzimas (Greenbaum *et al.*, 2000). Un total de 15  $\mu$ g de antígeno de ES de *E. caproni* se incubaron durante 20 min con DCG-04 5  $\mu$ M en CPB (pH 5,5) con DTT 1 mM. Para comprobar la especificidad de la unión, se preparó un control negativo que se preincubó durante 10 min con el inhibidor de cisteín-peptidasas E-64, a una concentración 50  $\mu$ M en el mismo tampón, antes de añadir DCG-04. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

A continuación, la mezcla proteica fue separada por electroforesis monodimensional en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Para ello la muestra y el control negativo se mezclaron con la cantidad adecuada de tampón de carga, o tampón de Laemmli concentrado [concentración de trabajo: 2-mercaptoetanol al

0,1% (v/v), glicerol al 10% (v/v), SDS al 2% (p/v) en Tris [tris(hidroximetil)aminometano] /HCl 63 mM (pH 6,8) con trazas de azul de bromofenol], y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Esta incubación permite la desnaturalización de las proteínas sin recurrir al calentamiento de la muestra, lo que podría afectar a la unión del inhibidor al enzima. Seguidamente, las muestras y el marcador de peso molecular (PM) (*Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards*, Bio-Rad) se cargaron en geles SDS-PAGE al 10% prefabricados (*Mini-PROTEAN® TGX™*, Bio-Rad) y se llevó a cabo la separación de las proteínas en tampón de corrido Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v) en un equipo de electroforesis vertical modelo *Mini-PROTEAN® 3 Cell* (Bio-Rad), aplicando un potencial eléctrico de 80 V durante 10 min seguido de 45 min a 180 V. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) (*Immuno Blot® PVDF Membrane*, Bio-Rad), previamente activada por incubación en metanol, mediante el sistema de electrotransferencia en semiseco *Trans-Blot® Turbo™ Transfer Starter System* (Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo en un tampón con Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1% (p/v) y metanol al 20% (v/v) durante 12 min a una intensidad de corriente de 1,3 A.

La membrana se lavó 3 veces, 5 min cada una, en tampón Tris salino [Tris 0,05 M y NaCl 0,15 M, ajustado a pH 7,5 con HCl (TBS)] con Tween®-20 al 0,05% (v/v) (TBS-T) y se bloqueó durante 1 h con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y BSA al 2% (p/v) en TBS-T. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y en agitación. Tras un lavado de 5 min con TBS-T para eliminar el exceso de solución de bloqueo, la membrana se incubó durante 1 h con estreptavidina conjugada con peroxidasa (Sigma-Aldrich®), a una dilución 1/1.000 en TBS-T. Finalmente, el filtro se lavó 3 veces con TBS-T, tal como se ha descrito, y una última vez con TBS antes de revelarlo por colorimetría con *Opti-4CN Substrate Kit* (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit comercial está basado en la capacidad de la peroxidasa de catalizar la oxidación del 4-cloronaftol en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formando un precipitado visible de color oscuro. La reacción de revelado se llevó a cabo por incubación de la membrana con la solución sustrato durante 30 min y la reacción colorimétrica se paró lavando con agua destilada durante 15 min.



#### 2.6.4. WESTERN BLOT FRENTE A CATEPSINA L

Una vez confirmada y caracterizada la presencia de catepsina L en el antígeno de ES de *E. caproni*, se llevaron a cabo ensayos de *western blot* empleando anticuerpos heterólogos anti-catepsina L. Los antígenos fueron sometidos previamente a una electroforesis monodimensional en gel SDS-PAGE al 10% y transferidos a una membrana de PVDF, tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Tras bloquear los sitios de unión inespecíficos con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y BSA al 2% (p/v) durante 2 h, la membrana se lavó durante 5 min en TBS-T y se incubó con el anticuerpo primario, diluido 1/100 en TBS-T, durante 1 h. Se emplearon tres anticuerpos distintos generados frente a catepsina L de diferentes especies de trematodos: (I) anti-catepsina L de *Diplostomum pseudospathaceum* (Monogenea), producido en ratón por el grupo del Dr. Libor Mikeš [Univerzita Karlova v Praze (Praga)]; anti-catepsina L de *Fascioloides magna* (Digenea), producido en rata por el grupo del Dr. Martin Kašný [Univerzita Karlova v Praze (Praga)]; y (III) anti-catepsina L de *Fasciola hepatica* (Digenea), producido en oveja por el grupo del Profesor John Dalton [Institute for the Biotechnology of Infectious Diseases (Sidney)]. Los controles negativos se llevaron a cabo de la misma manera, incubando con suero de ratón, rata y oveja, respectivamente, inmunizados con PBS. A continuación, se hicieron tres lavados de 5 min con TBS-T y las membranas se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa, a una dilución 1/1.000 en TBS-T. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y en agitación. Se empleó: (I) anti-IgG de ratón, producido en conejo (Sigma-Aldrich®); (II) anti-IgG de rata, producido en cabra (Alpha Diagnostic Intl. Inc.); y (III) anti-IgG de oveja, producido en burro (Sigma-Aldrich®). Finalmente, las membranas se lavaron tal y como se ha descrito y se revelaron con *Opti-4CN Substrate Kit* de Bio-Rad (véase 2.6.3.).

#### 2.6.5. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA LOCALIZACIÓN DE CATEPSINA L

Antes de llevar a cabo la detección inmunohistoquímica, las secciones se incubaron durante 30 min en estufa a 55 °C para extraer la parafina del tejido y se pasaron por una cadena de hidratación que consistió en los siguientes pasos: 2 pasos de 5 min en

xilol; un paso de 5 min en etanol 100°; un paso de 5 min en etanol 96°; un paso de 5 min en etanol 70°; y un último paso de 1 min en agua destilada, en agitación.

Una vez en medio acuoso, las secciones se bloquearon con BSA al 5% (p/v) en TBS-T durante 1 h y 30 min, y se lavaron durante 5 min en TBS antes de añadir el anticuerpo primario. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y en agitación. Se utilizó el mismo anticuerpo anti-catepsina L de *F. hepatica* empleado en los ensayos de *western blot*, a una dilución 1/50 en TBS, incubando las secciones durante 1 h y 30 min. Los controles negativos se llevaron a cabo con suero de oveja inmunizada con PBS. A continuación, los cortes histológicos se lavaron 3 veces, durante 5 min cada una, con TBS y se incubaron durante 1 h en oscuridad con un anticuerpo secundario anti-IgG de oveja, producido en burro y acoplado a FITC, a una dilución 1/200 en TBS. Finalmente, las secciones se lavaron con TBS, tal y como se ha descrito, y se montaron de forma extemporánea con glicerina 1:1 (v/v) en agua destilada.

Las secciones se analizaron con un microscopio de fluorescencia Olympus *BX51* acoplado a una cámara digital para la captura de imágenes. Los controles negativos se utilizaron para identificar posible autofluorescencia o marcaje inespecífico de ciertas estructuras del parásito, así como para fijar los parámetros de ganancia y tiempo de exposición para la toma de imágenes. Estos parámetros se ajustaron a unos valores en que la imagen adquirida para el control negativo era totalmente negra, de tal manera que se consigue eliminar el ruido de fondo e identificar el marcaje específico en las secciones incubadas con el anticuerpo de interés.

## **2.7. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DEL RACAMBIO DEL EPITELIO INTESTINAL**

---

Con la finalidad de evaluar los cambios inducidos por la infección sobre el recambio normal del epitelio intestinal y su trascendencia en el desarrollo de infecciones

agudas y crónicas, se llevaron a cabo experimentos de pulso y caza con BrdU que permitieron analizar la tasa de renovación epitelial en hospedadores de alta y baja compatibilidad infectados con *E. caproni*.

### **2.7.1. MARCAJE CON 5-BROMO-2-DESOXIURIDINA (BrdU)**

La BrdU es un nucleósido sintético, análogo halogenado de la timidina, que puede ser incorporado al DNA de las células en división durante la replicación del material genético, en la fase S del ciclo celular, por lo que es comúnmente utilizada en estudios de proliferación celular (Gratzner *et al.*, 1975, 1982; Cavanagh *et al.*, 2011). En nuestro caso, se recurrió al marcaje con BrdU con el objetivo de estudiar el proceso de renovación del epitelio intestinal en cada hospedador en respuesta a la infección.

#### **2.7.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN DE BrdU**

Los experimentos de pulso y caza son ampliamente utilizados en biología celular y molecular para estudiar la cinética de los procesos biológicos, ya que permiten trazar la localización de moléculas marcadas a lo largo del tiempo. En este caso, el pulso consistió en la administración intraperitoneal de BrdU a animales control e infectados con *E. caproni*, en diferentes semanas postinfección. A partir de este momento, las células intestinales proliferativas que entren en la fase S del ciclo celular incorporarán la BrdU en el DNA sintetizado durante el proceso de replicación del material genético. De esta manera, las células recién formadas quedan marcadas con el nucleósido sintético, pudiéndose localizar su posición en el tejido, determinar su avance en el eje criptavillosidad en función del tiempo y establecer la tasa de renovación del epitelio intestinal.

Para la realización de los experimentos de pulso y caza se emplearon ratones ICR y ratas Wistar a los que se les administró un solución de BrdU (Sigma-Aldrich®) en suero fisiológico por vía intraperitoneal, utilizando una aguja de calibre 25 G. La dosis utilizada fue ajustada para cada especie hospedadora, empleándose 10 mg de BrdU, en un volumen final de 150 µl en ratones y 20 mg de BrdU, en un volumen final de 600 µl, en ratas. Las administraciones se llevaron a cabo 1 h y 24 h antes del sacrificio de los animales. Para el

período de 1 h, las administraciones fueron realizadas a las 10.00 h y para del período de 24 h, a las 11.00 h. Todos los animales fueron sacrificados a las 11.00 h. Es importante señalar que la sincronización es fundamental para minimizar las diferencias en el recambio que puedan ser debidas a los ritmos circadianos.

#### **2.7.1.2. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE CÉLULAS MARCADAS CON BrdU**

La detección de las células marcadas con BrdU se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica, sobre secciones intestinales obtenidas tal y como se ha descrito en el Apartado 2.4.1.

El procesado de las muestras se inició durante una estancia en el laboratorio del Manchester Immunology Group (The University of Manchester, Inglaterra) bajo la supervisión del Profesor Richard K. Grencis. No obstante, el protocolo seguido por este grupo de investigación, basado en la utilización de un anticuerpo anti-BrdU acoplado a peroxidasa y revelado con 3,3'-diaminobencidina (Cliffe *et al.*, 2005), no resultó apropiado para el procesamiento de nuestras muestras. Surgieron problemas de ruido de fondo y baja sensibilidad de marcaje específico que dificultaban la discriminación entre las células positivas y negativas. Por este motivo fue necesaria la optimización del protocolo recurriendo, entre otras cosas, a la utilización de anticuerpos fluorescentes que permitieran incrementar la sensibilidad de marcaje.

La optimización del protocolo de inmunohistoquímica para la detección de células marcadas con BrdU (BrdU<sup>+</sup>) se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones de Wojtowicz & Kee (2006). Las secciones, desparafinadas por calor, se incubaron durante 1 h en xilol, el cual se lavaba a continuación por inmersión en etanol absoluto durante 5 min. Seguidamente se llevaba a cabo la hidrólisis ácida del DNA, por incubación en una solución de HCl 1,5 M durante 30 min a 60 °C, lo que permite que la BrdU quede expuesta para su posterior detección con el anticuerpo. Las muestras se devolvieron a pH neutro mediante tres lavados de 10 min en PBS. Antes de proceder al marcaje de las células BrdU<sup>+</sup>, las secciones se trataron con NaBH<sub>4</sub> al 1% (p/v) para eliminar la autofluorescencia del tejido,

realizando 3 incubaciones de 10 min. Tras lavar los restos de  $\text{NaBH}_4$  con PBS, las secciones se bloquearon con suero de burro al 5% (v/v) en PBS-TX durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron durante 5 min en PBS antes de incubarlas con el anticuerpo anti-BrdU.

Con la finalidad de aumentar la sensibilidad de detección se empleó un anticuerpo monoclonal anti-BrdU generado en ratón (clon MoBU-1) y marcado con *Alexa Fluor*<sup>®</sup> 555 (Life Technologies<sup>™</sup>), utilizado a una dilución 1/100 en PBS con *Triton*<sup>™</sup> X-100 al 0,3% (v/v). El fluoróforo *Alexa Fluor*<sup>®</sup> 555 presenta unas longitudes de onda de excitación y emisión de 555 nm y 580 nm, respectivamente. Las secciones intestinales se mantuvieron en contacto con el anticuerpo durante 16 h a 4 °C, en oscuridad. Esta incubación se llevó a cabo en cámara húmeda para evitar la evaporación del reactivo, y en continua agitación para minimizar la precipitación del anticuerpo sobre el tejido. Finalmente, las secciones se lavaron 3 veces en PBS durante 10 min y se incubaron durante 1 min con DAPI, diluido 1/1.000 en PBS. Se realizó un último lavado de 10 min antes de montarlos con el medio de montaje en medio acuoso *Fluoromount*<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), para microscopía de fluorescencia.

Mediante este protocolo se consiguió un marcaje claro y sensible que permitió llevar a cabo el estudio de la renovación del epitelio intestinal en el intestino de ratones y ratas infectados con *E. caproni*.

### 2.7.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y RECUENTO CELULAR

Para el recuento de las células BrdU<sup>+</sup> se empleó un microscopio de fluorescencia *Leica DMR* (Leica Biosystems) acoplado a una cámara digital. Para cada animal se seleccionaron un total de 50 mitades de UVC bien orientadas (10 en 5 secciones diferentes) y, utilizando el objetivo de 40x con aceite de inmersión, se tomaron imágenes para la señal del DAPI y el anticuerpo anti-BrdU marcado con *Alexa Fluor*<sup>®</sup> 555. Con el software de procesamiento de imagen digital *ImageJ* (NIH), estas imágenes se superpusieron y sobre ellas se contó la posición ocupada por las células BrdU<sup>+</sup> en cada media UVC, empezando desde la base de la cripta en dirección al extremo de la vellosoidad.

De esta manera se pudieron calcular los diferentes parámetros analizados en este estudio: (I) número de células marcadas por cripta; (II) distribución de las células marcadas en el tejido; (III) número de posiciones recorridas por las células BrdU<sup>+</sup>, mediante un análisis basado en posición; y (IV) cálculo de la velocidad de recambio epitelial.

## **2.8. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS**

---

Con la finalidad de identificar las proteínas directamente implicadas en el establecimiento de infecciones crónicas o, que por el contrario, contribuyen a la expulsión de los helmintos intestinales, se analizaron los cambios inducidos por la infección en la expresión de proteínas a nivel del íleon de hospedadores de alta y baja compatibilidad. Estas alteraciones se estudiaron empleando la técnica 2D-DIGE (electroforesis diferencial en geles bidimensionales).

### **2.8.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

El estudio de la expresión diferencial de proteínas en el íleon de ratones y ratas infectados con *E. caproni* se llevó a cabo sobre una solución compleja de proteínas, obtenida a partir de la lisis de las células epiteliales intestinales previamente aisladas.

#### **2.8.1.1. AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES**

Para la obtención de las células epiteliales intestinales, los animales control e infectados con *E. caproni* fueron diseccionados y se les extrajo la porción del intestino delgado correspondiente al íleon, a partir de la cual se aislaron las células epiteliales siguiendo el método descrito por Hansson *et al.* (2011), con algunas modificaciones.

Los segmentos de intestino se abrieron longitudinalmente en una placa Petri seca y, en el caso de los animales infectados, los adultos de *E. caproni* anclados a la mucosa intestinal fueron retirados cuidadosamente con ayuda de unas pinzas de disección. A

continuación, los intestinos eran transferidos a un tubo plástico de 50 ml y lavados varias veces en una solución tampón, mantenida en hielo, compuesta de HBSS (solución salina equilibrada de Hank) (Life Technologies™) enriquecida con suero de ternera fetal (FCS) inactivado por calor al 2% (v/v) (tampón de lavado). El HBSS es un medio de cultivo acuoso formulado a base de glucosa y diferentes sales inorgánicas (CaCl<sub>2</sub> anhidro, 140,0 mg/l; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 100,0 mg/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 100,0 mg/l; KCl, 400,0 mg/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 60,0 mg/l; NaHCO<sub>3</sub>, 350,0 mg/l; NaCl, 8.000,0 mg/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro, 48,0 mg/l; y D-Glucosa, 1.000,0 mg/l) que permite mantener el pH y el equilibrio osmótico de tejidos y suspensiones celulares. Se llevaron a cabo varios lavados, de 3 min cada uno, con 45 ml de la disolución tampón y agitación manual vigorosa. Los lavados se repitieron al menos 4 veces, hasta que el sobrenadante quedó claro.

Tras los lavados, el intestino era cortado en pequeños segmentos de 1 cm de longitud, los cuales se recogían en un nuevo tubo y se incubaban con 20 ml de un tampón de disociación (HBSS con FCS al 10% (v/v), EDTA 1mM, DTT 1mM y antibióticos: 100 U de penicilina y 10 µg/ml de estreptomicina) durante 20 min en estufa a 37 °C, en continua agitación. A continuación, el sobrenadante se transfería a un nuevo tubo, mantenido en hielo, y se repetía el proceso con otros 20 ml de tampón de disociación. Posteriormente, se descartaba el tejido y se hacía pasar todo el sobrenadante por un filtro celular con una luz de malla de 100 µm, para retener las partículas más gruesas y obtener una suspensión de células que se centrifugó a 200 g durante 10 min (4 °C). Finalmente, el sobrenadante se retiró cuidadosamente con ayuda de una pipeta Pasteur y el *pellet* de células se resuspendió en 2 ml de PBS frío.

#### **2.8.1.2. EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA**

La lisis celular y la extracción de proteínas se llevó a cabo con *M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este reactivo de lisis celular está formulado a base de un detergente no desnaturizante que disuelve las membranas celulares, permitiendo la extracción de las proteínas solubles. Para ello, la suspensión de células epiteliales intestinales fue transferida a un tubo de

centrífuga de 15 ml y lavada dos veces por centrifugación a 250 g durante 5 min a 4 °C en 2 ml de PBS frío. A continuación, se retiró cuidadosamente el PBS con ayuda de una pipeta Pasteur y se añadió el reactivo de lisis, en una proporción 20:1 (v/v) respecto al volumen del *pellet* de células, e inhibidor de proteasas [*Halt™ Protease Inhibitor Cocktail* (Thermo Scientific)] a la concentración adecuada. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min en agitación y posteriormente se clarificó el lisado por centrifugación a 18.000 g durante 15 min a 4 °C. Finalmente el sobrenadante fue recogido en tubos de microcentrífuga de 2 ml y almacenado a -80 °C hasta su utilización.

## **2.8.2. CUANTIFICACIÓN Y MARCAJE DE PROTEÍNAS**

La expresión diferencial de proteínas se analizó mediante 2D-DIGE empleando varias réplicas biológicas. Cada una de estas réplicas fue preparada a partir de la misma cantidad de extracto proteico obtenido de tres animales (infectados o control) diferentes. Para cada muestra individual se cuantificó la cantidad de proteínas solubles y se mezclaron los volúmenes correspondientes a una cantidad de 20 µg. Finalmente, la mezcla fue homogenizada y cuantificada de nuevo antes de proceder al marcaje de las proteínas.

### **2.8.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

La cuantificación de la concentración de proteínas, en las muestras individuales y en las mezclas, se llevó a cabo empleando *RC-DC Protein Assay* (Bio-Rad), basado en el método de Lowry para la cuantificación de proteínas (Lowry *et al.*, 1951). Este es un método colorimétrico que utiliza dos reacciones consecutivas. La primera de ellas implica la reacción de las proteínas con iones  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino, formándose un complejo de coordinación entre el cobre, que queda reducido a  $\text{Cu}^+$ , y el nitrógeno peptídico. La siguiente reacción consiste en la oxidación de los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano, catalizada por el  $\text{Cu}^+$ , y la subsiguiente reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles (ácido fosfomolibdotúngstico) a un complejo de color azul oscuro medible por espectrofotometría.



La mezcla de reacción se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y la concentración de proteínas en la muestra se calculó midiendo la absorbancia a 750 nm e interpolando el resultado en una recta patrón obtenida en idénticas condiciones.

#### **2.8.2.2. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON 2-D CLEAN-UP KIT**

Antes de proceder a la reacción de marcaje, 50 µg de cada réplica biológica se precipitaron utilizando *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare). Este kit permite, además, eliminar de la muestra sustancias contaminantes como detergentes, sales, lípidos, compuestos fenólicos y ácidos nucleicos que pueden interferir en la electroforesis posterior.

La precipitación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en un tubo de microcentrífuga se añade el volumen de muestra correspondiente a 50 µg de proteína y 300 µl del agente precipitante proporcionado en el kit. La mezcla se homogeniza y se incuba en hielo (4-5 °C) durante 15 min. A continuación, se añaden otros 300 µl de coprecipitante, se homogeniza bien y se centrifuga a 16.000 g durante 5 min. Tras la centrifugación es importante retirar rápidamente el sobrenadante para evitar la resuspensión parcial de las proteínas en el líquido de precipitación. El precipitado se lava con 40 µl de coprecipitante, dejándolo reposar en hielo durante 5 min y centrifugando de nuevo. El precipitado resultante se dispersa en 25 µl de agua desionizada, a los que se añaden 1 ml de tampón de lavado atemperado y 5 µl de aditivo de lavado. Los tubos se incuban a -20 °C durante 30 min, agitándolos por *vortex* cada 10 min. Finalmente, se centrifugan durante 5 min a 16.000 g, descartando el sobrenadante y dejando secar el *pellet* al aire antes de resuspenderlo en el tampón adecuado.

#### **2.8.2.3. MARCAJE DE PROTEÍNAS**

Para el marcaje de las proteínas se empleó *Amersham™ CyDye DIGE Fluor, minimal dye, labeling kit* (GE Healthcare). Los fluoróforos *CyDye™ DIGE* presentan un grupo éster N-hidroxisuccinamida y están diseñados para unirse covalentemente al grupo amino ε de los residuos de lisina (Lys) de las proteínas mediante la formación de un enlace

tipo amida. La cantidad de fluoróforo añadida a la reacción de marcaje es el paso limitante de la reacción, asegurando que el marca fluorescente es incorporada aproximadamente al 1-2% de Lys disponibles y, por tanto, a un solo residuo de Lys por molécula de proteína. Estos fluorocromos tienen un PM de 500 Da y una carga +1, que sustituye a la carga +1 de la Lys cuando se forma el enlace amida, minimizando de esta manera los cambios en el PM y punto isoeléctrico (pI) de las proteínas.

Los fluoróforos *CyDye™* fueron reconstituidos con dimetilformamida antes de proceder a la reacción de marcaje, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cincuenta microgramos de cada réplica biológica se ajustaron a un volumen final de 18 µl con tampón de marcaje (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v) y Tris 25 mM, pH 8,5) y se añadió 1 µl (400 pmol) de fluoróforo, Cy3 o Cy5. Las muestras se incubaron en hielo durante 30 min en oscuridad y, a continuación, se añadió 1 µl de una disolución de Lys 10 mM para parar la reacción. Los estándares internos se prepararon mezclando la misma cantidad de proteína de todas las muestras incluidas en el experimento y se marcaron, como se ha descrito, utilizando el fluoróforo Cy2.

### **2.8.3. ELECTROFORESIS DIFERENCIAL EN GELES BIDIMENSIONALES (2D-DIGE)**

Los extractos proteicos procedentes de animales control e infectados fueron comparados mediante ensayos 2D-DIGE con la finalidad de identificar, en cada especie hospedadora, aquellas proteínas cuya expresión se vio significativamente alterada como consecuencia de la presencia del parásito. Los experimentos 2D-DIGE fueron llevados a cabo en la Unitat de Proteòmica del SCSIE, bajo la supervisión de la Dra. Laura Cantero-Salazar.

#### **2.8.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

El método 2D-DIGE consiste en el marcaje de proteínas con fluoróforos *CyDye™* y su posterior separación mediante electroforesis bidimensional (2D), y está diseñado para simplificar el proceso de detección e identificación de proteínas mediante la técnica de

electroforesis 2D, permitiendo la separación de hasta tres muestras proteicas diferentes en el mismo gel.

Cada una de las muestras se marca con un fluoróforo diferente. Tras el marcaje, las tres muestras se mezclan y se separan en la misma tira de isoelectroenfoque (IEE) y posterior electroforesis en gel SDS-PAGE. La posibilidad de correr distintas muestras en el mismo gel permite que estén sujetas a exactamente las mismas condiciones de corrido en la primera y segunda dimensión. De este modo, la misma proteína, marcada con *CyDye™* distintos, migrará a la misma posición en el gel 2D, reduciéndose así la variación experimental. Posteriormente, durante el análisis de imagen, cada muestra individual puede visualizarse de forma independiente, seleccionando las longitudes de onda de excitación y emisión de cada fluoróforo *CyDye™*.

Las variaciones experimentales en los estudios basados en electroforesis 2D se deben mayoritariamente a la variabilidad entre geles. Con el método 2D-DIGE se reduce el número de geles necesarios para obtener un mismo número de réplicas, reduciéndose así esta variabilidad. En el presente trabajo, además, para evitar conclusiones erróneas debidas a variaciones individuales, la misma cantidad de proteína de células epiteliales intestinales procedente de tres animales distintos se mezcló para formar una réplica biológica. Se analizaron 4 réplicas biológicas de cada uno de los grupos (ratón control y ratón infectado; y rata control y rata infectada).

En los experimentos 2D-DIGE se utiliza también un estándar interno, que se obtiene mezclando una alícuota de cada una de las muestras incluidas en el experimento. De esta manera, cada proteína de cada muestra está representada en el estándar interno, que está presente en todos los geles, con lo que se consigue aumentar la confianza en el emparejamiento y generar una estadística más apurada entre los *spots* de geles distintos.

En la Tabla 2.3. se resume el diseño experimental seguido, independientemente, para la realización de los experimentos 2D-DIGE en muestras de proteínas intestinales aisladas de ratones y ratas control e infectados con *E. caproni*, a las 2 spi. Para minimizar

las posibles diferencias ocasionadas por el marcaje con el fluoróforo, en cada caso, las muestras control e infectadas se marcaron indistintamente con los fluoróforos Cy3 o Cy5, mientras que el estándar interno se marcó siempre con Cy2.

**Tabla 2.3.-** Diseño de los experimentos 2D-DIGE

**Réplicas biológicas en cada experimento \***

Control	Infectado
C1	I1
C2	I2
C3	I3
C4	I4

**Diseño experimental para cada gel 2D-DIGE**

Gel número	Cy2	Cy3	Cy5
1	EI **	C1	I1
2	EI	C2	I2
3	EI	I3	C3
4	EI	I4	C4

\* Cada réplica biológica se obtuvo mezclando la misma cantidad de proteína procedente de tres animales (control o infectados) diferentes.

\*\* EI: Estándar Interno. Preparado a partir de la misma cantidad de proteína de cada una de las réplicas biológicas incluidas en el experimento.

**Tabla 2.3.-** Diseño experimental de los experimentos 2D-DIGE con extractos de proteínas de células epiteliales intestinales de animales control (C) e infectados con *E. caproni* (I). Identificación de las diferentes réplicas biológicas utilizadas en el estudio y diseño experimental de los geles incluidos en cada experimento 2D-DIGE.

### 2.8.3.2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) PARA 2D-DIGE

La separación electroforética de las mezclas proteicas se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo. El IEE permite la separación de las proteínas en la primera dimensión en función de su pl. Se emplearon tiras con gradiente de pH inmovilizado (IPG) *Immobilized Dry Strips* (GE Healthcare) de 24 cm de longitud y un rango de pH no lineal de 3 a 11. La rehidratación de las tiras se llevó a cabo durante toda la noche con tampón de urea 8M, CHAPS al 4% (p/v), anfolitos al 1% (v/v) y *DeStreak™*, 12 µl/ml, como agente reductor (todos los productos de GE Healthcare). Las muestras se cargaron directamente en el extremo anódico de la tira (+) antes del IEE, previa adición de DTT y anfolitos a una concentración final de 65 mM y 1% (v/v), respectivamente. El IEE se llevó a cabo en el sistema *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare), a 20 °C, de acuerdo con el siguiente protocolo: (I) 300 V durante 4 h; (II) gradiente lineal hasta 1.000 V durante 6 h; (III) gradiente lineal hasta 8.000 V 3 h; y (IV) 8.000 V hasta 32.000 Vh.

Tras el IEE, y antes de la resolución de las proteínas en la segunda dimensión, se llevó a cabo el equilibrado de las tiras en dos pasos de 15 min en tampón Tris 50 mM, urea 6 M, glicerol 30% (v/v) y SDS 2% (p/v), conteniendo DTT al 2% (p/v) para el primer paso de reducción y yodoacetamida al 2,5% (p/v) para la alquilación de Cys.

Finalmente, las proteínas se separaron en función de su PM en geles SDS-PAGE al 12,5% (25 cm x 21 cm x 1 mm), empleando el mismo tampón descrito anteriormente (véase Apartado 2.6.3.). La electroforesis se llevó a cabo en el sistema *Ettan DALTsix* (GE Healthcare), fijando una potencia de 2 W/gel durante 1 h y, posteriormente, de 15 W/gel durante 5 h.

### 2.8.4. ANÁLISIS DE IMAGEN

Tras la electroforesis, los geles se escanearon en el sistema *Typhoon™ 9400 Variable Mode Imager* (GE Healthcare), con una resolución de 50 µm, seleccionando las longitudes de onda de excitación/emisión adecuadas para cada fluoróforo: Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm) y Cy5 (633/670 nm). La información innecesaria para el análisis

diferencial, como el contorno de los geles, el carril de carga, etc. fue eliminada con el software para análisis cuantitativo de imágenes *ImageQuant Tools* (GE Healthcare). Finalmente, las imágenes fueron analizadas usando el módulo *Difference In-Gel Analysis* (DIA) del software *DeCyder™ 2D Differential Analysis v7.0* (GE Healthcare), específicamente diseñado para el procesamiento de los resultados derivados de experimentos 2D-DIGE. El módulo DIA de este software es capaz de reconocer hasta tres imágenes en un gel (un estándar interno y dos muestras) y crear una única superposición sobre la que identificar y cuantificar cada *spot*. Para ello utiliza una serie de algoritmos que permiten codetectar los fluoróforos *CyDye™* y crear un primer nivel de emparejamiento de los *spots* del mismo gel; eliminar el ruido de fondo; cuantificar cada *spot* y normalizar los resultados frente al estándar interno.

El análisis estadístico de la expresión diferencial de proteínas fue llevado a cabo utilizando los módulos *Biological Variation Analysis* (BVA) y *Extended Data Analysis* (EDA) del mismo software, empleando un filtro que solo considerase las proteínas con un 100% de presencia. Es decir, que estuvieran presentes en todos los geles incluidos en el experimento. A partir de los datos generados en el análisis DIA, el módulo BVA lleva a cabo la integración de los diferentes geles incluidos en el experimento para crear una imagen de referencia que, a pesar de la precisión del software, debe ser validada manualmente. Además, este módulo permite aplicar diferentes test de comparación entre los grupos para la valoración estadística de los datos correspondientes a cada *spot*. El análisis estadístico de los resultados se describe más adelante en este capítulo, en el Apartado 2.11.4.

## **2.8.5. TINCIÓN DE LOS GELES CON PLATA**

Una vez analizadas las diferencias de expresión entre los animales control e infectados, los geles de referencia de cada experimento 2D-DIGE se tiñeron con plata para poder visualizar los *spots* de proteína. La tinción con plata es un método habitual para la visualización de proteínas en geles de poliacrilamida, ya que es un método colorimétrico que permite ver los *spots* en el espectro visible, sin necesidad de emplear fuentes de

iluminación alternativas. Asimismo, tiene una gran sensibilidad, del orden de 10 ng, y es compatible con el análisis posterior de los *spots* de proteínas mediante espectrometría de masas. Técnicamente, la tinción con plata consiste en la interacción y unión de los iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ), procedentes del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) empleado como reactivo de tinción, con algunos grupos funcionales de las proteínas. Las interacciones más fuertes ocurren con grupos de tipo ácido carboxílico, en las cadenas laterales del ácido aspártico y ácido glutámico; el grupo imidazol en histidina; sulfhidrilo en Cys y amina en Lys. A continuación, los iones  $\text{Ag}^+$  se reducen a plata metálica, dando lugar a una coloración marrón-negra sobre los *spots* de proteínas. Los kits comerciales incluyen reactivos sensibilizadores y potenciadores que aumentan la especificidad y eficiencia de la unión de los iones  $\text{Ag}^+$ , así como su conversión a plata metálica durante el revelado.

Para la tinción de los geles se empleó el kit comercial *PlusOne Silver Staining Kit, Protein* (GE Healthcare), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, antes de la tinción los geles 2D se fijaron, en dos pasos de 1 h cada uno, con una solución de etanol y ácido acético glacial al 30% (v/v) y al 10% (v/v), respectivamente. Todos los pasos se realizaron en agitación. A continuación, los geles se sometieron a un proceso de sensibilización, incubándolos durante 2 h en una solución que contenía etanol al 30% (v/v), tiosulfato de sodio al 0,2% (p/v) y acetato de sodio al 6,8% (p/v). Seguidamente se lavaron en agua destilada (5 lavados de 8 min cada uno), antes de proceder a la tinción con el reactivo de plata. Para ello, los geles se incubaron durante 1 h en una solución de  $\text{AgNO}_3$  al 0,25% (p/v) y se lavaron 4 veces durante un minuto en agua destilada antes de seguir con el revelado. La reacción de revelado se llevó a cabo con una solución de carbonato sódico al 2,5% (p/v), conteniendo formaldehído al 0,03% (p/v), durante unos minutos (2-5 min) y se paró con EDTA disódico hidratado al 1,46% (p/v). Por último, los geles se lavaron dos veces con agua destilada durante 30 min y se conservaron, también en agua, hasta su uso.

## 2.9. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA GLICOSILACIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS

---

Además de los cambios inducidos por la infección con *E. caproni* sobre la expresión de proteínas a nivel del epitelio intestinal, en el presente trabajo se analizaron también los cambios inducidos por la infección en la glicosilación de estas proteínas en el intestino de ratas infectadas. La glicosilación es una de las principales modificaciones postraduccionales a la que pueden verse sometidas las proteínas en las células eucariotas, la cual puede afectar a la función biológica, localización subcelular y/o propiedades bioquímicas. Dada la importancia que pueden tener los cambios en la glicosilación sobre la función de las proteínas, se consideró oportuno investigar las alteraciones inducidas por la infección sobre el glicoproteoma del íleon de rata, por su posible trascendencia tanto en el establecimiento del parásito como en la expulsión de los vermes alojados en el lumen intestinal. Para ello se emplearon los mismos extractos proteicos utilizados para los experimentos 2D-DIGE, que se separaron por electroforesis 2D y se enfrentaron a distintas lectinas con diferente especificidad de ligando.

### 2.9.1. CUANTIFICACIÓN Y PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA)

Los extractos de proteínas intestinales fueron cuantificados con el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad), tal y como se ha descrito anteriormente para los antígenos de *E. caproni* y *S. muris* (véase Apartado 2.3.1.) y se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v). El TCA es un agente desnaturalizante que afecta a la estructura terciaria y secundaria de las proteínas, disminuyendo su solubilidad y originando la formación de un precipitado. Al mismo tiempo, es capaz de extraer sales y polisacáridos de la muestra, mejorando la pureza de la misma. El protocolo para la precipitación con TCA consiste en emplear una solución madre de TCA, de concentración conocida, y mezclarla con la solución proteica que se desea concentrar, de manera que el ácido quede a una concentración final del 10% (p/v). Tras su homogeneización, la mezcla se deja en agitación horizontal a 4 °C durante 30 min, para la formación de los agregados de proteínas. A



continuación, se centrifuga a 16.000 g durante 10 min y se elimina el sobrenadante. Para eliminar los restos de ácido se hace un lavado del precipitado con 1 ml de agua destilada, centrifugando durante 10 min a 16.000 g. Finalmente, se retira el sobrenadante y el precipitado se deja secar al aire antes de resuspenderlo en un tampón de electroforesis adecuado.

### 2.9.2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

La técnica de electroforesis 2D SDS-PAGE se describió anteriormente, en el Apartado 2.8.3.2., en relación a la separación de mezclas proteicas en dos dimensiones para los estudios de expresión diferencial por 2D-DIGE. No obstante, aunque la base metodológica es la misma, tanto el aparataje como las condiciones electroforéticas empleados en este caso fueron distintos. Para la separación electroforética en geles 2D, los precipitados de proteínas se solubilizaron durante 8 h a 4 °C en 125 µl de un tampón de urea 7M, tiourea 2M, CHAPS al 4% (p/v), biolitos 3-10 al 2% (v/v), DTT 20 mM, y trazas de azul de bromofenol (todos los productos de Bio-Rad) y se pusieron en contacto con una tira de IPG de 7 cm y rango de pH lineal 5-8 (*ReadyStrip™ IPG Strips*, Bio-Rad). El IEE se llevó a cabo en el sistema *Protean® IEF Cell* (Bio-Rad), a 20 °C, de acuerdo con el siguiente programa: (I) rehidratación pasiva de las tiras durante 16 h con el tampón de rehidratación conteniendo la proteína solubilizada; (II) 300 V durante 1 h para la eliminación de sales; y (III) 4.000 V durante 6,5 h. Tras el IEE, las tiras se redujeron con DTT al 2% (p/v) y se alquilaron con yodoacetamida al 2,5% (p/v) en tampón de urea 6M, en Tris 0,375 M (pH 8,8) con SDS al 2% (p/v) y glicerol al 20% (v/v), en dos pasos de 10 min cada uno.

La separación de las proteínas en la segunda dimensión se llevó a cabo en geles SDS-PAGE al 10% (8,3 cm x 7 cm x 1mm) en un equipo de electroforesis vertical modelo *Mini-Protean® 3 Cell* (Bio-Rad), en tampón de corrido Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS al 0,1% (p/v), fijando un potencial eléctrico de 40 V durante 1h y, a continuación, de 100 V durante aproximadamente 2 h.

### 2.9.3. ELECTROTRANSFERENCIA Y *BLOTTING* CON LECTINAS

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde los geles 2D a membranas de nitrocelulosa. A fin de obtener una alta sensibilidad para la mayoría de las proteínas presentes en la muestra, se emplearon geles cargados con 350 µg de proteína. Aunque la técnica de electrotransferencia se describió anteriormente (véase 2.6.3.), el tipo de membrana, así como el sistema y las condiciones de transferencia empleadas en este caso fueron distintas. Para el *blotting* con lectinas, la transferencia se llevó a cabo sobre membranas de nitrocelulosa, utilizando el sistema para transferencia húmeda *Mini Trans-Bolt® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad), a una intensidad de corriente de 200 mA, durante 90 min, en tampón frío Tris 25 mM, glicina 190 mM y metanol 20% (v/v). El adecuado funcionamiento de la transferencia fue comprobado por tinción de las proteínas sobre la membrana con una solución de Ponceau S durante 10 min, en agitación suave a temperatura ambiente, y posteriores lavados con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.

Para el *blotting* con lectinas se empleó el kit comercial *DIG Glycan Differentiation Kit* (Roche) que incluye cinco lectinas con diferente especificidad de ligando marcadas con digoxigenina (Tabla 2.4.), y que está diseñado para la caracterización de las cadenas de carbohidrato de glicoproteínas inmovilizadas sobre membranas de nitrocelulosa. El protocolo seguido para la detección de glicoproteínas fue el indicado por el fabricante, el cual se resume a continuación. Todos los pasos fueron realizados a temperatura ambiente y en agitación suave, excepto el último paso de incubación con la solución de revelado. Los filtros se incubaron durante 1 h en 20 ml de la solución de bloqueo proporcionada por el kit. A continuación, se hicieron dos lavados de 10 min en TBS seguidos de un tercer lavado con una solución tampón de MgCl<sub>2</sub> 1mM, MnCl<sub>2</sub> 1mM y CaCl<sub>2</sub> 1mM en TBS a pH 7,5 (Tampón I). Posteriormente se realizó la incubación con la solución de lectina, preparada a la dilución correspondiente en Tampón I (Tabla 2.4.). Las membranas se incubaron durante 1 h en esta solución, tras lo cual se lavaron 3 veces en TBS, tal y como se ha descrito. Seguidamente, los filtros se incubaron en una solución de un anticuerpo policlonal anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina, producido en oveja, diluido a

Tabla 2.4.- Lectinas utilizadas en *blotting*

Lectina	Fuente	Residuo	Concentración de trabajo ( $\mu\text{g/ml}$ )
GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	Man $\alpha$ 1-3Man	1
		Man $\alpha$ 1-6Man	
		Man $\alpha$ 1-2Man	
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	NeuNAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$	5
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	NeuNAc $\alpha$ 2-6Gal	1
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal $\beta$ 1-3GalNAc	10
DSA	<i>Datura stramonium</i>	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	1
		GalNAc-Ser/Thr	

**Tabla 2.4.-** Lectinas incluidas en el kit para caracterización de las cadenas de carbohidrato de glicoproteínas inmovilizadas sobre membranas de nitrocelulosa *DIG Glycan Differentiation Kit* (Roche), empleado para el análisis de las proteínas intestinales de ratas infectadas con *E. caproni*. Fuente, residuo(s) disacárido(s) por el/los que presentan una mayor afinidad y concentración de lectina utilizada.

una concentración de 0,75 U/ml en TBS. Tras la incubación, los filtros se lavaron tres veces en TBS antes de la reacción de revelado.

La solución de revelado era preparada justo antes de su utilización, diluyendo 200  $\mu\text{l}$  de NBT/BCIP (cloruro de 4-nitro azul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) en un tampón Tris 0,1 M,  $\text{MgCl}_2$  0,05 M y NaCl 0,1 M, ajustado a pH 9,5 con HCl. La fosfatasa alcalina hidroliza el BCIP para formar un producto intermediario que dimeriza, originando un marcaje de color azul índigo. Esta reacción genera dos equivalentes de reducción que reducen el NTB a NTB-formazán. Esta segunda reacción es irreversible y ocurre a velocidad constante, permitiendo un control preciso sobre el desarrollo de la reacción de marcaje y su sensibilidad relativa. La reacción de marcaje se realizó sin agitación, observando la aparición de color, que se completa en unos minutos. Por último, los filtros se lavaron un par de veces en agua destilada para parar la reacción de coloración y se secaron entre varias capas de papel de filtro antes de proceder a su análisis.

Para cada lectina se repitió el experimento empleando tres réplicas biológicas de animales control e infectados, obtenidas al mezclar la misma cantidad de proteína procedente de 3 animales distintos. Las membranas fueron analizadas y comparadas visualmente y solo se consideraron aquellos *spots* que mostraron una glicosilación diferencial entre animales control e infectados en los tres filtros analizados.

#### **2.9.4. TINCIÓN DE LOS GELES CON SYPRO® RUBY**

Para la identificación de las proteínas cuya glicosilación se vio alterada como consecuencia de la infección con *E. caproni*, paralelamente a los geles sometidos a transferencia y *blotting* con lectinas, se corrieron otros geles 2D, éstos con 100 µg de proteína, que se tiñeron para la visualización de los *spots* de interés. Para asegurar la reproducibilidad en el emparejamiento de los *spots* entre gel y membrana, para cada una de las tres réplicas biológicas empleadas en el *blotting* con lectinas, se corrió en paralelo un gel 2D a partir del cual se extrajeron los *spots* de interés para su identificación por espectrometría de masas. Solo fueron tenidos en cuenta aquellos *spots* para los que la identificación fue confirmada en los tres casos.

Para la visualización de las proteínas, los geles 2D eran teñidos con el colorante SYPRO® Ruby (Bio-Rad) que ofrece una alta sensibilidad de detección (0,25-1 ng de proteína por *spot*). La tinción de los geles se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Antes de la tinción, las proteínas fueron fijadas por incubación del gel en una disolución de metanol al 10% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v) durante 30 min. A continuación, se eliminaba la solución de fijación y se añadían 50 ml del colorante SYPRO® Ruby. Los geles se mantenían en el colorante durante al menos 3 horas, a temperatura ambiente, en agitación constante y protegidos de la luz, y se lavaban en agua destilada con metanol 10% (v/v) y ácido acético 7% (v/v) durante 60 min para eliminar el exceso de colorante. La visualización de los *spots* se llevó a cabo en el sistema de imagen ChemiDoc™ MP (Bio-Rad), utilizando una fuente de transiluminación ultravioleta para la excitación y el software Quantity One® para la toma de imágenes.

## 2.10. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

---

Diferentes análisis llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral requirieron la identificación de las proteínas de interés. Concretamente, se identificaron proteínas del hospedador que mostraron diferente nivel de expresión en el íleon de los animales infectados con *E. caproni* respecto de los controles no infectados; así como aquellas proteínas intestinales de rata cuyo estatus de glicosilación resultó modificado como consecuencia de la infección. Por otra parte, se llevó a cabo el análisis proteómico del antígeno somático de los adultos de *S. muris*.

Los diferentes análisis se realizaron por espectrometría de masas (MS), una técnica analítica basada en la transformación de los analitos en moléculas cargadas (ionización) y el subsiguiente análisis de los iones y sus productos de fragmentación en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). Numerosas tecnologías diferentes están actualmente disponibles en el mercado, tanto para la ionización como para el análisis de los iones, dando lugar a distintos tipos de espectrómetros de masas con diferentes combinaciones de estos procesos (Pitt, 2009). En función de las características del experimento y la naturaleza y propiedades de las muestras, para la identificación de las proteínas se recurrió a diferentes variantes de esta técnica.

### 2.10.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DEL HOSPEDADOR

Aquellas proteínas que en los experimentos 2D-DIGE mostraron una expresión diferencial en el intestino del hospedador antes y después de la infección con *E. caproni*, así como las proteínas del intestino de rata cuyo estatus de glicosilación se vio alterado como consecuencia de la infección, fueron analizadas por MS para su identificación. Las identificaciones se realizaron en la Unitat de Proteòmica del SCSIE bajo la supervisión de la Dra. Luz Valero.

### 2.10.1.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los *spots* de interés se extrajeron del gel manualmente. A continuación, las proteínas fueron reducidas con DTT 10 mM en una solución de bicarbonato amónico (ABC) 100 mM durante 30 min a 56 °C; alquiladas con yodoacetamida 55 mM en ABC 100 mM durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad y, finalmente, digeridas *in-gel* con un exceso de tripsina a 37 °C durante toda la noche, tal y como describen Shevchenko *et al.* (2006). La digestión se paró con ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración final del 1% (v/v). Finalmente, la mezcla de digestión se secó por centrifugación a vacío y los péptidos se resuspendieron en 7 µl de TFA al 0,1% (v/v), pH 2.

### 2.10.1.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS SEGUIDA DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (MS-MS/MS)

Las mezclas peptídicas fueron analizadas inicialmente por espectrometría de masas seguida de espectrometría de masas en tándem (MS-MS/MS) en un espectrómetro 5800 MALDI TOFTOF (AB Sciex). Este sistema utiliza la tecnología MALDI (del inglés, *matrix-assisted laser desorption/ionization*) para la ionización de la muestra y dos analizadores de tiempo de vuelo (TOF) para separar los iones, MS y MS/MS, de acuerdo con su relación m/z.

Un microlitro de la mezcla de péptidos fue depositado en el soporte diana MALDI y, tras dejarlo secar al aire, se añadió 1 µl de matriz [ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, Sigma-Aldrich®) 5 mg/ml en TFA al 0,1% (v/v) en acetonitrilo (ACN) al 70% (v/v)], dejándolo secar nuevamente. Los péptidos fueron ionizados con 3.000 pulsos de láser en cada posición.

Para el análisis MS/MS, para cada posición se seleccionaron los 5 precursores más intensos, que se fragmentaron empleando aire como gas de colisión. Los criterios para la selección de los iones fueron los siguientes: (I) relación señal/ruido mínima: 10; (II) área mínima del grupo de iones: 500; y (III) diferencia máxima del ion precursor: 200 ppm. Los datos del análisis se adquirieron con el método 1kV MS/MS.

### 2.10.1.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS)

Aquellos *spots* que no consiguieron ser identificados por MALDI TOFTOF se separaron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) antes de ser analizados por MS/MS (LC-MS/MS). La HPLC es una técnica de separación basada en la distinta retención de los componentes de la muestra, disueltos en la fase móvil, al pasar por la fase estacionaria y se caracteriza por la elevada presión de operación necesaria para conseguir una velocidad óptima de la fase móvil.

Un total de 5  $\mu$ l de la mezcla peptídica se cargaron en una columna trampa (*NanoLC Column*, 3  $\mu$ m C18-CL, 350  $\mu$ m x 0,5 mm; Eksigent) y se desalaron con TFA al 0,1% (v/v) a un flujo de 3  $\mu$ l/min durante 5 min. A continuación, los péptidos se cargaron en la columna analítica (*LC Column*, 3  $\mu$ m C18-CL, 75  $\mu$ m x 12 cm; Nikkyo) y se equilibraron con una solución de ACN al 5% (v/v) y ácido fórmico al 0,1% (v/v). La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal: 5-45% (v/v) de B en A durante 15 min (siendo A: ácido fórmico al 0,1% (v/v) y B: ACN al 0,1% (v/v) en ácido fórmico) a un flujo de 300 nl/min. Los péptidos fueron analizados en un espectrómetro híbrido, cuadrupolo tiempo de vuelo, *nanoESI QqTOF* (TripleTOF, AB Sciex) operado en modo de adquisición dependiente de información. El voltaje del ionspray se mantuvo a 2,8 kV y se empleó nitrógeno como gas de colisión. El resto de parámetros de la fuente y posición del spray se optimizaron previamente con una mezcla comercial de proteínas digeridas con tripsina (LC Packings, P/N 161088).

Para la adquisición de los resultados se llevó a cabo un barrido de los productos TOF MS entre 350-1.250 m/z durante 0,25 s, seguido de un barrido de los productos de ionización entre 100-1.500 m/z durante 0,05 s, seleccionando los 50 iones (2-5 cargas) más intensos.

## **2.10.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA EL ESTUDIO DEL PROTEOMA DE LA FASE ADULTA DE *SYPHACIA MURIS***

El proteoma del estadio adulto de *S. muris* se estudió a partir de antígenos completos del parásito, obtenidos tal y como se ha descrito anteriormente (véase Apartado 2.3.1.3.). El análisis proteómico se llevó a cabo por LC-MS/MS. Con la finalidad de mejorar la identificación de proteínas se siguieron dos aproximaciones distintas: (I) prefraccionamiento del antígeno por IEE y análisis individual de las fracciones y (II) inyección de la mezcla total de proteínas no fraccionada. El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe, bajo la supervisión de los Dres. Luz Valero y Manuel Sánchez del Pino.

### **2.10.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Se emplearon dos alícuotas de 200 µg, cuantificadas con *RC-DC Protein Assay* (Bio-Rad) (véase Apartado 2.8.2.1.), que se procesaron de diferente manera en función de la aproximación seguida.

#### ***a) Precipitación de Proteínas con Cloroformo/Metanol***

Las proteínas solubles del antígeno completo de *S. muris* se precipitaron con cloroformo/metanol, siguiendo el protocolo descrito por Wessel & Flügge (1984). Para soluciones proteicas con un volumen inicial de 100 µl, se añaden 400 µl de metanol, se homogeniza y se mezcla con 100 µl de cloroformo. A continuación, se añaden 300 µl de agua y se agita de nuevo antes de centrifugar durante 1 min a 14.000 g (4 °C). Tras la centrifugación la mezcla queda separada en dos fases, quedando las proteínas en la interfaz entre ellas. Seguidamente, se desecha la fase acuosa (superior), se añaden 400 µl más de metanol y se mezcla nuevamente antes de centrifugar durante 2 min a 14.000 g. Tras esta segunda centrifugación las proteínas precipitan en el fondo del tubo. El sobrenadante se retira cuidadosamente y el sedimento se deja secar al aire antes de resuspenderlo en el tampón adecuado. Los volúmenes de cada reactivo fueron ajustados en función del volumen inicial de la muestra problema.



### **b) Digestión Triptica**

Tras la precipitación, las proteínas se resuspendieron en 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) al 50% (v/v) en ABC 50 mM. A continuación, se redujeron con DTT 2 mM durante 1 h a 37 °C y se alquilaron las Cys con yodoacetamida 5,5 mM durante 30 min, en oscuridad y temperatura ambiente. Seguidamente, la concentración de TFE se ajustó al 4,5% (v/v) con ABC 50 mM y se procedió a la digestión de las proteínas con 2 mg de tripsina a 37 °C durante toda la noche. Los péptidos resultantes de la digestión se secaron por centrifugación a vacío.

### **c) Preparación de la Muestra Fraccionada**

Para el fraccionamiento de la muestra, los péptidos resultantes de la digestión con tripsina se separaron por IEE en una tira IPG antes de proceder al análisis por LC-MS/MS. Para ello, la mezcla de péptidos se resuspendió en un tampón de urea 8 M, tiourea 2 M y anfólitos 1,6% (v/v) (todos los productos de GE Healthcare) y se cargaron en una tira IPG de 7 cm y gradiente de pH 3-10 no lineal (*Immobiline™ DryStrip*, GE Healthcare). La rehidratación se realizó de forma pasiva durante una noche a temperatura ambiente y el IEE se llevó a cabo en el sistema *Ettan IPGPhor-II IEF* (GE Healthcare) en un solo paso a 5.000 V hasta 12.000 Vh, a 20 °C. A continuación, la tira fue cortada en 10 segmentos y los péptidos se eluyeron con cuatro soluciones sucesivas de ACN al 0% (v/v), 50% (v/v), 75% (v/v) y 100% (v/v) en TFA al 0,1% (v/v). Los diferentes eluidos de cada fracción se mezclaron y se pasaron por una resina POROS 20 R2 para eliminar las sales. Finalmente, los péptidos recogidos de cada fracción se secaron por centrifugación a vacío y se reconstituyeron en 16 µl de TFA al 0,1% (v/v), pH 2.

### **d) Preparación de la Muestra No Fraccionada**

En el caso de la muestra no fraccionada los péptidos resultantes de la digestión triptica fueron reconstituidos directamente en 16 µl de TFA al 0,1% (v/v) y pH 2.

### 2.10.2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS)

Las mezclas de péptidos, separados por IEE o no fraccionados, se analizaron por LC-MS/MS. Cinco microlitros de cada una de las alícuotas fueron inyectados en una columna trampa (C18 PepMap100, 5  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$  x 5 mm; LC Packings) utilizando un sistema de HPLC capilar (Switchos, LC Packings) vía un flujo isocrático de fase móvil [TFA al 0,1% (v/v)] de 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  durante 3 min. Posteriormente, el flujo fue cambiado a 300  $\text{nl}/\text{min}$  y los péptidos fueron transferidos a una columna analítica (C18 PepMap100, 3  $\mu\text{l}$ , 100  $\text{\AA}$ , 75  $\mu\text{m}$  x 15 cm; LC Packings) y eluidos con una fase móvil en gradiente: 5-45% (v/v) de B en A [siendo A: ácido fórmico al 0,1 % (v/v) y B: ácido fórmico al 0,1% (v/v) en ACN al 95% (v/v)]. La elución se llevó a cabo durante 30 min para cada una de las fracciones procedentes del IEE y durante 150 min para los péptidos no fraccionados.

En cualquier caso, el eluido fue aplicado directamente a la fuente de nanospray de un espectrómetro de masas, cuadrupolo tiempo de vuelo, *QSTAR XL* (Applied Biosystems®) y analizado en modo de adquisición dependiente de información. El voltaje de ionspray se mantuvo en un rango de 2,5 a 3 kV y se empleó nitrógeno como gas de colisión. El resto de parámetros de la fuente y posición del spray habían sido previamente optimizados empleando una mezcla comercial de proteínas digeridas con tripsina (LC Packings, P/N 161088).

Cada una de las fracciones procedentes del IEE fue analizada una única vez. Sin embargo, los péptidos no fraccionados se analizaron en dos inyecciones. En la primera de ellas se llevó a cabo un análisis regular, mientras que para el segundo análisis se programó una lista de exclusión de todos los iones que habían sido asignados a una proteína tras el primer análisis. Esta lista de exclusión definía, para cada ión, el PM y el tiempo de retención determinados en el primer análisis. Cada ión se excluye por fragmentación durante 60 s alrededor de su tiempo de retención.

### 2.10.3. BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS

Para la identificación de las proteínas, los resultados obtenidos por MS fueron analizados por comparación con las secuencias disponibles en las bases de datos apropiadas empleando diferentes motores de búsqueda.

#### 2.10.3.1. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DEL HOSPEDADOR

La identificación de las proteínas se llevó a cabo por comparación de los datos espectrométricos con las secuencias depositadas en la base de datos de proteínas del National Center for Biotechnology Information [NCBI nr (no redundante)]. Esta base de datos recopila secuencias no idénticas procedentes de diferentes bases de datos [PDB (Protein Data Bank), Swiss-Prot, PIR (Protein Information Resource), PRF (Protein Research Foundation) y traducción de secuencias codificantes depositadas en GenBank].

Los resultados de MS-MS/MS y LC-MS/MS se enviaron a *MASCOT* v2.5 (Matrix Science) vía *ProteinPilot*<sup>™</sup> (AB Sciex). La búsqueda fue llevada a cabo con especificidad tríplica, permitiendo una sola pérdida de sitio de corte, y con una tolerancia en la medición de la masa de 100 ppm en modo MS y de 0,8 Da para los iones MS/MS. La carbamidometilación de Cys se definió como modificación fija, mientras que la oxidación de metionina (Met) y la deamidación de asparagina (Asn) y glutamina (Gln) se establecieron como modificaciones variables. La taxonomía se fijó en Metazoa.

#### 2.10.3.2. ESTUDIO DEL PROTEOMA DE LA FASE ADULTA DE *SYPHACIA MURIS*

Los datos espectrométricos derivados del análisis proteómico del antígeno total de *S. muris* fueron enfrentados a diferentes bases de datos empleando los motores de búsqueda *MASCOT* y *ProteinPilot*<sup>™</sup>.

Utilizando *MASCOT* v2.2.03 (Matrix Science) se llevó a cabo la comparación con las bases de datos NCBI nr (taxonomía fijada en Nematoda) y EST-nematode (NCBI), construida a partir de secuencias cortas derivadas de mRNA de organismos del phylum Nematoda (EST: *expressed sequences tags*). Las búsquedas con *MASCOT* se llevaron a cabo con especificidad tríplica, permitiendo una sola pérdida de sitio de corte, y con una

tolerancia en la medición de la masa de 100 ppm en modo MS y de 0,8 Da para los iones MS/MS. La carbamidometilación de Cys se definió como modificación fija, mientras que la oxidación de Met y la deamidación de Asn y Gln se establecieron como modificaciones variables. La identificación de las proteínas fue considerada precisa cuando la puntuación asignada, o *MASCOT score*, era mayor de 51 ( $p < 0,05$ ).

Asimismo, se empleó el software *ProteinPilot™ 3.0* (Applied Biosystems®) para la búsqueda en la base de datos de proteínas de Metazoa de NCBI. Este software emplea el algoritmo Paragon, con el que no es necesario fijar tolerancia de masa o posibles modificaciones. Este algoritmo utiliza valores preestablecidos debido a que las características del tipo modificaciones, sustituciones y cortes están modeladas en términos de probabilidad en lugar de por ajustes puntuales controlados. En este caso la identificación de proteínas se consideró adecuada cuando la puntuación fue superior a 1,3 con un intervalo de confianza del 95%.

## **2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

---

Para poder interpretar del significado biológico de los resultados, los datos obtenidos en los diferentes estudios fueron analizados mediante herramientas de análisis estadístico. En general, se emplearon pruebas paramétricas para la comparación de medias, las cuales son aplicables cuando el conjunto de datos analizado presenta una distribución normal. Es decir, que su representación gráfica se ajusta a una campana de Gauss. En cada caso, la distribución de las series de datos se contrastó mediante el test de Shapiro-Wilk y, cuando no se ajustaron a una distribución normal, se realizó la transformación logarítmica de los mismos para alcanzar la normalidad. Los diferentes test aplicados, los cuales se describen a continuación, requieren además la existencia de homocedasticidad entre los conjuntos de datos, esto es, que las varianzas de las medidas de los grupos comparados sean iguales. Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se empleó el test de Levene, que permite confirmar, para una variable determinada, la

igualdad de varianzas entre dos o más grupos. Los diferentes test utilizados para la comparación de medias entre dos o más grupos se describen en los siguientes apartados, indicando en qué casos fueron empleados cada uno de ellos. Todos los cálculos estadísticos se realizaron empleando el software *SPSS Statistics* (IBM).

### 2.11.1. TEST T DE STUDENT

Este test se emplea para comparar los valores medios calculados para una variable métrica (variable dependiente) respecto de una variable nominal (variable independiente), la cual puede tomar únicamente dos valores. La hipótesis nula asume que las medias son iguales en los dos grupos o categorías. Se trata de un test paramétrico que asume que la distribución de los datos en cada grupo es normal y que las varianzas de los dos grupos son iguales, es decir, que hay homocedasticidad.

El test *t* de Student para muestras independientes, no relacionadas, se empleó para la valoración estadística de las respuestas de anticuerpos tanto en suero como en mucosa intestinal, evaluadas mediante ELISA indirecto. En el caso de las respuestas sistémicas, en diferentes cepas de ratón y cuando se enfrentaron los sueros de ratas infectadas con *S. muris* a los antígenos tanto de *S. muris* como de *E. caproni*, los valores obtenidos en cada semana postinfección se compararon con los valores previos a la infección (0 spi). Cuando se enfrentaron los antígenos de *S. muris* y *E. caproni* a la mucosa intestinal de ratas control e infectadas con *S. muris*, la aplicación del test permitió comparar los valores de DO medidos, para cada semana, en animales infectados y control. Asimismo, esta prueba se utilizó para evaluar los recuentos de las diferentes poblaciones celulares analizadas a nivel de la mucosa del íleon de ratas infectadas con *S. muris* y la expresión génica relativa de: (I) las citoquinas implicadas en la respuesta Th17 en diferentes tejidos inmunoactivos de ratones y ratas infectados con *E. caproni* con respecto a los controles en cada especie hospedadora; (II) las citoquinas y mucinas durante las primeras semanas postinfección con *S. muris* en rata; y (III) la expresión relativa del gen que codifica para Muc5ac en el íleon de ratones y ratas infectados con *E. caproni*. Para esta mucina, en el caso de ratón se compararon los niveles de expresión, expresados en

términos de  $\Delta Ct$ , entre el íleon de ratones infectados a las 4 y 6 spi. En ratas, los valores obtenidos en cada semana postinfección se compararon con respecto a los de los animales control (0 spi). La distribución posicional de las células marcadas con BrdU (porcentaje de células marcadas en cada posición) entre el íleon de ratones y ratas control y en diferentes semanas postinfección con *E. caproni*, para cada hospedador, también fue analizada mediante *t* de Student. En todos los casos, los resultados se consideraron estadísticamente diferentes cuando  $p < 0,05$ .

### **2.11.2. ANOVA DE DOS FACTORES**

La prueba ANOVA de dos factores se emplea cuando se dispone de una variable métrica (variable dependiente) y dos variables nominales (variables independientes), las cuales se pueden encontrar en todas las combinaciones posibles. Como todos los análisis de la varianza, el ANOVA de dos factores asume que las observaciones en cada categoría se distribuyen de forma normal y tienen varianzas iguales. La hipótesis nula incluye, en realidad, tres hipótesis nulas: las medias observadas en los grupos creados sobre un factor son iguales; las medias observadas con el otro factor son iguales; y no hay interacción entre los factores.

La prueba ANOVA de dos factores se empleó para conocer la influencia de un segundo factor sobre los resultados obtenidos. De esta manera, el test ANOVA de dos factores se empleó para analizar la influencia de la semana postinfección y la especie hospedadora sobre la expresión relativa de los genes de mucinas a nivel del íleon de los hospedadores infectados (ratón y rata). Asimismo, cuando se emplearon diferentes cepas de ratón como hospedadores de *E. caproni*, el tiempo postinfección y la cepa se fijaron como variables independientes para conocer su influencia sobre varios de los parámetros analizados. Estos parámetros fueron: (I) la tasa de recuperación de adultos; (II) la expresión génica relativa de citoquinas, mucinas y del enzima iNOS; (III) la longitud de las criptas y vellosidades intestinales; y (IV) el recuento de las poblaciones de mastocitos y células caliciformes en la mucosa del íleon. Finalmente, se empleó ANOVA de dos factores para evaluar el efecto del tiempo (edad) y la infección (infectado vs. no infectado) sobre

la evolución del peso corporal de diferentes cepas de ratón a lo largo de la infección con *E. caproni*. Otro aspecto para el que se empleó este test estadístico fue el análisis de los distintos parámetros estudiados para determinar los niveles de proliferación celular y la tasa de recambio del epitelio intestinal durante la infección con *E. caproni* en ratón. El número de células, número de células BrdU<sup>+</sup> y porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> por cripta; la posición de la última célula BrdU<sup>+</sup> al cabo de 1 y 24 h postadministración; la longitud de las criptas y vellosidades intestinales y el número de células BrdU<sup>+</sup> acumuladas en eje cripta-vellosidad a las 24 h postadministración se analizaron, en cada hospedador, fijando como variables independientes la semana postinfección y la condición infectado/no infectado. Asimismo, se empleó este test para comparar las tasas de infección con *E. caproni* en ratas control y en diferentes semanas postinfección con *S. muris*. En todos los casos, el valor de significatividad se fijó en  $p < 0,05$ .

### 2.11.3. ANÁLISIS POST-HOC

Cuando el test ANOVA de dos factores reveló la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados se aplicó el test de Bonferroni como análisis *post-hoc*, para identificar aquellos grupos cuyas medias eran significativamente diferentes. Este test es similar a un test *t* en el cual el valor de significatividad se corrige, o ajusta, en función del número de pares de medias comparados. El valor de significatividad para la prueba de Bonferroni se fijó en  $p < 0,05$ .

### 2.11.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS DE 2D-DIGE

El análisis estadístico de la expresión diferencial de proteínas, estudiada en el íleon de animales (ratones y ratas) control y a las 2 spi con *E. caproni* mediante la técnica 2D-DIGE, fue llevado a cabo utilizando los módulos BVA y EDA del software *DeCyder™*, considerando únicamente las proteínas con un 100% de presencia. Es decir, que estuvieran presentes en todos los geles incluidos en el experimento correspondiente. A partir de los datos generados previamente (véase Apartado 2.8.4.), el módulo BVA lleva a cabo la integración de los diferentes geles incluidos en el experimento para crear una imagen de referencia, la cual debe ser validada manualmente, y permite aplicar diferentes

test de comparación entre los grupos para la valoración estadística de los datos correspondientes a cada *spot*. Esta herramienta detecta la consistencia de las diferencias entre todos los geles y aplica pruebas estadísticas para asignar un intervalo de confianza a cada diferencia. En nuestro caso se calculó la relación media de la expresión entre las dos poblaciones (infectados y no infectados) y se aplicó el test de la *t* de Student (véase Apartado 2.11.1.) para detectar las diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ). Los test estadísticos son aplicados al logaritmo de la abundancia, que se obtiene de la normalización del volumen del *spot*, estandarizado frente al estándar de gel correspondiente. Asimismo, se aplicó el test FDR (*False Discovery Rate*), un test de control estadístico que permite corregir el valor de significatividad cuando se realizan comparaciones múltiples, con la finalidad de reducir la introducción de falsos positivos. Para un determinado conjunto de datos, el test FDR utiliza las características de la distribución de los valores de  $p$  para asignar un valor de significatividad  $q$  a cada comparación. Se consideró que la comparación había superado el test FDR cuando  $q < 0,05$ .

Por otra parte, el módulo EDA de este software ofrece herramientas de estadística multivariante y permite el análisis combinado de diferentes conjuntos de datos, ofreciendo una interpretación biológica de los resultados. Se pueden aplicar diferentes tipos de análisis. En este caso se han utilizado: (I) el análisis de componentes principales (PCA), que proporciona una primera impresión sobre cuán diferentes entre sí son los distintos grupos, permitiendo identificar, en su caso, fuentes subyacentes de variación en el experimento y (II) el análisis de patrones, capaz de encontrar patrones de expresión, sin ninguna información previa de las variables, agrupando tanto las proteínas como los individuos con un patrón de expresión similar. Estos análisis se describen, con más detalle, en los apartados siguientes.

#### **2.11.4.1. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)**

El PCA es un método estadístico de síntesis de la información, cuyo objetivo es la simplificación y reducción de la dimensionalidad en el análisis de datos multivariantes, de tal manera que los datos transformados mantengan las características básicas de los datos



iniciales, asumiendo únicamente una pequeña pérdida de información. Dicho de otro modo, se trata de encontrar una serie de componentes capaces de explicar la mayor parte de la varianza total de las variables originales. De esta forma se obtiene una imagen simplificada del conjunto de datos inicial, que sigue describiéndolos en su mayor parte, pero que resulta mucho más sencilla a la hora de interpretarlos. Los nuevos componentes principales son una combinación lineal de las variables originales y son independientes entre sí (Silva *et al.*, 2014).

La primera fase del PCA supone el análisis de la matriz de correlaciones. Un PCA tiene sentido cuando existen altas correlaciones entre las variables, lo cual es indicativo de que existe información redundante y que, por tanto, pocos factores pueden explicar gran parte de la variabilidad total. Para realizar el PCA hay que partir de una matriz de datos con N filas (observaciones) y K columnas (variables). Esta matriz se representa en un espacio con tantas dimensiones como variables (K dimensiones), en el que cada variable representa un eje de coordenadas, generando un espacio multidimensional en el que cada observación se representa como un punto.

Para la selección de los componentes principales, sobre el espacio multidimensional construido a partir del conjunto de datos de partida, el PCA define nuevas variables que recogen la mayor parte de la información (identificada con la varianza) contenida en las variables originales. De este modo, cada nueva variable será un nuevo eje de coordenadas en el que el valor de cada observación será la proyección del punto correspondiente sobre dicho eje. Es decir, el PCA buscará los ejes más adecuados, que serán aquellos que proyecten una mayor cantidad de varianza. Estos nuevos ejes, denominados componentes principales o factores, son una combinación lineal de las variables originales y deben ser independientes entre sí. La elección de los componentes principales se realiza de tal forma que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original. Esto es, el primer componente principal (PC) 1 se define como la combinación lineal de las variables originales que tiene varianza máxima, el segundo factor debe recoger la máxima variabilidad posible no recogida en el primero y así

sucesivamente. Normalmente, un único PC no es suficiente para representar un conjunto grande de datos, por lo que suelen calcularse dos o más. Del total de factores se eligen aquellos que recogen el porcentaje de variabilidad que se considera suficiente.

El valor de la proyección de cada observación en el nuevo eje de coordenadas, definido por los componentes principales, se conoce como puntuación y la representación de las proyecciones de las observaciones en los nuevos ejes de coordenadas recibe el nombre de gráfico de puntuación. Pero el PCA no solo aporta información de sobre las observaciones, sino también sobre las variables. Los denominados valores de contribución proporcionan una perspectiva de la influencia de las variables originales en los componentes principales. Estos valores se representan en el gráfico de contribución, que indica qué variables están correlacionadas, cuáles son influyentes y cuáles son responsables de los patrones detectados en las observaciones. De este modo, cuando la correlación es directa, las variables se agrupan en la misma región del gráfico de contribución y cuando están inversamente correlacionadas se sitúan en cuadrantes opuestos. La distancia sobre el origen del gráfico también influye, cuanto más alejada del origen, más impacto tiene la variable sobre el modelo. Por último, es necesario tener en cuenta que este tipo de análisis es extremadamente sensible a la presencia de valores extremos o atípicos (comúnmente conocidos como *outliers*), observaciones extremas que no encajan en el modelo de componentes principales calculado y pueden alterar los resultados del análisis. No obstante, los valores extremos o atípicos son fáciles de detectar. El gráfico de puntuación muestra una elipse que representa un intervalo de confianza del 95% para las observaciones que se ajustan a la normalidad multivariante. Así pues, las observaciones que aparecen fuera de la elipse no se ajustan a la distribución normal y serán consideradas valores extremos o atípicos.

Para el PCA, el módulo EDA del software *DeCyder™* permite tomar como variables las muestras y como observaciones los *spots* o a la inversa (los *spots* como variables y las muestras como observaciones). En la presente Tesis Doctoral los resultados se presentan tomando los *spots* como variables. De esta manera lo que se pretende es reducir la

complejidad para conseguir una visión más simple de las muestras, las cuales aparecen representadas en el gráfico de puntuación. En este tipo de análisis, las muestras pertenecientes al mismo grupo experimental y, *a priori*, con perfiles de expresión similares, deben aparecer próximas en el gráfico de puntuación. Cuando esto no ocurre es indicativo de que existe algún problema con la muestra en cuestión, especialmente cuando aparece representada fuera de la elipse que delimita el intervalo de normalidad. Por ello, este análisis se usa principalmente para identificar fuentes subyacentes de variación en el experimento y encontrar valores extremos o atípicos en las muestras que deban ser excluidos del estudio.

#### 2.11.4.2. ANÁLISIS DE PATRONES POR AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO

El análisis de patrones por agrupamiento jerárquico permite encontrar variaciones de expresión y perfiles de expresión diferencial. Consiste en una clasificación no supervisada, generada por la aplicación de varias técnicas de estadística multivariante, cuya finalidad es agrupar los elementos de un conjunto de forma jerárquica, en grupos homogéneos en función de la similitud entre ellos. Este tipo de análisis, igual que el PCA, se lleva a cabo directamente con los resultados de expresión de todos los *spots*, en todas las muestras y todos los geles del experimento, sin ningún conocimiento previo sobre las variables ni las razones biológicas para la agrupación de las mismas. Por ello se define como un método de clasificación no supervisado, ya que *a priori* se desconoce el número de clases en que es razonable dividir las observaciones, así como a qué clase debe pertenecer cada observación. Asimismo, se denomina método jerárquico porque crea una jerarquía entre las clases que se construyen a partir de las observaciones. De este modo, dado un conjunto de datos inicial donde cada elemento es una clase, se genera un árbol jerárquico, también denominado dendrograma, que agrupa en cada etapa las dos clases ubicadas a la misma distancia. Por tanto, además de reducir la dimensionalidad de los datos, su finalidad es separar en grupos un conjunto de observaciones en función de la similitud que exista entre ellas. Es decir, clasificar los objetos (observaciones y variables) de tal manera que los perfiles de expresión de los objetos en un mismo grupo sean muy

similares entre sí y distintos de los perfiles de expresión de los objetos de los grupos diferentes (Meunier *et al.*, 2007).

Este análisis se llevó a cabo con el módulo el módulo EDA del software *DeCyder™*, empleando la distancia euclídea como método para la estimación de la similitud. Este software permite realizar al mismo tiempo la clasificación jerárquica de las muestras y los *spots* de proteínas, de manera que los resultados se presentan en forma de dos dendrogramas, los cuales delimitan un espacio bidimensional en el que se representa un diagrama de calor. Este diagrama consiste en un sistema de coordenadas en el que los *spots* están representados en el eje vertical y las muestras en el eje horizontal, de modo que cada coordenada del diagrama representa un determinado *spot* en una muestra concreta. Mediante una escala de colores que va del verde (expresión disminuida) al rojo (expresión aumentada), pasando por el negro (sin cambio en la expresión), se representa el nivel de expresión de cada *spot* de proteína en cada una de las muestras incluidas en el experimento.

# Capítulo III

---

## RESULTADOS



### **3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA TH17 FRENTE A *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN RATÓN Y RATA INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE**

---

Los linfocitos Th17 constituyen una población diferenciada de células T CD4+ que interviene en la patología de algunas infecciones por helmintos, además de otras enfermedades de naturaleza inflamatoria y autoinmunitaria. Asimismo, evidencias crecientes sugieren que esta población actúa como puente entre la inmunidad innata y adaptativa, al estar implicada en la vigilancia y defensa temprana de las mucosas frente a diferentes patógenos extracelulares (Basu *et al.*, 2013).

#### **3.1.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL**

Trelis *et al.* (2011) analizaron los perfiles de expresión de citoquinas de tipo Th1 y Th2 en respuesta a la infección por *E. caproni* en hospedadores de alta y baja compatibilidad. Sin embargo, el paradigma clásico de respuesta (Th1/Th2) ha sido enriquecido recientemente con la identificación de otras poblaciones de linfocitos T CD4+ que intervienen en la protección del hospedador frente a infecciones de diferente naturaleza (véase Capítulo I, Apartado 1.3.1.). Con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la respuesta inmunitaria generada frente a *E. caproni* en hospedadores de diferente compatibilidad y determinar los factores implicados en la expulsión de los helmintos intestinales, se ha estudiado la expresión *in vivo* de los genes de varias citoquinas implicadas en la respuesta Th17.

Korn *et al.* (2009) propusieron un modelo para la polarización a Th17 en tres pasos, en el que: (I) TGF- $\beta$  e IL-6 inducen la diferenciación de linfocitos T inmaduros a células Th17 productoras de IL-21 e IL-23, además de otras citoquinas efectoras (IL-17A, IL-17F e IL-22); (II) la IL-21 actúa a través de un mecanismo de retroalimentación positiva, amplificando la frecuencia de células Th17; y (III) por último la IL-23, relacionada con la maduración de la respuesta, acaba de diferenciar y estabilizar el fenotipo Th17. Para la

caracterización de la respuesta Th17 en ratones y ratas infectados con *E. caproni* se determinaron los perfiles de expresión de la citoquina efectora IL-17A y las citoquinas reguladoras TGF- $\beta$  e IL-23 en diferentes tejidos inmunoactivos (bazo, NLM, placas de Peyer e intestino). La expresión de IL-6 había sido previamente analizada por Trelis *et al.* (2011).

El estudio se llevó a cabo empleando un total de 20 ratones ICR macho, de 5 semanas de edad (30-35 g de peso), y el mismo número de ratas Wistar, también machos, de 3 semanas de edad (80-100 g), que se infectaron con una dosis de 75 y 100 metacercarias de *E. caproni*, respectivamente. Un total de 5 ratones y 5 ratas se mantuvieron como controles no infectados. Bisemanalmente, desde el momento de la infección, 5 hospedadores de cada especie fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de RNA total de los tejidos antes mencionados, que se utilizaron para la cuantificación relativa de la expresión génica de las citoquinas mediante RT-PCRrt.

### **3.1.2. CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS IMPLICADAS EN LA RESPUESTA TH17**

Los perfiles de expresión relativa del mRNA de IL-17A, TGF- $\beta$  e IL-23 en bazo, NLM, placas de Peyer y tejido intestinal de ratas infectadas con *E. caproni* se describen a continuación. Las cantidades relativas de mRNA de cada citoquina en cada semana postinfección analizada se muestran tras la correspondiente normalización con respecto a la expresión del gen de la  $\beta$ -actina (control endógeno) y la relativización respecto a su expresión en los controles negativos (animales no infectados). La significancia estadística de las diferencias observadas entre animales control e infectados, para cada citoquina en cada tejido y hospedador, se evaluó mediante *t* de Student con el tiempo postinfección como variable independiente. Antes de pasar a describir los resultados obtenidos, cabe señalar que en el hospedador de alta compatibilidad (ratón) no se detectaron cambios significativos en la expresión de ninguna de las citoquinas analizadas durante todo el experimento.



### 3.1.2.1. EXPRESIÓN RELATIVA DE IL-17A

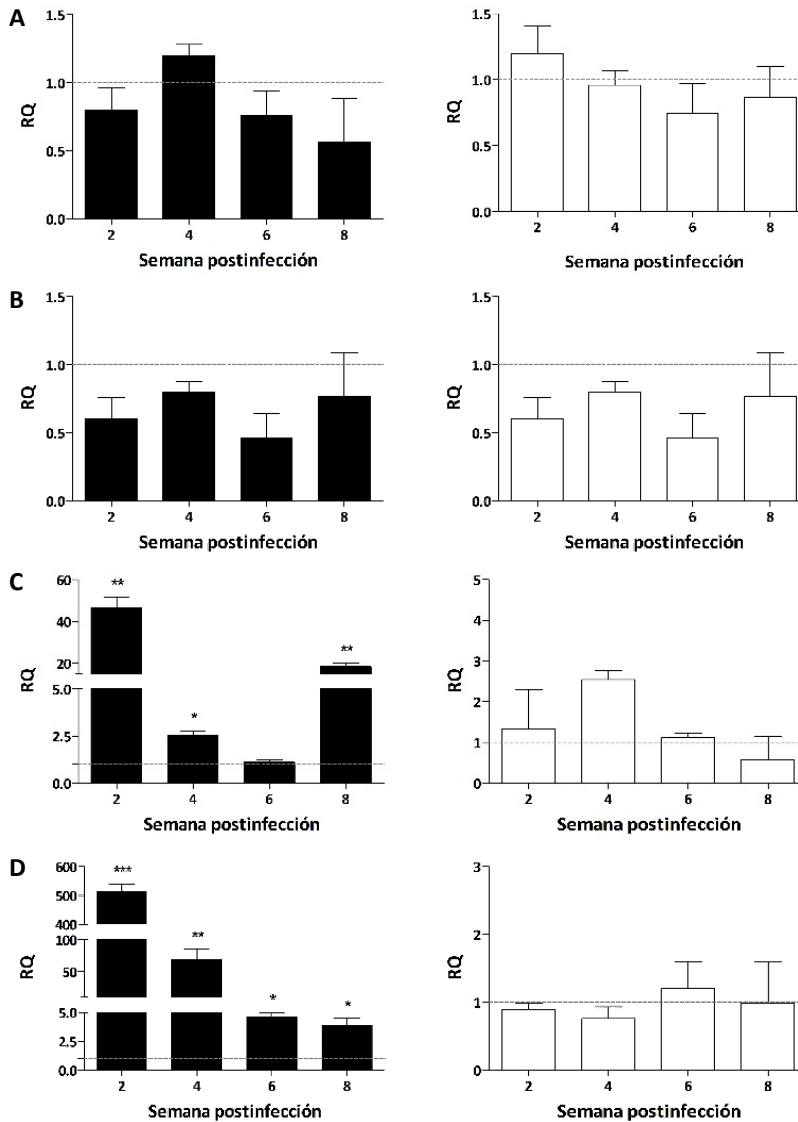
Se detectaron incrementos significativos en la expresión del mRNA de IL-17A en el íleon y placas de Peyer de ratas infectadas con *E. caproni* desde la 2 spi (Figura 3.1.). La cinética observada fue similar en ambos tejidos, en los que se detectó un rápido aumento en la expresión relativa, la cual disminuyó de forma progresiva en las semanas posteriores. A nivel de las placas de Peyer se detectó un fuerte aumento en la expresión génica de esta citoquina a las 2 spi ( $p < 0,01$ ), si bien los valores disminuyeron rápidamente, manteniéndose significativamente superiores a los de los controles hasta la 4 spi ( $p < 0,05$ ). A las 8 spi se detectó un nuevo incremento repentino de la expresión, alcanzándose valores de RQ significativamente más elevados que en los animales no infectados ( $p < 0,01$ ). En el tejido intestinal, la expresión relativa del gen de la IL-17A aumentó de forma muy acusada en las primeras semanas de la infección, alcanzando el máximo a las 2 spi ( $p < 0,001$ ). En las semanas posteriores la expresión fue decayendo de manera progresiva, aunque se mantuvo significativamente superior a la de los controles en todos los tiempos postinfección analizados ( $p < 0,05$ ).

En los tejidos de ratón no se observaron cambios significativos en la expresión del gen que codifica para la IL-17A en ninguna de las semanas postinfección estudiadas (Figura 3.1.).

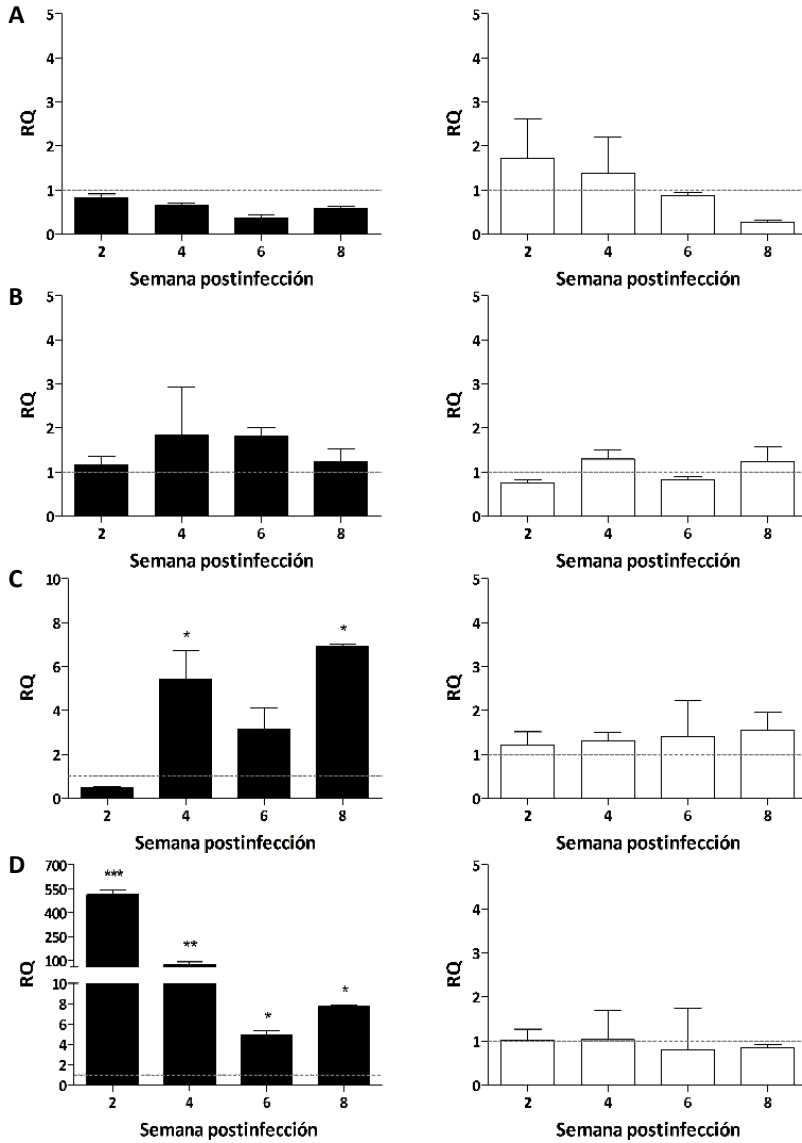
### 3.1.2.2. EXPRESIÓN RELATIVA DE TGF- $\beta$

La cinética de expresión relativa del mRNA del TGF- $\beta$  fue similar a la observada para la IL-17A, con incrementos estadísticamente significativos a nivel del íleon y las placas de Peyer de ratas infectadas (Figura 3.2.). Del mismo modo, no se observaron aumentos significativos en la expresión de esta citoquina en ninguno de los tejidos de ratón analizados (Figura 3.2.).

En el íleon de las ratas, la expresión del gen que codifica para el TGF- $\beta$  aumentó rápidamente después de la infección, alcanzándose el máximo a las 2 spi ( $p < 0,001$ ). En las



**Figura 3.1.-** Expresión de IL-17 en ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*. Expresión relativa del mRNA de IL-17 en bazo (A), nódulos linfáticos mesentéricos (B), placas de Peyer (C) e intestino (D) de ratas (barras negras) y ratones (barras blancas) en diferentes semanas postinfección (spi) con *E. caproni*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados (0 spi), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001).



**Figura 3.2.-** Expresión de TGF- $\beta$  en ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*. Expresión relativa del mRNA de TGF- $\beta$  en bazo (A), nódulos linfáticos mesentéricos (B), placas de Peyer (C) e intestino (D) de ratas (barras negras) y ratones (barras blancas) en diferentes semanas postinfección (spi) con *E. caproni*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados (0 spi), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001).

semanas posteriores, los niveles de RQ disminuyeron progresivamente, manteniéndose significativamente superiores a los de los controles en todas las semanas de estudio ( $p < 0,05$ ). En placas de Peyer, la expresión relativa de TGF- $\beta$  solo fue significativamente superior a la de los controles a las 4 y 8 spi ( $p < 0,05$ ).

### **3.1.2.3. EXPRESIÓN RELATIVA DE IL-23**

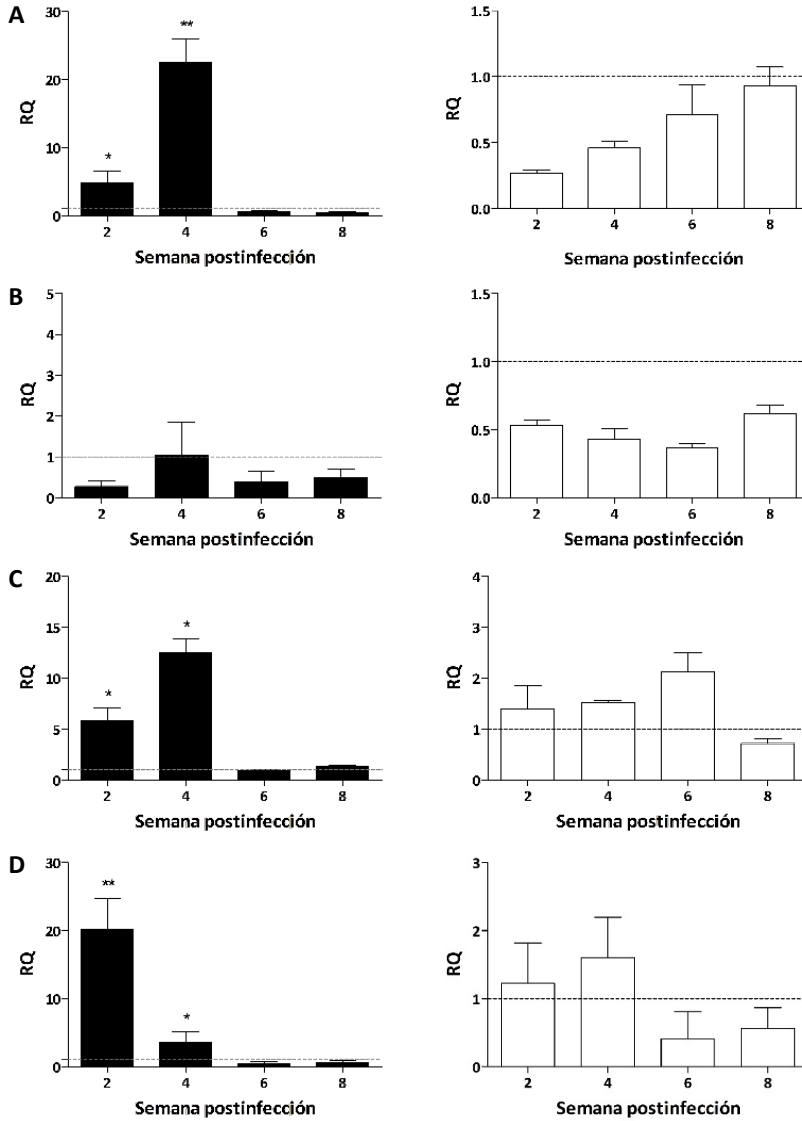
En cuanto a la expresión génica de IL-23, se detectaron cambios significativos a nivel del bazo, las placas de Peyer y el íleon de ratas infectadas, si bien los incrementos fueron menores y más transitorios que en el caso de la IL-17A y el TGF- $\beta$  (Figura 3.3.). En bazo y placas de Peyer se pudo apreciar un aumento progresivo en la expresión del mRNA de esta citoquina hasta las 4 spi, el cual fue seguido de un rápido y acusado descenso. En ambos tejidos los niveles de RQ fueron significativamente superiores a los de los controles solo a las 2 y 4 spi ( $p < 0,05$ ). A nivel intestinal, en cambio, el incremento fue más rápido que en el resto de tejidos analizados, con un máximo de expresión a las 2 spi seguido de un marcado descenso. Los valores de RQ resultaron significativamente superiores a los de los controles en la 2 y la 4 spi ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente).

La expresión de IL-23 en los ratones infectados por *E. caproni* fue similar a la de los animales control durante todo el experimento (Figura 3.3.).

## **3.2. ESTUDIO DEL PAPEL DEL IFN- $\gamma$ EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN RATÓN**

---

El IFN- $\gamma$  es una citoquina proinflamatoria producida principalmente por células *natural killer* y linfocitos T CD4+ activados. Es la citoquina más característica de la subpoblación Th1 de linfocitos T cooperadores y participa en la regulación de respuestas inmunitarias, tanto de naturaleza innata como adaptativa. En el contexto de las infecciones por helmintos intestinales el papel que desempeña el IFN- $\gamma$  es controvertido.



**Figura 3.3.- Expresión de IL-23 en ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*.** Expresión relativa del mRNA de IL-23 en bazo (A), nódulos linfáticos mesentéricos (B), placas de Peyer (C) e intestino (D) de ratas (barras negras) y ratones (barras blancas) en diferentes semanas postinfección (spi) con *E. caproni*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados (0 spi), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

La producción de esta citoquina se asocia habitualmente a las formas severas de la enfermedad, caracterizadas por el establecimiento crónico de la infección y el desarrollo de patología intestinal (Artis *et al.*, 1999; Toledo *et al.*, 2006a; Humphreys *et al.*, 2008). Sin embargo, varios trabajos han puesto de manifiesto que tanto el IFN- $\gamma$  como el enzima iNOS no están necesariamente asociados al aumento de la morbilidad, pudiendo tener incluso efectos beneficiosos para el hospedador (Lawrence *et al.*, 1998; McDermott *et al.*, 2005; Cliffe *et al.*, 2007).

### 3.2.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL

Estudios previos llevados a cabo en el modelo *E. caproni*-roedor pusieron de manifiesto que los perfiles locales de expresión de citoquinas condicionan el curso de la infección y que el desarrollo de fuertes respuestas locales de tipo Th1, con elevados niveles de expresión de IFN- $\gamma$  e inflamación, son determinantes para el desarrollo de infecciones crónicas con elevadas tasas de recuperación de adultos (Trelis *et al.*, 2011). Con el objetivo de esclarecer el papel del IFN- $\gamma$  en el curso de la infección con *E. caproni* se comparó inicialmente el impacto de la infección en dos cepas de ratón diferentes: (I) ratón ICR, definido clásicamente como hospedador de alta compatibilidad para *E. caproni*, y (II) ratón BALB/c, que es una cepa de ratón prototipo de respuesta Th2. En vista de los resultados obtenidos y con la finalidad de confirmar el papel del IFN- $\gamma$  en la progresión de la enfermedad se empleó una tercera cepa: (III) ratón *knock out* deficiente en IFN- $\gamma$ , generado sobre un fondo genético BALB/c.

Para el desarrollo experimental de este estudio se emplearon un total de 35 ratones macho de cada una de las cepas estudiadas, todos ellos de 5 semanas de edad. Un total de 25 animales de cada cepa fueron infectados experimentalmente con 75 metacercarias de *E. caproni*. Estos animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos. El Grupo 1, formado por 10 ratones de cada cepa, se empleó para evaluar la capacidad de supervivencia del hospedador y la evolución del peso corporal de los animales a lo largo de la infección. Asimismo, bisemanalmente se obtuvieron muestras de suero de estos animales para el análisis la respuesta sistémica de anticuerpos en las

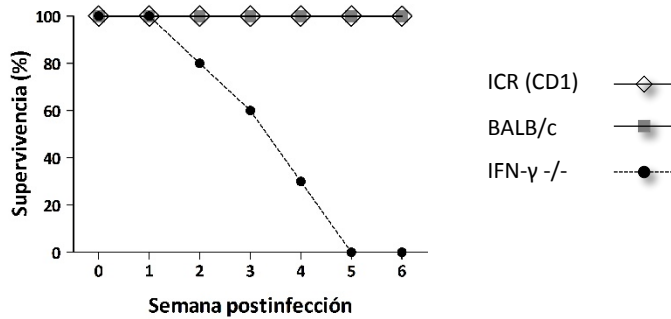
diferentes cepas hospedadoras. Otros 5 ratones de cada cepa se mantuvieron sin infectar y se emplearon como controles para evaluar el incremento de peso semanal en animales sanos. El segundo grupo (Grupo 2) incluyó un total de 15 ratones de cada cepa. Cada 2 semanas, 5 animales de cada cepa fueron sacrificados para obtener muestras de tejidos (bazo, NLM, placas de Peyer e intestino), de las que se extrajo el RNA total para la cuantificación relativa de la expresión de citoquinas y mucinas por RT-PCRrt, y segmentos de intestino para el estudio de los efectos histopatológicos de la infección. Por otra parte, en cada semana postinfección analizada se recontaron los adultos de *E. caproni* alojados en el intestino de cada animal para establecer la tasa de recuperación de adultos en cada cepa hospedadora. Paralelamente, 5 ratones no infectados de cada cepa se utilizaron como controles negativos para los diferentes experimentos realizados con los materiales obtenidos a partir de los animales del Grupo 2.

### 3.2.2. SUPERVIVENCIA DEL HOSPEDADOR

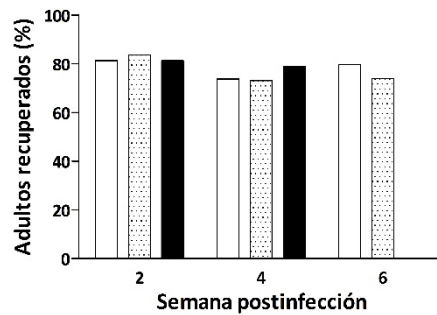
Este estudio se prolongó durante 6 semanas. Durante este tiempo ninguno de los ratones ICR o BALB/c murió como consecuencia de la infección. En cambio, todos los ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  murieron a causa de la infección intestinal antes acabar el experimento. Durante la 2 y la 3 spi murieron dos animales cada semana, ocasionando una reducción semanal del 20% sobre el total de los animales que conformaban inicialmente el grupo experimental. A lo largo de la 4 spi, otros 3 ratones deficientes en IFN- $\gamma$  (30%) murieron también a causa de la infección con *E. caproni*, mientras que los 3 animales restantes (30%) murieron antes del final del experimento, en la 5 spi (Figura 3.4.).

### 3.2.3. PORCENTAJES DE INFECCIÓN

La Figura 3.5. muestra el porcentaje de adultos de *E. caproni* recuperados a partir de los ratones de las cepas ICR, BALB/c e IFN- $\gamma^{-/-}$  durante las 6 semanas que duró el experimento. En los ratones ICR y BALB/c los adultos se recogieron, bisemanalmente, en todas las semanas de estudio y el rango estuvo entre 32 y 50 [39,3 $\pm$ 9,9 (media $\pm$ ds)]



**Figura 3.4.- Supervivencia del hospedador en la infección con *Echinostoma caproni*.** Porcentaje de ratones de cada una de las cepas que sobrevivieron a la infección con *E. caproni* durante las 6 semanas que duró el experimento.



**Figura 3.5.- Tasas de infección con *Echinostoma caproni* en diferentes cepas de ratón.** Porcentaje de adultos recuperados del íleon de ratones ICR (barras blancas), BALB/c (barras punteadas) e IFN-γ<sup>-/-</sup> (barras negras) en diferentes semanas postinfección con *E. caproni*.

y 26-50 (38,1±9,0) vermes por ratón, respectivamente. En los ratones deficientes en IFN-γ los porcentajes de infección solo pudieron ser determinados a las 2 y a las 4 spi, ya que todos los animales murieron antes de las 6 spi. El número de adultos recuperados estuvo en un rango de 37 a 45 (40,2±3,1) adultos por ratón. La aplicación del test estadístico ANOVA de dos factores, fijando el tiempo postinfección y la cepa de ratón como variables independientes, no mostró resultados estadísticamente significativos entre las diferentes semanas postinfección y tampoco entre cepas.



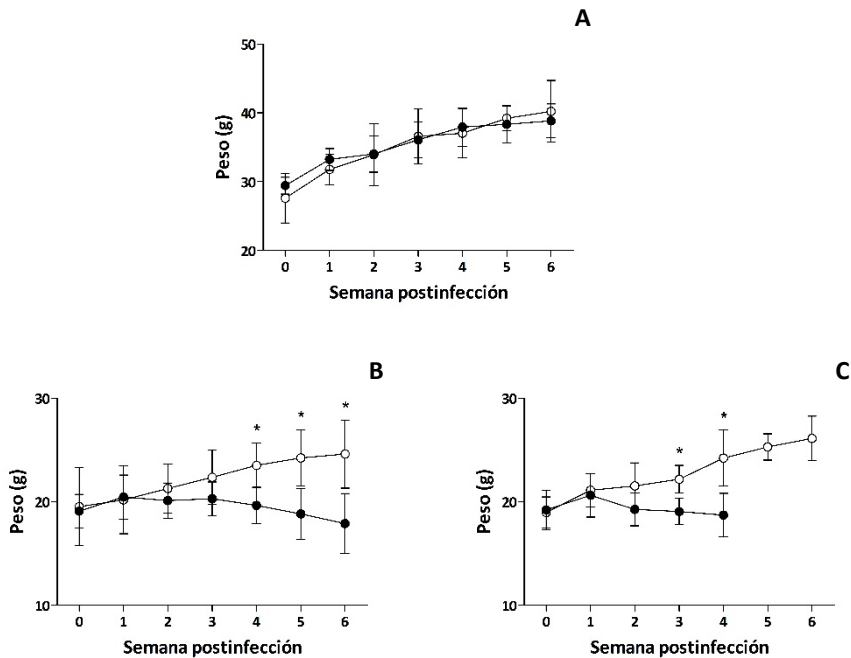
### 3.2.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PATOLOGÍA INTESTINAL Y OTROS SIGNOS CLÍNICOS

Las manifestaciones clínicas y patológicas de la infección con *E. caproni* en las diferentes cepas de ratón estudiadas se describen a continuación.

#### 3.2.4.1. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL A LO LARGO DE LA INFECCIÓN

La evolución del peso corporal de los ratones se evaluó semanalmente y se muestra en la Figura 3.6. Al inicio del experimento, el peso de los ratones ICR estaba en  $28,6 \pm 1,8$  g (media  $\pm$  ds), mientras que para las otras dos cepas el peso fue inferior, lo cual es normal en las cepas con fondo genético BALB/c. El peso medio inicial de los ratones BALB/c e IFN- $\gamma^{-/-}$  fue de  $19,1 \pm 1,6$  y  $19,0 \pm 1,9$  g, respectivamente. Todos los valores coincidieron con el peso normal de los ratones de cada cepa a las 5 semanas de edad, de acuerdo con la información proporcionada por los laboratorios comercializadores (Charles River y The Jackson Laboratory).

Los ratones ICR infectados mostraron un desarrollo normal, no detectándose diferencias significativas en el peso corporal entre los animales infectados y no infectados durante todo el experimento (Figura 3.6. A). En cambio, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas en los ratones BALB/c e IFN- $\gamma^{-/-}$ . Los ratones BALB/c infectados mostraron un incremento de peso similar al de los controles durante las primeras 2 spi. Sin embargo, a partir de la 3 spi se detectó una tendencia decreciente en el peso de los mismos, que se mantuvo hasta el final del experimento. El peso corporal de los ratones infectados decreció desde los  $20,1 \pm 1,7$  g a las 2 spi, hasta los  $17,9 \pm 2,9$  g en la 6 spi con *E. caproni*, mientras que los ratones control incrementaron su peso hasta los  $24,6 \pm 3,3$  g durante este intervalo. El peso medio de los ratones infectados fue significativamente menor que el de los controles a las 4, 5 y 6 spi ( $p < 0,01$ ), fijando la semana postinfección y la condición infectado/no infectado como variables independientes para la aplicación del test estadístico ANOVA de dos factores y el correspondiente análisis *post-hoc* (Figura 3.6. B).



**Figura 3.6.- Evolución del peso corporal en diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.**

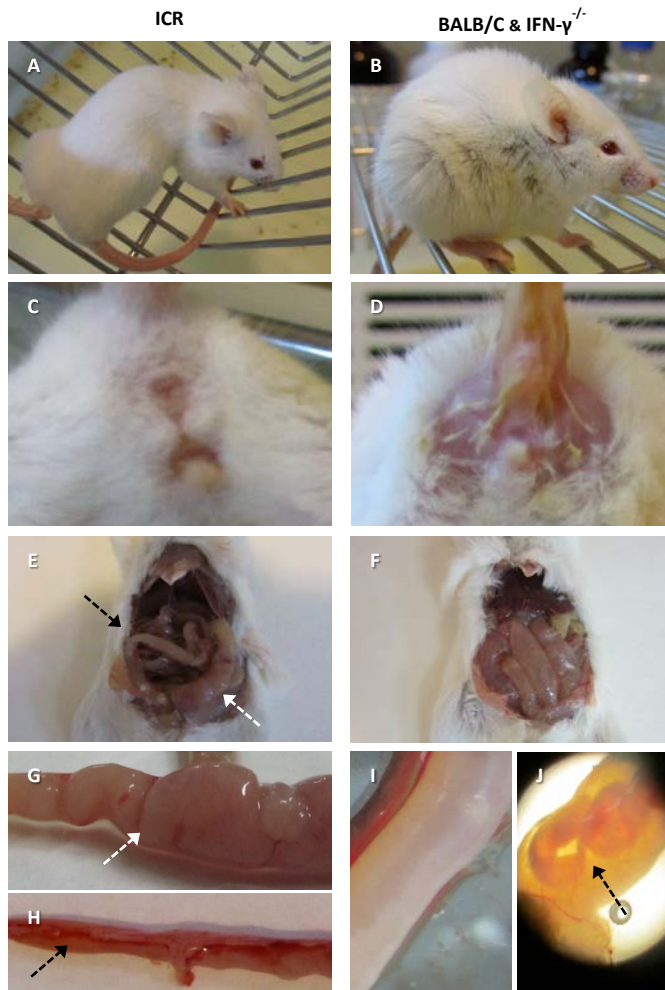
Curvas de crecimiento, en gramos, de ratones ICR (A), BALB/c (B) e IFN- $\gamma^{-/-}$  (C) control (círculos blancos) e infectados con *E. caproni* (círculos negros) a lo largo de la infección. Las barras verticales representan la desviación estándar y los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los animales control e infectados ( $p < 0,01$ ) en la semana postinfección indicada.

La tendencia observada en los ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  fue similar a la descrita para los ratones BALB/c, si bien la pérdida de peso de los animales infectados comenzó con una semana de antelación en los ratones *knock out*. El peso corporal descendió desde los  $21,1 \pm 2,1$  g en la 1 spi hasta los  $18,7 \pm 2,1$  g a las 4 spi. En cambio, los controles no infectados incrementaron su peso hasta los  $24,2 \pm 2,7$  g durante el mismo periodo. El peso medio de los ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  infectados fue significativamente menor que el de los controles a las 3 y 4 spi ( $p < 0,01$ ) tal y como se muestra en la Figura 3.6. (C).

### 3.2.4.2. SIGNOS CLÍNICOS Y OBSERVACIONES PATOLÓGICAS MACROSCÓPICAS

A parte de la pérdida de peso corporal, los ratones BALB/c e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> desarrollaron otros signos clínicos como consecuencia de la infección intestinal. Los ratones BALB/c infectados presentaron alteraciones claras en el pelaje, que se volvió grisáceo, áspero y erizado. Asimismo, mostraron alteraciones gastrointestinales como diarrea y consecuentemente irritación e inflamación de la región perianal a partir de la 2 y 3 spi (Figura 3.7. B y D). Por otra parte, cabe resaltar que los animales parasitados se mostraban irritables, asustados, temblorosos y evasivos, y presentaban en general una actividad física reducida con respecto a los controles no infectados. Estos signos y síntomas se vieron progresivamente agravados a lo largo del curso de la infección. La evolución de los ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados con *E. caproni* fue similar a la descrita para los ratones BALB/c, si bien los signos y síntomas clínicos aparecieron con una semana de antelación en esta cepa, siendo además más acusados. Por el contrario, los ratones ICR infectados con *E. caproni* no presentaron signos de enfermedad a lo largo de todo el experimento (Figura 3.7. A y C).

En el momento de la necropsia, el examen macroscópico del intestino delgado de los ratones ICR mostró marcadas dilataciones de la luz intestinal, las cuales estaban limitadas a aquellas regiones donde se encontraban anclados los adultos de *E. caproni* (Figura 3.7. E, G y H), tal como se había descrito previamente para esta cepa (Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Toledo, 2009a). Los ratones BALB/c e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> también presentaron dilatación del intestino asociada a la presencia de adultos de *E. caproni*. No obstante, en estos casos la dilatación no estuvo limitada a la zona de anclaje de los vermes, sino que se extendía a todo el intestino delgado (figura 3.7. F). Además, los intestinos de estos animales presentaban un aspecto demacrado, con las paredes intestinales extremadamente finas, llegando incluso a ser transparentes en algunos casos, y con la mucosa intestinal destruida casi por completo en algunas zonas (Figura 3.7. I y J).



**Figura 3.7.- Signos clínicos y observaciones patológicas macroscópicas de la infección con *Echinostoma caproni* en diferentes cepas de ratón a las 4 semanas postinfección.** Los ratones BALB/C e  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  desarrollan una patología similar en respuesta a la infección, por lo que se muestran juntos en esta Figura. (A y B) Aspecto físico de los ratones; (C y D) Región perianal de animales infectados, nótese la inflamación e irritación en D; (E y F) Aspecto de la cavidad abdominal; (G y H) Detalles del intestino delgado en ratones ICR. Se aprecian marcadas dilataciones en el lugar de anclaje de los adultos [E (flecha blanca) y G], a diferencia del resto del intestino que conserva un aspecto normal [E (flecha negra) y H]. (I y J) Detalles del intestino delgado en ratones BALB/C e  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ . Se aprecia la dilatación generalizada del intestino y la delgadez de las paredes intestinales (I), que llegan a ser transparentes en algunos casos (J) [adultos de *E. caproni* en la luz intestinal (flecha)].

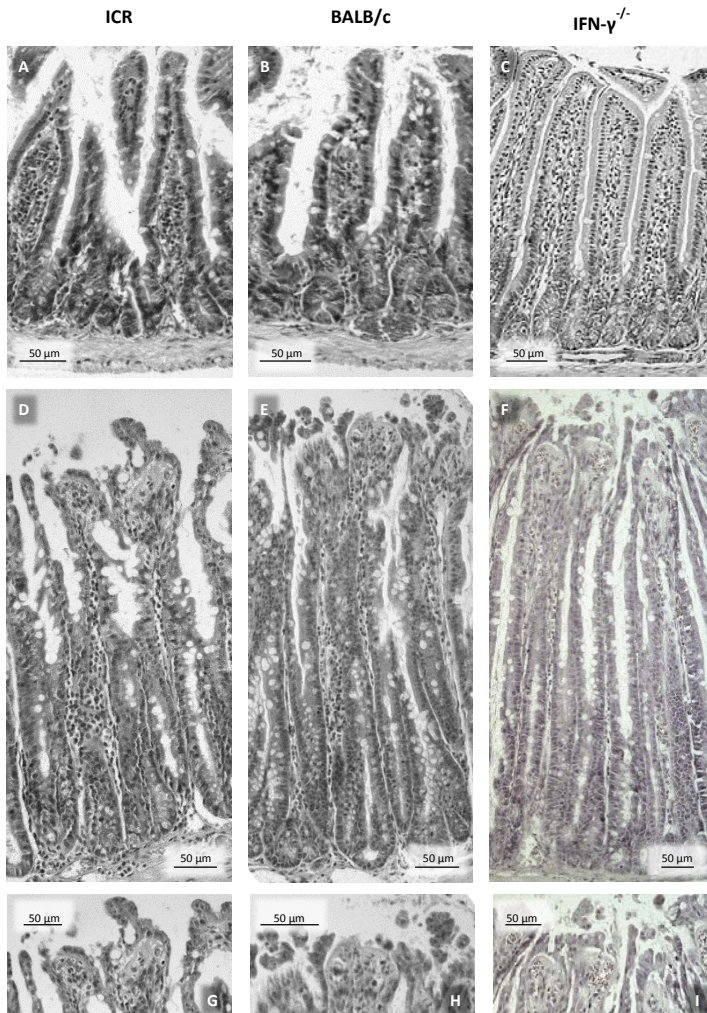
### 3.2.4.3. ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS

En el examen histopatológico los ratones infectados de las tres cepas mostraron erosión de los extremos de las vellosidades y alteraciones en la arquitectura del tejido intestinal, tal y como se aprecia en la Figura 3.8. Cabe destacar que se observaron aumentos significativos tanto en la longitud de las vellosidades intestinales como de las criptas Lieberkühn en el intestino de los ratones ICR y BALB/c infectados con *E. caproni*, con respecto a los animales control ( $p < 0,001$ ) (Figura 3.9.). En cambio, en los ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  la hiperplasia de las criptas ( $p < 0,001$ ) no estuvo asociada a un aumento significativo en la longitud de las vellosidades intestinales respecto de los animales no infectados de la misma cepa. En los tres casos, la relación vellosidad/cripta fue significativamente menor en el intestino de los animales infectados ( $p < 0,001$ ), indicando un predominio en el aumento de la longitud de las criptas en todas las cepas (Figura 3.9.).

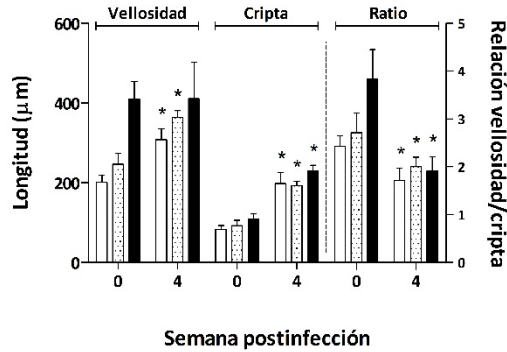
Por otra parte, dado que las células caliciformes y los mastocitos parecen ejercer un papel importante en el control de la patología intestinal ocasionada por las infecciones con *E. caproni* (Toledo *et al.*, 2006a; Toledo, 2009a), se analizaron los recuentos de estas poblaciones celulares en el intestino delgado a lo largo de la infección. El perfil observado fue similar en las tres cepas, el cual se caracterizó por un incremento de ambas poblaciones celulares durante las primeras semanas de infección (Figura 3.10.). En todas las cepas se detectaron cambios significativos en el recuento de estas poblaciones celulares en relación al tiempo postinfección ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, la dinámica fue casi idéntica en los tres casos, no observándose diferencias significativas al aplicar ANOVA de dos factores con la semana postinfección y la cepa como variables independientes.

### 3.2.4.4. EXPRESIÓN GÉNICA DE iNOS EN TEJIDO INTESTINAL

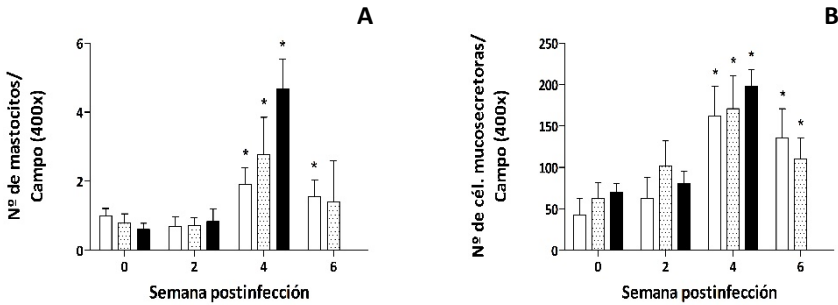
Con el objetivo de obtener mayor información acerca de las respuestas inflamatorias locales inducidas por la infección con *E. caproni*, se analizó la expresión relativa del gen del enzima iNOS a nivel intestinal mediante RT-PCRrt. Los resultados obtenidos en las diferentes cepas de ratón se recogen en la Figura 3.11. Tan solo se



**Figura 3.8.- Histología del intestino delgado en diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Tinción con hematoxilina-eosina de secciones intestinales de diferentes cepas de ratón antes de la infección (A-C) y a las 4 semanas postinfección con *E. caproni* (D-I). Las imágenes G-I muestran en detalle la erosión del extremo de las vellosidades en el intestino de los ratones infectados.

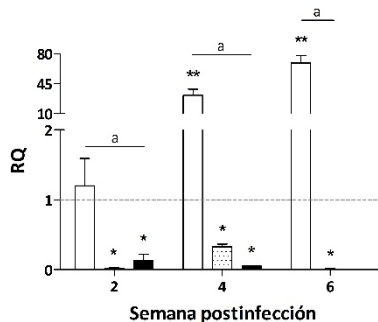


**Figura 3.9.-** Longitud de las vellosidades intestinales y las criptas de Lieberkühn en diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*. Medida y ratio de las vellosidades y criptas intestinales en ratones ICR (barras blancas), BALB/c (barras punteadas) e IFN- $\gamma^{-/-}$  (barras negras) control [0 semanas postinfección (spi)] y a las 4 spi con *E. caproni*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre la longitud a las 0 y 4 spi, para cada cepa hospedadora.



**Figura 3.10.-** Población de mastocitos y células mucosecretoras en el íleon de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*. Recuento de mastocitos (A) y células caliciformes (B) en la mucosa intestinal de ratones ICR (barras blancas), BALB/c (barras punteadas) e IFN- $\gamma^{-/-}$  (barras negras) en diferentes semanas postinfección (spi) con *E. caproni*. Las barras verticales representan la desviación estándar y los asteriscos señalan diferencias significativas con respecto a los controles negativos (0 spi) para cada cepa ( $p < 0,01$ ).

detectaron incrementos en la expresión del mRNA de iNOS en el intestino de los ratones ICR infectados experimentalmente. En este hospedador se observó un marcado incremento en la expresión del enzima a partir de la 4 spi, alcanzándose el máximo en la



**Figura 3.11.- Expresión intestinal de iNOS en diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Expresión relativa del mRNA del enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en el íleon de ratones ICR (barras blancas), BALB/c (barras punteadas) e IFN- $\gamma^{-/-}$  (barras negras) en diferentes semanas postinfección (spi) con *E. caproni*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados (0 spi), representada mediante la línea discontinua. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi, para cada cepa hospedadora (\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,0001$ ). Las barras horizontales señalan diferencias significativas entre cepas en cada semana postinfección (a:  $p < 0,0001$ ).

última semana del experimento (6 spi). Los niveles de expresión relativa fueron significativamente superiores a los de los controles a partir de la 4 spi ( $p < 0,0001$ ). Por el contrario, en los ratones BALB/c e IFN- $\gamma^{-/-}$  la expresión de iNOS resultó regulada a la baja tras la infección con *E. caproni*, con valores significativamente inferiores a los de los controles en todas las semanas analizadas ( $p < 0,001$ ). La aplicación del test ANOVA de dos factores, con la semana postinfección y la cepa hospedadora como variables independientes, puso de manifiesto que la expresión de iNOS es significativamente mayor en los ratones ICR que en las otras cepas en todas las semanas estudiadas ( $p < 0,0001$ ).

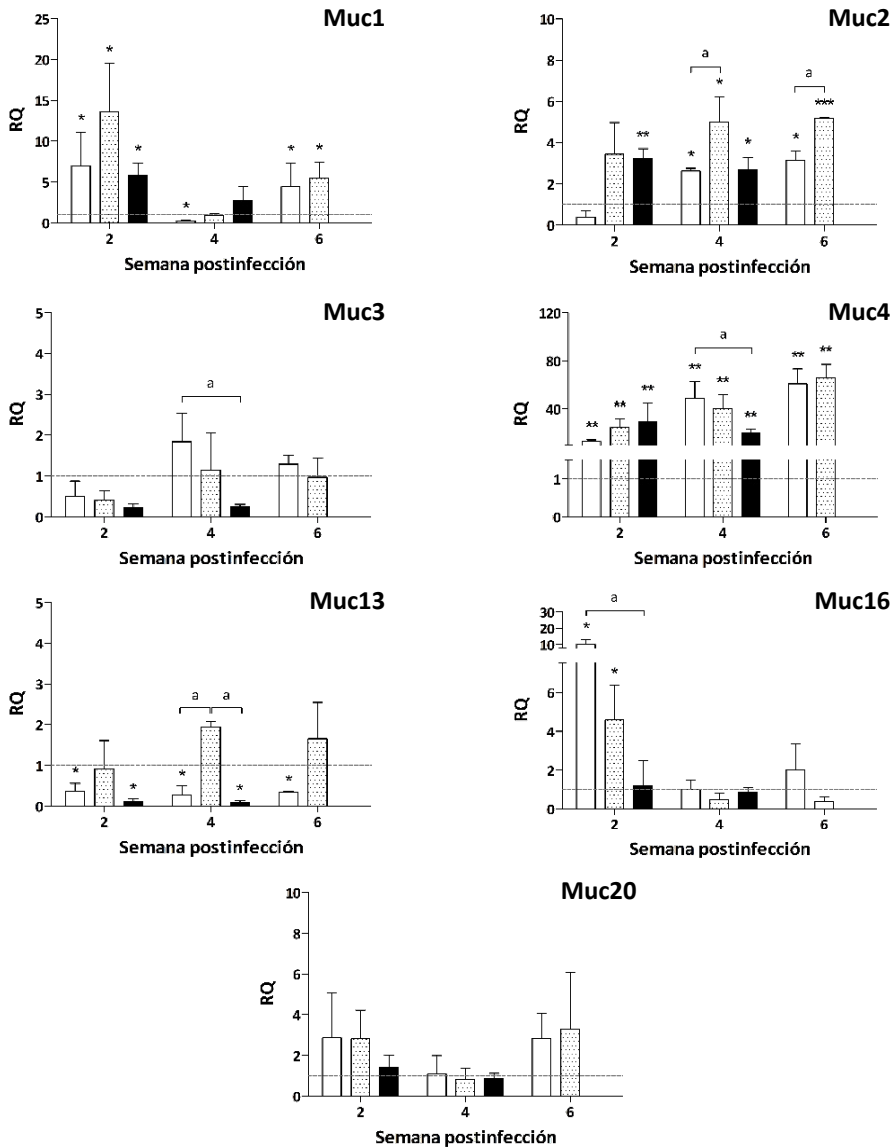
### 3.2.4.5. EXPRESIÓN GÉNICA DE MUCINAS A NIVEL INTESTINAL

Las mucinas expresadas a nivel de la mucosa intestinal ejercen un papel protector, tanto de carácter mecánico como frente a patógenos, sobre el epitelio subyacente. Con la finalidad de conocer el papel de estas glicoproteínas en el curso de la infección crónica con *E. caproni* y su relación con la patología intestinal asociada a la



infección, se analizaron los cambios inducidos en su expresión a nivel del íleon de las diferentes cepas de ratón estudiadas. Mediante RT-PCR se evaluaron los niveles de expresión relativa del gen de la mucina soluble Muc2, principal componente macromolecular del moco intestinal, y de las mucinas transmembrana Muc1, Muc3, Muc4, Muc13, Muc15, Muc16 y Muc20, expresadas en la superficie apical de los enterocitos, formando parte del glicocálix de estas células. El perfil de expresión génica de mucinas fue muy similar en los ratones infectados de las tres cepas (Figura 3.12.). La aplicación del test ANOVA de dos factores, fijando la semana postinfección y la cepa hospedadora como variables independientes, puso de manifiesto la existencia de cambios en la expresión relativa de varias de las mucinas analizadas, mientras que las diferencias entre hospedadores distintos fueron escasas y puntuales.

Los cambios más destacados con relación al tiempo postinfección consistieron en aumentos en la expresión de Muc2 y, más intensamente, de Muc4 en todas las cepas hospedadoras (Figura 3.12.). La expresión del gen que codifica para la mucina soluble Muc2 resultó significativamente aumentado en el intestino de los ratones deficientes en IFN- $\gamma$  a las 2 y a las 4 spi ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente). En los ratones ICR y BALB/c, la expresión relativa de este gen aumentó de forma progresiva a lo largo de la infección, con valores que estuvieron significativamente por encima de los de los controles a las 4 y a las 6 spi en ambos casos ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, cabe resaltar que la sobreexpresión de este gen en el íleon de los ratones BALB/c fue significativamente mayor que en los ratones de la cepa ICR tanto a las 4 como a las 6 spi ( $p < 0,05$ ). En cuanto a la expresión relativa del mRNA de Muc4 se detectaron fuertes incrementos en todas las cepas desde el inicio de la infección. Los valores de RQ fueron significativamente superiores a los de los controles de cada cepa durante todas las semanas de estudio ( $p < 0,01$ ). En los ratones ICR y BALB/c los niveles de expresión se incrementaron de forma acusada al principio de la infección y siguieron aumentando, aunque más lentamente, en las semanas posteriores. En los ratones *knock out* la expresión a las 4 spi fue ligeramente inferior que en la semana 2 postinfección (pi) detectándose para este tiempo postinfección (4 spi) diferencias estadísticamente significativas entre esta cepa y los ratones ICR ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.12.- Expresión de mucinas en el íleon de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Expresión relativa del mRNA de mucinas solubles (Muc2) y transmembrana (Muc1, Muc3, Muc4, Muc13, Muc16 y Muc20) en el intestino delgado de ratones ICR (barras blancas), BALB/c (barras punteadas) e IFN- $\gamma^{-/-}$  (barras negras) en diferentes semanas postinfección (spi) con *E. caproni*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los correspondientes controles no infectados (0 spi), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a 0 spi para cada cepa (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Los segmentos horizontales señalan diferencias significativas entre las cepas indicadas en la misma semana postinfección (a:  $p < 0,05$ ).

Además de las alteraciones en la expresión de Muc2 y Muc4, se observaron también cambios puntuales en la expresión relativa de otras mucinas como consecuencia de la infección con *E. caproni*. Para una misma semana postinfección, se detectaron diferencias entre cepas en los niveles de expresión de Muc3, Muc13 y Muc16 (Figura 3.12.). Los niveles de Muc3 no fueron significativamente diferentes de los de los controles no infectados en ninguna de las cepas estudiadas. Sin embargo, se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de esta mucina entre los ratones ICR e IFN- $\gamma^{-/-}$  en la 4 spi ( $p < 0,05$ ). En el caso de Muc13 los valores de RQ fueron significativamente inferiores a los de los controles en todas las semanas postinfección analizadas en las cepas ICR y *knock out* ( $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los animales infectados de la cepa BALB/c respecto de los controles, si bien los niveles de expresión relativa en estos ratones fueron significativamente superiores a los de los animales infectados de las otras dos cepas en la 4 spi ( $p < 0,05$ ). En cuanto a la expresión del mRNA de Muc16 se observó un incremento transitorio, aunque estadísticamente significativo, en la 2 spi en los ratones ICR y BALB/c ( $p < 0,05$ ). En este tiempo postinfección los valores de RQ obtenidos para los ratones ICR fueron significativamente superiores que los de los animales *knock out* ( $p < 0,05$ ).

Finalmente, la expresión del gen que codifica para Muc1 mostró incrementos significativos en su expresión a las 2 spi en las tres cepas ( $p < 0,05$ ) y a las 6 spi en el caso de los ratones ICR y BALB/c ( $p < 0,05$ ). No se detectaron diferencias entre cepas en los niveles de expresión de esta mucina, como tampoco en el caso de Muc20, cuya expresión no resultó significativamente alterada como consecuencia de la infección en ninguna cepa hospedadora (Figura 3.12.). En el caso de Muc15 no se detectó producto de PCR amplificado si bien la expresión de esta mucina en el intestino delgado había sido previamente descrita (Linden *et al.*, 2008).

### **3.2.5. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS**

La respuesta inmunitaria generada frente a la infección con *E. caproni* resulta fundamental para la evolución de la infección. Por ello, con la finalidad de caracterizar el tipo de respuesta que se produce en cada cepa hospedadora y su posible trascendencia en las manifestaciones de la infección en cada caso, además de los aspectos descritos hasta el momento, se analizaron también varios parámetros inmunológicos como la respuesta sistémica de anticuerpos y los perfiles de expresión génica de numerosas citoquinas.

#### **3.2.5.1. RESPUESTA SISTÉMICA DE ANTICUERPOS**

El papel de los anticuerpos sistémicos en la respuesta frente a la infección crónica con *E. caproni* es escaso. Estudios previos pusieron de manifiesto que en el hospedador de alta compatibilidad el desarrollo de fuertes respuestas de anticuerpos, tanto locales como sistémicos, no resultan en la eliminación de los parásitos de la luz intestinal (Sotillo *et al.*, 2007). A pesar de ello, el análisis de la respuesta humoral sistémica contribuye a la caracterización de la respuesta inmunitaria generada por el hospedador frente a la infección. Los niveles sanguíneos de diferentes isotipos, clases y subclases de inmunoglobulinas se evaluaron, mediante ELISA indirecto, en el suero de los animales del Grupo 1, antes y después de la infección experimental. Las diluciones óptimas de suero y los diferentes conjugados empleados se determinaron mediante una serie de pruebas previas y se indican en la Tabla 3.1. Del mismo modo que para la determinación de la expresión génica de iNOS y mucinas, el experimento se extendió hasta las 6 spi en los ratones de las cepas ICR y BALB/c, mientras que en los ratones deficientes en IFN- $\gamma$  solo se pudo disponer de muestras a las 2 y 4 spi. En líneas generales, cabe destacar que para la mayoría de las inmunoglobulinas estudiadas la cinética de anticuerpos fue similar en las tres cepas de ratón. La significancia estadística de los cambios observados en cada cepa hospedadora se analizó aplicando el test *t* de Student, con el tiempo postinfección como variable independiente. Los resultados obtenidos en cada cepa hospedadora se describen a continuación.

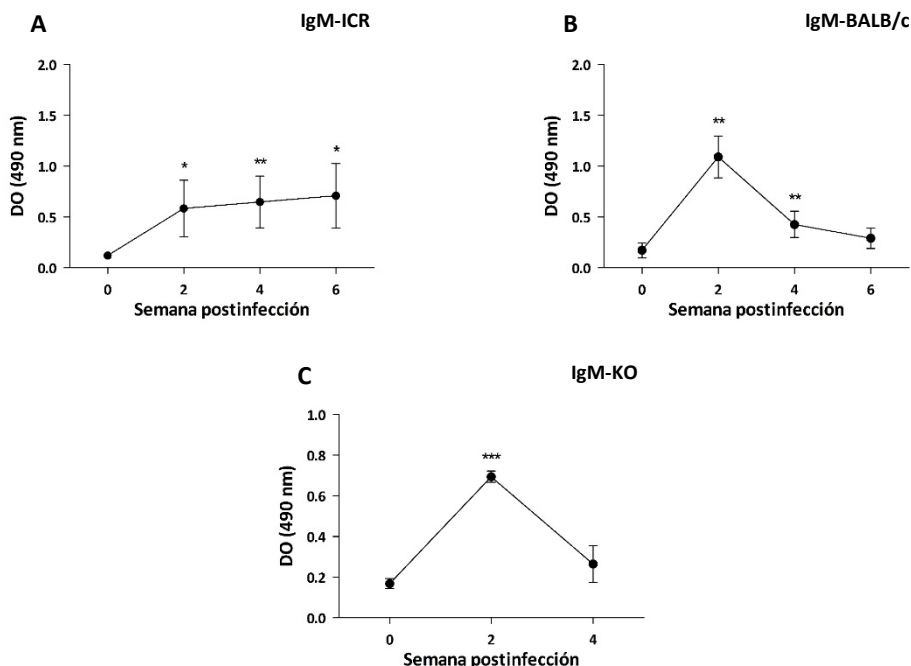
**Tabla 3.1.-** Diluciones utilizadas en ELISA indirecto: suero de ratón frente a antígeno de *Echinostoma caproni*

	Suero	Conjugado Suero
<b>IgM</b>		
ICR	1/800	1/2.000
BALB/c	1/800	1/2.000
IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>	1/800	1/2.000
<b>IgA</b>		
ICR	1/400	1/15000
BALB/c	1/400	1/20.000
IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>	1/400	1/20.000
<b>IgG total</b>		
ICR	1/200	1/4.000
BALB/c	1/200	1/4.000
IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>	1/200	1/4.000
<b>IgG1</b>		
ICR	1/200	1/4.000
BALB/c	1/200	1/1.000
IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>	1/200	1/1.000
<b>IgG2a</b>		
ICR	1/100	1/3.000
BALB/c	1/400	1/3.000
IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>	1/400	1/3.000
<b>IgG3</b>		
ICR	1/100	1/2.000
BALB/c	1/400	1/2.000
IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>	1/400	1/2.000

**Tabla 3.1.-** Diluciones de suero y de los diferentes anticuerpos secundarios empleadas en ELISA indirecto para el estudio de la cinética de anticuerpos generada frente a la infección por *Echinostoma caproni* en diferentes cepas de ratón (ICR, BALB/c e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>).

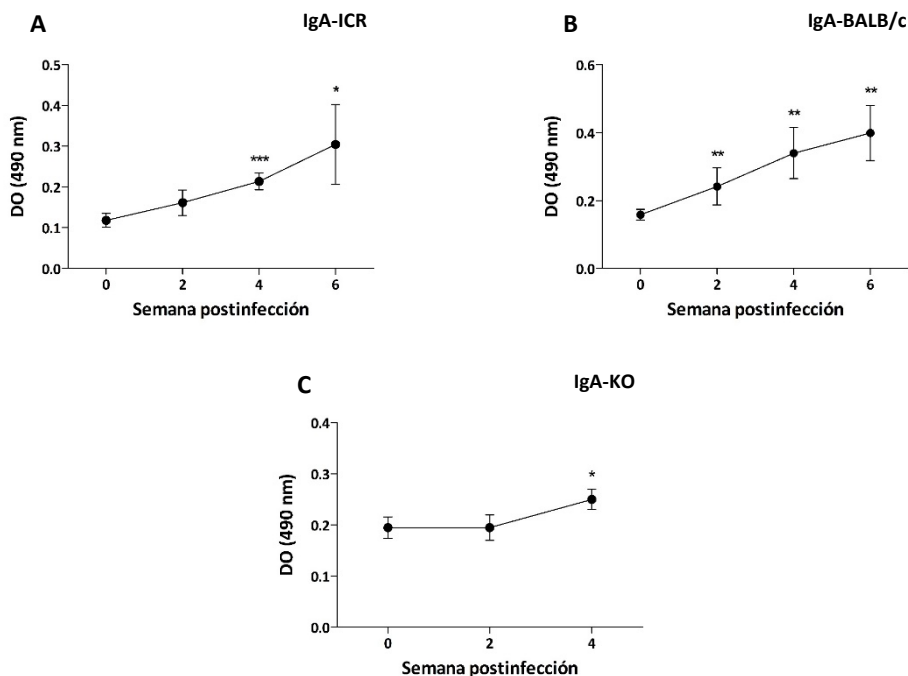
**Inmunoglobulina M:** Los ratones infectados de las tres cepas mostraron aumentos rápidos en la producción de IgM específica tras la infección, con incrementos significativos desde la 2 spi. No obstante, la cinética de esta inmunoglobulina fue un tanto diferente entre las distintas cepas (Figura 3.13.). En los ratones ICR infectados los niveles de IgM aumentaron rápidamente en las primeras semanas postinfección y se mantuvieron relativamente estables hasta el final del experimento, a las 6 spi. Los valores estuvieron en un rango de 0,35 a 1,26 [0,64±0,27 (media±ds)] y fueron significativamente superiores a los de los controles en todas las semanas de estudio ( $p<0,05$ ) (Figura 3.13. A). En los ratones BALB/c e IFN- $\gamma^{-/-}$ , sin embargo, el aumento en los niveles de IgM sérica fue mucho más acusado tras 2 spi, cuando se alcanzaron los valores máximos, los cuales descendieron a continuación de forma pronunciada (Figura 3.13. B y C). En los animales de la cepa BALB/c los niveles permanecieron significativamente superiores a los niveles previos a la infección en las semanas 2 y 4 pi ( $p<0,01$ ), con valores que estuvieron en un rango entre 0,21 y 1,48 (0,64±0,39). En los ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  los niveles cayeron hasta valores próximos a los valores iniciales a las 4 spi. En esta cepa, los niveles de IgM específica solo fueron superiores a los de 0 spi en la semana 2 pi ( $p<0,001$ ), con valores que oscilaron en un rango de 0,65 a 0,70 (0,69±0,03).

**Inmunoglobulina A:** La cinética de IgA sérica fue similar en los ratones ICR y BALB/c, con niveles ascendentes desde el inicio de la infección, hasta alcanzar el máximo al final del experimento (Figura 3.14. A y B). En los ratones ICR los valores de IgA específica en suero estuvieron en el rango de 0,11 a 0,49 (0,22±0,08) y fueron significativamente superiores a los valores previos a la infección a las 4 y 6 spi ( $p<0,001$  y  $p<0,05$ , respectivamente). En los ratones BALB/c la cinética fue la misma, si bien los valores fueron superiores a los de 0 spi desde la semana 2 pi hasta el final del experimento ( $p<0,01$ ), manteniéndose en un rango entre 0,17 y 0,49 (0,32±0,09). Por el contrario, en los ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  el aumento en los niveles de IgA fue muy ligero, siendo estadísticamente significativo solo en la 4 spi ( $p<0,05$ ) (Figura 3.14. C).



**Figura 3.13.-** Cinética de inmunoglobulina M en el suero de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*. Detección de IgM sérica frente al antígeno de excreción/secreción de *E. caproni* en ratones ICR (A), BALB/c (B) e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> (C) infectados experimentalmente. Las barras verticales representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los valores a las 0 semanas postinfección, antes de la inoculación de las metacercarias (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001).

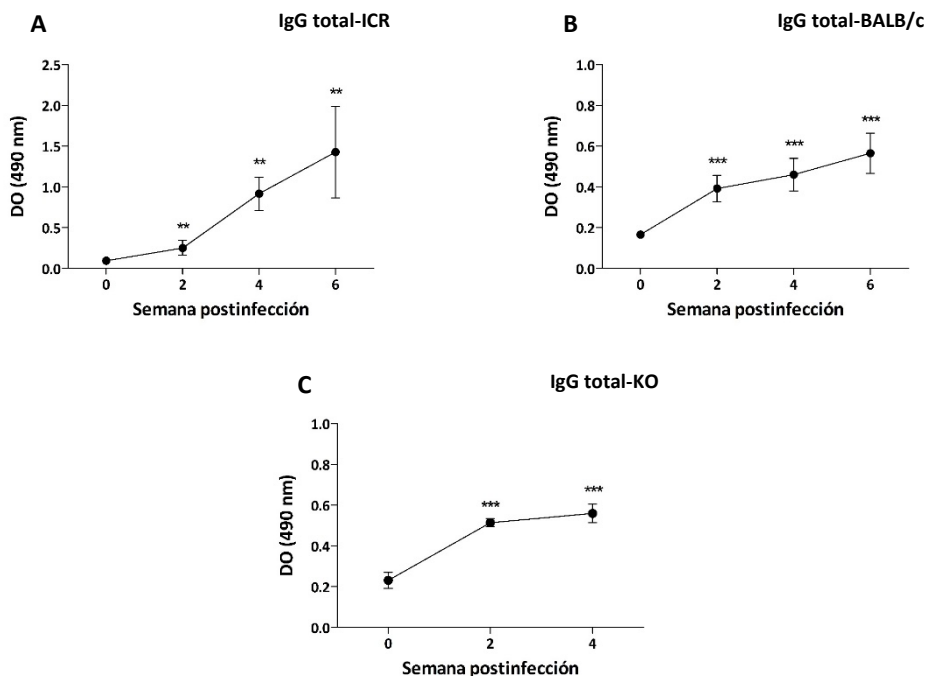
**Inmunoglobulina G total:** Los niveles de IgG total aumentaron progresivamente tras la infección hasta alcanzar el máximo en la última semana postinfección en las tres cepas estudiadas (Figura 3.15.). En los ratones ICR, este aumento fue ligero en las primeras semanas postinfección. Sin embargo, a partir de las 2 spi y hasta las 6 spi los valores aumentaron de forma pronunciada (Figura 3.15. A). Los niveles de IgG total en esta cepa fueron significativamente superiores a los niveles previos a la infección en todas las semanas de estudio ( $p$ <0,01), manteniéndose en un rango entre 0,16 y 1,41 ( $0,84\pm 0,57$ ). En los animales BALB/c los niveles máximos de IgG total se alcanzaron también en la 6 spi. Asimismo, la cinética de esta inmunoglobulina mostró un aumento acusado en las



**Figura 3.14.- Cinética de inmunoglobulina A en el suero de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Detección de IgA sérica frente al antígeno de excreción/secreción de *E. caproni* en ratones ICR (A), BALB/c (B) e IFN- $\gamma^{-/-}$  (C) infectados experimentalmente. Las barras verticales representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los valores a las 0 semanas postinfección, antes de la inoculación de las metacercarias (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

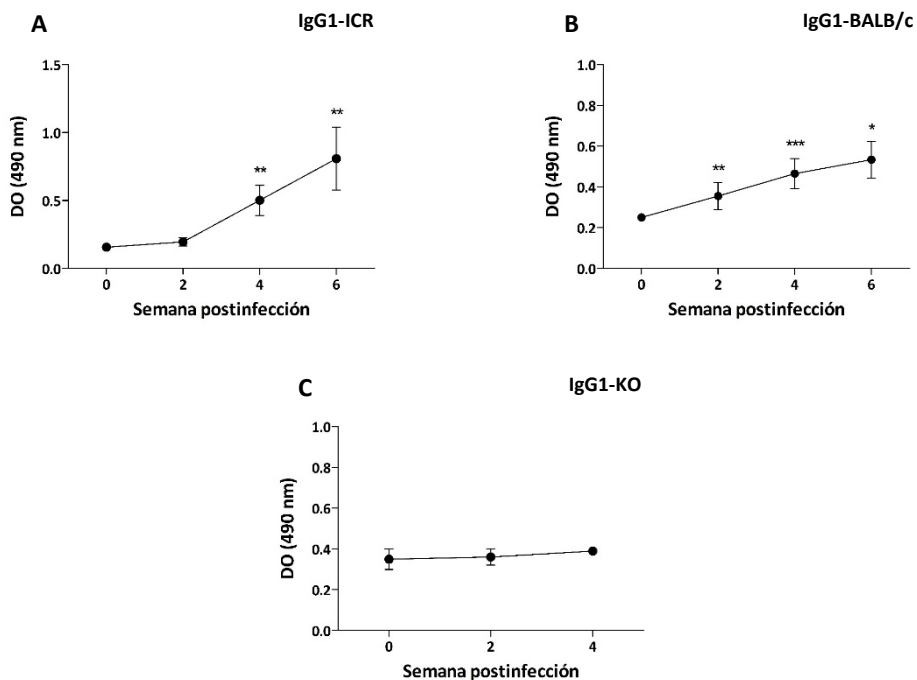
primeras 2 spi, con valores que aumentaron de forma más moderada en las semanas posteriores, si bien los niveles fueron inferiores a los detectados en la cepa ICR en todos los tiempos postinfección analizados (Figura 3.15. B). Los valores de DO estuvieron por encima de los iniciales, previos a la infección, en todas las semanas analizadas ( $p < 0,001$ ) y se mantuvieron en un rango que iba de 0,30 a 0,69 ( $0,46 \pm 0,10$ ). Finalmente, los ratones *knock out* para IFN- $\gamma$  mostraron un aumento rápido en la producción de IgG total específica a las 2 spi, que continuó hasta las 4 spi aunque de manera menos acusada (Figura 3.15. C). Los valores fueron significativamente superiores a los de los controles en los dos tiempos postinfección analizados ( $p < 0,001$ ) y se mantuvieron en un rango entre 0,42 y 0,58 ( $0,50 \pm 0,07$ ).





**Figura 3.15.-** Cinética de inmunoglobulina G total en el suero de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*. Detección de IgG total sérica frente al antígeno de excreción/secreción de *E. caproni* en ratones ICR (A), BALB/c (B) e IFN- $\gamma^{-/-}$  (C) infectados experimentalmente. Las barras verticales representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los valores a las 0 semanas postinfección, antes de la inoculación de las metacercarias (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

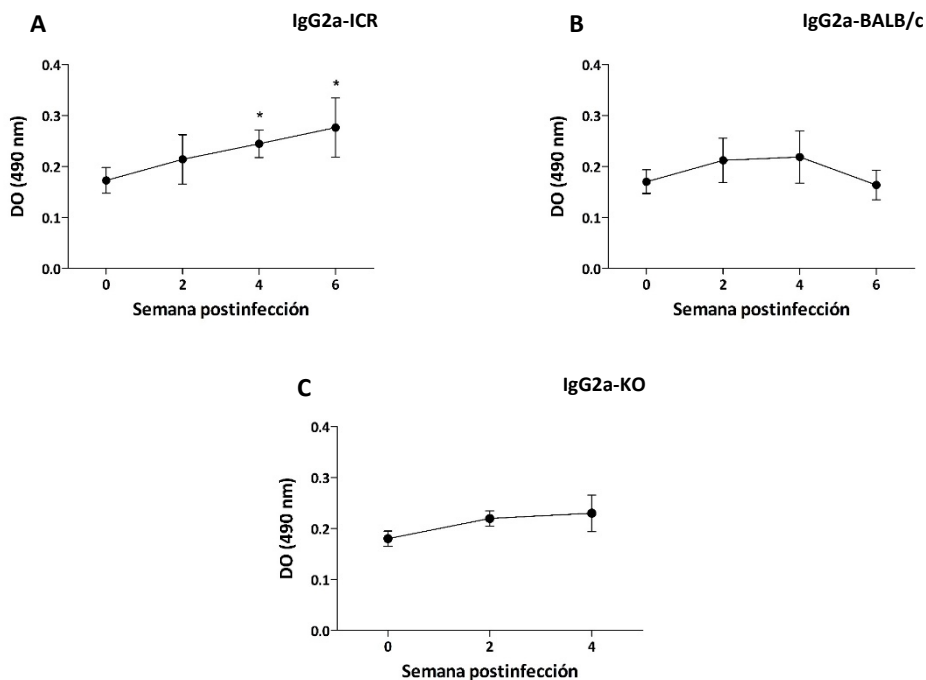
**Inmunoglobulina G1:** La cinética de IgG1 fue muy similar a la descrita anteriormente para la IgG total en los ratones ICR y BALB/c. En ambos casos los valores aumentaron progresivamente hasta alcanzar el máximo a las 6 spi (Figura 3.16. A y B). En los ratones ICR, los niveles alcanzados fueron mayores que en la cepa BALB/c, encontrándose en un rango entre 0,15 y 0,95 ( $0,41 \pm 0,29$ ) y siendo significativamente superiores a los valores previos a la infección a las 4 y 6 spi ( $p < 0,01$ ). Los ratones BALB/c presentaron niveles significativamente superiores a los de los controles en todas las semanas postinfección analizadas ( $p < 0,05$ ), con valores de DO en el rango de 0,29 a 0,64 ( $0,44 \pm 0,10$ ). Por el contrario, no se detectó respuesta de IgG1 específica en los ratones



**Figura 3.16.- Cinética de inmunoglobulina G1 en el suero de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Detección de IgG1 sérica frente al antígeno de excreción/secreción de *E. caproni* en ratones ICR (A), BALB/c (B) e IFN- $\gamma^{-/-}$  (C) infectados experimentalmente. Las barras verticales representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los valores a las 0 semanas postinfección, antes de la inoculación de las metacercarias (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

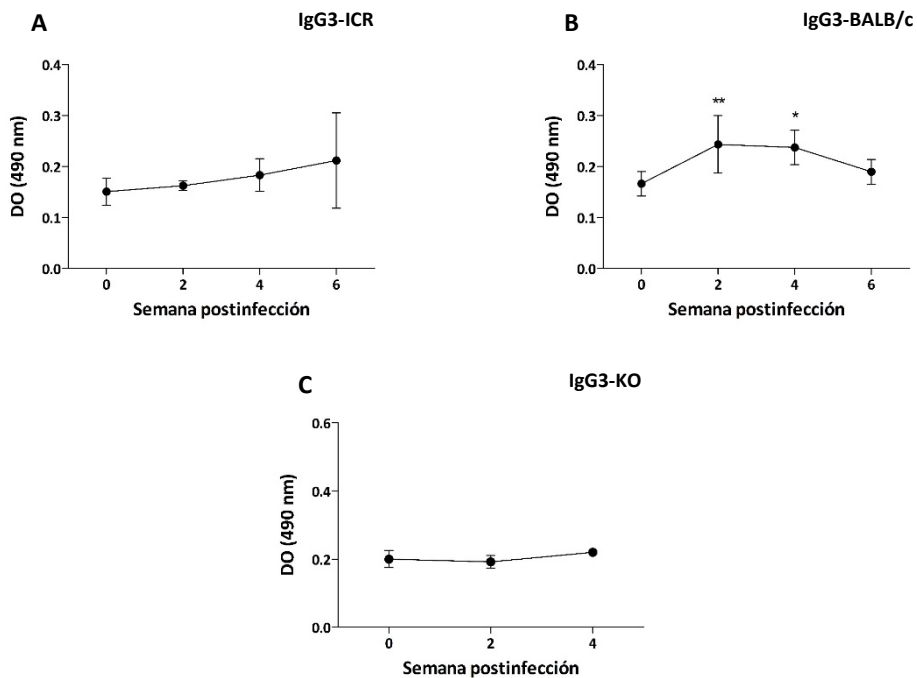
IFN- $\gamma^{-/-}$  tras la infección, permaneciendo los niveles de esta clase de IgG similares a los iniciales (0 spi) durante todo el experimento (Figura 3.16. C).

**Inmunoglobulina G2a:** Los resultados para la IgG2a se recogen en la Figura 3.17. En los ratones ICR infectados con *E. caproni* se detectaron aumentos ligeros, aunque estadísticamente significativos, únicamente a las 4 y 6 spi ( $p < 0,05$ ). El máximo se alcanzó a las 6 spi y los valores para esta inmunoglobulina en los animales parasitados estuvieron en el rango de 0,15 a 0,35 ( $0,23 \pm 0,05$ ). Los ratones BALB/c e IFN- $\gamma^{-/-}$  no mostraron cambios significativos en los niveles de IgG2a durante todo el experimento.



**Figura 3.17.- Cinética de inmunoglobulina G2a en el suero de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Detección de IgG2a sérica al antígeno de excreción/secretión de *E. caproni* en ratones ICR (A), BALB/c (B) e IFN- $\gamma^{-/-}$  (C) infectados experimentalmente. Las barras verticales representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los valores a las 0 semanas postinfección, antes de la inoculación de las metacercarias (\* $p < 0,05$ ).

**Inmunoglobulina G3:** No se detectaron aumentos significativos en los niveles séricos de IgG3 en los ratones ICR ni IFN- $\gamma^{-/-}$  en ninguna de las semanas postinfección analizadas (Figura 3.18. A y C). Los animales de la cepa BALB/c mostraron aumentos muy ligeros, aunque significativos ( $p < 0,05$ ), a las 2 y a las 4 spi con *E. caproni* (Figura 3.18. B). Los valores en los animales infectados estuvieron en un rango entre 0,16 y 0,36 ( $0,23 \pm 0,05$ ).



**Figura 3.18.- Cinética de inmunoglobulina G3 en el suero de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Detección de IgG3 sérica frente al antígeno de excreción/secreción de *E. caproni* en ratones ICR (A), BALB/c (B) e IFN- $\gamma^{-/-}$  (C) infectados experimentalmente. Las barras verticales representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los valores a las 0 semanas postinfección, antes de la inoculación de las metacercarias (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

### 3.2.5.2. CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS

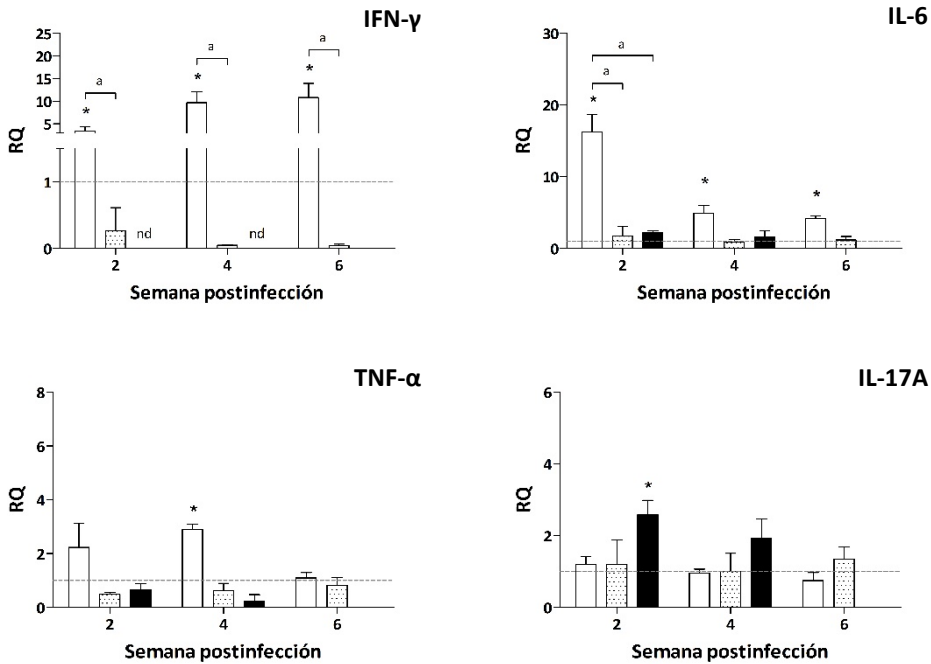
Con el objetivo de profundizar en la caracterización del tipo de respuesta inmunitaria generada frente a la infección con *E. caproni* en cada una de las cepas de ratón estudiadas, se analizaron los perfiles de expresión génica de varias citoquinas en distintos tejidos inmunoactivos (bazo, NLM, placas de Peyer e intestino). Los resultados obtenidos se describen en los siguientes apartados. No obstante, cabe resaltar que no se detectó expresión del mRNA del gen que codifica para el IFN- $\gamma$  en ninguno de los tejidos pertenecientes a los ratones *knock out* (IFN- $\gamma^{-/-}$ ).

### **a) Expresión Relativa de Citoquinas en Bazo**

Las alteraciones inducidas por la infección en la expresión de citoquinas a nivel del bazo de los ratones parasitados fueron escasas en las tres cepas, detectándose únicamente diferencias estadísticas en la expresión relativa de los genes de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, los cuales estuvieron sobreexpresados en los ratones de la cepa ICR, y del gen que codifica para la IL-17A, el cual mostró un aumento ligero y transitorio de su expresión en los ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> en la 2 spi ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.19.). Los niveles de expresión para IFN- $\gamma$  e IL-6 fueron significativamente superiores a los de los controles en todas las semanas del experimento ( $p < 0,05$ ), mientras que en el caso del TNF- $\alpha$  solo se observaron diferencias significativas en la 4 spi ( $p < 0,05$ ). Asimismo, la aplicación del test estadístico ANOVA de dos factores, con la semana postinfección y la cepa hospedadora como variables independientes, puso de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa de estos genes entre las distintas cepas. Los valores de RQ para IFN- $\gamma$  fueron significativamente superiores en los ratones ICR que en la cepa BALB/c en todas las semanas analizadas ( $p < 0,05$ ). Asimismo, los niveles de expresión relativa del gen de la IL-6 resultaron significativamente más elevados en los ratones ICR que en las otras cepas en la semana 2 pi ( $p < 0,05$ ). El resto de citoquinas analizadas no mostraron diferencias significativas en su expresión relativa en respuesta a la infección con *E. caproni*, ni en relación al tiempo postinfección como tampoco entre las diferentes cepas hospedadoras (Figura 3.20.).

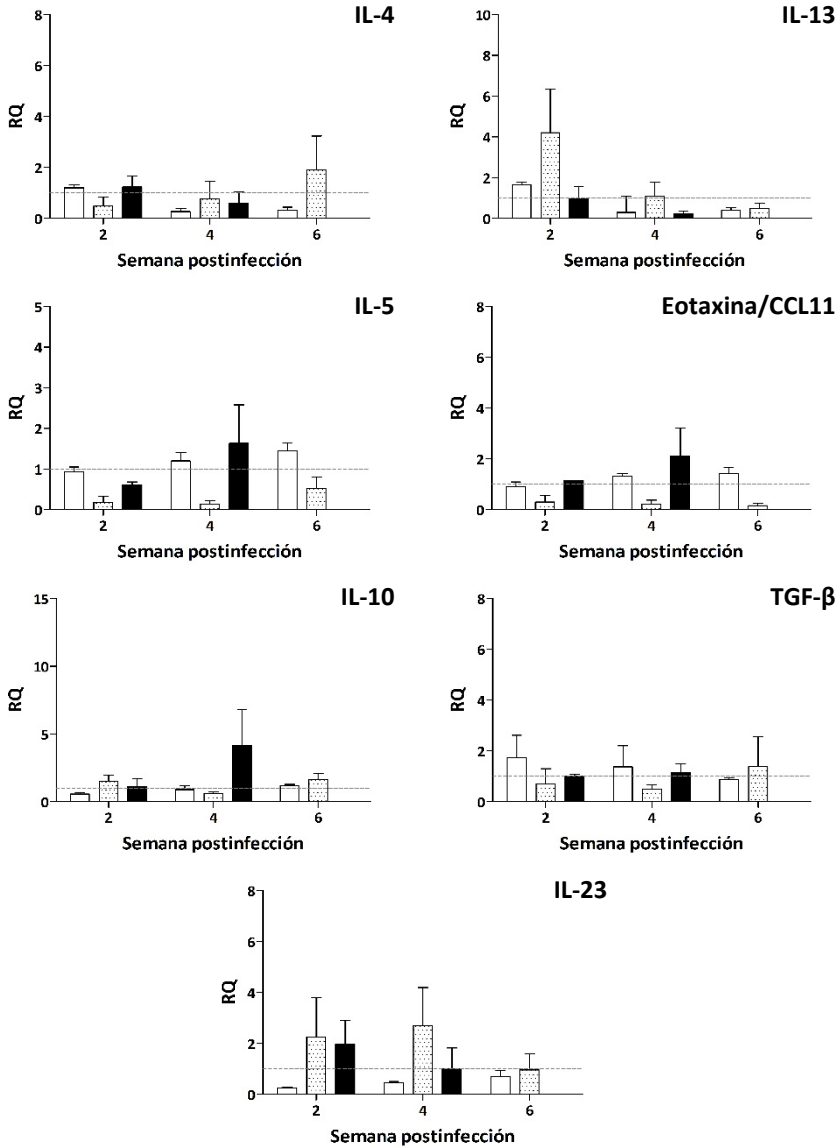
### **b) Expresión Relativa de Citoquinas en Nódulos Linfáticos Mesentéricos**

A nivel de los NLM se detectaron diferencias en la expresión génica de varias de las citoquinas analizadas, tanto en relación al tiempo postinfección como entre cepas. Se detectaron incrementos significativos en la expresión del mRNA de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-5 y eotaxina/CCL11 en los ratones ICR infectados (Figura 3.21.). Los niveles de RQ para eotaxina/CCL11 fueron significativamente superiores tanto a los de los controles no infectados como a los de las otras dos cepas estudiadas ( $p < 0,05$ ), mientras que para IFN- $\gamma$  solo se detectaron niveles superiores a los de 0 spi en las semanas 2 y 4 pi ( $p < 0,05$ ). En

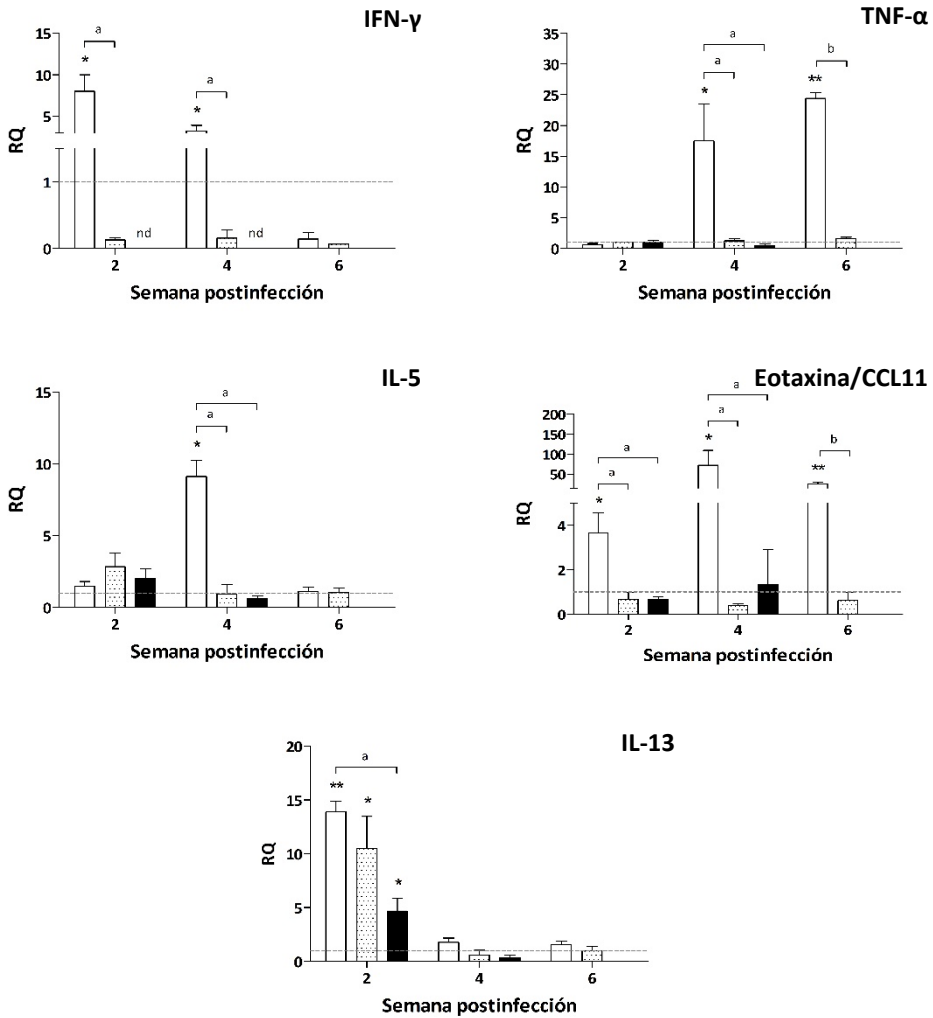


**Figura 3.19.- Citoquinas con expresión diferencial en el bazo de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que se detectaron diferencias estadísticamente significativas, en relación al tiempo postinfección y/o entre cepas, a nivel del bazo de los hospedadores infectados: ratones ICR (barras blancas), ratones BALB/c (barras punteadas) y ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> (barras negras). Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados [0 semanas postinfección (spi)], representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi (\* $p < 0,05$ ). Los segmentos horizontales señalan diferencias estadísticamente significativas, entre las cepas indicadas, para la semana postinfección correspondiente (a:  $p < 0,05$ ). nd: producto de PCR no detectado.

ambos tiempos postinfección los valores fueron significativamente más elevados que los registrados en los animales de la cepa BALB/c ( $p < 0,05$ ). En el caso del TNF- $\alpha$ , los valores de RQ fueron significativamente superiores a los detectados en animales no infectados en la 4 y 6 spi ( $p < 0,05$ ), mientras que para la IL-5 solo se observaron diferencias significativas en la semana 4 pi. Para la IL-5 y el TNF-  $\alpha$  tan solo se detectaron diferencias puntuales



**Figura 3.20.- Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en el bazo de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, en relación al tiempo postinfección y/o entre cepas, a nivel del bazo de los hospedadores infectados: ratones ICR (barras blancas), ratones BALB/c (barras punteadas) y ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  (barras negras). Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados, representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar.



**Figura 3.21.-** Citoquinas con expresión diferencial en los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*. Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que se detectaron diferencias estadísticamente significativas, en relación al tiempo postinfección y/o entre cepas, a nivel de los NLM de los hospedadores infectados: ratones ICR (barras blancas), ratones BALB/c (barras punteadas) y ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  (barras negras). Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados [0 semanas postinfección (spi)], representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01). Los segmentos horizontales señalan diferencias estadísticamente significativas entre las cepas indicadas para la semana postinfección correspondiente (a:  $p$ <0,05; b:  $p$ <0,01). nd: producto de PCR no detectado.

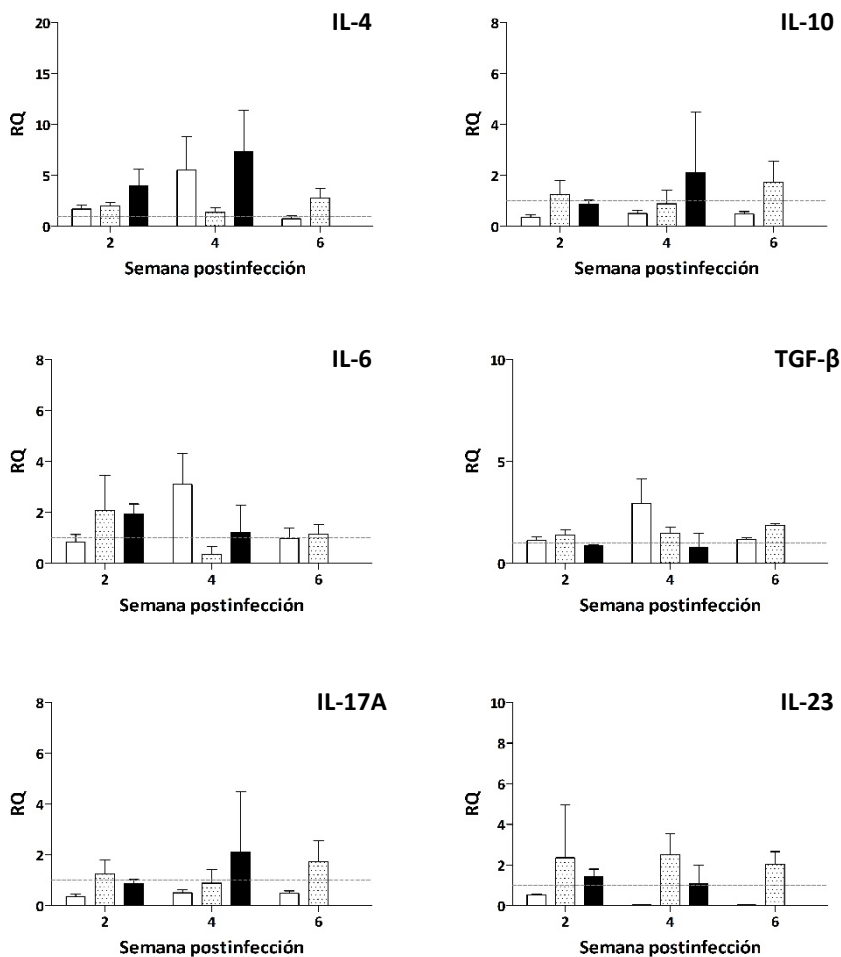


entre cepas a las 4 y a las 4 y las 6 spi, respectivamente ( $p < 0,05$ ), siendo en ambos casos mayor la expresión en los ratones de la cepa ICR. Finalmente, en todas las cepas analizadas se detectó un aumento puntual en la expresión del mRNA de la IL-13 en la 2 spi ( $p < 0,05$ ), si bien los niveles de RQ detectados en los ratones ICR fueron significativamente superiores a los de los animales deficientes en IFN- $\gamma$  en este tiempo postinfección ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.21.). Los resultados obtenidos para el resto de citoquinas, que no mostraron diferencias significativas en su expresión génica como consecuencia de la infección, se recogen en la Figura 3.22.

### ***c) Expresión Relativa de Citoquinas en Placas de Peyer***

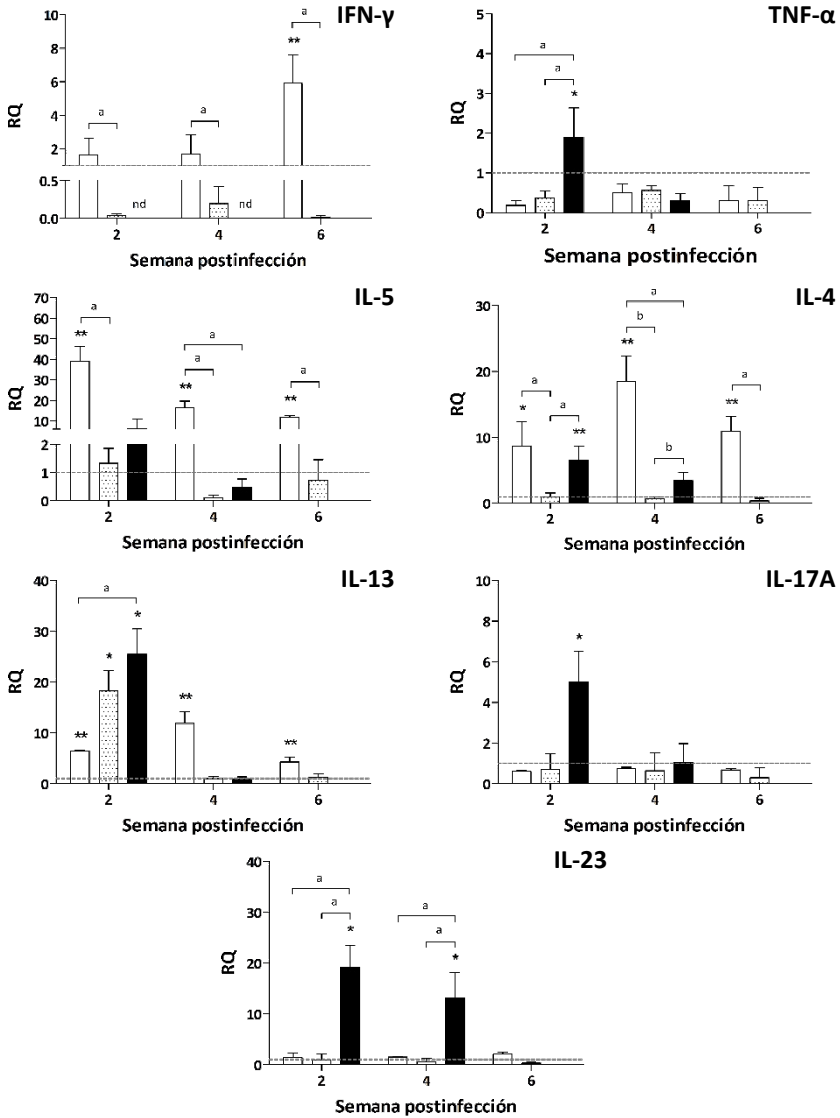
Los perfiles de expresión génica a nivel de las placas de Peyer pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas, tanto entre cepas como con relación al tiempo postinfección, para la mayoría de las citoquinas estudiadas (Figura 3.23.). Los resultados correspondientes a las citoquinas cuya expresión génica no se vio modificada como consecuencia de la infección en este tejido se muestran en la Figura 3.24.

Los ratones ICR infectados mostraron aumentos significativos en la expresión relativa de los genes que codifican para IL-4 e IL-5 en todas las semanas de estudio ( $p < 0,05$ ). Los niveles de expresión relativa para estas citoquinas fueron significativamente superiores a los detectados en los ratones de la cepa BALB/c en todas las semanas postinfección analizadas ( $p < 0,05$ ) y en ambos casos estuvieron significativamente por encima de los valores detectados en los animales IFN- $\gamma^{-/-}$  en la semana 4 pi ( $p < 0,05$ ). Asimismo, en el caso de los ratones deficientes en IFN- $\gamma$  se detectaron incrementos estadísticamente significativos en la expresión del mRNA de IL-4 solo en la 2 spi, si bien los niveles de RQ en esta cepas fueron significativamente superiores a los detectados en los animales BALB/c en cada semana analizada ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.23.). La expresión de IFN- $\gamma$  estuvo significativamente por encima de la de los controles en los ratones ICR a las 6 spi ( $p < 0,001$ ), aunque los niveles de RQ en esta cepa fueron superiores a los detectados en los ratones BALB/c en todas las semanas del experimento ( $p < 0,005$ ).

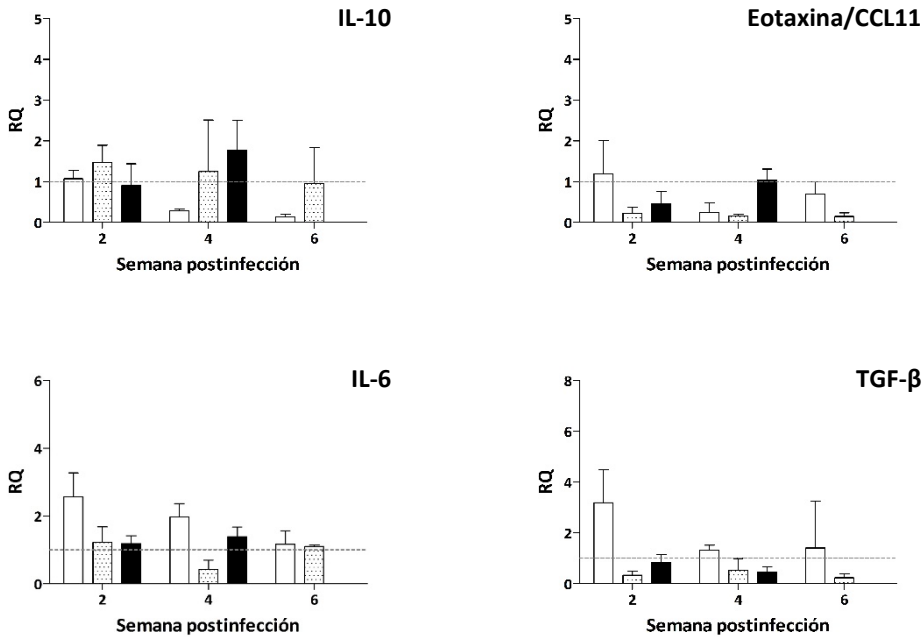


**Figura 3.22.- Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, en relación al tiempo postinfección y/o entre cepas, a nivel de los NLM de los hospedadores infectados: ratones ICR (barras blancas), ratones BALB/c (barras punteadas) y ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  (barras negras). Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados, representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar.

Por otra parte, los ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  mostraron incrementos significativos en la expresión relativa de los genes que codifican para TNF- $\alpha$  e IL-17A a las 2 spi y para IL-23 a



**Figura 3.23.- Citoquinas con expresión diferencial en las placas de Peyer de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que se detectaron diferencias estadísticamente significativas, en relación al tiempo postinfección y/o entre cepas, a nivel de las placas de Peyer de los hospedadores infectados: ratones ICR (barras blancas), ratones BALB/c (barras punteadas) y ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  (barras negras). Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados [0 semanas postinfección (spi)], representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Los segmentos horizontales señalan diferencias estadísticamente significativas entre las cepas indicadas para la semana postinfección correspondiente (a:  $p < 0,05$ ). nd: producto de PCR no detectado.



**Figura 3.24.- Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en las placas de Peyer de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, en relación al tiempo postinfección y/o entre cepas, a nivel de las placas de Peyer de los hospedadores infectados: ratones ICR (barras blancas), ratones BALB/c (barras punteadas) y ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  (barras negras). Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados, representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar.

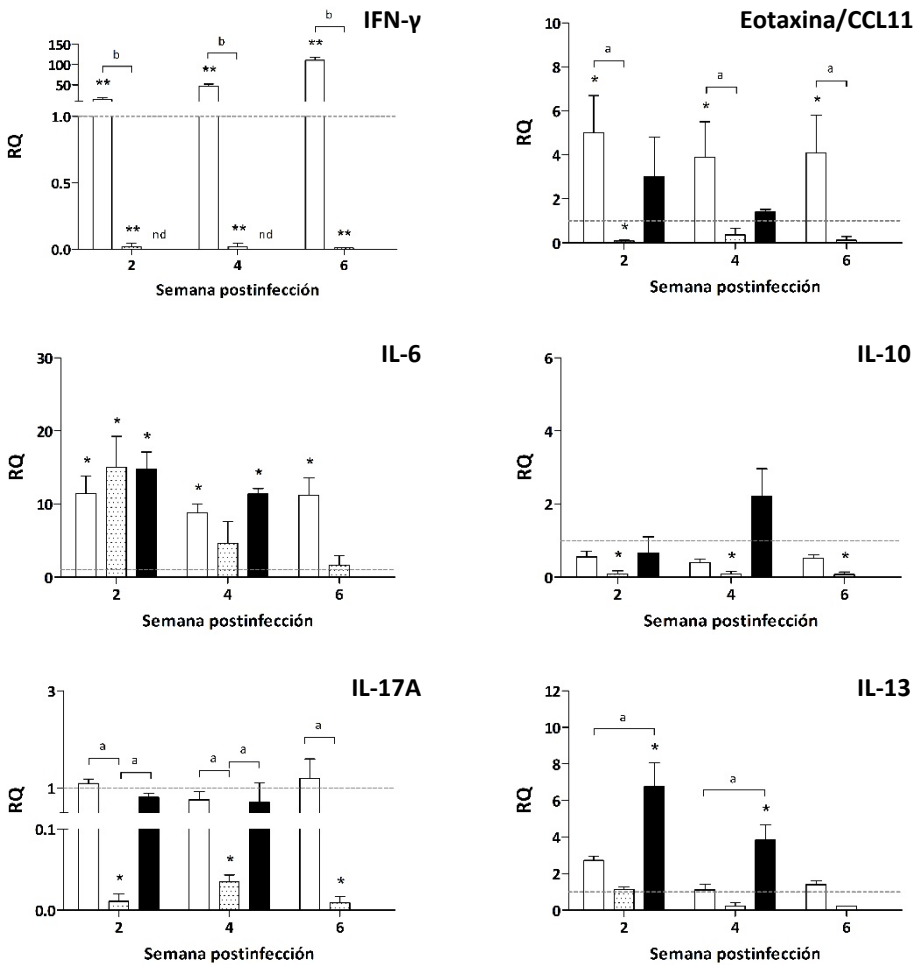
las 2 y a las 4 spi ( $p < 0,05$ ). Los niveles de expresión para la IL-23 resultaron significativamente más elevados que los detectados en ratones ICR y BALB/c en cada semana analizada, mientras que para el TNF- $\alpha$  solo se detectaron diferencias significativas entre cepas en la 2 spi ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.23.). Se detectaron también incrementos significativos en la expresión del mRNA de IL-13 en las placas de Peyer de los ratones infectados de todas las cepas. Los valores de RQ fueron significativamente superiores a los de los animales control durante cada semana postinfección analizada en el caso de los ratones ICR ( $p < 0,01$ ). En cambio, en los ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  y BALB/c solo se observaron diferencias estadísticamente significativas a las 2 spi con *E. caproni*, con valores que fueron

significativamente más elevados que los observados en los ratones de la cepa ICR ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.23.).

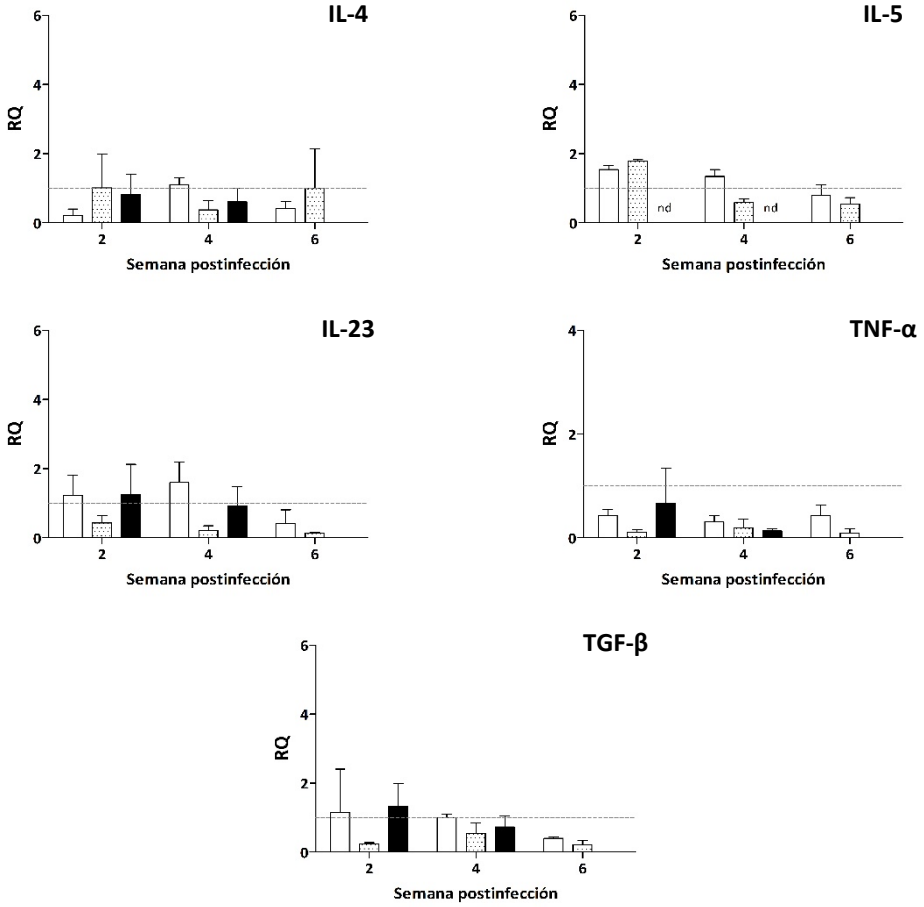
#### **d) Expresión Relativa de Citoquinas en Tejido Intestinal**

La infección con *E. caproni* afectó de manera diferente al perfil de expresión de citoquinas en el íleon de cada cepa hospedadora. La aplicación del test estadístico ANOVA de dos factores puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas tanto en función del tiempo postinfección, como entre las distintas cepas estudiadas. Los perfiles de expresión de las citoquinas que mostraron diferencias estadísticas a nivel intestinal con relación al tiempo postinfección y/o la cepa hospedadora se recogen en la Figura 3.25. Aquellas cuya expresión no resultó alterada como consecuencia de la infección con *E. caproni* se muestran en la Figura 3.26.

En los ratones de la cepa BALB/c, la expresión génica de la mayoría de las citoquinas estudiadas no se vio alterada como consecuencia de la infección con *E. caproni*. Los animales infectados de esta cepa no mostraron una respuesta local de citoquinas clara, detectándose únicamente incrementos significativos en la expresión del gen de IL-6 a las 2 y a las 4 spi ( $p < 0,05$ ). Asimismo, se observaron descensos significativos en la expresión relativa de los genes que codifican para varias citoquinas, tales como IFN- $\gamma$ , eotaxina/CCL11, IL-10 e IL-17A. En el caso de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17A los valores de RQ fueron significativamente inferiores a los de los controles en cada semana de estudio ( $p < 0,05$ ). Además, los niveles de mRNA de IL-17A estuvieron significativamente por debajo de los detectados en los ratones ICR e IFN- $\gamma^{-/-}$  ( $p < 0,01$ ), a pesar de que para este gen no se observaron diferencias respecto de la expresión en los controles no infectados en ninguna de las dos cepas. Para la eotaxina/CCL11, si bien los valores detectados en animales infectados estuvieron siempre por debajo de los de los controles, solo resultaron significativamente menores que estos a las 2 spi ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.25.).



**Figura 3.25.- Citoquinas con expresión diferencial en el intestino de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que se detectaron diferencias estadísticamente significativas, en relación al tiempo postinfección y/o entre cepas, a nivel del intestino de los hospedadores infectados: ratones ICR (barras blancas), ratones BALB/c (barras punteadas) y ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  (barras negras). Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados [0 semanas postinfección (spi)], representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Los segmentos horizontales señalan diferencias estadísticamente significativas entre las cepas indicadas para la semana postinfección correspondiente (a:  $p < 0,01$ ; b:  $p < 0,0001$ ). nd: producto de PCR no detectado.



**Figura 3.26.- Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en el intestino de diferentes cepas de ratón infectadas con *Echinostoma caproni*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, en relación al tiempo postinfección y/o entre cepas, a nivel del intestino de los hospedadores infectados: ratones ICR (barras blancas), ratones BALB/c (barras punteadas) y ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  (barras negras). Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados, representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. nd: producto de PCR no detectado.

Los ratones ICR, por el contrario, desarrollaron una fuerte respuesta local de tipo Th1, caracterizada por un marcado incremento en los niveles de mRNA de IFN- $\gamma$  durante todo el experimento ( $p < 0,01$ ). Los valores de expresión relativa para IFN- $\gamma$  en este

hospedador fueron significativamente superiores a los detectados en los ratones BALB/c en todas las semanas postinfección analizadas ( $p < 0,0001$ ). En estos animales se detectaron también aumentos estadísticamente significativos en la expresión relativa de los genes de IL-6 y eotaxina/CCL11 ( $p < 0,05$ ), si bien fueron menos intensos que los observados para IFN- $\gamma$  (Figura 3.25.). Los niveles de expresión para eotaxina/CCL11 en el intestino de los ratones ICR fueron significativamente más elevados que los registrados en los animales BALB/c en todos los tiempos postinfección analizados ( $p < 0,01$ ).

Por su parte, los ratones deficientes en IFN- $\gamma^{-/-}$  desarrollaron una leve respuesta de tipo Th2 a nivel local, caracterizada por un ligero incremento en la expresión del gen de la IL-13 ( $p < 0,05$ ) en los dos tiempos postinfección analizados en esta cepa. Los niveles de expresión relativa de este gen en el intestino de los ratones *knock out* resultaron significativamente más elevados que en las otras cepas tanto a las 2 como a las 4 *spi* ( $p < 0,01$ ). Además de la IL-13, la infección con *E. caproni* indujo aumentos significativos en la expresión de IL-6 ( $p < 0,05$ ) en el intestino de estos animales (Figura 3.25.).

### **3.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y GLICOSILACIÓN DE MUCINAS A NIVEL INTESTINAL EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *ECHINOSTOMA CAPRONI***

---

Las mucinas son un grupo de proteínas altamente glicosiladas expresadas por las células epiteliales. En función de su estructura y localización se clasifican en dos grandes grupos: las mucinas secretadas, solubles o formadoras de gel, y las mucinas transmembrana, las cuales constituyen el componente principal del moco extracelular y el glicocálix de los enterocitos, respectivamente. En conjunto, ambas estructuras forman una barrera defensiva dinámica, regulada por la inmunidad innata y adaptativa, que ejerce un papel protector sobre el epitelio subyacente, reduciendo el estrés mecánico y limitando la entrada y/o el establecimiento de una amplia variedad de patógenos intestinales (McGuckin *et al.*, 2011).



### 3.3.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL

Los aumentos en la producción y liberación de moco intestinal constituyen un mecanismo común para la expulsión de numerosos helmintos intestinales y están asociados habitualmente al desarrollo de respuestas locales de tipo Th2 (Hasnain *et al.*, 2013). Con la finalidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la expulsión de los helmintos intestinales y, más concretamente, del papel que juegan las mucinas en la regulación de las infecciones por *E. caproni*, nos planteamos investigar los cambios inducidos por la infección en la composición del moco intestinal en hospedadores de alta y baja compatibilidad, en los que la respuesta del hospedador y el curso de la infección son marcadamente diferentes. Para ello se analizó la cinética de expresión del mRNA de un amplio espectro de mucinas a nivel del íleon de ratones y ratas infectados experimentalmente. Los resultados obtenidos se contrastaron con los niveles de producción y secreción de moco en el lugar de infección, evaluados mediante inmunohistoquímica frente a mucinas solubles.

Además de los cambios cuantitativos en la expresión y producción de mucinas, los cambios cualitativos en la composición de las cadenas glucídicas de estas glicoproteínas pueden alterar las propiedades fisicoquímicas del moco intestinal, facilitando la expulsión de los vermes alojados en la luz del intestino (Hasnain *et al.*, 2013). Con el objetivo de caracterizar los cambios inducidos por la infección con *E. caproni* sobre la glicosilación de las mucinas, se analizaron los patrones de marcaje del moco intestinal con diferentes lectinas antes y después de la infección.

Para estos estudios se utilizaron RNA total de íleon y secciones histológicas intestinales de ratones ICR y ratas Wistar control e infectados experimentalmente. Un total de 15 ratones ICR macho de 5 semanas de edad (30-35 g de peso) y 10 ratas macho de 3 semanas de edad (80-100 g de peso) fueron infectados con 75 y 100 metacercarias de *E. caproni*, respectivamente. Otros 5 ratones y ratas se mantuvieron como controles negativos, no infectados. Bisemanalmente, desde el momento de la infección, 5 animales de cada especie fueron sacrificados para obtener los materiales necesarios para cada

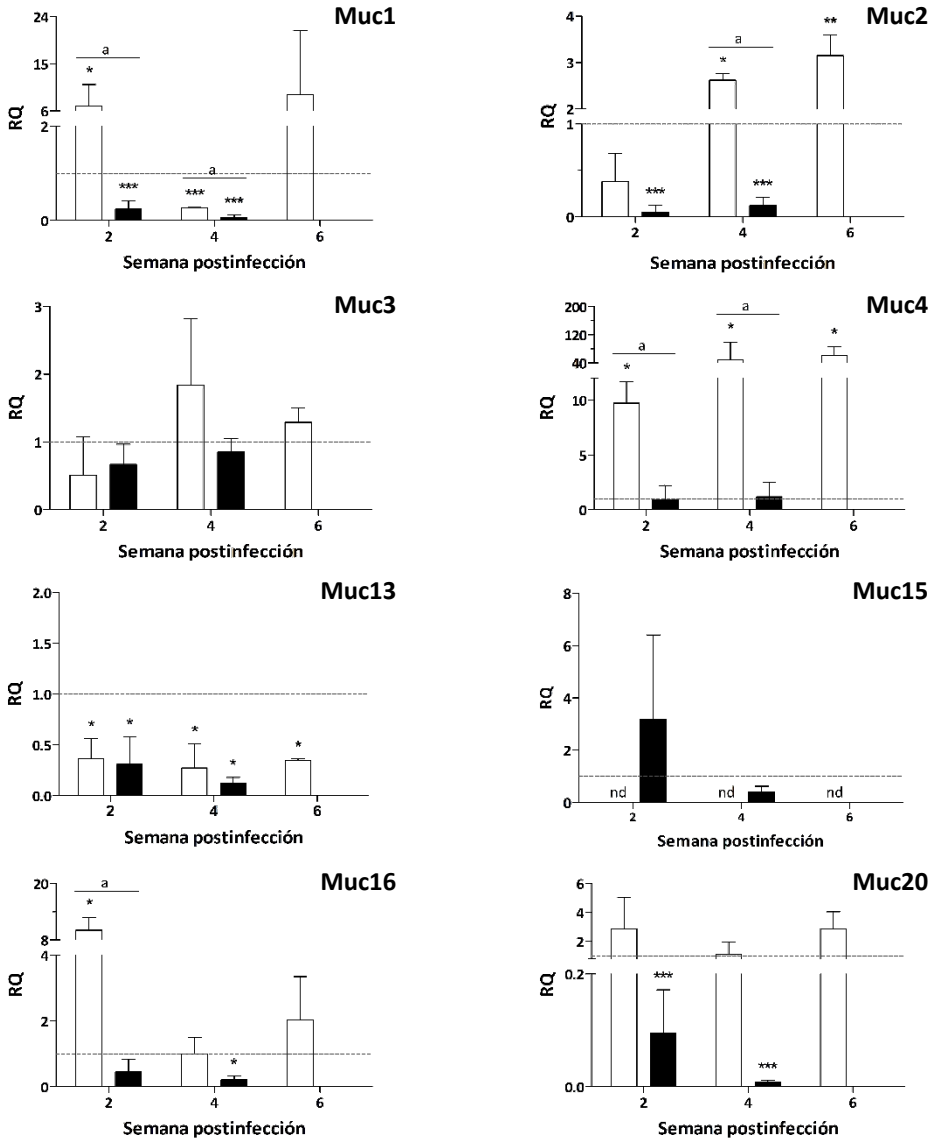
experimento. El punto final se fijó a las 4 spi en el caso de las ratas, pues a partir de este punto comienza la desparasitación natural de este hospedador. En cambio, en ratones el experimento se extendió hasta las 6 spi, ya que en este caso las infecciones se establecen de forma crónica.

### **3.3.2. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE MUCINAS EN EL ÍLEON DE RATÓN Y RATA INFECTADOS CON *ECHINOSTOMA CAPRONI***

Los niveles de expresión relativa de los genes que codifican para la mucina soluble Muc2 y las mucinas transmembrana Muc1, Muc3, Muc4, Muc13, Muc15, Muc16 y Muc20, cuya expresión en el intestino delgado ha sido previamente descrita (Linden *et al.*, 2008), se analizaron mediante RT-PCRrt. Asimismo, se evaluó la expresión del gen de Muc5ac, una mucina soluble que no se expresa de forma constitutiva a nivel intestinal, si bien su expresión *de novo* ha sido asociada a numerosas alteraciones intestinales, entre ellas las infecciones por helmintos intestinales y, más concretamente, a la expulsión de los mismos (Hasnain *et al.*, 2010; 2011b).

#### **3.3.2.1. EXPRESIÓN RELATIVA DE MUCINAS PROPIAS DEL EPITELIO INTESTINAL**

En ratones infectados con *E. caproni* se observaron aumentos progresivos en la expresión del mRNA de Muc2 y Muc4 a lo largo de la infección (Figura 3.27.). La expresión relativa para Muc2 fue significativamente superior a la de los controles a las 4 ( $p < 0,05$ ) y a las 6 ( $p < 0,01$ ) spi, mientras que para Muc4 los niveles de RQ se mantuvieron significativamente por encima de los de los animales no infectados en todas las semanas estudiadas ( $p < 0,05$ ). Además, los incrementos en la expresión de estas mucinas fueron siempre significativamente superiores a los detectados en ratas para la misma semana postinfección ( $p < 0,05$ ). La expresión relativa de los genes de Muc1 y Muc16 mostró perfiles similares, con incrementos estadísticamente significativos a las 2 spi ( $p < 0,05$ ) seguidos de un rápido descenso (Figura 3.27.). A las 4 spi los valores de RQ para Muc16 fueron similares a los valores control (animales no infectados), mientras que los niveles de Muc1 fueron significativamente menores ( $p < 0,001$ ). A las 6 spi, los niveles de expresión



**Figura 3.27.- Expresión de mucinas en el íleon de ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*.** Expresión relativa del mRNA de mucinas solubles (Muc2) y transmembrana (Muc1, Muc3, Muc4, Muc13, Muc15, Muc16 y Muc20) en el intestino delgado de ratones (barras blancas) y ratas (barras negras) en diferentes semanas postinfección (spi) con *E. caproni*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los correspondientes controles no infectados (0 spi), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a 0 spi (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001). Las barras horizontales señalan diferencias significativas entre hospedadores en la misma spi (a:  $p$ <0,05). nd: niveles de expresión no detectados en la spi correspondiente.

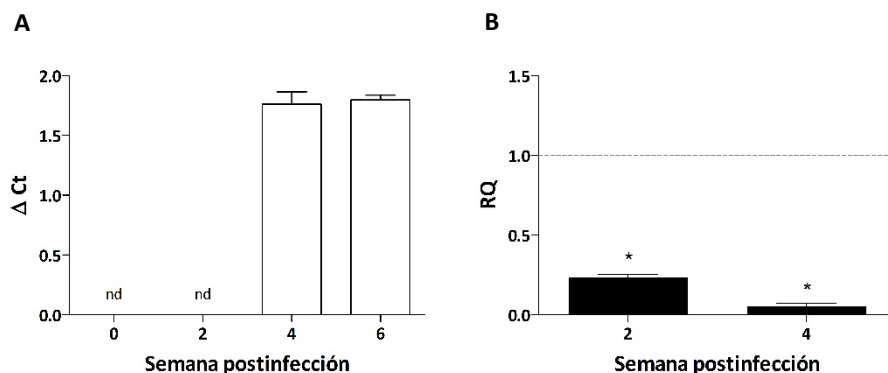
relativa del mRNA de Muc1 y Muc16 permanecieron similares a los detectados en los animales control. Además de los cambios dependientes del tiempo postinfección, la aplicación del test estadístico ANOVA de dos factores, fijando la semana postinfección y el hospedador como variables independientes, reveló diferencias significativas entre especies hospedadoras para estas mucinas. En el caso de Muc1, los niveles de expresión génica fueron significativamente superiores a los detectados en ratas a las 2 y las 4 spi, mientras que para Muc16 únicamente se detectaron diferencias significativas a las 2 spi ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, los niveles de expresión relativa del gen que codifica para Muc13 en el íleon de los ratones infectados fueron significativamente menores que los de los controles en todos los tiempos postinfección analizados ( $p < 0,05$ ) y la expresión de los genes de Muc3 y Muc20 no mostró diferencias significativas respecto de los controles no infectados. Finalmente, cabe señalar que no se detectó expresión del mRNA de Muc15 en íleon de animales infectados ni control, si bien la expresión intestinal de esta mucina había sido descrita previamente.

A diferencia de lo observado en ratón, en el íleon de ratas infectadas con *E. caproni* no se detectó sobreexpresión de ninguna de las mucinas analizadas (Figura 3.27.). Por el contrario, se pudo observar una regulación a la baja de la mayoría de los genes de mucinas estudiados. La expresión de Muc3, Muc4 y Muc15 se mantuvo similar a la de los controles no infectados durante todo el experimento. Sin embargo, del resto de genes de mucinas analizados (Muc1, Muc2, Muc13 y Muc20) mostraron un descenso significativo en su expresión relativa a partir de la 2 spi con *E. caproni* ( $p < 0,001$ ). En el caso de Muc16, sin embargo, la expresión solo fue significativamente menor que la de los controles a las 4 spi ( $p < 0,05$ ).

### **3.3.2.2. EXPRESIÓN RELATIVA DE MUC5AC**

Si bien Muc5ac es una mucina formadora de gel que no se expresa en el intestino en condiciones normales, estudiamos la expresión intestinal de esta glicoproteína porque ha sido asociada a la expulsión de algunos helmintos intestinales (Hasnain *et al.*, 2010; 2011b). Cabe señalar que no se detectó mRNA de Muc5ac en íleon de ratones control ni a

las 2 spi con *E. caproni*. Sin embargo, en este hospedador, se pudo apreciar la acumulación del producto de PCR a las 4 y 6 spi (Figura 3.28. A). Puesto que la expresión del gen de Muc5ac no fue detectada en el intestino de ratón antes de la infección, la cuantificación relativa de la expresión génica mediante la aplicación del método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  no se pudo llevar a cabo en este hospedador (véase Capítulo II, Apartado 2.2.3.). En este caso los resultados se presentan en términos de  $\Delta Ct$  (media $\pm$ ds), que es la diferencia entre el Ct del gen de interés (Muc5ac) y del control endógeno ( $\beta$ -actina) para cada muestra. El valor medio representa la expresión del gen de interés respecto del control endógeno para cada semana postinfección. La aplicación del test *t* de Student para muestras no relacionadas no mostró diferencias estadísticamente significativas entre la expresión ( $\Delta Ct$ ) a las 4 y 6 spi.



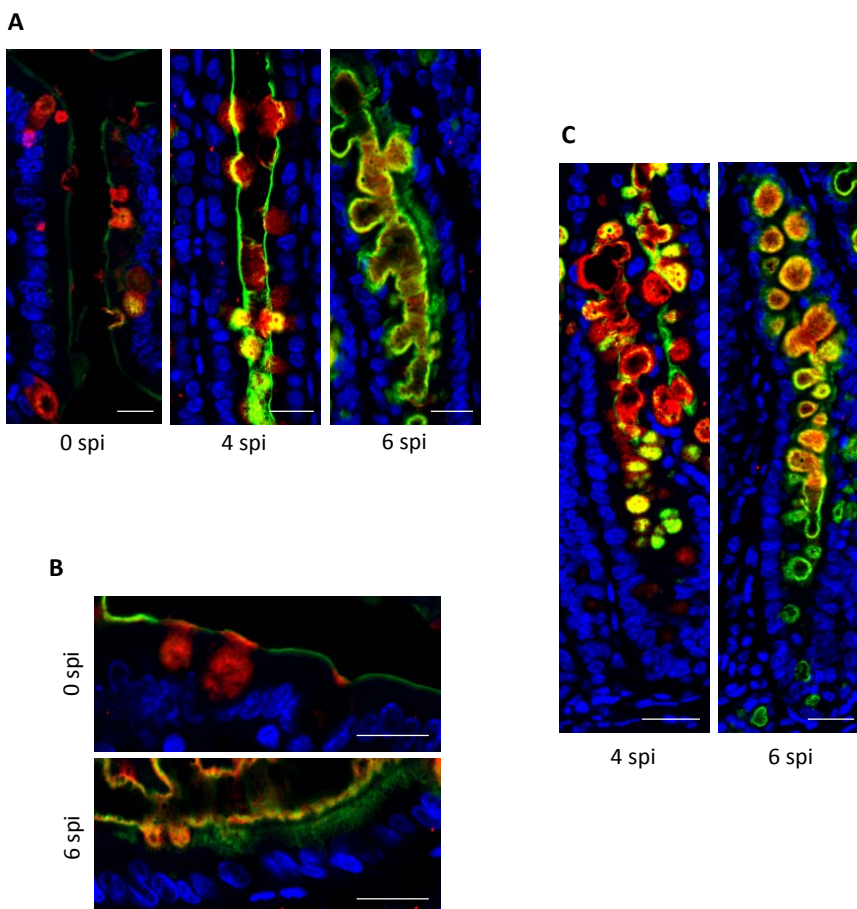
**Figura 3.28.- Expresión de Muc5ac en el íleon de ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*.** (A) Cantidad de mRNA del gen de Muc5ac, normalizada respecto a la expresión del control endógeno ( $\beta$ -actina), en el íleon de ratones en diferentes semanas postinfección (spi) con *E. caproni*. Los resultados se expresan en términos de  $\Delta Ct$ , que representa la diferencia entre el ciclo umbral (Ct) del control endógeno y el gen de interés. nd: producto de PCR del gen de interés no detectado. (B) Expresión relativa del mRNA de Muc5ac en el íleon de ratas a las 2 y 4 spi con *E. caaproni*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados (0 spi), representada mediante la línea discontinua. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi (\* $p$ <0,05).

Por el contrario, en el caso de ratas sí se detectó cierta expresión basal de Muc5ac en el íleon de los animales no infectados. En este hospedador, la cuantificación relativa aplicando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  reveló un descenso significativo en la expresión de este gen a lo largo de la infección. No obstante, hay que resaltar que los niveles de expresión fueron muy bajos durante todo el experimento (Figura 3.28. B).

### **3.3.3. PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE MUCINAS SOLUBLES EN EL ÍLEON DE RATÓN Y RATA INFECTADOS CON *ECHINOSTOMA CAPRONI***

Si bien el análisis cuantitativo de los niveles de mRNA es un método de elección para analizar la expresión de proteínas en células y tejidos, varios factores biológicos pueden alterar la correlación entre mRNA y proteína en uno u otro sentido (Gygi *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2009). Sorprendentemente, los resultados obtenidos en la cuantificación relativa de la expresión de los genes de mucinas en hospedadores de alta y baja compatibilidad con *E. caproni* se mostraron contrarios a la mayoría de los trabajos publicados en esta línea. Habitualmente, el aumento en la producción de moco extracelular y del espesor del glicocálix suponen un mecanismo efector eficaz frente a numerosos helmintos intestinales y suelen estar mediados por citoquinas de tipo Th2, fundamentalmente IL-13 e IL-4 (Hasnain *et al.*, 2013). A la vista de estos resultados, y teniendo en cuenta la posibilidad de una desregulación entre la transcripción de los genes de mucinas y su posterior traducción a proteínas, decidimos investigar los cambios en la producción y secreción de mucinas solubles en el íleon de ratones y ratas infectados con *E. caproni* mediante inmunohistoquímica, empleando anticuerpos policlonales frente a Muc2 y Muc5ac.

Los resultados de inmunohistoquímica confirmaron en gran medida los resultados de RT-PCR<sub>rt</sub> observados en ratón (Figura 3.29.). En general, el marcaje con anti-Muc2 fue claramente superior en las secciones procedentes de animales infectados que en las de los no infectados. Tanto en los controles como a las 2 spi con *E. caproni* el marcaje con el anticuerpo estuvo limitado a las células caliciformes, productoras de mucinas solubles. A las 4 spi, si bien el patrón de marcaje fue similar al observado en los ratones



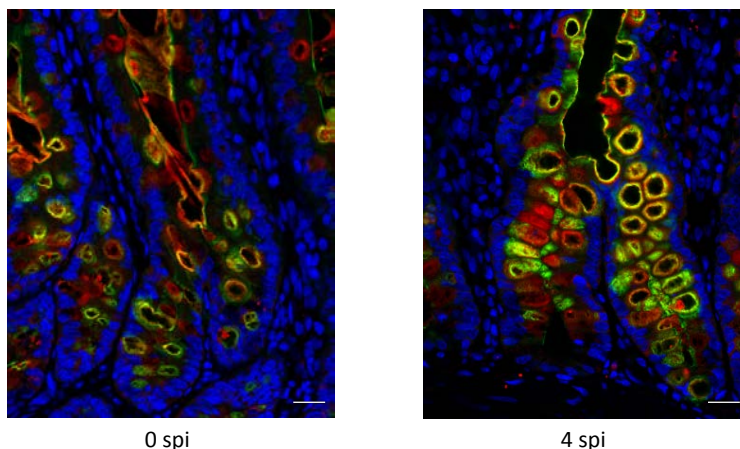
**Figura 3.29.-** Doble inmunofluorescencia con DBA y anti-Muc2 en el íleon de ratones infectados con *Echinostoma caproni*. Inmunohistoquímica con la lectina DBA (verde) y un anticuerpo anti-Muc2 (rojo) sobre la mucosa intestinal de ratones control y en varias semanas postinfección (spi) con *E. caproni*. El color amarillo/naranja muestra la colocalización del anticuerpo y la lectina. Los núcleos celulares aparecen marcados con DAPI (azul). (A) Visión general del doble marcaje a nivel de las vellosidades intestinales de ratones a las 0, 4 y 6 spi. (B) Detalles de las imágenes del panel A donde se aprecia el aumento de grosor del glicocálix y la capa de moco extracelular a las 6 spi respecto de los controles no infectados (0 spi). (C) Criptas hiperplásicas de los ratones infectados, a las 4 y 6 spi, donde se observan elevadas poblaciones de células mucosecretoras. Escala = 20  $\mu$ m.

control y tras las primeras semanas postinfección, la visión general del tejido mostró un claro aumento en el número de células mucosecretoras, tal como se había descrito

anteriormente para este hospedador (Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Trelis *et al.*, 2011). A las 6 spi, la población de células caliciformes fue aún mayor y por lo general las vesículas de mucinas eran más grandes que en los ratones control y en las semanas postinfección previas. Además, en este tiempo postinfección el glicocálix, marcado con la lectina DBA, aparecía totalmente recubierto por una capa relativamente gruesa de moco soluble, doblemente marcada con la lectina y el anticuerpo anti-Muc2 (Figura 3.29.). Estos resultados coinciden con los de la histoquímica con DBA, en los que se aprecia una mayor intensidad de señal en el intestino de los ratones infectados que en los controles, tal y como se describe en el siguiente apartado. Aunque las muestras de 6 spi no se incluyeron en el estudio del estatus de glicosilación de las mucinas intestinales (véase Apartado 3.3.4.), la doble inmunofluorescencia reveló también un aumento en el grosor del glicocálix, marcado exclusivamente con la lectina, en este tiempo postinfección (Figura 3.29. B). Estos resultados están de acuerdo con el aumento en la expresión del mRNA de mucinas transmembrana, como Muc4, detectados mediante RT-PCRrt. La expresión *de novo* de Muc5ac no pudo ser confirmada mediante inmunohistoquímica, pues no se observó marcaje específico en el íleon de los ratones infectados a las 4 y 6 spi con ninguno de los anticuerpos anti-Muc5ac utilizados (resultados no mostrados).

En el caso de las ratas infectadas con *E. caproni*, en cambio, el marcaje con anti-Muc2 no apoyó los resultados de expresión relativa de mRNA. La PCR cuantitativa mostró un descenso significativo en la expresión de Muc2 desde la 2 spi. Sin embargo, la inmunohistoquímica no reveló un descenso paralelo en la producción y/o secreción de mucinas, ya que el patrón de marcaje fue muy similar entre las ratas control e infectadas, tanto a las 2 como a las 4 spi (Figura 3.30.). El marcaje con anti-Muc5ac fue negativo tanto en ratas control como infectadas (resultados no mostrados).





**Figura 3.30.-** Doble inmunofluorescencia con DBA y anti-Muc2 en el íleon de ratas infectadas con *Echinostoma caproni*. Inmunohistoquímica con la lectina DBA (verde) y un anticuerpo anti-Muc2 (rojo) sobre la mucosa intestinal de ratas control y a las 4 semanas postinfección (spi) con *E. caproni*. El color amarillo/naranja muestra la colocalización del anticuerpo y la lectina. Los núcleos celulares aparecen marcados con DAPI (azul). Escala = 20  $\mu$ m.

### 3.3.4. PATRONES DE GLICOSILACIÓN DE MUCINAS EN EL ÍLEON DE RATÓN Y RATA INFECTADOS CON *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Las alteraciones inducidas por la infección con *E. caproni* en la composición de los glicanos de las mucinas se analizaron mediante la utilización de 5 lectinas con diferente especificidad de ligando [Véase Capítulo II, Apartado 2.5.1. (Tabla 2.2.)]. Se llevaron a cabo tinciones histoquímicas sobre la mucosa del íleon de ratones y ratas control (0 spi) e infectados (2 y 4 spi), empleando para cada lectina y hospedador la concentración de trabajo que se indica en la Tabla 3.2. En cada caso, se evaluó el marcaje específico a nivel del glicocálix (mucinas transmembrana), las células caliciformes (células productoras de moco) y el moco extracelular (mucinas formadoras de gel). La Tabla 3.3. resume la intensidad de marcaje de cada una de estas estructuras cuando se incubaron las diferentes lectinas empleadas sobre la mucosa del íleon de ambos hospedadores.

**Tabla 3.2.-** Lectinas utilizadas en histoquímica: Concentración de trabajo (l)

Lectina	Concentración de Trabajo	
	Ratón	Rata
DBA	50 µg/ml	50 µg/ ml
PNA	50 µg/ml	50 µg/ml
SNA	20 µg/ml	5 µg/ml
UEA-I	10 µg/ml	10 µg/ml
WGA	10 µg/ml	10 µg/ml

**Tabla 3.2.-** Concentración de trabajo de las diferentes lectinas empleadas en histoquímica sobre cortes histológicos de íleon de ratones y ratas control e infectados con *Echinostoma caproni*.

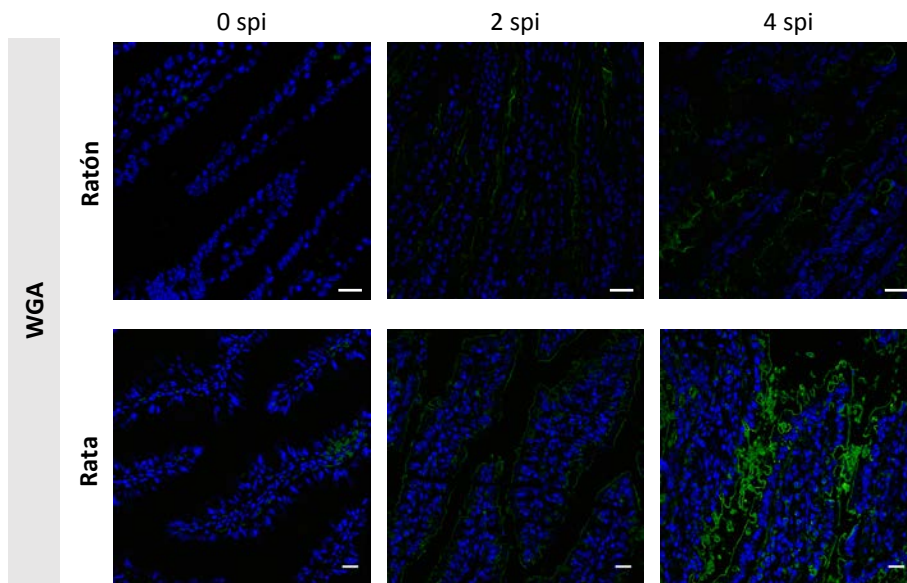
#### 3.3.4.1. MARCAJE CON WGA

Cuando se empleó la lectina WGA, que reconoce residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc), no se observó marcaje específico en el íleon de los ratones y ratas no infectados. Sin embargo, tras la infección con *E. caproni* se pudo apreciar la aparición de marcaje específico en las dos especies hospedadoras. A las 2 spi, en las secciones intestinales de ratón la señal se localizó principalmente a nivel del glicocáliz, siendo discontinua en algunos puntos. En las ratas infectadas, el marcaje se extendió además a las células caliciformes en este tiempo postinfección. En ambos casos el marcaje fue más débil a las 2 que a las 4 spi, siendo este claramente más intenso en el caso de las ratas que en los ratones infectados en los dos tiempos estudiados, tal y como se observa en la Figura 3.31. En la 4 spi, además del glicocáliz, las células mucosectoras de ratón estuvieron puntualmente marcadas con WGA, mientras que en las ratas infectadas con *E. caproni* el marcaje fue en general más intenso, sobre todo a nivel del moco soluble.

**Tabla 3.3.-** Marcaje en histoquímica con lectinas (I)

	Lectina	spi	Glicocáliz	Células caliciformes	Moco soluble	
<b>Ratón</b>	<b>WGA</b>	0	-	-	-	
		2	+	+/-	-	
		4	+	+	+	
	<b>SNA</b>	0	-	+/-	+	
		2	+/-	+/-	+	
		4	+/-	+	+	
	<b>DBA</b>	0	++	++	++	
		2	+++	++	+++	
		4	+++	+++	+++	
	<b>UEA-I</b>	0	+/-	+	++	
		2	+/-	++	++	
		4	+/-	++	++	
	<b>PNA</b>	0	-	-	-	
		2	-	-	-	
		4	-	-	-	
	<b>Rata</b>	<b>WGA</b>	0	-	-	-
			2	+	+	+
			4	++	++	++
<b>SNA</b>		0	+	+	+	
		2	-	-	-	
		4	+/-	++	++	
<b>DBA</b>		0	+/-	++	+	
		2	+++	+++	++	
		4	+++	+++	+++	
<b>UEA-I</b>		0	+++	+++	+++	
		2	+++	+++	+++	
		4	++	++	++	
<b>PNA</b>		0	-	-	-	
		2	-	-	-	
		4	-	-	-	

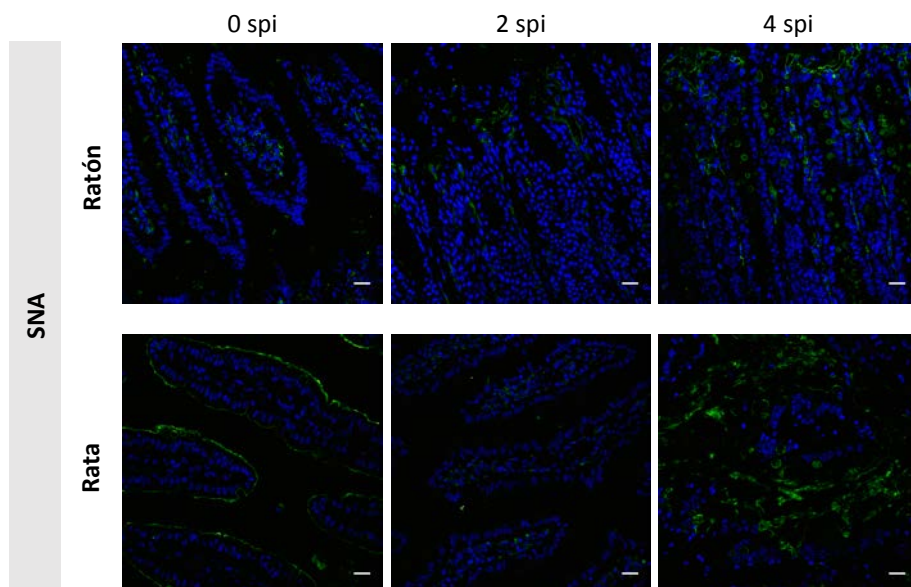
**Tabla 3.3.-** Evaluación subjetiva del marcaje con lectinas, valorado en un rango entre ausente (-) y muy positivo (+++), en el íleon de ratones y ratas en diferentes semanas postinfección (spi) con *Echinostoma caproni*.



**Figura 3.31.- Marcaje con WGA en el íleon de ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*.** Imágenes de microscopía de fluorescencia en que se muestran los cambios en la glicosilación observados cuando se incubaron cortes histológicos del íleon de ratones y ratas control [0 semanas postinfección (spi)] e infectados con *E. caproni* (2 y 4 spi) con la lectina WGA (verde). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul). Escala = 20  $\mu$ m.

### 3.3.4.2. MARCAJE CON SNA

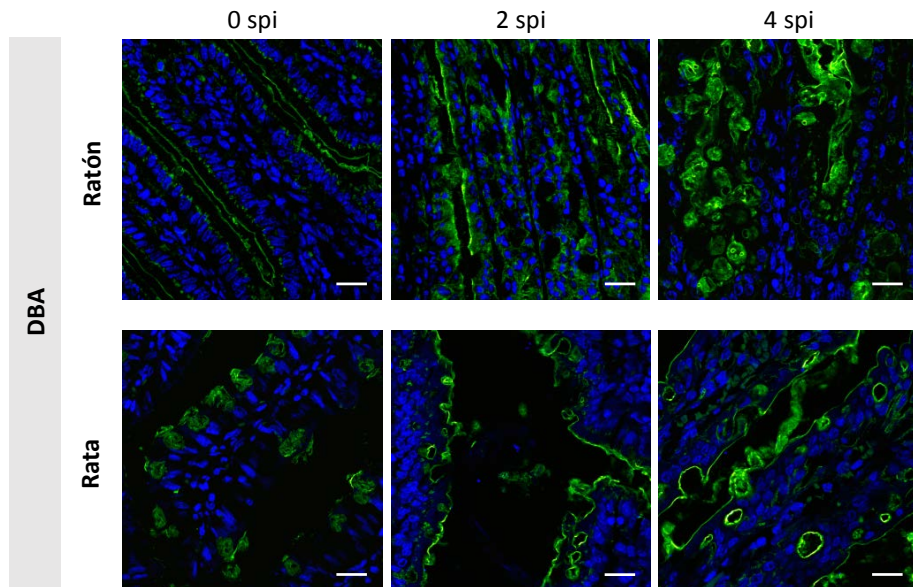
Con la lectina SNA, que reconoce ácido siálico unido a galactosa (NeuNA $\alpha$ 2-6Gal), se detectaron cambios inducidos por la infección en las dos especies hospedadoras, si bien el patrón de marcaje fue diferente en cada una de ellas (Figura 3.32.). En los ratones infectados con *E. caproni*, se detectó la aparición de una ligera señal en algunos puntos del glicocáliz a las 2 y a las 4 spi. Más evidente fue el incremento en el marcaje a nivel de las células caliciformes, especialmente a las 4 spi. En cambio, en ratas infectadas, lo más llamativo resultó la desaparición del marcaje a las 2 spi con respecto a los controles no infectados. A las 4 spi se recuperó el marcaje a nivel de las células caliciformes y el moco soluble en este hospedador, si bien el marcaje del glicocáliz permaneció discontinuo (Figura 3.32.).



**Figura 3.32.-** Marcaje con SNA en el íleon de ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*. Imágenes de microscopía de fluorescencia en que se muestran los cambios en la glicosilación observados cuando se incubaron cortes histológicos del íleon de ratones y ratas control [0 semanas postinfección (spi)] e infectados con *E. caproni* (2 y 4 spi) con la lectina SNA (verde). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul). Escala = 20  $\mu$ m.

### 3.3.4.3. MARCAJE CON DBA

El marcaje con DBA, que se une a residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc), mostró una señal intensa en el íleon de los ratones control, la cual fue más fuerte en el intestino de los animales infectados a las 2 y 4 spi observándose, como cambio más destacado, un aumento en el espesor del glicocáliz (Figura 3.33.). En el hospedador de baja compatibilidad se detectó también un incremento en la intensidad de marcaje en la mucosa del íleon de los animales infectados. Aunque el marcaje del glicocáliz en las ratas no infectadas fue débil y discontinuo, la señal se volvió intensa y continua en el íleon de los animales infectados (Figura 3.33.). En ambos hospedadores, las células mucosecretoras y el moco soluble estuvieron marcados con esta lectina en todos los tiempos postinfección

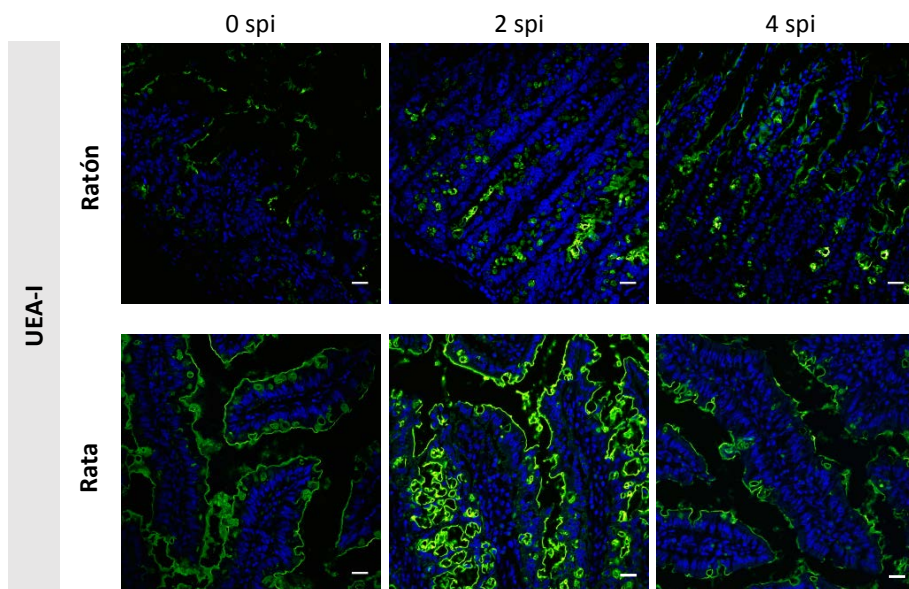


**Figura 3.33.- Marcaje con DBA en el íleon de ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*.** Imágenes de microscopía de fluorescencia en que se muestran los cambios en la glicosilación observados cuando se incubaron cortes histológicos del íleon de ratones y ratas control [0 semanas postinfección (spi)] e infectados con *E. caproni* (2 y 4 spi) con la lectina DBA (verde). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul). Escala = 20  $\mu$ m.

analizados, si bien la intensidad de señal fue mayor en los animales infectados que en los controles.

#### 3.3.4.4. MARCAJE CON UEA-I

Cuando se empleó la lectina UEA-I, que marca residuos de fucosa y galactosa (Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ ), se observaron en general pocos cambios en el patrón de marcaje a nivel del íleon de los ratones y ratas infectados (Figura 3.34.). En el caso de los ratones infectados se apreció un incremento en el número de células mucosecretoras marcadas (2 y 4 spi). En rata, lo más destacado fue la observación de un marcaje ligeramente más débil en el íleon de los animales infectados a las 4 spi que en el caso de los controles y a las 2 spi con *E. caproni*.



**Figura 3.34.- Marcaje con UEA-I en el íleon de ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*.** Imágenes de microscopía de fluorescencia en que se muestran los cambios en la glicosilación observados cuando se incubaron cortes histológicos del íleon de ratones y ratas control [0 semanas postinfección (spi)] e infectados con *E. caproni* (2 y 4 spi) con la lectina UEA-I (verde). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul). Escala = 20  $\mu$ m.

### 3.3.4.5. MARCAJE CON PNA

La lectina PNA reconoce residuos de tipo Gal $\beta$ 1-3GalNAc. Cuando se utilizó esta lectina no se detectó marcaje específico en el íleon de los animales control ni infectados en ninguna de las dos especies hospedadoras<sup>4</sup> (resultados no mostrados).

---

<sup>4</sup> Otros trabajos han puesto de manifiesto la unión específica de la lectina PNA a glicanos presentes en el intestino de ratones y ratas (Fujino & Fried, 1993b; Yamamoto *et al.*, 2010). Ante la ausencia de marcaje observada en nuestro caso tras repetidos ensayos, se testó la capacidad reactiva de la lectina comercial utilizada, para descartar que el resultado negativo fuera debido a un producto defectuoso. Mediante *slot blot*, se enfrentaron varias diluciones de lectina a cantidades crecientes de una glicoproteína control (fetuína

### **3.4. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE CATEPSINAS EN LA FASE ADULTA DE *ECHINOSTOMA CAPRONI***

---

Las catepsinas son un grupo de cisteín-proteasas tipo papaína (clan CA) que se expresan en todos los organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Los helmintos patógenos expresan también estas enzimas, los cuales intervienen en numerosos aspectos de su relación con el hospedador, como por ejemplo la invasión y establecimiento; la migración intraorgánica; la alimentación de los vermes o la supresión de las funciones de algunas células inmunitarias efectoras (Sajid & McKerrow, 2002; Robinson *et al.*, 2008).

#### **3.4.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL**

Los miembros del género *Echinostoma* son trematodos parásitos que maduran y se establecen directamente en el intestino de su hospedador definitivo, sin fases de migración intraorgánica. Precisamente, la ausencia de fases tisulares es una de las principales razones por las que, probablemente, no se han llevado a cabo hasta el momento trabajos centrados en el estudio de las catepsinas en este grupo de parásitos. No obstante, además de facilitar la invasión tisular, estas enzimas intervienen en otros numerosos procesos en la relación con el hospedador. Por ejemplo, se ha observado que algunos parásitos intestinales producen cisteín-proteasas capaces de cortar los extremos no glicosilados de las mucinas, afectando de ese modo a la estructura macromolecular del moco intestinal y facilitando la invasión (Moncada *et al.*, 2003; Lidell *et al.*, 2006). En otros casos, las proteasas secretadas degradan diferentes isotipos de inmunoglobulinas, proporcionando un mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria generada por el hospedador (Berasain *et al.*, 2000, 2003).

---

desializada), que presenta residuos azucarados de tipo Gal $\beta$ 1-3GalNAc. Los resultados obtenidos fueron positivos en todos los casos, descartando de ese modo la posible falta de reactividad de la lectina comercial.

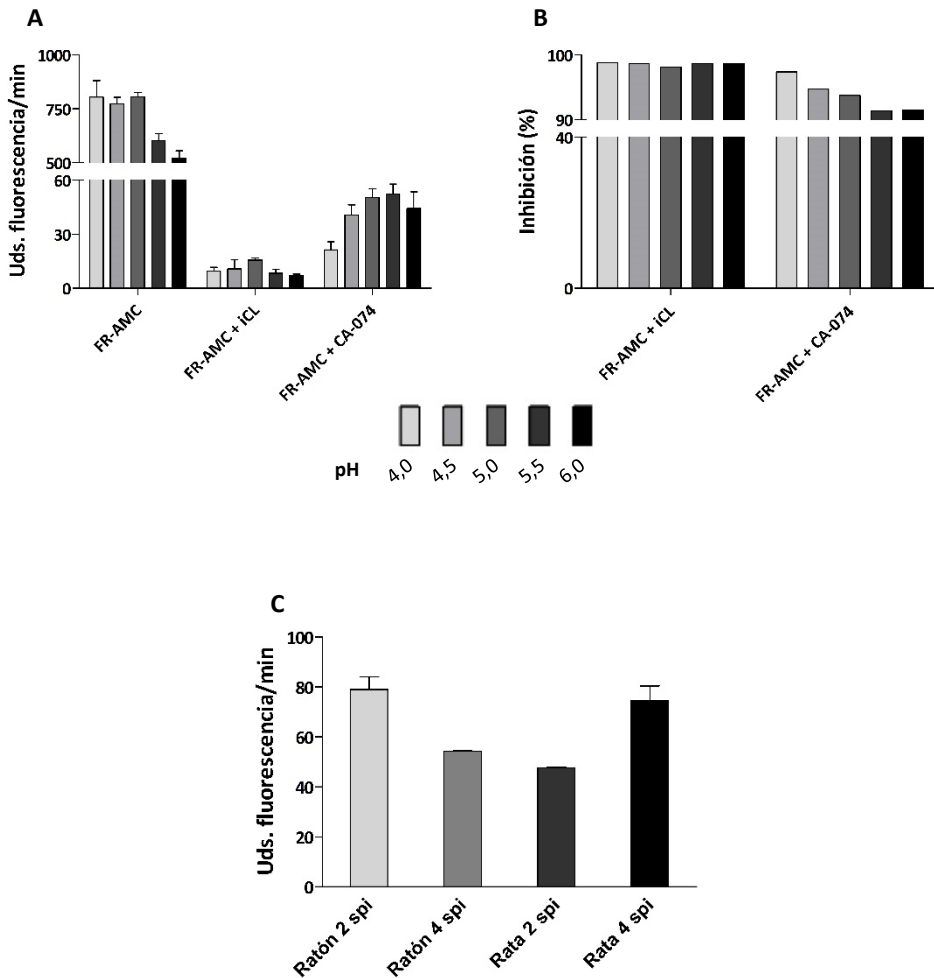


Con la finalidad de llevar a cabo una primera aproximación al estudio de las catepsinas expresadas en la fase adulta de *E. caproni* y su posible interacción con el hospedador, se evaluó la presencia y actividad de cisteín-proteasas en el ESP, el cual constituye una parte fundamental de la interfaz de contacto entre el parásito y su hospedador. Asimismo, se investigó la localización tisular de estas enzimas en los tejidos del verme empleando secciones histológicas de ejemplares parásitos adultos.

### 3.4.2. ENSAYO FLUORIMÉTRICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El ESP de *E. caproni* fue analizado para determinar la presencia de cisteín-peptidasas, particularmente, de las catepsinas de la familia C1: catepsina B y catepsina L. Se emplearon antígenos de ES de ejemplares adultos del parásito recuperados de ratones infectados experimentalmente (2 spi) para caracterizar la actividad catepsina frente al sustrato FR en un rango de pH de 4,0 a 6,0. La utilización de inhibidores específicos de catepsina B y L permitió confirmar la especificidad de la actividad peptidasa y distinguir entre la actividad de ambos tipos de enzimas.

La Figura 3.35. (A y B) muestra la actividad catepsina en el antígeno de ES de *E. caproni* en presencia y ausencia de inhibidores específicos, en intervalos de 0,5 unidades de pH. Los resultados se expresan como unidades de fluorescencia/minuto, que representan la velocidad de liberación del fluoróforo AMC como consecuencia de la escisión del sustrato peptídico FR. Para todos los valores de pH analizados se observó una mayor actividad catepsina L que catepsina B. Asimismo, el porcentaje de inhibición de la actividad peptidasa fue mayor cuando se añadió al medio de reacción el inhibidor específico de catepsina L que al emplear CA-074, que inhibe de forma específica las catepsinas B. El pH óptimo para la actividad catepsina L fue 5,5, siendo este el punto en el que el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática fue menor. Para este valor de pH la actividad catepsina L fue más de 6 veces superior a la actividad catepsina B (Figura 3.35. A).



**Figura 3.35.- Ensayo fluorimétrico de la actividad catepsina.** Perfil de actividad cisteín-peptidasa, expresada en unidades (Uds.) de fluorescencia liberadas por minuto, en el producto de excreción/secreción (ESP) de *Echinostoma caproni* en función del pH (A). Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática en presencia de inhibidores específicos (B) (iCL: inhibidor irreversible de catepsina L; CA-074: inhibidor irreversible de catepsina B). (C) Confirmación de la actividad catepsina en diferentes ESP obtenidos a partir de adultos de *E. caproni* recuperados de hospedadores distintos en diferentes semanas postinfección (spi). FR-AMC: benzoiloxycarbonil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina (sustrato peptídico).

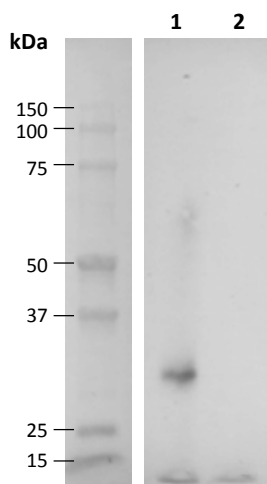
Una vez caracterizado el tipo de actividad peptidasa predominante en el ESP de *E. caproni* y su pH óptimo de actividad, se testó la presencia de actividad catepsina L en los antígenos de ejemplares adultos recuperados a partir de hospedadores distintos, en diferentes semanas postinfección (Figura 3.35. C). Los resultados mostrados en esta Figura ponen de manifiesto la existencia de actividad catepsina L en el producto de ES de *E. caproni* independientemente del hospedador y el tiempo postinfección. No obstante, si bien a la vista de los resultados puede parecer que existen variaciones en la actividad enzimática en función del hospedador y/o el tiempo postinfección, cabe señalar que la falta de un mayor número de réplicas biológicas impidió la aplicación de test estadísticos que confirmasen, en su caso, la existencia de tales diferencias.

### 3.4.3. UNIÓN DE DCG-04 AL SITIO ACTIVO DE CISTEÍN-PEPTIDASAS

Tras la incubación del ESP de *E. caproni* con el inhibidor irreversible biotinilado DCG-04, la electroforesis monodimensional y *blotting* posteriores revelaron una banda a una altura aproximada de 28 kDa, encontrándose dentro del rango de PM esperable para las catepsinas (Figura 3.36.). El control negativo, preincubado con el inhibidor irreversible de cisteín-peptidasas E-64, no reveló ninguna banda en esta zona, confirmando la especificidad de la unión de la sonda biotinilada.

### 3.4.4. WESTERN BLOT ANTI-CATEPSINA L

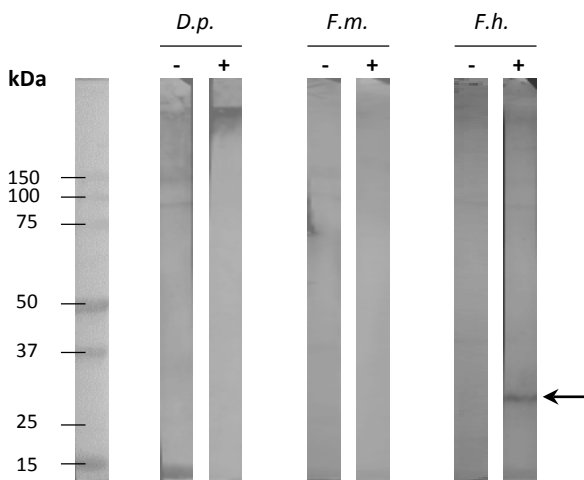
Con la finalidad de confirmar la presencia de catepsina L en el antígeno de ES de *E. caproni* se llevaron a cabo ensayos de *western blot* empleando anticuerpos heterólogos generados frente a catepsina L de otros trematodos (Véase Capítulo II, Apartado 2.6.4.). Se utilizaron tres anticuerpos diferentes, de los cuales únicamente el anti-catepsina L de *F. hepatica* fue capaz de reconocer específicamente la proteína de *E. caproni*, dando lugar a una banda específica a la altura de 28 kDa (Figura 3.37.). Este resultado coincide con el PM observado previamente en el *blotting* con DCG-04. Los anticuerpos anti-catepsina L de *F. magna* y *D. pseudospathaceum* no mostraron reconocimiento específico alguno.



**Figura 3.36.- Blotting con DCG-04.** Confirmación de la presencia de catepsinas en el producto de excreción/secreción (ESP) de *Echinostoma caproni* mediante incubación con la sonda para cisteín-peptidasas DCG-04 marcada con biotina (1). Control de la especificidad de unión mediante preincubación del ESP con el inhibidor específico de cisteín peptidasas E-64, antes de la incubación con DCG-04 (2).

### 3.4.5. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA LOCALIZACIÓN DE CATEPSINA L

Una vez confirmadas la presencia y actividad catepsina L en el antígeno de ES de *E. caproni* y la capacidad del suero anti-catepsina L de *F. hepatica* para reconocer específicamente la proteína homóloga de *E. caproni*, se llevaron a cabo ensayos de inmunohistoquímica con el objetivo de localizar la expresión de la proteína en los tejidos de los vermes adultos. Las pruebas de inmunohistoquímica se realizaron sobre secciones histológicas de ejemplares recuperados de ratones y ratas a las 2 y 4 spi. En todos los casos se detectó la presencia de la proteína en la pared intestinal de los vermes y sobre su superficie corporal, en la parte más externa del tegumento, poniendo de manifiesto la presencia del enzima a nivel de la interfaz de contacto parásito-hospedador (Figura 3.38).

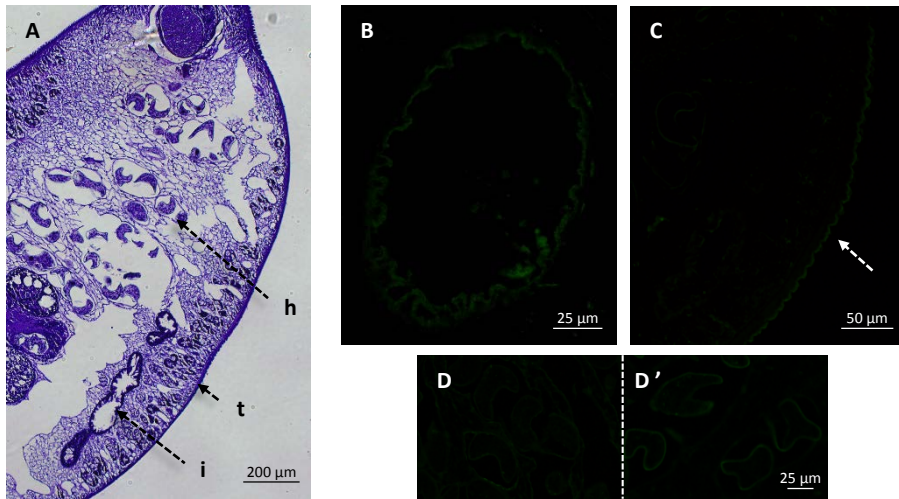


**Figura 3.37.- Western blot anti-catepsina L.** Antígenos de excreción/secretión de *Echinostoma caproni* enfrentados a sueros de animales inmunizados frente a catepsina L (+) de *Diplostomum pseudospathaceum* (*D.p.*), *Fascioloides magna* (*F.m.*) y *Fasciola hepatica* (*F.h.*) respectivamente, y los correspondientes controles negativos, incubados con sueros de animales inmunizados con PBS (-). La flecha señala la banda reconocida específicamente en por el suero de oveja inmunizada frente a catepsina L de *F. hepatica*.

B y C). A parte del marcaje específico de estas estructuras se pudo apreciar la unión inespecífica del anticuerpo secundario a nivel de las paredes del útero y los huevos, que aparecieron marcados indistintamente al emplear suero anti-catepsina L y suero control (Figura 3.38. D y D’).

### 3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y GLICOSILACIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DEL EPITELIO INTESTINAL INDUCIDAS POR LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Estudios previos llevados a cabo con el modelo *E. caproni*-roedor han puesto de manifiesto que el tipo de respuesta inmunitaria generada frente a la infección intestinal



**Figura 3.38.-** Inmunohistoquímica anti-catepsina L sobre adultos de *Echinostoma caproni*. (A) Corte histológico de un adulto de *E. caproni*, teñido con azul de toluidina, sobre el que se indican las estructuras del parásito que aparecen marcadas en inmunohistoquímica, cuando se empleó suero anti-catepsina L de *Fasciola hepatica* y un anticuerpo secundario acoplado a FITC: i) intestino; t) tegumento y h) útero con huevos. (B-D') Imágenes de microscopía de fluorescencia en las que se observa el marcaje específico de la pared intestinal (B) y el tegumento (C) de los adultos de *E. caproni* y el marcaje inespecífico del útero y los huevos, observado indistintamente al emplear suero anti-catepsina L (D) y suero control (D').

resulta fundamental para determinar el curso de la misma en hospedadores de diferente compatibilidad (véase Capítulo I, Apartado 1.1.2.). Asimismo, otros estudios realizados en el marco de la presente Tesis Doctoral han contribuido a esclarecer algunos de los mecanismos efectoros que pueden contribuir a la expulsión de los vermes de la luz intestinal o que, por el contrario, favorecen el establecimiento de infecciones de carácter crónico. Sin embargo, los cambios inducidos por la infección a nivel proteómico han sido por lo general poco estudiados. En este apartado se pretende profundizar en los cambios intestinales inducidos por *E. caproni* a nivel proteómico y glicoproteómico, con la finalidad de combinarlos con los datos conocidos en relación con las respuestas inmunológicas y patológicas inducidas por la infección en el intestino de los hospedadores de alta y baja compatibilidad. Los resultados obtenidos pueden resultar de gran interés para avanzar en el conocimiento de los factores implicados tanto en la defensa frente a los helmintos

intestinales en los hospedadores resistentes, como en el establecimiento de infecciones crónicas en los hospedadores altamente compatibles.

### **3.5.1. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS**

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de los cambios intestinales inducidos por la infección con *E. caproni* a nivel proteómico y su posible repercusión sobre la evolución de la infección en hospedadores de alta y baja compatibilidad, se llevaron a cabo análisis de expresión diferencial para identificar aquellas proteínas cuya expresión se ve modificada como consecuencia de la presencia del parásito en la luz intestinal.

#### **3.5.1.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL**

Para analizar los cambios cuantitativos en la expresión de proteínas, extractos proteicos del íleon de animales infectados (2 spi) y control se compararon mediante la técnica 2D-DIGE. Se realizaron dos estudios por separado, empleando materiales obtenidos de ratones y ratas infectados y control. Para cada experimento DIGE se utilizaron 4 réplicas biológicas de cada uno de los grupos analizados (infectado y control). La significancia estadística y el significado biológico de las diferencias observadas entre los grupos fueron evaluados en ambos casos mediante herramientas de análisis estadístico univariante y multivariante (véase Capítulo II, Apartado 2.11.). Asimismo, aplicando diferentes criterios de selección, se escogieron los *spots* de proteína diferenciales más representativos en cada caso, los cuales fueron extraídos de los geles de poliacrilamida para su identificación por MS.

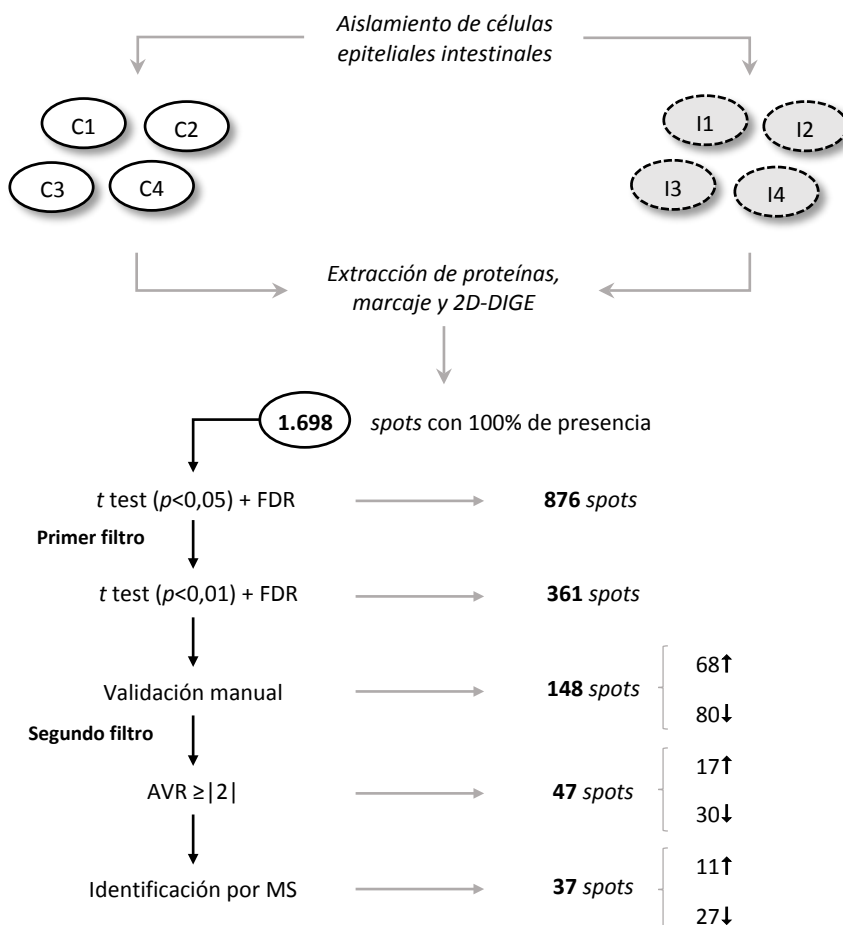
#### **3.5.1.2. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN EL INTESTINO DE RATONES INFECTADOS CON *ECHINOSTOMA CAPRONI***

La comparación del perfil proteómico del íleon de ratones control y a las 2 spi con *E. caproni* resolvió un total de 1.698 *spots* con un 100% de presencia en los distintos geles incluidos en el experimento. El análisis estadístico de los resultados, utilizando el test *t* de Student y aplicando el factor FDR, reveló un total de 876 *spots* diferencialmente

expresados ( $p < 0,05$ ). Este es un valor automático, sin validación manual, generado por el software de procesamiento y análisis de imagen *DeCyder™*. Del total de estos 876 *spots*, 96 presentaron una expresión más de 2 veces superior en el intestino de los animales infectados con respecto a los controles ( $AVR \geq +2$ ) y un total de 112 estuvieron infraexpresados en la misma proporción ( $AVR \leq -2$ ) en el íleon de los ratones parasitados. Ante el elevado número de *spots* de proteínas diferenciales se optó por aplicar una serie de filtros que permitieran seleccionar aquellos con mayor diferencia y significatividad estadística en la expresión.

La Figura 3.39. muestra de forma esquemática los resultados obtenidos en el 2D-DIGE y los criterios de selección aplicados para la elección de los *spots* que fueron sometidos a MS para la identificación de las proteínas correspondientes. Al conjunto inicial de 876 *spots* diferenciales se aplicó un filtro para seleccionar aquellos con un mayor grado de significatividad estadística, fijando el valor de  $p$  del test  $t$  de Student por debajo de 0,01 y manteniendo el criterio del FDR ( $q < 0,05$ ). Tras la aplicación de este primer filtro el número de *spots* se redujo hasta 361, una cifra que resulta más manejable para la validación manual de cada uno de los *spots* de manera individual. De estos 361 *spots*, 148 fueron validados manualmente, confirmándose su correspondencia entre los diferentes geles del experimento. Ochenta de ellos presentaban una expresión disminuida en los animales infectados respecto de los controles y otros 68 estaban regulados al alza. Con la finalidad de identificar aquellas proteínas cuya expresión se ve más afectada como consecuencia de la infección se aplicó un segundo filtro y se seleccionaron aquellos *spots* con un  $AVR \geq 2$ , en valor absoluto. Este criterio de selección reveló un total de 47 *spots*, 17 de ellos sobreexpresados y los 30 restantes regulados a la baja en el intestino de los ratones infectados. Finalmente, 37 de los 47 *spots* seleccionados pudieron ser extraídos del gel e identificados con éxito por MS.





**Figura 3.39.- Criterios de selección para la identificación de los spots diferencialmente expresados en el íleon de ratones control e infectados con *Echinostoma caproni*.** Representación esquemática de los resultados de 2D-DIGE y de los criterios (filtros) aplicados para la selección de los spots con expresión diferencial mayor y más significativa entre el íleon de ratones control (C) y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni* (I), los cuales fueron identificados mediante espectrometría de masas (MS). FDR: *False Discovery Rate*; AVR: *Average Volume Ratio*; (↑): Spots sobreexpresados en el íleon de los ratones infectados; (↓): Spots regulados a la baja en el íleon de ratones infectados.

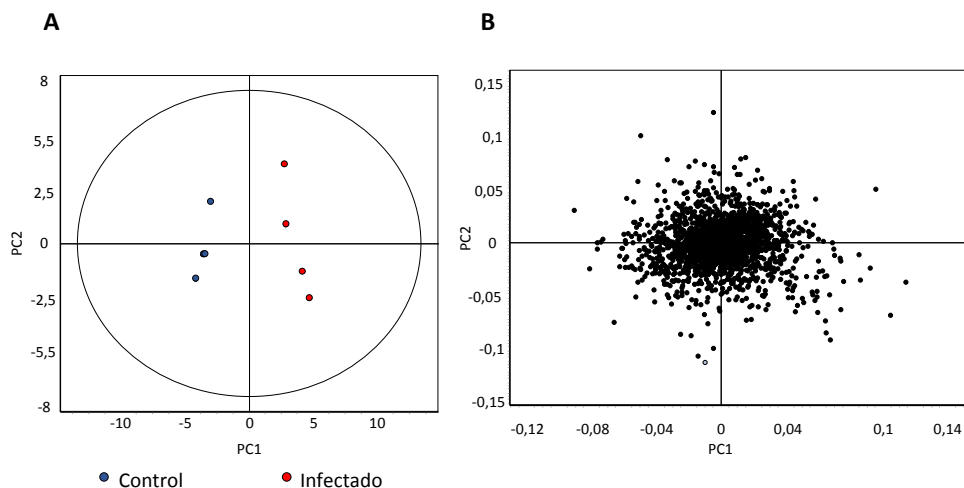
**a) Resultados de los Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de Patrones por Agrupamiento Jerárquico**

En los estudios de proteómica diferencial, además de la identificación de las proteínas con expresión diferente entre los grupos de estudio, se contempla

generalmente un segundo objetivo, que consiste en poder agrupar o clasificar a los sujetos de estudio de acuerdo con sus perfiles de expresión global, sin ningún conocimiento previo sobre las razones biológicas para la existencia de tales grupos. Para ello se recurre a herramientas de estadística multivariante, que permiten el análisis conjunto de los datos ofreciendo una interpretación biológica de los resultados (Meunier *et al.*, 2007). En la presente Tesis Doctoral se aplicaron dos de los principales análisis utilizados para este fin en los estudios de proteómica: el PCA y el análisis de patrones por agrupamiento jerárquico. El PCA es un método estadístico de síntesis de la información que permite la simplificación del conjunto de datos inicial, ofreciendo una interpretación mucho más sencilla de los resultados. Por su parte, el análisis de patrones por agrupamiento jerárquico permite agrupar a los diferentes sujetos de estudio incluidos en el experimento de acuerdo con sus perfiles de expresión global.

Dado que una de las principales propiedades de los análisis multivariante aplicados a estudios de expresión diferencial consiste en el análisis de los datos sin conocimiento previo sobre el origen de las muestras, en primer lugar se analizaron los resultados “crudos” derivados del experimento 2D-DIGE, antes de aplicar cualquier test de estadística univariante. Es decir, se llevaron a cabo los test de estadística multivariante antes mencionados considerando el total de *spots* con un 100% de presencia en el experimento, antes de ser validados manualmente ni confirmar cuáles estaban diferencialmente expresados de forma estadísticamente significativa entre los grupos control e infectado. Esta aproximación ofrece una primera interpretación de cuán disimilares son las muestras entre sí, independientemente de que exista o no una razón biológica para considerarlas diferentes.

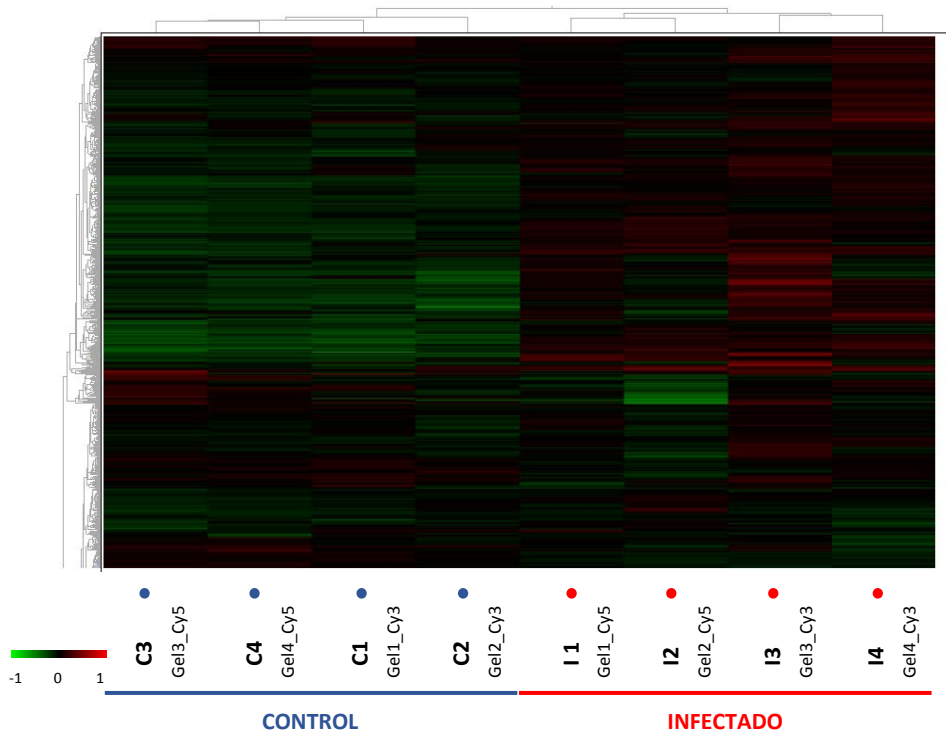
Tanto el PCA como el análisis de patrones por agrupamiento jerárquico aplicado al set de 1.698 *spots* con 100% de presencia en los geles 2D consiguieron separar gráficamente los dos grupos de muestras: control e infectado. La Figura 3.40. muestra los resultados del PCA, llevado a cabo tomando como observaciones las réplicas biológicas y los *spots* como variables. En el gráfico de puntuación (Figura 3.40. A) se puede observar



**Figura 3.40.- Análisis de componentes principales (PCA) de las proteínas del íleon de ratones control e infectados con *Echinostoma caproni* resueltas mediante 2D-DIGE.** Representación gráfica de los resultados del PCA aplicado al set de 1.698 *spots* de proteína aislados del íleon de ratones control y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni*, los cuales estuvieron presentes en todos los geles incluidos en el experimento 2D-DIGE (100% de presencia). El análisis fue llevado a cabo con el módulo EDA del software *DeCyder™* tomando los *spots* como variables y las réplicas biológicas como observaciones. (A) Gráfico de puntuación: representa las diferentes réplicas biológicas sobre los ejes de coordenadas definidos por los componentes principales (PC) 1 y 2. (B) Gráfico de contribución: muestra la distribución de los 1.698 *spots* incluidos en el análisis sobre los mismos ejes.

como las muestras control y procedentes de ratones infectados con *E. caproni* (2 spi) aparecen gráficamente separadas por el eje vertical que define el primer componente principal (PC1), el cual explica la mayor parte de la variabilidad existente entre las muestras. Asimismo, todas las muestras estuvieron representadas dentro de la elipse que determina el intervalo de normalidad (95% de confianza), descartando la existencia de valores extremos o atípicos.

En la Figura 3.41. se muestra el diagrama de calor con dendrogramas generado a partir del análisis de patrones aplicado al mismo conjunto de *spots* (100% de presencia). Cada columna representa una de las 8 réplicas biológicas incluidas en el experimento (4 pertenecientes a animales control y otras 4 correspondientes a ratones infectados). Se

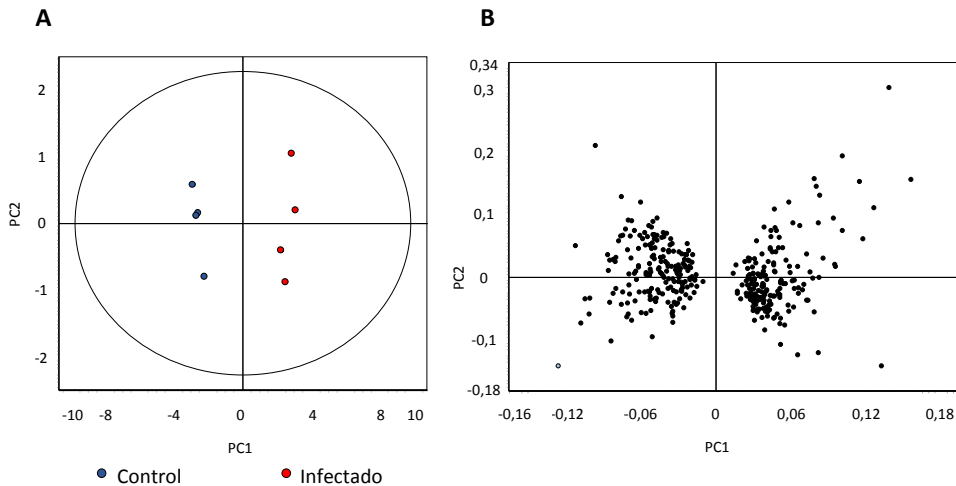


**Figura 3.41.- Agrupamiento jerárquico de las proteínas del íleon de ratones control e infectados con *Echinostoma caproni* resueltas mediante 2D-DIGE.** Mapa de calor generado con el módulo EDA del software *DeCyder™* tras la clasificación jerárquica del conjunto de 1.698 spots de proteína aislados del íleon de ratones control (C) y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni* (I). El dendrograma vertical muestra la clasificación de las proteínas y el dendrograma horizontal agrupa las diferentes réplicas biológicas en función de la disimilitud que existe entre ellas. Las diferentes réplicas biológicas se indican en el eje horizontal. Las muestras correspondientes a animales infectados se representan con un punto rojo y los controles con un punto azul. Para cada réplica se indica el número del gel en el experimento y el fluoróforo con el que fue marcada.

puede observar como el dendrograma horizontal separa las muestras en dos grupos principales, que se corresponden con los grupos biológicos que se comparan en el experimento. Este resultado indica que los perfiles de expresión proteica de los individuos (réplicas biológicas) que forman los grupos control e infectado son similares entre sí y diferentes de los del otro grupo. En cambio, la agrupación de las proteínas en función de su grado de expresión en cada grupo no resultó tan bien definida en este primer análisis. Como consecuencia de ello, se aprecia como el dendrograma vertical no es capaz de

agrupar los *spots* en 2 categorías principales incluyendo, cada una de ellas, aquellas proteínas con una expresión disminuida o aumentada en un grupo biológico (control o infectado) con respecto al otro. Este resultado sugiere la existencia de una elevada variabilidad en la expresión de los *spots* seleccionados para el análisis, la cual se ve incrementada por la falta de validación manual de los mismos y la consideración de todos los *spots*, independientemente de que existieran o no diferencias significativas en su expresión. Este primer análisis pone de manifiesto que los dos grupos de muestras son claramente diferentes entre sí en base a sus perfiles de expresión global. No obstante, la identificación de las proteínas con un patrón de expresión similar en cada grupo requiere filtrar los resultados “crudos” obtenidos del experimento 2D-DIGE.

Una vez aplicados los criterios de selección anteriormente descritos se realizaron de nuevo el PCA y el análisis de patrones, considerando únicamente el set de 361 *spots* diferencialmente expresados con  $p < 0,01$  en el test  $t$  de Student y que hubieran superado el test FDR ( $q < 0,05$ ). Como cabía esperar, el PCA, realizado en las mismas condiciones que el primero (muestras como observaciones y *spots* como variables), separó gráficamente las réplicas biológicas en dos grupo diferenciados en base al primer componente principal, sin la identificación de *outliers* (Figura 3.42. A). El gráfico de distribución (Figura 3.42. B) muestra la separación de las variables (*spots*) a ambos lados del eje vertical (PC1). Del mismo modo, el análisis de patrones por agrupamiento jerárquico clasificó las réplicas biológicas en dos grupos principales distintos, coincidiendo con la condición de infectado/no infectado, tal y como se observa en el dendrograma horizontal representado en la Figura 3.43. Estos resultados ponen de manifiesto que el patrón de expresión del conjunto de los 361 *spots* con  $p < 0,01$  y  $q < 0,05$  es suficiente para explicar las diferencias existentes entre los dos grupos biológicos. Asimismo, a diferencia de lo observado en el primer análisis de patrones, el nuevo agrupamiento jerárquico permitió no solo clasificar las muestras, sino también los *spots* de proteínas con un perfil de expresión similar en cada grupo de muestras. Como se aprecia en la Figura 3.43., en este caso el mapa de calor quedó dividido en cuatro cuadrantes claramente diferenciados. Esta distribución es debida

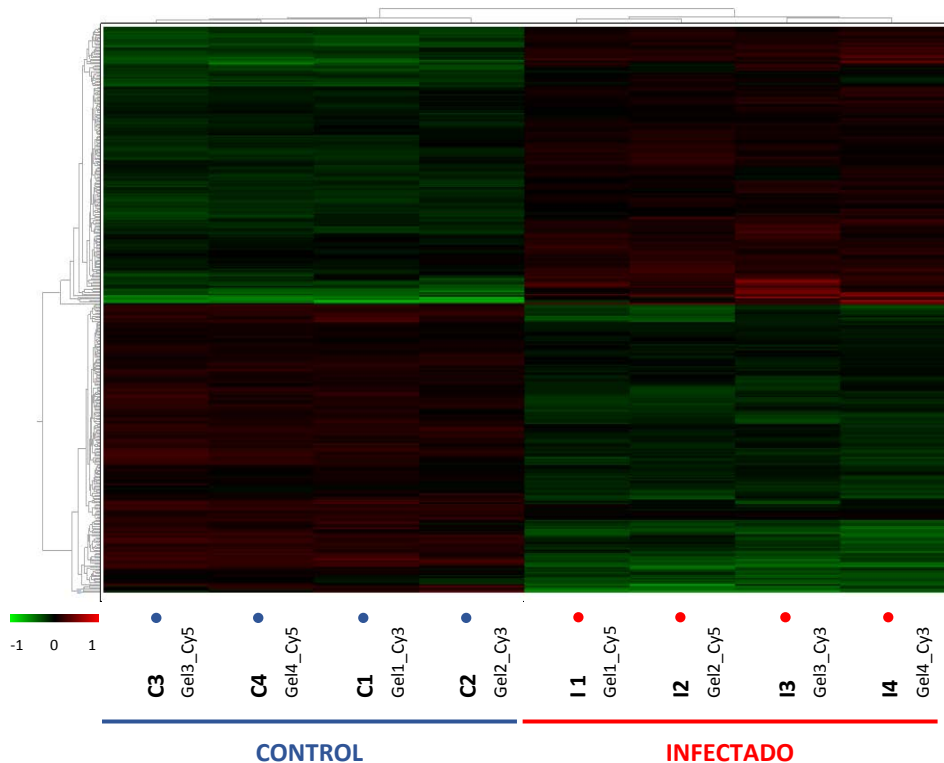


**Figura 3.42.- Análisis de componentes principales (PCA) de las proteínas diferencialmente expresadas en el íleon de ratones control e infectados con *Echinostoma caproni*.** Representación gráfica de los resultados del PCA aplicado al set de 361 *spots* cuya expresión resultó significativamente diferente entre animales control y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni* [ $p < 0,01$  en el test  $t$  de Student y  $q < 0,05$  para el test *False Discovery Rate* (FDR)] generado con el módulo EDA del software *DeCyder*<sup>™</sup> tomando los *spots* como variables y las réplicas biológicas como observaciones. (A) Gráfico de puntuación: representa las diferentes réplicas biológicas sobre los ejes de coordenadas definidos por los componentes principales (PC) 1 y 2. (B) Gráfico de contribución: muestra la distribución de los 361 *spots* incluidos en el análisis sobre los mismos ejes.

a que para el conjunto de datos utilizado en el análisis ambos dendrogramas (horizontal y vertical) establecen dos categorías principales: muestras procedentes de ratones control o infectados, en el eje horizontal; y *spots* sobreexpresados en un grupo experimental con respecto al otro, en el eje vertical.

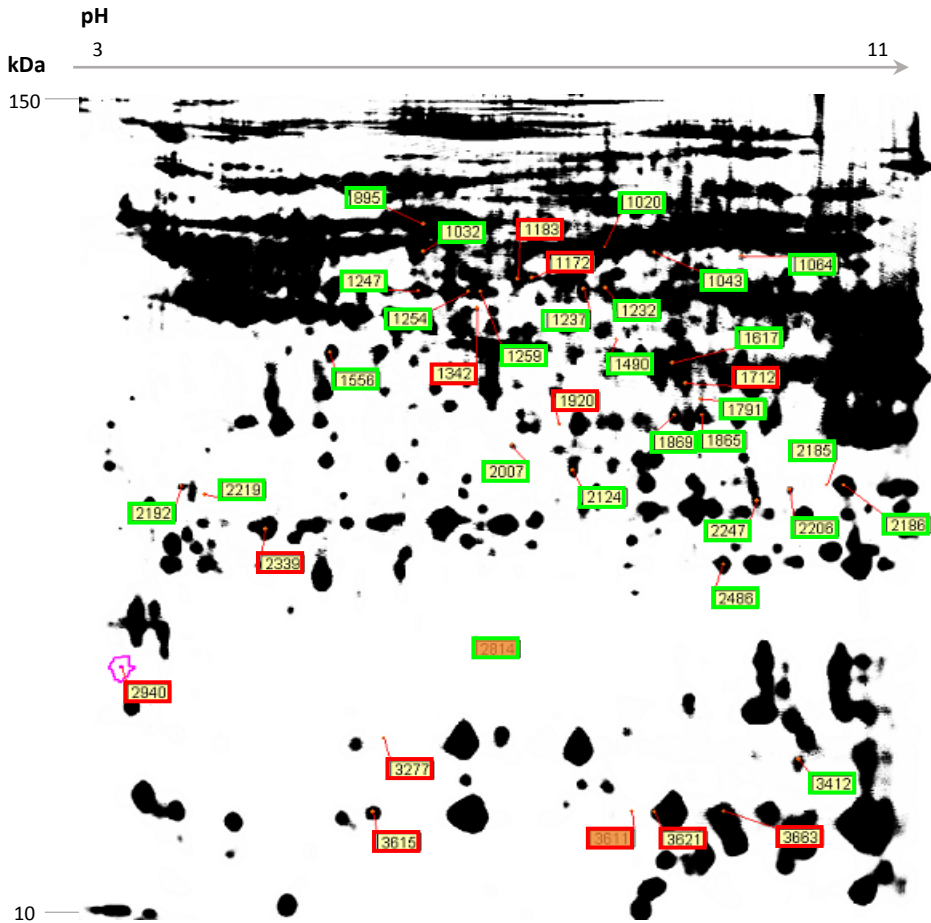
### ***b) Identificación por Espectrometría de Masas de las Proteínas Diferencialmente Expresadas***

Los *spots* con mayores diferencias en la expresión ( $AVR \geq 2$ , en valor absoluto) y con mayor grado de significación estadística ( $p < 0,01$  para el test  $t$  de Student y  $q < 0,05$  en el test FDR) fueron seleccionados para su identificación por MS. Un total de 37 *spots*, de los 47 que pasaron inicialmente los filtros de selección, fueron identificados



**Figura 3.43.- Agrupamiento jerárquico de las proteínas diferencialmente expresadas en el íleon de ratones control e infectados con *Echinostoma caproni*.** Mapa de calor generado con el módulo EDA del software *DeCyder™* tras la clasificación jerárquica del conjunto de los 361 *spots* de proteína diferencialmente expresados en el íleon de ratones control (C) y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni* (I) [ $p < 0,01$  en el test *t* de Student y  $q < 0,05$  para el test *False Discovery Rate* (FDR)]. El dendrograma vertical muestra la clasificación de las proteínas y el dendrograma horizontal agrupa las diferentes réplicas biológicas en función de la disimilitud que existe entre ellas. Las diferentes réplicas biológicas se indican en el eje horizontal. Las muestras correspondientes a animales infectados se representan con un punto rojo y los controles con un punto azul. Para cada réplica se indica el número del gel en el experimento y el fluoróforo con el que fue marcada.

satisfactoriamente. De ellos, 11 estaban sobreexpresados en los animales infectados, mientras que los 27 restantes estuvieron regulados a la baja respecto de su expresión en el intestino de los controles no infectados. La Figura 3.44. muestra la imagen del gel de referencia sobre la que se señala la posición de los *spots* seleccionados para la identificación de las proteínas correspondientes.



**Figura 3.44.-** Imagen representativa del gel 2D-DIGE de las proteínas aisladas del íleon de ratones control e infectados con *Echinostoma caproni*. Imagen de referencia seleccionada con el módulo BVA del software *DeCyder™* sobre la que se indican los *spots* del íleon de ratones control y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni* que fueron seleccionados para su identificación por espectrometría de masas. Los *spots* de proteínas sobrexpresados en el intestino de los animales infectados están señalados en rojo y los infraexpresados en verde. Los detalles de identificación de las proteínas correspondientes se indican en la Tabla 3.4. El *spot* sombreado en naranja no pudo ser identificado.

Las proteínas identificadas fueron clasificadas en 10 grupos funcionales diferentes (Tabla 3.4.), si bien es importante resaltar que el grupo mayoritario fue el de las enzimas



Tabla 3.4.- Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el íleon de ratones infectados con *Echinostoma caproni*

Spot <sup>a</sup>	Identificación	Especie (GI) <sup>b</sup>	t Test <sup>c</sup>	AVR <sup>d</sup>	Cobertura (%)	MASCOT score
<b>Enzimas metabólicas</b>						
1032	Proteína X del complejo piruvato deshidrogenasa, mitocondrial	<i>Mus musculus</i> (28201978)	0,0053	-2,03	24,7	278
1043	4-trimetilaminobutiraldehído deshidrogenasa	<i>M. musculus</i> (78099319)	0,0023	-2,34	54,5	596
1064	4-aminobutirato aminotransferasa, precursor mitocondrial isoforma 1	<i>M. musculus</i> (37202121)	0,0013	-3,39	51,0	543
1172	Enolasa 1B	<i>M. musculus</i> (70794816)	0,0023	2,74	33,2	162
1183	Enolasa 1B	<i>M. musculus</i> (70794816)	0,0047	2,00	66,4	567
1232	Factor de elongación Tu, mitocondrial isoforma 1	<i>M. musculus</i> (27370092)	0,0012	-2,87	55,5	318
1237	Factor de elongación Tu, mitocondrial (parcial)	<i>Mesocricetus auratus</i> (298351659)	0,0012	-3,56	71,0	88
1247	Ornitina aminotransferasa, precursor mitocondrial	<i>M. musculus</i> (8393866)	0,0091	-2,64	33,0	106
1254	Ornitina aminotransferasa, precursor mitocondrial	<i>M. musculus</i> (8393866)	0,0076	-2,14	45,6	669
1259	Ornitina aminotransferasa, precursor mitocondrial	<i>M. musculus</i> (8393866)	0,0023	-3,94	44,2	738
1342	Aminoacilasa-1	<i>M. musculus</i> (13384746)	0,0027	2,23	45,3	267
1556	Isocitrato deshidrogenasa 3 (NAD <sup>+</sup> ) alfa, isoforma CRA_e	<i>M. musculus</i> (148693875)	0,0074	-2,15	33,0	117
1617	Ornitina carbamoiltransferasa, mitocondrial	<i>M. musculus</i> (129277)	0,0079	-2,26	29,0	81

1712	L-lactato deshidrogenasa, cadena A, isoforma 1	<i>M. musculus</i> (6754524)	0,0059	2,70	50,0	383
1791	Hidroximetilglutaril-CoA liasa, precursor mitocondrial	<i>M. musculus</i> (171543858)	0,0028	-3,42	41,5	327
1920	Sulfotransferasa familia 1B, miembro 1, isoforma CRA_a (parcial)	<i>M. musculus</i> (148706035)	0,0029	2,34	28,2	168
2206	Enoil-CoA hidratasa, cadena corta, 1, mitocondrial, isoforma CRA_a	<i>M. musculus</i> (148685962)	0,0053	-2,00	40,3	320
3412	Subunidad IV de la citocromo c oxidasa isoforma 1, isoforma CRA_a	<i>M. musculus</i> (148679695)	0,0013	-2,52	42,2	100
<b>Transporte de electrones</b>						
1865	Flavoproteína transferidora de electrones, polipéptido alfa	<i>M. musculus</i> (13097375)	0,0012	-2,91	53,8	335
1869	Flavoproteína transferidora de electrones, polipéptido alfa	<i>M. musculus</i> (13097375)	0,0042	-2,21	58,9	547
2185	Flavoproteína transferidora de electrones, subunidad beta	<i>M. musculus</i> (38142460)	0,0016	-2,16	71,0	477
2186	Flavoproteína transferidora de electrones, subunidad beta	<i>M. musculus</i> (38142460)	0,0027	-2,2	39,0	166
<b>Proteínas estructurales</b>						
2192	Lamina B	<i>M. musculus</i> (293689)	0,0029	-2,16	60,4	374
2219	Queratina, tipo II citoesquelética 8	<i>M. musculus</i> (114145561)	0,0031	-2,87	23,1	222
2940	Queratina, tipo I citoesquelética 19*	<i>M. musculus</i> (6680606)	0,0035	2,89	28,04*	14,43*

<b>Proteínas unidoras de metales</b>						
1490	Proteína 2 con dominio unión de zinc alcohol deshidrogenasa	<i>M. musculus</i> (31559926)	0,0082	-2,69	18,3	143
2124	Proteína 3 con domino tipo alcohol-ácido hidrolasa	<i>M. musculus</i> (21312204)	0,0097	-2,38	26,0	89
2247	Proteína con dominio fumarilacetoacetato hidrolasa 1	<i>M. musculus</i> (20072495)	0,0059	-2,32	44,9	139
<b>Proteínas unidoras de lípidos</b>						
2339	Apolipoproteína A-I, isoforma CRA_b	<i>M. musculus</i> (148693731)	0,0033	3,45	42,4	197
3615	Proteína unidora de ácidos grasos, intestinal	<i>M. musculus</i> (6679737)	0,0012	3,20	43,9	124
3663	Proteína unidora de ácidos grasos, hepática	<i>M. musculus</i> (8393343)	0,0024	2,54	59,8	91
<b>Proteínas unidoras de proteínas</b>						
895	Proteína disulfuro-isomerasa A3, precursor	<i>M. musculus</i> (112293264)	0,0059	-2,27	56,5	762
2007	Subunidad tipo alfa-1 del proteasoma	<i>M. musculus</i> (33563282)	0,0049	-2,12	48,7	336
<b>Detoxificación/Antioxidantes</b>						
1020	Aldehído deshidrogenasa X, precursor mitocondrial	<i>M. musculus</i> (21312260)	0,0017	-2,74	22,0	122
2486	Manganeso superóxido dismutasa	<i>M. musculus</i> (53450)	0,0015	-2,12	30,6	181

<b>Proteínas unidoras de calcio</b>						
3277	Proteína D2 con dominio <i>EF-hand</i>	<i>M. musculus</i> (31981086)	0,0012	2,36	30,2	113
<b>Proteínas unidoras de azúcares</b>						
3621	Galectina-2	<i>M. musculus</i> (269914146)	0,0033	2,20	32,0	142

<sup>a</sup> El número de *spot* está referido a la Figura 3.44.

<sup>b</sup> Número GI de acceso de la proteína en la base de datos de proteínas del NCBI.

<sup>c</sup> Valor de *p* obtenido en el test *t* de Student.

<sup>d</sup> AVR: *Average Volume Ratio*.

\*El *spot* nº 2940 fue identificado empleando el motor de búsqueda *ProteinPilot™* por lo que los valores de porcentaje de cobertura y *score* corresponden con los parámetros calculados por este motor de búsqueda.

**Tabla 3.4.-** Identificación, por espectrometría de masas y búsqueda en las bases de datos, de las proteínas de células epiteliales intestinales que mostraron una expresión diferencial entre el intestino de ratones control e infectados con *Echinostoma caproni* a las 2 semanas postinfección, mediante la técnica 2D-DIGE.

metabólicas, con un total de 17 *spots* correspondientes a 14 proteínas diferentes. La mayoría de estas enzimas estuvieron infraexpresadas en el intestino de los animales infectados con *E. caproni*. Entre ellas se encontraron proteínas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos, como la proteína X del complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH), que supone el punto de enlace y regulación entre la glicólisis y el ciclo de Krebs, y la isocitrato deshidrogenasa 3 (IDH3), implicada también en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos; además de enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial, como la subunidad IV de la citocromo c oxidasa (CcO). En esta línea, cabe resaltar el descenso en la expresión de varias isoformas de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la flavoproteína transferidora de electrones (ETF), implicada en la transferencia de electrones a la cadena de transporte electrónico (ETC) de la membrana mitocondrial interna, en el íleon de los ratones parasitados. Asimismo, se observó un descenso en la expresión de algunas enzimas implicadas en la biosíntesis de los aminoácidos, entre ellas varias isoformas de la ornitina aminotransferasa (OAT); y en el metabolismo de los ácidos grasos, como la enoil-CoA hidratasa. Una de las isoformas de la OAT resultó la proteína más infraexpresada en el íleon de los animales infectados, con un AVR de -3,94. Entre las enzimas metabólicas sobrepresadas a las 2 *spi* con *E. caproni* cabe destacar dos isoformas de la enolasa B1, que si bien es una enzima citosólica implicada en la glicólisis, tiene un papel importante en la inflamación. También la L-lactato deshidrogenasa (LDH), que participa en el metabolismo anaeróbico del piruvato, y la aminoacilasa-1 (ACY1), involucrada en el catabolismo de los aminoácidos acilados. Además de las enzimas metabólicas y proteínas de la cadena de transporte electrónico se identificaron algunas proteínas estructurales, concretamente proteínas de filamentos intermedios citosólicos, como las queratinas (K) 8 y 19, las cuales estuvieron sobrepresadas en el íleon de ratones control e infectados, respectivamente; y de filamentos intermedios nucleares, como la lamina B, infraexpresada en el íleon de los animales infectados.

Entre las proteínas cuya expresión se vio regulada a la baja como consecuencia de la infección se identificaron también varias proteínas con dominios de unión a metales

de tipo alcohol-ácido hidrolasa, fumarilacetato hidrolasa y dominio de unión a Zn, y proteínas con dominios de unión a  $\text{Ca}^{+2}$  (dominio *EF-hand*). Se encontraron además enzimas relacionadas con el metabolismo de los aldehídos, proteínas con función detoxificadora (aldehído deshidrogenasa X) y antioxidante [manganeso superóxido dismutasa (MnSod)], y otras implicadas en el plegamiento y degradación de proteínas [disulfuro isomerasa A3 (PDIA3) y subunidad alfa-1 del proteasoma (PSMA1)]. Por otra parte, entre las proteínas sobrexpresadas en el íleon de los ratones infectados con *E. caproni* se identificaron varias proteínas unidoras de lípidos, como la apolipoproteína (Apo) A-I y proteínas unidoras de ácidos grasos (FABPs), tanto en su forma intestinal como hepática; y una proteína de unión a residuos azucarados, la galectina-2 (Gal2). Los detalles de identificación de todas las proteínas se recogen en la Tabla 3.4.

### **3.5.1.3. EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN EL INTESTINO DE RATAS INFECTADAS CON *ECHINOSTOMA CAPRONI***

Con la finalidad de identificar las proteínas directamente implicadas en la expulsión de *E. caproni* de la luz intestinal en hospedadores de baja compatibilidad, se analizaron las diferencias en los perfiles de expresión de proteínas a nivel del íleon de ratas control y a las 2 spi. La separación de las proteínas intestinales de ratas control e infectadas mediante electroforesis 2D resolvió un total de 686 *spots* con un 100% de presencia en todos los geles incluidos en el experimento 2D-DIGE. El análisis estadístico de los resultados, aplicando el test *t* de Student, reveló un total de 47 proteínas diferencialmente expresadas entre los grupos control e infectado ( $p < 0,05$ ), de los cuales ninguno superó el test FDR.

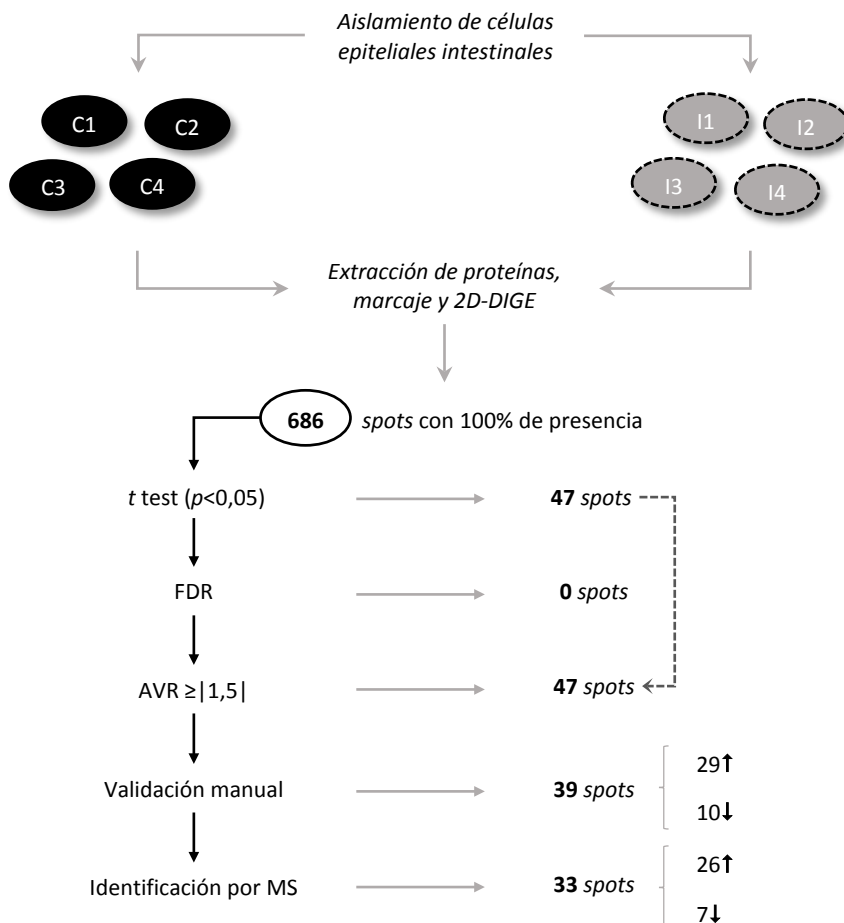
A diferencia de lo sucedido en ratón, el número total de *spots* resueltos en este caso resultó mucho más manejable para su validación manual y más abordable desde el punto de vista de la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas. Por este motivo, no fue necesario aplicar criterios de selección restrictivos y el valor del AVR se fijó en  $\pm 1,5$ . Todos los *spots* estadísticamente diferenciales (47) presentaron un AVR igual o superior a este valor de corte, por lo que fueron seleccionados para su validación manual.

Se pudo confirmar la correspondencia en todos los geles del experimento de 39 de estos *spots*, de los cuales 29 estaban sobreexpresados en el íleon de los animales parasitados, mientras que los 10 restantes mostraban una expresión disminuida como consecuencia de la infección. Del set de 39 *spots* validados, 33 pudieron ser extraídos del gel para su identificación por MS: 26 de ellos sobreexpresados y 7 regulados a la baja tras la infección. La Figura 3.45. muestra de forma esquemática los *spots* seleccionados para su identificación a partir del conjunto inicial de 686 con 100% de presencia.

**a) Resultados de los Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de Patrones por Agrupamiento Jerárquico**

El PCA aplicado al set de 686 *spots* de proteínas con un 100% de presencia en el experimento, realizado tomando como observaciones las réplicas biológicas y los *spots* como variables, no fue capaz de separar las distintas muestras en grupos diferenciados (Figura 3.46.). En el gráfico de puntuación (Figura 3.46. A) se observa como las réplicas biológicas de los grupos control e infectado no quedaron gráficamente separadas por los ejes definidos por el primer y segundo componente principal, indicando que cuando se consideran todos los *spots* resueltos en la electroforesis 2D la variabilidad existente entre las muestras no permite explicar su condición de infectado/no infectado. Este resultado no debe considerarse extraño puesto que del conjunto de *spots* incluidos en el análisis solo un 6,8% (47 de 686) presentaron diferencias estadísticamente significativas en su expresión cuando se aplicó el test *t* de Student ( $p < 0,05$ ), por lo que no tendrían peso suficiente para discriminar la razón biológica de las muestras en un conjunto tan grande de datos. Además, la correspondencia de los *spots* entre geles no había sido confirmada manualmente. En cualquier caso, es importante señalar que todas las muestras estuvieron representadas dentro de la elipse que delimita la normalidad (95% de confianza), descartando la existencia de valores atípicos entre las réplicas biológicas.

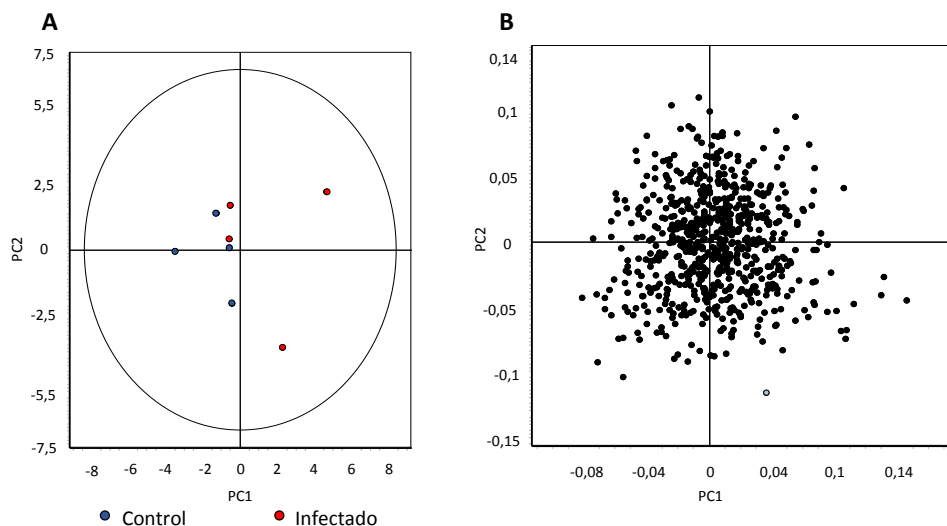
Cuando se realizó el PCA considerando únicamente los 47 *spots* de proteínas con expresión diferencial estadísticamente significativa ( $p < 0,05$  para el test *t* de Student), el nuevo análisis separó claramente los 2 grupos experimentales en el eje vertical, definido



**Figura 3.45.- Criterios de selección para la identificación de los spots diferencialmente expresados en el íleon de ratas control e infectadas con *Echinostoma caproni*.** Representación esquemática de los resultados de 2D-DIGE y de los criterios aplicados para la selección de los spots con expresión diferencial mayor y más significativa entre el íleon de ratas control (C) y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni* (I), los cuales fueron identificados mediante espectrometría de masas (MS). FDR: *False Discovery Rate*; AVR: *Average Volume Ratio*; (↑): *Spots* sobreexpresados en el íleon de las ratas infectados; (↓): *Spots* regulados a la baja en el íleon de ratas infectados.

por el PC1, tal y como se observa en la Figura 3.47. (A). En el gráfico de contribución (Figura 3.47. B) los 47 spots quedaron distribuidos a ambos lados del eje definido por el PC1. Estos resultados ponen de manifiesto que tras la exclusión de los spots no expresados diferencialmente se consigue reducir la variabilidad del conjunto de datos inicial, de tal

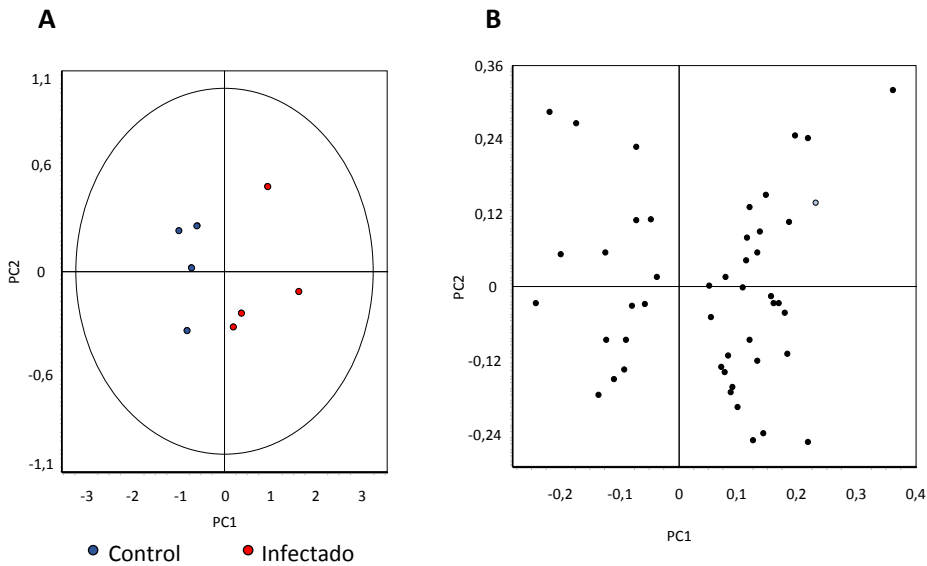




**Figura 3.46.- Análisis de componentes principales (PCA) de las proteínas del íleon de ratas control e infectadas con *Echinostoma caproni* resueltas mediante 2D-DIGE.** Representación gráfica de los resultados del PCA aplicado al set de 686 spots de proteína aislados del íleon de ratas control y las 2 semanas postinfección con *E. caproni*, los cuales estuvieron presentes en todos los geles incluidos en el experimento 2D-DIGE (100% de presencia). El análisis fue llevado a cabo con el módulo EDA del software *DeCyder*<sup>™</sup> tomando los spots como variables y las réplicas biológicas como observaciones. (A) Gráfico de puntuación: representa las diferentes réplicas biológicas sobre los ejes de coordenadas definidos por los componentes principales (PC) 1 y 2. (B) Gráfico de contribución: muestra la distribución de los 686 spots incluidos en el análisis sobre los mismos ejes.

manera que las diferencias existentes en la expresión los spots diferenciales permiten distinguir los dos tipos de muestras, agrupándolas de acuerdo con su razón biológica. Es decir, al considerar solo los spots expresados diferencialmente la variabilidad existente entre las réplicas biológicas es debida fundamentalmente a su condición infectado/no infectado.

Del mismo modo, el análisis de patrones por agrupamiento jerárquico aplicado al set de 47 proteínas con expresión diferencial separó gráficamente las muestras de acuerdo con su razón biológica, en base al perfil de expresión global para este conjunto de proteínas. Como se puede apreciar en la Figura 3.48., el dendrograma horizontal, que representa cada una de las réplicas biológicas analizadas, establece dos categorías

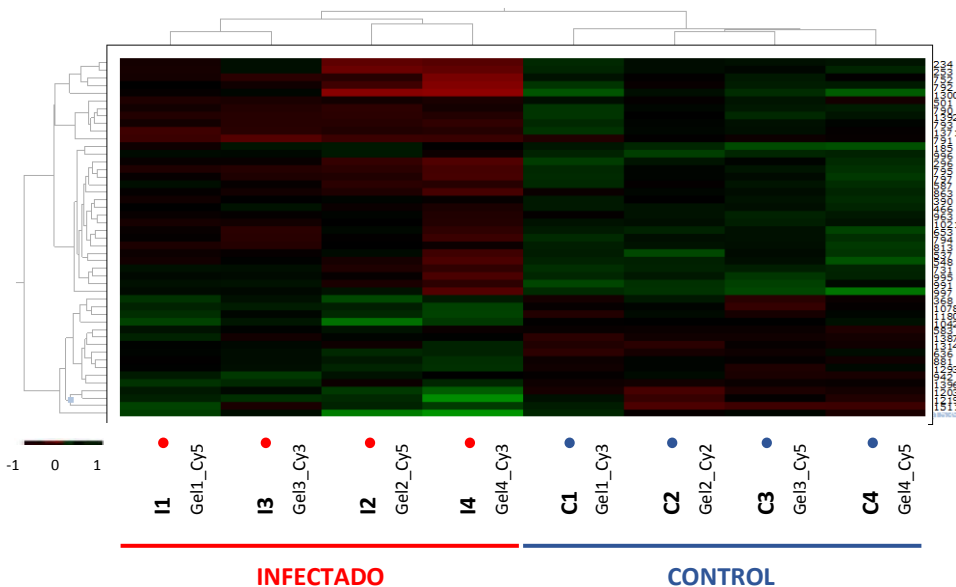


**Figura 3.47.- Análisis de componentes principales (PCA) de las proteínas diferencialmente expresadas en el íleon de ratas control e infectadas con *Echinostoma caproni*.** Representación gráfica de los resultados del PCA aplicado al set de 47 *spots* cuya expresión resultó significativamente diferente entre animales control y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni* ( $p < 0,05$ ), realizado con el módulo EDA del software *DeCyder™* tomando los *spots* como variables y las réplicas biológicas como observaciones. (A) Gráfico de puntuación: representa las diferentes réplicas biológicas sobre los ejes de coordenadas definidos por los componentes principales (PC) 1 y 2. (B) Gráfico de contribución: muestra la distribución de los 47 *spots* incluidos en el análisis sobre los mismos ejes.

principales, las cuales coinciden con los grupos experimentales infectado y control. Asimismo, el dendrograma vertical, que agrupa los *spots* proteicos en función de su perfil de expresión, separó también los *spots* en dos conjuntos principales, discriminando entre aquellas proteínas sobreexpresadas o infraexpresadas en un grupo experimental con respecto al otro.

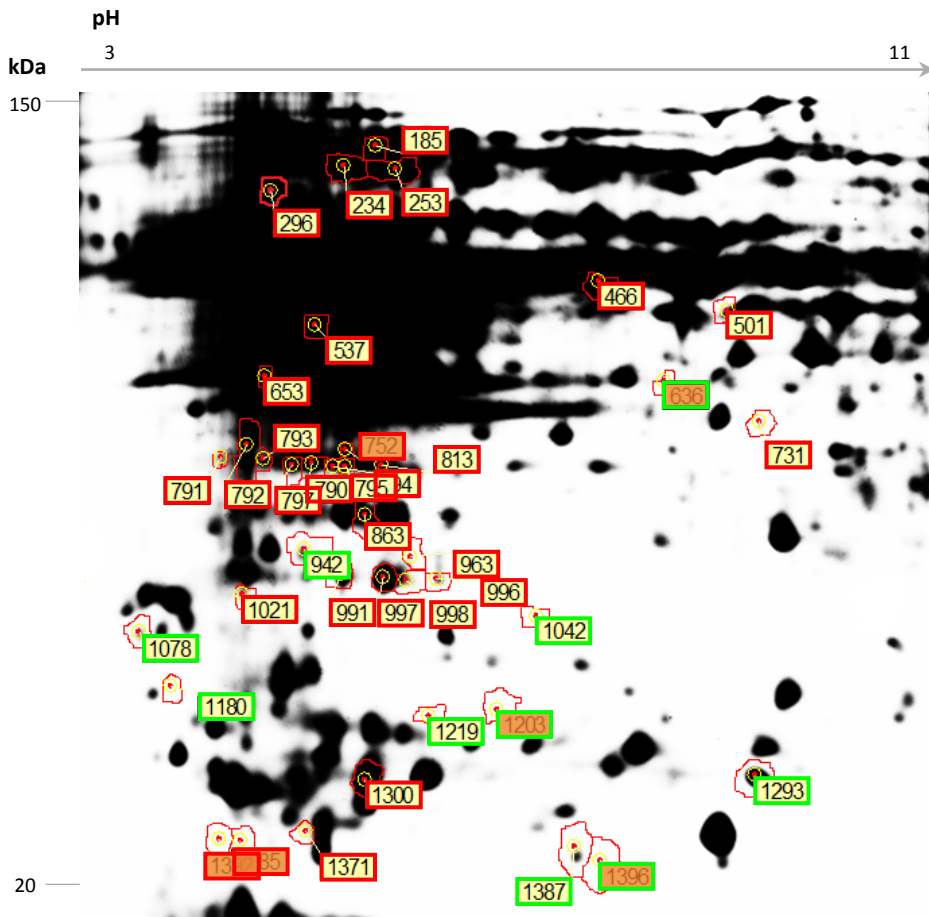
### ***b) Identificación por Espectrometría de Masas de las Proteínas Diferencialmente Expresadas***

La comparación cuantitativa de los dos proteomas reveló un total de 39 *spots* diferencialmente expresados entre animales control e infectados. En la Figura 3.49. se



**Figura 3.48.- Agrupamiento jerárquico de las proteínas diferencialmente expresadas en el íleon de ratas control e infectadas con *Echinostoma caproni*.** Mapa de calor generado con el módulo EDA del software *DeCyder™* tras la clasificación jerárquica del conjunto de los 47 *spots* diferencialmente expresados en el íleon de ratas control (C) y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni* (I) ( $p < 0,05$ ). El dendrograma vertical muestra la clasificación de las proteínas y el dendrograma horizontal agrupa las diferentes réplicas biológicas en función de la disimilitud entre ellas. Los números en el eje vertical (derecha) hacen referencia al identificador de cada *spot* en el gel de referencia. Las diferentes réplicas biológicas se indican en el eje horizontal. Las muestras correspondientes a animales infectados se representan con un punto rojo y los controles con un punto azul. Para cada réplica se indica el número del gel en el experimento y el fluoróforo con el que fue marcada.

muestra la imagen del gel de referencia sobre el que se indican los *spots* seleccionados para su identificación por MS y búsqueda en las bases de datos. De estos *spots*, 29 estaban sobrexpresados en el intestino de ratas infectadas y los 10 restantes mostraban un nivel de expresión inferior al de los controles, indicando que la infección con *E. caproni* induce cambios significativos en la expresión de proteínas en el íleon de las ratas infectadas. Un total de 33 *spots*, correspondientes a 26 *spots* sobrexpresados y 7 regulados a la baja, fueron identificadas con éxito. Los datos referentes a la identificación de las proteínas pueden consultarse en la Tabla 3.5. Cabe resaltar que de los 33 *spots* identificados algunos correspondieron a la misma proteína, por ejemplo la K19 y la anexina A4 fueron



**Figura 3.49.-** Imagen representativa del gel 2D-DIGE de las proteínas aisladas del íleon de ratas control e infectadas con *Echinostoma caproni*. Imagen de referencia seleccionada con el módulo BVA del software *DeCyder™* sobre la que se indican los *spots* diferencialmente expresados en el íleon de ratas control y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni*. Los *spots* de proteína sobreexpresados en el intestino de los animales infectados están señalados en rojo y los infraexpresados en verde. Los detalles de identificación, por espectrometría de masas, de las proteínas correspondientes se indican en la Tabla 3.5. Los *spots* sombreados en naranja no pudieron ser identificados.

identificadas en varios *spots* (7 y 5, respectivamente), sugiriendo la existencia de diferentes isoformas debidas a pequeñas variaciones en el pI y/o PM de las proteínas, haciendo que presenten distinta movilidad en los geles 2D (Görg *et al.*, 2004). Todas estas

**Tabla 3.5.-** Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el íleon de ratas infectadas con *Echinostoma caproni*

<i>Spot</i> <sup>a</sup>	Identificación	Especie (GI) <sup>b</sup>	<i>t</i> Test <sup>c</sup>	AVR <sup>d</sup>	Cobertura (%)	MASCOT score
<b>Enzimas metabólicas</b>						
501	Proteína Eno-1 (parcial)	<i>Rattus norvegicus</i> (3864932)	0,030	+ 1,5	74	2.319
731	Inhibidor A de la elastasa de leucocitos	<i>R. norvegicus</i> (72255515)	0,027	+ 1,7	51	1.435
863	Subunidad beta del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa, precursor mitocondrial	<i>R. norvegicus</i> (56090293)	0,049	+1,7	44	772
942	ADP-azúcar pirofosfatasa	<i>R. norvegicus</i> (56090301)	0,042	-1,6	42	710
1021	Proteína Coq9	<i>R. norvegicus</i> (51259441)	0,003	+1,7	40	567
1078	ADP/ATP translocasa sintasa 2	<i>Mus musculus</i> (22094075)	0,012	-1,8	25	377
1219	6-fosfogluconolactonasa	<i>R. norvegicus</i> (157823471)	0,032	-2,7	69	79
1293	Peroxiirredoxina-3	<i>R. norvegicus</i> (118597399)	0,041	-1.5	38	76
1371	Peroxiirredoxina-1 tipo II	<i>M. musculus</i> (3603241)	0,005	+1,7	18	478
<b>Proteínas estructurales</b>						
234	T-plastina	<i>R. norvegicus</i> (57381)	0,041	+2,2	21	89
466	Queratina, tipo II citoesquelética 8	<i>R. norvegicus</i> (40786432)	0,041	+1,7	41	59
537	Citoqueratina 8 polipéptido	<i>R. norvegicus</i> (203734)	0,031	+2,0	22	494
653	Actina, alfa 1, músculo esquelético, isoforma CRA_a	<i>R. norvegicus</i> (149043182)	0,016	+1,9	47	160
790	Queratina, tipo I citoesquelética 19	<i>R. norvegicus</i> (42409519)	0,002	+1,9	86	2.378
791	Queratina, tipo I citoesquelética 19	<i>R. norvegicus</i> (42409519)	0,001	+1,6	27	541

792	Citoqueratina 8 polipéptido	<i>R. norvegicus</i> (203734)	0,041	+2,4	20	352
797	Queratina, tipo I citoesquelética 19	<i>R. norvegicus</i> (42409519)	0,013	+2,2	27	85
793	Queratina, tipo I citoesquelética 19	<i>R. norvegicus</i> (42409519)	0,003	+1,9	48	1.467
794	Queratina, tipo I citoesquelética 19	<i>R. norvegicus</i> (42409519)	0,015	+2,0	73	1.877
795	Queratina, tipo I citoesquelética 19	<i>R. norvegicus</i> (42409519)	0,002	+2,1	37	881
813	Queratina, tipo I citoesquelética 19	<i>R. norvegicus</i> (42409519)	0,009	+1,8	31	167
<b>Proteínas unidoras de calcio</b>						
963	Anexina A4	<i>R. norvegicus</i> (55742832)	0,043	+1,6	36	775
991	Anexina A4	<i>R. norvegicus</i> (55742832)	0,033	+1,8	46	1.185
996	Anexina A4	<i>R. norvegicus</i> (55742832)	0,014	+1,5	76	2.308
997	Anexina A4	<i>R. norvegicus</i> (55742832)	0,031	+2,4	29	99
998	Anexina A4	<i>R. norvegicus</i> (55742832)	0,045	+1,8	51	1.894
1300	Calcineurina B (proteína homóloga 2)	<i>R. norvegicus</i> (33285021)	0,027	+3,8	36	163
<b>Chaperonas</b>						
185	Proteína similar a HSP 71 kDa	<i>R. norvegicus</i> (13242237)	0,034	+1,7	26	215
296	BiP	<i>M. musculus</i> (2598562)	0,045	+2,1	31	834
<b>Proteínas de señalización celular</b>						
1180	14-3-3 isoforma zeta	<i>R. norvegicus</i> (1051270)	0,023	-1,8	28	224

<b>Proteínas unidoras de metales</b>						
1387	Ferritina (cadena pesada)	<i>R. norvegicus</i> (6978859)	0,044	-1,5	54	1.201
<b>Proteínas del metabolismo de ácidos nucleicos</b>						
1042	Prohibitina	<i>M. musculus</i> (6679299)	0,018	-1,8	58	778
<b>Reactantes de fase aguda</b>						
253	Albúmina sérica	<i>Mesocricetus auratus</i> (298351527)	0,048	+2,4	17	545

<sup>a</sup> El número de *spot* está referido a la Figura 3.49.

<sup>b</sup> Número GI de acceso de la proteína en la base de datos de proteínas del NCBI.

<sup>c</sup> Valor de *p* obtenido en el test *t* de Student.

<sup>d</sup> AVR: *Average Volume Ratio*.

**Tabla 3.5.-** Identificación, por espectrometría de masas y búsqueda en las bases de datos, de las proteínas de células epiteliales intestinales que mostraron una expresión diferencial entre el intestino de ratas control e infectadas con *Echinostoma caproni* a las 2 semanas postinfección, mediante la técnica 2D-DIGE.

isoformas estuvieron reguladas al alza en el íleon de las ratas infectadas en un rango entre 1,6 y 1,9 para la K19 y de 1,5 a 2,2 en el caso de la anexina A4.

Desde el punto de vista de la función biológica que ejercen las proteínas identificadas, estas fueron clasificadas en 7 grupos funcionales, entre los que destacaron las proteínas estructurales y las enzimas metabólicas por ser las más abundantes. Se identificaron un total de 12 *spots* correspondientes a proteínas estructurales, si bien 10 de ellos fueron identificados como isoformas de K8 (3 *spots*) y K19 (7 *spots*), que son proteínas citoesqueléticas que se unen para formar los filamentos intermedios de las células epiteliales. Se identificaron además actina, que forma los microfilamentos del esqueleto celular, y T-plastina, una proteína de entrecruzamiento de los filamentos de actina que participa en la estabilización y remodelación de los mismos. Otras 9 proteínas fueron clasificadas como enzimas metabólicas, las cuales resultaron estar implicadas en diferentes rutas y procesos celulares como el metabolismo de los carbohidratos [enolasa 1 y una subunidad del complejo PDH, ambas sobrepresadas en el intestino de las ratas parasitadas]; la vía de las pentosas fosfato (6-fosfogluconolactonasa) o el intercambio ADP/ATP (ADP-azúcar pirofosfatasa y ADP/ATP translocasa sintasa 2), todas ellas reguladas a la baja tras la infección. De hecho, la 6-fosfogluconolactonasa fue la proteína más infraexpresada como consecuencia de la infección por *E. caproni*, con un incremento negativo de -2,7 veces en el íleon de los animales parasitados. Se identificaron también 2 enzimas antioxidantes tipo peroxirredoxina (Prdx), que presentaron valores de AVR de -1,5 y +1,7, respectivamente. Los demás grupos funcionales estuvieron menos representados. Se identificaron proteínas unidoras de  $\text{Ca}^{+2}$ , entre ellas 5 isoformas de anexina A4 y la proteína homóloga 2 de calcineurina B, todas sobrepresadas en el íleon de las ratas parasitadas. La proteína homóloga de calcineurina B fue la que mostró un mayor aumento en su expresión a consecuencia de la infección. Se trata de una enzima dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  que actúa como cofactor esencial de los intercambios  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  en la membrana plasmática e interviene en la regulación de la proliferación celular, la cual mostró un incremento de +3,8 en los extractos proteicos obtenidos a partir de animales



infectados. Por su parte, las anexinas son una familia de proteínas que unen fosfolípidos y carbohidratos en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  y están implicadas en varios mecanismos de reparación celular y tisular. Finalmente, otras proteínas identificadas fueron chaperonas (BiP, proteína similar a HSP de 71 kDa), proteínas implicadas en el metabolismo de los ácidos nucleicos (prohibitina), proteínas unidoras de metales (cadena pesada de ferritina), así como proteínas implicadas en la transducción de señales y reactantes de fase aguda (una 14-3-3 y albúmina sérica, respectivamente) (Tabla 3.5.).

### 3.5.2. GLICOSILACIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS

La glicosilación es una de las principales modificaciones postraduccionales a la que pueden verse sometidas las proteínas en las células eucariotas. Este proceso tiene lugar a nivel del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y puede afectar a la función biológica de las proteínas, su localización subcelular y/o sus propiedades bioquímicas.

#### 3.5.2.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL

Dada la importancia que pueden tener los cambios en la glicosilación sobre la función de las proteínas y, en vista de que el número de proteínas expresadas diferencialmente de forma significativa en el íleon de ratas control y a las 2 spi con *E. caproni* resultó relativamente reducido, se consideró oportuno investigar las alteraciones inducidas por la infección sobre el glicoproteoma del íleon de rata por su posible trascendencia tanto en el establecimiento del parásito como en la expulsión de los vermes alojados en el lumen intestinal. Para ello, los mismos extractos empleados para el estudio de la expresión diferencial de proteínas se separaron por electroforesis 2D, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se enfrentaron a un total de 5 lectinas diferentes, las cuales reconocen residuos azucarados distintos [Véase Capítulo II, Apartado 2.9.3. (Tabla 2.4.)]. Se compararon los patrones de reconocimiento con cada lectina entre las muestras procedentes de animales infectados y control y los *spots* que resultaron diferencialmente glicosilados fueron seleccionados para su identificación por MS (Tabla 3.6.).

**Tabla 3.6.-** Identificación de proteínas diferencialmente glicosiladas en el íleon de ratas infectadas con *Echinostoma caproni*

<b>Spot<sup>a</sup></b>	<b>Identificación</b>	<b>Especie (GI)<sup>b</sup></b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>MASCOT score</b>	<b>Lectina</b>	<b>Ratas control</b>	<b>Ratas infectadas</b>
<b>Enzimas metabólicas</b>							
1	Aminopeptidasa citosólica	<i>Rattus norvegicus</i> (81884348)	6	86	DSA	+	-
2	Proteasa 26S, subunidad reguladora 7	<i>R. norvegicus</i> (2492518)	8	299	DSA	+	-
3	Piruvato quinasa tipo L	<i>R. norvegicus</i> (206199)	6	110	DSA	-	+
4	Proteína asociada a disulfuro isomerasa 3, isoforma CRA_a	<i>R. norvegicus</i> (149023097)	45	1.389	MAA	+	-
5	Aldehído deshidrogenasa, precursor mitocondrial	<i>R. norvegicus</i> (14192933)	31	1.195	MAA	-	+
6	ATP sintasa, subunidad beta	<i>R. norvegicus</i> (1374715)	85	2.912	SNA	+	-
7	ATP sintasa, subunidad beta	<i>R. norvegicus</i> (1374715)	56	2.954	SNA	+	-
<b>Proteínas estructurales</b>							
8	Vilina-1	<i>R. norvegicus</i> (149016109)	8	301	PNA	+	-

<sup>a</sup> El número de spot está referido a las Figuras 3.50.-3.53.

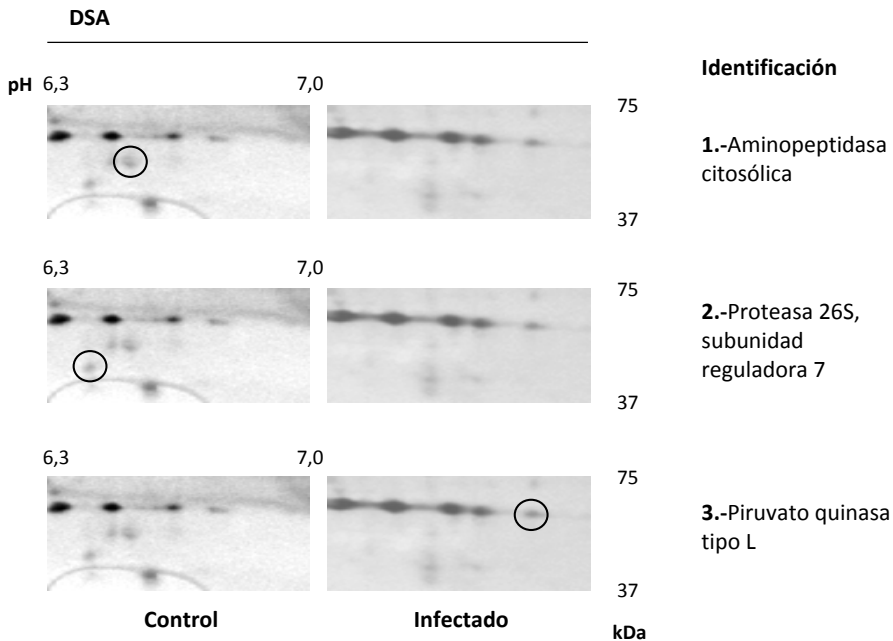
<sup>b</sup> Número GI de acceso de la proteína en la base de datos de proteínas del NCBI.

**Tabla 3.6.-** Identificación, por espectrometría de masas y búsqueda en las bases de datos, de las proteínas de células epiteliales intestinales que, mediante *blotting* con lectinas, mostraron una glicosilación diferencial en el intestino de ratas control e infectadas con *Echinostoma caproni* a las 2 semanas postinfección.

### 3.5.2.2. GLICOSILACIÓN DIFERENCIAL EN EL INTESTINO DE RATAS INFECTADAS CON *ECHINOSTOMA CAPRONI*

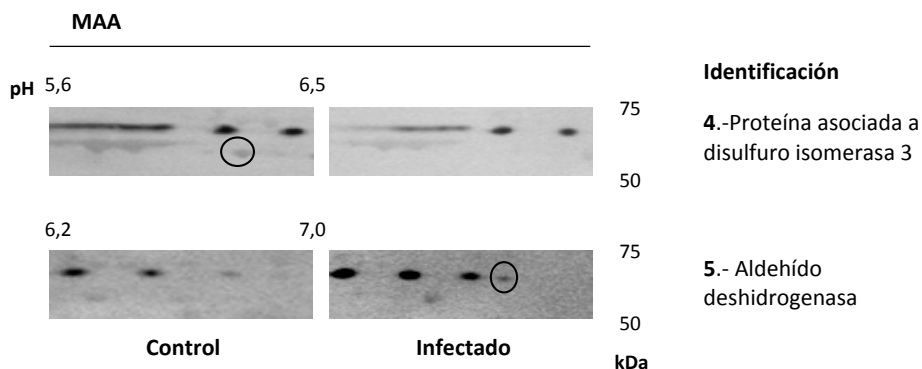
Un total de 8 *spots* resultaron diferencialmente reconocidos por las lectinas entre las membranas de animales control e infectados. Las Figuras 3.50.-3.53. muestran los fragmentos de membrana en que las proteínas intestinales de ratas control e infectadas con *E. caproni* fueron diferencialmente reconocidas por las lectinas correspondientes. De ellos, 6 estuvieron marcados únicamente en las muestras de animales control, mientras que otros 2 *spots* tan solo fueron reconocidos en los extractos proteicos procedentes de animales infectados. Estos resultados ponen de manifiesto que la infección con *E. caproni* induce cambios en el estatus de glicosilación de algunas proteínas intestinales, sugiriendo que la presencia del parásito en el intestino reduce principalmente la presencia de residuos de ácido siálico y de tipo galactosa sobre estas proteínas. De los *spots* reconocidos exclusivamente en las membranas correspondientes a animales control, 2 fueron reconocidos por DSA (aglutinina de *Datura stramonium*) (Figura 3.50.), que une residuos Gal/GlcNAc y GalNAc-Ser/Thr, y otros 3 resultaron marcados con MAA (aglutinina de *Maackia amurensis*) (1 *spot*) (Figura 3.51.) y SNA (2 *spots*) (Figura 3.52.), que reconocen residuos tipo NeuNAc/Gal con conformación diferente. Un sexto *spot* resultó marcado con PNA antes de la infección, indicando la presencia de residuos Gal/NAcGal en esta proteína en condiciones normales (Figura 3.53.). Sin embargo, el marcaje de este *spot* se volvió negativo a las 2 *spi* con *E. caproni*. Los 2 *spots* reconocidos únicamente en los filtros de animales infectados se marcaron con DSA y MAA, respectivamente (Figuras 3.50. y 3.51.). Finalmente, cabe resaltar que no se observaron diferencias entre animales control e infectados cuando se empleó la lectina GNA (aglutinina de *Galanthus nivalis*), que reconoce residuos de manosa (Man)/Glu (resultados no mostrados).

Los 8 *spots* fueron identificados con éxito, encontrándose 7 proteínas diferentes (Tabla 3.6.). Desde el punto de vista funcional, la gran mayoría de las proteínas identificadas fueron clasificadas como enzimas metabólicas y solo una correspondió a una proteína estructural (vilina-1). Entre las enzimas metabólicas se encontraron enzimas glicolíticas (piruvato quinasa tipo L); proteínas del metabolismo proteico (proteína

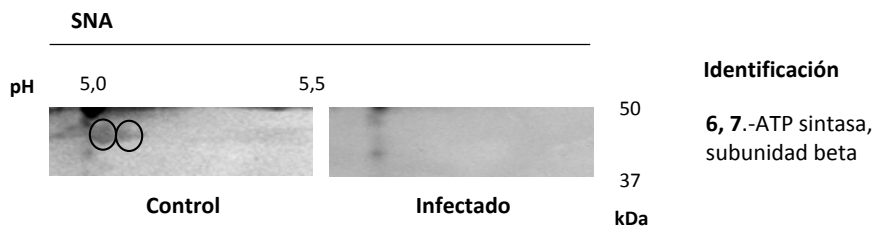


**Figura 3.50.- Glicosilación diferencial de proteínas del íleon de rata inducida por la infección con *Echinostoma caproni* detectada con la lectina DSA.** Blotting con DSA a partir de geles SDS-PAGE bidimensionales del extracto proteico de células epiteliales intestinales aisladas de ratas control y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni*. Los círculos señalan los *spots* que mostraron un estatus de glicosilación diferente entre los dos tipos de muestras. A la derecha de la figura se indican las proteínas correspondientes a cada *spot*, identificadas por espectrometría de masas y búsqueda en las bases de datos, cuyos detalles de identificación se recogen en la Tabla 3.6.

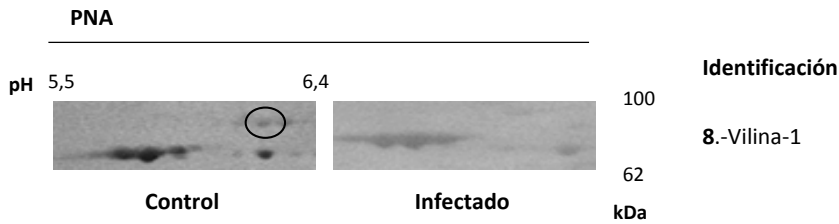
asociada a disulfuro isomerasa, citosol aminopeptidasa y la subunidad reguladora 7 de la proteasa 26S); enzimas del metabolismo energético [subunidad beta de la ATP sintasa (2 *spots*)] y una proteína con función detoxificadora (aldehído deshidrogenasa).



**Figura 3.51.-** Glicosilación diferencial de proteínas del íleon de rata inducida por la infección con *Echinostoma caproni* detectada con la lectina MAA. Blotting con MAA a partir de geles SDS-PAGE bidimensionales del extracto proteico de células epiteliales intestinales aisladas de ratas control y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni*. Los círculos señalan los spots que mostraron un estatus de glicosilación diferente entre los dos tipos de muestras. A la derecha de la figura se indican las proteínas correspondientes a cada spot, identificadas por espectrometría de masas y búsqueda en las bases de datos, cuyos detalles de identificación se recogen en la Tabla 3.6.



**Figura 3.52.-** Glicosilación diferencial de proteínas del íleon de rata inducida por la infección con *Echinostoma caproni* detectada con la lectina SNA. Blotting con SNA a partir de geles SDS-PAGE bidimensionales del extracto proteico de células epiteliales intestinales aisladas de ratas control y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni*. Los círculos señalan los spots que mostraron un estatus de glicosilación diferente entre los dos tipos de muestras. A la derecha de la figura se indican las proteínas correspondientes a cada spot, identificadas por espectrometría de masas y búsqueda en las bases de datos, cuyos detalles de identificación se recogen en la Tabla 3.6.



**Figura 3.53.- Glicosilación diferencial de proteínas del ileon de rata inducida por la infección con *Echinostoma caproni* detectada con la lectina PNA.** *Blotting* con PNA a partir de geles SDS-PAGE bidimensionales del extracto proteico de células epiteliales intestinales aisladas de ratas control y a las 2 semanas postinfección con *E. caproni*. Los círculos señalan los *spots* que mostraron un estatus de glicosilación diferente entre los dos tipos de muestras. A la derecha de la figura se indican las proteínas correspondientes a cada *spot*, identificadas por espectrometría de masas y búsqueda en las bases de datos, cuyos detalles de identificación se recogen en la Tabla 3.6.

### 3.6. ESTUDIO DE LA RENOVACIÓN DEL EPITELIO INTESTINAL EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *ECHINOSTOMA CAPRONI*

---

El epitelio intestinal está sujeto a un proceso de renovación continua que en el intestino delgado comienza a nivel de las criptas de Lieberkühn. En este compartimento, las células madre intestinales se dividen continuamente y las células recién formadas se desplazan a lo largo de la superficie interna de la cripta, al tiempo que se van diferenciando en células epiteliales especializadas. El proceso de migración continúa a lo largo del eje de la vellosidad, en dirección al lumen, hasta que al alcanzar el extremo las células mueren y son descamadas (Yen & Wright, 2006; Simons & Clevers, 2011). Los helmintos intestinales mantienen un contacto estrecho con el tejido epitelial, de manera que las alteraciones que afectan a la estructura y homeostasis de este tejido pueden ser determinantes para la evolución de la infección. En este sentido, el aumento de la tasa de recambio epitelial en respuesta a la infección puede afectar al establecimiento del parásito, facilitando que sea rápidamente expulsado (Cliffe *et al.*, 2005).

### 3.6.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL

Con el objetivo de analizar los cambios que se producen en el proceso de renovación del epitelio intestinal en respuesta a la infección con *E. caproni*, se realizaron experimentos de pulso y caza con BrdU para determinar la tasa de recambio epitelial en el íleon de hospedadores de alta y baja compatibilidad y evaluar su efecto sobre la evolución de la infección. Para ello se emplearon ratones ICR macho, de 5 semanas de edad (30 y 35 g de peso) y ratas Wistar macho, de 3 semanas de edad (80-100 g). Un total de 30 ratones y 20 ratas fueron infectados experimentalmente con *E. caproni*, con dosis de 75 y 100 metacercarias, respectivamente. Otros 10 animales de cada especie se mantuvieron sin infectar y se emplearon como controles negativos. A todos los animales, infectados y controles, se les inyectó una solución de BrdU por vía intraperitoneal de acuerdo con el protocolo anteriormente descrito (véase Capítulo II, Apartado 2.7.1.1.). Bisemanalmente, desde el momento de la infección, 10 animales de cada especie eran sacrificados, 5 de ellos 1 h tras la administración de BrdU y los 5 restantes transcurridas 24 h desde la inyección. De estos animales se extrajeron segmentos de intestino delgado, correspondientes a la zona de anclaje de los adultos, a partir de los cuales se obtuvieron los cortes histológicos sobre los que se realizaron las pruebas de inmunohistoquímica anti-BrdU. El experimento se extendió hasta las 6 spi en el caso de los ratones, que desarrollan infecciones de carácter crónico con *E. caproni*, mientras que en las ratas, que son hospedadores de baja compatibilidad, se analizaron solamente las semanas 2 y 4 pi, puesto que a partir de la cuarta semana se inicia la desparasitación natural de este hospedador.

### 3.6.2. RENOVACIÓN DEL EPITELIO INTESTINAL EN RATÓN Y RATA INFECTADOS CON *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Para la caracterización del proceso de recambio epitelial en respuesta a la infección con *E. caproni* se analizaron diferentes parámetros: (I) número de células marcadas con BrdU por cripta, transcurrida 1 h desde la administración intraperitoneal del nucleósido halogenado; (II) distribución posicional de las células marcadas en el tejido en

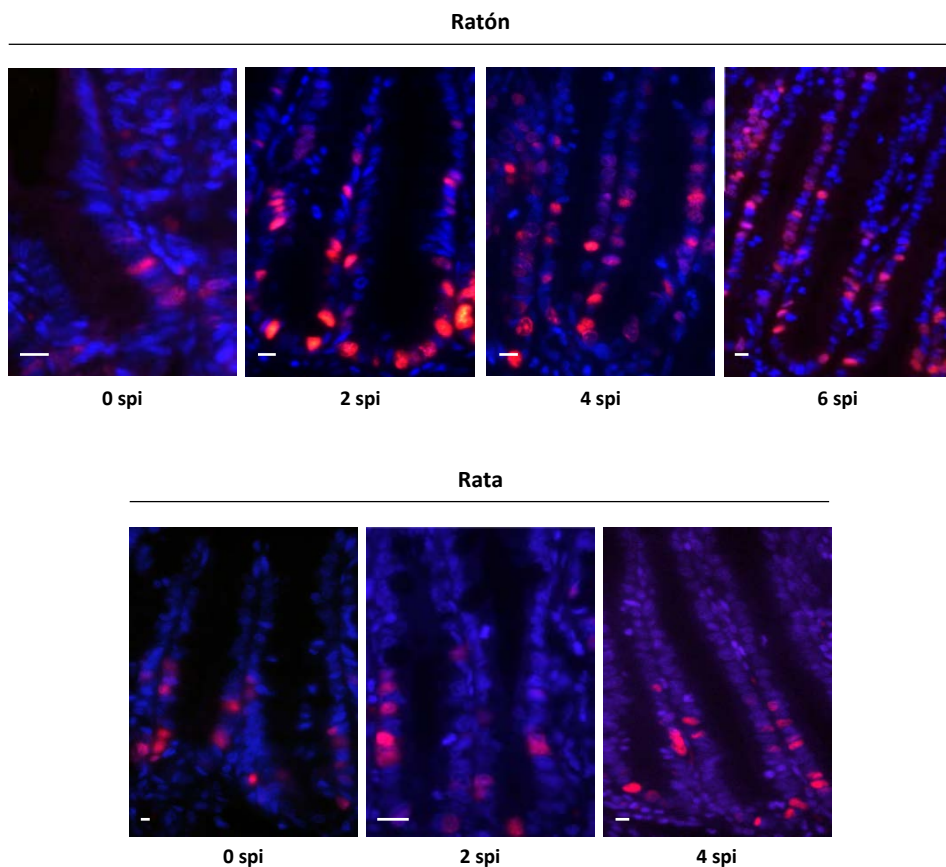
este tiempo postadministración; (III) número de posiciones recorridas por las células marcadas en 23 h; y (IV) velocidad de desplazamiento de las células en el eje criptavillosidad y tasa de recambio epitelial. Los resultados obtenidos en cada especie hospedadora se describen a continuación.

### **3.6.2.1. NIVELES DE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES Y DISTRIBUCIÓN POSICIONAL DE LAS CÉLULAS MARCADAS CON BrdU**

Los niveles de proliferación de las células del epitelio intestinal en ratones y ratas infectados con *E. caproni* y su distribución en el tejido se analizaron empleando secciones intestinales de animales control e infectados, sacrificados 1 h tras la administración de BrdU. La Figura 3.54. muestra las imágenes de inmunohistoquímica con anti-BrdU sobre secciones intestinales de ratones y ratas, en las que se pueden observar las células proliferativas en los animales control y en diferentes semanas postinfección con *E. caproni*. Sobre estas secciones se recontó inicialmente el número de células marcadas en un total de 50 medias UVC, tal y como se describió anteriormente (véase Capítulo II, Apartado 2.7.2.). Sin embargo, en el análisis de las muestras de ratón se observó que el número de células por cripta aumentaba en los animales infectados respecto de los controles, por lo que con la finalidad de proporcionar un resultado más estandarizado se recontaron las células epiteliales totales en cada cripta y se calculó el porcentaje de células marcadas (Figura 3.55.). La valoración estadística de los resultados en cada hospedador se realizó mediante ANOVA de dos factores, fijando el tiempo postinfección y la condición infectado/no infectado como variables independientes.

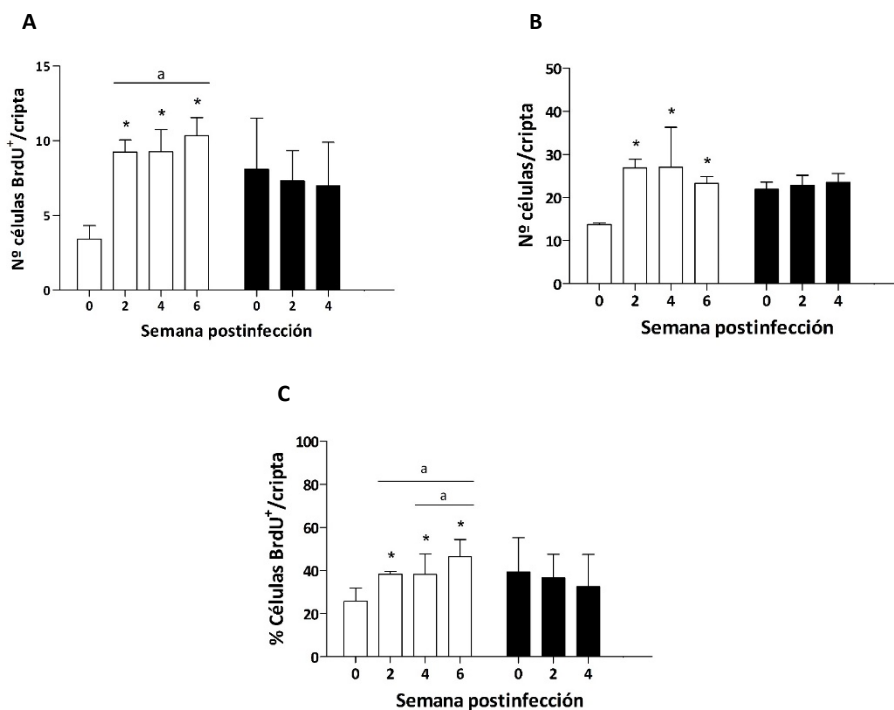
Transcurrida 1 h desde la administración intraperitoneal todas las células marcadas con BrdU estuvieron localizadas a nivel de las criptas de Lieberkühn en ambos hospedadores. El recuento de las células BrdU<sup>+</sup> puso de manifiesto que en los ratones infectados con *E. caproni* se produce un aumento significativo en los niveles de proliferación celular en el lugar de la infección, reflejado en el incremento del número de células marcadas por cripta desde la 2<sup>a</sup> spi ( $p < 0,001$ ). Asimismo, el número de células





**Figura 3.54.-** Inmunohistoquímica anti-5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) en el íleon de ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*. Imágenes de microscopía de fluorescencia para la inmunohistoquímica anti-BrdU (rosa) sobre secciones intestinales de hospedadores control [0 semanas postinfección (spi)] e infectados con *E. caproni* obtenidas a 1 h postadministración de BrdU. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). Nótese el aumento en el tamaño de las criptas y el número de células marcadas con BrdU en las secciones correspondientes a los ratones infectados con *E. caproni* (2 a 6 spi) respecto de los controles (0 spi).

marcadas a las 6 spi fue significativamente mayor que en las semanas anteriores ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.55. A). El recuento del número de células por cripta confirmó la observación inicial, detectándose un aumento significativo desde las 2 spi ( $p < 0,001$ ), lo que indica que la infección induce hiperplasia de las criptas de Lieberkühn en los ratones parasitados



**Figura 3.55.- Niveles de proliferación de las células epiteliales intestinales en el íleon de ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*.** Recuento de células proliferativas, marcadas con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU<sup>+</sup>), en el íleon de ratones (barras blancas) y ratas (barras negras) en diferentes semanas postinfección (spi) con *E. caproni*, 1 h después de la administración intraperitoneal de BrdU. (A) Número de células proliferativas por cripta de Lieberkühn. (B) Número de células totales por cripta. (C) Porcentaje de células marcadas por cripta. Las barras verticales representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control negativo (0 spi) para cada hospedador ( $p < 0,001$ ). Las líneas horizontales señalan diferencias significativas entre las distintas spi en cada hospedador (a:  $p < 0,05$ ).

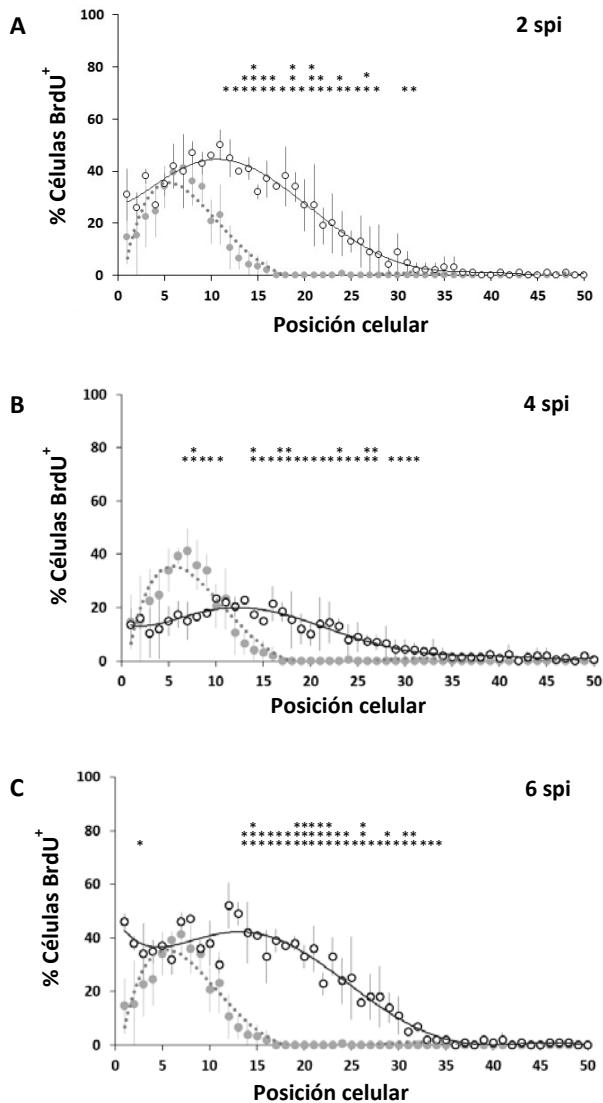
(Figura 3.55. B). La Figura 3.55. (C) muestra cómo, a pesar de que el número de células por cripta aumentó significativamente como consecuencia de la infección, el porcentaje de células marcadas con BrdU fue también más elevado en los ratones infectados que en los controles ( $p < 0,001$ ), siendo mayor en la 6 spi que en las semanas previas ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, en las ratas infectadas con *E. caproni*, tanto el número de células BrdU<sup>+</sup> como el porcentaje de células marcadas por cripta fue ligeramente menor en los animales infectados que en los controles, si bien no se detectaron diferencias estadísticamente

significativas en el número y porcentaje de células marcadas, como tampoco en el número total de células por cripta.

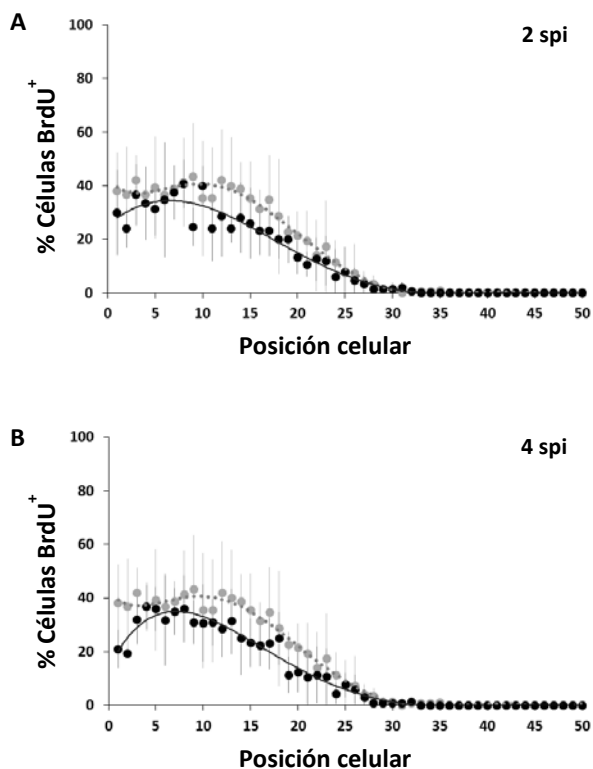
A la vista de estos resultados se pudo apreciar que las tasas de proliferación basales, a las 0 spi, son muy diferentes entre las dos especies hospedadoras (Figura 3.55.). La comparación estadística de los resultados obtenidos en el íleon de ratones y ratas control mediante el test *t* de Student para muestras no relacionadas puso de manifiesto que tanto el número de células por cripta ( $p < 0,0001$ ), como el número y el porcentaje de células marcadas ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,001$ , respectivamente), eran significativamente más elevados en ratas que en ratones. Estas diferencias interespecíficas basales implican que los resultados obtenidos en cada especie hospedadora en relación con el tiempo postinfección no puedan ser comparados estadísticamente.

El análisis de la distribución posicional de las células marcadas con BrdU en el tejido intestinal confirmó los resultados observados hasta el momento. Para la realización de este estudio en cada cripta analizada se anotó la posición ocupada por cada una de las células marcadas. La posición 1 correspondió a la célula más próxima a la base de la cripta, siguiendo el conteo en dirección ascendente hacia el extremo de las vellosidades. Las Figuras 3.56. y 3.57. muestran el porcentaje de células marcadas en cada posición en ratones y ratas infectados con *E. caproni*, respectivamente, respecto de los controles no infectados.

En el caso de los ratones infectados se observó el desplazamiento de la curva de tendencia hacia la derecha del gráfico con respecto a la curva control en los tres tiempos postinfección analizados (Figura 3.56. A-C). Este resultado refleja, por una parte, que el número de células marcadas en el intestino de los animales infectados fue mayor que en los controles, como se desprende de los resultados anteriores (Figura 3.55.). Al mismo tiempo, indica que las células marcadas habían avanzado más en el eje de la cripta, puesto que en el intestino de los ratones parasitados se encontraron porcentajes más elevados



**Figura 3.56.- Distribución posicional de las células marcadas con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU<sup>+</sup>) en el íleon de ratones infectados con *Echinostoma caproni*.** Porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> en cada posición (0 a 50) en el íleon de ratones control (círculos grises) y en diferentes semanas postinfección (spi) con *E. caproni* (círculos blancos) transcurrida 1 h desde la administración intraperitoneal de BrdU. Las barras verticales representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias significativas entre animales control e infectados (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). En cada gráfico se representan las líneas de tendencia de las diferentes series de datos. La línea de puntos representa la tendencia de la serie de datos correspondiente al grupo de animales control (0 spi) y la línea continua corresponde a los animales infectados (2, 4 o 6 spi).



**Figura 3.57.- Distribución posicional de las células marcadas con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU<sup>+</sup>) en el íleon de ratas infectadas con *Echinostoma caproni*.** Porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> en cada posición (0 a 50) en el íleon de ratas control (círculos grises) y en diferentes semanas postinfección (spi) con *E. caproni* (círculos negros) transcurrida 1 h desde la administración intraperitoneal de BrdU. Las barras verticales representan la desviación estándar. En cada gráfico se representan las líneas de tendencia de las diferentes series de datos. La línea de puntos representa la serie de datos correspondiente al grupo de animales control (0 spi) y la línea continua corresponde a los animales infectados (2 o 4 spi).

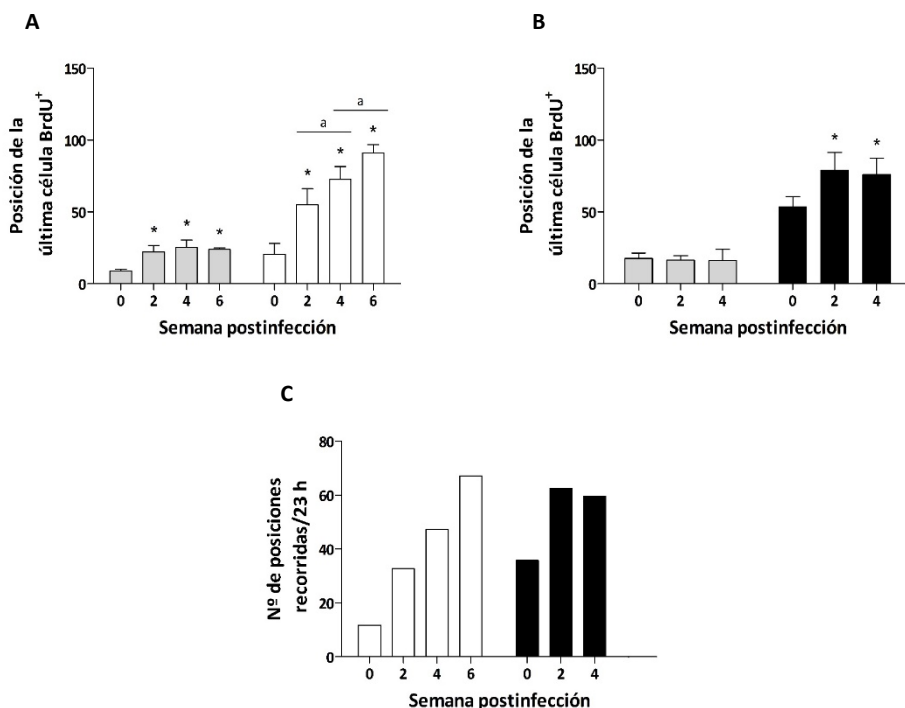
de células marcadas en posiciones mucho más alejadas de la base de la cripta que en los animales no infectados ( $p < 0,05$ ). Aunque esta tendencia se mantuvo en todas las semanas postinfección analizadas, en la Figura 3.56. puede apreciarse como los gráficos correspondientes a las 2 y 6 spi (A y C) mostraron un perfil similar, mientras que la apariencia de la gráfica para las 4 spi (B) fue ligeramente distinta. En este caso, el porcentaje de células marcadas en las posiciones más próximas a la base de la cripta fue significativamente inferior en los animales infectados que en los controles [posiciones 5 a

9 ( $p<0,05$ )). No obstante, este resultado es poco relevante porque tanto el número total como el porcentaje de células marcadas por cripta fueron significativamente superiores en los animales infectados que en los controles para este tiempo postinfección (véase Figura 3.55.). Así pues, lo más destacado es que se mantuvo la misma tendencia observada en los demás tiempos postinfección analizados, apareciendo la curva desplazada hacia la derecha del gráfico e indicando que las células marcadas alcanzaron posiciones más alejadas en el intestino de los animales infectados que en los controles.

Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células marcadas en ninguna posición en el caso de las ratas infectadas. Tal y como se aprecia en la Figura 3.57., la distribución de las células BrdU<sup>+</sup> mostró una tendencia similar a la de los controles tanto a las 2 como a las 4 spi.

### **3.6.2.2. TASA DE RENOVACIÓN DEL EPITELIO INTESTINAL EN EL ÍLEON DE RATÓN Y RATA INFECTADOS CON *ECHINOSTOMA CAPRONI***

Para determinar la velocidad de recambio del epitelio intestinal en cada hospedador fue necesario conocer la posición ocupada por la última célula BrdU<sup>+</sup> al cabo de 1 y 24 h desde la administración intraperitoneal, y así poder calcular el número de posiciones celulares recorridas en el eje cripta-vellosidad durante este intervalo (23 h). La Figura 3.58. (A y B) muestra, para cada hospedador, la posición de la última célula BrdU<sup>+</sup> en los dos tiempos postadministración analizados antes y después de la infección con *E. caproni*. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que el avance de las células marcadas fue significativamente mayor en los animales infectados de ambas especies que en los correspondientes controles negativos ( $p<0,0001$ ). En ratones infectados con *E. caproni* la posición de la última célula marcada resultó significativamente mayor en los animales infectados que en los controles desde la primera hora postadministración de BrdU (Figura 3.58. A), coincidiendo con los resultados observados en el análisis de la distribución posicional de las células marcadas (véase Figura 3.56.). Al cabo de 1 h postadministración la posición ocupada por la última célula BrdU<sup>+</sup> fue similar en las tres semanas postinfección analizadas. Sin embargo, transcurridas 24 h desde la inyección de BrdU, se pudo apreciar



**Figura 3.58.- Velocidad de desplazamiento de las células epiteliales intestinales en el íleon de ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*.** (A) Posición en el eje cripta-vellosidad de la última célula marcada con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU<sup>+</sup>) en el íleon de ratones control y en diferentes semanas postinfección (spi) *E. caproni* transcurridas 1 h (columnas grises) y 24 h (columnas blancas) desde la administración intraperitoneal de BrdU. (B) Posición de la última célula BrdU<sup>+</sup> en el íleon de ratas control e infectadas con *E. caproni* en diferentes spi después de 1 h (columnas grises) y 24 h (columnas negras) desde la inyección intraperitoneal de BrdU. Las barras verticales representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control negativo (0 spi) correspondiente ( $p < 0,0001$ ). Las barras horizontales señalan diferencias significativas entre spi (a:  $p < 0,0001$ ). (C) Velocidad de desplazamiento de las células epiteliales en el eje cripta-vellosidad en el íleon de ratones (columnas blancas) y ratas (columnas negras) en diferentes spi con *E. caproni*. Los resultados se presentan en valor absoluto, como el incremento en la posición media de la última célula BrdU<sup>+</sup> entre la 1 y las 24 h postadministración de BrdU.

como el avance de las células marcadas se incrementó de manera estadísticamente significativa a lo largo de la infección, alcanzándose posiciones más alejadas de la base de la cripta a las 4 que a las 2 spi y a las 6 spi respecto de la semana 4 pi ( $p < 0,0001$ ).

Los resultados observados en el intestino de rata fueron un tanto diferentes a los descritos para ratón. Transcurrida 1 h desde la administración de BrdU la posición de la última célula marcada fue muy similar en las ratas control e infectadas (Figura 3.58. B), tal como se observó en los gráficos de distribución posicional (véase Figura 3.57.). No obstante, al cabo de 24 h la última célula marcada estuvo significativamente más alejada de la base de la cripta en los animales infectados que en los controles ( $p < 0,0001$ ). No se encontraron diferencias significativas entre animales infectados a las 2 y a las 4 spi.

Al igual que los parámetros analizados anteriormente, los valores basales en cuanto al avance de las células en el eje cripta-vellosidad también resultó diferente entre los ratones y ratas control. La posición ocupada por la última célula marcada estuvo significativamente más alejada de la base de la cripta en el íleon de las ratas control que en los ratones no infectados, tanto a la 1 como a las 24 h postadministración de BrdU ( $p < 0,0001$ ) (Figura 3.58. A y B).

La velocidad de desplazamiento de las células del epitelio intestinal en hospedadores control e infectados se calculó al restar la posición media de la última célula marcada a las 24 h postadministración de BrdU menos la posición media de la última célula marcada 1 h después de la administración, para cada hospedador en cada tiempo postinfección analizado. El resultado de esta diferencia es el número de posiciones recorridas por una célula en el eje cripta-vellosidad durante 23 h y está representado en la Figura 3.58. (C). Puesto que se calcula a partir de la diferencia entre las medias, este es un valor absoluto que no admite el cálculo de la desviación estándar ni la aplicación de test de comparación estadística. No obstante, los resultados calculados de esta manera se pueden comparar en términos absolutos, es decir, comparando la magnitud del cambio en la velocidad de desplazamiento de las células en el eje cripta-vellosidad en respuesta a la infección. De acuerdo con esto, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la velocidad a la que se desplazan las células epiteliales es mayor en el íleon de los hospedadores infectados que en el de los controles. En los ratones infectados con *E. caproni* la velocidad de desplazamiento aumentó progresivamente a lo largo de la

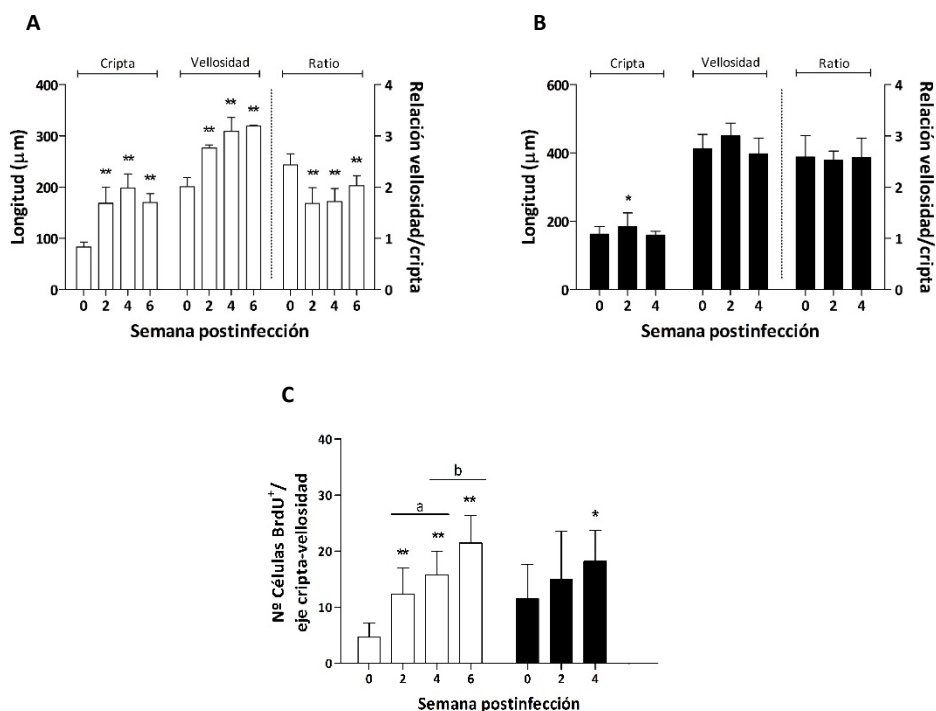


infección. En la Figura 3.58. (C) se puede apreciar cómo, mientras que a las 2 spi la velocidad de desplazamiento casi triplicó la de los controles, esta llegó a ser 4 veces superior en la 4 spi y casi 6 veces mayor en los animales infectados a las 6 spi. En el caso de las ratas infectadas, la velocidad de desplazamiento de las células epiteliales resultó igualmente incrementada en el íleon de los animales infectados respecto de los controles. Sin embargo, no se observaron diferencias relacionadas con el tiempo postinfección en este hospedador, sino que los valores obtenidos a las 2 y 4 spi fueron muy similares, llegando casi a duplicar la velocidad calculada para las ratas control. Otro aspecto a destacar es que antes de la infección, la velocidad de recambio epitelial en el intestino del hospedador de baja compatibilidad fue 3 veces superior a la de los ratones control (Figura 3.58. C).

### **3.6.3. LONGITUD DE LAS CRIPTAS Y VELLOSIDADES INTESTINALES EN RATÓN Y RATA INFECTADOS CON *ECHINOSTOMA CAPRONI***

Hasta el momento se han presentado los resultados en relación a los niveles de proliferación y la velocidad de desplazamiento de las células epiteliales en el tejido intestinal. No obstante, debe tenerse en cuenta que el proceso de renovación epitelial está basado en el equilibrio entre la producción de nuevas células indiferenciadas en la base de las criptas de Lieberkühn y la descamación de las células epiteliales “viejas”, especializadas, en el extremo de las vellosidades. Solo de esta manera se consigue mantener la arquitectura y homeostasis del tejido intestinal. Esta dinámica implica que la velocidad de desplazamiento de las células epiteliales y la tasa de renovación tisular son conceptos diferentes, que no tienen por qué ir necesariamente ligados. Si bien en condiciones normales, el aumento en los niveles de proliferación y en la velocidad de desplazamiento debe traducirse en un aumento en la tasa de renovación del epitelio intestinal, alteraciones intestinales de diferente naturaleza pueden conducir a la desregulación de estos procesos, dando lugar a alteraciones en la estructura del tejido. Los resultados presentados hasta el momento ponen de manifiesto que la infección con *E. caproni* induce cambios en los niveles de proliferación y/o en la velocidad a la cual se mueven las células del epitelio intestinal en el íleon de hospedadores de alta y baja

compatibilidad. Con el objetivo de investigar las consecuencias que estas alteraciones tienen sobre la estructura del epitelio intestinal, se midió la longitud de las criptas y vellosidades intestinales en el lugar de infección con *E. caproni*. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 3.59. (A y B).



**Figura 3.59.- Longitud de las vellosidades intestinales y las criptas de Lieberkühn en el íleon de ratones y ratas infectados con *Echinostoma caproni*.** Medidas y ratio de las vellosidades y criptas intestinales en el íleon de ratones (A) y ratas (B) en diferentes semanas postinfección (spi) con *E. caproni*. (C) Número de células marcadas con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU<sup>+</sup>), acumuladas en el eje cripta-vellosidad en las 24 h siguientes a la administración intraperitoneal de BrdU, en el íleon de ratones (barras blancas) y ratas (barras negras) en diferentes spi. Las barras verticales representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los animales no infectados (0 spi) para cada especie hospedadora (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,0001$ ). Las líneas horizontales señalan los cambios significativos entre spi (a:  $p < 0,0001$ ; b:  $p < 0,05$ ).

Las medidas realizadas revelaron que la infección con *E. caproni* ocasiona una marcada alteración de la estructura del tejido intestinal en el íleon de los ratones

parasitados, caracterizada por hiperplasia de la criptas de Lieberkühn, cuya longitud resultó significativamente aumentada desde la 2 spi ( $p < 0,0001$ ). Este resultado coincide con el aumento en el número de células por cripta observado previamente (véase Figura 3.55. B). Asimismo, la longitud de las vellosidades intestinales también resultó significativamente aumentada como consecuencia de la infección en todas las semanas analizadas ( $p < 0,0001$ ). No obstante, la magnitud del aumento en la longitud de las vellosidades no fue proporcional al aumento en el tamaño de las criptas, dando lugar a una alteración de la relación vellosidad/cripta, que se redujo de manera estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) en los animales infectados con respecto a los controles (Figura 3.59. A). En las ratas infectadas con *E. caproni*, sin embargo, no se observaron alteraciones destacadas en la estructura del tejido intestinal (Figura 3.59. B). El análisis estadístico de las medidas solo reveló un aumento puntual y ligero, aunque significativo, en la longitud de las criptas de Lieberkühn a las 2 spi ( $p < 0,05$ ). No obstante, anteriormente no se había detectado un aumento en el número de células por cripta para este hospedador (véase Figura 3.55. B). El resto de parámetros analizados (longitud de las vellosidades intestinales y relación vellosidad/cripta) fueron similares a los de los controles en los dos tiempos postinfección analizados.

Estos resultados, junto con los anteriores, ponen de manifiesto que en el hospedador de alta compatibilidad (ratón) se produce una desregulación del proceso de renovación del epitelio intestinal como consecuencia de la infección con *E. caproni*, la cual conduce a un aumento no proporcional en la longitud de las criptas y vellosidades intestinales. Las alteraciones detectadas en este hospedador indican que, a pesar de que los niveles de proliferación celular y el avance de las células en el eje cripta-vellosidad son significativamente mayores en los animales infectados que en los controles (Figuras 3.55. y 3.58.), la tasa de recambio epitelial no aumenta en la misma magnitud y, por tanto, las nuevas células formadas se acumulan en el tejido dando lugar a la hiperplasia del mismo. La Figura 3.59. (C) muestra el número de células marcadas con BrdU acumuladas en el eje cripta-vellosidad durante las 24 h siguientes a la inyección intraperitoneal. Estos resultados confirmaron la mayor acumulación de células marcadas en el íleon de los

animales infectados con respecto a los controles ( $p < 0,0001$ ). El número de células BrdU<sup>+</sup> acumulado por eje cripta-vellosidad aumentó significativamente a medida que avanzó la infección, siendo más elevado a las 4 que a las 2 spi ( $p < 0,001$ ) y a las 6 que a las 4 spi ( $p < 0,05$ ). En conjunto, el análisis de los resultados obtenidos en el estudio de la renovación del epitelio intestinal en ratones infectados experimentalmente puso de manifiesto que la infección con *E. caproni* induce un incremento en los niveles de proliferación celular y, consecuentemente, de la velocidad de desplazamiento de las células BrdU<sup>+</sup> en el eje cripta-vellosidad. Sin embargo, ello no se traduce en un aumento en la tasa de renovación del epitelio intestinal, sino que las nuevas células formadas se acumulan en el tejido, dando lugar a la hiperplasia del mismo.

En el hospedador de baja compatibilidad (rata), por el contrario, la arquitectura del epitelio intestinal no se vio afectada como consecuencia de la infección, si bien se observó un ligero aumento, aunque significativo ( $p < 0,05$ ) en el número de células acumuladas a las 4 spi (Figura 3.59. C). En este contexto, en el que el avance de las células marcadas en el eje cripta-vellosidad resultó significativamente más rápido después de la infección (véase Figura 3.58.), el mantenimiento de la homeostasis estructural del tejido intestinal indica que la tasa de renovación del epitelio intestinal aumenta como consecuencia de la infección en este hospedador.

### **3.7. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN EXPERIMENTAL ENTRE *ECHINOSTOMA CAPRONI* Y *SYPHACIA MURIS* EN RATA**

---

Las coinfecciones parasitarias son un fenómeno muy frecuente en la naturaleza. Sin embargo, a pesar del evidente interés que por distintas razones presenta el estudio de estas interacciones, la tendencia de la mayoría de trabajos experimentales sobre enfermedades infecciosas es considerar cada enfermedad de manera aislada, entre otras razones, por la complejidad que conlleva su estudio. *E. caproni* y *S. muris* son helmintos parásitos del tracto intestinal cuyo ciclo biológico puede ser fácilmente mantenido en el

laboratorio. Este hecho facilita que puedan ser utilizados como modelos experimentales para el estudio de cómo la infección por una especie parásita puede afectar a la inmunobiología de una infección subsiguiente, así como de las interacciones que tienen lugar entre dos especies parásitas y el sistema inmunitario.

### 3.7.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL

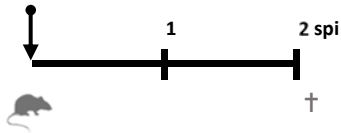
*S. muris* es un nematodo parásito, agente causal de infecciones accidentales, habituales y recurrentes en colonias de animales de laboratorio. Las infecciones con este nematodo suelen ser subclínicas, ocasionando síntomas y signos clínicos evidentes únicamente cuando la carga parasitaria es muy elevada, motivo por el cual no suelen ser tenidas en cuenta desde el punto de vista de la salud y el bienestar animal. Sin embargo, infecciones inadvertidas con este y otros oxyúridos comunes en animales de experimentación pueden interferir en el desarrollo experimental de investigaciones no relacionadas y en la interpretación final de los resultados (véase Capítulo I, Apartado 1.2.). *E. caproni*, por su parte, es un trematodo intestinal sin fases de migración intraorgánica en el hospedador definitivo, que se emplea como modelo experimental para el estudio de las relaciones parásito-hospedador y de los factores que determinan la expulsión de los helmintos intestinales (véase Capítulo I, Apartado 1.1.). Observaciones realizadas en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que, a pesar de establecerse en microhábitats diferentes dentro del hospedador definitivo, la infección de ratas Wistar con *S. muris* inducía cierta inmunidad protectora frente a la posterior infección experimental con *E. caproni*. A partir de esta observación decidimos estudiar la interacción entre ambas especies parásitas cuando concurren en el mismo hospedador. Los resultados presentados en este apartado tienen especial interés en el contexto de la inmunomodulación inducida por helmintos y, de forma más general, en el ámbito de los estudios experimentales que implican la utilización de roedores de laboratorio potencialmente infectados por oxyúridos.

Para llevar a cabo este estudio se emplearon un total de 75 ratas Wistar hembra, de 3 semanas de edad (80-100 g de peso), que fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos. El Grupo 1 estuvo formado por 25 animales, que se emplearon para la caracterización del tipo de interacción que se establece entre las dos especies parásitas cuando concurren en el mismo hospedador. Un total de 20 ratas pertenecientes a este grupo fueron infectadas con 500 huevos de *S. muris* (infección primaria). Semanalmente, entre la primera y la cuarta semana postinfección primaria (spip), 5 animales elegidos al azar eran retados con 100 metacercarias de *E. caproni* (infección secundaria). Tras la infección con *E. caproni* los animales se mantuvieron durante 2 semanas [semanas postinfección secundaria (spis)] antes de proceder a la necropsia y disección de los mismos para recontar el número de adultos de *E. caproni* alojados en el intestino delgado. Los 5 animales restantes se infectaron únicamente con metacercarias de *E. caproni* y fueron utilizados como controles de la infección simple con este trematodo. El protocolo para las infecciones individuales y superpuestas se esquematiza en la Figura 3.60.

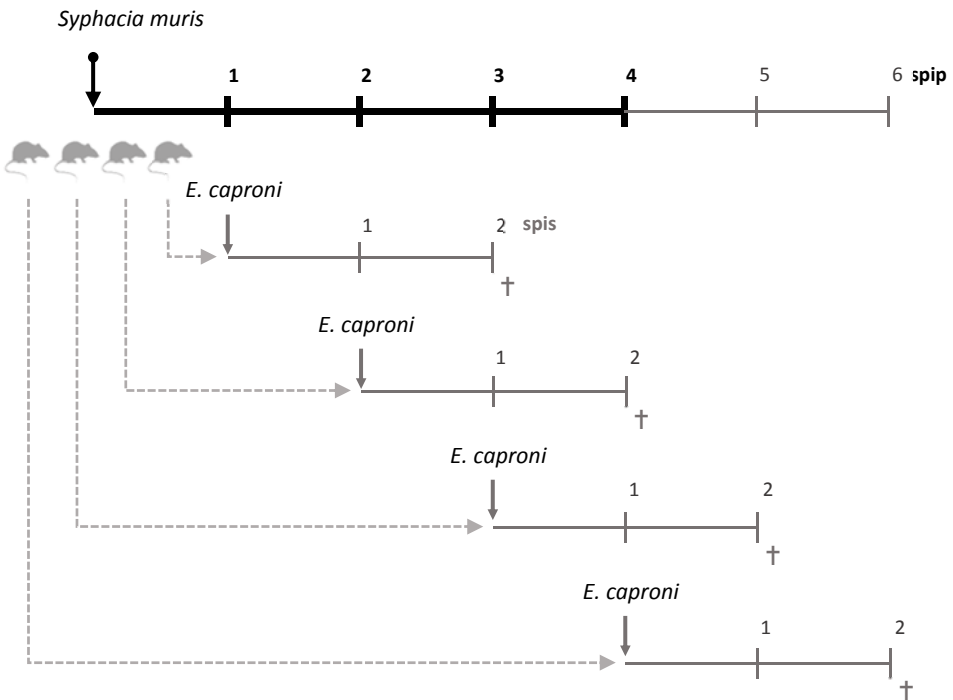
Un total de 5 ratas libres de helmintos constituyeron el Grupo 2. En este caso, todos los animales fueron sacrificados a tiempo cero para obtener muestras de diferentes tejidos en el momento previo a la infección. Se obtuvo RNA total de bazo, NLM, placas de Peyer e intestino delgado (íleon) para el estudio de los perfiles de expresión de citoquinas y mucinas. Asimismo, se recogieron segmentos de intestino, para la realización de diferentes técnicas histológicas y lavados intestinales de animales no parasitados, que se emplearon como controles para el estudio de las respuestas locales de anticuerpos a nivel de la mucosa del intestino delgado. El Grupo 3 contenía un total de 40 ratas, 20 de las cuales fueron infectadas con 500 huevos de *S. muris* y otras 20 se mantuvieron como controles negativos. Semanalmente, entre la primera y la cuarta semana postinfección, 5 animales infectados y 5 controles eran sacrificados para la obtención de las muestras antes mencionadas durante las primeras semanas postinfección con *S. muris*. Un último grupo formado por 5 animales (Grupo 4) fue empleado para la obtención de muestras seriadas

**Grupo CONTROL**

*Echinostoma caproni*



**Infecciones MIXTAS**



**Figura 3.60.-** Protocolo para las infecciones individuales y superpuestas con *Echinostoma caproni* y *Syphacia muris*. Cada rata representa un grupo de 5 animales. spi: semana postinfección; spip: semana postinfección primaria; spis: semana postinfección secundaria; †: necropsia.

de suero antes y después de la infección, para el estudio de la respuesta sistémica de anticuerpos generada frente a *S. muris* en rata.

### 3.7.2. TASAS DE INFECCIÓN CON *ECHINOSTOMA CAPRONI* EN RATAS INFECTADAS CON *SYPHACIA MURIS*

Los resultados obtenidos tras las infecciones sencillas con *E. caproni* y las infecciones mixtas con *S. muris* y *E. caproni* se describen a continuación. Todos los animales del Grupo 1 expuestos a *S. muris* resultaron infectados con este nematodo. En todos los casos la infección se mantuvo hasta el fin del experimento y los adultos de *S. muris* estuvieron alojados a nivel del ciego y el colon de los animales parasitados, sin invadir el intestino delgado. Del mismo modo todos los animales control, no sometidos a la infección primaria con *S. muris*, resultaron infectados con *E. caproni*. La tasa de recuperación de adultos de *E. caproni* en estos animales osciló entre 31 y 56 [43,3±4,0 (media±ds)] vermes/animal (Tabla 3.7.). Sin embargo, los resultados derivados de las infecciones superpuestas confirmaron la existencia de una interacción antagonista entre las dos especies parásitas. La validación estadística de estos resultados se llevó a cabo mediante ANOVA de dos factores, con el tiempo postinfección primaria y la infección/no infección con *S. muris* como variables independientes. Se pudo apreciar como la infección primaria con *S. muris* induce un estado de resistencia progresivo frente la infección posterior con *E. caproni*, tal y como se desprende de los datos presentados a en la Tabla 3.7. Si bien las ratas que fueron retadas con metacercarias de *E. caproni* al cabo de 1 spip resultaron infectadas con este trematodo, el número de adultos recuperados fue significativamente menor que en los animales control ( $p<0,05$ ). A las 2 spip, el porcentaje de ratas que resultaron infectadas con *E. caproni* se redujo hasta el 40%, siendo el número de adultos recuperados por animal significativamente menor que en las ratas no expuestas a *S. muris* ( $p<0,05$ ). Las ratas retadas a las 3 y 4 spip resultaron totalmente refractarias a la infección con *E. caproni*. Todos los adultos de *E. caproni* recuperados se encontraban alojados en el íleon de los animales parasitados.



**Tabla 3.7.-** Resultados de coinfección con *Syphacia muris* y *Echinostoma caproni*

Infección primaria	Intervalo (semanas) <sup>a</sup>	Infección secundaria	<i>E. caproni</i> Infectadas/Expuestas <sup>b</sup>	Adultos de <i>E. caproni</i> <sup>c</sup> Rango (media ±DS)
-	0	<i>E. caproni</i>	5/5	31-56 (43.3 ± 4.0)
<i>S. muris</i>	1	<i>E. caproni</i>	5/5	19-30 (24.7 ± 1.5)*
<i>S. muris</i>	2	<i>E. caproni</i>	2/5	15-29 (21.9 ± 1.9)*
<i>S. muris</i>	3	<i>E. caproni</i>	0/5	0
<i>S. muris</i>	4	<i>E. caproni</i>	0/5	0

<sup>a</sup> Semanas entre la infección primaria y la infección secundaria.

<sup>b</sup> Número de ratas infectadas con *E. caproni* respecto del número de ratas expuestas.

<sup>c</sup> Número de adultos de *E. caproni* recuperados tras dos semanas desde la infección secundaria.

\* Diferencias significativas respecto a ratas no expuestas a *S. muris* ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.7.-** Adultos de *Echinostoma caproni* recuperados a partir de ratas expuestas a 500 huevos de *Syphacia muris* y, posteriormente, retadas con 100 metacercarias de *E. caproni* en diferentes semanas postinfección primaria.

### 3.7.3. PATOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *SYPHACIA MURIS*

Una vez caracterizado el tipo de interacción que se establece entre *S. muris* y *E. caproni* cuando concurren en el mismo hospedador, se investigaron diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria generada frente a *S. muris* en rata, los cuales podrían estar implicados en la resistencia observada. Los parámetros analizados incluyeron: (I) recuentos de varias poblaciones celulares en el lugar de infección con *E. caproni* (íleon); (II) respuesta de anticuerpos generada frente a *S. muris* a nivel sistémico y local, en la mucosa del intestino delgado; y (III) perfiles de expresión de citoquinas en diferentes tejidos inmunoactivos durante las primeras semanas postinfección.

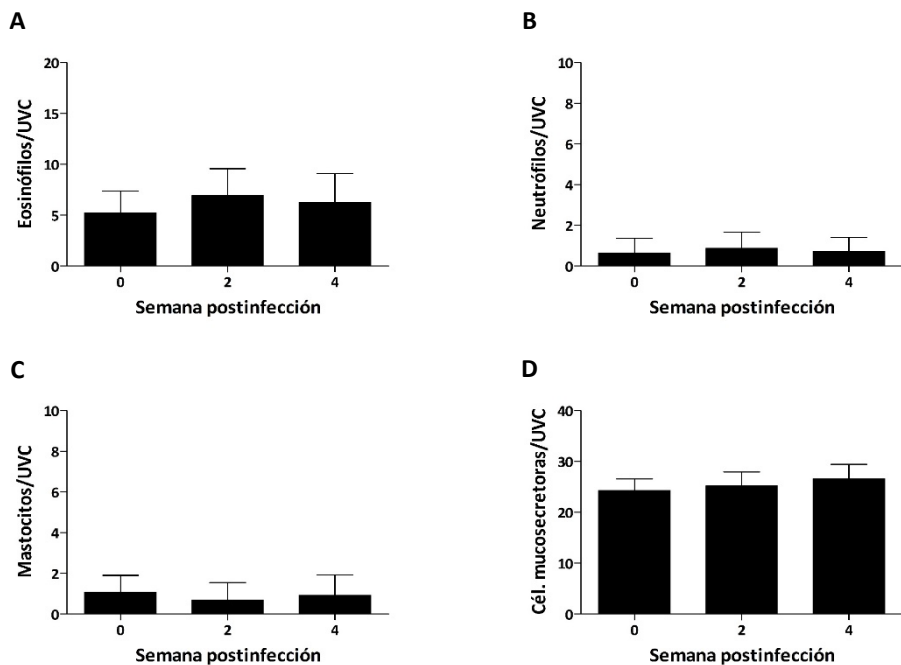
### **3.7.3.1. PATOLOGÍA INTESTINAL**

Diferentes alteraciones locales en los recuentos de varias poblaciones de células inmunitarias y no inmunitarias han sido relacionadas tanto con la expulsión de los adultos de *E. caproni* del lumen intestinal, como con el establecimiento de infecciones de carácter crónico (Toledo *et al.*, 2006a; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Trelis *et al.*, 2011). Los posibles cambios inducidos por la infección con *S. muris* en estas poblaciones celulares a nivel del íleon de ratas infectadas se analizaron empleando secciones histológicas obtenidas a partir de los animales de los Grupos 2 y 3 a las 0, 2 y 4 spi. Tal y como se observa en la Figura 3.61., el examen histológico no mostró cambios significativos en las poblaciones de eosinófilos, neutrófilos, mastocitos ni células caliciformes en el íleon de las ratas infectadas con *S. muris* en ninguna de las semanas postinfección analizadas. La valoración estadística de los resultados mediante el test *t* de Student, fijando el tiempo postinfección como variable independiente, confirmó la ausencia de variaciones estadísticamente significativas en los recuentos de las poblaciones celulares analizadas.

### **3.7.3.2. CINÉTICA DE ANTICUERPOS EN SUERO Y MUCOSA INTESTINAL DE RATAS DURANTE LAS PRIMERAS SEMANAS DE INFECCIÓN CON *SYPHACIA MURIS***

Las respuestas de anticuerpos generadas en rata frente a la infección por *S. muris* fueron analizadas tanto a nivel sistémico como local, en la mucosa del intestino delgado. Asimismo, se investigó la reactividad de estos anticuerpos frente al antígeno completo de *E. caproni*.

Las pruebas de ELISA indirecto se llevaron a cabo tal y como se ha descrito anteriormente (véase Capítulo II, Apartado 2.3.3.). Las diluciones óptimas de suero, mucosa intestinal y de los diferentes conjugados empleados cuando se enfrentaron los antígenos de *S. muris* y *E. caproni* al suero y la mucosa intestinal de ratas infectadas con *S. muris* fueron determinados mediante pruebas previas y se recogen en las Tablas 3.8. y 3.9., respectivamente.



**Figura 3.61.- Recuento de varias poblaciones celulares en el íleon de ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Número de eosinófilos (A), neutrófilos (B), mastocitos (C) y células caliciformes (D), por unidad vellosidad-cripta (UVC), en la mucosa intestinal del íleon durante la infección simple con *S. muris* a las 0, 2 y 4 semanas postinfección. Las barras verticales representan la desviación estándar.

#### **a) Respuesta de Anticuerpos en Suero**

La generación de respuestas específicas de anticuerpos en el suero de ratas infectadas experimentalmente con *S. muris* se estudió en los animales de Grupo 4. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que las ratas infectadas con este nematodo no desarrollan respuestas de anticuerpos significativas a nivel sistémico en las primeras semanas postinfección. La aplicación de la prueba *t* de Student no reveló cambios significativos en los niveles de anticuerpos para ninguna de las inmunoglobulinas analizadas. Los resultados de las pruebas de ELISA para la detección de IgM, IgA, IgE, IgG total, IgG1 e IgG2a específicas se reflejan en la Figura 3.62., donde se puede apreciar que en ningún caso hubo reconocimiento específico de los antígenos.

**Tabla 3.8.-** Diluciones utilizadas en ELISA indirecto: suero/mucosa de ratas infectadas con *Syphacia muris* frente a antígenos de *Syphacia muris*

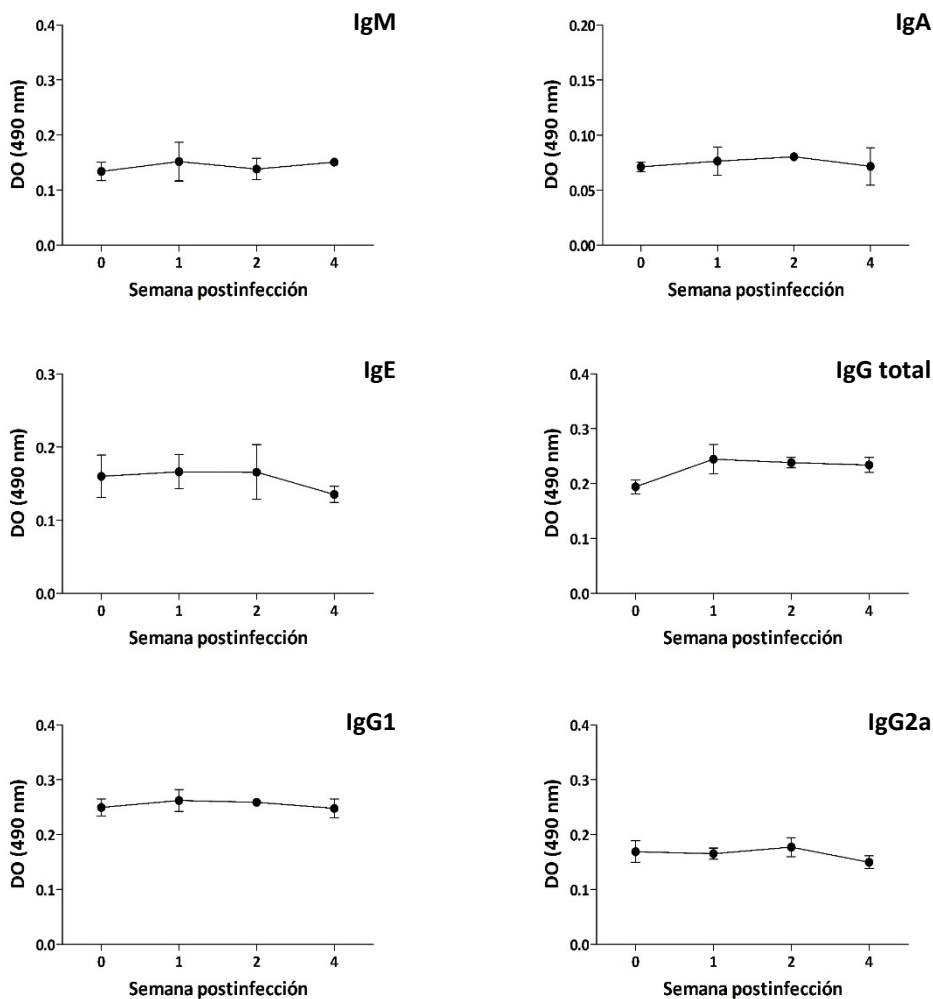
	Suero	Conjugado Suero	Mucosa	Conjugado Mucosa
IgM	1/200	1/2.000	1/100	1/500
IgA	1/200	1/2.000	1/100	1/500
IgE	1/200	1/4.000	1/200	1/2.000
IgG	1/200	1/4.000	1/100	1/500
IgG1	1/100	1/2.000	1/500	1/2.000
IgG2a	1/100	1/2.000	1/500	1/2.000

**Tabla 3.8.-** Diluciones de suero, mucosa intestinal y los diferentes anticuerpos secundarios empleadas para el estudio de la cinética de anticuerpos en las primeras semanas de infección con *Syphacia muris* en rata mediante ELISA indirecto.

**Tabla 3.9.-** Diluciones utilizadas en ELISA indirecto: suero/mucosa de ratas infectadas con *Syphacia muris* frente a antígenos de *Echinostoma caproni*

	Suero	Conjugado Suero	Mucosa	Conjugado Mucosa
IgM	1/200	1/500	1/100	1/500
IgA	1/100	1/1.000	1/200	1/500
IgE	1/200	1/2.000	1/200	1/2.000
IgG	1/200	1/1.000	1/200	1/1.000
IgG1	1/200	1/700	1/500	1/2.000
IgG2a	1/200	1/700	1/500	1/2.000

**Tabla 3.9.-** Diluciones de suero, mucosa intestinal y los diferentes anticuerpos secundarios empleadas, en ELISA indirecto, cuando se enfrentó antígeno completo de *Echinostoma caproni* a suero/mucosa de ratas control e infectadas con *Syphacia muris*.



**Figura 3.62.- Respuesta sistémica de anticuerpos en ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Resultados de las pruebas de ELISA indirecto para IgM, IgA, IgE, IgG total, IgG1 e IgG2a, cuando se enfrentaron los sueros de ratas control [0 semanas postinfección (spi)] e infectadas con *S. muris* (1, 2 y 4 spi) al antígeno total de *S. muris*. Las barras verticales representan la desviación estándar. No se detectaron diferencias significativas entre animales control e infectados para ninguna de las inmunoglobulinas analizadas.

### **b) Respuesta de Anticuerpos en Mucosa Intestinal**

A diferencia de lo que sucede a nivel sérico, en la mucosa intestinal de ratas infectadas con *S. muris* se detectaron respuestas de anticuerpos tempranas frente a los

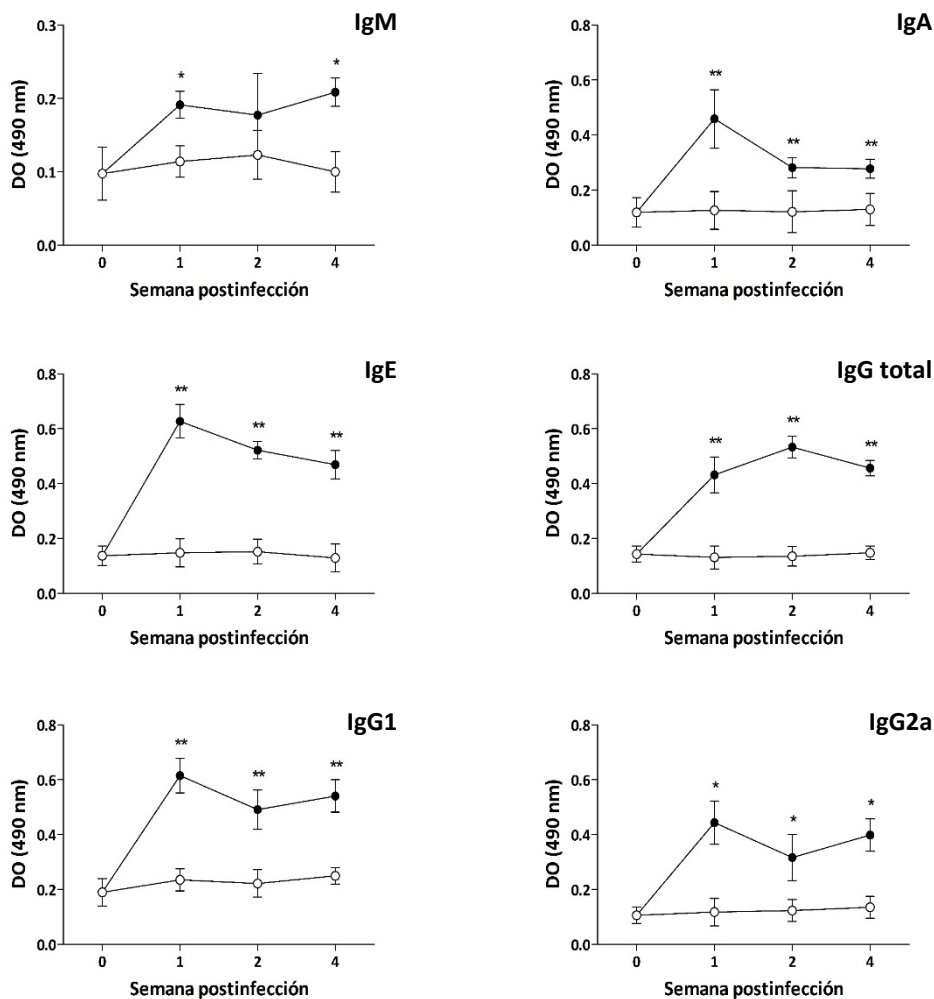
antígenos del parásito. En la Figura 3.63. se puede observar como las pruebas de ELISA, llevadas a cabo con los lavados intestinales obtenidos de los animales de los Grupos 2 y 3, resultaron positivas para todos los isotipos analizados. La existencia de diferencias significativas en los niveles de anticuerpos locales para cada semana postinfección se determinó mediante *t* de Student para muestras no relacionadas, con la semana postinfección como variable independiente. Los resultados observados para cada isotipo, clase o subclase de inmunoglobulina analizada se describen a continuación.

***Inmunoglobulina M:*** La respuesta local de IgM fue la más débil de las detectadas, observándose diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles en las semanas 1 y 4 pi ( $p < 0,05$ ). El rango de valores y la media ( $\pm$ ds) observada fue 0,18-0,21 (0,19 $\pm$ 0,02).

***Inmunoglobulina A:*** Las ratas infectadas con *S. muris* desarrollaron respuestas rápidas de IgA a nivel intestinal. Para esta inmunoglobulina los valores fueron positivos desde la primera semana y se mantuvieron más o menos constantes hasta el final del experimento, siendo significativamente mayores que los de los controles para cada semana estudiada ( $p < 0,01$ ). El valor máximo se obtuvo en la semana 1 pi y el rango y la media observados fueron 0,33-0,46 (0,41 $\pm$ 0,03).

***Inmunoglobulina E:*** Para la IgE los valores fueron positivos en todas las semanas estudiadas, obteniéndose el valor máximo en la semana 1 pi y manteniéndose significativamente mayores que los controles en las semanas 2 y 4 pi ( $p < 0,01$ ). El rango de valores y la media observada fueron 0,47-0,63 (0,54 $\pm$ 0,05).

***Inmunoglobulina G total:*** Los valores de IgG total fueron positivos desde la primera semana postinfección y se mantuvieron más o menos constantes hasta el final del experimento, siendo significativamente superiores a los de los de los controles para cada semana estudiada ( $p < 0,01$ ). El rango de valores y la media observada fue 0,43-0,53 (0,48 $\pm$ 0,02).



**Figura 3.63.- Respuesta local de anticuerpos en ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Resultados de las pruebas de ELISA indirecto para IgM, IgA, IgE, IgG total, IgG1 e IgG2a, cuando se enfrentaron los lavados intestinales de ratas control (círculos blancos) y en diferentes semanas postinfección con *S. muris* (círculos negros) al antígeno total de *S. muris*. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos señalan diferencias significativas entre animales control e infectados en la semana postinfección indicada (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

**Inmunoglobulina G1:** En el caso de la IgG1 los valores también fueron positivos en todas las semanas estudiadas, obteniéndose el valor más alto en la semana 1 pi y

manteniéndose significativamente por encima de los controles en las semanas 2 y 4 pi ( $p < 0,01$ ). El rango y la media observados fueron 0,49-0,62 ( $0,55 \pm 0,04$ ).

**Inmunoglobulina G2a:** Del mismo modo, los valores de IgG2a fueron positivos desde la primera semana después de la infección y se mantuvieron más o menos constantes hasta el final del experimento, siendo significativamente mayores que los de los controles en todas las semanas estudiadas ( $p < 0,05$ ). El rango y la media observados fueron 0,32-0,44 ( $0,39 \pm 0,03$ ).

### **c) Reactividad cruzada frente a los antígenos de *Echinostoma caproni***

Como cabía esperar debido a la ausencia de anticuerpos específicos, los resultados obtenidos cuando se enfrentaron los sueros de ratas infectadas con *S. muris* a los antígenos de *E. caproni* fueron también negativos para todos los isotipos analizados (Figura 3.64.). Por el contrario, al enfrentar el antígeno total de *E. caproni* a la mucosa intestinal de ratas infectadas con *S. muris* se pudo apreciar un elevado grado de reactividad cruzada. Tal y como se observa en la Figura 3.65., por lo general, los antígenos de *E. caproni* fueron reconocidos por los anticuerpos anti-*S. muris*, incluso con mayor intensidad de que los antígenos homólogos en el caso de algunas de las inmunoglobulinas estudiadas (véase Figura 3.63.). La validación estadística de los resultados mediante *t* de Student reveló la existencia de diferencias significativas en el reconocimiento de los antígenos de *E. caproni* entre los anticuerpos presentes en la mucosa de ratas control y ratas infectadas con *S. muris*.

**Inmunoglobulina M:** La reactividad de IgM fue débil, no observándose valores superiores a los de los controles durante todo el experimento.

**Inmunoglobulina A:** En el caso de IgA el reconocimiento fue positivo desde la primera semana, siendo significativamente mayor que en los controles para cada semana estudiada ( $p < 0,05$ ). El valor máximo se obtuvo en la semana 2 pi y el rango y la media observados fueron 0,28-0,46 ( $0,34 \pm 0,08$ ).



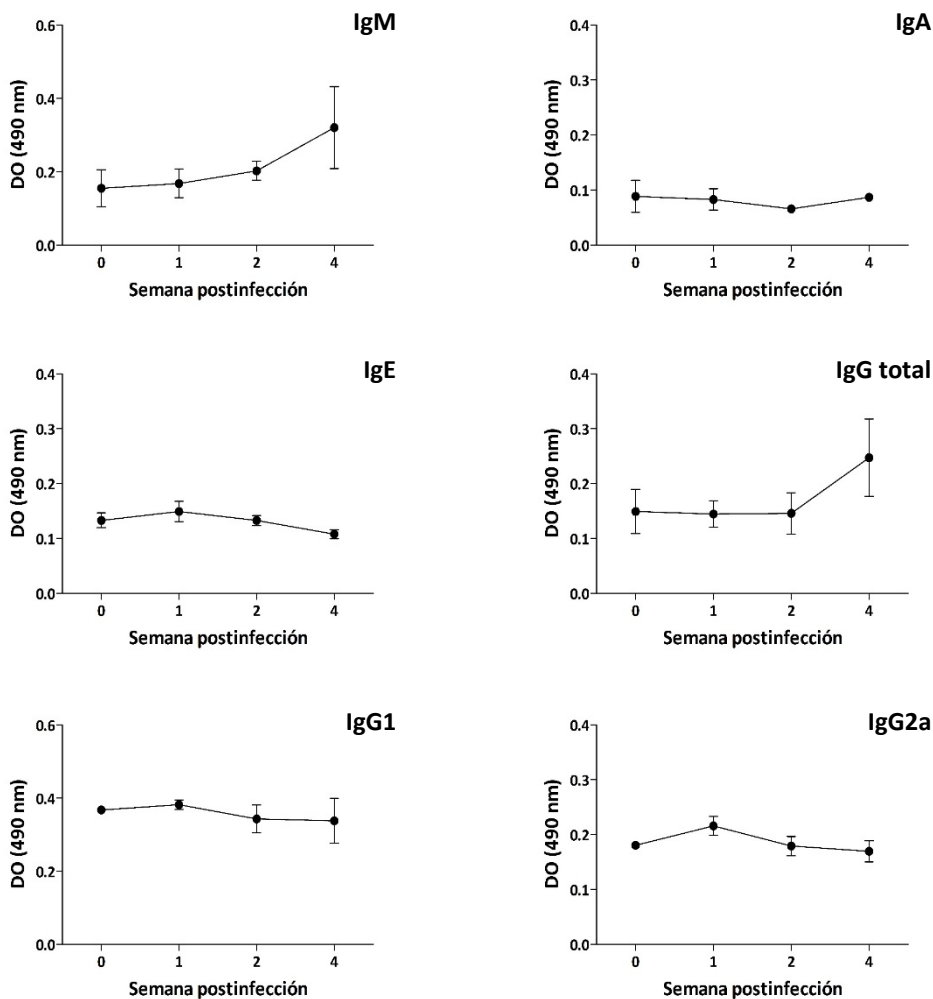
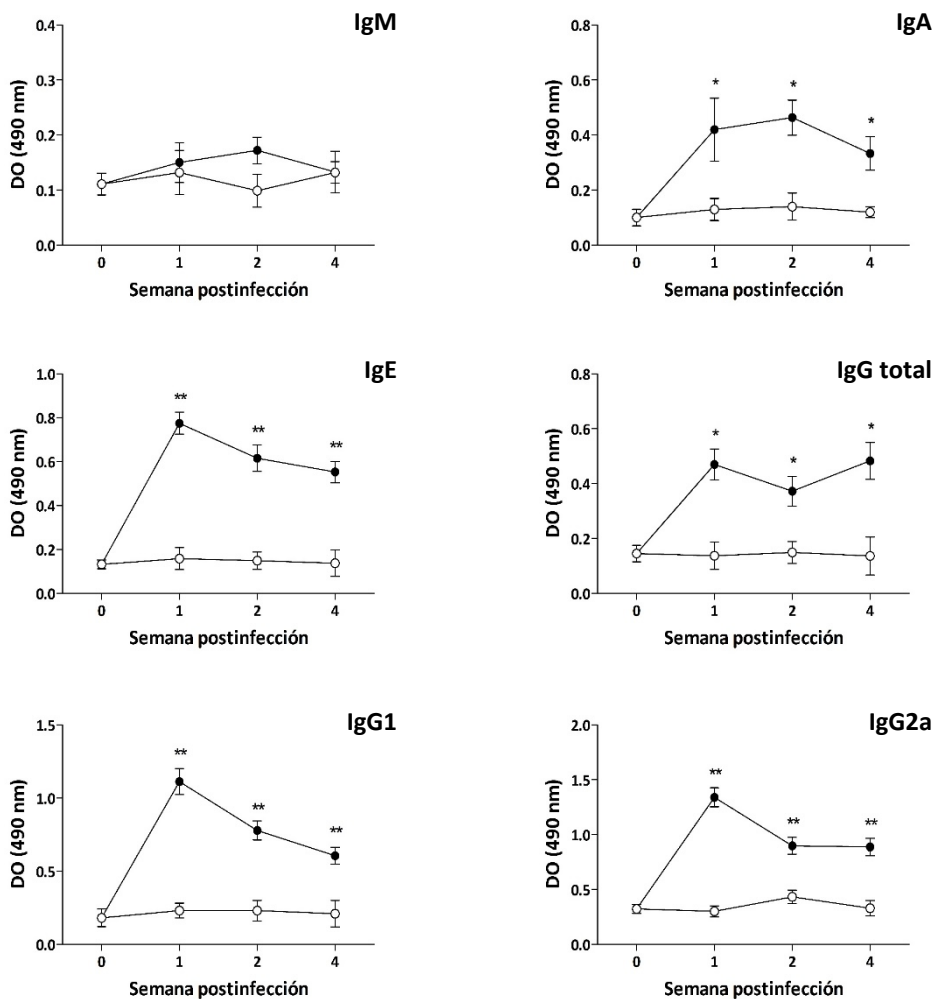


Figura 3.64.- Reactividad del suero de ratas infectadas con *Syphacia muris* frente a los antígenos de *Echinostoma caproni*. Resultados de las pruebas de ELISA indirecto para IgM, IgA, IgE, IgG total, IgG1 e IgG2a, cuando se enfrentaron los sueros de ratas control [0 semanas postinfección (spi)] e infectadas con *S. muris* (1, 2 y 4 spi) al antígeno total de *E. caproni*. Las barras verticales representan la desviación estándar. No se detectaron diferencias significativas entre animales control e infectados para ninguna de las inmunoglobulinas analizadas.

**Inmunoglobulina E:** La IgE mostró reactividad cruzada en todas las semanas estudiadas, obteniéndose el valor máximo en la semana 1 pi y manteniéndose



**Figura 3.65.- Reactividad de los lavados intestinales de ratas infectadas con *Syphacia muris* frente a los antígenos de *Echinostoma caproni*.** Resultados de las pruebas de ELISA indirecto para IgM, IgA, IgE, IgG total, IgG1 e IgG2a, cuando se enfrentaron las mucosas de ratas control (círculos blancos) y en diferentes semanas postinfección con *S. muris* (círculos negros) al antígeno total de *E. caproni*. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos señalan diferencias significativas entre animales control e infectados en la semana postinfección indicada (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

significativamente por encima de los controles en las semanas 2 y 4 pi ( $p < 0,01$ ). El rango de valores y la media observada fueron 0,55-0,78 (0,65 $\pm$ 0,04).

**Inmunoglobulina G total:** Con IgG total el reconocimiento fue positivo desde la primera semana postinfección. Los valores se mantuvieron significativamente superiores a los de los controles para cada semana estudiada ( $p < 0,05$ ). El rango de valores y la media observada fueron 0,37-0,47 ( $0,44 \pm 0,01$ ).

**Inmunoglobulina G1:** La IgG1 también mostró reactividad cruzada en todas las semanas estudiadas. El valor máximo se obtuvo en la semana 1 pi y los valores de DO fueron significativamente mayores que los de los controles en las semanas 2 y 4 pi ( $p < 0,01$ ). El rango y la media observados fueron 0,61-1,11 ( $0,83 \pm 0,05$ ).

**Inmunoglobulina G2a:** En el caso de IgG2a el reconocimiento también fue positivo desde la primera semana, con valores que se mantuvieron más o menos constantes hasta el final del experimento. La DO fue significativamente mayor que en los controles para cada semana estudiada ( $p < 0,01$ ). El rango de valores y la media observada fueron 0,89-1,34 ( $1,04 \pm 0,04$ ).

### 3.7.3.3. CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS DURANTE LAS PRIMERAS SEMANAS DE INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *SYPHACIA MURIS*

Uno de los aspectos fundamentales para la caracterización de la respuesta inmunitaria generada por el hospedador frente a una infección consiste en el estudio del perfil de citoquinas expresadas. En el contexto de las infecciones concomitantes, el papel que juegan las citoquinas resulta esencial, puesto que dependiendo del tipo y el grado de polarización de la respuesta inmunitaria inducido por un agente infeccioso, la inmunopatología y el establecimiento de otra u otras especies concomitantes pueden verse afectados en cualquier sentido.

Con la finalidad de determinar el tipo de respuesta generado por la infección con *S. muris* en rata durante la primeras semanas de infección y poder valorar así la influencia de dicha respuesta sobre la resistencia observada frente a la infección posterior por *E. caproni*, se analizaron los perfiles de expresión del mRNA de citoquinas en varios tejidos inmunoactivos (bazo, NLM, placas de Peyer e íleon). Para poder caracterizar ampliamente

esta respuesta, se llevó a cabo la cuantificación relativa de la expresión de las principales citoquinas, reguladoras y efectoras, implicadas en los diferentes tipos de respuesta inmunitaria descritos en el Capítulo I de la presente Tesis Doctoral: Th1 (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ); Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 y eotaxina/CCL11); Th17 (IL-6, IL-17a e IL-23); y Treg (IL-10 y TGF- $\beta$ ).

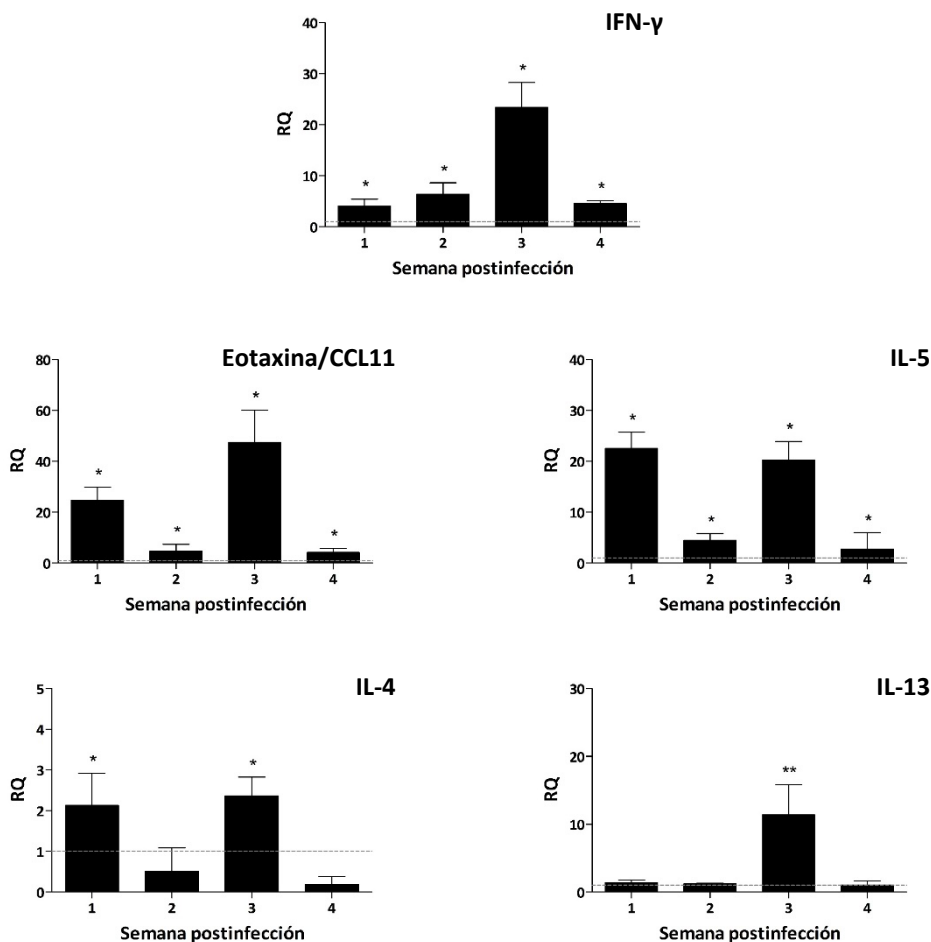
En líneas generales, cabe resaltar que los perfiles observados a nivel de bazo, NLM y placas de Peyer fueron bastante heterogéneos. No obstante, considerando que *E. caproni* se establece a nivel del íleon sin invadir otros tejidos, lo más probable es que las respuestas locales a este nivel sean las más relevantes para explicar la resistencia inducida por la infección primaria con *S. muris*. La valoración estadística de los resultados obtenidos para cada citoquina en los diferentes tejidos se realizó con el test *t* de Student, fijando el tiempo postinfección como variable independiente.

#### **a) Expresión Relativa de Citoquinas en Bazo**

El perfil de citoquinas observado en el bazo de ratas infectadas con *S. muris* se refleja en las Figuras 3.66. y 3.67. De todas las citoquinas analizadas tan solo se detectaron incrementos significativos en la expresión relativa de los genes que codifican para IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-13 y eotaxina/CCL11 (Figura 3.66.). En el caso de IFN- $\gamma$ , eotaxina/CCL11 e IL-5 se detectaron aumentos significativos en la expresión relativa desde la semana 1 pi hasta el final del experimento ( $p < 0,05$ ). En el caso de la IL-4, los valores de RQ solo fueron significativamente superiores a los de los animales control en las semanas 1 y 3 pi ( $p < 0,05$ ). Finalmente, para la IL-13 se detectó únicamente un pico de expresión significativamente superior a los controles en la semana 3 pi ( $p < 0,01$ ). Los resultados obtenidos para las citoquinas cuya expresión génica no se vio modificada como consecuencia de la infección en este tejido se muestran en la Figura 3.67.

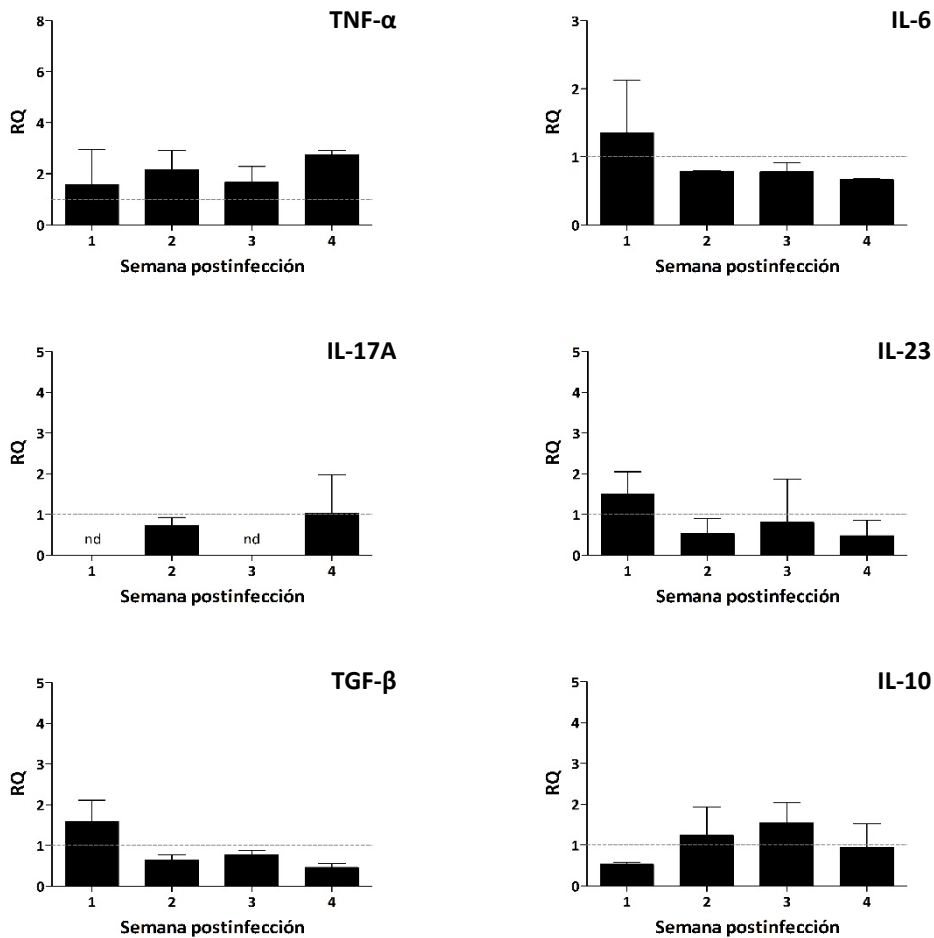
#### **b) Expresión Relativa de Citoquinas en Nódulos Linfáticos Mesentéricos**

La respuesta de citoquinas observada en NLM se muestra en las Figuras 3.68. y 3.69. En este tejido, se observaron incrementos significativos en la expresión relativa de



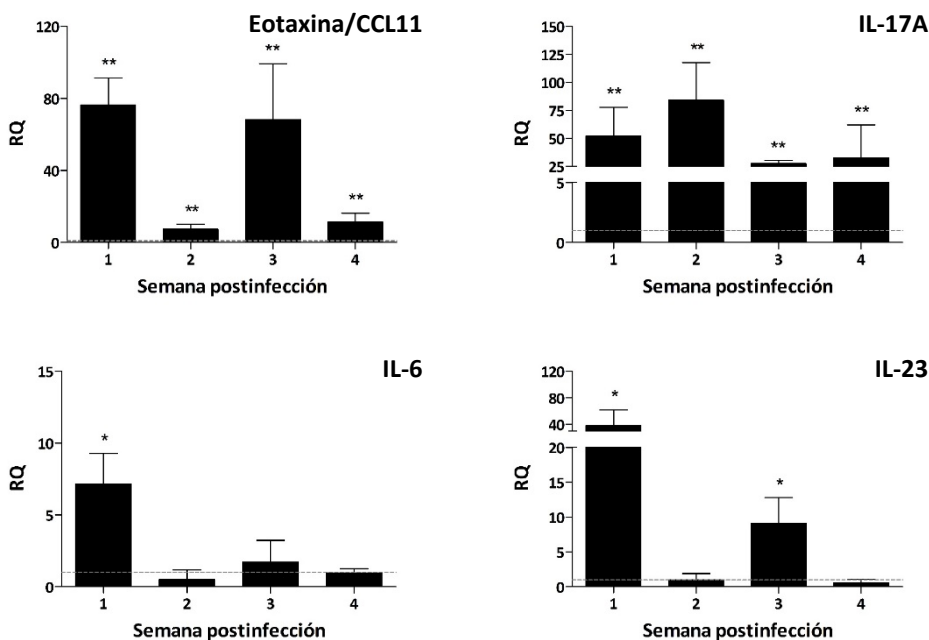
**Figura 3.66.- Citoquinas con expresión diferencial en el bazo de ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que se detectaron diferencias estadísticamente significativas a nivel del bazo durante las primeras semanas postinfección (spi) con *S. muris*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados (0 spi), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

los genes de IL-6, eotaxina/CCL11, IL-17A e IL-23, si bien las cinéticas fueron claramente diferentes en cada caso (Figura 3.68.). Para la IL-6 solo se detectaron incrementos significativos en la expresión en la semana 1 pi ( $p < 0,05$ ), mientras que en el resto de



**Figura 3.67.- Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en el bazo de ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas a nivel del bazo entre animales control e infectados con *S. muris*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar.

semanas analizadas los valores fueron similares a los de los controles. La IL-23 mostró niveles de RQ significativamente elevados en las semanas 1 y 3 pi ( $p < 0,05$ ). En cambio, la

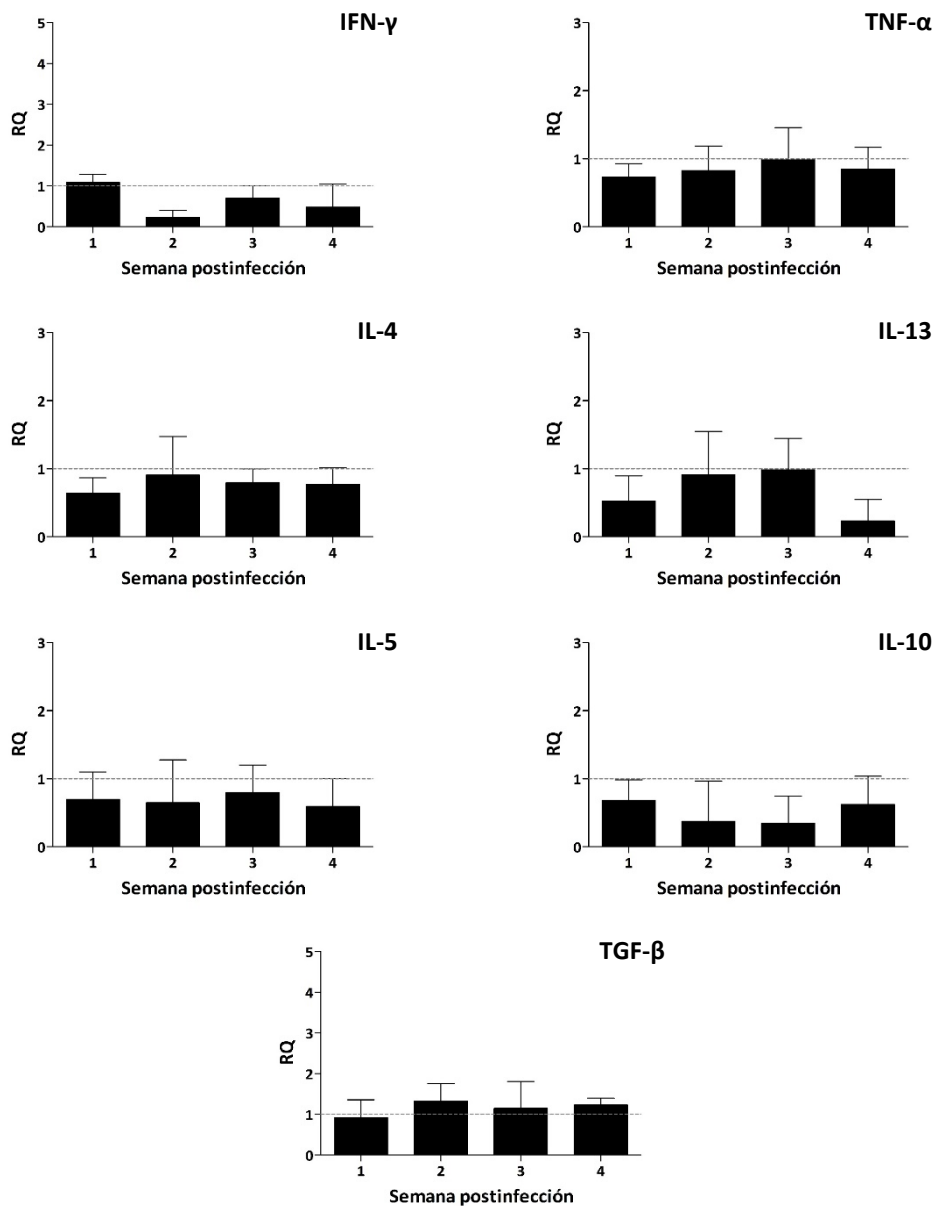


**Figura 3.68.-** Citoquinas con expresión diferencial en nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de ratas infectadas con *Syphacia muris*. Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que se detectaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de los NLM durante las primeras semanas postinfección (spi) con *S. muris*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados (0 spi), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

expresión relativa del mRNA de eotaxina/CCL11 e IL-17A se mantuvo significativamente elevada con respecto a los controles durante cada semana del experimento ( $p < 0,01$ ). Los resultados obtenidos para el resto de citoquinas, las cuales no mostraron diferencias significativas en su expresión génica como consecuencia de la infección con *S. muris*, se recogen en la Figura 3.69.

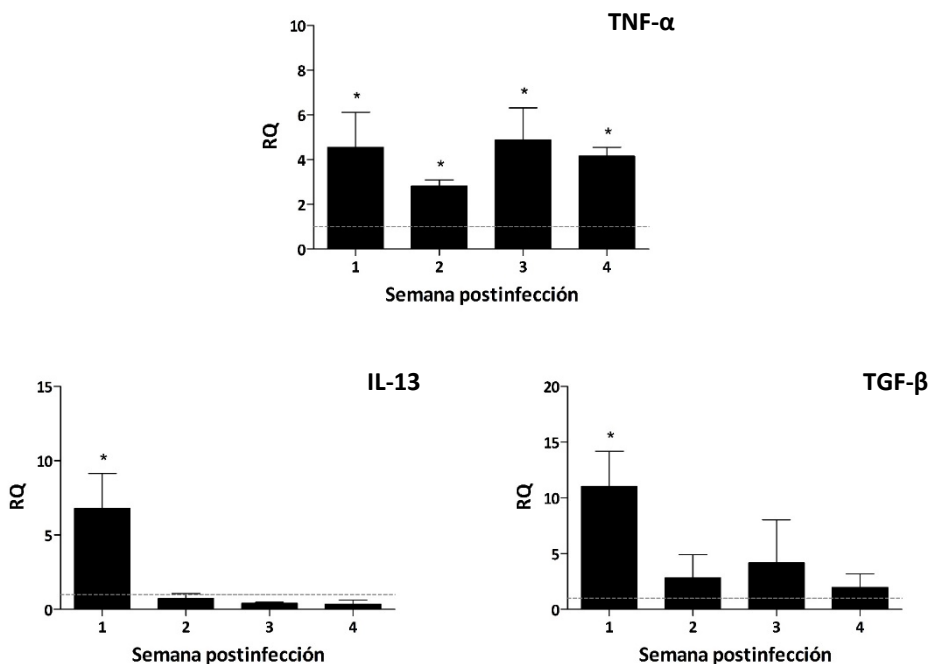
### c) Expresión Relativa de Citoquinas en Placas de Peyer

A nivel de las placas de Peyer se observaron aumentos estadísticamente significativos en la expresión relativa del mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-13 y TGF- $\beta$  (Figura 3.70.). En



**Figura 3.69.- Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de los NLM entre animales control e infectados con *S. muris*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados (0 semanas postinfección), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar.



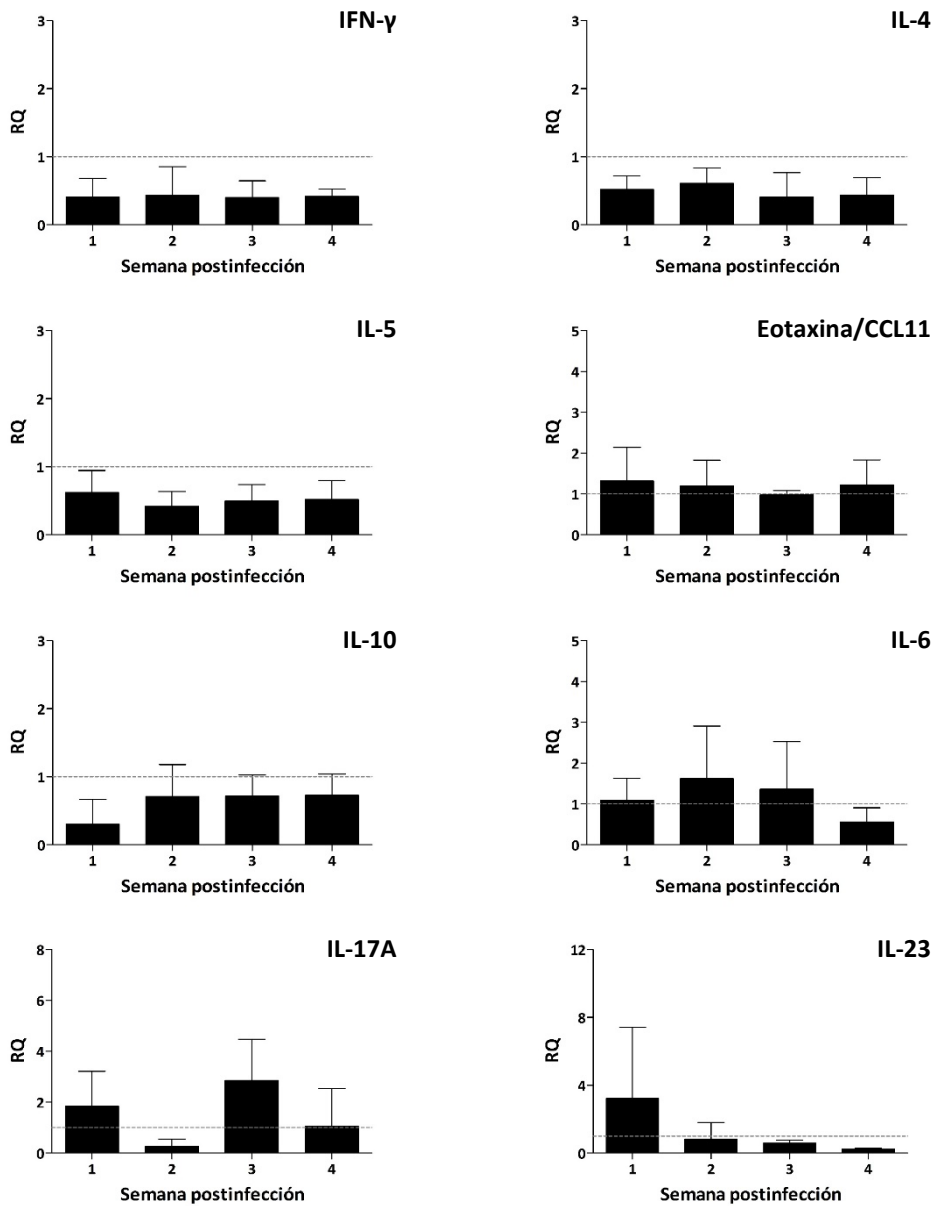


**Figura 3.70.- Citoquinas con expresión diferencial en placas de Peyer de ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que se detectaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de las placas de Peyer durante las primeras semanas postinfección (spi) con *S. muris*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados (0 spi), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi (\* $p < 0,05$ ).

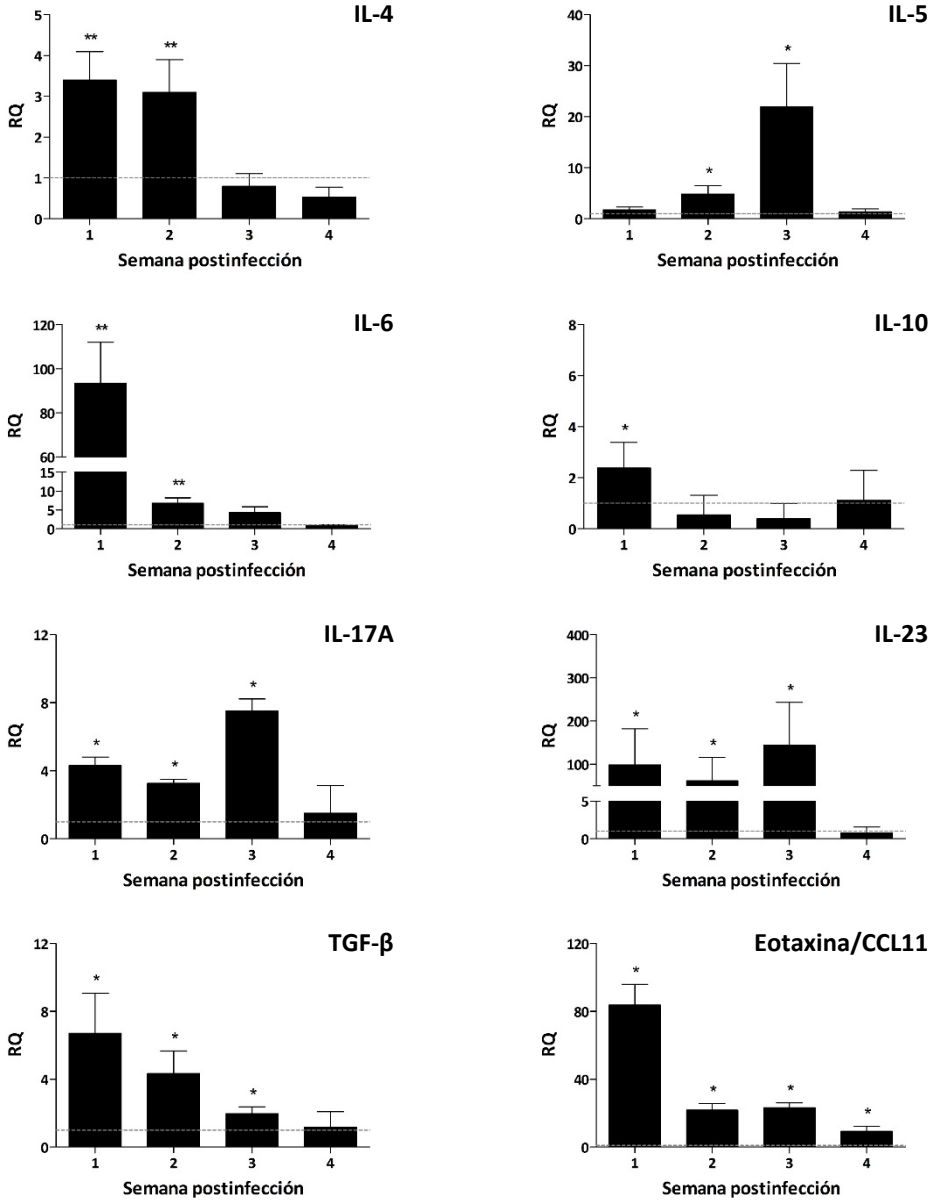
el caso del TNF- $\alpha$  los valores fueron irregulares, aunque significativamente mayores que los de los controles durante cada semana de estudio ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, en el caso de IL-13 y TGF- $\beta$  solo se detectó un incremento transitorio, aunque significativo, en la primera semana postinfección ( $p < 0,05$ ). El resto de citoquinas analizadas no mostraron diferencias significativas en su expresión relativa en respuesta a la infección con *S. muris* (Figura 3.71.).

#### **d) Expresión Relativa de Citoquinas en Tejido Intestinal**

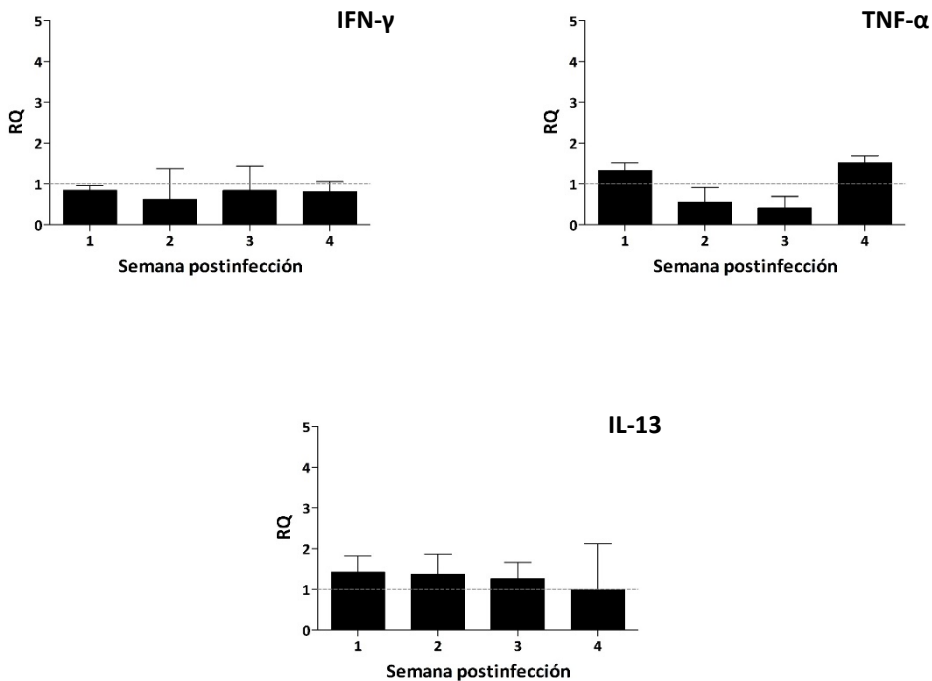
Los resultados obtenidos cuando se analizó la expresión génica de citoquinas en el íleon de ratas infectadas con *S. muris* se recogen en las Figuras 3.72. y 3.73. En este



**Figura 3.71.- Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en placas de Peyer de ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de las placas de Peyer entre animales control e infectados con *S. muris*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados (0 semanas postinfección), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar.



**Figura 3.72.- Citoquinas con expresión diferencial en el íleon de ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que se detectaron diferencias estadísticamente significativas a nivel del íleon durante las primeras semanas postinfección (spi) con *S. muris*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la β-actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados (0 spi), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a 0 spi (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).



**Figura 3.73.- Citoquinas que no mostraron expresión diferencial en el íleon de ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Expresión relativa del mRNA de las citoquinas para las que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas a nivel del íleon entre animales control e infectados con *S. muris*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los controles no infectados (0 semanas postinfección), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar.

tejido se observaron marcados incrementos en la expresión relativa del mRNA de IL-5, IL-6, eotaxina/CCL11 e IL-23 y, en menor medida, de IL-4, IL-10, IL-17A y TGF- $\beta$  (Figura 3.72.). No obstante, cabe resaltar que las respuestas de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 fueron transitorias. En el caso de IL-4 e IL-6 los valores de RQ fueron significativamente superiores a los de los controles en las semanas 1 y 2 pi ( $p < 0,01$ ), mientras que para la IL-10 estuvieron por encima de los controles únicamente en la primera semana postinfección ( $p < 0,05$ ). Los aumentos en la expresión del gen que codifica para la IL-5 fueron estadísticamente significativos en las semanas 2 y 3 pi ( $p < 0,05$ ) y los valores de expresión relativa de IL-17A, IL-23 y TGF- $\beta$  se mantuvieron significativamente por encima de los de los controles desde

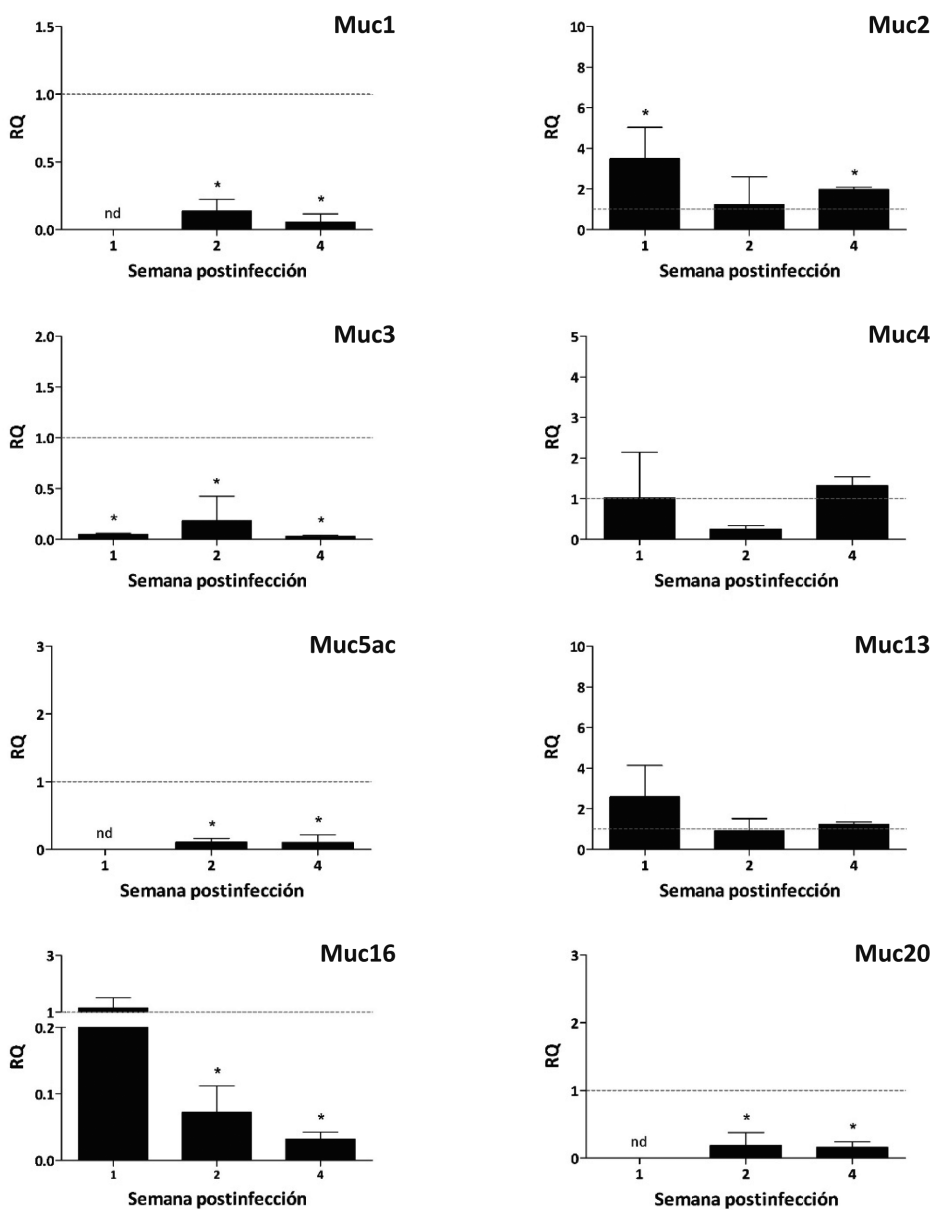
el inicio del experimento hasta la tercera semana postinfección ( $p < 0,05$ ). La expresión relativa del mRNA de eotaxina/CCL11 fue la más constante, con valores de RQ que fueron significativamente superiores a los de los controles durante todo el experimento ( $p < 0,05$ ). El resto de citoquinas analizadas no resultaron alteradas como consecuencia de la infección con *S. muris* (Figura 3.73).

### **3.7.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y GLICOSILACIÓN DE MUCINAS EN EL ÍLEON DE RATAS DURANTE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *SYPHACIA MURIS***

Como se describió anteriormente, las mucinas solubles y transmembrana son proteínas altamente glicosiladas que constituyen la base estructural de una barrera física defensiva, regulada por la inmunidad innata y adaptativa, capaz de responder de forma dinámica a las infecciones gastrointestinales con cambios en la tasa de producción y la composición de sus constituyentes. Con la finalidad de analizar el papel de las mucinas y el moco intestinal en la resistencia inducida por *S. muris* frente a la infección con *E. caproni*, se analizaron los cambios cuantitativos (expresión) y cualitativos (glicosilación) inducidos por la infección primaria sobre las mucinas del íleon de ratas infectadas. Para ello, se evaluaron los niveles de expresión relativa de los genes que codifican para Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5ac, Muc13, Muc15, Muc16 y Muc20 mediante RT-PCRrt. La significatividad estadística de las diferencias observadas se evaluó mediante la aplicación del test estadístico de la *t* de Student, fijando el tiempo postinfección como variable independiente. Asimismo, se analizaron los cambios en el estatus de glicosilación de las mucinas solubles y transmembrana utilizando un total de 5 lectinas con diferente especificidad de ligando [Véase Capítulo II, Apartado 2.5.1. (Tabla 2.2.)].

#### **3.7.4.1. PERFIL DE EXPRESIÓN RELATIVA DE MUCINAS**

El estudio de la expresión relativa de los genes de mucinas en el íleon de ratas infectadas con *S. muris* no mostró aumentos destacados para ninguna de las mucinas analizadas (Figura 3.74.). Si bien se observaron incrementos significativos ( $p < 0,05$ ) en la expresión del mRNA de la mucina soluble Muc2 en las semanas 1 y 4 pi, los aumentos detectados fueron muy ligeros y transitorios. Por el contrario, la expresión de



**Figura 3.74.- Expresión de mucinas en el íleon de ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Expresión relativa del mRNA de mucinas solubles (Muc2 y Muc5ac) y transmembrana (Muc1, Muc3, Muc4, Muc13, Muc16 y Muc20) en el intestino delgado de ratas en diferentes semanas postinfección (spi) con *S. muris*. Las cantidades relativas de expresión (RQ) se muestran tras la normalización con el gen de la  $\beta$ -actina y la relativización respecto a la expresión en los correspondientes controles no infectados (0 spi), representada mediante la línea discontinua. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a 0 spi ( $*p < 0,05$ ). nd: producto de PCR no detectado.

los genes de Muc1, Muc3, Muc16 y Muc20 en el intestino delgado se vio significativamente reducida como consecuencia de la infección ( $p < 0,05$ ). No se detectó producto de PCR amplificado para los genes de Muc1 y Muc20 en la semana 1 pi, siendo la expresión de estas mucinas significativamente inferior a la de los controles en los demás tiempos postinfección analizados ( $p < 0,05$ ). En el caso de Muc3 los valores de RQ fueron significativamente menores que los de los controles en todas las semanas postinfección analizadas ( $p < 0,05$ ), mientras que para Muc16 la expresión se vio significativamente reducida a partir de la segunda semana postinfección ( $p < 0,05$ ). No se observaron cambios significativos en la expresión relativa de Muc4 ni Muc13 y la expresión de Muc15 resultó indeterminada en todos los animales infectados (resultados no mostrados).

Como se comentó anteriormente, Muc5ac es una mucina soluble que en condiciones normales no se expresa a nivel del epitelio intestinal, ni en el intestino delgado ni en el grueso. No obstante, su expresión puede verse incrementada en respuesta a la infección por algunos helmintos intestinales, favoreciendo la expulsión de los mismos (Hasnain *et al.*, 2010; 2011b). A pesar de no ser una mucina propia del epitelio intestinal, se detectaron niveles basales del mRNA de Muc5ac en el íleon de ratas no infectadas, que se vieron significativamente reducidos ( $p < 0,05$ ) tras la infección con *S. muris* (Figura 3.74.). En cualquier caso, hay que resaltar que los niveles de expresión detectados para esta mucina fueron muy bajos durante todo el experimento.

#### 3.7.4.2. PATRÓN DE GLICOSILACIÓN DE MUCINAS

Los resultados descritos hasta el momento habían puesto de manifiesto que la infección con *S. muris* no induce incrementos destacados en la expresión relativa de los genes de mucinas analizados ni hiperplasia de células caliciformes en el íleon de las ratas infectadas. No obstante, no solo los cambios cuantitativos en la producción y secreción de moco intestinal intervienen en la regulación de la infecciones por helmintos intestinales. Es sabido que las alteraciones en el estatus de glicosilación de las mucinas pueden ser importantes para la expulsión de estos parásitos de la luz intestinal. Estas alteraciones pueden afectar las propiedades físicas y bioquímicas del moco intestinal, alterando las

características del nicho en que se establecen los parásitos y facilitando que sean eliminados (Hasnain *et al.*, 2013). Los cambios inducidos por la infección con *S. muris* en la glicosilación de mucinas a nivel del íleon fueron estudiados mediante histoquímica con lectinas, tal y como se describió anteriormente. La concentración de trabajo empleada para cada lectina se indica en la Tabla 3.10. Aunque los resultados de marcaje con cada lectina se describen de forma detallada en los siguientes apartados, en la Tabla 3.11. se resume la intensidad de marcaje de las diferentes estructuras tisulares (glicocáliz, moco soluble y células mucosecretoras) con cada lectina a las 0, 2 y 4 spi con *S. muris*.

**Tabla 3.10.- Lectinas utilizadas en histoquímica: Concentración de trabajo (II)**

Lectina	Concentración de Trabajo
DBA	50 µg/ml
PNA	50 µg/ml
SNA	5 µg/ml
UEA-I	10 µg/ml
WGA	10 µg/ml

**Tabla 3.10.-** Concentración de trabajo de las diferentes lectinas empleadas en histoquímica sobre cortes histológicos de íleon de ratas control e infectadas con *Syphacia muris*.

#### **a) Marcaje con UEA-I**

Cuando se empleó la lectina UEA-I se observaron diferencias en el patrón de marcaje únicamente a las 4 spi (Figura 3.75.). Tanto en los animales control como infectados con *S. muris* a las 2 spi se pudo apreciar un marcaje intenso a nivel del glicocáliz, las células mucosecretoras y el moco soluble. Sin embargo, a las 4 spi se produjo una pérdida total en el marcaje del glicocáliz con esta lectina, indicando que la infección con *S. muris* reduce la expresión de residuos de Fuc a este nivel. Por el contrario, las vesículas



**Tabla 3.11.-** Marcaje en histoquímica con lectinas (II)

Lectina	spi	Glicocáliz	Células caliciformes	Moco soluble
UEA-I	0	+++	+++	+++
	2	+++	+++	+++
	4	-	+++	+++
WGA	0	-	-	-
	2	+/-	-	-
	4	+	+	-
DBA	0	++	+/-	+
	2	+/-	+/-	++
	4	+++	+++	+++
SNA	0	++	++	++
	2	++	++	++
	4	++	++	++
PNA	0	-	-	-
	2	-	-	-
	4	-	-	-

**Tabla 3.11.-** Evaluación subjetiva del marcaje con lectinas, valorado en un rango entre ausente (-) y muy positivo (+++), en el íleon de ratas a diferentes semanas postinfección (spi) con *Syphacia muris*.

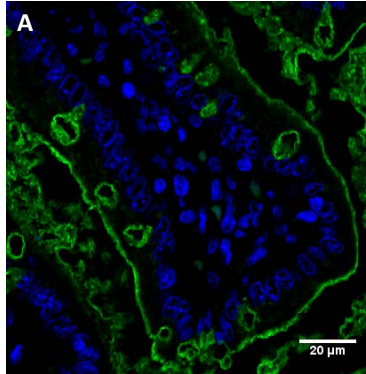
de mucina de las células caliciformes conservaron el marcaje en este tiempo postinfección, apareciendo marcado también el moco soluble.

**b) Marcaje con WGA**

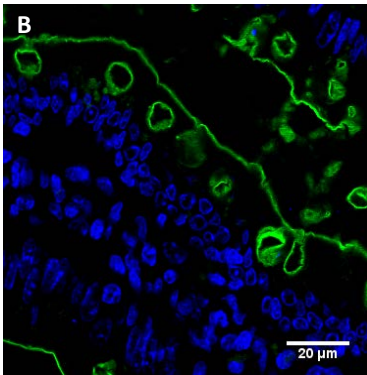
Al incubar las secciones intestinales con la lectina WGA se observaron cambios inducidos por la infección en los dos tiempos postinfección analizados (Figura 3.76.). Con esta lectina no se detectó marcaje específico en el íleon de los animales no infectados. Sin embargo, a las 2 spi las secciones intestinales de los animales infectados con *S. muris* mostraron un marcaje fino y discontinuo a nivel del glicocáliz, que resultó más evidente y continuo transcurridas 4 semanas desde la infección experimental. En este tiempo postinfección (4 spi) las células caliciformes aparecían también ligeramente marcadas

## UEA-I

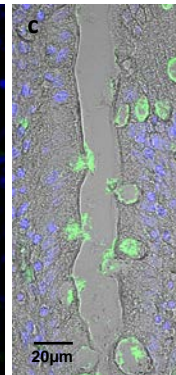
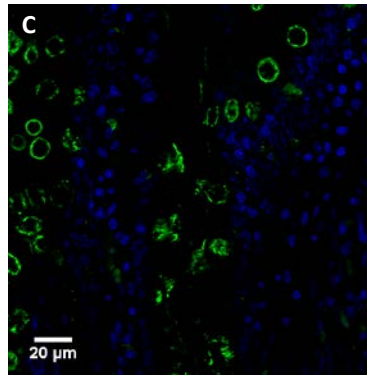
0 spi



2 spi

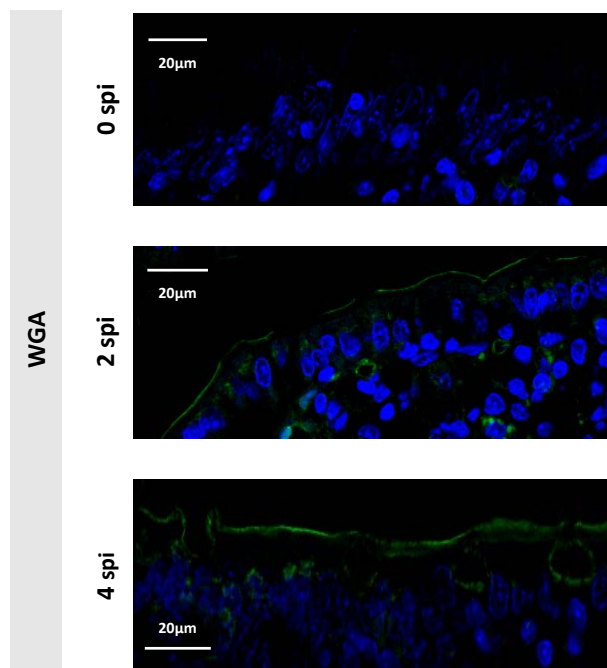


4 spi



**Figura 3.75.-** Marcaje con UEA-I en el íleon de ratas infectadas con *Syphacia muris*. Imágenes de microscopía de fluorescencia (A-C) en las que se muestran los cambios en la glicosilación observados cuando se incubaron cortes histológicos de íleon de ratas control [0 semanas postinfección (spi)] e infectadas con *S. muris* (2 y 4 spi) con la lectina UEA-I (verde). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul). La imagen c muestra la superposición de las imágenes de fluorescencia y transmisión del fragmento central de la imagen C, donde se aprecia con más detalle la pérdida de marcaje a nivel del glicocálix en la 4 spi con *S. muris*.

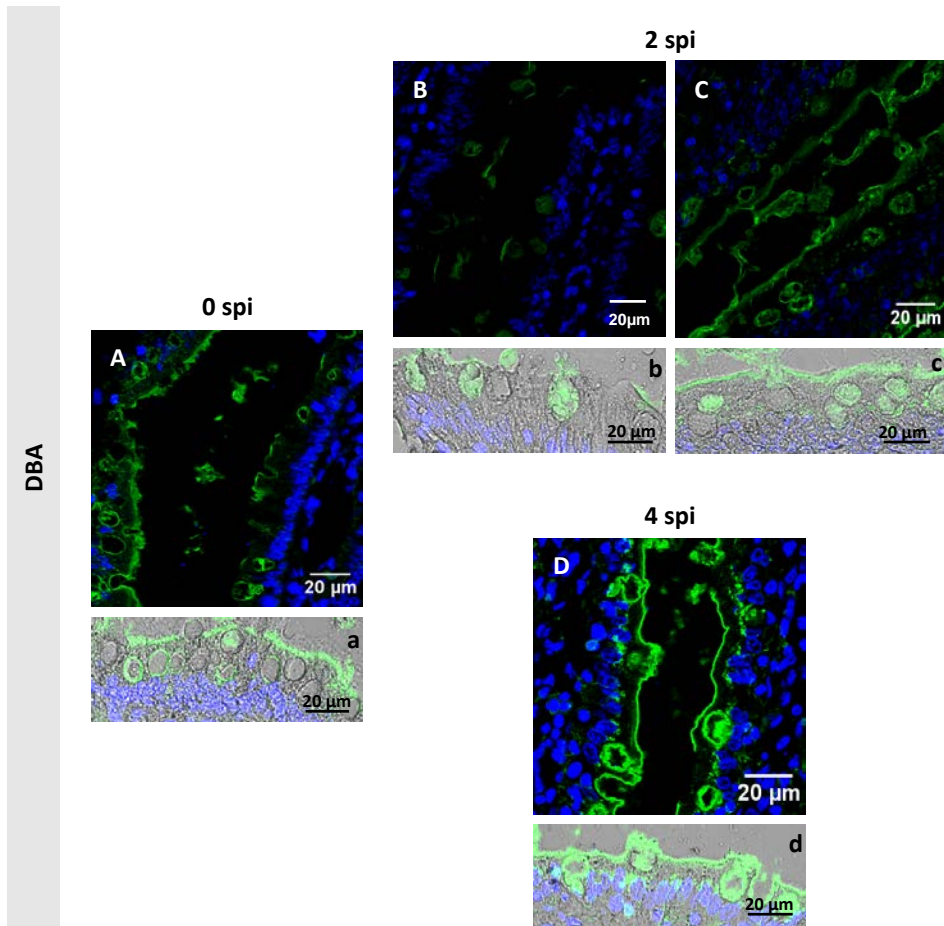
como consecuencia de la unión específica de la lectina. No se observó marcaje del moco soluble en ninguno de los tiempos postinfección analizados.



**Figura 3.76.-** Marcaje con WGA en el íleon de ratas infectadas con *Syphacia muris*. Imágenes de microscopía de fluorescencia en que se muestran los cambios en la glicosilación observados cuando se incubaron cortes histológicos del íleon de ratas control [0 semanas postinfección (spi)] e infectadas con *S. muris* (2 y 4 spi) con la lectina WGA (verde). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul).

### c) Marcaje con DBA

Cuando se incubaron las secciones de íleon de ratas infectadas con *S. muris* con la lectina DBA los resultados obtenidos fueron diferentes en los dos tiempos postinfección estudiados (Figura 3.77.). El patrón de marcaje con DBA observado en los animales infectados con *S. muris* a las 2 spi fue heterogéneo. En este tiempo postinfección, algunos animales infectados con *S. muris* mostraron el mismo marcaje que los animales no infectados, el cual se caracterizó por una señal intensa a nivel del glicocáliz y la presencia de células mucosecretoras, tanto marcadas como no marcadas, en todas las secciones analizadas. En cambio, algunos animales infectados (2 spi) no mostraron marcaje a nivel del glicocáliz y solo algunas células caliciformes aparecieron marcadas (Figura 3.77. B-b y



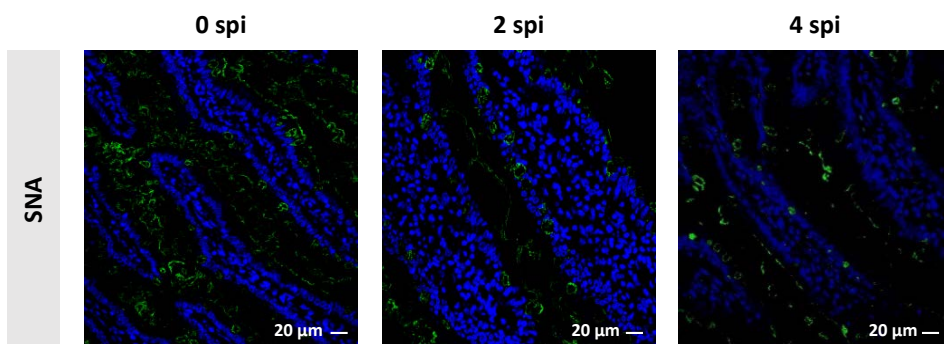
**Figura 3.77.- Marcaje con DBA en el íleon de ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Imágenes de microscopía de fluorescencia (A-D) en las que se muestran los cambios en la glicosilación observados cuando se incubaron cortes histológicos de íleon de ratas control [0 semanas postinfección (spi)] e infectadas con *S. muris* (2 y 4 spi) con la lectina DBA (verde). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul). Las imágenes a-d muestran en detalle la superposición de las imágenes de fluorescencia y transmisión de fragmentos de las imágenes correspondientes (A-D), donde se aprecia la presencia de vesículas de células caliciformes tanto marcadas como no marcadas en las ratas control y a las 2 spi con *S. muris* (a-c).

C-c). El moco soluble estuvo marcado en todos los casos. A las 4 spi, todos los animales infectados mostraban un marcaje muy intenso del glicocáliz y, a diferencia de los controles y los animales infectados a las 2 spi, en este caso todas las células mucoscretoras

presentaron sus vesículas fuertemente teñidas. El marcaje del moco extracelular se conservó en este tiempo postinfección (Figura 3.77. D-d).

#### d) Marcaje con SNA

Cuando se empleó la lectina SNA no se apreciaron diferencias destacadas en el patrón de marcaje entre animales control e infectados (Figura 3.78.). En todos los casos se observó marcaje del glicocálix y las células caliciformes, si bien la intensidad de la señal fue más ligera que para otras lectinas empleadas, como por ejemplo UEA-I o DBA. El moco soluble también resultó puntualmente marcado con esta lectina en todas las secciones analizadas, pertenecientes tanto a animales control como infectados.



**Figura 3.78.- Marcaje con SNA en el ileon de ratas infectadas con *Syphacia muris*.** Imágenes de microscopía de fluorescencia en las que se muestra el patrón de marcaje observado cuando se incubaron cortes histológicos del ileon de ratas control [0 semanas postinfección (spi)] e infectadas con *S. muris* (2 y 4 spi) con la lectina SNA (verde). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul).

#### e) Marcaje con PNA

No se observó marcaje específico de ninguna de las estructuras analizadas cuando se empleó la lectina PNA (resultados no mostrados). El resultado fue negativo en todos los animales analizados, infectados y control (véase Nota al pie 4, en la página 263).

### **3.8. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA FASE ADULTA DE *SYPHACIA MURIS* Y COMPARACIÓN CON *ECHINOSTOMA CAPRONI***

---

El término proteoma fue empleado por primera vez por Wasinger *et al.* (1995) para describir el complemento proteico del genoma. Sin embargo, a diferencia de este, el proteoma de un organismo es dinámico y varía, no solo entre las células, tejidos y órganos del mismo, sino también en función del estado de diferenciación o desarrollo y de las condiciones ambientales.

#### **3.8.1. FUNDAMENTO EXPERIMENTAL**

Uno de los aspectos clave para la caracterización de las relaciones parásito-hospedador es el conocimiento de las proteínas que intervienen en dicha interacción. En este sentido, a pesar de que los oxyúridos son un grupo de parásitos muy extendido en la naturaleza y que diferentes especies de esta familia son responsables de infecciones accidentales frecuentes en colonias de animales de experimentación, el conocimiento en torno a la proteómica de la familia Oxyuridae es aún muy limitado. La búsqueda en la base de datos de proteínas del NCBI con la taxonomía fijada en Oxyuridae devuelve un total de 395 entradas, correspondientes a 21 especies diferentes de oxyúridos. Los géneros mayoritarios son *Enterobius*, con 109 entradas correspondientes a 4 especies diferentes y *Syphacia*, con 161 entradas pertenecientes a 7 especies distintas. Dentro de cada género, las especies con un mayor número de entradas en la base de datos son *E. vermicularis* (101) y *S. obvelata* (138), respectivamente. Teniendo en cuenta la gran variedad de géneros y especies que se incluyen dentro de la familia Oxyuridae, 395 entradas supone un número relativamente pequeño. Más llamativo aún resulta que estas 395 entradas corresponden únicamente a 13 proteínas distintas, siendo en realidad, diferentes subunidades de 4 complejos enzimáticos como son los complejos de la NADH deshidrogenasa, el citocromo b, la citocromo c oxidasa y el complejo de la ATP sintasa.

Con la finalidad de profundizar en el conocimiento de las proteínas posiblemente implicadas en la interacción entre *S. muris* y el hospedador se llevó a cabo el análisis

proteómico del antígeno somático de este nematodo, empleando ejemplares adultos, machos y hembras, recuperados de ratas infectadas experimentalmente. Asimismo, dado que los estudios de coinfección entre *S. muris* y *E. caproni* desarrollados en el marco de la presente Tesis Doctoral pusieron de manifiesto un alto grado de reactividad cruzada entre los anticuerpos generados frente a este nematodo y los antígenos de *E. caproni*, se ha realizado una comparación cualitativa entre los resultados obtenidos y los resultados publicados previamente en relación al proteoma y el transcriptoma de *E. caproni*.

### 3.8.2. PROTEOMA DEL ESTADIO ADULTO DE *SYPHACIA MURIS*

El estudio proteómico del antígeno somático de *S. muris* se llevó a cabo por LC-MS/MS siguiendo dos aproximaciones diferentes: (I) análisis del producto fraccionado por IEE y (II) análisis del producto completo en una sola inyección. Por otra parte, los datos espectrométricos se analizaron utilizando los motores de búsqueda *MASCOT* y *ProteinPilot™*, con la finalidad de incrementar el número de indentificaciones por su similitud con proteínas conocidas, incluidas en las bases de datos NCBI nr, NCBI Metazoa y EST-nematode (NCBI).

En conjunto, en los dos análisis, se identificaron un total de 4.739 péptidos, un 20,2% de los cuales (959) mostraron homología significativa con proteínas conocidas. Cabe señalar que ninguna de las proteínas identificadas se correspondió con alguna de las proteínas de *S. muris* o de otras especies de la familia Oxyuridae disponibles en las bases de datos, sino que se identificaron por su homología con proteínas de otros nematodos, parásitos y de vida libre. En total se identificaron 330 proteínas (259 empleando *MASCOT* y 71 cuando se utilizó el software *ProteinPilot™*), si bien 21 de ellas fueron identificadas simultáneamente con ambos motores de búsqueda. Del total de proteínas identificadas, 204 (155 con *MASCOT* y 49 con *ProteinPilot™*) presentaron funciones biológicas conocidas, mientras que las 126 restantes (104 y 22, respectivamente) tenían ontología desconocida. Los datos de identificación de estas proteínas se pueden consultar en las Tablas 3.12. y 3.13.

**Tabla 3.12.-** Proteínas del antígeno completo de adultos de *Syphacia muris* identificadas con MASCOT

Proteína	Especie	Número GI (NCBI) <sup>a</sup>	MASCOT Score	Péptidos coincidentes <sup>b</sup>
<b>Enzimas metabólicas (28)</b>				
Enolasa	<i>Heterorhabditis indica</i>	296940216	274	29
Proteína GPD-3 <sup>i</sup> (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	32566163	252	57
Triosa fosfato isomerasa	<i>Brugia malayi</i>	170584984	241	16
Propionil-CoA carboxilasa	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	268580197	217	17
Adenilato quinasa 1	<i>Loa loa</i>	312099159	185	26
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	<i>Ascaris suum</i>	464437	172	6
Metilmalonil-CoA epimerasa	<i>C. briggsae</i>	309360534	149	27
ATP sintasa, cadena beta	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	268619096	132	6
Malato deshidrogenasa citosólica	<i>Trichinella spiralis</i>	316971266	124	5
Presunto complejo piruvato deshidrogenasa dihidrolipoamida acetiltransferasa	<i>T. spiralis</i>	316971165	106	9
Adenina deaminasa	<i>Oenococcus oeni</i>	116491444	83	3
Nucleósido difosfato quinasa	<i>L. loa</i>	312073888	80	3

<sup>i</sup> La mayoría de las proteínas de *Caenorhabditis* spp. reciben nombres abreviados que, generalmente, coinciden con el nombre del gen que codifica para la proteína en cuestión. En estos casos el nombre completo de la proteína se indica entre paréntesis.



NADH deshidrogenasa subunidad 2	<i>C. elegans</i>	170027356	79	3
Proteína CRE-PGK-1 (fosfoglicerato quinasa)	<i>C. elegans</i>	308505762	78	2
Procolágeno-lisina,2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2	<i>L. loa</i>	312082545	69	5
Piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasa	<i>Carnobacterium sp.</i>	163789514	68	2
Ornitina aminotransferasa	<i>T. spiralis</i>	316975343	67	3
6-fosfofructoquinasa	<i>L. loa</i>	312078540	64	2
NADH-ubiquinona oxidorreductasa	<i>B. malayi</i>	170583233	64	2
Miembro de la familia carboxilesterasa	<i>B. malayi</i>	170581723	62	2
Glicosil hidrolasa, familia 47	<i>T. spiralis</i>	316971486	61	2
Oxidorreductasa, familia de proteínas deshidrogenasas unidoras de zinc	<i>B. malayi</i>	170595381	60	4
ATP sintasa vacuolar subunidad D	<i>L. loa</i>	312081600	59	9
Aldosa reductasa	<i>T. spiralis</i>	316975573	58	3
Presunta malonil-CoA descarboxilasa	<i>B. malayi</i>	170594966	54	2
Oxidorreductasa, familia de proteínas deshidrogenasa/reductasa de cadena corta	<i>B. malayi</i>	170592821	54	2
Presunta proteína hidrolasa con plegamiento alfa/beta	<i>T. spiralis</i>	316971528	53	7
Proteína UCR-2.1, isoforma a (complejo ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa)	<i>C. elegans</i>	17570205	52	2
<b>Miscelánea (23)</b>				
<i>Disorganized muscle protein 1</i>	<i>B. malayi</i>	170589519	213	21

Proteína CBR-LEC-3 (galectina)	<i>C. briggsae</i>	309359857	202	6
Peroxidoxina-2	<i>Onchocerca volvulus</i>	2829135	185	26
Proteína CRE-LET-49 (letal 49)	<i>Caenorhabditis remanei</i>	308485796	118	15
Tiorredoxina peroxidasa	<i>Dirofilaria immitis</i>	2347119	82	4
Presunta proteína con dominio fibronectina tipo III	<i>T. spiralis</i>	316976745	75	4
Proteína FBXA-80 (proteína A con caja F)	<i>C. elegans</i>	32565209	73	4
Proteína ribosomal 60S L18a	<i>L. loa</i>	312088693	73	5
Proteína CRE-EPG-5 (proteína de gránulos P ectópicos)	<i>C. remanei</i>	308503336	68	3
Alquildihidroxiacetonafofato sintasa	<i>L. loa</i>	312074176	67	30
Proteína ribosomal 40S S21	<i>L. loa</i>	312067018	67	3
Proteína de la familia antígeno repetitivo de superficie	<i>T. spiralis</i>	316976930	67	3
Proteína NPP-9, isoforma b (proteína del poro nuclear)	<i>C. elegans</i>	32565674	64	5
Proteína EGL-21 ( <i>egg laying defective</i> )	<i>C. elegans</i>	17539632	62	2
Presunta proteína con dominio inmunoglobulina	<i>T. spiralis</i>	316975004	61	4
Atlastina-1	<i>T. spiralis</i>	316971640	60	16
Antígeno repetitivo L3R15	<i>B. malayi</i>	148466892	60	4
Proteína striatina-3	<i>T. spiralis</i>	316975910	59	4
Precursor ASABF	<i>A. suum</i>	21322740	59	2
Tanquirasa-1	<i>T. spiralis</i>	316974869	58	2

Acetilcolinesterasa 1	<i>T. spiralis</i>	316972186	54	2
Proteína peroxisomal de anclaje a la membrana	<i>B. malayi</i>	170575004	52	10
Proteína pad-1 ( <i>patterning defective</i> )	<i>T. spiralis</i>	316968182	52	3

#### **Metabolismo de ácidos nucleicos/ Ciclo celular (22)**

Proteína CBR-GFI-3 (subunidad del complejo promotor de anafase)	<i>C. briggsae</i>	309362817	252	11
Proteína CBR-EFT-3.2 (factor de elongación)	<i>C. briggsae</i>	309366626	96	5
Proteína EEF-1A.2, isoforma c (factor de elongación de la traducción)	<i>C. elegans</i>	32566301	96	5
Factor de elongación 2	<i>T. spiralis</i>	316978456	85	2
Complejo integrador, subunidad 9	<i>T. spiralis</i>	316979622	79	32
Proteína ICD-1 (inhibidor de la muerte celular)	<i>L. loa</i>	312071431	76	4
RNA polimerasa 2	<i>Rhabditoides regina</i>	157841492	74	3
Proteína CRE-COM-1 (terminación de la recombinación meiótica)	<i>C. remanei</i>	308497070	72	9
Factor de elongación 1-alfa	<i>L. loa</i>	312078818	68	6
Proteína CRE-REC-8 (subunidad del complejo cohesina específica de meiosis)	<i>C. remanei</i>	308485326	67	3
Factor de transcripción nuclear Y, subunidad beta	<i>L. loa</i>	312094318	64	3
Miembro de la familia de histonas de tipo H1 (hil-2)	<i>C. elegans</i>	71999558	63	3
Proteína PAB-1, isoforma b (proteína de unión a la cola poliA)	<i>C. elegans</i>	71993209	62	2
Presunta ribonucleasa Oy	<i>T. spiralis</i>	316971315	59	2
Proteína CRE-LET-756 (ligando tipo factor de crecimiento de fibroblastos)	<i>C. remanei</i>	308498850	59	4

Proteína CRE-TRR-1 (subunidad de complejos histona acetil transferasa)	<i>C. remanei</i>	308510324	59	3
Parafibromina	<i>T. spiralis</i>	316971884	57	3
Proteína CBR-ATL-1 [ <i>ataxia telangectasia mutated</i> ]-like]	<i>C. briggsae</i>	309356998	57	2
DNA polimerasa familia B	<i>B. malayi</i>	170575674	55	3
Proteína CBR-HPR-17 (Rad)	<i>C. briggsae</i>	309365065	55	2
Proteína CRE-SMG-2 (regulador de transcritos sin sentido)	<i>C. remanei</i>	308505126	54	2
Proteína con dedos de zinc	<i>T. spiralis</i>	316978913	53	3

#### Proteínas motoras y estructurales (21)

---

Tropomiosina	<i>O. volvulus</i>	42559586	651	22
Actina	<i>Bursaphelenchus mucronatus</i>	270309012	351	33
Miosina, cadena pesada B	<i>L. loa</i>	312098597	167	10
Proteína CRE-MLC-3 (miosina, cadena ligera)	<i>C. remanei</i>	308497094	148	12
Troponina	<i>B. malayi</i>	170587394	102	2
Cadena ligera 1 de dineína, citoplásmica	<i>B. malayi</i>	170585424	118	5
Tubulina, cadena beta	<i>T. spiralis</i>	316966293	83	3
Colágeno cuticular rol-6	<i>T. spiralis</i>	316978232	75	3
Proteína con dominio vilina	<i>B. malayi</i>	170593169	72	3
Cadena ligera reguladora de miosina 1	<i>L. loa</i>	312072078	72	3
Proteína tipo quinesina vab-8	<i>C. briggsae</i>	306526274	71	6

Proteína CBR-SMA-1 (espectrina beta-H)	<i>C. briggsae</i>	309354943	64	5
Proteína VAB-10B (espectraplaquina)	<i>C. elegans</i>	27801760	62	4
Beta-tubulina	<i>Caenorhabditis brenneri</i>	240265890	61	2
Presunta proteína con dominio quinesina	<i>T. spiralis</i>	316978409	58	3
Proteína IFA-1, isoforma c (proteína de filamentos intermedios)	<i>C. elegans</i>	133901976	57	4
Paramiosina, isoforma 1	<i>Dictyocaulus viviparus</i>	47606682	55	2
Proteína TTN-1, isoforma g (miembro de la familia Titin)	<i>C. elegans</i>	72000923	54	2
Proteína CBR-INFT-2 (formina)	<i>C. briggsae</i>	309361839	54	2
Proteína CBR-HUM-8 (miosina no convencional, cadena pesada)	<i>C. briggsae</i>	309359764	53	2
Tubulina, miembro de la familia alfa (tba-1)	<i>C. elegans</i>	17509355	52	2
<b>Transportadores y receptores transmembrana (15)</b>				
Familia de proteínas transportadoras ABC	<i>B. malayi</i>	170585949	90	5
Proteína CBR-KCC-2 (cotransportador K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> )	<i>C. briggsae</i>	309360076	71	2
Proteína CBR-SRI-18 (quimiorreceptor serpentina clase I)	<i>C. briggsae</i>	309361799	70	6
Proteína CBR-STR-206 (receptor 7TM)	<i>C. briggsae</i>	309356751	66	6
Miembro 1 del complejo receptor SNAP Golgi	<i>T. spiralis</i>	316979339	57	2
Proteína SULP-1 (transportador sulfato permeasa)	<i>C. elegans</i>	71982567	55	3
Proteína CLH-1, isoforma a (canal de Cl <sup>-</sup> tipo CLC)	<i>C. elegans</i>	71996452	54	3
Transportador de tiamina 2	<i>T. spiralis</i>	316971928	54	9
Unc-5	<i>C. elegans</i>	71981383	53	3

Proteína CCB-1 (subunidad de canal de Ca <sup>+2</sup> regulado por voltaje)	<i>C. elegans</i>	115533639	53	2
Proteína GLT-4 (transportador de glutamato)	<i>C. elegans</i>	71996953	53	2
Proteína CRE-LOV-1 ( <i>location of vulva defective</i> )	<i>C. remanei</i>	308510136	52	4
Proteína CRE-PGP-11 (superfamilia de transportadores ABC)	<i>C. remanei</i>	308509274	52	2
Proteína CBR-IMB-3 (proteína tipo importina beta)	<i>C. briggsae</i>	309355414	52	2
Proteína SRAB-20 (receptor serpenita clase AB, tipo A)	<i>C. elegans</i>	72000641	52	1

### Metabolismo de proteínas (13)

---

Disulfuro isomerasa	<i>A. suum</i>	187942166	232	6
Proteína CRE-CYN-7 (ciclofilina A)	<i>C. remanei</i>	308506549	161	7
Peptidil-prolil cis-trans isomerasa-2 de tipo ciclofilina, Bmcp-2	<i>B. malayi</i>	170596067	153	4
Proteína de la familia de ubiquitina	<i>T. spiralis</i>	316979574	119	6
Proteína SMO-1	<i>L. loa</i>	312068123	107	3
Proteína AMAN-3 (alfa manosidasa)	<i>C. elegans</i>	71986473	83	20
Catepsina tipo D, aspártico proteasa	<i>Anisakis simplex</i>	262232673	75	4
Proteína relacionada con fructosamina-3-quinasa	<i>B. malayi</i>	170584159	66	20
Proteína con dominio NAC	<i>L. loa</i>	312084276	58	3
Proteína CBR-PAS-5 (subunidad alfa del proteasoma)	<i>C. briggsae</i>	309365348	58	3
Proteína con dominio dimerización de peptidasas	<i>L. loa</i>	312068158	57	4
Miembro de la familia hidrolasa carboxil-terminal de ubiquitina	<i>B. malayi</i>	170583692	56	5

Proteína con dominio MATH (math-45)	<i>C. elegans</i>	32564817	55	6
<b>Chaperonas (10)</b>				
Chaperonina 10 kDa	<i>B. malayi</i>	170596401	180	13
p27	<i>Dirofilaria immitis</i>	1206025	134	9
Proteína CRE-HSP-6 (Proteína de choque térmico-6)	<i>C. remanei</i>	308506465	112	4
Proteína CRE-CRT-1 (calreticulina)	<i>C. remanei</i>	308500596	111	2
Proteína CRE-HSP-4 (Proteína de choque térmico-4)	<i>C. remanei</i>	308503104	90	2
HSP60	<i>O. volvulus</i>	4680247	88	6
Calnexina	<i>T. spiralis</i>	316975460	78	4
Proteína CRE-HSP-1 (Proteína de choque térmico-1)	<i>C. remanei</i>	308482446	73	3
Proteína de choque térmico 90	<i>L. loa</i>	312065174	62	2
Endoplasmina	<i>L. loa</i>	312075055	52	1
<b>Señalización celular (10)</b>				
Proteína CBR-FTT-2 (14-3-3)	<i>C. briggsae</i>	268577907	566	90
Proteína CBR-GCY-33 (guanilato ciclasa)	<i>C. briggsae</i>	309354927	87	15
Proteína TK/KIN16	<i>L. loa</i>	312079325	64	5
Proteína con actividad proteína tirosina fosfatasa	<i>B. malayi</i>	170586388	64	4
Proteína quinasa CK1/TTBKL	<i>L. loa</i>	312068993	62	3
Serina/Treonina quinasa	<i>B. malayi</i>	170591276	55	3

Proteína CRE-SAD-1 (Ser/tproteína quinasa)	<i>C. remanei</i>	308486715	52	2
Proteína tirosina fosfatasa	<i>L. loa</i>	312079596	52	2
Proteína CBR-GRL-14 (proteína tipo hedgehog)	<i>C. briggsae</i>	309363700	52	2
Proteína CBR-SAEG-1 (supresor de EGL-4 activado)	<i>C. briggsae</i>	309361724	51	2
<b>Hospedador/Bacteria (8)</b>				
Precursor de albúmina	<i>Rattus norvegicus</i>	158138568	689	30
Beta-hemoglobina	<i>R. norvegicus</i>	204570	160	7
Histidina quinasa regulón sensor fosfato	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	227889701	76	3
Fosfolipasa C-beta-1b	<i>R. norvegicus</i>	149023393	69	1
Piruvato quinasa	<i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum</i>	170289777	67	5
Proteína hipotética	<i>Lactobacillus salivarius</i>	227892010	65	2
ATPasa	<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	206900106	58	1
Superfamilia SNF2	<i>Micromonas sp.</i>	255072403	58	2
<b>Unidoras de calcio (5)</b>				
Proteína tipo calponina	<i>T. spiralis</i>	237638727	377	84
Proteína CRE-CALU-1 (calumenina)	<i>C. remanei</i>	308511999	109	6
Proteína CRE-PAT-10 (troponina C)	<i>C. remanei</i>	308473997	100	9
Anexina	<i>L. loa</i>	312080878	87	9
Proteína CRE-CPNA-2 ( <i>copine domain protein, atypical</i> )	<i>C. remanei</i>	308480599	58	4



**Función desconocida (104)**

---

Proteína hipotética CBG15312	<i>C. briggsae</i>	268576310	78	5
Proteína hipotética M02D8.1	<i>C. elegans</i>	17568939	78	2
Proteína hipotética CRE_17236	<i>C. remanei</i>	308489614	77	20
Proteína hipotética CRE_20702	<i>C. remanei</i>	308485772	76	3
Proteína hipotética CRE_06539	<i>C. remanei</i>	308495472	76	6
Proteína hipotética CRE_04843	<i>C. remanei</i>	256251530	75	3
Proteína hipotética CRE_19308	<i>C. remanei</i>	308474081	73	2
Proteína hipotética CBG_11897	<i>C. briggsae</i>	309360639	73	5
Proteína hipotética LOAG_01380	<i>L. loa</i>	312067913	73	3
Proteína hipotética LOAG_03166	<i>L. loa</i>	312071748	73	2
Proteína hipotética Cbre_JD13.011	<i>Caenorhabditis breneri</i>	209489336	72	8
Proteína hipotética Bm1_25250	<i>B. malayi</i>	170583284	72	3
Proteína hipotética CRE_05768	<i>C. remanei</i>	308243897	72	22
Proteína hipotética CRE_00392	<i>C. remanei</i>	308511439	70	7
Proteína hipotética CBG_05169	<i>C. briggsae</i>	309363929	70	5
Miembro de la familia <i>Apex-related genes</i>	<i>C. elegans</i>	71989021	70	3
Proteína hipotética CRE_02007	<i>C. remanei</i>	308509202	70	2
Proteína hipotética Bm1_57070	<i>B. malayi</i>	170596721	69	3

Proteína hipotética LOAG_13760	<i>L. loa</i>	312099316	69	2
Proteína hipotética LOAG_03622	<i>L. loa</i>	312072749	68	2
Proteína hipotética CBG_24445	<i>C. briggsae</i>	309366672	67	3
Proteína hipotética CRE_16923	<i>C. remanei</i>	308477483	66	2
Proteína hipotética CRE_15263	<i>C. remanei</i>	308445979	66	3
Proteína hipotética Bm1_17265	<i>B. malayi</i>	170579619	66	5
Proteína hipotética CBG_07629	<i>C. briggsae</i>	309362763	65	2
Proteína hipotética CBG_24674	<i>C. briggsae</i>	309366565	64	3
Proteína hipotética LOAG_12425	<i>L. loa</i>	312094335	64	2
Proteína hipotética CRE_06558	<i>C. remanei</i>	308495604	64	2
Proteína hipotética CBG13246	<i>C. briggsae</i>	268572699	62	12
Proteína hipotética CRE_29046	<i>C. remanei</i>	308464934	62	5
GRSP-1 (proteína secretada rica en glicina)	<i>C. elegans</i>	72001162	62	3
Proteína hipotética CBG_18306	<i>C. briggsae</i>	309357450	62	2
Proteína hipotética LOAG_16110	<i>L. loa</i>	312119007	62	2
Proteína hipotética CBG14663	<i>C. briggsae</i>	268579391	62	2
Proteína hipotética CRE_03312	<i>C. remanei</i>	308480920	62	1
Proteína hipotética B0524.6	<i>C. elegans</i>	17551906	60	10
Proteína hipotética CBG09009	<i>C. briggsae</i>	268571813	60	7

Proteína hipotética F10E7.1	<i>C. elegans</i>	115533957	60	4
Proteína hipotética CRE_22845	<i>C. remanei</i>	308484424	60	3
Proteína hipotética CBG_05653	<i>C. briggsae</i>	309363744	60	2
Proteína hipotética CRE_31105	<i>C. remanei</i>	308500698	60	2
Proteína hipotética CBG_05653	<i>C. briggsae</i>	309363744	60	2
Proteína hipotética F54D5.14	<i>C. elegans</i>	17534363	60	2
Proteína hipotética CRE_30902	<i>C. remanei</i>	308500626	59	9
Proteína hipotética LOAG_03306	<i>L. loa</i>	312072055	59	6
Proteína hipotética Y102E9.2	<i>C. elegans</i>	193210638	59	5
Proteína hipotética CRE_24014	<i>C. remanei</i>	308485034	59	3
Proteína hipotética CRE_10895	<i>C. remanei</i>	308492984	59	2
Proteína hipotética LOAG_04738	<i>L. loa</i>	312075226	59	2
Proteína hipotética CBG_24166	<i>C. briggsae</i>	309366786	58	13
Proteína hipotética F43D9.3	<i>C. elegans</i>	193205775	58	4
Proteína hipotética CRE_14508	<i>C. remanei</i>	308490067	58	3
Proteína hipotética CBG_27845	<i>C. briggsae</i>	309358069	58	3
Proteína hipotética CBG_05911	<i>C. briggsae</i>	309363575	58	2
Proteína hipotética LOAG_08029	<i>L. loa</i>	312082835	58	2
Proteína hipotética CBG_01086	<i>C. briggsae</i>	309365747	58	2

Proteína hipotética CBG_16436	<i>C. briggsae</i>	309358215	58	2
Proteína hipotética F14F4.1	<i>C. elegans</i>	17551698	58	2
Proteína hipotética CRE_23696	<i>C. remanei</i>	308465521	58	2
Proteína hipotética CBG_02113	<i>C. briggsae</i>	309365522	57	5
Proteína hipotética CRE_21224	<i>C. remanei</i>	308486149	57	5
Proteína hipotética CRE_12186	<i>C. remanei</i>	308471947	57	3
Presunta proteína de célula glandular esofágica Hgg-20	<i>Heterodera glycines</i>	18677164	57	2
Proteína hipotética CRE_00058	<i>C. remanei</i>	308512575	56	8
Proteína hipotética K10B4.3	<i>C. elegans</i>	71992322	56	3
Proteína hipotética CBG_09473	<i>C. briggsae</i>	309361842	56	2
Proteína hipotética CRE_14687	<i>C. remanei</i>	308490147	56	2
Proteína hipotética LOAG_10139	<i>L. loa</i>	312088060	56	2
Proteína hipotética CBG_07523	<i>C. briggsae</i>	309362807	55	5
Proteína hipotética CRE_09158	<i>C. remanei</i>	308507885	55	4
Proteína hipotética CRE_20704	<i>C. remanei</i>	308485688	55	4
Proteína hipotética CBG03383	<i>C. briggsae</i>	268537128	55	4
Proteína hipotética CBG_26416	<i>C. briggsae</i>	309356492	55	4
Proteína hipotética CBG24202	<i>C. briggsae</i>	268568898	55	2
Proteína hipotética Tsp_10408	<i>T. spiralis</i>	316968793	54	12

Proteína hipotética CBG_15863	<i>C. briggsae</i>	309358512	54	4
Proteína hipotética CRE_22688	<i>C. remanei</i>	308459613	54	3
Proteína hipotética C18H2.1	<i>C. elegans</i>	133905197	54	2
Proteína hipotética Y38H8A.2	<i>C. elegans</i>	115533004	54	2
Proteína hipotética CBG19490	<i>C. briggsae</i>	268562932	54	2
Proteína hipotética CRE_15286	<i>C. remanei</i>	308488253	54	1
Proteína hipotética CRE_18083	<i>C. remanei</i>	308476446	53	7
Proteína hipotética Tsp_10353	<i>T. spiralis</i>	316966951	53	5
Proteína hipotética CBG_12265	<i>C. briggsae</i>	309360408	53	3
Proteína hipotética Bm1_06060	<i>B. malayi</i>	170574131	53	3
Proteína hipotética Tsp_11158	<i>T. spiralis</i>	316967525	53	2
Proteína hipotética F31D4.2	<i>C. elegans</i>	17560374	53	2
Proteína hipotética LOAG_04910	<i>L. loa</i>	312075615	53	2
Proteína hipotética CBG_12730	<i>C. briggsae</i>	309360233	53	2
Proteína hipotética LOAG_06920	<i>L. loa</i>	312080208	53	2
Proteína hipotética LOAG_03677	<i>L. loa</i>	312072869	52	4
Proteína hipotética CRE_07908	<i>C. remanei</i>	308454214	52	3
Proteína hipotética CRE_04606	<i>C. remanei</i>	308497380	52	2
Proteína CRE-TAG-192	<i>C. remanei</i>	308497953	52	2

Proteína hipotética CRE_02191	<i>C. remanei</i>	308509286	52	2
Proteína hipotética CBG_09328	<i>C. briggsae</i>	309361921	52	2
Proteína hipotética CBG23011	<i>C. briggsae</i>	268576216	52	2
Proteína hipotética CRE_31297	<i>C. remanei</i>	308481490	52	2
Proteína hipotética LOAG_12525	<i>L. loa</i>	312094622	52	2
Proteína hipotética CRE_31447	<i>C. remanei</i>	308467967	52	2
Proteína hipotética CRE_10011	<i>C. remanei</i>	308492291	51	3
Proteína hipotética CRE_29480	<i>C. remanei</i>	308499563	51	2
Proteína hipotética CBG_13710	<i>C. briggsae</i>	309359639	51	2
Proteína hipotética CBG_08251	<i>C. briggsae</i>	309362453	51	2

<sup>a</sup> Número GI de acceso de la proteína en la base de datos de proteínas del NCBI.

<sup>b</sup> Número de péptidos coincidentes con la secuencia de la proteína anotada.

**Tabla 3.12.-** Proteínas del antígeno total de la fase adulta de *Syphacia muris* identificadas por espectrometría de masas y búsqueda en las bases de datos NCBI<sup>nr</sup> y EST-nematode (NCBI) con el motor de búsqueda MASCOT v 2.2.03 (Matrix Science), clasificadas de acuerdo con su función biológica.

**Tabla 3.13.-** Proteínas del antígeno completo de adultos de *Syphacia muris* identificadas con *ProteinPilot™*

Proteína	Especies	Número GI (NCBI) <sup>a</sup>	Score <sup>b</sup>	Péptidos coincidentes <sup>c</sup>
<b>Enzimas metabólicas (15)</b>				
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa [GTP]	<i>Ascaris suum</i>	464437	12,6	7
Proteína CBR-MCE-1 <sup>i</sup> (metilmalonil-CoA epimerasa)	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	268560632	9,3	4
Proteína ENOL-1, isoforma c	<i>Caenorhabditis elegans</i>	71995829	8,8	4
Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa	<i>Onchocerca volvulus</i>	5052015	8,6	4
Propionil-CoA carboxilasa cadena alfa, mitocondrial	<i>C. elegans</i>	74964123	8,1	6
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2	<i>C. briggsae</i>	417018	5,7	5
Proteína PCCB-1, isoforma b (Propionil-CoA carboxilasa subunidad beta)	<i>C. elegans</i>	25147362	5,1	2
Adenilato quinasa isoenzima 1	<i>Brugia malayi</i>	170578003	5,0	2
Citocromo b	<i>Agamermis sp. BH-2006</i>	162424487	4,4	2
Fosfoglicerato quinasa	<i>A. suum</i>	324517212	2,6	1
Proteína CRE-AHCY-1 (S-adenosilhomociteína hidrolasa)	<i>Caenorhabditis remanei</i>	308505972	2,5	1
Proteína HPD-1 (4-hidroxifenilpiruvato deshidrogenasa)	<i>C. elegans</i>	17555220	2,3	1
Delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa, precursor mitocondrial	<i>B. malayi</i>	170573040	2,1	1

<sup>i</sup> La mayoría de las proteínas de *Caenorhabditis* spp. reciben nombres abreviados que, generalmente, coinciden con el nombre del gen que codifica para la proteína en cuestión. En estos casos el nombre completo de la proteína se indica entre paréntesis.

Proteína CBR-ATP-2 (ATP sintasa, subunidad beta)	<i>C. briggsae</i>	268575600	2,0	1
Triosa fosfato isomerasa	<i>Loa loa</i>	312086704	2,0	2
<b>Miscelánea (8)</b>				
Ag3	<i>Baylisascaris schroederi</i>	219665135	6,7	2
Antígeno filárico	<i>B. malayi</i>	1041968	5,7	2
Proteína tipo trombospondina	<i>Dictyocaulus viviparus</i>	170791244	4,0	2
Tiorredoxina peroxidasa	<i>Acanthocheilonema viteae</i>	19698783	3,9	3
Galectina GAL-1	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	5070261	2,8	1
Proteína de compensación de dosis dpy-30	<i>A. suum</i>	324509256	2,1	1
Proteína NEP-19 (neprilisina)	<i>C. elegans</i>	71994787	2,0	1
Zinc metalopeptidasa 1	<i>Ancylostoma caninum</i>	13518042	1,5	1
<b>Metabolismo de ácidos nucleicos/ Ciclo celular (4)</b>				
Proteína PFS-2 (subunidad de factor de poliadenilación)	<i>C. elegans</i>	17535491	2,0	1
Proteína CBR-MRS-1 (metionil-tRNA sintasa)	<i>C. briggsae</i>	268536458	1,5	1
Factor de elongación 2	<i>Trichinella spiralis</i>	316978456	1,3	1
Deacetilasa NAD-dependiente Hst2	<i>T. spiralis</i>	316974368	1,3	1
<b>Proteínas motoras y estructurales (8)</b>				
Tropomiosina	<i>O. volvulus</i>	773389	22,8	9
Actina-5C	<i>T. spiralis</i>	316975454	9,7	6



Miembro de la familia del colágeno (col-135)	<i>C. elegans</i>	71992048	8,1	6
Proteína CBR-MLC-3 (cadena ligera de miosina)	<i>C. briggsae</i>	268563831	3,7	2
Cadena ligera 1 de dineína, citoplásmica	<i>B. malayi</i>	170585424	3,3	2
Proteína CBR-DPY-8 (colágeno)	<i>C. briggsae</i>	268579323	2,8	1
Proteína COL-35 (colágeno)	<i>C. elegans</i>	255068778	2,4	2
Proteína CBR-MLC-1 (cadena ligera de miosina)	<i>C. briggsae</i>	268577395	1,7	1
<b>Metabolismo de proteínas (4)</b>				
Ciclofilina Ovcyp-2	<i>O. volvulus</i>	1480465	5,1	2
Proteína disulfuro isomerasa	<i>O. volvulus</i>	687235	4,2	2
SUMO	<i>C. elegans</i>	2501447	2,6	1
Proteína CRE-UBQ-1 (poliubiquitina-A)	<i>C. remanei</i>	308497342	1,8	1
<b>Chaperonas (4)</b>				
HSP60	<i>O. volvulus</i>	4680247	8,0	3
p27	<i>Dirofilaria immitis</i>	1206025	3,9	2
Chaperonina 10 kDa	<i>T. spiralis</i>	316968325	2,5	1
Proteína de choque térmico 70 A	<i>Heterodera glycines</i>	26422391	2,4	1
<b>Señalización celular (3)</b>				
Proteína secretada <i>frizzled-related 1</i>	<i>T. spiralis</i>	316971876	2,0	1
Proteína 14-3-3b	<i>Meloidogyne incognita</i>	40388674	1,3	8

Sorting nexin 12	<i>L. loa</i>	312097280	1,3	1
<b>Hospedador/Bacteria (1)</b>				
Precursor de albúmina	<i>Rattus norvegicus</i>	158138568	23,9	12
<b>Unidoras de calcio (2)</b>				
Proteína CBR-CPN-3 (calponina)	<i>C. briggsae</i>	268561110	6,0	3
Proteína tipo calponina	<i>Trichinella pseudospiralis</i>	237638725	4,1	4
<b>Función desconocida (22)</b>				
Proteína F52D10.3a	<i>C. elegans</i>	3877418	16,7	15
Proteína hipotética C44B7.10	<i>C. elegans</i>	32563853	7,4	4
Proteína Y17G7B.7	<i>C. elegans</i>	3947595	4,6	3
Proteína F38B2.4a	<i>C. elegans</i>	3876832	3,7	3
Proteína hipotética CBG15316	<i>C. briggsae</i>	268576316	3,5	3
Proteína hipotética CRE_25993	<i>C. remanei</i>	308452990	2,6	1
Proteína hipotética CBG18957	<i>C. briggsae</i>	268558566	2,5	1
Presunta proteína con dominio quinasa	<i>T. spiralis</i>	316965481	2,5	1
Proteína hipotética CBG08596	<i>C. briggsae</i>	268556630	2,3	1
Proteína Y69E1A.5	<i>C. elegans</i>	3947637	2,1	1
Proteína hipotética F38E9.4	<i>C. elegans</i>	17567525	2,0	1
Proteína hipotética C01B10.3	<i>C. elegans</i>	32566354	2,0	1

Proteína hipotética LOAG_09188	<i>L. loa</i>	312085651	2,0	1
Proteína Y48A6B.7	<i>C. elegans</i>	3881060	2,0	1
Proteína hipotética secretada 3 de célula glandular esofágica	<i>H. glycines</i>	10644552	2,0	1
Proteína hipotética CRE_16794	<i>C. remanei</i>	308489223	1,9	1
Proteína hipotética CBG_03281	<i>C. briggsae</i>	309364856	1,7	1
Proteína hipotética F39G3.2	<i>C. elegans</i>	71993463	1,7	1
Proteína hipotética LOAG_09118	<i>L. loa</i>	312085474	1,5	1
Producto proteico sin nombre	<i>C. elegans</i>	259685201	1,4	1
Proteína hipotética CRE_11855	<i>C. remanei</i>	308493725	1,4	1
Proteína hipotética CRE_03323	<i>C. remanei</i>	308473084	1,4	1

<sup>a</sup> Número de acceso de la proteína en la base de datos de proteínas del NCBI.

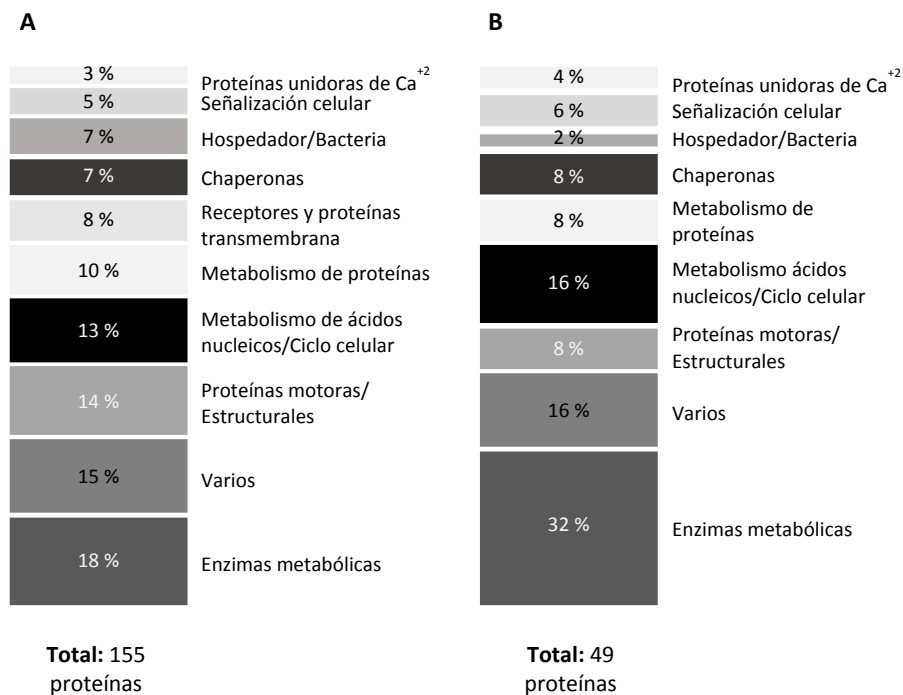
<sup>b</sup> El *score* es una medida de la confianza en la anotación de la proteína.

<sup>c</sup> Número de péptidos coincidentes con la secuencia de la proteína anotada.

**Tabla 3.13.-** Proteínas del antígeno total de la fase adulta de *Syphacia muris* identificadas por espectrometría de masas y búsqueda en la base de datos Metazoa del NCBI con el software *ProteinPilot™* 3.0 (Applied Biosystems), clasificadas de acuerdo con su función biológica.

Las proteínas identificadas con cada motor de búsqueda se agruparon de acuerdo con su función biológica, tal como se muestra en la Figura 3.79. Las proteínas con *scores* más elevados correspondieron a proteínas estructurales y motoras, como actina y tropomiosina. Sin embargo, con ambos motores de búsqueda, el grupo mayoritario fue el de las enzimas metabólicas. Dentro de este grupo se encontraron proteínas mayoritariamente implicadas en el metabolismo de los carbohidratos, fundamentalmente en las rutas de la glicólisis (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, enolasa, 6-fosfofructoquinasa, fosfoglicerato quinasa o triosa fosfato isomerasa, entre otras) y la gluconeogénesis (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y malato deshidrogenasa citosólica). También destacaron las enzimas relacionadas con el metabolismo energético, encontrándose varias proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa, las cuales forman parte de los complejos multienzimáticos de la ETC mitocondrial (NADH deshidrogenasa, ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa, citocromo b) o que intervienen directamente en la síntesis de ATP (fosfoglicerato quinasa, ATP sintasa). En menor medida se identificaron enzimas implicadas en el metabolismo lipídico y, más concretamente, en la degradación de los ácidos grasos (metilmalonil-CoA epimerasa, propionil-CoA carboxilasa) y en el metabolismo de nucleótidos, tanto de purinas (adenilato quinasa), como de pirimidinas (piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasa).

En el grupo de las proteínas del ciclo celular y el metabolismo de los ácidos nucleicos se incluyen las proteínas implicadas en los procesos de replicación y transcripción del DNA, así como otras proteínas de naturaleza diversa que ejercen alguna función sobre el control del ciclo celular. Se identificaron sobre todo factores de elongación, DNA y RNA polimerasas, así como proteínas relacionadas con los cromosomas (histonas, histona desacetilasas y una subunidad del complejo promotor de anafase, entre otras). Entre las proteínas que actúan a nivel del ciclo celular se han encontrado proteínas homólogas de factores de crecimiento (proteína CRE-LET-756) y otras que intervienen en el control de la muerte celular (proteína CBR-HPR-17 y proteína ICD-1).



**Figura 3.79.- Clasificación funcional de las proteínas identificadas en el antígeno completo de *Syphacia muris*.** Gráficos representativos del porcentaje de proteínas del antígeno de *S. muris*, identificadas con los motores de búsqueda MASCOT (A) y ProteinPilot™ (B), de acuerdo con su función biológica. Los porcentajes se calcularon asignando a cada proteína una sola función y considerando, como total, el número de proteínas con función conocida identificadas con cada motor de búsqueda.

Se identificaron numerosas proteínas citoesqueléticas y proteínas asociadas. Las más representadas fueron las proteínas asociadas a los filamentos de actina (actina, miosina, tropomiosina, paramiosina, etc.), pero también se encontraron proteínas de microtúbulos (tubulina alfa y beta); proteínas de transporte asociadas a microtúbulos, como quinesinas y dineínas; y proteínas de filamentos intermedios (proteína IFA-1). Además, cabe destacar que se encontraron varios tipos de colágeno, una proteína estructural fundamental para la formación de la cutícula de los nematodos.

Los receptores y transportadores transmembrana y las proteínas relacionadas con el metabolismo proteico también estuvieron altamente representadas en el antígeno completo de *S. muris*. Se identificaron varias proteínas implicadas en el transporte a través de membranas (transportador de glutamato, transportador de tiamina, transportadores ABC, etc.) y canales iónicos de Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>+2</sup>, así como receptores 7TM (7 segmentos transmembrana) o serpentina, entre otros. En el grupo de las proteínas involucradas en el metabolismo proteico se incluyeron las proteínas directamente implicadas en la síntesis y degradación de proteínas, como los catalizadores del plegamiento proteico (disulfuro isomerasa y ciclofilinas) o proteínas del sistema ubiquitina (proteína CRE-UBQ-1, proteína SMO-1) y del proteasoma (proteína CBR-PAS-5), además de catepsinas y otras peptidasas. Las chaperonas estuvieron también muy representadas y se agruparon en un grupo aparte, en el que se encuentran varias proteínas de choque térmico y otras chaperonas como calnexina o endoplasmína. Otros grupos importantes son el de las proteínas de señalización celular, en el que destaca una proteína 14-3-3, que fue una de las que obtuvo un *score* más alto (proteína CBR-FTT-2), además de varias quinasas y fosfatasas entre otras proteínas con funciones más específicas (proteína CBR-GRL-14 o proteína CBR-SAEG-1); y el grupo de las proteínas unidoras de Ca<sup>+2</sup> (anexina, calponina, etc.).

Por otra parte, se creó un grupo denominado “miscelánea”, en el que se incluyeron proteínas con funciones muy diversas. En este grupo se han incluido proteínas con actividad antioxidante, como la Prdx-2 y la tiorredoxina peroxidasa; lectinas (proteína CBR-LEC-3, galectina GAL-1); antígenos (antígeno repetitivo L3R15, Ag3); péptidos con actividad antibacteriana (precursor ASABF) o proteínas implicadas en el desarrollo de los vermes, como las proteínas EGL-21 y CRE-LET-49 o la proteína de compensación de dosis dpy-30, entre muchas otras. Un total de 9 proteínas fueron identificadas como proteínas del hospedador o propias de bacterias habituales de la flora intestinal de roedores.

### **3.8.3. COMPARACIÓN CON *ECHINOSTOMA CAPRONI***

Dada la interacción antagonista que existe entre *E. caproni* y *S. muris* cuando concurren en el mismo hospedador y habiendo constatado que la elevada reactividad

cruzada entre los anticuerpos específicos frente a *S. muris* y los antígenos de *E. caproni* puede ser uno de los factores más influyentes en la interacción observada, en este último apartado se comparan los resultados obtenidos en el análisis proteómico de *S. muris* con los datos publicados para *E. caproni* en este contexto. En primer lugar hay que señalar que los estudios moleculares y genómicos con *E. caproni* son relativamente escasos y que el número de secuencias disponibles en las bases de datos, tanto de genes como de proteínas, para este género de helmintos es muy bajo. Hasta la fecha existen tres trabajos publicados que abordan el estudio de las proteínas de *E. caproni* desde diferentes perspectivas. Cronológicamente, Sotillo *et al.* (2008) identificaron diferentes proteínas antigénicas en el ESP de *E. caproni* y posteriormente pudieron identificar un total de 20 proteínas distintas mediante el análisis proteómico de este material (Sotillo *et al.*, 2010). Más recientemente, Garg *et al.* (2013) publicaron el transcriptoma de la fase adulta de *E. caproni* en la infección crónica en ratón.

#### **3.8.3.1. COMPARACIÓN CON EL PRODUCTO DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN DE ECHINOSTOMA CAPRONI**

De entrada, cabe resaltar que resulta complejo comparar los resultados aportados por los trabajos anteriormente citados con los obtenidos en el análisis proteómico de la fase adulta de *S. muris*, pues en cada caso el material de partida fue diferente (antígeno de ES y mRNA frente a antígeno total, respectivamente). Teniendo en cuenta estas diferencias y con la finalidad de llevar a cabo una comparación que resultara lo más ajustada posible, al menos en principio, a los trabajos de Sotillo *et al.* (2008, 2010), se buscaron las proteínas identificadas en el antígeno de *S. muris* que presentaban péptido señal para la secreción, empleando la herramienta de predicción *SignalP 4.1*. (Center of Biological Sequence Analysis, CBS). De esta manera se encontraron un total de 25 proteínas, las cuales son secretadas al medio siguiendo la vía clásica, a través del retículo endoplasmático (Tabla 3.14.). Catorce de estas proteínas tenían función conocida. Entre ellas se encontró una glicosil hidrolasa, que interviene en la degradación de glicanos, y varias proteínas con actividad disulfuro isomerasa, que funcionan como catalizadores del plegamiento proteico. En esta línea, se encontraron también varias chaperonas de

naturaleza diferente como calnexina, endoplasmina y una proteína de choque térmico (CRE-HSP-4). Aparecieron además otras proteínas de función diversa como el colágeno, una proteína estructural que forma la cutícula de los nematodos; una proteasa tipo catepsina D y una proteína con dominios de inhibición de serín-proteasas (proteína tipo trombospondina); una proteína con función en el sistema nervioso del nematodo, EGL-21, que actúa induciendo la liberación de acetilcolina; y un péptido con actividad antibacteriana (ASABF), entre otras (véase Tabla 3.14.). De estas proteínas solo una fue identificada por Sotillo *et al.* (2010) en el ESP de *E. caproni*: la disulfuro isomerasa, anotada como proteína disulfuro isomerasa de *F. hepatica* (número GI de acceso en NCBI: 3392892), la cual presenta también péptido señal.

En los productos de ES de los parásitos, no obstante, es frecuente encontrar muchas proteínas que son liberadas al medio por otras vías no dependientes de péptido señal. De acuerdo con esto, al comparar las proteínas identificadas por Sotillo *et al.* (2010) en el ESP de *E. caproni* con las proteínas de *S. muris* identificadas en la presente Tesis se encontraron un total de 11 proteínas coincidentes. La mayoría correspondían a enzimas metabólicas: enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, triosa fosfato isomerasa, fructosa-bisfosfato aldolasa y fosfoglicerato quinasa, todas ellas implicadas en la ruta de la glicólisis. Otras 3 eran proteínas de choque térmico (HSP60, HSP70 y HSP90) y, en ambos productos, se encontró también la proteína motora/estructural actina.

El principal objetivo de esta comparación es identificar aquellas proteínas de *S. muris* susceptibles de inducir la producción de anticuerpos específicos que pudieran reconocer los antígenos heterólogos de *E. caproni*. En este contexto, lo más interesante resulta pues comparar las proteínas que han sido identificadas como las más inmunógenas en el caso de *E. caproni*. Siguiendo una aproximación inmunoproteómica, Sotillo *et al.* (2008) identificaron un total de 6 proteínas diferentes del ESP, las cuales fueron reconocidas por diferentes isotipos de inmunoglobulinas presentes en el suero de ratones



**Tabla 3.14.-** Proteínas del antígeno total de *Syphacia muris* con péptido señal

Proteína	Especie (GI) <sup>a</sup>	Función	Motor de búsqueda <sup>b</sup>
Glicosil hidrolasa, familia 47	<i>Trichinella spiralis</i> (316971486)	Enzima	MASCOT
Disulfuro isomerasa	<i>Ascaris suum</i> (187942166)	Enzima	MASCOT
Proteína disulfuro isomerasa	<i>Onchocerca volvulus</i> (687235)	Enzima	ProteinPilot™
EGL-21 ( <i>Egg laying defective</i> )	<i>Caenorhabditis elegans</i> (17539632)	Enzima	MASCOT
Proteína CRE-HSP-4	<i>Caenorhabditis remanei</i> (308503104)	Chaperona	MASCOT
Calnexina	<i>T. spiralis</i> (316975460)	Chaperona	MASCOT
Endoplasmina	<i>Loa loa</i> (312075055)	Chaperona	MASCOT
Catepsina tipo D, aspártico proteasa	<i>Anisakis simplex</i> (262232673)	Proteasa	MASCOT
Familia de proteínas transportadoras ABC	<i>Brugia malayi</i> (170585949)	Transportador	MASCOT
Proteína CRE-CALU-1	<i>C. remanei</i> (308511999)	Unidora de Ca <sup>+2</sup>	MASCOT
Precursor ASABF	<i>A. suum</i> (21322740)	Antibacteriana	MASCOT
Proteína tipo trombospondina	<i>Dictyocaulus viviparus</i> (170791244)	Antiangiogénica	ProteinPilot™
Miembro de la familia del colágeno (col-135)	<i>C. elegans</i> (71992048)	Estructural	ProteinPilot™
Proteína secretada <i>frizzled-related 1</i>	<i>T. spiralis</i> (316971876)	Señalización	ProteinPilot™
Proteína hipotética CRE_17236	<i>C. remanei</i> (308489614)	Desconocida	MASCOT
Proteína hipotética CRE_05768	<i>C. remanei</i> (308243897)	Desconocida	MASCOT
Proteína hipotética CRE_00392	<i>C. remanei</i> (308511439)	Desconocida	MASCOT
Miembro de la familia <i>Apex-related genes</i>	<i>C. elegans</i> (71989021)	Desconocida	MASCOT
Proteína hipotética CBG_07629	<i>Caenorhabditis briggsae</i> (309362763)	Desconocida	MASCOT
GRSP-1	<i>C. elegans</i> (72001162)	Desconocida	MASCOT

Proteína hipotética LOAG_03306	<i>Loa loa</i> (312072055)	Desconocida	MASCOT
Proteína hipotética LOAG_10139	<i>Loa loa</i> (312088060)	Desconocida	MASCOT
Proteína hipotética C18H2.1	<i>C. elegans</i> (133905197)	Desconocida	MASCOT
Proteína hipotética CRE_02191	<i>C. remanei</i> (308509286)	Desconocida	MASCOT
Proteína hipotética secretada 3 de célula glandular esofágica	<i>Heterodera glycines</i> (10644552)	Desconocida	ProteinPilot™

<sup>a</sup> Número GI de acceso de la proteína en la base de datos de proteínas del NCBI.

<sup>b</sup> Motor de búsqueda con el que fue identificada cada proteína.

**Tabla 3.14.-** Proteínas identificadas en el antígeno de *S. muris* para las que se predijo la presencia de péptido señal para la secreción por la vía clásica mediante la utilización del servidor *SignalP4.1* (CBS).

infectados. Cinco de estas proteínas fueron identificadas en el antígeno total del estadio adulto de *S. muris*, ninguna de ellas con péptido señal. La homología de secuencia entre estas proteínas fue analizada mediante *BLASTp*, observándose en líneas generales un alto grado de identidad entre las secuencias comparadas (Tabla 3.15.).

Tal y como se comentó al inicio de este apartado, la principal limitación en este tipo de estudios es la escasa disponibilidad de secuencias específicas en las bases de datos. Por este motivo, para la determinación del grado de homología entre las proteínas de interés se emplearon las secuencias de especies relacionadas. La secuencia de aminoácidos utilizada en cada caso corresponde a la de la especie de helminto que sirvió para la identificación de la proteína correspondiente de *S. muris* y *E. caproni* (Sotillo *et al.*, 2008) mediante MS y búsqueda en las bases de datos (Tabla 3.15.). A pesar de este inconveniente, los resultados de los alineamientos fueron por lo general muy buenos. La proteína que mostró un mayor grado de similitud fue la actina, con un 96% de identidad entre las secuencias comparadas, siendo la cobertura del 100%. La enolasa y la HSP70 mostraron igualmente altos grados de identidad, del 84% y 74% respectivamente, con un porcentaje de cobertura superior al 90% en ambos casos. La homología de secuencia de la aldolasa fue menor que para las proteínas anteriores, si bien mostró un nivel considerable

**Tabla 3.15.-** Homología de secuencia con *BLASTp 2 sequences*

Proteína	Especie <sup>a</sup>	Número GI (NCBI) <sup>b</sup>	Score Total	% Cobertura	valor E	% Identidad
Actina	<i>Trichinella spiralis</i>	316975454	764	100%	0,0	96%
	<i>Schistosoma mansoni</i>	1703106				
HSP70	<i>Heterodera glycines</i>	26422391	1070	93%	0,0	84%
	<i>Echinostoma caproni</i>	187817586				
Enolasa	<i>Heterorhabditis indica</i>	296940216	662	99%	0,0	74%
	<i>E. caproni</i>	112950027				
Aldolasa	<i>Onchocerca volvulus</i>	5052015	475	100%	9e-172	63%
	<i>S. mansoni</i>	1703248				
Anexina	<i>Loa loa</i>	312080878	275	68%	6e-63	35%
	<i>S. mansoni</i>	4753140				

<sup>a</sup> Debido a la ausencia de secuencias específicas de *Syphacia muris* y, en algunos casos, de *Echinostoma caproni* en las bases de datos, para la determinación del grado de homología entre las proteínas se han utilizado las secuencias de especies relacionadas. La secuencia de aminoácidos utilizada en cada caso corresponde a la de la especie de helminto que ha servido para la identificación de la proteína correspondiente de *S. muris* (véase Apartado 3.8.1.) y *E. caproni* (Sotillo *et al.*, 2008).

<sup>b</sup> Numero GI de acceso de la proteína en la base de datos de proteínas del NCBI.

**Tabla 3.15.-** Homología de secuencia, calculada mediante *BLASTp 2 sequences*, de las proteínas inmunogénicas de *E. caproni* (Sotillo *et al.*, 2008) identificadas en el estudio proteómico del antígeno total de *S. muris*, entre especies de nematodos (cuadros blancos) y trematodos (cuadros grises).

de identidad (63%) para una cobertura del 100%. La anexina es la que mostró un menor grado de homología y cobertura (35% y 68%, respectivamente). No obstante, cabe señalar que Sotillo *et al.* (2008) ya descartaron esta proteína por presentar bajos niveles de cobertura en la identificación, sugiriendo que la anexina está menos conservada filogenéticamente que las proteínas anteriores.

### 3.8.3.2. COMPARACIÓN CON EL TRANSCRIPTOMA DE *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Garg *et al.* (2013) publicaron el transcriptoma del estadio adulto de *E. caproni* en el hospedador de alta compatibilidad. La información proporcionada por los estudios proteómicos y transcriptómicos es distinta, pues los materiales estudiados en cada caso son diferentes y también el significado biológico de los mismos. Sin embargo, la relación entre ambos productos es evidentemente muy estrecha. Aunque siguen aproximaciones diferentes, ambos tipos de estudios están dirigidos a investigar las proteínas expresadas, a nivel de mRNA o producto proteico, y contribuyen a profundizar en el conocimiento de las proteínas que pueden tener un papel clave en la biología del parásito y en su relación con el hospedador. La finalidad de este apartado es simplemente comparar los procesos biológicos más activos en cada caso, por lo que no se hará referencia a las proteínas concretas identificadas en cada trabajo, sino a los principales grupos proteicos hallados en el proteoma de *S. muris* y el transcriptoma de *E. caproni*.

De acuerdo con la clasificación funcional de la KEGG (*Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes*), que es la que siguen Garg *et al.* (2013), la ordenación de los grupos funcionales más representados en el proteoma de *S. muris* y el transcriptoma de *E. caproni* fue muy similar. En ambos casos el grupo de proteínas mayoritarias fue el de las proteínas con actividad enzimática, que supone un 31% de las proteínas totales diferentes identificadas en el antígeno de *S. muris*. Las enzimas más abundantes están relacionadas con el metabolismo de la glucosa (23% de las proteínas con actividad enzimática) y el metabolismo energético (13%). El siguiente grupo más representado en ambos casos fue el de las proteínas implicadas en el procesamiento de la información genética (26%). Este grupo engloba proteínas muy variadas que participan en funciones tan diversas que van, desde la replicación y reparación del DNA (7,3% del total de proteínas identificadas) y la transcripción a mRNA (4%), a su traducción a proteínas (3%) y el posterior plegamiento, clasificación y degradación de las mismas (13%). Entre las proteínas implicadas en la replicación del material genético destacaron los factores de elongación (33%) y las proteínas relacionadas con los cromosomas (42%). En cuanto al procesamiento de proteínas destacaron el grupo de las chaperonas y los catalizadores del plegamiento

proteico (71%), seguido de las proteínas del sistema ubiquitina (19%). Asimismo, en ambos estudios las proteínas citoesqueléticas estuvieron representadas en gran número. El 13% de las proteínas identificadas en el proteoma de *S. muris* se incluyeron en este grupo, siendo a su vez las más abundantes las relacionadas con el citoesqueleto de actina (41%). Otros grupos funcionales significativamente representados en ambos estudios, aunque en menor medida que los citados anteriormente, son transportadores (4,2%), canales iónicos (1,8%), receptores acoplados a proteínas G (1,8%), lectinas (1,2%) y antígenos celulares (1,2%). Finalmente, cabe señalar que en el proteoma de *S. muris* se encontraron diversas proteínas directamente implicadas en el desarrollo de los vermes (3%), las cuales no constituyeron un grupo destacado en el estudio del transcriptoma de *E. caproni*.



# Chapter IV

---

## DISCUSSION





Echinostomes are a heterogeneous group of digenean, which have been extensively used as experimental models in different areas of parasitology. A number of experimental studies have demonstrated that echinostomes are suitable models for the study of several aspects of the biology of helminth infections, particularly for the understanding of host-related factors that determine the course of intestinal helminth infections, which is an essential issue in the field of helminthology. The species *E. caproni* has singular characteristics in this respect. *E. caproni* is able to parasitize a wide range of rodent hosts, although the host-parasite compatibility differs considerably among rodent species and, for this reason, the course of the infection is highly dependent on host-related factors. Hosts of high compatibility develop chronic infections characterized by elevated worm burdens. In contrast, low worm establishment and rapid parasite rejection characterize the infection in hosts of low compatibility (Toledo & Fried, 2005; Toledo, 2009b). Apart from the biological features, several immunological and pathological parameters are also dependent on the host species. In this sense, the cytokine response has been regarded to be crucial for determining the outcome of the infection. Local inflammatory responses with neutrophilic infiltration and high production of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) are associated with the development of chronic infections. Host resistance to infection, however, appears to be related to the development of a local Th2 phenotype, mediated by interleukin (IL)-4-independent mechanisms and IL-13 as the main immune mediator responsible for parasite clearance. Thus, the expulsion appears to be based on non-bone marrow-derived cells (Toledo *et al.*, 2006a, b; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Trelis *et al.*, 2011).

In the present study, we aimed to further characterize the immune response generated in high- and low-compatible hosts during the course of *E. caproni* infection as well as elucidate the effector mechanisms involved in this response. Particularly, infection-induced intestinal changes were investigated in detail to uncover the mechanisms that

effectively contribute to worm rejection or, in contrast, are responsible for the establishment of long-lasting infections in the high-compatible host.

In order to gain further insight into the immune response generated against *E. caproni* infection in hosts of high and low compatibility, we initially attempted to analyze the involvement of Th17 responses in determining the course of the infection. Together with previously published results (Trelis *et al.*, 2011), these data provide a more complete picture as regards the type of response generated against the infection in hosts displaying different compatibility with the parasite and contribute to elucidate potential mechanisms involved either in worm rejection or the development of chronic infections. Our study showed marked differences in the Th17-related cytokine responses between ICR mice (a host of high compatibility) and Wistar rats (a low-compatible host). We have shown that Th17 responses are generated in the early *E. caproni* infection in rats. In the low-compatible host, increased mRNA expression of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , IL-17A and IL-23 was observed locally, in Peyer's patches and intestinal tissue, during *E. caproni* infection. In contrast, up-regulation of Th17-associated cytokines was not observed in *E. caproni*-infected mice in any of the tissues analyzed. Because this trematode resides in the intestinal lumen without invading other tissues, the mucosal immunity and its associated tissues have been pointed to be the most relevant to determine the outcome of the infection

(Trelis *et al.*, 2011). In the intestine, the inductive sites are mainly the Peyer's patches. After primed, B and T cells migrate to the mesenteric lymphatic nodes (MLNs) via afferent lymph and then, via the thoracic duct, to the peripheral blood for subsequent extravasation at mucosal effector sites, mainly the intestine (lamina propria) (Brandtzaeg, 2009; Izcue *et al.*, 2009). Our results demonstrated that *E. caproni* induces different Th17 responses at both the inductive and effector sites in mice and rats.

Considering these results together with those previously published by Trelis *et al.* (2011), the early rejection of *E. caproni* seems to be related to a complex process of Th subset differentiation in which Th17, Th2 and Treg (regulatory T cells) appear to be

involved. Trelis *et al.* (2011) studied the *in vivo* cytokine profile in response to *E. caproni* infection through the analysis of mRNA expression of a large group of cytokines primarily involved in both Th1- and Th2-type responses. However, the validity of the Th1/Th2 paradigm has been maintained until relatively few years ago, when different Th cell subsets were identified as distinct lineages (reviewed in Basu *et al.*, 2013). The early rejection of *E. caproni* adults in the host of low compatibility was associated with augmented expression of Th2-type cytokines, basically IL-13 and IL-4 at Peyer's patches and MLNs, whereas in the intestine host protection was related to marked increases of IL-13, IL-5 and IL-6. According to our results, protection against *E. caproni* is mediated by the expansion of Th2 lineage concomitantly with Th17 lineage at the expense of Th1. Moreover, up-regulation of TGF- $\beta$  mRNA has been noticed in Peyer's patches and, especially, in the intestinal tissue. This fact, together with previously reported IL-10 up-regulation in rats (Trelis *et al.*, 2011), suggests an important role of the Treg lineages in the generation of these responses. Therefore, *E. caproni* infection in rats induces an early biased Th17/Th2 response that results in the subsequent worm expulsion.

Increased expression of Th17-related cytokines was detected from 2 weeks post infection (wpi). Hence, the early generation of this response suggests that Th17 differentiation may constitute a link between innate and adaptive response against the parasite, which facilitates the development of a concomitant Th2 response. Several studies have shown that Th17 cells are primed to mediate surveillance and early defense during mucosal infections by producing IL-17A. Although IL-17A primarily galvanizes the innate branch of host defense, recent evidence suggests a role for this cytokine in initiating Th2 responses (Stockinger *et al.*, 2007; Takagi *et al.*, 2008; Peck & Mellins, 2010). Herein, we have also observed a marked increase in TGF- $\beta$  expression from 2 wpi in *E. caproni*-infected rats. This cytokine, together with IL-6, may be essential for the Th17 differentiation in this host. Th17 and iTreg (induced Treg) share common developmental pathways, where TGF- $\beta$  has been clearly recognized as a link between both T cell subsets and IL-6 appears as an essential differentiation factor for Th17 commitment (Bettelli *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007a; Zhou *et al.*, 2008a). Moreover, IL-10 initially produced by iTreg in

rats may prevent the Th1 differentiation, thereby facilitating the development of the biased Th17/Th2 response. Schopf *et al.* (2002) showed that this cytokine was essential to induce host resistance against *T. muris* infection, displaying a critical role in the polarization towards Th2-type responses. Significant increases of IL-23 expression were detected in the spleen, Peyer's patches and intestinal tissue of experimentally infected rats. IL-23 is a member of the IL-12 family of cytokines (Korn *et al.*, 2009) and may be essential for the development of Th17 responses in *E. caproni*-infected rats. Although this cytokine cannot be the unique inducer of the Th17 response, IL-23 is a major promoter of Th17 development synergistically with IL-6 and IL-1 (Korn *et al.*, 2009). Trelis *et al.* (2011) observed elevated levels of IL-6 expression in both the spleen and the intestine of infected rats from 2 wpi and, according to our results, this up-regulated expression may be of great importance to Th17 differentiation. IL-6 is sufficient to induce the expression of IL-23 receptor. Then, IL-23 further amplifies the expression of its receptor facilitating the Th17 differentiation.

A striking feature of our study is that Th17 responses were exclusively detected in that host in which local inflammatory responses are not developed. *E. caproni* infections in high-compatible hosts such as mice are characterized by the development of a prominently polarized Th1 phenotype, with augmented expression of IFN- $\gamma$  and iNOS and marked epithelial damage. Conversely, the presence of worms in the ileum of rats does not induce apparent inflammatory responses and the levels of Th1 signature are low (Toledo *et al.*, 2006a; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Trelis *et al.*, 2011). In this sense, the expression of the Th17 lineage concomitantly with the Th2 lineage may protect the host against tissue injury induced by infection-induced inflammation. Although the Th17 response is usually considered to be pro-inflammatory, the induction of IL-17A in the presence of anti-inflammatory factors could have a protective effect to avoid tissue injury. This is the case of Th17 differentiation in the presence of IL-6 and TGF- $\beta$  (McGeachy & Cua, 2007). O'Connor *et al.* (2009) showed that IL-17A suppresses Th1 differentiation *in vitro* and mediates a protective effect on T cell-driven intestinal inflammation *in vivo*, suggesting that in the absence of immunopathology IL-17A expression may contribute to

maintain the intestinal homeostasis. According to this, our data suggests that IL-17A exerts anti-inflammatory effects in rats through the suppression of pathogenic Th1 cell differentiation, preventing IFN- $\gamma$  expression. Moreover IL-6, which is involved in Th17 differentiation and has been shown to be up-regulated in the ileum of *E. caproni*-infected rats (Trelis *et al.*, 2011), has been also implicated in the protection of the intestinal epithelium during infections (Dann *et al.*, 2008; Scheller *et al.*, 2011).

Apart from its regulatory function and its potential protective role against parasite-induced intestinal inflammation, the development of a Th17 response may also facilitate the expulsion of *E. caproni* adult worms in the low-compatible host. Trelis *et al.* (2011) suggested that rejection of *E. caproni* infections in rats is mainly mediated by IL-13, signaling through the type II IL-4 receptor (IL-4R) and the signal transducer and activator of transcription (STAT)6 to induce a variety of effector mechanisms (Finkelman *et al.*, 2004). Fu *et al.* (2009) demonstrated that IL-17A significantly increases the intestinal contractility in mice experimentally infected with *T. spiralis*. In this way, the Th17 responses observed in *E. caproni*-infected rats may well contribute to the expulsion of the worms.

The absence of a Th17-type response observed in the ileum of infected mice indicates that the establishment of chronic infections in this host is mainly characterized by the development of marked local Th1-type immune responses, with high levels of IFN- $\gamma$ , iNOS and tissue inflammation (Trelis *et al.*, 2011). The elevated expression of IFN- $\gamma$  has been considered the most relevant feature determining the development of chronic infections with high worm recoveries in ICR mice (Sotillo *et al.*, 2011; Trelis *et al.*, 2011). Considering the relevance of IFN- $\gamma$  in the outcome of the intestinal helminth infections (Artis *et al.*, 1999; Toledo *et al.*, 2006a; Cliffe *et al.*, 2007; Humphreys *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2009), we aimed to further clarify the role of this pro-inflammatory cytokine in the course of the infection with *E. caproni* in the high-compatible host. With this purpose, three mouse strains displaying different immunological backgrounds were experimentally infected to assess the factors determining both the characteristics and the outcome of the

infection. Several aspects of the intestinal infection were investigated in each host strain, e.g. worm recovery rates, intestinal pathology, clinical signs and immunological features such as antibody kinetics and cytokine profile.

The impact of *E. caproni* infection was initially compared between ICR mice and the prototypical Th2 mouse strain, BALB/c. Our first results regarding infection rates indicated that the susceptibility to *E. caproni* infection was similar in both cases. Worm recoveries were similar in the two strains over the course of the infection. However, relevant differences were observed in relation to the clinical manifestations induced by *E. caproni* infection in each host strain. Visually, infected ICR mice did not show evidence of illness and their general appearance was similar to that of non-infected mice of the same strain. Moreover, weight curves were almost identical when compared with control mice. Gross pathology induced by *E. caproni* infection in ICR mice was similar to that described previously. At necropsy, marked intestinal dilatations were observed exclusively in those areas where the worms were attached, as commonly occurs in this host (Simonsen *et al.*, 1989; Toledo *et al.*, 2006a; Muñoz- Antolí *et al.*, 2007). In contrast, infected BALB/c mice looked physically emaciated from 2 wpi, displaying clinical signs such as rough coats, diarrhea, perianal irritation and weight loss. The body weight of infected BALB/c mice was significantly lower than in control animals of the same strain from 4 wpi.

In order to determine the factors that explain these differences, several mechanisms that could play a protective role against the parasite-induced virulence, such as increases in mucosal goblet and mast cell populations or augmented expression of mucins, were investigated at the site of the infection. Although it is well established that these factors may play an important role in the protection against intestinal disease (Toledo *et al.*, 2006a, b; McGukin *et al.*, 2011), our results suggest that improper activation of these mechanisms cannot be associated with the enhanced severity of the disease observed in BALB/c mice. Both goblet and mast cell counts increased after infection, showing a similar profile in ICR and BALB/c mice. Moreover, the pattern of mucin expression was nearly identical in the two strains. Significant increases in the mRNA

expression of secreted mucin (Muc)2 and membrane-anchored mucin Muc4 were detected in both host strains. The expression of Muc16 was found to be up-regulated at early infection and showed a pronounced decrease at 4 wpi, returning to basal levels in both hosts. Considering that the kinetics of mucin expression were similar both in ICR and BALB/c mice, these changes do not appear to play a role in the different clinical manifestations observed.

The immune response generated against the infection was also characterized in each mouse strain, analyzing both systemic antibody responses and cytokine expression profiles in several immunoactive tissues (i.e. spleen, MLNs, Peyer's patches and intestinal tissue). Although systemic antibody responses are known to be of little effect upon *E. caproni* infections (Sotillo *et al.*, 2007), the analysis of the humoral response may aid to define the immune response generated by the host. However, the antibody kinetics were very similar in the two strains, showing early significant responses of IgM, IgA and total IgG in both cases. Cytokines, however, play a crucial role in determining the outcome of the infection in terms of immunity and immunopathology. Our results agree with previous studies showing a dominance of Th1 responses mediated by IFN- $\gamma$  in the spleen, MLNs and Peyer's patches of infected ICR mice (Trelis *et al.*, 2011). In contrast, cytokine response in BALB/c mice was low, only showing a rapid but transient elevation in the mRNA expression of IL-13 in MLNs and Peyer's patches. Similarly, at the effector site, the intestinal cytokine response in BALB/c mice was weak and none of the cytokines examined showed significant increases over the course of the experiment. Conversely, infected ICR mice developed a strong local Th1 response, characterized by very high levels of IFN- $\gamma$  expression during the whole experiment.

IFN- $\gamma$  has been considered the main causative factor of the inflammatory responses and the establishment of *E. caproni* chronic infections in mice (Muñoz-Antoli *et al.*, 2007; Sotillo *et al.*, 2011; Trelis *et al.*, 2011). Our results support the evidence that IFN- $\gamma$  is essential for the development of local inflammatory responses as demonstrated by the mRNA expression levels of iNOS in the different mouse strains, which correlated with

the expression of IFN- $\gamma$ . Furthermore, the present study supports the hypothesis that IFN- $\gamma$  is not imperative for high worm recoveries in *E. caproni* infections, but may play a major role in the protection of the host against the intestinal disease by modulating its severity and reducing the clinical signs. In our study, the lack of clinical manifestations correlates with elevated levels of this pro-inflammatory cytokine in ICR mice, whereas BALB/c mice developed a more severe form of the disease in the absence of local of expression IFN- $\gamma$ .

In order to confirm the protective role of IFN- $\gamma$  against the development of severe disease in *E. caproni* infection, an IFN- $\gamma$ -deficient mouse strain was also employed to evaluate the effects of the infection. Although several infection parameters such as worm recoveries, cell counts, the pattern of intestinal mucin expression or the systemic antibody responses were similar to those observed in ICR and BALB/c, the knock out strain developed similar symptoms to those seen in the BALB/c mice. In this case, however, the clinical signs and symptoms appeared earlier and became more intense. Moreover, host mortality was high in this strain, starting at 2 wpi and reaching the 100% by the 5 wpi. These results strongly support the hypothesis that IFN- $\gamma$  modulates the virulence of *E. caproni* in mice and protects the host against the clinical manifestations and the high death rate induced by the parasitic infection. Thus, either the low expression levels or the lack of IFN- $\gamma$  production in BALB/c and IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice, respectively, appear to be the cause of the harmful effects of *E. caproni* infection in these strains. The basal levels of IFN- $\gamma$  expression observed in BALB/c mice may explain the lower intensity of the clinical signs as well as the lower mortality rate observed in this strain with respect to the IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice. The resistance against severe disease in the ICR mice infected with the *E. caproni* infection can be attributed, therefore, to the marked up-regulation of IFN- $\gamma$  expression and, highly likely, to the subsequent increase in the levels of iNOS expression.

The fact that augmented IFN- $\gamma$  and iNOS expression provides protection against the development of intestinal disease has a particular interest since the up-regulation of this pro-inflammatory cytokine and the consequent production of reactive intermediates such as nitric oxide (NO) have been often associated with severe forms of intestinal disease



and clinical pathology (Mowat, 1989; Smith, 1989; Kühn *et al.*, 1993; Krämer *et al.*, 1995; Mizoguchi *et al.*, 1996; Artis *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 2000; Keklikoglu *et al.*, 2008). However, an increasing number of reports show that IFN- $\gamma$  may also have beneficial effects. In other mouse models, it has been shown that the modulation of the immune response towards a Th1 phenotype with up-regulation of IFN- $\gamma$  ameliorates the severity of several intestinal diseases, though in most of these cases this phenotype is associated with the resolution of the infection, which does not occur in our study (Falcone *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2011; Castilow *et al.*, 2008). Recently, a study has associated the absence of IFN- $\gamma$  with high levels of enteropathy in *Eimeria falciformis* infections, although in this case the augmented pathology was mediated by the expression of Th17 cytokines, such as IL-17A and IL-22, generated in absence of IFN- $\gamma$  (Stange *et al.*, 2012). Otherwise, Lawrence *et al.*, (1998) showed that enteropathy in *T. spiralis*-infected mice is not regulated by IFN- $\gamma$ , but pathology is mediated by tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) under the regulation of IL-4 and Th2-mediated responses. In our experiment, however, the absence of strongly polarized Th1-type responses in BALB/c and IFN- $\gamma^{-/-}$  mice is not associated with the rejection of worms or a Th17/Th2-biased immune response. In fact, the development of mild Th2 responses in IFN- $\gamma$  deficient mice did not lead to protection against severe disease.

Based on the results provided by the comparison of infection features among the three different strains it is difficult to ascertain the manner in which IFN- $\gamma$  and/or iNOS can protect the host against the morbidity and mortality induced by *E. caproni* infection. However, it can be speculated that the development of IFN- $\gamma$ -mediated responses and the consequent iNOS overexpression may affect the parasite, restricting its ability to induce severe disease and clinical signs in mice. NO has been commonly identified as an effector molecule against invading parasites which can affect their development (Oswald *et al.*, 1994; Rajan *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1996; Bao *et al.*, 2000; Brunet, 2001). In *E. caproni* infections, the elevated levels of IFN- $\gamma$  and iNOS expression seen in the ICR mice appear to serve to control the parasite ability to induce evident clinical signs, protecting the host against severe, or even lethal, disease. Conversely, *E. caproni*-infected BALB/c and IFN- $\gamma^{-/-}$

mice developed clear symptoms of severe disease in the absence of IFN- $\gamma$  and iNOS expression.

Besides, it has been shown that IFN- $\gamma$  responses during *T. muris* chronic infection have a beneficial role for the host through the promotion of epithelial cell apoptosis (Cliffe *et al.*, 2007). It has been proposed that augmented apoptosis rates, induced by pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , contribute to the maintenance of intestinal homeostasis since they may serve to counteract the dysregulation of tissue architecture caused by the hyper-proliferative response induced against the parasite (Cliffe *et al.*, 2007). Our results indicate that IFN- $\gamma$  could play other roles in the maintenance of the mucosal homeostasis, additionally to the up-regulation of apoptosis. IFN- $\gamma$  could play a regulatory role in the component processes underlying crypt-villus homeostasis in *E. caproni* infections. The lack of IFN- $\gamma$  induced crypt hyperplasia in the absence of changes in villi length in the knock out mice. The expansion of the proliferating compartment (i.e. crypts) together with a non-proportional production of differentiated intestinal epithelial cells suggests the induction of an altered rostral-caudal gradient in this strain. The histological examination of ileal sections over the course of the infection indicates that in the total absence of IFN- $\gamma$ , aspects such as cell differentiation, migration or lineage-specific maturation become disrupted after the intestinal infection. Moreover, it is well known that alterations in these processes are crucial factors for the generation of pathology in intestinal diseases (Sakatani *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007b; Maloy & Powrie, 2011; Kandasamy *et al.*, 2014). Therefore, in *E. caproni* infections, IFN- $\gamma$  may participate in the preservation of mucosal architecture, preventing the host from developing severe forms of disease as occurs in ICR mice.

Moreover, IFN- $\gamma$  may play other protective roles against intestinal injury. Previous reports showed that IFN- $\gamma$  reduces fibrinolytic activity, thereby promoting fibrin deposition (Gluszko *et al.*, 1994; Musial *et al.*, 1998), while cells exposed to IFN- $\gamma$  *in vitro* up-regulate fibrin-promoting activities (Moon & Geczy, 1988; Schwager & Jungi, 1994). Although Th1 immune-mediated fibrin deposition has been shown to exacerbate

inflammation and disease (Degen *et al.*, 1999), Johnson *et al.* (2003) demonstrated that coagulation performs a critical protective function in the setting of *Toxoplasma gondii* infection by suppressing colorectal hemorrhage evoked by IFN- $\gamma$ . Thus, although coagulant products have the potential to function pathologically, immune-associated coagulative response can also protect the host's intestine against the tissue damage caused by both the parasites and the immune system itself. Fibrin is assembled into the extracellular matrix (ECM) at sites of tissue damage, where it plays an important role in tissue repair by providing an initial matrix that can stabilize wound fields and support local cell proliferation, migration and organization (Rybarczyk *et al.*, 2003). Moreover, it favors the infiltration of granulocytes, monocytes and leukocytes into injured tissues and modulates the activity of macrophages and monocytes, playing a key role in the transition rate between wound inflammation and tissue repair (Laurens *et al.*, 2006). According to this, blocked INF- $\gamma$ -induced fibrin deposition may diminish the re-epithelialization of wounds, increase intestinal permeability and liquid extravasation and even impair hemorrhage retention during the intestinal injury, thereby exacerbating clinical signs in the knock out mice.

All these results suggest a novel and intriguing interplay between IFN- $\gamma$  and pathogenic processes in intestinal helminth infections in which this inflammatory mediator plays a dichotomous role. On the one hand, IFN- $\gamma$  plays a negative role for the host since it inhibits the generation of the protective Th2 responses and induces inflammation but, on the other hand, IFN- $\gamma$  is also beneficial as it protects the host from infection-induced morbidity and mortality. These results provide further insights into the factors determining the pathology induced by intestinal helminths. Hence, we consider that these topics merit further attention since they may serve to get a better understanding of the pathogenesis of intestinal helminthiasis.

Intestinal-dwelling helminths maintain an intimate contact with the intestinal epithelium, thus alterations in the properties and functionality of intestinal epithelial cells (IEC) directly affect the parasites' microhabitat and become determining for the course of

the infection. In order to investigate the intestinal changes induced by *E. caproni* at proteomic level and uncover those cellular mechanisms associated with either the expulsion or the chronic establishment of intestinal helminths, 2D-DIGE (two-dimensional differential in gel electrophoresis) proteomic analysis were performed on whole ileal cell extracts from control and 2 weeks-infected mice and rats. Differentially expressed spots were identified by mass spectrometry (MS).

2D-DIGE data analysis showed that *E. caproni* infection induced massive remodeling of protein expression profile in IEC of mice, affecting more than 50% of the spots detected in the experiment (i.e. 876 from 1,698). Moreover, multivariate statistical analysis was able to discriminate between samples from control and infected mice even when the whole set of spots detected in the experiment was considered. This indicates that *E. caproni* infection induces a noted change on IEC phenotype in the high-compatible host, since expression profiles displayed by individuals (biological replicates) in either control or infected group were similar among them and dissimilar from those in the other group. In *E. caproni*-infected rats, proteomic changes were scarce in comparison with mice. A total of 47 spots from 686 (i.e. 6.85%) were found to be differentially expressed between control and infected rats at 2 wpi and multivariate analysis distinguished control and infected individuals only when statistically differential spots were considered. In view of the reduced number of differentially expressed proteins, infection-induced changes on the glycosylation status of proteins isolated from IEC of rats were also investigated and 8 protein spots were identified.

Although the magnitude of the changes induced by the early infection in the ileum of high- and low-compatible hosts was markedly different, several selection criteria were applied to the significantly differentially expressed spots in mice to choose those displaying greater differences between control and infected animals for protein identification. A similar number of differentially expressed protein spots were identified by MS in mouse and rat samples (38 and 33, respectively) and the changes observed in each host species were completely different. In both cases, metabolic enzymes

represented a large group of differentially expressed proteins. The metabolic alterations, however, were different in each host species, thereby suggesting that cellular energy metabolism may have a significant impact in the control of the infection at mucosal surfaces.

Our proteomic data suggest that mitochondrial function is strongly suppressed in the ileum of *E. caproni*-infected mice, affecting the expression of a number of mitochondrial metabolic enzymes involved in several biochemical pathways. Most of the cellular energy is produced in the mitochondria by oxidative phosphorylation. Moreover, these organelles also play an essential role in other cellular functions, such as fatty acid oxidation, antioxidant defense or programmed cell death. A number of pathophysiological disorders cause mitochondrial dysfunction, leading to an eventual reduction in energy production and cell death (Wallace, 2005; Sivitz & Yorek, 2010; Chaturvedi & Flint Beal, 2013; Dexter & Jenner, 2013; Blake & Trounce, 2014; Song *et al.*, 2014). In the gastrointestinal tract, ulcerative colitis (Sifroni *et al.*, 2010; Santhanam *et al.*, 2012), secondary gastrointestinal dysfunction (Zhu *et al.*, 2014) and drug-induced inflammation (Kolli *et al.*, 2014) have been associated with the development of mitochondrial dysfunction.

In the ileal mucosa of *E. caproni*-infected mice, significant down-regulation of a component of pyruvate dehydrogenase complex (PDH) and the subunit  $\alpha$  of NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase 3 (IDH3) were detected. The mitochondrial PDH complex catalyzes the conversion of pyruvate to acetyl coenzyme A (CoA), linking the glycolysis to the Krebs cycle, which is of critical importance to maintain the cellular energy homeostasis. IDH3 is a mitochondrial matrix enzyme that catalyzes the rate-limiting step of the Krebs cycle, the oxidation of isocitrate to oxalosuccinate. Complete oxidation of pyruvate to CO<sub>2</sub> to generate energy requires the collaboration of PDH complex, the Krebs cycle and the mitochondrial respiratory chain to finally produce ATP (adenosine triphosphate). Therefore, alterations in any of these processes deteriorate mitochondrial ATP production and cause energy depletion (Wallace, 2005). In that case, when an

inefficient oxidative phosphorylation occurs, the mitochondrial fat oxidation pathway becomes important in providing an alternative source of energy. However, the  $\beta$ -oxidation of fatty acids was also impaired in the IEC isolated from infected mice. Enoyl-CoA hydratase, a mitochondrial enzyme that catalyzes the second step of each cycle of  $\beta$ -oxidation, was down-regulated after infection. Moreover, the fatty acid metabolism and, consequently, the energy production became affected as a result of a reduction in the carnitine biosynthetic pathway. Carnitine is indispensable for energy metabolism since it enables activated fatty acids to enter the mitochondrial matrix, where they are broken down via  $\beta$ -oxidation. In the ileum of *E. caproni*-infected mice, reduced expression of 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in carnitine biosynthesis that catalyzes the conversion of 4-trimethylaminobutirate to  $\gamma$ -butirotetaine, was noticed. Although the last step of carnitine biosynthesis from  $\gamma$ -butirotetaine takes place in the liver, precursor metabolites are absorbed in intestine and kidneys and transformed into  $\gamma$ -butirotetaine, which once in the liver is rapidly converted into carnitine (Vaz & Wanders, 2002). Hence, reduced intestinal biosynthesis of carnitine-precursor metabolites affects mitochondrial import of fatty acids, reduces  $\beta$ -oxidation and favors their cytosolic accumulation. This is consistent with the overexpression of fatty acid-binding proteins (FABPs) and apolipoprotein (Apo) A-I observed in the ileum of infected mice.

FABPs are highly abundant cytosolic proteins that are expressed in most of mammalian tissues. In the small intestine, both liver and intestinal FABPs (LFABP and IFABP, respectively) are expressed in villus enterocytes. These proteins display high-affinity for long-chain fatty acids and are involved in lipids uptake and trafficking at intestinal level (Gajda & Storch, 2015). IFABP overexpression has been shown to enhance  $\beta$ -oxidation of fatty acids and cholesterol uptake (Montoudis *et al.*, 2008). However, in the ileum of *E. caproni*-infected mice both IFABP and LFABP overexpression coincided with mitochondrial dysfunction and down-regulation of enoyl-CoA hydratase. In IEC, FABPs have also been proposed to have a role in the regulation of intracellular levels of unbound fatty acids (Veerkamp & van Moerkerk, 1993; Atshaves *et al.*, 2010), which can be toxic for

the cells (Listenberger *et al.*, 2001; Kazantzis & Stahl, 2012). Therefore, in the context of *E. caproni* infection, its overexpression seems to be a collateral consequence of reduced mitochondrial metabolism and the subsequent accumulation of fatty acids in the cytosol of enterocytes. Accordingly, increased expression of Apo A-I was also detected in the ileum of infected mice. Apo A-I is the major protein component of the high-density lipoprotein. However, the intestine can also act as a source of Apo A-I (Glickman & Green, 1977), which is incorporated to form mature chylomicrons that transport the exceeding lipids to other tissues such as adipose, cardiac or skeletal muscle (Manasbach & Siddiqi, 2010).

Overall, the ensemble of these metabolic alterations indicates that in the ileum of infected mice, enterocytes display a highly limited respiration and ATP production through the oxidative phosphorylation system, which would force a metabolic shift to obtain energy from alternative metabolic processes. Indeed, parallel to mitochondrial dysfunction, lactate dehydrogenase (LDH) overexpression was detected in the ileum of infected mice. LDH is a cytosolic enzyme involved in the anaerobic metabolism of glucose, which catalyzes the transformation of pyruvate into lactate, coupled to the oxidation of NADH. LDH up-regulation associated to PDH down-regulation has been previously described (Glushakova *et al.*, 2011; Adeva *et al.*, 2013) and involves a crucial shift in cell metabolism that prevents pyruvate accumulation and the consequent stop of the glycolysis. This shift in the major cellular energy supply from mitochondrial respiration to anaerobic glycolysis is a signature of oxidative stress-induced cellular senescence (Wei *et al.*, 2009). Since oxidative phosphorylation is a far more efficient mechanism for ATP production than anaerobic metabolism, such change in energy metabolism is normally accompanied by an increase in the glycolytic flux in an attempt to maintain the energy production rate (Pelicano *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2009; Glushakova *et al.*, 2011; Adeva *et al.*, 2013). Accordingly, our results revealed a simultaneous increase in the expression of two different isoforms of the glycolytic enzyme enolase 1, also known as  $\alpha$ -enolase, that catalyzes the conversion of 2-phosphoglycerate into phosphoenolpyruvate, which is then dephosphorylated into pyruvate to yield ATP.

As mentioned above, mitochondrial dysfunction is associated with a number of medical disorders and ageing. Although it may directly or indirectly participate in the development of pathology, a major mechanism underlying the development of mitochondria-related diseases consists in an increase in the intracellular oxidative stress (Wallace, 2005; Sivitz & Yorek, 2010; Santhanam *et al.*, 2012; Chaturvedi & Flint Beal, 2013; Kolli *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014). Increased production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) leads to an elevation in nitroxidative stress, which can oxidatively damage mitochondrial DNA, lipids and, primarily, proteins. These alterations may induce mitochondrial dysfunction, causing altered cellular metabolism, energy depletion, fatty accumulation, lipotoxicity and greater ROS/RNS production. Ultimately, sustained mitochondrial dysfunction leads to cell death and tissue injury (Indo *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2014). The pleiotropic cytokine IFN- $\gamma$  is involved in the modulation of several cellular responses including inflammation, cell growth and survival (Boehm *et al.*, 1997; Schroder *et al.*, 2004), displaying both pro-tumorigenic (Taniguchi *et al.*, 1987; Zaidi *et al.*, 2011) and pro-apoptotic roles (Chawla-Sarkar *et al.*, 2003; Sun & Gao, 2004; Zhou *et al.*, 2008b), and intracellular ROS and RNS are important during IFN- $\gamma$  mediated responses (Prasanna *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007). IFN- $\gamma$  increases the levels of NO and superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) through increased expression of iNOS and NADH oxidase activity, respectively, and impairs the cellular antioxidant defense by reducing catalase expression in hepatoma cells (Prasanna *et al.*, 2007). Furthermore, NO and  $O_2^{\cdot-}$  can react to form peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot}$ ), which enhances inflammatory response, causes tissue damage and induces various positive feedback cycles that elevate the generation of NO and ROS (Förstersmann & Münzel, 2006). The ability to produce high amounts of NO, ROS and RNS in response to IFN- $\gamma$  have been recently shown to be essential to undergo growth arrest and apoptosis in tumor cells *in vitro*, with IFN- $\gamma$ -induced NO as the key initiator for ROS production and  $ONOO^{\cdot}$  as the major downstream effector (Rakshit *et al.*, 2014). Therefore, the high levels of IFN- $\gamma$  and iNOS local expression induced in the ileum of ICR mice early after *E. caproni* infection (Trelis *et al.*, 2011; Cortés *et al.*, 2014) appear to be responsible for the early induction of mitochondrial dysfunction observed herein.



Increased ROS production is normally associated with defects in the mitochondrial respiratory chain that reduce effective oxidative phosphorylation and increase the leakage of electrons and the formation of reactive species (Indo *et al.*, 2007). Two different isoforms of both  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the electron-transferring flavoprotein (ETF) were found to be down-regulated after infection. ETF is a component of the mitochondrial respiratory chain that together with the ETF dehydrogenase forms a short pathway that transfers electrons from at least 11 mitochondrial flavoprotein dehydrogenases to the ubiquinone pool (Watmough & Frerman, 2010). Mutations in genes coding for either  $\alpha$  or  $\beta$  subunit of ETF lead to multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency in human patients, a metabolic disorder that affects mitochondrial fatty acids oxidation, branched amino acids, lysine and choline metabolism (Curcay *et al.*, 2003; Olsen *et al.*, 2003; Schiff *et al.*, 2006). However, the down-regulation of the ETF subunits observed herein is likely to be related to the infection-induced impairment of mitochondrial metabolism, which may contribute to the generation of intestinal mitochondrial dysfunction. Furthermore, decreased expression cytochrome c oxidase (CcO) subunit IV isoform 1 (IV-1) was observed in the ileum of infected mice. CcO is the terminal enzymatic complex of the mitochondrial electron transport chain (ETC), which catalyzes the reduction of  $O_2$  to water and represents the rate-limiting enzyme for the regulation of oxidative phosphorylation and ATP synthesis. Although CcO activity can be regulated at several levels, the subunit IV has been shown to be a key regulatory subunit in response to ATP and  $O_2$  levels (Ludwig *et al.*, 2001). CcO IV-1 isoform binds ATP causing allosteric inhibition of the enzyme at high cellular energy levels. Thereby, CcO IV-1 enables the enzyme to detect the cellular energy level and adapt the ATP production to cellular energy demand in order to avoid oxidative stress. At high ATP demand this mechanism is relieved due to an exchange of ATP by ADP at CcO IV-1, although it can be also switched off by the presence of a second isoform, IV-2 (Fukuda *et al.*, 2007). Thus, the down-regulation of CcO IV-1 observed herein suggests that, in response to the infection, CcO activity is regulated through the modification of the expression of subunit IV isoforms.

CcO IV-2 produces the desensitization of the enzyme to the cellular energy levels and increases its catalytic activity at the expense of elevated ROS and cell death. The gene expression of IV-2 is induced under hypoxic and toxic conditions, and it has been shown to be up-regulated via hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) in several cell types (Hervouet *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2007). HIFs are transcription factors induced by low oxygen concentrations that regulate cell metabolism, angiogenesis, cell proliferation and cell survival during hypoxia response (Palazon *et al.*, 2014). HIF-1 $\alpha$  is found at high levels in solid tumors and is involved in the activation of numerous cellular processes including resistance against apoptosis, vascular remodeling, angiogenesis and metastasis (Marín-Hernández *et al.*, 2009). However, activation of HIF-1 $\alpha$  in IEC does not increase carcinogenesis or tumor progression (Xue *et al.*, 2014). In ischemic and inflammatory diseases of the intestine, the activation of HIF-1 $\alpha$  in epithelial cells is beneficial as it plays a protective role through the regulation of a battery of genes involved in the maintenance of epithelial tight barrier and mucosal immune response (Furuta *et al.*, 2001; Synnestvedt *et al.*, 2002; Karhausen *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2014; Keely *et al.*, 2014). Moreover, HIF-1 $\alpha$  has been shown to correlate with PDH dysfunction and plays a major role in promoting the shift of cell metabolism to anaerobic glycolysis (Martín-Hernández *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2009; Glushakova *et al.*, 2011), which is in agreement with our proteomic data. Although the mechanisms leading to inflammation-mediated hypoxia are not fully understood, it most likely involves vasculitis and edema (Colgan & Taylor 2010). Additionally, neutrophil migration into the intestinal mucosa is critical in depleting local O<sub>2</sub> and activating HIF-1 $\alpha$  (Campbell *et al.*, 2014). Neutrophil infiltration at the site of the infection is also characteristic in the *E. caproni* high-compatible host (Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Treliis *et al.*, 2011). Therefore, in the ileum of infected mice, inflammation and neutrophilia may lead to overexpression of HIF-1 $\alpha$  that, in turn, contributes to shift the enterocyte metabolism and to the exhibition of a senescent phenotype by IEC.

ROS accumulation would be favored by the down-regulation of the antioxidant enzyme manganese superoxide dismutase (MnSod), a mitochondrial matrix and intermembrane space protein that transforms the highly reactive O<sub>2</sub><sup>-</sup> into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>.

Inactivation of MnSod gen in mouse induces mitochondrial disease associated with ROS toxicity and apoptosis (Esposito *et al.*, 1999; Kokoszka *et al.*, 2001; Van Remmen *et al.*, 2001). Although antioxidant enzymes are generally believed to be up-regulated in response to an oxidative stress (Ji, 2007), a positive role for reduced expression of MnSod in controlling the homeostatic dysregulation of the intestinal tissue during *E. caproni* chronic infection is discussed below.

Overall, the infection-induced alterations on the IEC metabolism suggest that *E. caproni* infection induces a rapid and intense mitochondrial dysfunction in mice, which is mainly characterized by the shift of cell metabolism to an anaerobic use of glucose. These changes seem to be secondary to the oxidative stress induced by the overexpression of IFN- $\gamma$  and iNOS in the intestinal mucosa of infected mice and, in view of the global changes, the transcription factor HIF-1 $\alpha$  appears to be a candidate to regulate these alterations and control the intestinal pathology in the high-compatible host.

In the host of low compatibility (rat), in contrast, the results suggest that *E. caproni* infection induces a shift to a more aerobic-oxidative metabolism with respect to the uninfected control animals. The enzyme ADP/ATP translocase, which catalyzes the exchange of ADP and ATP across the mitochondrial inner membrane and is essential to maintain the mitochondrial membrane potential, was down-regulated in the ileum of infected rats. Reduced expression of this enzyme has been previously associated to viral infections such as coxsackie B3 in the heart (Kato *et al.*, 1995; Schulze & Schultheiss, 1995) and chronic hepatitis B (Li *et al.*, 2009), leading to an imbalance in the mitochondrial energy metabolism. Modifications in the glycosylation status of a key glycolytic enzyme such as pyruvate kinase, which can impair its catalytic activity, together with the up-regulation of citric acid cycle components and elements of oxidative phosphorylation support the notion of an infection-induced shift in the cellular energy metabolism (Doran *et al.*, 2008; O'Connell *et al.*, 2008). The enzyme pyruvate kinase is one of the three rate limiting enzymes in the glycolysis pathway, which catalyzes the transfer of a phosphate group from phosphoenolpyruvate to ADP, yielding one molecule of ATP and one of

pyruvate. Pyruvate kinase was recognized by DSA lectin in the ileum of infected rats, indicating that it became glycosylated after infection. Changes in the catalytic activity of this enzyme have been reported after increased glycosylation. This modification has been regarded to affect proper subcellular location, functional molecular interactions, enzyme stability and the efficient coupling between the substrate and the active site, thereby negatively affecting its glycolytic activity (O'Connell *et al.*, 2008). Concomitantly with the glycosylation of pyruvate kinase, up-regulation of the glycolytic enzyme  $\alpha$ -enolase, the E1 component of PDH complex and the ubiquinone biosynthetic protein Coq9, which is involved in the biosynthesis of coenzyme Q10, a constituent of the ETC, were also observed in the ileum of infected rats. Besides, down-regulation of proteins that participate in the anaerobic pentose-phosphate pathway, such as the 6-phosphogluconolactonase, and modifications in the glycosylation status of proteases, such as an aminopeptidase or the regulatory subunit of protease 26S, were also noticed. A similar pattern of changes has been reported in aged muscular fibers and it has been attributed to a shift towards a more aerobic-oxidative metabolism coupled with ageing (Lanza *et al.*, 2005; Doran *et al.*, 2008; O'Connell *et al.*, 2008). Altogether, our results suggest that *E. caproni* infection induces in the ileum of rats a reduced glycolytic flux rate and overall ATP production.

In the group of metabolic enzymes, the  $\beta$  subunit of the ATP synthase complex was found to be alternatively glycosylated after infection. Although ATP synthase was firstly described as a mitochondrial protein, located in the inner membrane of these organelles, the entire  $F_1F_0$ -ATP synthase complex has been also localized on the surface of endothelial cells, fibroblasts, hepatocytes and neural cells, where it can be functionally active (Moser *et al.*, 2001; Arakaki *et al.*, 2003; Bae *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2008). Schmidt and co-authors (2008) reported that the  $\alpha$  subunit of the  $F_1F_0$ -ATP synthase complex is transported to the surface of amyloid precursor protein (APP)-deficient neuroblastoma cells after APP transfection and it becomes N-glycosylated during this process. In our study, two isoforms of the  $\beta$  subunit of ATP synthase, another subunit of the  $F_1$  particle, were recognized by SNA lectin in the intestine of non-infected rats but not

at 2 wpi, reflecting the loss of sialic acid residues after *E. caproni* infection. It is likely, thus, that ATP synthase complex is transported to the surface of ileal cells after infection, being modified during this process. The importance of the glycosylation of ATP synthase resides in the fact that this post-translational modification considerably modifies its enzymatic activity and, consequently, the ATP production rate (Anello *et al.*, 2004).

Extracellular ATP has been recognized as an endogenous signalling molecule that modulates inflammation in a concentration dependent manner (Bours *et al.*, 2006). However, its extracellular concentration is negligible in healthy tissues because extracellular enzymes quickly degrade it. In IEC, ATP release is an early alert response to infection with enteric pathogens such as *Shigella flexneri*, which regulates T cell responses and eventually promotes gut inflammation (Puhar *et al.*, 2013). The level of extracellular ATP is tightly regulated by ATP hydrolases such as ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (ENTPDases). In the small intestine, IEC mainly express ENTPDase7 (Robson *et al.*, 2006) and it has been shown that increased ATP levels in the intestine of *Entpd7<sup>-/-</sup>* mice correlate with increases in the number of Th17 cells in the lamina propria, indicating that ATP release mediates enhanced Th17 cell development in the small intestine (Kusu *et al.*, 2013). This fact has a particular interest since, as shown herein, strong local Th17 responses are developed early in the ileum of *E. caproni* infected rats in the absence of exacerbated tissue inflammation. Thus, the translocation of ATP synthase complex to the cellular surface may represent a pathway to augment the extracellular ATP levels in the absence of cell damage, which can serve to promote the development of protective Th17 responses in the ileum of *E. caproni* infected rats.

The BrdU pulse-chase experiments conducted herein have indicated that intestinal tissue hyper-proliferation is a hallmark response in *E. caproni* chronic infections, and the proteomic data strongly support this observation. Epithelial restitution and cell proliferation appear to be constitutively active processes in the ileum of *E. caproni*-infected ICR mice. After injury, intestinal wound healing depends on a precise balance among cell migration, proliferation and differentiation around the wounded area. The first

step is the so-called epithelial restitution, which starts early after injury and is independent of proliferation. This process implies the cells surrounding the wound losing their polarity and migrating into the denuded area to restore barrier integrity. Then, proliferation of the mucosal epithelium starts to increase the pool of enterocytes available to resurface the injury. Finally, IEC differentiation is necessary to maintain the epithelial barrier function (Iizuka & Konno, 2011). Intense tissue damage is developed in the ileum of *E. caproni*-infected mice, caused not only by the parasites themselves but also by the local inflammatory response developed against the infection (Toledo *et al.*, 2006; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Trelis *et al.*, 2011). Villi tip erosion and gaps in the epithelial line are common at the site of infection in this host species (Toledo *et al.*, 2006a; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007). Nevertheless, tissue necrosis is not developed, suggesting that epithelial restitution mechanisms work actively in an attempt to restore the constant tissue damage.

Galectin 2 (Gal2), was also found to be overexpressed in the ileum of infected mice. Galectins are a family of structurally related  $\beta$ -galactoside-binding proteins broadly distributed in mammalian cells and tissues. Although these lectins are likely to mediate a wide range of cell functions, both at intracellular and extracellular levels (Hughes, 2001; Hsu & Liu, 2004; Sato & Nieminen, 2004; Rabinovich *et al.*, 2007), they play a major role in re-epithelialization of wounds (Panjwani *et al.*, 2014). In several models of intestinal inflammation, exogenous Gal2 was demonstrated to ameliorate colitis (Paclik *et al.*, 2008a). Moreover, secreted Gal2 has been shown to bind to IEC and promote cellular restitution *in vitro* by increasing cell cycle progression and cell migration, suggesting that it plays a role in resealing the disrupted intestinal epithelial barrier (Paclik *et al.*, 2008b). In addition to Gal2, an EF-hand domain containing protein (EFhd2, also named swiprosin-1) was among the most up-regulated proteins in the ileum of infected mice. Besides B lymphocytes and other hematopoietic cells, EFhd2 is predominantly expressed in the brain, and in both immune and brain cells it is regulated under inflammatory conditions (Dütting *et al.*, 2011). Recent reports have demonstrated that EFhd2 is found together with actin and actin-binding proteins in mast cells and natural killer-like cells, modulating bundling and cell spreading (Kwon *et al.*, 2013) and actin remodeling (Ramesh *et al.*, 2009;

Thylur *et al.*, 2009), respectively. Moreover, it has been shown to modulate lamellipodia dynamics in melanoma cells (Huh *et al.*, 2013). During epithelial restitution, extensive reorganization of the actin cytoskeleton is needed (Iizuka & Konno, 2011), suggesting that EFhd2 may play a role in the repair of the intestinal epithelium during the chronic infection. In contrast to what occurs in other mammalian cells, enterocyte migration seems to be impaired after RhoA-GTPase activation, through an increase in focal adhesions and enhanced cell adhesiveness, and NO has been shown to impair mucosal healing by activating RhoA (Cetin *et al.*, 2004, 2007). Moreover, IFN- $\gamma$  has also been shown to inhibit enterocyte migration in a RhoA-independent manner, preventing inter-enterocyte gap junction communication (Leaphart *et al.*, 2007). Hence, in a context with high levels of IFN- $\gamma$  and NO, common RhoA- and cell junction-mediated restitution mechanisms are expected to be diminished, suggesting that other pathways should replace their role in the intestinal epithelial reparation during *E. caproni* chronic infection in ICR mice. Therefore, although the precise mechanisms for Gal2- and EFhd2-mediated epithelial healing still remain undefined, our results indicate that these two proteins are potential candidates to direct epithelial restitution under inflammatory conditions.

Once started epithelial restitution, increased cell proliferation is required to provide new enterocytes to restore the damaged area. Crypt-cell hyper-proliferation in the ileum of *E. caproni*-infected mice has been evidenced herein, and the proteomic results reveal different pathways which are probably involved in the regulation of tissue hyper-proliferation. The altered expression of the antioxidant enzyme MnSod may have a role in this process. Apart from its function in controlling oxidative damage, this protein also plays a role in tissue renewal, since MnSod genetic deficiency has been shown to promote cell turnover via alterations in both AP-1 (activator protein 1) and p53 pathways (Zhao *et al.*, 2002). AP-1 mediates cell proliferation and is associated with tumor promotion. The activity of this transcription factor was found to be reduced in a transgenic mice overexpressing MnSod in the skin (Zhao *et al.*, 2001), whereas reduction of MnSod in *Sod2*<sup>+/-</sup> mutant mice led to increased levels of oxidative-damaged proteins together with an enhanced activity of AP-1 after treatment with a tumor promoter. These changes were

accompanied by increased levels of ornithine decarboxylase (ODC) and cell proliferation. Augmented levels of mitochondrion-mediated apoptosis were also observed in *Sod2*<sup>-/-</sup> mice, which were mediated by the increase in nuclear levels of tumor suppressor protein p53 (Zhao *et al.*, 2002). The role of IEC apoptosis in the context of *E. caproni* infection is discussed below. However, at this point, MnSod down-regulation appears as one of the likely mechanisms responsible for infection-induced crypt-cell hyper-proliferation during the establishment of chronic infections.

ODC was not found among the most up-regulated proteins in the ileum of infected mice, although a minor increase in the expression of this protein cannot be discarded. The most down-regulated proteins in the ileum of infected mice were involved in the metabolism of L-ornithine, the substrate of ODC. Three isoforms of the mitochondrial precursor of ornithine aminotransferase (OAT) were found to be down-regulated in the ileum of ICR mice after *E. caproni* infection, one of them being the most down-regulated protein spot seen in the experiment. Another enzyme involved in ornithine metabolism, ornithine carbamoyltransferase (OCT), was also down-regulated. Ornithine is a non-essential amino acid, synthesized from Arg by the cytosolic isoform of the enzyme arginase, which is a necessary metabolite for the production of polyamines and prolines that control cell proliferation and collagen production, respectively. In addition to ornithine synthesis, Arg can also be metabolized by nitric oxide synthase to generate NO and L-citrulline, so that arginase/NOS balance is determinant to displace Arg metabolism to one or another pathway (Hesse *et al.*, 2001). Although increased protein levels of iNOS have not been detected herein, the mRNA expression of this enzyme has been shown to be highly up-regulated in response to *E. caproni* infection in ICR mice (Trelis *et al.*, 2011; Cortés *et al.*, 2014). This feature indicates that in the ileal epithelium of infected mice Arg metabolism is expected to be displaced to the production of NO and L-citrulline and, consequently, ornithine synthesis results reduced. Neither arginase nor iNOS appeared among the most affected ileal proteins in response to *E. caproni* infection at proteomic level. Nevertheless, our results suggest that ornithine metabolism is strongly affected as a consequence of the infection. Both OAT and OCT are metabolic enzymes



involved in ornithine catabolism. Thus, in a context in which ornithine biosynthesis is expected to be diminished due to the displacement of Arg metabolism to NO production via iNOS, the intense down-regulation of such catabolic enzymes allows the increase in ornithine bioavailability for polyamine synthesis through ODC.

Polyamines (putrescine, spermidine and spermine) are small, polycationic, organic molecules, synthesized from ornithine via ODC, which are mandatory to cell proliferation (Pegg & McCann, 1982; Russell, 1985). In inflammatory models, Arg to NO production is considered to be an early phase response, whereas the production of polyamines normally appears as a later repair-phase response after iNOS inhibition by agmatine aldehyde (Satriano, 2004). However, during *E. caproni* chronic infection in ICR mice both iNOS overexpression and crypt-cell hyper-proliferation occur early after infection and exacerbate over time. Accordingly, the increase of ornithine bioavailability for polyamine synthesis through the down-regulation of enzymes responsible for its use in alternative metabolic pathways may represent a different route to guarantee tissue repair in the presence of sustained high levels of NO production during chronic infections.

Several proliferation markers were also found among the most up-regulated proteins in the ileum of infected mice. Some of these, such as keratin (K)19, sulfotransferase (SULT)1B1 and aminoacylase 1 (ACY1) are typically expressed in non-differentiated enterocytes, whereas  $\alpha$ -enolase is a glycolytic enzyme whose overexpression has been associated with inflammation and tissue overproliferation in a pathophysiological context.

K19 is a structural protein considered as a marker of gut morphogenesis since it is mainly expressed in proliferative crypts (Quaroni *et al.*, 1991). Thus, K19 overexpression in the ileum of infected mice is consistent with the crypt hyperplasia developed in this host. Similarly, the activity of the cytosolic enzyme ACY1 has been found to be stronger in the crypt areas than in the villous portion of small intestine (Cigna *et al.*, 2007). ACY1 is responsible for deacylation of the  $\alpha$ -acylated amino acid residues from the N-terminal peptides during intracellular protein catabolism. Although the molecular mechanisms up-

regulating ACY1 expression is still not clearly defined, the specific activity of this enzyme is stimulated by the concentration of its substrate so it makes sense that proliferating undifferentiated cells at the crypt area demand much more active amino acid turnover than the mature non-dividing enterocytes do (Cigna *et al.*, 2007). The biological function of SULT1B is not that clear, however, and high levels of its mRNA expression have been detected in human fetal small intestine (Stanley *et al.*, 2005). Now we have detected intestinal overexpression of SULT1B1 in a context with high cell proliferation rates and epithelial restitution in response to tissue damage, suggesting that it may play a role cell proliferation, differentiation and/or tissue structural organization in the small intestine.

Apart from its primary role as a glycolytic enzyme,  $\alpha$ -enolase belongs to a novel class of surface proteins, since it serves as a plasminogen receptor on the surface of a variety of hematopoietic, epithelial and endothelial cells. Interaction of plasminogen with  $\alpha$ -enolase enhances its activation to plasmin, hence concentrating plasmin proteolytic activity on the cell surface (Miles *et al.*, 1991; Redlitz *et al.*, 1995). Plasmin-enolase interactions are involved in promoting cell migration in pathophysiological processes, such as inflammatory response, cell invasion and cancer metastasis (Pancholi, 2001; Godier & Hunt, 2012). Moreover,  $\alpha$ -enolase has been identified as an oncoprotein overexpressed in some cancers, such as lung, breast and pancreatic cancers (Capello *et al.*, 2011). The expression of  $\alpha$ -enolase varies according to the pathophysiological, metabolic or developmental conditions of cells. Its mRNA expression markedly increases in exponentially growing cells, but remains almost at an undetectable level in the stationary/resting/quiescent phase (Lim *et al.*, 2004). At protein level, it was found to be around two-fold in proliferating versus differentiated human keratinocytes (Olsen *et al.*, 1995). In the gastrointestinal tissue,  $\alpha$ -enolase overexpression has been found in *H. pylori*-infected gastric mucosa, both at mRNA and protein levels (Lim *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2014), as well as in ulcerative colitis (Poulsen *et al.*, 2012) and it has been proposed to be a target antigen in inflammatory bowel disease (Vermeulen *et al.*, 2008, 2011). A role for  $\alpha$ -enolase overexpression in the increase of glycolytic flux after mitochondrial dysfunction has been discussed above. Nevertheless, both glycolytic and

non-glycolytic functions are not incompatible. Indeed, two different overexpressed isoforms of  $\alpha$ -enolase have been identified herein. In the high-compatible host, both infection-induced inflammation and hyper-proliferation are developed at the site of infection. In this context, the elevated expression of  $\alpha$ -enolase in the ileal enterocytes may well be a marker of intestinal inflammation and/or tissue over-proliferation. This protein was also found to be overexpressed in the ileum of *E. caproni*-infected rats in which increased epithelial cell renewal occurs in the absence of inflammatory responses (Toledo *et al.*, 2006b; Trelis *et al.*, 2011; Muñoz-Antolí *et al.*, 2014). This suggests that  $\alpha$ -enolase may have a key role in restoring homeostasis of injured intestinal tissue, as demonstrated in adult skeletal muscle (Díaz-Ramos *et al.*, 2012). Finally, this result indirectly suggests the possibility of cancer development in *E. caproni*-infected ileal mucosa, which was supported by altered expression of ACY1 in ICR mice. In addition to its biochemical function in scavenging N-acylated aminoacid, ACY1 was identified as an up-regulated protein in colorectal cancer when compared with normal colon tissues and was associated with mesenteric lymph node metastasis (Shi *et al.*, 2011, 2013).

In the ileum of infected rats, a total of 10 overexpressed protein spots were identified as different isoforms of keratins. Keratins are a family of structural proteins that form the intermediate filaments of the cytoskeleton in epithelial cells (Coulombe & Omary, 2002). Their function is to confer cells protection against a variety of mechanical and non-mechanical forms of stress (Omary *et al.*, 2004). Around 49 subtypes of keratins have been already described and can be divided into type I (acidic) and type II (neutral and basic) classes. Type I and type II keratins are regulated in a pair-wise, tissue specific manner in epithelial tissues. All epithelial tissues express keratin pairs formed by one type I and one type II keratins (Salas *et al.*, 1997; Coulombe & Omary, 2002; Omary *et al.*, 2004; Wald *et al.*, 2005).

We have found that *E. caproni* infection induces up-regulation of both type I (K19) and type II (K8) keratins in the intestine of rats. The expression of these proteins is essential to maintain the integrity and function of the epithelial barrier and is known to be

regulated by IL-6 (Wang *et al.*, 2007). Based on these data, we hypothesized that local IL-6 generated after *E. caproni* infection in rats may protect the host against the infection through the up-regulation of keratins, preserving the integrity of the intestinal epithelium, preventing inflammation and, probably, facilitating the expulsion of the adult worms. Although K8 and K18 are the major intermediate filaments in the intestinal epithelia of mammals (Moll *et al.*, 2008), K19 is the predominant type I keratin in the ileum of rats, particularly in crypt-cells (Quaroni *et al.*, 1991; Iizumi *et al.*, 2007), and can pair with K8 to build up the intermediate filaments (Moll *et al.*, 2008). Our results indicate that *E. caproni* infection in rats induces the formation of a heterotypic type I/type II keratin pair made up of K19/K8, which would favor the regeneration of the intestinal epithelium. Since it is predominantly found in proliferative crypt cells and is increased in response to pathological alterations, K19 up-regulation in this host is consistent with a continuous formation and development of enterocytes and an enhancement of the epithelial barrier integrity. This may explain the histology that characterizes the infection in rats and the early expulsion of *E. caproni* (Toledo *et al.*, 2006a, b).

The notion that *E. caproni* induces major changes in the cytoskeleton and structure of IEC in rats is supported by the overexpression of T-plastin, a regulatory protein of the actin cytoskeleton, concomitantly with the up-regulation of actin alpha-1, an F-actin cross-linking protein which is thought to anchor actin to a variety of intracellular structures. Plastins are a family of actin-binding proteins that cross-link actin filaments into tight bundles facilitating the turnover of actin filaments (Delanote *et al.*, 2005) and T-plastin, concretely, is present during the early stages of IEC differentiation and is essential for the formation and expression of the microvilli (Delanote *et al.*, 2005). Furthermore, it has been shown that T-plastin is involved in the cytoskeletal rearrangement during infections with intestinal bacteria, stimulating cell rounding and increasing the length and density of microvilli among other effects (Arpin *et al.*, 1994; Adam *et al.*, 1995).

Villin-1 is another protein involved in the arrangement of the cytoskeleton of enterocytes. It belongs to the family of gelsolins, which comprises ubiquitous actin-binding

proteins involved in the organization of actin microfilaments and contributing to the bundling of actin filaments into microvilli (Athman *et al.*, 2002). Although villin can be overexpressed during the formation process of enterocytes (Athman *et al.*, 2002), its up-regulation was not detected herein. However, we observed that *E. caproni* infection induces the glycosylation of this protein in the intestine of rats. Villin-1 was recognized by PNA lectin in the ileum of rats at 2 wpi, but not in control animals, thereby suggesting that villin-1 may be involved somehow in the preservation of the intestinal tissue under *E. caproni* infection conditions. We have not found previous reports on the glycosylation of this protein, although several potential sites of N-linked glycosylation can be predicted in the sequence of villin-1 of *R. norvegicus* using *NetNGlyc 1.0 Server*. Moreover, three sites for O-GlcNAcylation can also be predicted using *YinOYang 1.2 server*.

Consistent with the idea that *E. caproni* promotes the renewal of the intestinal epithelium of rats is the overexpression of calcineurin B homologous protein 2. This is a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein that plays a role in the regulation of cell proliferation by increasing the phosphatase activity of protein phosphatase 3  $\alpha$  isozyme. Moreover, it is an activator of the calcineurin/NFATc (nuclear factor of activated T cells) signaling pathway, involved in the translocation of the transcription factor NFATc3 to the nucleus (Li *et al.*, 2008a). NFATc participates in several processes including keratinocyte cell differentiation via the increase in the expression of the TNF-related apoptosis-induced ligand (Wang *et al.*, 2011).

Five isoforms of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein annexin A4 were found to be up-regulated after *E. caproni* infection in rats. Annexins are a family of structurally related proteins that bind phospholipids in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Monastyrskaya *et al.*, 2009). Annexin A4, concretely, is a relatively widely distributed protein, predominantly produced by epithelial cells, which is found in high levels in the intestine among other tissues (Massey *et al.*, 1991; Massey-Harroche *et al.*, 1998). It is normally distributed in the pool of proteins associated to the cytosolic side of the membrane bilayer in IEC, which can be transferred to the extracellular membrane upon initial cellular injury. It can be also found in lipid rafts and the extracellular surface (Willshaw *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2006).

Annexin A4 overexpression has been correlated with *H. pylori* infection of the gastric mucosa and this has been suggested to facilitate the bacterial colonization by affecting the epithelial cell function and changing the gastric environment (Lin *et al.*, 2008). Annexin A4 is reported to regulate passive permeability to H<sub>2</sub>O and H<sup>+</sup> and the active Cl<sup>-</sup> secretion in IEC. Moreover, Annexin A4 binding rigidifies the outer leaflet of the membrane bilayer, thus inhibiting water flux (Hill *et al.*, 2003), and its overexpression inhibits calmodulin-dependent protein kinase II-activated chloride conductance, thereby affecting ion equilibrium in the gastrointestinal lumen (Kaetzel *et al.*, 2001; Lin *et al.* 2008). Alterations in IEC function have been associated with the expulsion of intestinal nematodes (Harari *et al.*, 1987; Shea-Donoue *et al.*, 2001; Madden *et al.*, 2002, 2004). Decreased Cl<sup>-</sup> secretion and reduced tissue permeability were observed in the small intestine of mice infected with either *T. spiralis*, *H. polygyrus* or *N. brasiliensis*. Those changes were found not to be mediated by the enteric nervous system. Conversely, they appeared to be the result of direct effects on IEC, which were dependent on the activation of STAT6 either through IL-4 or through IL-13 downstream signaling (Madden *et al.*, 2004). The increase in intraluminal fluid may impair the access of worms to the intestine mucosal surface, thereby facilitating their expulsion. Herein, overexpression of several isoforms of annexin A4 have been found in the ileum of *E. caproni* rats, where elevated levels of IL-13 expression have been previously reported (Trelis *et al.*, 2011). This finding indicates that up-regulation of annexin A4 may be involved in the altered IEC function mediated by IL-13/IL-4 signaling and STAT6 activation and suggests the involvement of a new IL-13-driven effector mechanism that can contribute to the early rejection of *E. caproni* in rats.

Furthermore, annexins have been implicated in the repair mechanisms at both tissue and intracellular level, since they affect membrane properties such as permeability or anchoring of cytoskeletal elements (Gerke & Moss, 2002; Gerke *et al.*, 2005). Evidences of annexins as modulators of inflammation have been widely provided and several reports show that they suppress the expression of pro-inflammatory cytokines and favor the production anti-inflammatory ones (Munoz *et al.*, 2007; Perreti & D'Acquisto, 2009; Fatimathas & Moss, 2010). In this sense, annexin A4 has been shown to bind fetuin-A in

the cell surface (Kundranda *et al.*, 2004). This is an acute phase protein with anti-inflammatory properties, which is strategically synthesized and released by the liver in response to infection and injury (Wang & Sama, 2012). Fetuin-A facilitates anti-inflammatory actions of cationic polyamines and may be critical for regulating the innate immune response (Wang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997, 2000). Therefore, overexpression of Annexin A4 may also contribute to the defense of rats against *E. caproni* infection by limiting parasite-induced mechanical damage, as it rigidifies the apical membrane of enterocytes, and concomitantly, acting as an anti-inflammatory factor. An inhibitor of proteases, such as leukocyte elastase inhibitor A, was also overexpressed in the ileum of rats after *E. caproni* infection, which may contribute to the preservation of the intestinal tissue. Proteases are involved in multiple biological processes including inflammation and tissue injury, hence the balance between these proteases and their inhibitors appear to be crucial for the maintenance of tissue integrity (Hiemstra, 2002). Inflammatory cells produce and secrete serine proteases such as monocyte and neutrophil elastase, which contribute to tissue destruction and inflammation through their proteolytic activity. Leukocyte elastase inhibitor A, as described for other protease inhibitors, can protect local tissue preventing intestinal injury caused by excessive release of proteolytic enzymes by inflammatory cells (Si-Tahar *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2007).

The alterations observed in the ileum of rats in response to *E. caproni* infection appear to be related to the regeneration of the ileal epithelium throughout an augmented proliferation and differentiation of enterocytes. Whereas the changes observed in the ileum of infected mice seem to be directed to repair and restore the damaged tissue, the alterations seen in the ileum of rats enable the preservation of the functional integrity of epithelial barrier, thereby limiting the generation of tissue injury in this host. This may be crucial for parasite expulsion, as this physical barrier constitutes a major defense line against intestinal helminths. In this sense, the elevated levels of IL-13 expression generated in the ileum of rats after *E. caproni* infection could be responsible for the induction of effector mechanisms such as changes in IEC function and accelerated

epithelial renewal, which can lead to the early expulsion of this parasite from the rat intestine.

Although in different circumstances, proteomic data obtained herein suggest that cell proliferation is enhanced in the ileum of both infected high- and low-compatible hosts. In a context with such an augmented cell proliferation, concurrently elevated levels of cell death must be expected in order to maintain tissue homeostasis and prevent massive dysregulation (Cliffe *et al.*, 2007). Furthermore, in the ileum of *E. caproni*-infected mice, continued inflammation and wound healing represent a high risk for DNA damage and malignant transformation (Bissell & Radisky, 2001), thus defective cells are needed to be rapidly eliminated. Additionally to mitochondrial dysfunction, which causes energy depletion and premature cellular senescence, several other alterations observed herein support this notion. Apoptosis is the most common way of programmed cell death, although other forms do exist. It normally occurs as a homeostatic mechanism to preserve cell populations in tissues, a defense mechanism in immune reactions or to eliminate damaged cells. The mechanisms of apoptosis are complex and sophisticated, and they are not fully understood yet. However, two main apoptotic pathways have been classically accepted: the extrinsic or death receptor pathway and the intrinsic or mitochondrial pathway (Vermeulen *et al.*, 2005). Our proteomic data suggest that mitochondrial-driven pro-apoptotic events are activated in the ileum of *E. caproni* infected mice. This is not strange since the intrinsic pathway is triggered by intracellular signals such as free radicals, mitochondrial dysfunction or DNA damage among many other factors (Wang *et al.*, 2013).

The control and regulation of the intrinsic pathway of apoptosis occurs through the members of the Bcl-2 family proteins, and the tumor suppressor protein p53 has a critical role in their regulation (Miyashita *et al.*, 1994). Although none of these proteins were among the most affected ones in response to *E. caproni* infection, several of the primarily altered proteins in the ileum of infected mice were associated with the regulation of intracellular levels of p53. As discussed above, down-regulation of MnSod promotes cell turnover and increases nuclear levels of p53 (Zhao *et al.*, 2002). Moreover,



the down-regulation of proteasome subunit alpha type 1 (PSMA1) may also affect the levels of this transcription factor. Proteasomes are very large protein complexes that carry out protein degradation in an ATP/ubiquitin-dependent process. Concretely, PSMA1 plays a role in gating the entry of proteins into the proteasome, as it is strategically located at the mouth of the proteasome barrel (Zhang *et al.*, 2007), and its overexpression has been involved in tumorigenesis (Deng *et al.*, 2007). Proteasome inhibition, however, has been closely associated with increased intrinsic apoptosis through different pathways. On the one hand, proteasome dysfunction may directly increase p53 availability. Under normal conditions, p53 is a very labile protein whose rapid degradation is largely achieved through the ubiquitin-proteasome pathway, whereas its accumulation mainly occurs through post-translational modifications (Oren, 1999). Inflammation-induced proteasome dysfunction has been shown to lead to the accumulation of p53 and ubiquitinated proteins (Kumagai *et al.*, 2014). On the other hand, proteasome dysfunction also affects the activation of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling through the stabilization of the inhibitory subunit I $\kappa$ B- $\alpha$  (Traencker *et al.*, 1994). NF- $\kappa$ B is a protein complex with various transcriptional regulatory functions involved in stress response, cell proliferation, differentiation, apoptosis and tumorigenesis. NF- $\kappa$ B activation is initiated by signal-induced proteasome degradation of I $\kappa$ B protein, which binds NF- $\kappa$ B as an inhibitor, resulting in its activation. After degradation of I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B is able to enter the cell nucleus to perform its transcriptional regulatory function, turning on the expression of certain appropriate genes to avoid apoptosis (Tergaonkar, 2006).

PSMA1 down-regulation has been detected in colorectal cancer cells after treatment with caffeic acid phenethyl ester (CAPE) (He *et al.*, 2014), a polyphenolic antioxidant with anti-proliferative effects in various tumor cells both *in vitro* (Lee *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Nagaoka *et al.*, 2002; Usia *et al.*, 2002; Onori *et al.*, 2009) and *in vivo* (Orsolich *et al.*, 2005; Kuo *et al.*, 2006). CAPE induces cancerous cell apoptosis through the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling (Natarajan *et al.*, 1996; Orban *et al.*, 2000; Fitzpatrick *et al.*, 2001). Therefore, PSMA1 is an important regulator of proteasome-mediated proteolysis, with a key role in cancer development and/or progression through modulation

of p53 and NF- $\kappa$ B signaling, which can play a key role in the control of intestinal tissue hyperplasia and homeostatic dysregulation after *E. caproni* infection.

MnSod is transcriptionally regulated by NF- $\kappa$ B (Djavaheri-Mergny *et al.*, 2004). As mentioned before, the decreased expression of this antioxidant enzyme in a context with expected high levels of oxidative stress seems to be inconsistent. However, it has been shown that the novel antimalarial agent dihydroartemisinin induces autophagy in cancer cells through repression of NF- $\kappa$ B activity. Suppression of NF- $\kappa$ B translocation results in reduction of MnSod expression, leading to ROS accumulation and cell death (Hu *et al.*, 2014). Therefore, the down-regulation of MnSod detected herein may be secondary to proteasome dysfunction-mediated NF- $\kappa$ B repression, and is likely to play a double role in the ileum of infected mice promoting crypt-cell proliferation and, concomitantly, inducing ROS-mediated programmed cell death to counteract homeostatic dysregulation.

Beside changes directly associated with the induction of cell death, alterations in different structural proteins were also noted in the intestine of infected mice. Together with the augmented expression of crypt-specific K19, a decrease in the expression of type II K8 was detected. Decreased protein expression of K8 may involve the formation of intermediate filaments pairs based on a different type II keratin, such as the crypt-specific K7, or directly impair the formation of the intermediate filament cytoskeleton in differentiated IEC. K8<sup>-/-</sup> mice showed a lack of intermediate filament cytoskeleton in small IEC from the opening of crypts, with differentiated enterocytes displaying progressive loss of apical membrane-associated proteins and alterations in microtubule organization along the crypt-villous axis (Ameen *et al.*, 2001). Although tissue functional deficiencies were not observed in the knock out mice, it was noted that mature IEC lacking intermediated filament cytoskeleton displayed shortened microvilli and they were probably unable to fully recover from tissue injury (Ameen *et al.*, 2001). These cytoskeletal alterations totally contrast to what occurs in rats. Thus, in the ileum of *E. caproni*-infected mice cytoskeletal deficiency may make the infected epithelium even more sensitive to both parasite- and immune-mediated tissue damage, accelerating the induction of cell death. Indeed, small

intestine enterocytes from K8<sup>-/-</sup> mice appear to be more predisposed to apoptosis compared to those obtained from K8<sup>+/+</sup> mice (Habtezion *et al.*, 2011)

A decrease in the expression of the structural nuclear protein lamin B was also noted after infection. Lamins, A- and B-types, are the major components of the nuclear lamina. Although they are basically structural proteins, these type V intermediate filament proteins make an important contribution to nuclear envelope integrity (Burke & Stewart, 2013). A number of studies have linked B-type lamins to multiple aspects of normal cell physiology such as transcription, replication, spindle assembly, chromatin organization or resistance to oxidative stress (Dechat *et al.*, 2010; Shimi *et al.*, 2010). Moreover, there is growing evidence suggesting that B-type lamins regulate cellular senescence (Freund *et al.*, 2011; Shimi *et al.*, 2011), a potent tumor-suppressive mechanism that arrests cell proliferation, essentially irreversibly, in cells that are at risk of malignant transformation. The decrease in lamin B1 expression occurs in response to direct stimulation of either p53 or pRB tumor suppressor pathways and it has been demonstrated that its loss induces inhibition of proliferation and premature senescence (Freund *et al.*, 2012; Shimi *et al.*, 2011). Nonetheless, altered lamin expression is common in gastrointestinal neoplasms and reduced expression of either lamin A/C or lamin B1 may be a biomarker of malignancy in the gastrointestinal tract in humans (Moss *et al.*, 1999). Two isoforms of the mitochondrial elongation factor Tu (TUFM) were also found among the most down-regulated proteins in IEC from infected mice. TUFM is one of the major mitochondrial biogenesis regulating proteins, which has been found to be down-regulated during ageing in muscle cells (Gueugneau *et al.*, 2014). Moreover, its inhibition induces mitochondrial dysfunction and increased cell death in cancer cells (Jeong *et al.*, 2012), which is fully consistent with the results observed herein.

Despite the fact that proteomic data strongly support the idea of elevated levels of IEC death, tissue hyperplasia is developed in the ileum of *E. caproni* infected mice. IEC apoptosis in response to *E. caproni* infection has not been studied yet. However, our results indicate that mitochondrial dysfunction and premature senescence are not enough

to equilibrate cell proliferation and death rates in chronic infections. In primary cultured hepatocytes, it has been shown that IFN- $\gamma$ -induced high amounts of ROS are not sufficient to induce cell death, but a combination of ROS and endoplasmic reticulum (ER) stress is required to induce apoptosis (Watanabe *et al.*, 2003). In this sense, we have found protein disulfide isomerase A3 (PDIA3, also known as ERp57 or 1,25D<sub>3</sub>-MARRS) to be down-regulated in the ileum of infected mice. PDIA3 is a stress-responsive protein that in the ER is involved in protein folding, glycoprotein quality control and the assembly of the major compatibility complex class I (Turano *et al.*, 2011). Therefore, the lack of a proper ER stress response may reduce the rate of IEC death despite the fact that premature senescence is induced in mature enterocytes in response to the infection. Nevertheless, in addition to the ER, PDIA3 is present in many other subcellular locations, what makes difficult to predict the effects of its down-regulation on the course of the intestinal infection (Turano *et al.*, 2011).

Constant wound repair represents an elevated risk for DNA damage and genomic instability in proliferating cells, promoting the development of a tumorigenic environment, with chronic inflammation being the most important risk factor (Schäfer & Werner, 2008). Moreover, a continuous state of chronic inflammation and wound healing have been regarded as the key events for cancer development in other chronic helminth infections (Salim *et al.*, 2008; Sripa *et al.*, 2012). Herein we have demonstrated that both pro-tumorigenic and anti-tumorigenic mechanisms are activated early after infection in *E. caproni*-infected mice. Malignant tumors are often developed at sites of chronic injury, re-epithelialization and inflammation. Thus, according to our results, persistent damage of the intestinal epithelium in long-lasting infections could represent a risk factor for cancer development. We consider that this issue merits further attention and the *E. caproni*-mouse model can be useful for the study of the helminth-induced malignancy.

In the case of rats, proteomic results indicate that programmed cell death is also hyper-activated, although in this host species the molecular pathways involved seem to be different to those described in infected-mice. The enzyme ADP-sugar pyrophosphatase

was found among the down-regulated proteins in the ileum of *E. caproni*-infected rats. This enzyme has an intrinsic activity to cleave ADP sugars to AMP and sugar phosphate and is considered as a 'sanitization enzyme' due to its ability to prevent errors during DNA replication and eliminate endogenous toxic material (Kamiya *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2011). ADP-sugar pyrophosphatase has been seen to be down-regulated in response to oxidative stress in endothelial progenitor cells (Liu *et al.*, 2013). Although the levels of oxidative stress in the ileum of infected rats are not expected to be as elevated as in the high-compatible host, as IFN- $\gamma$ -mediated responses are not developed in this case, infection-induced mild oxidative stress can be presumed.

Peroxiredoxins (Prdx) are a family of antioxidant enzymes that also control cytokine-induced peroxide levels and mediate signal transduction in mammalian cells (Rhee *et al.*, 2005). Herein, we have found the concomitant up- and down-regulation of two members of the Prdx family: the cytosolic Prdx-1 and the mitochondrial thioredoxin-dependent peroxide reductase (also known as Prdx-3), respectively. Prdx-3 protects radical-sensitive enzymes from oxidative damage and acts synergistically with MAP3K13 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13) to regulate the activation of NF- $\kappa$ B in the cytosol and avoid apoptosis (Masaki *et al.*, 2003). Prdx-1 can play an important role in eliminating peroxides generated during metabolism and participates in the signal cascade of growth factors and TNF- $\alpha$ . Moreover, it has been shown to induce the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 (Riddell *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). Pro-inflammatory TNF- $\alpha$  was found to be slightly up-regulated in the ileum of *E. caproni*-infected rats (Trelis *et al.*, 2011) and is known to down-regulate the expression of prohibitin in IEC. Prohibitin is an ubiquitously expressed multifunctional protein involved in several cellular processes such as mitochondrial function, protein folding, cell proliferation and suppression of oncogenesis (Jupe *et al.*, 1995; McClung *et al.*, 1995; Dell'Orco *et al.*, 1996; Nijtmans *et al.*, 2000; Artal-Sanz *et al.*, 2003). Moreover, this protein has been reported to reduce the severity of colitis by acting as a regulator of the antioxidant response (Theiss *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2013). According to these facts, the concomitant down-regulation of ADP-sugar pyrophosphatase, Prdx-3 and prohibitin in the ileum of *E. caproni*-infected rats suggests a

high error rate in DNA replication and protein folding due to oxidative stress, resulting in IEC apoptosis. This hypothesis is supported by the down-regulation of the zeta ( $\zeta$ ) isoform of the signal transducer 14-3-3. 14-3-3 proteins are a family of cytosolic Ser/Thr-binding proteins with anti-apoptotic functions. Concretely, 14-3-3  $\zeta$  is an oncogenic protein whose down-regulation has been shown to sensitize cells to stress-induced apoptosis and enhance anoikis (Li *et al.*, 2008b; Niemantsverdriet *et al.*, 2008), a type of apoptotic cell death induced by the detachment of normal epithelial cells from their substrate, just as in the apices of intestinal villi (Potten & Allen, 1977).

TNF- $\alpha$  mediated IEC apoptosis has been reported to be a beneficial mechanism to counteract tissue homeostasis dysregulation during chronic intestinal helminth infections (Cliffe *et al.*, 2007). Our results suggest that slightly increased TNF- $\alpha$  production in the ileum of infected rats may protect this host against the development of tissue hyperplasia by affecting the expression of proteins such as prohibitin and inducing IEC apoptosis. Moreover, detrimental excessive apoptosis appears to be prevented through the activation of proper ER stress responses, as suggested by the increased expression of chaperones such as heat shock cognate 71 KDa protein and BiP in the ileum of infected rats. BiP bind the luminal domain of several ER stress inducers (Zhao & Ackerman, 2006) and is known to attenuate ER stress responses and ER stress-induced apoptosis (Oyadomari & Mori, 2004; Gu *et al.*, 2010).

Differential proteomic analysis in the ileum of hosts of high and low compatibility have provided a vast amount of information as regards the molecular changes that may effectively contribute either to the development of intestinal pathology and the establishment of chronic infections or the worm rejection. The ability of some of these effector mechanisms to participate in the expulsion of *E. caproni* adult worms has been also evaluated in the present study.

Proteomic analysis have revealed that in both mice (ICR) and rats infected with *E. caproni* intestinal epithelial cell proliferation is augmented early after infection, since increases in protein expression of the gut morphogenesis marker K19 and  $\alpha$ -enolase have

been detected in the two host species at 2 wpi. Increased epithelial cell turnover is a potential dislodging mechanism that may affect the steadiness of worms in their intestinal microhabitat and, therefore, result in parasite clearance (Da Costa, 1971; Symons, 1978; Hoste 1989; Cliffe *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2014). In order to have a better understanding of the effector mechanisms involved in the rejection of *E. caproni* worms and, more precisely, define the role that epithelial renewal has in the evolution of the intestinal infection, BrdU pulse-chase experiments were conducted to investigate the changes induced on IEC kinetics in hosts displaying high and low compatibility with the parasite. The results showed that *E. caproni* infection affects the IEC kinetics in the ileal mucosa of each host species in a different manner. Interestingly, although the presence of *E. caproni* adults induces an increase in the migration rate of IEC along the crypt-villus axis in both host species, the consequences of this change are completely different in each case, leading to a different outcome in every host.

In *E. caproni*-infected mice, an elevation in the proliferation rate was evident from 2 wpi, coinciding with the development of tissue hyperplasia. The percentage of BrdU-labeled cells was significantly augmented in the ileum of infected animals and the positional distribution of labeled cells 1 h after BrdU injection revealed that newly formed cells moved further from the crypt base when compared with controls. The analysis of the positional distribution of labeled-cells showed a similar profile at 2 and 6 wpi, albeit the graph obtained at 4 wpi was slightly different. At this week post infection, the percentage of labeled cells in positions close to the crypt base was significantly lower in infected animals than in controls (cell positions 5 to 9). However, this would have little relevance since in this week post infection the total number of epithelial cells and the percentage of BrdU-labeled cells per crypt were significantly higher in the ileum of infected animals than in uninfected controls, as occurs at 2 and 6 wpi.

The IEC migration rate, expressed as the number of cell positions moved by one cell in 23 h, was markedly enhanced in the ileum of mice after *E. caproni* infection, increasing progressively over the course of the infection. The number of cell positions

moved in this time period was almost three-fold at 2 wpi respect to uninfected controls, and it became about six-fold higher in the ileum of infected mice at 6 wpi. Notwithstanding, this increase in the migration rate did not lead to an accelerated epithelial cell turnover in this host, but newly formed cells accumulated in the crypt-villus axis causing tissue hyperplasia. Intestinal epithelial renewal is a tightly regulated process, based on a continuous and balanced gain and loss of cells at the base of the crypts of Lieberkühn and the villi apices, respectively. Only in this way intestinal homeostasis and architecture can be maintained (van der Flier & Clevers, 2009). Although increases in proliferation levels and cell migration rate do normally correlate with an enlarged IEC turnover, a number of heterogeneous intestinal alterations can induce the dysregulation of these processes, resulting in changes on tissue structure (Guy-Grand *et al.*, 1998; Xian *et al.*, 2002; Boudry *et al.*, 2007; Maloy & Powrie, 2011; Kandasamy *et al.*, 2014). Our results indicate that in the ileum of the highly compatible host *E. caproni* infection induces a dysfunction on normal epithelial renewal, which is characterized by high levels of crypt-cell proliferation and a slow rate of epithelial turnover, which would explain tissue hyperplasia associated with chronicity.

IFN- $\gamma$  regulates the crucial homeostatic functions of cell proliferation and apoptosis (Nava *et al.*, 2010, 2014; Capaldo *et al.*, 2012) and a critical role for this cytokine in regulating the homeostasis of IEC proliferation during gut inflammation has been evidenced. *In vivo* blocking of IFN- $\gamma$  effectively ameliorated infection-induced crypt-cell hyper-proliferation in the caecum of a *T. muris*-susceptible mouse strain (Artis *et al.*, 1999). Moreover, the IFN- $\gamma$ -induced chemokine CXCL10 was also reported to reduce the rate of epithelial cell turnover in different mouse models (Sasaki *et al.*, 2002; Cliffe *et al.*, 2005).

Previous studies have shown that chronic infections with *E. caproni* are associated with high local inflammatory responses and intestinal tissue damage in ICR mice (Toledo *et al.*, 2006a; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007), coinciding with strong local Th1-type responses that are mainly characterized by high levels of IFN- $\gamma$  expression (Trelis *et*



*al.*, 2011). Moreover, herein we have suggested that local IFN- $\gamma$  production plays a dichotomous role, on the one hand inhibiting protective Th2 responses and inducing inflammation but, on the other hand, reducing the severity of the disease and protecting ICR mice from infection-induced morbidity and mortality. Although intestinal homeostasis was also affected in the IFN- $\gamma^{-/-}$  mice, the lack of IFN- $\gamma$  induced crypt hyperplasia in the absence of changes in villi length in this host strain, causing an altered rostral-caudal gradient that consists in an expansion of the proliferating compartment along with a non-proportional production of differentiated IEC (Cortés *et al.*, 2014). These differences between strains suggest that, although IFN- $\gamma$  may play a major role in the infection-induced homeostatic dysregulation observed in the ileum of *E. caproni*-infected ICR mice, INF- $\gamma$ -independent pathways should also be implicated. In this context, some of the alterations in intestinal protein expression detected in the differential proteomic analysis have contributed to elucidate alternative pathways involved in this dysregulation, such as the down-regulation of MnSod and the multiple alterations in ornithine metabolism that seem to lead to an increased polyamine synthesis. Moreover, the fact that increased IEC proliferation may be caused by the parasite itself through the release of mitogenic excretory/secretory products (ESP) cannot be discarded. The existence of helminth-derived factors that can influence IEC proliferation (Rikihisa *et al.*, 1984; Huby *et al.*, 1995, 1999) and the fact that both high-and low-compatible hosts display alterations in the IEC dynamics after *E. caproni* infection support this hypothesis.

In the low-compatible host (rat), major changes in the intestinal tissue structure were not noticed after *E. caproni* infection. Infected rats did not develop crypt nor villi hyperplasia, although IEC kinetics was affected as a consequence of the infection. However, the results obtained in the BrdU pulse-chase experiment were somewhat confusing in this host species. No significant changes in the number of labeled cells were detected between control and infected animals 1 h after BrdU administration, and positional distribution analysis showed similar profiles during the complete experiment. Nevertheless, 24 h after intraperitoneal injection differences in the cell migration rate become evident between control and infected rats. At first sight, these results appear to

be inconsistent since an elevation in cell migration rate does correlate with an increase in cell proliferation levels. However, it must be taken into account that intestinal epithelial renewal is subjected to the control of circadian rhythms. Although several lines of evidence suggest the existence of a crosstalk between molecules that are responsible for the generation of circadian rhythms and molecules that control cell cycle progress (Borgs *et al.*, 2009), the regulatory mechanisms behind the circadian rhythmicity of enterocyte proliferation remain elusive (Pácha & Sumová, 2013). Several studies conducted in this way indicate that in rodents, the peak of the S phase of the cell cycle occurs late at night, whereas the mitotic activity is highest in the early part of the day and lowest around the early evening (Scheving & Pauly 1973; Neal & Potten, 1981). BrdU is a synthetic nucleotide that can be incorporated into de DNA double-chain during the replication of genetic material in the S phase of the cell cycle (Gratzner *et al.*, 1982; Cavanagh *et al.*, 2011). Considering that BrdU injections were carried out in the morning (10.00 a.m.), it seems highly likely that the discrepancy between the results observed at 1 and 24 h after BrdU injection can be attributed to the fact that the moment of highest BrdU bioavailability in the intestine did not coincide with the peak of S phase. Moreover, the magnitude of the changes detected in the ileum of infected rats was smaller than in mice, which may also contribute to explain the absence of detectable variations during the first hour after BrdU administration in this host. The results at 24 h post administration, however, showed that IEC migration rate is about two-fold higher in the ileum of infected animals than in controls. Furthermore, although the number of BrdU-labeled cells per crypt-villous axis was slightly higher in the ileum of infected rats, the accumulation of newly formed epithelial cells was scarce in this host species. Altogether, these results suggest that *E. caproni* infection affects IEC kinetics, resulting in an accelerated epithelial cell turnover associated with worm rejection.

In this context, IL-13 expressed in the ileum of infected rats may be a key immune mediator, since it has an important role in regulating the epithelial cell turnover. Cliffe *et al.*, (2005) discovered that *T. muris* rejection was associated with an elevated rate of intestinal epithelial renewal regulated in an IL-13-dependent manner. These authors

proposed a new mechanism for *T. muris* expulsion in which the elevation of IEC migration rate acts as an epithelial escalator, displacing the worms from their optimal niche and causing their expulsion. However, the mechanism that operates in the case of *E. caproni* infection must be different. *T. muris* adult worms live partially embedded in the host intestinal epithelium, thus an increased IEC turnover pushes them along the crypt axis towards the caecal lumen. In contrast, *E. caproni* adult worms attach to the small intestine mucosal surface through the ventral sucker, in an active process in which they detach and attach again in close places. In this case, molecular interactions between the parasites and the IEC appear to be of relevance (Marcilla *et al.*, 2012). Therefore, an accelerated epithelial cell turnover may hinder the establishment of proper host-parasite interactions at molecular level, impairing the development of long-lasting infections. Conversely, in *E. caproni*-infected mice the slow cell turnover and tissue hyperplasia would enable more stable interactions, thereby favouring the development of chronic infections.

The changes induced on IEC kinetics after *E. caproni* infection in each host species evidence that intestinal infection causes differential alterations in the host mucosal homeostasis, which may play a major role in the outcome of the infection. However, it is interesting to note that the IEC dynamics in naïve hosts showed marked differences between the two species, which prevented us from the statistical comparison of infection-induced changes between them. Considering that our results support the idea that an accelerated IEC turnover contributes to worm rejection, the fact that both proliferating levels and IEC migration rate were higher in the ileum of naïve rats compared with uninfected mice may have a role in affecting the establishment of juvenile worms from the outset of infection. One of the main advantages of the *E. caproni*-rodent model is that, despite its ability to parasitize a broad range of definitive hosts, the host-parasite compatibility differs considerably among rodent species in respect of worm establishment and survival (Toledo & Fried, 2005). In this sense, a number of studies have demonstrated that the immune response generated by the host against the parasite is a crucial factor determining the outcome of the infection in hosts of different compatibility (Toledo *et al.*, 2006a, b; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Sotillo *et al.*, 2007, 2011; Trelis *et al.*, 2011). According

to our results concerning the role of epithelial cell turnover, the rat intestine appears as a hostile niche for the establishment of *E. caproni* worms. This would serve to explain the lower rate of primary worm establishment in rats than that observed in mice and hamsters (Toledo *et al.*, 2004, 2006a, Muñoz-Antolí *et al.*, 2007). However, the development of proper T CD4+-mediated immune responses, which direct appropriate effector mechanisms, is crucial to expel the parasites and render the host resistant (Sotillo *et al.*, 2011; Trelis *et al.*, 2011).

Another dislodging mechanism that is generally associated with host resistance against gastrointestinal helminths, consists in augmented intestinal mucus production in response to the infection. The gastrointestinal mucus layer plays a protective role on the underlying epithelium. This barrier, which is mainly constituted by both gel-forming and transmembrane mucins, can respond dynamically to a broad range of luminal insults, including parasitic infections, and is regulated by underlying innate and adaptive immunity (McGuckin *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2011). Enhanced mucin release appears to be a common mechanism for the intestinal clearance of gut helminths, from small nematodes like *T. muris* (Hasnain *et al.*, 2011a, b) or *N. brasiliensis* (Yamauchi *et al.*, 2006) to larger worms such as *H. diminuta* (Webb *et al.*, 2007), and it is routinely mediated by cytokines produced by the Th2 subset of CD4+ T cells. Furthermore, changes in the saccharide composition of mucin glycans have also been reported to influence the evolution of these intestinal infections (Ishikawa *et al.*, 1993; Ishikawa, 1994; Tsubokawa *et al.*, 2009; Hasnain *et al.*, 2011a). Evidences of changes in mucus production during *E. caproni* infections were not detected in the differential proteomic analysis neither in the high- nor in the low-compatible host. This is not rare, however, since among IEC mucus-producing cells represent a minority population in comparison with absorptive enterocytes. Indeed, goblet cell hyperplasia has been previously reported in both *E. caproni*-infected mice and rats (Toledo *et al.*, 2006b; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Trelis *et al.*, 2011). Moreover, as IL-13 is known to mediate augmented mucus production and release, it has been suggested that this would be a potential effector mechanism for worm rejection in *E. caproni*-infected rats (Trelis *et al.*, 2011). With the aim of ascertaining the role of intestinal mucins

in regulating the course of the *E. caproni* infection in high- and low-compatible hosts and assessing their ability to influence the outcome of the infection, qualitative and quantitative changes in the intestinal mucus were investigated in *E. caproni*-infected mice (ICR) and rats.

Mucin glycosylation plays an important role in the barrier properties of mucus gel, contributing to its hydration and providing a framework that allows the retention of antibodies and other host defense molecules as well as the entrapment of worms and their derived molecules. Moreover, cell surface mucins provide a physical barrier and are involved in intracellular signaling events (Singh & Hollingsworth, 2006; Thornton *et al.*, 2008). Qualitative changes in the glycosylation patterns of terminal chains on mucins may alter the viscosity and permeability of the intestinal mucus. These biochemical modifications of mucus properties may be accompanied by an increase in mucus production and/or secretion and, altogether, facilitate worm trapping and impair parasite motility and feeding capacity leading to its ultimate expulsion from the intestinal lumen (Carlisle *et al.*, 1991; Webb *et al.*, 2007; Thornton *et al.*, 2008). In order to characterize this sort of changes in the context of *E. caproni* infections, the specific staining of brush border (transmembrane mucins), goblet cells (mucus-producing cells) and extracellular mucus (gel-forming mucins) was investigated in each host species by using a panel of five lectins with different sugar specificity. The results showed altered glycosylation patterns in the intestine of *E. caproni*-infected ICR mice and rats. In both host species, enhanced expression of N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) and N-acetyl-galactosamine (GalNAc) residues were detected in the glycocalyx of IEC, goblet cells vesicles and extracellular mucus, suggesting these are not crucial modifications for the different development of the infection observed in each host species, at least in primary infections. This result contrasts to previously published studies according to which elevated levels of GlcNAc and GalNAc residues induced by primary infection prevented heterologous or superimposed infection with *E. caproni*. In C3H mice, the expulsion of the related echinostome species *E. trivolvis* was associated with goblet cell hyperplasia together with strong expression of GalNAc and  $\alpha$ -L-Fucose (Fuc) residues on the surface of the intestinal villi and GalNAc,  $\alpha$ -L-Fuc and

GlcNAc in the goblet cells content. Moreover, it was suggested that these changes might mediate the rapid expulsion of *E. caproni* in a heterologous secondary infection (Fujino & Fried, 1993b; Fujino *et al.*, 1996b, c).

One of the most striking differences observed between mice and rats was related to the staining kinetics with SNA lectin, which binds  $\alpha$ -2,6-sialic acid. Whereas the intensity of the staining was slight during the complete experiment in mice, a marked decrease in the signal intensity was observed at 2 wpi in rats, though the staining level was recovered at 4 wpi. Although it was transient, this alteration may affect the rheological properties of the mucus barrier at early infection in rats. Sialic acids occupying terminal positions on mucus glycoproteins have been seen to elevate the viscosity of mucus, and desylation of mucins may lead to the degradation of mucus matrix (Yusuf *et al.*, 2005). Thus, mucins with abundant sialic acid residues may trap the intestinal worms and induce their expulsion (Soga *et al.*, 2008; Tsubokawa *et al.*, 2009). Given such a context, the decrease of SNA staining observed in the ileum of *E. caproni*-infected rats at 2 wpi might be induced by the parasites themselves in an attempt to facilitate their establishment in a hostile environment with goblet cell hyperplasia and a Th2/Th17 immune profile.

As regards quantitative alterations, our results indicate that *E. caproni* infection affects the production of intestinal mucins in a different manner in mice and rats, although the way in which these changes influence the evolution of the infection is not as evident as in other animal models of intestinal helminth infections. Increased mucin expression and mucus production have been often associated with the development of Th2-type responses and the expulsion of intestinal helminths (Carlisle *et al.*, 1991; Yamauchi *et al.*, 2006; Webb *et al.*, 2007; Hasnain *et al.*, 2011a, b). Strikingly, our results indicate that the development of chronic infections in mice is associated with the up-regulation of several mucin genes, whereas the early expulsion of worms in rats occurs concomitantly with low levels of mucins expression. mRNA expression of most of the mucins analyzed were found to be down-regulated in the ileum of infected rats (i.e. Muc1, Muc2, Muc5ac, Muc13, Muc16 and Muc 20), whereas the remainder ones (i.e. Muc3, Muc, 4 and Muc15) were

unaltered. This indicates that in the low-compatible host *E. caproni* infection alters mucin expression as described for other infectious agents. It has been shown that intestinal pathogens may develop mechanisms to modulate the mucus barrier to make their survival possible (Sheng *et al.*, 2012). For instance, several studies have revealed that *H. pylori* down-regulates the expression of several mucins to enhance the chronicity of the infection (Byrd *et al.*, 2000; Slomiany & Slomiany, 2006; Kang *et al.*, 2008;). Thus, the reduced expression of mucins in the intestine of rats could be a mechanism induced by the parasites themselves in response to the adverse environment generated in the ileum of this host species against the infection. In contrast to quantitative PCR (qPCR) results, mucin immunohistochemistry did not show a concomitant decrease in Muc2 production and secretion at the site of infection. This lack of correlation is not unusual since several biological factors may influence the mRNA-protein correspondence. Furthermore, methodological constraints also play a role when comparing mRNA to protein levels and, in this sense, qPCR is much more sensitive than tissue localization of proteins by immunohistochemistry (Maier *et al.*, 2009). Moreover, although from 2 wpi most of genes were found to be down-regulated this does not necessarily trigger immediate consequences. Navabi *et al.* (2013) showed that a decrease in mucin expression in *H. pylori* infections resulted in a delayed reduction in mucin synthesis and secretion.

In highly compatible hosts, *E. caproni* infection induced an enhanced expression of Muc2 and Muc4 together with increased levels of Muc1 and Muc16 at 2 wpi. Moreover, enhanced production and secretion of Muc2 along with an increase in glycocalyx thickness at 6 wpi was confirmed by immunohistochemistry. These alterations, however, do not serve to protect the host from intestinal infection. As described above, *E. caproni* infection in ICR mice is characterized by elevated levels of IFN- $\gamma$  and iNOS expression at the site of infection. Although infection-induced mucin overexpression is linked to Th2-type immune responses, pro-inflammatory cytokines and inflammatory mediators can also induce mucin synthesis and secretion. Thus, the type of response that occurs in mice may well explain the increase in mucus production seen in this host. Our results agree with previous reports, which demonstrate that IFN- $\gamma$  and NO can up-regulate the expression of several

mucin genes. In pancreatic cancer cells, it has been established that IFN- $\gamma$  induces the expression of Muc4 by the up-regulation of STAT1 (Andrianifahanana *et al.*, 2007). Furthermore, Lee *et al.* (2010) showed that in HT29 human intestinal epithelial cells the expression of Muc2, Muc3 and Muc4 was augmented after stimulation with *Gymnophalloides seoi* or *N. brasiliensis* antigens, and it was significantly enhanced after co-stimulation with human IFN- $\gamma$ . Similarly, Schreiber *et al.* (2013) demonstrated that iNOS-derived NO is important not only in baseline mucus secretion, but is responsible for the increase in mucus thickness after dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in rats. NO from iNOS also plays a protective role on the gastric epithelium by inducing the production of gel-forming mucins (Muc5 and Muc6) after different insults (Nam *et al.*, 2005; Phillipson *et al.*, 2008). According to this, IFN- $\gamma$  and NO appear to be crucial mediators in regulating the expression of mucins in *E. caproni*-infected ICR mice. However, the fact that Muc2 and Muc4 expression profiles are similar to those seen in BALB/c and IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice is a somewhat controversial issue. Notwithstanding, increases in the expression of mucin genes in the absence of stimulatory IFN- $\gamma$  and iNOS-derived NO indicate the existence of alternative regulatory mechanisms, suggesting that other tissue-damage mediators may be involved in controlling mucin production after intestinal infection.

The case of Muc5ac, a gel-forming mucin which is not normally expressed in the intestinal epithelium, deserves special attention as it has been shown that intestinal nematode infections may induce its *de novo* expression in a process mediated by IL-13 (Kringle *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2010; Hasnain *et al.*, 2011a). The expression of this mucin was undetected in the ileum of control mice, though *de novo* expression of Muc5ac occurred after infection with *E. caproni*. Although the expression of this mucin could not be evidenced at protein level by immunohistochemistry, the qPCR result has a particular interest since up-regulation of Muc5ac was detected in an IFN- $\gamma$ -rich environment. In contrast, elevated levels of IL-13 in rats correlated with down-regulation of Muc5ac, indicating that other mechanisms operate in the regulation of the Muc5ac expression during *E. caproni* infections. Nevertheless, our results also indicate that Muc5ac is not



involved in the expulsion of *E. caproni*. Muc5ac was considered as a crucial part of the IL-13-mediated immune response serving as a critical protective mediator during intestinal nematode infection (Hasnain *et al.*, 2011a). Conversely, although the rejection of *E. caproni* adult worms seems to be mediated by IL-13, other effector mechanisms not related to the expression of Muc5ac appear to be of greater importance, for instance the aforementioned IEC turnover and intestinal tissue regeneration.

Beyond the regulatory mechanisms of mucin expression, the most intriguing find is the fact that augmented mucin expression and mucus production after *E. caproni* infection in ICR mice was not associated with protection against the infection. The defensive nature of mucins lies in their ability to entrap pathogenic organisms. However, they may also represent a source of nutrients or act as ligands for binding sites on the pathogen surfaces (Deplancke & Gaskins, 2001). Furthermore, a number of pathogens are able to produce enzymes that degrade the mucus matrix (Moncada *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003). Thus, increases in mucus production and secretion not always prevent infection. Although we cannot presently determine the cause of this feature, our preliminary studies on cysteine peptidases of *E. caproni* suggest that these enzymes may play a role in the parasite resistance to this effector mechanism.

Cathepsins are a type of papain-like peptidases that are used by helminth parasites in essential aspects of their relationship with the definitive host. For instance, cathepsins facilitate skin and intestine penetration, tissue migration, feeding capacity and suppression of host immune effector cell functions (Sajid & McKerrow, 2002; Dalton *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2008a). Much of the available knowledge on cathepsin cysteine proteases of infectious helminths comes from studies on trematode species such as *Schistosoma* spp., liver flukes of the genus *Clonorchis* and *Opisthorchis*, *Paragonimus* spp. and *F. hepatica* (Park *et al.*, 2001; Na *et al.*, 2008; Dovorák *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2008b). All these helminth species have tissue phases in their definitive hosts. In contrast, *Echinostoma* spp. and other intestinal-dwelling trematodes are parasites with no tissue

phases in the definitive host and this may be one of the main reasons that justifies the lack of studies on cathepsins in this group of trematodes.

Immunohistochemical staining evidenced the presence of cathepsin L in the gut and the tegument of *E. caproni* adult worms. This pattern is in agreement with previous studies showing that helminth cysteine proteases are predominantly located at sites with rapid protein degradation and synthesis, such as cells lining the gut lumen or the surface layers (Fairweather *et al.*, 1999;). Moreover, the presence of active cathepsin proteases was detected in the ESP of *E. caproni* adult worms by enzymatic assays, blotting with DCG-04 and western blot with heterologous antibodies. Cathepsin proteases are commonly found among the molecules secreted by helminth parasites (Curwen *et al.*, 2006; Dalton *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2008b). In the large intestine, the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* secretes cathepsin proteases that are able to cleave the non-glycosylated ends of Muc2 and degrade the polymeric structure of extracellular mucus, enabling the invasion of colonic epithelium by the amoeba (Moncada *et al.* 2003; Lidell *et al.*, 2006). In this context, we hypothesized that the ability of *E. caproni* to remain in the ileum of infected mice, in spite of the augmented production of mucus, may be associated with its ability to release cysteine peptidases that degrade the polymeric mucus matrix around the parasite and render the structure useless for effective worm trapping and rejection. Although this hypothesis needs to be confirmed by experimental evidence, it is supported by the fact that the protein domain peptidase C1A, papain is found among the ten most represented protein domains in putative proteins annotated in the transcriptome analysis of the *E. caproni* adult stage (Garg *et al.*, 2013). This suggests a key role of papain-like peptidases in the biology of the parasite and its relation with the definitive host. Thus, cathepsins may play a major role in the determination of the outcome of *E. caproni* infections and new studies, currently in course, will help to clarify this issue.

Apart from the study of the factors that determine the outcome and the pathology of the intestinal helminth infections using the *E. caproni*-rodent model, an

observation in our laboratory gave us the opportunity to research further into the factors determining the resistance to these infections. In routine infections made in our laboratory, we detected that Wistar rats that were previously infected with *S. muris*, were completely refractory to superimposed infections with *E. caproni*. From this observation, a series of experiments was designed to gain a better knowledge of the factors responsible for this resistance.

Although the vast majority of laboratory studies normally consider infections as isolated events, in nature, the concurrence of several infectious agents in the same individual is common. In the case of parasites, the co-occurrence of two or more species in the same host (polyparasitism) is well known in medicine, veterinary and zoology (Fleming *et al.*, 2006; Ellis *et al.*, 2007; Matthys *et al.*, 2011; Yakob *et al.*, 2013; Gibson *et al.*, 2014; Gorsich *et al.*, 2014; Thumbi *et al.*, 2014). In this context, the interaction between helminth species has aroused special concern. The case presented herein has a particular interest for several reasons: (I) *E. caproni* and *S. muris* are phylogenetically distant species; (II) each one inhabits a separate niche inside the host (small vs. large intestine); and (III) *S. muris* infection not only reduce the infection rate with *E. caproni* but render the host totally resistant to superimposed trematode infection after a few weeks post primary infection (wppi). Apart from being a suitable experimental model for the study of parasitic co-infections in the laboratory, the analysis of this interaction has allowed us to go in depth into the knowledge of factors determining the expulsion of intestinal helminths. Moreover, *S. muris* is a ubiquitous nematode that commonly affects colonies of laboratory animals, so this study also evidences how subclinical pinworm infections may interfere in nonrelated experiments.

Our study has demonstrated that the response generated against *S. muris* in rats is not limited to the immediate site of infection, but extends to other locations reaching at least the ileum. Furthermore, it has been shown that this distant response is able to regulate other helminth infections, even generating resistance just as in the case of *E. caproni* in the small intestine. This resistance appeared as early as 1 wppi with *S. muris*,

manifested in a reduction of *E. caproni* worm recovery rate. This resistance becomes complete from 3 wppi until the end of the experiment at 4 wppi. Although other mechanisms of regulation cannot be excluded, the fact that each interacting species occupies a different microhabitat inside the host, together with patent alterations in the ileum of *S. muris*-infected rats, suggests a strong likelihood that resistance mainly relies on the immune response generated against *S. muris* infection. In fact, it was observed that resistance is associated with a significant mucosal antibody response and changes in the glycosylation status of ileal mucins, which correlates with significant Th17 responses in the ileum of primary infected rats (Trelis *et al.*, 2013).

Although it is well known that infections with gastrointestinal nematodes, including members of the genus *Syphacia*, are characterized by the initiation of immunomodulatory responses (Maizels *et al.*, 2004; Michels *et al.*, 2006), the immune responses generated by *Syphacia* spp. have been little studied. In mice, the related species *S. obvelata* induces a transient Th2-type response, leading to a dominant type 2 cytokine up-regulation with elevated expression of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- $\gamma$  in the spleen and MLNs (Michels *et al.*, 2006). Furthermore, high levels of IgG, mainly IgG1, IgA and IgM have been found in the sera of *S. obvelata*-infected mice (Sato, 1993; Sato *et al.*, 1995; Michels *et al.*, 2006; Perec & Okulewicz, 2006). Our results regarding the cytokine expression profile in spleen and MLNs are consistent with those reported in *S. obvelata*-infected mice. Moreover, significant Th17 responses, characterized by the up-regulation of IL-17A and IL-23 in MLNs, were also observed in rats infected with *S. muris*. Conversely, the presence of specific antibodies against *S. muris* antigens was not detected in the sera of infected rats.

Because *E. caproni* inhabits the ileum of its definitive hosts without invading other tissues, the alterations induced by *S. muris* infection at this level were analyzed in detail. Although *S. muris* adult worms are confined to the caecum and colon, our results prove that the mucosal response is not limited to the immediate site of infection. This finding is not rare but the dissemination of mucosal responses throughout the intestine has been previously demonstrated after multiple challenge infections with gastrointestinal

nematodes (Bendixen *et al.*, 1995). More recently, Menzies *et al.* (2010) detected differential expression of oxidant-, antioxidant- and mucus-related genes in different areas of the gut after primary challenge with *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. Furthermore, Su *et al.* (2011) found that *H. polygyrus*, which resides in the duodenum, produces a significant increase in colonic epithelial permeability.

Several alterations that have been commonly associated with the expulsion and/or resistance to gastrointestinal helminths were analyzed in the ileum of *S. muris*-infected rats. Local cell population responses do not appear to be involved in the development of resistance against superimposed infections with *E. caproni*. Mastocytosis, eosinophilia, neutrophilia and goblet cell hyperplasia are characteristic features in infections with gastrointestinal helminths (Khan & Collins, 2004; Artis, 2006; Toledo *et al.*, 2006a). However, this study showed that *S. muris* infection does not elicit significant changes in the counts of these cell populations in the ileum of rats. On a separate issue, the limited role of intestinal mucus overproduction in the resolution of *E. caproni* infections has been discussed in depth above (Cortés *et al.*, 2015). At this point, it is worth emphasizing that the results obtained in the context of the interaction between *S. muris* and *E. caproni* support this observation. In this case, resistance to superimposed *E. caproni* infection is achieved in the absence of goblet cell hyperplasia or the up-regulation of either secreted (Muc2 and Muc5ac) or membrane-bound mucins (Muc1, Muc3a, Muc4, Muc13, Muc15, Muc16, Muc20) in the ileum of rats primary infected with *S. muris*.

The main alterations observed in the ileum of *S. muris*-infected rats, which may be involved in the development of resistance to *E. caproni* were: (I) changes in the glycosylation of ileal mucins; (II) development of a biased Th17/Th2 immune response; and (III) local antibody responses with elevated levels of mucosal IgA, IgE, IgG, IgG1 and IgG2a that cross-reacted with *E. caproni* antigens.

The glycosylation status of terminal chains on mucins may have an important role in the establishment and or rejection of intestinal helminths, even in the absence of goblet cell hyperplasia or the up-regulation of mucin expression (Ishikawa, 1994; Maruyama *et*

*al.*, 2002; Yamauchi *et al.*, 2006). As mentioned above, the glycosylation pattern is essential to determine the barrier properties of the mucus gel and participates in a number of processes such as hydration of mucus, retention of antibodies or entrapment of worms and their derived products to facilitate parasite expulsion (Singh & Hollingsworth, 2006; Thornton *et al.*, 2008). Although we have previously shown that qualitative changes on mucin glycans do not seem to be critical for the outcome of *E. caproni* infections in hosts of different compatibility, prior studies had shown that mucins and their glycosylation patterns were important for the expulsion of *Echinostoma* spp. from rodents. Fujino & Fried (1993b) showed that both *E. caproni* and *E. trivolvis* alter the lectin binding patterns in the ileal mucosa of CH3 mice. The expulsion of *E. trivolvis* in this host was associated with goblet cell hyperplasia and strong expression of Fuc, GalNAc and GlcNAc residues. Moreover, these changes were associated with the rapid expulsion of *E. caproni* in secondary infections. These results are partially consistent with those observed in the ileum of resistant rats. After *S. muris* infection, the staining of the ileal mucosa with DBA and WGA lectins became more intense, coinciding with the refractory status to *E. caproni* infection. A marked decrease in UEA-I binding was also observed, suggesting that *S. muris* infection induces a replacement of Fuc with GlcNAc residues. These findings suggest that, though they do not seem to be relevant for the evolution of *E. caproni* single infections, the changes on the glycosylation status of intestinal mucins may play a significant role in regulating the establishment of the parasite in secondary infections.

At the beginning of this chapter, the importance of the immune response in regulating the course of *E. caproni* infection in high- and low-compatible hosts has been highlighted. Previous studies have shown that the generation of local Th2-type responses, with up-regulation of IL-5, IL-6 and IL-13 at the site of the infection mediate the early rejection of *E. caproni* adults (Trelis *et al.*, 2011). Moreover, it has been shown herein that in rats the expansion of the local Th2 lineage is associated with the expansion of the Th17 lineage at the expense of Th1, whereas the up-regulation of TGF- $\beta$  together with IL-10 suggests an important role for the Treg subset in this response (Sotillo *et al.*, 2011). In this context, the IL-13 appears to be an essential mediator because of its ability to bind the IL-

4R and activate STAT6 signaling, initiating diverse effector mechanisms that may lead to the worm rejection. Our results indicate that primary infections with *S. muris* induce a similar cytokine profile in the ileum of rats, with a predominance of Th17 responses. Elevated levels of IL-6, TGF- $\beta$ , IL-17A and IL-23 were detected as early as 1 wppi. As discussed above, Th17 responses may facilitate the expulsion of *E. caproni* adult worms through an increase in the intestinal contractility, as has been demonstrated in other intestinal helminth models (Fu *et al.*, 2009). Up-regulation of IL-13 expression was not seen in the ileum of *S. muris*-infected rats, though a rapid but transient increase in the mRNA levels of IL-4 was detected at 1 and 2 wppi. Although this increment was transitory, it may well contribute to generate an environment responsible for the refractory status seen in these rats. Indeed, it has been shown that both IL-4 and IL-13 can activate epithelial cells to induce the up-regulation of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases and N-acetylglucosaminyltransferase and, consequently, the incorporation of GalNAc and GlcNAc residues on mucin glycans (Beum *et al.*, 2005; Kanoh *et al.*, 2008), which is in agreement with the changes seen on mucin glycosylation.

The third alteration observed after primary *S. muris* infection in rats, which may play an important role in the resistance to superimposed *E. caproni* infection, consists in the development of intense local antibody responses. A central role for antibodies in providing protective immunity has been recently identified in secondary infections with *H. polygyrus* (McCoy *et al.*, 2008; Wojciechowski *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Whereas primary infections in mice induce alterations in jejunal physiology, including IL-4 and IL-13-mediated changes on the function of epithelial and smooth muscle cells (Shea-Donohue *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003), in subsequent infections the development of sexually mature worms is impaired and these are rapidly rejected (Morimoto *et al.*, 2004). In the last mentioned study, it was demonstrated that protective immunity was entirely dependent on the antibodies, mainly IgA and IgG1, which arose from previous *H. polygyrus* infections and affected larvae migration and development during the tissue-dwelling phase (McCoy *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010). Although it is well known that antibodies have little or no impact on the clearance of primary *E. caproni* infections (Toledo *et al.*, 2006a;

Sotillo *et al.*, 2007; Toledo, 2009a;), the mechanism necessary for the generation of resistance in superimposed infections differs from that required for the expulsion of luminal-dwelling adult worms. Unlike what occurs in single infections, in the co-infection experiments the antibody-mediated immunity is targeted against juvenile worms immediately after metacercariae excystation. It was seen that *S. muris* infection in rats induces rapid antigen-specific responses, leading to elevated levels of IgA, IgM, IgE, total IgG, IgG1 and IgG2a in the ileal mucosa. Furthermore, a high degree of cross-reactivity with *E. caproni* antigens was found for all these immunoglobulin classes except for IgM, suggesting that they may be involved in the resistance against *E. caproni*.

Antigenic cross-reactivity among helminth parasites and its ability to induce protective immunity is a well known issue. Iglesias *et al.* (1996) showed high cross-reactivity between the sera of mice either infected or immunized with *Anisakis simplex* antigens and different protein extracts from related ascaroid nematodes such as *A. suum*, *Toxocara canis* and *Hysterothylacium aduncum*. These sera, however, failed to recognize the antigens from non ascaroid worms *T. muris* and *T. spiralis*. Similarly, Rodríguez *et al.* (2006) observed reactivity against a recombinant enolase from *A. simplex* in the sera from mice immunized with crude extracts from *A. suum* and *T. canis*, but not with *H. aduncum*, *T. muris* or *T. spiralis* antigens. Recently, a monoclonal antibody against hemoglobin of *Anisakis pegreffii* has been shown to cross-react with *Ascaris lumbricoides* and *N. brasiliensis* antigens. Moreover, passive immunization of mice with this antibody prior to infection induces protective immunity against *N. brasiliensis*, leading to a significant reduction in worm burdens (Nieuwenhuizen *et al.*, 2013). Cross-reaction is also a common feature among trematodes. A monoclonal antibody against an immunoreactive somatic antigen from *Metagonimus yokogawai* recognizes antigens of various trematodes including *G. seoi*, *Paragonimus westermani*, *Clonorchis sinensis* and *F. hepatica* (Han *et al.*, 2014). Tandler *et al.* (1996) demonstrated that a recombinant form of the *S. mansoni* antigen rSm14 protected outbred mice against challenge with *S. mansoni* cercariae (67% of protection) and provide complete protection against challenge with *F. hepatica*



metacercariae, appearing as a suitable candidate to the development of anti-helminth vaccines (Almeida *et al.*, 2003; García *et al.*, 2008; Espíndola *et al.*, 2014).

Herein, high cross-reactivity between *S. muris*-specific mucosal antibodies and *E. caproni* whole worm extracts has been evidenced. Furthermore, the comparison of proteomic data has revealed significant similarities. Most of previously identified *E. caproni*-immunoreactive proteins were found in the proteome of *S. muris* (Sotillo *et al.*, 2012). These are, for the most part, highly conserved proteins displaying high percentages of sequence homology between nematodes and trematodes [e.g. enolase, actin or heat shock protein (HSP)-70]. Enolase is the most antigenic protein in the ESP of *E. caproni* (Sotillo *et al.*, 2008) and it has been shown to be secreted and present on the external surface of several trematode species including *E. friedi* (Bernal *et al.*, 2006), *F. hepatica* (Bernal *et al.*, 2004; Morales & Espino, 2012), *S. bovis* (Pérez-Sánchez *et al.*, 2006; Ramajo-Hernández *et al.*, 2007; de la Torre-Escudero *et al.*, 2010) and *C. sinensis* (Wang *et al.*, 2014). This enzyme has the ability to bind and activate host plasminogen, hence inducing plasminogen-mediated proteolysis, which may be important in the degradation of the ECM in host tissues (Bergmann *et al.*, 2001; Mölkänen *et al.*, 2002; Jolodar *et al.*, 2003; Ramajo-Hernández *et al.*, 2007). The ability of *E. caproni* enolase to bind plasminogen has been demonstrated *in vitro*, indicating that it may be of great importance for the attachment of worms to the host intestinal mucosa (Marcilla *et al.*, 2007). Furthermore, early responses are generated against actin and HSP-70 in *E. caproni*-infected mice suggesting they are exposed early to the host and may be of importance in the parasite establishment (Sotillo *et al.*, 2008). Actin is early expressed as it forms part of the spines of the collar and surface of echinostomes (Fujino *et al.*, 1994; Sohn *et al.*, 2002). Moreover, in both *E. caproni* and the related species *E. friedi* an increased amount of actin has been correlated with the early expulsion in rats (Bernal *et al.*, 2006; Sotillo *et al.*, 2010). HSP-70 is a parasite stress protein that is regarded to play an important role in the survival strategy by modulating host immune response and has been proposed to be involved in the establishment of *E. caproni* chronic infections by favoring local inflammatory responses (Bernal *et al.*, 2006; Toledo *et al.*, 2006a; Higón *et al.*, 2008).

Altogether, these results suggest that specific mucosal antibodies against *S. muris* are likely to recognize *E. caproni* antigens on highly evolutionarily conserved proteins. Since these proteins have been shown to be crucial for the establishment of *E. caproni* infections, the heterologous antibodies may affect juvenile worms preventing their development, attachment and/or establishment in the ileum of *S. muris*-infected rats, ultimately facilitating their early expulsion. The findings derived from the study of the negative interaction between *S. muris* and *E. caproni* have contributed to the comprehension of the mechanisms involved in the generation of protective immunity against secondary helminth infections. However, the development of new studies based on multiple challenge infections are crucial to determine if local antibody responses are enough to induce resistance against both superimposed and secondary infections or, in contrast, appropriate T CD4+-mediated responses are required to achieve complete host protection. Furthermore, we have shown that the response elicited by *S. muris* in rats is not limited to the immediate site of infection and this distant response is able to regulate and even generate resistance against other helminths, such as *E. caproni*. These features are of particular interest considering that *S. muris* is a common parasite of laboratory rodents and its presence may compromise the outcome of unrelated experiments.

In summary, we have analyzed the ileal changes that occur in the early infection with the intestinal trematode *E. caproni* in hosts of high and low compatibility to obtain further insight into the factors responsible for the pathogenesis and the aspects that determine the rejection of the intestinal helminths or, in contrast, the establishment of chronic infections. Our results indicate that the pathology induced by *E. caproni* and the outcome of the infection depend on a variety of interrelated factors. According to our results, the most relevant features are:

- 1.-** IL-13 appears to direct the main mechanisms responsible for worm expulsion in rats, in a process mediated by an accelerated epithelial cell turnover and the regeneration of the intestinal epithelium.

2.- Other effector mechanisms such as alterations in IEC function and IL-17A-mediated enhanced intestinal contractility may contribute to worm rejection in this host, whereas mucus overproduction does not appear to be an effective mechanism against *E. caproni* infections.

3.- A novel and intriguing interplay between IFN- $\gamma$ , NO and pathogenic processes in intestinal helminth infections has been suggested. Although these inflammatory mediators do not seem to be essential for the establishment of long-lasting infections, they play important tissue-protective roles such as the control of intestinal homeostatic dysregulation.

4.- Our results indicate that *E. caproni* chronic infection generates an environment characterized by chronic inflammation and wound healing, which are key events for cancer development. This indicates that the *E. caproni*-mouse system may be an appropriate model for the study of helminth-induced malignancies.

Finally, we have analyzed the interactions between *S. muris* and *E. caproni* in co-infected rats. The results indicate that primary infections with *S. muris* induce intestinal changes that prevent superimposed infections with *E. caproni*. We have shown that some effector mechanisms such as the local antibody responses or the changes in mucin glycosylation, which are not useful for the control of *E. caproni* primary infections, may play an important role in the resistance against juvenile *E. caproni* worms hence indicating that resistance against secondary infections with *E. caproni* is feasible.



# Conclusions

---

*Conclusiones*



## 1

---

*E. caproni*-infected rats develop significant Th17 responses, which appear to be important for the regulation of the immune response against the parasite, since they may facilitate the concomitant development of Th2-type responses that are essential for worm expulsion. Moreover, Th17 responses may play a protective role against infection-induced tissue inflammation and aid parasite rejection through an increase in the intestinal contractility.

*Las ratas infectadas con E. caproni desarrollan respuestas significativas de tipo Th17, las cuales parecen ser importantes para la regulación de la respuesta inmunitaria generada frente al parásito, ya que pueden facilitar el desarrollo de respuestas concomitantes de tipo Th2, que son esenciales para la expulsión de los vermes. Asimismo, las respuestas Th17 pueden desempeñar un papel protector frente a la inflamación tisular inducida por la infección y contribuir a la eliminación del parásito a través del aumento de la contractilidad intestinal.*

## 2

---

The characterization of several infection parameters in different mouse strains indicates that the severity of the intestinal disease induced by *E. caproni* infection in high-compatible hosts is dependent upon the ability of the host to express IFN- $\gamma$  and iNOS. This fact suggests that development of inflammatory responses in helminth infections is not necessarily associated with the most severe forms of disease. Apart from the induction of inflammatory responses, IFN- $\gamma$  and iNOS appear to play a major role in the control of the pathological manifestations, playing a dichotomous role in the course of *E. caproni* infections.

*La caracterización de varios parámetros de infección en diferentes cepas de ratón indica que la severidad de la enfermedad intestinal inducida por la infección con E. caproni en hospedadores de alta compatibilidad depende de la capacidad del*

*hospedador para expresar IFN- $\gamma$  e iNOS. Este hecho sugiere que el desarrollo de respuestas inflamatorias en infecciones causadas por helmintos no está asociado necesariamente con las formas más severas de la enfermedad. Aparte de la inducción de respuestas inflamatorias, IFN- $\gamma$  e iNOS parecen jugar un papel importante en el control de las manifestaciones patológicas, desempeñando un papel dicotómico en el curso de las infecciones con E. caproni.*

### 3

---

*E. caproni* infection induces an early and marked remodeling on the protein expression pattern of intestinal epithelial cells in mice, primarily promoting the restoration of the intestinal epithelium and the control of homeostatic dysregulation. Wound-healing and crypt-cell proliferation are constitutively active processes from the early stages of the infection, concomitantly with the inducement of mitochondrial dysfunction and cellular senescence and the activation of other pro-apoptotic events. Augmented programmed cell death appears to be essential to control the level of homeostatic dysregulation and eliminate potentially malignant damaged cells.

*La infección con E. caproni induce una remodelación temprana y profunda en el patrón de expresión proteica de las células epiteliales intestinales de ratón, promoviendo principalmente la restauración del epitelio intestinal y el control de la desregulación homeostática. La cicatrización de heridas y la proliferación de celular son procesos constitutivamente activos desde fases tempranas de la infección, junto con la inducción de disfunción mitocondrial y senescencia celular y la activación de otros eventos proapoptóticos. El aumento de la muerte celular programada parece esencial para controlar el nivel de desregulación homeostática y eliminar células dañadas potencialmente malignas.*

### 4

---

The effects of *E. caproni* infection on the intestinal epithelial cells of rats are low in comparison with mice, mainly affecting the expression of proteins related with the



cytoskeleton and the maintenance of the functional integrity of the epithelial barrier. Changes on the absorptive/secretory function of enterocytes and, especially, an increased regenerative capacity of the intestinal epithelium appear as potentially IL-13-mediated effector mechanisms involved in the early rejection of worms in this host. A strict control of proliferation and programmed cell death appears to be essential to maintain the intestinal homeostasis and protect the host against the injurious effects of the infection.

*Los efectos de E. caproni sobre las células epiteliales intestinales de ratas son someros en comparación con lo que sucede en ratón, afectando principalmente a la expresión de proteínas relacionadas con el citoesqueleto y el mantenimiento de la integridad funcional de la barrera epitelial. Cambios en la función absorptiva/secretora de los enterocitos y, fundamentalmente, un aumento en la capacidad regenerativa del epitelio intestinal se presentan como mecanismos efectores, potencialmente mediados por IL-13, implicados en la expulsión temprana de los adultos en este hospedador. Un estricto control de los procesos de proliferación y muerte celular programada parece esencial para garantizar el mantenimiento de la homeostasis intestinal y proteger al hospedador de los efectos perjudiciales de la infección.*

## 5

---

The cellular energy metabolism becomes differentially modified in the ileum of *E. caproni*-infected mice and rats as can be inferred from proteomic data. Whereas in mice the intestinal infection induces mitochondrial dysfunction and an increase in the anaerobic use of glucose to yield ATP, in rats the transition to a more aerobic and oxidative metabolism is suggested, leading to a reduced glycolytic flux and overall ATP production. Although the impact that these alterations in energy metabolism have on the course of the intestinal infection is difficult to evaluate according to our current knowledge, it could be of relevance for a better comprehension of the mechanisms involved in the control of infections on mucosal surfaces.

*El metabolismo energético celular resulta modificado de manera diferente in el íleon de ratones y ratas infectados con E. caproni. Mientras que en los ratones la infección intestinal induce disfunción mitocondrial y un aumento en el uso anaeróbico de la glucosa para la producción de ATP, en ratas se ha sugerido la transición a un metabolismo más aerobio y oxidativo, con una reducción del flujo glicolítico y la producción total de ATP. Si bien el impacto que estas alteraciones en el metabolismo energético tienen sobre el curso de la infección intestinal es difícil de evaluar en base los conocimientos actuales, este hecho podría ser relevante para un mejor entendimiento de los mecanismos implicados en el control de las infecciones a nivel de las superficies mucosas.*

## 6

---

Accelerated epithelial cell turnover is an effector mechanism associated with worm rejection in *E. caproni* infected rats. Conversely, a slow rate of epithelial renewal and the resulting tissue hyperplasia favor the establishment of chronic infections in mice. Although the molecular mechanisms behind these findings are not fully understood, differential infection-induced alterations on the intestinal epithelial cell kinetics in low- and high-compatible hosts appear to play a major role in the outcome of *E. caproni* infections.

*El recambio epitelial acelerado es un mecanismo efector asociado a la expulsión de los adultos de E. caproni en ratas infectadas. En cambio, una tasa de renovación epitelial baja y la consiguiente hiperplasia tisular favorecen el establecimiento de infecciones crónicas en ratón. Si bien los mecanismos moleculares que se encuentran detrás de este hallazgo no son totalmente conocidos, las alteraciones diferenciales inducidas por la infección sobre la cinética de las células epiteliales intestinales en hospedadores de baja y alta compatibilidad parecen tener un papel importante en el resultado de las infecciones por E. caproni.*

## 7

---

*E. caproni* infection induces qualitative and quantitative changes in the intestinal mucus of infected high- and low-compatible hosts, though these alterations do not seem to be essential for the different evolution of the infection in each host species. The results obtained in the *E. caproni*-rodent model, however, indicate that in contrast to prevailing thoughts the resolution of intestinal helminth infections do not necessarily associate with augmented levels of mucus production.

*La infección con E. caproni induce cambios cualitativos y cuantitativos a nivel de la mucosidad intestinal en hospedadores de alta y baja compatibilidad, si bien estas alteraciones no parecen ser esenciales para la diferente evolución de la infección que tiene lugar en cada especie hospedadora. Los resultados obtenidos en el modelo E. caproni-roedor, sin embargo, indican que la resolución de las infecciones por helmintos intestinales no está necesariamente asociada a aumentos en la producción de moco intestinal.*

## 8

---

Preliminary studies suggest that the ability of *E. caproni* adult worms to release active cathepsin proteases in the ESP may disrupt the structure of extracellular mucus matrix, facilitating the development of chronic infections in mice, in spite of the enhanced mucus production and secretion.

*Estudios preliminares sugieren que la capacidad de los adultos de E. caproni de liberar catepsinas activas en sus ESP puede alterar la estructura de la matriz de moco extracelular, facilitando el desarrollo de infecciones crónicas en ratón a pesar de una producción y secreción de moco aumentadas.*

## 9

---

Primary infection with the nematode *S. muris* induces protective immunity against superimposed infection with the trematode *E. caproni* in experimentally infected Wistar

rats. Given that both helminth species inhabit different microhabitats inside the host, in all likelihood, this antagonistic interaction is mediated by the immune system of the host through: (I) induction of a host protective Th17/Th2 biased response and (II) cross-immunity based on the recognition of heterologous antigens.

*La infección primaria con el nematodo S. muris induce inmunidad protectora frente a la infección superpuesta con el trematodo E. caproni en ratas Wistar infectadas experimentalmente. Puesto que ambas especies parásitas se establecen en microhábitats diferentes dentro del hospedador, lo más probable es que esta interacción antagonista esté mediada por el sistema inmunitario a través de: (I) la inducción de una respuesta protectora polarizada a Th17/Th2; y (II) la existencia de inmunidad cruzada basada en el reconocimiento de antígenos heterólogos.*

**Referencias**

**Bibliográficas**

---



- Abuzzi A. & Fried B.** (2011). Coinfection of *Schistosoma* (Trematoda) with bacteria, protozoa and helminths. *Advances in Parasitology* **77**, 1-85.
- Adam T., Arpin M., Prevost M. C., Gounon P. & Sansonetti P. J.** (1995). Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *The Journal of Cell Biology* **129**, 367-381.
- Adamson M.** (1994). Evolutionary patterns in life histories of Oxyurida. *International Journal for Parasitology* **24**, 1167-1177.
- Adegnika A. A. & Kremsner P. G.** (2012). Epidemiology of malaria and helminth interaction: a review from 2001 to 2011. *Current Opinion in HIV and AIDS* **7**, 221-224.
- Adeva M., González-Lucan M., Seco M. & Donapetry C.** (2013). Enzymes involved in L-lactate metabolism in humans. *Mitochondrion* **13**, 615-629.
- Agger M. K., Simonsen P. E. & Vennervald B. J.** (1993). The antibody response in serum, intestinal wall and intestinal lumen of NMRI mice infected with *Echinostoma caproni*. *Journal of Helminthology* **67**, 169-178.
- Akdis C. A. & Akdis M.** (2009). Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **123**, 735-746.
- Akiho H., Blennerhassett P., Deng Y. & Collins S. M.** (2002). Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **282**, G226-232.
- Allen J. E. & Maizels R. M.** (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews. Immunology* **11**, 375-388.
- Almeida M. S., Torloni H., Lee-Ho P., Vilar M. M., Thaumaturgo N., Simpson A. J. & Tandler M.** (2003). Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. *Parasite Immunology* **25**, 135-137.

- Ameen N. A., Figueroa Y. & Salas P. J.** (2001). Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia. *Journal of Cell Science* **114**, 563-575.
- Andreassen J., Odaibo A. B. & Christensen N. O.** (1990). Concurrent infections of the trematode *Echinostoma caproni* and the tapeworms *Hymenolepis diminuta* and *Hymenolepis microstoma* in mice. *The Journal of Parasitology* **76**, 573-575.
- Andresen K., Simonsen P. E., Andersen B. J. & Birch-Andersen A.** (1989). *Echinostoma caproni* in mice: shedding of antigens from the surface of an intestinal trematode. *International Journal for Parasitology* **19**, 111-118.
- Andrianifahanana M., Singh A. P., Nemos C., Ponnusamy M. P., Moniaux N., Mehta P. P., Varshney G. C. & Batra S. K.** (2007). IFN-gamma-induced expression of MUC4 in pancreatic cancer cells is mediated by STAT-1 upregulation: a novel mechanism for IFN-gamma response. *Oncogene* **26**, 7251-7261.
- Anello M., Spampinato D., Piro S., Purrello F. & Rabuazzo A. M.** (2004). Glucosamine-induced alterations of mitochondrial function in pancreatic beta-cells: possible role of protein glycosylation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **287**, E602-608.
- Anthony R. M., Rutitzky L. I., Urban J. F., Jr, Stadecker M. J. & Gause W. C.** (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews. Immunology* **7**, 975-987.
- Arakaki N., Nagao T., Niki R., Toyofuku A., Tanaka H., Kuramoto Y., Emoto Y., Shibata H., Magota K. & Higuti T.** (2003). Possible role of cell surface H<sup>+</sup>-ATP synthase in the extracellular ATP synthesis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Molecular Cancer Research: MCR* **1**, 931-939.
- Arpin M., Friederich E., Algrain M., Vernel F. & Louvard D.** (1994). Functional differences between L- and T-plastin isoforms. *The Journal of Cell Biology* **127**, 1995-2008.
- Artis D.** (2006). New weapons in the war on worms: identification of putative mechanisms of immune-mediated expulsion of gastrointestinal nematodes. *International Journal for Parasitology* **36**, 723-733.



- Artis D. & Grecnis R. K.** (2008). The intestinal epithelium: sensors to effectors in nematode infection. *Mucosal Immunology* **1**, 252-264.
- Artis D., Potten C. S., Else K. J., Finkelman F. D. & Grecnis R. K.** (1999). *Trichuris muris*: host intestinal epithelial cell hyperproliferation during chronic infection is regulated by interferon-gamma. *Experimental Parasitology* **92**, 144-153.
- Artis D., Wang M. L., Keilbaugh S. A., He W., Brenes M., Swain G. P., Knight P. A., Donaldson D. D., Lazar M. A., Miller H. R., Schad G. A., Scott P. & Wu G. D.** (2004). RELMbeta/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13596-13600.
- Arul G. S., Moorghen M., Myerscough N., Alderson D. A., Spicer R. D. & Corfield A. P.** (2000). Mucin gene expression in Barrett's oesophagus: an *in situ* hybridisation and immunohistochemical study. *Gut* **47**, 753-761.
- Ataev G. L., Dobrovolskij A. A., Fournier A. & Jourdane J.** (1997). Migration and development of mother sporocysts of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae). *The Journal of Parasitology* **83**, 444-453.
- Athman R., Louvard D. & Robine S.** (2002). The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. III. How is villin involved in the actin cytoskeleton dynamics in intestinal cells? *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **283**, G496-502.
- Atshaves B. P., Martin G. G., Hostetler H. A., McIntosh A. L., Kier A. B. & Schroeder F.** (2010). Liver fatty acid-binding protein and obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **21**, 1015-1032.
- Audousset J. C., Rondelaud D., Dreyfuss G. & Vareille-Morel C.** (1989). Les émissions cercariennes de *Fasciola hepatica* L. chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller, a propos de quelques observations chronobiologiques. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* **7**, 217-224.
- Bae T. J., Kim M. S., Kim J. W., Kim B. W., Choo H. J., Lee J. W., Kim K. B., Lee C. S., Kim J. H., Chang S. Y., Kang C. Y., Lee S. W. & Ko Y. G.** (2004). Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface. *Proteomics* **4**, 3536-3548.

- Baker D. G.** (1998). Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clinical Microbiology Reviews* **11**, 231-266.
- Bao S., Beagley K. W., France M. P., Shen J. & Husband A. J.** (2000). Interferon-gamma plays a critical role in intestinal immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *Immunology* **99**, 464-472.
- Barlow S. C., Brown M. M. & Price H. V.** (2005). Eradication of *Syphacia muris* from food-restricted rats without environmental decontamination. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science/American Association for Laboratory Animal Science* **44**, 23-25.
- Barnes S. L., Vidrich A., Wang M. L., Wu G. D., Cominelli F., Rivera-Nieves J., Bamias G. & Cohn S. M.** (2007). Resistin-like molecule beta (RELMbeta/FIZZ2) is highly expressed in the ileum of SAMP1/YitFc mice and is associated with initiation of ileitis. *Journal of Immunology* **179**, 7012-7020.
- Basu R., Hatton R. D. & Weaver C. T.** (2013). The Th17 family: flexibility follows function. *Immunological Reviews* **252**, 89-103.
- Battles A. H., Adams S. W., Courtney C. H. & Mladinich C. R.** (1987). Efficacy of ivermectin against natural infection of *Syphacia muris* in rats. *Laboratory Animal Science* **37**, 791-792.
- Behnke J. M.** (2008). Structure in parasite component communities in wild rodents: predictability, stability, associations and interactions .... or pure randomness? *Parasitology* **135**, 751-766.
- Behnke J. M.** (1976). *Aspicularis tetraptera* in wild *Mus musculus*. Age resistance and acquired immunity. *Journal of Helminthology* **50**, 197-202.
- Behnke J. M.** (1975). *Aspicularis tetraptera* in wild *Mus musculus*. The prevalence of infection in male and female mice. *Journal of Helminthology* **49**, 85-90.
- Behnke J. M., Bajer A., Sinski E. & Wakelin D.** (2001). Interactions involving intestinal nematodes of rodents: experimental and field studies. *Parasitology* **122 Suppl**, S39-49.

- Bendixsen T., Emery D. L. & Jones W. O.** (1995). The sensitization of mucosal mast cells during infections with *Trichostrongylus colubriformis* or *Haemonchus contortus* in sheep. *International Journal for Parasitology* **25**, 741-748.
- Ben-Smith A., Wahid F. N., Lammas D. A. & Behnke J. M.** (1999). The relationship between circulating and intestinal *Heligmosomoides polygyrus*-specific IgG1 and IgA and resistance to primary infection. *Parasite Immunology* **21**, 383-395.
- Berasain P., Carmona C., Frangione B., Cazzulo J. J. & Goni F.** (2003). Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **130**, 23-29.
- Berasain P., Carmona C., Frangione B., Dalton J. P. & Goni F.** (2000). *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Experimental Parasitology* **94**, 99-110.
- 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.
- Bernal D., Carpena I., Espert A. M., De la Rubia J. E., Esteban J. G., Toledo R. & Marcilla A.** (2006). Identification of proteins in excretory/secretory extracts of *Echinostoma friedi* (Trematoda) from chronic and acute infections. *Proteomics* **6**, 2835-2843.
- 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.
- Bethony J., Brooker S., Albonico M., Geiger S. M., Loukas A., Diemert D. & Hotez P. J.** (2006). Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis and hookworm. *Lancet* **367**, 1521-1532.
- Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T. B., Oukka M., Weiner H. L. & Kuchroo V. K.** (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238.

- Betts C. J. & Else K. J.** (1999). Mast cells, eosinophils and antibody-mediated cellular cytotoxicity are not critical in resistance to *Trichuris muris*. *Parasite Immunology* **21**, 45-52.
- Beum P. V., Basma H., Bastola D. R. & Cheng P. W.** (2005). Mucin biosynthesis: upregulation of core 2 beta 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase by retinoic acid and Th2 cytokines in a human airway epithelial cell line. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **288**, L116-124.
- Bindseil E. & Christensen N. O.** (1984). Thymus-independent crypt hyperplasia and villous atrophy in the small intestine of mice infected with the trematode *Echinostoma revolutum*. *Parasitology* **88 (Pt 3)**, 431-438.
- Bissell M. J. & Radisky D.** (2001). Putting tumours in context. *Nature Reviews. Cancer* **1**, 46-54.
- Blake R. & Trounce I. A.** (2014). Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1840**, 1404-1412.
- Blakley B. R. & Rousseaux C. G.** (1991). Effect of ivermectin on the immune response in mice. *American Journal of Veterinary Research* **52**, 593-595.
- Blankenhaus B., Klemm U., Eschbach M. L., Sparwasser T., Huehn J., Kuhl A. A., Loddenkemper C., Jacobs T. & Breloer M.** (2011). *Strongyloides ratti* infection induces expansion of Foxp3+ regulatory T cells that interfere with immune response and parasite clearance in BALB/c mice. *Journal of Immunology* **186**, 4295-4305.
- Blankenhaus B., Reitz M., Brenz Y., Eschbach M. L., Hartmann W., Haben I., Sparwasser T., Huehn J., Kuhl A., Feyerabend T. B., Rodewald H. R. & Breloer M.** (2014). Foxp3(+) regulatory T cells delay expulsion of intestinal nematodes by suppression of IL-9-driven mast cell activation in BALB/c but not in C57BL/6 mice. *PLoS Pathogens* **10**, doi: 10.1371/journal.ppat.1003913.
- Boehm U., Klamp T., Groot M. & Howard J. C.** (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annual Review of Immunology* **15**, 749-795.
- Borgs L., Beukelaers P., Vandenbosch R., Belachew S., Nguyen L. & Malgrange B.** (2009). Cell "circadian" cycle: new role for mammalian core clock genes. *Cell Cycle* **8**, 832-837.

- Bottomley C., Isham V. & Basanez M. G.** (2005). Population biology of multispecies helminth infection: interspecific interactions and parasite distribution. *Parasitology* **131**, 417-433.
- Boudry G., Jury J., Yang P. C. & Perdue M. H.** (2007). Chronic psychological stress alters epithelial cell turn-over in rat ileum. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **292**, G1228-1232.
- Bouix-Busson D., Rondelaud D. & Barthe D.** (1985). L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller par *Fasciola hepatica* I. Etude des lésions de la glande digestive et de rein chez des jeunes mollusques. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **60**, 571-587.
- Bours M. J., Swennen E. L., Di Virgilio F., Cronstein B. N. & Dagnelie P. C.** (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* **112**, 358-404.
- Bradford M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Bradley J. E. & Jackson J. A.** (2008). Measuring immune system variation to help understand host-pathogen community dynamics. *Parasitology* **135**, 807-823.
- Brandtzaeg P.** (2009). Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scandinavian Journal of Immunology* **70**, 505-515.
- Brunet L. R.** (2001). Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology* **1**, 1457-1467.
- Brunet L. R., Joseph S., Dunne D. W. & Fried B.** (2000). Immune responses during the acute stages of infection with the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. *Parasitology* **120**, 565-571.
- Brygoo E. R.** (1965). Cycle experimental d'*Echinostoma caproni* Richard, 1964. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*, 207-209.
- Bugarski D., Jovicic G., Katic-Radivojevic S., Petakov M., Krstic A., Stojanovic N. & Milenkovic P.** (2006). Hematopoietic changes and altered reactivity to IL-17 in *Syphacia obvelata*-infected mice. *Parasitology International* **55**, 91-97.

- Bulek K., Swaidani S., Aronica M. & Li X.** (2010). Epithelium: the interplay between innate and Th2 immunity. *Immunology and Cell Biology* **88**, 257-268.
- Burke B. & Stewart C. L.** (2013). The nuclear lamins: flexibility in function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **14**, 13-24.
- Byrd J. C., Yunker C. K., Xu Q. S., Sternberg L. R. & Bresalier R. S.** (2000). Inhibition of gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **118**, 1072-1079.
- Cadman E. T. & Lawrence R. A.** (2010). Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? *Parasite Immunology* **32**, 1-19.
- Campbell E. L., Bruyninckx W. J., Kelly C. J., Glover L. E., McNamee E. N., Bowers B. E., Bayless A. J., Scully M., Saeedi B. J., Golden-Mason L., Ehrentraut S. F., Curtis V. F., Burgess A., Garvey J. F., Sorensen A., Nemenoff R., Jedlicka P., Taylor C. T., Kominsky D. J. & Colgan S. P.** (2014). Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity* **40**, 66-77.
- Capaldo C. T., Beeman N., Hilgarth R. S., Nava P., Louis N. A., Naschberger E., Sturzl M., Parkos C. A. & Nusrat A.** (2012). IFN-gamma and TNF-alpha-induced GBP-1 inhibits epithelial cell proliferation through suppression of beta-catenin/TCF signaling. *Mucosal Immunology* **5**, 681-690.
- Capello M., Ferri-Borgogno S., Cappello P. & Novelli F.** (2011). alpha-Enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *The FEBS Journal* **278**, 1064-1074.
- Carlisle M. S., McGregor D. D. & Appleton J. A.** (1991). Intestinal mucus entrapment of *Trichinella spiralis* larvae induced by specific antibodies. *Immunology* **74**, 546-551.
- Castilow E. M., Olson M. R., Meyerholz D. K. & Varga S. M.** (2008). Differential role of gamma interferon in inhibiting pulmonary eosinophilia and exacerbating systemic disease in fusion protein-immunized mice undergoing challenge infection with respiratory syncytial virus. *Journal of Virology* **82**, 2196-2207.
- Cavanagh B. L., Walker T., Norazit A. & Meedeniya A. C.** (2011). Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules* **16**, 7980-7993.

- Cayrol C. & Girard J. P.** (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 9021-9026.
- Cetin S., Ford H. R., Sysko L. R., Agarwal C., Wang J., Neal M. D., Baty C., Apodaca G. & Hackam D. J.** (2004). Endotoxin inhibits intestinal epithelial restitution through activation of Rho-GTPase and increased focal adhesions. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 24592-24600.
- Cetin S., Leaphart C. L., Li J., Ischenko I., Hayman M., Upperman J., Zamora R., Watkins S., Ford H. R., Wang J. & Hackam D. J.** (2007). Nitric oxide inhibits enterocyte migration through activation of RhoA-GTPase in a SHP-2-dependent manner. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **292**, G1347-1358.
- Chai J.Y.** (2009). Echinostomes in humans. In: B. Fried & R. Toledo (Eds.) *The Biology of the Echinostomes, from the Molecule to the Community*, Springer, New York, pp. 147-183.
- Chan C. H., Ko C. C., Chang J. G., Chen S. F., Wu M. S., Lin J. T. & Chow L. P.** (2006). Subcellular and functional proteomic analysis of the cellular responses induced by *Helicobacter pylori*. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* **5**, 702-713.
- Chaturvedi R. K. & Flint Beal M.** (2013). Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radical Biology & Medicine* **63**, 1-29.
- Chawla-Sarkar M., Lindner D. J., Liu Y. F., Williams B. R., Sen G. C., Silverman R. H. & Borden E. C.** (2003). Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* **8**, 237-249.
- Chen N., Bellone C. J., Schriewer J., Owens G., Fredrickson T., Parker S. & Buller R. M.** (2011). Poxvirus interleukin-4 expression overcomes inherent resistance and vaccine-induced immunity: pathogenesis, prophylaxis, and antiviral therapy. *Virology* **409**, 328-337.
- Chen S., Duan G., Zhang R. & Fan Q.** (2014). *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A protein upregulates alpha-enolase expression via Src/MEK/ERK pathway:

implication for progression of gastric cancer. *International Journal of Oncology* **45**, 764-770.

**Chen Y. J., Shiao M. S. & Wang S. Y.** (2001). The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anti-Cancer Drugs* **12**, 143-149.

**Cho Y. K., Ryang Y. S., Kim I. S., Park S. K., Im J. A. & Lee K. J.** (2007). Differential immune profiles following experimental *Echinostoma hortense* infection in BALB/c and C3H/HeN mice. *Parasitology Research* **100**, 1053-1061.

**Christensen N. O., Fagbemi B. O. & Nansen P.** (1984). *Trypanosoma brucei*-induced blockage of expulsion of *Echinostoma revolutum* and of homologous *E. revolutum* resistance in mice. *The Journal of Parasitology* **70**, 558-561.

**Christensen N. O., Furu P., Kurtzhals J. & Odaibo A.** (1988). Heterologous synergistic interactions in concurrent experimental infection in the mouse with *Schistosoma mansoni*, *Echinostoma revolutum*, *Plasmodium yoelii*, *Babesia microti*, and *Trypanosoma brucei*. *Parasitology Research* **74**, 544-551.

**Christensen N. O., Knudsen J. & Andreassen J.** (1986). *Echinostoma revolutum*: resistance to secondary and superimposed infections in mice. *Experimental Parasitology* **61**, 311-318.

**Christensen N. O., Knudsen J., Fagbemi B. & Nansen P.** (1985). Impairment of primary expulsion of *Echinostoma revolutum* in mice concurrently infected with *Schistosoma mansoni*. *Journal of Helminthology* **59**, 333-335.

**Christensen N. O., Nansen P., Fagbemi B. O. & Monrad J.** (1987). Heterologous antagonistic and synergistic interactions between helminths and between helminths and protozoans in concurrent experimental infection of mammalian hosts. *Parasitology Research* **73**, 387-410.

**Christensen N. O., Nydal R., Frandsen F. & Nansen P.** (1981b). Homologous immunotolerance and decreased resistance to *Schistosoma mansoni* in *Echinostoma revolutum*-infected mice. *The Journal of Parasitology* **67**, 164-166.



- Christensen N. O., Nydal R., Frandsen F., Sirag S. B. & Nansen P.** (1981a). Further studies on resistance to *Fasciola hepatica* and *Echinostoma revolutum* in mice infected with *Schistosoma* sp. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* **65**, 293-298.
- Christensen N.O., Simonsen P.E., Odaibo A.B. & Mahler H.** (1990). Establishment, survival and fecundity of *Echinostoma caproni* (Trematoda) infections in hamsters and jirds. *Journal of Helminthological Society of Washington* **5**, 104-107.
- Cigna N., Nicoletti C., Durand A., Chaix J. C., Giardina T. & Perrier J.** (2007). Acylase 1 expression in rat intestinal crypt-villus axis. *Cell Biology International* **31**, 966-973.
- Cliffe L. J., Humphreys N. E., Lane T. E., Potten C. S., Booth C. & Grecis R. K.** (2005). Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science* **308**, 1463-1465.
- Cliffe L. J., Potten C. S., Booth C. E. & Grecis R. K.** (2007). An increase in epithelial cell apoptosis is associated with chronic intestinal nematode infection. *Infection and Immunity* **75**, 1556-1564.
- Coghlan L. G., Lee D. R., Psencik B. & Weiss D.** (1993). Practical and effective eradication of pinworms (*Syphacia muris*) in rats by use of fenbendazole. *Laboratory Animal Science* **43**, 481-487.
- Colgan S. P. & Taylor C. T.** (2010). Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* **7**, 281-287.
- Cortés A., Munoz-Antolí C., Sotillo J., Fried B., Esteban J. G. & Toledo R.** (2015). *Echinostoma caproni* (Trematoda): differential in vivo mucin expression and glycosylation in high- and low-compatible hosts. *Parasite Immunology* **37**, 32-42.
- Cortés A., Sotillo J., Munoz-Antolí C., Fried B., Esteban J. G. & Toledo R.** (2014). Intestinal IFN-gamma production is associated with protection from clinical signs, but not with elimination of worms, in *Echinostoma caproni* infected-mice. *Parasitology Research* **113**, 2037-2045.
- Coulombe P. A. & Omary M. B.** (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 110-122.

- Cray C., Villar D., Zaias J. & Altman N. H.** (2008). Effects of fenbendazole on routine immune response parameters of BALB/c mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* **47**, 32-36.
- Crotty S.** (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annual Review of Immunology* **29**, 621-663.
- Curcoy A., Olsen R. K., Ribes A., Trenchs V., Vilaseca M. A., Campistol J., Osorio J. H., Andresen B. S. & Gregersen N.** (2003). Late-onset form of beta-electron transfer flavoprotein deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* **78**, 247-249.
- 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: MCP* **5**, 835-844.
- Da Costa L. R.** (1971). Small-intestinal cell turnover in patients with parasitic infections. *British Medical Journal* **3**, 281-283.
- Dalton J. P.** (2006). Proteases in trematode biology. In: A. G. Maule & N. J. Marks (Eds.) *Parasitic Flatworms Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Phisiology*, CAB International, pp. 348-368.
- Dann S. M., Spehlmann M. E., Hammond D. C., Iimura M., Hase K., Choi L. J., Hanson E. & Eckmann L.** (2008). IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. *Journal of Immunology* **180**, 6816-6826.
- 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.
- Dechat T., Adam S. A., Taimen P., Shimi T. & Goldman R. D.** (2010). Nuclear lamins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a000547.
- Degen J. L.** (1999). Hemostatic factors and inflammatory disease. *Thrombosis and Haemostasis* **82**, 858-864.

- Delanote V., Vandekerckhove J. & Gettemans J.** (2005). Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. *Acta Pharmacologica Sinica* **26**, 769-779.
- de la Rosa-Arana J. L., Campos-Rodríguez R., Rivera-Aguilar V., Escobar-Gutiérrez A., Miliar-García A., Herrera-González N. E. & Jarillo-Luna R. A.** (2012). Comparative effects of levamisole, *Staphylococcus*, and Freund's adjuvant on rat immunization with excretory and secretory antigens of *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Parasitology Research* **111**, 1599-1605.
- D'Elia R., Behnke J. M., Bradley J. E. & Else K. J.** (2009). Regulatory T cells: a role in the control of helminth-driven intestinal pathology and worm survival. *Journal of Immunology* **182**, 2340-2348.
- Dell'Orco R. T., McClung J. K., Jupe E. R. & Liu X. T.** (1996). Prohibitin and the senescent phenotype. *Experimental Gerontology* **31**, 245-252.
- Deng S., Zhou H., Xiong R., Lu Y., Yan D., Xing T., Dong L., Tang E. & Yang H.** (2007). Over-expression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics. *Breast Cancer Research and Treatment* **104**, 21-30.
- Deplancke B. & Gaskins H. R.** (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *The American Journal of Clinical Nutrition* **73**, 1131S-1141S.
- Derothe J. M., Loubes C., Orth A., Renaud F. & Moulia C.** (1997). Comparison between patterns of pinworm infection (*Aspiculuris tetraptera*) in wild and laboratory strains of mice, *Mus musculus*. *International Journal for Parasitology* **27**, 645-651.
- Detwiler J. T., Bos D. H. & Minchella D. J.** (2010). Revealing the secret lives of cryptic species: Examining the phylogenetic relationships of echinostome parasites in North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **55**, 611-620.
- Detwiler J. T., Zajac A. M., Minchella D. J. & Belden L. K.** (2012). Revealing cryptic parasite diversity in a definitive host: echinostomes in muskrats. *The Journal of Parasitology* **98**, 1148-1155.

- Dewi K. & Hasegawa H.** (2010). A new *Syphacia* species (Nematoda: Oxyuridae) collected from *Bunomys* spp. (Rodentia: Muridae) in central Sulawesi, Indonesia. *The Journal of Parasitology* **96**, 125-128.
- Dexter D. T. & Jenner P.** (2013). Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine* **62**, 132-144.
- Dharmani P., Srivastava V., Kissoon-Singh V. & Chadee K.** (2009). Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *Journal of Innate Immunity* **1**, 123-135.
- Díaz-Ramos A., Roig-Borrellas A., García-Melero A., Llorens A. & López-Alemanly R.** (2012). Requirement of plasminogen binding to its cell-surface receptor alpha-enolase for efficient regeneration of normal and dystrophic skeletal muscle. *PLoS One* **7**, doi: 10.1371/journal.pone.0050477.
- Diehl S., Chow C. W., Weiss L., Palmetshofer A., Twardzik T., Rounds L., Serfling E., Davis R. J., Anguita J. & Rincon M.** (2002). Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. *The Journal of Experimental Medicine* **196**, 39-49.
- Diehl S. & Rincon M.** (2002). The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology* **39**, 531-536.
- Dillman R. O.** (2011). Cancer immunotherapy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* **26**, 1-64.
- Djavaheri-Mergny M., Javelaud D., Wietzerbin J. & Besancon F.** (2004). NF-kappaB activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNFalpha-treated Ewing sarcoma cells. *FEBS Letters* **578**, 111-115.
- Doran P., O'Connell K., Gannon J., Kavanagh M. & Ohlendieck K.** (2008). Opposite pathobiochemical fate of pyruvate kinase and adenylate kinase in aged rat skeletal muscle as revealed by proteomic DIGE analysis. *Proteomics* **8**, 364-377.
- Drake L. H., Jukes M. C. H., Sternberg R. J. & Bundy D. A. P.** (2000). Geohelminth infections (ascariasis, trichuriasis, and hookworm): Cognitive and developmental impacts. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* **11**, 245-251.

- Duhen T., Geiger R., Jarrossay D., Lanzavecchia A. & Sallusto F.** (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunology* **10**, 857-863.
- Dütting S., Brachs S. & Mielenz D.** (2011). Fraternal twins: Swiprosin-1/EFhd2 and Swiprosin-2/EFhd1, two homologous EF-hand containing calcium binding adaptor proteins with distinct functions. *Cell Communication and Signaling: CCS* **9**, doi: 10.1186/1478-811x-9-2.
- Dvorak J., Mashiyama S. T., Braschi S., Sajid M., Knudsen G. M., Hansell E., Lim K. C., Hsieh I., Bahgat M., Mackenzie B., Medzihradzky K. F., Babbitt P. C., Caffrey C. R. & McKerrow J. H.** (2008). Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. *Biochimie* **90**, 345-358.
- Eaton G. J.** (1972). Intestinal helminths in inbred strains of mice. *Laboratory Animal Science* **22**, 850-853.
- Edelblum K. L., Yan F., Yamaoka T. & Polk D. B.** (2006). Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflammatory Bowel Diseases* **12**, 413-424.
- El Zawawy L. A., Said D. E., Gaafar M. R. & Ashram Y. A.** (2006). Effect of *Schistosoma mansoni* infection on physiological gastrointestinal transit and contractility. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* **36**, 1057-1070.
- Elliott D. E. & Weinstock J. V.** (2012). Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1247**, 83-96.
- Ellis M. K., Raso G., Li Y. S., Rong Z., Chen H. G. & McManus D. P.** (2007). Familial aggregation of human susceptibility to co- and multiple helminth infections in a population from the Poyang Lake region, China. *International Journal for Parasitology* **37**, 1153-1161.
- Else K. J. & Grecis R. K.** (1991). Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. I. Differential cytokine production during acute or chronic infection. *Immunology* **72**, 508-513.

- Else K. J., Hultner L. & Grecnis R. K.** (1992). Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. II. Differential induction of TH-cell subsets in resistant versus susceptible mice. *Immunology* **75**, 232-237.
- Esatgil M. U., Gulanber A. & Aydin H.** (2008). Use of topical selamectin for the treatment of *Syphacia muris* infection in laboratory rats. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **11**, 67-69.
- Espindola M. S., Frantz F. G., Soares L. S., Masson A. P., Tefe-Silva C., Bitencourt C. S., Oliveira S. C., Rodrigues V., Ramos S. G., Silva C. L. & Faccioli L. H.** (2014). Combined immunization using DNA-Sm14 and DNA-Hsp65 increases CD8+ memory T cells, reduces chronic pathology and decreases egg viability during *Schistosoma mansoni* infection. *BMC Infectious Diseases* **14**, doi: 10.1186/1471-2334-14-263.
- Espósito L. A., Melov S., Panov A., Cottrell B. A. & Wallace D. C.** (1999). Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 4820-4825.
- Esteban J. G. & Muñoz-Antolí C.** (2009). Echinostomes: Systematics and Life Cycles. In: B. Fried & R. Toledo (Eds.) *The Biology of the Echinostomes, from the Molecule to the Community*, Springer, New York, pp. 1-34
- Fairweather I.** (1999). Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In: J. P. Dalton (Eds.) *Fasciolosis*, CAB International, pp. 47-112.
- Falcone M., Rajan A. J., Bloom B. R. & Brosnan C. F.** (1998). A critical role for IL-4 in regulating disease severity in experimental allergic encephalomyelitis as demonstrated in IL-4-deficient C57BL/6 mice and BALB/c mice. *Journal of Immunology* **160**, 4822-4830.
- Fallon P. G., Ballantyne S. J., Mangan N. E., Barlow J. L., Dasvarma A., Hewett D. R., McIlgorm A., Jolin H. E. & McKenzie A. N.** (2006). Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *The Journal of Experimental Medicine* **203**, 1105-1116.
- Fatimathas L. & Moss S. E.** (2010). Annexins as disease modifiers. *Histology and Histopathology* **25**, 527-532.

- Filbey K. J., Grainger J. R., Smith K. A., Boon L., van Rooijen N., Harcus Y., Jenkins S., Hewitson J. P. & Maizels R. M.** (2014). Innate and adaptive type 2 immune cell responses in genetically controlled resistance to intestinal helminth infection. *Immunology and Cell Biology* **92**, 436-448.
- Finkelman F. D., Shea-Donohue T., Morris S. C., Gildea L., Strait R., Madden K. B., Schopf L. & Urban J. F., Jr.** (2004). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunological Reviews* **201**, 139-155.
- Finney C. A., Taylor M. D., Wilson M. S. & Maizels R. M.** (2007). Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *European Journal of Immunology* **37**, 1874-1886.
- Fitzpatrick L. R., Wang J. & Le T.** (2001). Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **299**, 915-920.
- Fleming F. M., Brooker S., Geiger S. M., Caldas I. R., Correa-Oliveira R., Hotez P. J. & Bethony J. M.** (2006). Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH* **11**, 56-64.
- Forstermann U. & Munzel T.** (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* **113**, 1708-1714.
- Fort M. M., Cheung J., Yen D., Li J., Zurawski S. M., Lo S., Menon S., Clifford T., Hunte B., Lesley R., Muchamuel T., Hurst S. D., Zurawski G., Leach M. W., Gorman D. M. & Rennick D. M.** (2001). IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies *in vivo*. *Immunity* **15**, 985-995.
- Franco J., Huffman J. E. & Fried B.** (1986). Infectivity, growth, and development of *Echinostoma revolutum* (Digenea: Echinostomatidae) in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *The Journal of Parasitology* **72**, 142-147.
- Frazer B. A. & Fried B.** (1998). Single-species infections of *Echinostoma caproni* cercariae in pulmonate snails and concurrent infections of *E. caproni* and *Echinostoma trivolvis*

cercariae in *Biomphalaria glabrata*. *International Journal for Parasitology* **28**, 595-597.

**Frazer B. A., Fried B., Fujino T. & Sleckman B. P.** (1999). Host-parasite relationships between *Echinostoma caproni* and RAG-2-deficient mice. *Parasitology Research* **85**, 337-342.

**Freund A., Laberge R. M., Demaria M. & Campisi J.** (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 2066-2075.

**Fried B.** (1994). Metacercarial excystment of trematodes. *Advances in Parasitology* **33**, 91-144.

**Fried B. & Graczyk T. K.** (2004). Recent advances in the biology of *Echinostoma* species in the "revolutum" group. *Advances in Parasitology* **58**, 139-195.

**Fried B. & Huffman J. E.** (1996). The Biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. *Advances in Parasitology* **38**, 311-368.

**Fried B., Nanni T. J., Reddy A. & Fujino T.** (1997). Maintenance of the life cycle of *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) in dexamethasone-treated ICR mice and laboratory-raised *Helisoma trivolvis* (Gastropoda). *Parasitology Research* **83**, 16-19.

**Fried B., Schneck J. L. & Ponder E. L.** (2004). Effects of tonicity, digestive enzymes and bile salts, and nutrient media on the survival of excysted metacercariae of *Echinostoma caproni*. *Parasitology Research* **93**, 1-4.

**Fried B. & Toledo R.** (2004). Criteria for species determination in the 'revolutum' group of *Echinostoma*. *The Journal of Parasitology* **90**, 917.

**Fu Y., Wang W., Tong J., Pan Q., Long Y., Qian W. & Hou X.** (2009). Th17 cells influence intestinal muscle contraction during *Trichinella spiralis* infection. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences* **29**, 481-485.

**Fujino T. & Fried B.** (1996). The expulsion of *Echinostoma trivolvis* from C3H mice: differences in glycoconjugates in mouse versus hamster small intestinal mucosa during infection. *Journal of Helminthology* **70**, 115-121.



- Fujino T. & Fried B.** (1993b). *Echinostoma caproni* and *E. trivolvis* alter the binding of glycoconjugates in the intestinal mucosa of C3H mice as determined by lectin histochemistry. *Journal of Helminthology* **67**, 179-188.
- Fujino T. & Fried B.** (1993a). Expulsion of *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914) Kanev, 1985 and retention of *E. caproni* Richard, 1964 (Trematoda: Echinostomatidae) in C3H mice: pathological, ultrastructural, and cytochemical effects on the host intestine. *Parasitology Research* **79**, 286-292.
- Fujino T., Fried B. & Hosier D. W.** (1994). The expulsion of *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) from ICR mice: extension/retraction mechanisms and ultrastructure of the collar spines. *Parasitology Research* **80**, 581-587.
- Fujino T., Fried B., Ichikawa H. & Tada I.** (1996b). Rapid expulsion of the intestinal trematodes *Echinostoma trivolvis* and *E. caproni* from C3H mice by trapping with increased goblet cell mucins. *International Journal for Parasitology* **26**, 319-324.
- Fujino T., Fried B. & Tada I.** (1993). The expulsion of *Echinostoma trivolvis*: worm kinetics and intestinal cytopathology in conventional and congenitally athymic BALB/c mice. *Parasitology* **106 (Pt 3)**, 297-304.
- Fujino T., Ichikawa H. & Fried B.** (1998a). The immunosuppressive compound FK506 does not affect expulsion of *Echinostoma trivolvis* in C3H mice. *Parasitology Research* **84**, 519-521.
- Fujino T., Ichikawa H., Fried B. & Fukuda K.** (1997). The expulsion of *Echinostoma trivolvis*: worm kinetics and intestinal reactions in C3H/HeN mice treated with dexamethasone. *Journal of Helminthology* **71**, 257-259.
- Fujino T., Ichikawa H., Fried B. & Fukuda K.** (1996a). The expulsion of *Echinostoma trivolvis*: suppressive effects of dexamethasone on goblet cell hyperplasia and worm rejection in C3H/HeN mice. *Parasite* **3**, 283-289.
- Fujino T., Ichikawa H., Fukuda K. & Fried B.** (1998b). The expulsion of *Echinostoma trivolvis* caused by goblet cell hyperplasia in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Parasite* **5**, 219-222.

- Fujino T., Nakano T., Washioka H., Tonosaki A., Ichikawa H. & Fried B. (2000).** Comparative ultrastructure of eggs in *Echinostoma paraensei*, *E. caproni*, and *E. trivolvis* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology Research* **86**, 427-430.
- Fujino T., Yamada M., Ichikawa H., Fried B., Arizono N. & Tada I. (1996c).** Rapid expulsion of the intestinal trematodes *Echinostoma trivolvis* and *E. caproni* from C3H/HeN mice after infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology Research* **82**, 577-579.
- Fukuda R., Zhang H., Kim J. W., Shimoda L., Dang C. V. & Semenza G. L. (2007).** HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* **129**, 111-122.
- Fürst T., Keiser J. & Utzinger J. (2012).** Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious Diseases* **12**, 210-221.
- Furuta G. T., Turner J. R., Taylor C. T., Hershberg R. M., Comerford K., Narravula S., Podolsky D. K. & Colgan S. P. (2001).** Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *The Journal of Experimental Medicine* **193**, 1027-1034.
- Gajda A. M. & Storch J. (2015).** Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs): Different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty acids* **93**, 9-16.
- García T. C., Fonseca C. T., Pacífico L. G., Duraes Fdo V., Marinho F. A., Penido M. L., Caliari M. V., de Melo A. L., Pinto H. A., Barsante M. M., Cunha-Neto E. & Oliveira S. C. (2008).** Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Acta Tropica* **106**, 162-167.
- Garg G., Bernal D., Trelis M., Forment J., Ortiz J., Valero M. L., Pedrola L., Martínez-Blanch J., Esteban J. G., Ranganathan S., Toledo R. & Marcilla A. (2013).** The transcriptome of *Echinostoma caproni* adults: further characterization of the secretome and identification of new potential drug targets. *Journal of Proteomics* **89**, 202-214.

- Georgieva S., Selbach C., Faltynkova A., Soldanova M., Sures B., Skirnisson K. & Kostadinova A.** (2013). New cryptic species of the 'revolutum' group of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) revealed by molecular and morphological data. *Parasites & Vectors* **6**, doi: 10.1186/1756-3305-6-64.
- Gerke V., Creutz C. E. & Moss S. E.** (2005). Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **6**, 449-461.
- Gerke V. & Moss S. E.** (2002). Annexins: from structure to function. *Physiological Reviews* **82**, 331-371.
- Gessner A., Mohrs K. & Mohrs M.** (2005). Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *Journal of Immunology* **174**, 1063-1072.
- Gibson D. I., Bray R. A., Hunt D., Georgiev B. B., Scholz T., Harris P. D., Bakke T. A., Pojmanska T., Niewiadomska K., Kostadinova A., Tkach V., Bain O., Durette-Desset M. C., Gibbons L., Moravec F., Petter A., Dimitrova Z. M., Buchmann K., Valtonen E. T. & de Jong Y.** (2014). Fauna europaea: helminths (animal parasitic). *Biodiversity Data Journal* **2**, doi: 10.3897/BDJ.2.e1060.
- Glickman R. M. & Green P. H.** (1977). The intestine as a source of apolipoprotein A1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 2569-2573.
- Glushakova L. G., Judge S., Cruz A., Pourang D., Mathews C. E. & Stacpoole P. W.** (2011). Increased superoxide accumulation in pyruvate dehydrogenase complex deficient fibroblasts. *Molecular Genetics and Metabolism* **104**, 255-260.
- Gluszko P., Undas A., Amenta S., Szczeklik A. & Schmaier A. H.** (1994). Administration of gamma interferon in human subjects decreases plasminogen activation and fibrinolysis without influencing C1 inhibitor. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **123**, 232-240.
- Godier A. & Hunt B. J.** (2013). Plasminogen receptors and their role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune and malignant disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* **11**, 26-34.

- Görg A., Weiss W. & Dunn M. J.** (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665-3685.
- Gorsich E. E., Ezenwa V. O. & Jolles A. E.** (2014). Nematode-coccidia parasite co-infections in African buffalo: Epidemiology and associations with host condition and pregnancy. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife* **3**, 124-134.
- Graczyk T.K.** (2000). Immunobiology and immunodiagnosis of echinostomiasis. In: B. Fried & T. K. Graczyk, (Eds.) *Echinostomes as Experimental Models for Biological Research*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 229–244.
- Graham A. L., Cattadori I. M., Lloyd-Smith J. O., Ferrari M. J. & Bjornstad O. N.** (2007). Transmission consequences of coinfection: cytokines writ large? *Trends in Parasitology* **23**, 284-291.
- Grainger J. R., Smith K. A., Hewitson J. P., McSorley H. J., Harcus Y., Filbey K. J., Finney C. A., Greenwood E. J., Knox D. P., Wilson M. S., Belkaid Y., Rudensky A. Y. & Maizels R. M.** (2010). Helminth secretions induce *de novo* T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway. *The Journal of Experimental Medicine* **207**, 2331-2341.
- Gratzner H. G.** (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**, 474-475.
- Gratzner H. G., Leif R. C., Ingram D. J. & Castro A.** (1975). The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Experimental Cell Research* **95**, 88-94.
- Greenbaum D., Medzihradzky K. F., Burlingame A. & Bogyo M.** (2000). Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chemistry & Biology* **7**, 569-581.
- Grencis R. K.** (2015). Immunity to helminths: resistance, regulations and susceptibility to gastrointestinal nematodes. *Annual Reviews in Immunology* **33**, 201-225.
- Grencis R. K., Humphreys N. E. & Bancroft A. J.** (2014). Immunity to gastrointestinal nematodes: mechanisms and myths. *Immunological Reviews* **260**, 183-205.

- Gu X., Li K., Laybutt D. R., He M. L., Zhao H. L., Chan J. C. & Xu G.** (2010). BiP overexpression, but not CHOP inhibition, attenuates fatty-acid-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in HepG2 liver cells. *Life Sciences* **87**, 724-732.
- Gueugneau M., Coudy-Gandilhon C., Gourbeyre O., Chambon C., Combaret L., Polge C., Taillandier D., Attaix D., Friguet B., Maier A. B., Butler-Browne G. & Bechet D.** (2014). Proteomics of muscle chronological ageing in post-menopausal women. *BMC Genomics* **15**:1165.
- Günther C., Neumann H., Neurath M. F. & Becker C.** (2013). Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut* **62**, 1062-1071.
- Guy-Grand D., DiSanto J. P., Henchoz P., Malassis-Seris M. & Vassalli P.** (1998). Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN-gamma, TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *European Journal of Immunology* **28**, 730-744.
- Gygi S. P., Rochon Y., Franza B. R. & Aebersold R.** (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 1720-1730.
- Haas W.** (2000). The behavioral biology of echinostomes. In: B. Fried & T. K. Graczyk, (Eds.) *Echinostomes as Experimental Models for Biological Research*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 175-197.
- Haberl B., Korner M., Spengler Y., Hertel J., Kalbe M. & Haas W.** (2000). Host-finding in *Echinostoma caproni*: miracidia and cercariae use different signals to identify the same snail species. *Parasitology* **120 (Pt 5)**, 479-486.
- Habtezion A., Toivola D. M., Asghar M. N., Kronmal G. S., Brooks J. D., Butcher E. C. & Omary M. B.** (2011). Absence of keratin 8 confers a paradoxical microflora-dependent resistance to apoptosis in the colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 1445-1450.
- Han E. T., Yang H. J., Park Y. J., Park J. H. & Chai J. Y.** (2014). *Metagonimus yokogawai*: a 100-kDa somatic antigen commonly reacting with other trematodes. *The Korean Journal of Parasitology* **52**, 201-204.
- Hansen K., Nielsen J. W., Hindsbo O. & Christensen N. O.** (1991). *Echinostoma caproni* in rats: worm population dynamics and host blood eosinophilia during primary

infections with 6, 25 and 50 metacercariae and resistance to secondary and superimposed infections. *Parasitology Research* **77**, 686-690.

**Hansson J., Panchaud A., Favre L., Bosco N., Mansourian R., Benyacoub J., Blum S., Jensen O. N. & Kussmann M.** (2011). Time-resolved quantitative proteome analysis of *in vivo* intestinal development. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* **10**, M110.005231.

**Harari Y., Russell D. A. & Castro G. A.** (1987). Anaphylaxis-mediated epithelial Cl<sup>-</sup> secretion and parasite rejection in rat intestine. *Journal of Immunology* **138**, 1250-1255.

**Harris N. L.** (2011). Advances in helminth immunology: optimism for future vaccine design? *Trends in Parasitology* **27**, 288-293.

**Harris N. & Gause W. C.** (2011). To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends in Immunology* **32**, 80-88.

**Hasegawa H., Sato H., Iwakiri E., Ikeda Y. & Une Y.** (2008). Helminths collected from imported pet murids, with special reference to concomitant infection of the golden hamsters with three pinworm species of the genus *Syphacia* (Nematoda: Oxyuridae). *The Journal of Parasitology* **94**, 752-754.

**Hasnain S. Z., Evans C. M., Roy M., Gallagher A. L., Kindrachuk K. N., Barron L., Dickey B. F., Wilson M. S., Wynn T. A., Grecis R. K. & Thornton D. J.** (2011a). Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. *The Journal of Experimental Medicine* **208**, 893-900.

**Hasnain S. Z., Gallagher A. L., Grecis R. K. & Thornton D. J.** (2013). A new role for mucins in immunity: insights from gastrointestinal nematode infection. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **45**, 364-374.

**Hasnain S. Z., Thornton D. J. & Grecis R. K.** (2011b). Changes in the mucosal barrier during acute and chronic *Trichuris muris* infection. *Parasite Immunology* **33**, 45-55.

**Hasnain S. Z., Wang H., Ghia J. E., Haq N., Deng Y., Velcich A., Grecis R. K., Thornton D. J. & Khan W. I.** (2010). Mucin gene deficiency in mice impairs host resistance to an enteric parasitic infection. *Gastroenterology* **138**, 1763-1771.

- He Y. J., Li W. L., Liu B. H., Dong H., Mou Z. R. & Wu Y. Z.** (2014). Identification of differential proteins in colorectal cancer cells treated with caffeic acid phenethyl ester. *World Journal of Gastroenterology: WJG* **20**, 11840-11849.
- Helmby H.** (2009). Helminths and our immune system: friend or foe? *Parasitology International* **58**, 121-127.
- Herbert D. R., Yang J. Q., Hogan S. P., Groschwitz K., Khodoun M., Munitz A., Orekov T., Perkins C., Wang Q., Brombacher F., Urban J. F., Jr, Rothenberg M. E. & Finkelman F. D.** (2009). Intestinal epithelial cell secretion of RELM-beta protects against gastrointestinal worm infection. *The Journal of Experimental Medicine* **206**, 2947-2957.
- Herrera E. J., Mino M. H., Notarnicola J. & Robles M. R.** (2011). A new species of *Syphacia* (Nematoda: Oxyuridae) from *Calomys laucha* (Rodentia: Cricetidae) in an agroecosystem of central Argentina. *The Journal of Parasitology* **97**, 676-681.
- Hervouet E., Pecina P., Demont J., Vojtiskova A., Simonnet H., Houstek J. & Godinot C.** (2006). Inhibition of cytochrome c oxidase subunit 4 precursor processing by the hypoxia mimic cobalt chloride. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **344**, 1086-1093.
- Hesse M., Modolell M., La Flamme A. C., Schito M., Fuentes J. M., Cheever A. W., Pearce E. J. & Wynn T. A.** (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *Journal of Immunology* **167**, 6533-6544.
- Hiemstra P. S.** (2002). Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochemical Society Transactions* **30**, 116-120.
- Higón M., Monteagudo C., Fried B., Esteban J. G., Toledo R. & Marcilla A.** (2008). Molecular cloning and characterization of *Echinostoma caproni* heat shock protein-70 and differential expression in the parasite derived from low- and high-compatible hosts. *Parasitology* **135**, 1469-1477.
- Hill W. A., Randolph M. M., Lokey S. J., Hayes E., Boyd K. L. & Mandrell T. D.** (2006). Efficacy and safety of topical selamectin to eradicate pinworm (*Syphacia* spp.) infections in rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* **45**, 23-26.

- Hill W. A., Randolph M. M. & Mandrell T. D.** (2009). Sensitivity of perianal tape impressions to diagnose pinworm (*Syphacia* spp.) infections in rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* **48**, 378-380.
- Hill W. G., Kaetzel M. A., Kishore B. K., Dedman J. R. & Zeidel M. L.** (2003). Annexin A4 reduces water and proton permeability of model membranes but does not alter aquaporin 2-mediated water transport in isolated endosomes. *The Journal of General Physiology* **121**, 413-425.
- Hoffmann K. F., Cheever A. W. & Wynn T. A.** (2000). IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal of Immunology* **164**, 6406-6416.
- Hogan S. P., Seidu L., Blanchard C., Groschwitz K., Mishra A., Karow M. L., Ahrens R., Artis D., Murphy A. J., Valenzuela D. M., Yancopoulos G. D. & Rothenberg M. E.** (2006). Resistin-like molecule beta regulates innate colonic function: barrier integrity and inflammation susceptibility. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **118**, 257-268.
- Horsnell W. G., Cutler A. J., Hoving J. C., Mearns H., Myburgh E., Arendse B., Finkelman F. D., Owens G. K., Erle D. & Brombacher F.** (2007). Delayed goblet cell hyperplasia, acetylcholine receptor expression, and worm expulsion in SMC-specific IL-4Ralpha-deficient mice. *PLoS Pathogens* **3**, doi: 10.1371/journal.ppat.0030001.
- Hosier D. W. & Fried B.** (1991). Infectivity, growth, and distribution of *Echinostoma caproni* (Trematoda) in the ICR mouse. *The Journal of Parasitology* **77**, 640-642.
- Hosier D. W., Fried B. & Szewczak J. P.** (1988). Homologous and heterologous resistance of *Echinostoma revolutum* and *E. liei* in ICR mice. *The Journal of Parasitology* **74**, 89-92.
- Hoste H.** (1989). *Trichostrongylus colubriformis*: epithelial cell kinetics in the small intestine of infected rabbits. *Experimental Parasitology* **68**, 99-104.
- Hsu D. K. & Liu F. T.** (2004). Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconjugate Journal* **19**, 507-515.



- Hotez P. J., Alvarado M., Basáñez M. G., Bolliger I., Bourne R., Boussinesg M., Brooker S. J., Brown A. S., Buckle G., Budke C. M., Carabin H., Coffeng L. E., Fèvre E. M., Fürst T, Halasa Y. A., Jasrasaria R., Johns N. E., Keiser J., King C. H., Lozano R., Murdoch M. E., O’Hanlon S., Pion S. D., Pullan R. L., Ramaiah K. D., Roberts T., Shepard D. S., Smith J. L., Stolk W. A., Undurraga E. A., Utzinger J., Wang M., Murray C. J. & Naghavi M.** (2014). The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**, doi: 10.1371/journal.pntd.0002865.
- Hotez P. J., Brindley P. J., Bethony J. M., King C. H., Pearce E. J. & Jacobson J.** (2008). Helminth infections: the great neglected tropical disease. *The Journal of Clinical Investigation* **118**, 1311-1321.
- Hotez P. J. & Kamath A.** (2009). Neglected tropical diseases in sub-saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and disease burden. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**, doi: 10.1371/journal.pntd.0000412.
- Hu W., Chen S. S., Zhang J. L., Lou X. E. & Zhou H. J.** (2014). Dihydroartemisinin induces autophagy by suppressing NF-kappaB activation. *Cancer Letters* **343**, 239-248.
- Huber S., Schramm C., Lehr H. A., Mann A., Schmitt S., Becker C., Protschka M., Galle P. R., Neurath M. F. & Blessing M.** (2004). Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the *in vivo* expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Journal of Immunology* **173**, 6526-6531.
- Huby F., Hoste H., Mallet S., Fournel S. & Nano J. L.** (1995). Effects of the excretory/secretory products of six nematode species, parasites of the digestive tract, on the proliferation of HT29-D4 and HGT-1 cell lines. *Epithelial Cell Biology* **4**, 156-162.
- Huby F., Nano J. L., Mallet S. & Hoste H.** (1999). Effects of the excretory/secretory products of *Trichostrongylus colubriformis* on the growth of different cell lines. *International Journal for Parasitology* **29**, 697-702.
- Huerkamp M. J.** (1993). Ivermectin eradication of pinworms from rats kept in ventilated cages. *Laboratory Animal Science* **43**, 86-90.
- Huerkamp M. J., Benjamin K. A., Webb S. K. & Pullium J. K.** (2004). Long-term results of dietary fenbendazole to eradicate *Syphacia muris* from rat colonies. *Contemporary*

*Topics in Laboratory Animal Science/American Association for Laboratory Animal Science* **43**, 35-36.

**Huerkamp M. J., Benjamin K. A., Zitzow L. A., Pullium J. K., Lloyd J. A., Thompson W. D., Webb S. K. & Lehner N. D.** (2000). Fenbendazole treatment without environmental decontamination eradicates *Syphacia muris* from all rats in a large, complex research institution. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science/American Association for Laboratory Animal Science* **39**, 9-12.

**Huffman J. E., Alcaide A. & Fried B.** (1988). Single and concurrent infections of the golden hamster, *Mesocricetus auratus*, with *Echinostoma revolutum* and *E. liei* (Trematoda: Digenea). *The Journal of Parasitology* **74**, 604-608.

**Huffman J. E. & Fried B.** (1990). *Echinostoma* and echinostomiasis. *Advances in Parasitology* **29**, 215-269.

**Hughes R. C.** (2001). Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* **83**, 667-676.

**Hugot J. P.** (1990). The Syphaciinae (Oxyuridae, Nematoda) parasitic in rodents and lagomorpha. Numerical taxonomy. Cladistic analysis of evolution. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* **65 Suppl 1**, 27-29.

**Huh Y. H., Kim S. H., Chung K. H., Oh S., Kwon M. S., Choi H. W., Rhee S., Ryu J. H., Park Z. Y., Jun C. D. & Song W. K.** (2013). Swiprosin-1 modulates actin dynamics by regulating the F-actin accessibility to cofilin. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **70**, 4841-4854.

**Humphreys N. E. & Grecis R. K.** (2009). IL-1-dependent, IL-1R1-independent resistance to gastrointestinal nematodes. *European Journal of Immunology* **39**, 1036-1045.

**Humphreys N. E., Xu D., Hepworth M. R., Liew F. Y. & Grecis R. K.** (2008). IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *Journal of Immunology* **180**, 2443-2449.

**Hung L. Y., Lewkowich I. P., Dawson L. A., Downey J., Yang Y., Smith D. E. & Herbert D. R.** (2013). IL-33 drives biphasic IL-13 production for noncanonical Type 2 immunity against hookworms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 282-287.

- Hurst S. D., Muchamuel T., Gorman D. M., Gilbert J. M., Clifford T., Kwan S., Menon S., Seymour B., Jackson C., Kung T. T., Brieland J. K., Zurawski S. M., Chapman R. W., Zurawski G. & Coffman R. L. (2002). New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: *in vivo* function of the novel cytokine IL-25. *Journal of Immunology* **169**, 443-453.
- Hussey K. L. (1957). *Syphacia muris* vs. *S. obvelata* in laboratory rats and mice. *The Journal of Parasitology* **43**, 555-559.
- Iglesias R., Leiro J., Ubeira F. M., Santamarina M. T., Navarrete I. & Sanmartín M. L. (1996). Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitology Research* **82**, 378-381.
- Iizumi G., Sadoya Y., Hino S., Shibuya N. & Kawabata H. (2007). Proteomic characterization of the site-dependent functional difference in the rat small intestine. *Biochimica et Biophysica Acta* **1774**, 1289-1298.
- Iikura M., Suto H., Kajiwara N., Oboki K., Ohno T., Okayama Y., Saito H., Galli S. J. & Nakae S. (2007). IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* **87**, 971-978.
- Iizuka M. & Konno S. (2011). Wound healing of intestinal epithelial cells. *World Journal of Gastroenterology: WJG* **17**, 2161-2171.
- Ikeda K., Nakajima H., Suzuki K., Kagami S., Hirose K., Suto A., Saito Y. & Iwamoto I. (2003). Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood* **101**, 3594-3596.
- Ilić V., Krstic A., Katic-Radivojevic S., Jovcic G., Milenkovic P. & Bugarski D. (2010). *Syphacia obvelata* modifies mitogen-activated protein kinases and nitric oxide synthases expression in murine bone marrow cells. *Parasitology International* **59**, 82-88.
- Inaba T., Sato H. & Kamiya H. (2003). Monoclonal IgA antibody-mediated expulsion of *Trichinella* from the intestine of mice. *Parasitology* **126**, 591-598.

- Ince S., Kozan E., Kucukkurt I. & Bacak E.** (2010). The effect of levamisole and levamisole+vitamin C on oxidative damage in rats naturally infected with *Syphacia muris*. *Experimental Parasitology* **124**, 448-452.
- Indo H. P., Davidson M., Yen H. C., Suenaga S., Tomita K., Nishii T., Higuchi M., Koga Y., Ozawa T. & Majima H. J.** (2007). Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion* **7**, 106-118.
- Iorio S. L., Fried B. & Hosier D. W.** (1991). Concurrent infections of *Echinostoma caproni* and *Echinostoma trivolvis* in ICR mice. *International Journal for Parasitology* **21**, 715-717.
- Ishikawa N.** (1994). Histochemical characteristics of the goblet cell mucins and their role in defence mechanisms against *Nippostrongylus brasiliensis* infection in the small intestine of mice. *Parasite Immunology* **16**, 649-654.
- Ishikawa N., Horii Y. & Nawa Y.** (1993). Immune-mediated alteration of the terminal sugars of goblet cell mucins in the small intestine of *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats. *Immunology* **78**, 303-307.
- Ishikawa N., Wakelin D. & Mahida Y. R.** (1997). Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology* **113**, 542-549.
- Iskova N. I.** (1985). [Trematoda. Vol 4. Echinostomata]. Fauna Ukrainy. Kiev: Naukova Dumka, 34, 198 pp.
- Ito R., Sekiguchi M., Setoyama D., Nakatsu Y., Yamagata Y. & Hayakawa H.** (2011). Cleavage of oxidized guanine nucleotide and ADP sugar by human NUDT5 protein. *Journal of Biochemistry* **149**, 731-738.
- Izcue A., Coombes J. L. & Powrie F.** (2009). Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annual Review of Immunology* **27**, 313-338.
- Jacobson R. H. & Reed N. D.** (1974). The thymus dependency of resistance to pinworm infection in mice. *The Journal of Parasitology* **60**, 976-979.

- Jeong S. H., Song I. S., Kim H. K., Lee S. R., Song S., Suh H., Yoon Y. G., Yoo Y. H., Kim N., Rhee B. D., Ko K. S. & Han J.** (2012). An analogue of resveratrol HS-1793 exhibits anticancer activity against MCF-7 cells via inhibition of mitochondrial biogenesis gene expression. *Molecules and Cells* **34**, 357-365.
- Jeyarasasingam U., Heyneman D., Lim H.K. & Mansour N.** (1972). Life cycle of a new echinostome from Egypt, *Echinostoma liei* sp nov (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology* **65**, 203-222.
- Ji L. L., Gómez-Cabrera M. C. & Vina J.** (2007). Role of nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase signaling in exercise-induced antioxidant enzyme adaptation. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* **32**, 930-935.
- Johansson M. E., Ambort D., Pelaseyed T., Schutte A., Gustafsson J. K., Ermund A., Subramani D. B., Holmen-Larsson J. M., Thomsson K. A., Bergstrom J. H., van der Post S., Rodriguez-Pineiro A. M., Sjoval H., Backstrom M. & Hansson G. C.** (2011). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cellular and Molecular Life sciences: CMLS* **68**, 3635-3641.
- Johnson L. L., Berggren K. N., Szaba F. M., Chen W. & Smiley S. T.** (2003). Fibrin-mediated protection against infection-stimulated immunopathology. *The Journal of Experimental Medicine* **197**, 801-806.
- Jolodar A., Fischer P., Bergmann S., Buttner 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* **1627**, 111-120.
- Jupe E. R., Liu X. T., Kiehlbauch J. L., McClung J. K. & Dell'Orco R. T.** (1995). Prohibitin antiproliferative activity and lack of heterozygosity in immortalized cell lines. *Experimental Cell Research* **218**, 577-580.
- Kaetzel M. A., Mo Y. D., Mealy T. R., Campos B., Bergsma-Schutter W., Brisson A., Dedman J. R. & Seaton B. A.** (2001). Phosphorylation mutants elucidate the mechanism of annexin IV-mediated membrane aggregation. *Biochemistry* **40**, 4192-4199.

- Kamiya H., Hori M., Arimori T., Sekiguchi M., Yamagata Y. & Harashima H.** (2009). NUDT5 hydrolyzes oxidized deoxyribonucleoside diphosphates with broad substrate specificity. *DNA Repair* **8**, 1250-1254.
- Kandasamy J., Huda S., Ambalavanan N. & Jilling T.** (2014). Inflammatory signals that regulate intestinal epithelial renewal, differentiation, migration and cell death: Implications for necrotizing enterocolitis. *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology/ISP* **21**, 67-80.
- Kanev I.** (1985). On the morphology, biology, ecology and taxonomy of *E. revolutum* group (Trematoda: Echinostomatidae: *Echinostoma*). Doctoral dissertation. Sofia, Bulgaria.
- Kanev I.** (1994). Life cycle, delimitation and redescription of *E. revolutum* (Froelich, 1802) (Trematoda: Echinostomatidae). *Systematic Parasitology* **28**, 125-144.
- Kanev I., Fried B., Dimitrov V., & Radev V.** (1995a). Redescription of *Echinostoma jurini* (Skvortzov, 1924) with a discussion of its identity and characteristics. *Annalen des Naturhistorischen* **97B**, 37-53.
- Kanev I., Fried B., Dimitrov V., & Radev V.** (1995b). Redescription of *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914) (Trematoda: Echinostomatidae) with a discussion of its identity. *Systematic Parasitology* **32**, 61-70.
- Kang H. M., Kim N., Park Y. S., Hwang J. H., Kim J. W., Jeong S. H., Lee D. H., Lee H. S., Jung H. C. & Song I. S.** (2008). Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric mucin expression. *Journal of Clinical Gastroenterology* **42**, 29-35.
- Kanoh A., Takeuchi H., Kato K., Waki M., Usami K. & Irimura T.** (2008). Interleukin-4 induces specific pp-GalNAc-T expression and alterations in mucin O-glycosylation in colonic epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**, 577-584.
- Karhausen J., Furuta G. T., Tomaszewski J. E., Johnson R. S., Colgan S. P. & Haase V. H.** (2004). Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *The Journal of Clinical Investigation* **114**, 1098-1106.
- Kato M., Yamashina S., Takeda N., Mochizuki S., Morishita T. & Nagano M.** (1995). Molecular biological and quantitative abnormalities of ADP/ATP carrier protein in cardiomyopathic hamsters. *European Heart Journal* **16 Suppl O**, 78-80.

- Kato Y., Manabe T., Tanaka Y. & Mochizuki H.** (1999). Effect of an orally active Th1/Th2 balance modulator, M50367, on IgE production, eosinophilia, and airway hyperresponsiveness in mice. *Journal of Immunology* **162**, 7470-7479.
- Kazantzis M. & Stahl A.** (2012). Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1821**, 852-857.
- Keeler S.P. & Huffman J.E.** (2009). Echinostomes in the second intermediate host. In: B. Fried & R. Toledo (Eds.) *The Biology of the Echinostomes, from the Molecule to the Community*, Springer, New York, pp 61-88.
- Keely S., Campbell E. L., Baird A. W., Hansbro P. M., Shalwitz R. A., Kotsakis A., McNamee E. N., Eltzschig H. K., Kominsky D. J. & Colgan S. P.** (2014). Contribution of epithelial innate immunity to systemic protection afforded by prolyl hydroxylase inhibition in murine colitis. *Mucosal Immunology* **7**, 114-123.
- Keklikoglu N., Koray M., Kocaelli H. & Akinci S.** (2008). iNOS expression in oral and gastrointestinal tract mucosa. *Digestive Diseases and Sciences* **53**, 1437-1442.
- Kellogg H. S. & Wagner J. E.** (1982). Experimental transmission of *Syphacia obvelata* among mice, rats, hamsters, and gerbils. *Laboratory Animal Science* **32**, 500-501.
- Kerrick G. P., Hoskins D. E. & Ringler D. H.** (1995). Eradication of pinworms from rats by using ivermectin in the drinking water. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science/American Association for Laboratory Animal Science* **34**, 78-79.
- Khan W. I., Blennerhasset P., Ma C., Matthaei K. I. & Collins S. M.** (2001). STAT6 dependent goblet cell hyperplasia during intestinal nematode infection. *Parasite Immunology* **23**, 39-42.
- Khan W. I. & Collins S. M.** (2004). Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. *Parasite Immunology* **26**, 319-326.
- Kim I., Im J. A., Lee K. J. & Ryang Y. S.** (2000). Mucosal mast cell responses in the small intestine of rats infected with *Echinostoma hortense*. *The Korean Journal of Parasitology* **38**, 139-143.
- Kim M. R., Manoukian R., Yeh R., Silbiger S. M., Danilenko D. M., Scully S., Sun J., DeRose M. L., Stolina M., Chang D., Van G. Y., Clarkin K., Nguyen H. Q., Yu Y. B., Jing**

- S., Senaldi G., Elliott G. & Medlock E. S.** (2002). Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. *Blood* **100**, 2330-2340.
- Kimura A. & Kishimoto T.** (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology* **40**, 1830-1835.
- King V. M. & cosgrove G. E.** (1963). Intestinal helminths in various strains of laboratory mice. *Laboratory Animal Care* **13**, 46-48.
- Klein D.** (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* **8**, 257-260.
- Knott M. L., Matthaei K. I., Giacomini P. R., Wang H., Foster P. S. & Dent L. A.** (2007). Impaired resistance in early secondary *Nippostrongylus brasiliensis* infections in mice with defective eosinophilopoiesis. *International Journal for Parasitology* **37**, 1367-1378.
- Knowles S. C., Fenton A., Petchey O. L., Jones T. R., Barber R. & Pedersen A. B.** (2013). Stability of within-host-parasite communities in a wild mammal system. *Proceedings. Biological Sciences/The Royal Society* **280**, 20130598.
- Köhler P.** (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology* **31**, 336-345.
- Kokoszka J. E., Coskun P., Esposito L. A. & Wallace D. C.** (2001). Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2<sup>(+/-)</sup> mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2278-2283.
- Kolli V. K., Natarajan K., Isaac B., Selvakumar D. & Abraham P.** (2014). Mitochondrial dysfunction and respiratory chain defects in a rodent model of methotrexate-induced enteritis. *Human & Experimental Toxicology* **33**, 1051-1065.
- Korn T., Bettelli E., Oukka M. & Kuchroo V. K.** (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology* **27**, 485-517.



- Kostadinova A.**, (1999). Cercarial chetotaxy of *Echinostoma miyagawai* Ishii, 1932 (Digenea: Echinostomatidae), with a review of the sensory patterns in the 'revolutum' group. *Systematic Parasitology* **44**, 201-209.
- Kostadinova A.** (1995). *Echinostoma echinatum* (Zeder, 1803) sensu Kanev (Digenea, Echinostomatidae) a note of caution. *Systematic Parasitology* **32**, 23-26.
- Kostadinova A., Herniou E. A., Barrett J. & Littlewood D. T.** (2003). Phylogenetic relationships of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via DNA and morphological analyses. *Systematic Parasitology* **54**, 159-176.
- Kostadinova A. & Gibson D. I.** (2000). The systematics of echinostomes. In: B. Fried & T. K. Graczyk, (Eds.) *Echinostomes as Experimental Models for Biological Research*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 31-57
- Kostadinova A. & Jones A.** (2005). Superfamily Echinostomatoidea Looss, 1899. In: R. A. Bray & D. I. Gibson (Eds.) *Keys to the Trematoda*, Vol. 2, CAB International Publishing and The Natural History Museum, London, pp. 5-8.
- Koyasu S. & Moro K.** (2011). Type 2 innate immune responses and the natural helper cell. *Immunology* **132**, 475-481.
- Krämer S., Schimpl A. & Hunig T.** (1995). Immunopathology of interleukin (IL) 2-deficient mice: thymus dependence and suppression by thymus-dependent cells with an intact IL-2 gene. *The Journal of Experimental Medicine* **182**, 1769-1776.
- Kringel H., Iburg T., Dawson H., Aasted B. & Roepstorff A.** (2006). A time course study of immunological responses in *Trichuris suis* infected pigs demonstrates induction of a local type 2 response associated with worm burden. *International Journal for Parasitology* **36**, 915-924.
- Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K. & Muller W.** (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263-274.
- Kumagai T., Usami H., Matsukawa N., Nakashima F., Chikazawa M., Shibata T., Noguchi N. & Uchida K.** (2014). Functional interaction between cyclooxygenase-2 and p53 in response to an endogenous electrophile. *Redox Biology* **4C**, 74-86.

- Kundranda M. N., Ray S., Saria M., Friedman D., Matrisian L. M., Lukyanov P. & Ochieng J.** (2004). Annexins expressed on the cell surface serve as receptors for adhesion to immobilized fetuin-A. *Biochimica et Biophysica Acta* **1693**, 111-123.
- Kuo H. C., Kuo W. H., Lee Y. J., Lin W. L., Chou F. P. & Tseng T. H.** (2006). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Letters* **234**, 199-208.
- Kusu T., Kayama H., Kinoshita M., Jeon S. G., Ueda Y., Goto Y., Okumura R., Saiga H., Kurakawa T., Ikeda K., Maeda Y., Nishimura J., Arima Y., Atarashi K., Honda K., Murakami M., Kunisawa J., Kiyono H., Okumura M., Yamamoto M. & Takeda K.** (2013). Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine. *Journal of Immunology* **190**, 774-783.
- Kwon M. S., Park K. R., Kim Y. D., Na B. R., Kim H. R., Choi H. J., Piragyte I., Jeon H., Chung K. H., Song W. K., Eom S. H. & Jun C. D.** (2013). Swiprosin-1 is a novel actin bundling protein that regulates cell spreading and migration. *PLoS One* **8**, doi: 10.1371/journal.pone.0071626.
- Landin A. M., Frasca D., Zaias J., Van der Put E., Riley R. L., Altman N. H. & Blomberg B. B.** (2009). Effects of fenbendazole on the murine humoral immune system. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* **48**, 251-257.
- Lanza I. R., Befroy D. E. & Kent-Braun J. A.** (2005). Age-related changes in ATP-producing pathways in human skeletal muscle *in vivo*. *Journal of Applied Physiology* **99**, 1736-1744.
- Laurens N., Koolwijk P. & de Maat M. P.** (2006). Fibrin structure and wound healing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* **4**, 932-939.
- Lawrence C. E., Paterson J. C., Higgins L. M., MacDonald T. T., Kennedy M. W. & Garside P.** (1998). IL-4-regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *European Journal of Immunology* **28**, 2672-2684.
- Lawrence C. E., Paterson J. C., Wei X. Q., Liew F. Y., Garside P. & Kennedy M. W.** (2000). Nitric oxide mediates intestinal pathology but not immune expulsion during *Trichinella spiralis* infection in mice. *Journal of Immunology* **164**, 4229-4234.

- Leaphart C. L., Qureshi F., Cetin S., Li J., Dubowski T., Baty C., Beer-Stolz D., Guo F., Murray S. A. & Hackam D. J.** (2007). Interferon-gamma inhibits intestinal restitution by preventing gap junction communication between enterocytes. *Gastroenterology* **132**, 2395-2411.
- Lee J. J., Kim D., Pyo K. H., Kim M. K., Kim H. J., Chai J. Y. & Shin E. H.** (2013). STAT6 expression and IL-13 production in association with goblet cell hyperplasia and worm expulsion of *Gymnophalloides seoi* from C57BL/6 mice. *The Korean Journal of Parasitology* **51**, 589-594.
- Lee K. D., Guk S. M. & Chai J. Y.** (2010). Toll-like receptor 2 and Muc2 expression on human intestinal epithelial cells by *Gymnophalloides seoi* adult antigen. *The Journal of Parasitology* **96**, 58-66.
- Lee K. J., Park S. K., Im J. A., Kim S. K., Kim G. H., Kim G. Y., Yang E. J. & Ryang Y. S.** (2004). Susceptibility of several strains of mice to *Echinostoma hortense* infection. *The Korean Journal of Parasitology* **42**, 51-56.
- Lee S. H., Jung B. K., Park J. H., Shin E. H. & Chai J. Y.** (2014). Increased intestinal epithelial cell turnover and intestinal motility in *Gymnophalloides seoi*-infected C57BL/6 mice. *The Korean Journal of Parasitology* **52**, 273-280.
- Lee Y. J., Liao P. H., Chen W. K. & Yang C. Y.** (2000). Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Letters* **153**, 51-56.
- Lello J., Boag B., Fenton A., Stevenson I. R. & Hudson P. J.** (2004). Competition and mutualism among the gut helminths of a mammalian host. *Nature* **428**, 840-844.
- León B., Ballesteros-Tato A., Browning J. L., Dunn R., Randall T. D. & Lund F. E.** (2012). Regulation of T(H)2 development by CXCR5+ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells. *Nature Immunology* **13**, 681-690.
- Levison S. E., McLaughlin J. T., Zeef L. A., Fisher P., Grecnis R. K. & Pennock J. L.** (2010). Colonic transcriptional profiling in resistance and susceptibility to trichuriasis: phenotyping a chronic colitis and lessons for iatrogenic helminthosis. *Inflammatory Bowel Diseases* **16**, 2065-2079.
- Lewis J. W. & D'Silva J.** (1986). The life-cycle of *Syphacia muris* Yamaguti (Nematoda: Oxyuroidea) in the laboratory rat. *Journal of Helminthology* **60**, 39-46.

- Li G. D., Zhang X., Li R., Wang Y. D., Wang Y. L., Han K. J., Qian X. P., Yang C. G., Liu P., Wei Q., Chen W. F., Zhang J. & Zhang Y.** (2008a). CHP2 activates the calcineurin/nuclear factor of activated T cells signaling pathway and enhances the oncogenic potential of HEK293 cells. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 32660-32668.
- Li M. O., Wan Y. Y. & Flavell R. A.** (2007a). T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* **26**, 579-591.
- Li N., Long Y., Fan X., Liu H., Li C., Chen L. & Wang Z.** (2009). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma tissues. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* **28**, doi: 10.1186/1756-9966-28-122.
- Li P., Lin J. E., Chervoneva I., Schulz S., Waldman S. A. & Pitari G. M.** (2007b). Homeostatic control of the crypt-villus axis by the bacterial enterotoxin receptor guanylyl cyclase C restricts the proliferating compartment in intestine. *The American Journal of Pathology* **171**, 1847-1858.
- Li Z., Zhao J., Du Y., Park H. R., Sun S. Y., Bernal-Mizrachi L., Aitken A., Khuri F. R. & Fu H.** (2008b). Down-regulation of 14-3-3zeta suppresses anchorage-independent growth of lung cancer cells through anoikis activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 162-167.
- Liang S. C., Tan X. Y., Luxenberg D. P., Karim R., Dunussi-Joannopoulos K., Collins M. & Fouser L. A.** (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of Experimental Medicine* **203**, 2271-2279.
- Lidell M. E., Moncada D. M., Chadee K. & Hansson G. C.** (2006). *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 9298-9303.
- Lievins-Moal V. & Servin A. L.** (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 315-337.

- Lim J. W., Kim H., Kim J. M., Kim J. S., Jung H. C. & Kim K. H.** (2004). Cellular stress-related protein expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial AGS cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 1624-1634.
- Lin L. L., Chen C. N., Lin W. C., Lee P. H., Chang K. J., Lai Y. P., Wang J. T. & Juan H. F.** (2008). Annexin A4: A novel molecular marker for gastric cancer with *Helicobacter pylori* infection using proteomics approach. *Proteomics. Clinical Applications* **2**, 619-634.
- Linden S. K., Sutton P., Karlsson N. G., Korolik V. & McGuckin M. A.** (2008). Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunology* **1**, 183-197.
- Listenberger L. L., Ory D. S. & Schaffer J. E.** (2001). Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 14890-14895.
- Liu D., Mao P., Huang Y., Liu Y., Liu X., Pang X. & Li Y.** (2014). Proteomic analysis of lung tissue in a rat acute lung injury model: identification of PRDX1 as a promoter of inflammation. *Mediators of Inflammation* **2014**, 469358.
- Liu Q., Kreider T., Bowdridge S., Liu Z., Song Y., Gaydo A. G., Urban J. F., Jr & Gause W. C.** (2010). B cells have distinct roles in host protection against different nematode parasites. *Journal of Immunology* **184**, 5213-5223.
- Liu Y., Wei J., Chang M., Liu Z., Li D., Hu S. & Hu L.** (2013). Proteomic analysis of endothelial progenitor cells exposed to oxidative stress. *International Journal of Molecular Medicine* **32**, 607-614.
- Livak K. J. & Schmittgen T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Lubcke R., Hutcheson F. A. & Barbezat G. O.** (1992). Impaired intestinal electrolyte transport in rats infested with the common parasite *Syphacia muris*. *Digestive Diseases and Sciences* **37**, 60-64.

- Ludwig B., Bender E., Arnold S., Huttemann M., Lee I. & Kadenbach B.** (2001). Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology* **2**, 392-403.
- Lytvynets A., Langrova I., Lachout J. & Vadlejš J.** (2013). Detection of pinworm eggs in the dust of laboratory animals breeding facility, in the cages and on the hands of the technicians. *Laboratory Animals* **47**, 71-73.
- MacArthur J. A. & Wood M.** (1978). Control of oxyurids in mice using thiabendazole. *Laboratory Animals* **12**, 141-143.
- Madden K. B., Whitman L., Sullivan C., Gause W. C., Urban J. F., Jr, Katona I. M., Finkelman F. D. & Shea-Donohue T.** (2002). Role of STAT6 and mast cells in IL-4- and IL-13-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. *Journal of Immunology* **169**, 4417-4422.
- Madden K. B., Yeung K. A., Zhao A., Gause W. C., Finkelman F. D., Katona I. M., Urban J. F., Jr & Shea-Donohue T.** (2004). Enteric nematodes induce stereotypic STAT6-dependent alterations in intestinal epithelial cell function. *Journal of Immunology* **172**, 5616-5621.
- Mahler H., Christensen N. O. & Hindsbo O.** (1995). Studies on the reproductive capacity of *Echinostoma caproni* (Trematoda) in hamsters and jirds. *International Journal for Parasitology* **25**, 705-710.
- Maier T., Guell M. & Serrano L.** (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters* **583**, 3966-3973.
- Maizels R. M., Balic A., Gómez-Escobar N., Nair M., Taylor M. D. & Allen J. E.** (2004). Helminth parasites--masters of regulation. *Immunological Reviews* **201**, 89-116.
- Maizels R. M., Bundy D. A., Selkirk M. E., Smith D. F. & Anderson R. M.** (1993). Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* **365**, 797-805.
- Maizels R. M., Hewitson J. P. & Smith K. A.** (2012). Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Current Opinion in Immunology* **24**, 459-466.

- Maizels R. M. & Yazdanbakhsh M.** (2003). Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews. Immunology* **3**, 733-744.
- Makepeace B. L., Martin C., Turner J. D. & Specht S.** (2012). Granulocytes in helminth infection -- who is calling the shots? *Current Medicinal Chemistry* **19**, 1567-1586.
- Maldonado A., Jr, Coura R., da Silva G., Lanfredi R. M. & Rey L.** (2001). Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **96 Suppl**, 193-198.
- Maloy K. J. & Powrie F.** (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* **474**, 298-306.
- Mansbach C. M. & Siddiqi S. A.** (2010). The biogenesis of chylomicrons. *Annual Review of Physiology* **72**, 315-333.
- Marcilla A., Pérez-García A., Espert A., Bernal D., Muñoz-Antolí C., Esteban J. G. & Toledo R.** (2007). *Echinostoma caproni*: identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. *Experimental Parasitology* **117**, 57-64.
- Marcilla A., Trelis M., Cortés A., Sotillo J., Cantalapiedra F., Mínguez M. T., Valero M. L., Sánchez del Pino M. M., Muñoz-Antolí 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**, doi: 10.1371/journal.pone.0045974.
- Marillier R. G., Brombacher T. M., Dewals B., Leeto M., Barkhuizen M., Govender D., Kellaway L., Horsnell W. G. & Brombacher F.** (2010). IL-4R{alpha}-responsive smooth muscle cells increase intestinal hypercontractility and contribute to resistance during acute Schistosomiasis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **298**, G943-951.
- Marillier R. G., Michels C., Smith E. M., Fick L. C., Leeto M., Dewals B., Horsnell W. G. & Brombacher F.** (2008). IL-4/IL-13 independent goblet cell hyperplasia in experimental helminth infections. *BMC Immunology* **9**, doi: 10.1186/1471-2172-9-11.

- Marín-Hernández A., Gallardo-Pérez J. C., Ralph S. J., Rodríguez-Enríquez S. & Moreno-Sánchez R.** (2009). HIF-1 $\alpha$  modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **9**, 1084-1101.
- Marshall J. S., Leal-Berumen I., Nielsen L., Glibetic M. & Jordana M.** (1996). Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. *The Journal of Clinical Investigation* **97**, 1122-1128.
- Martínez F. O., Helming L. & Gordon S.** (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology* **27**, 451-483.
- Maruyama H., Hirabayashi Y., el-Malky M., Okamura S., Aoki M., Itagaki T., Nakamura-Uchiyama F., Nawa Y., Shimada S. & Ohta N.** (2002). *Strongyloides venezuelensis*: longitudinal distribution of adult worms in the host intestine is influenced by mucosal sulfated carbohydrates. *Experimental Parasitology* **100**, 179-185.
- Marx M. B.** (1991). Parasites, pets, and people. *Primary Care* **18**, 153-165.
- Masaki M., Ikeda A., Shiraki E., Oka S. & Kawasaki T.** (2003). Mixed lineage kinase LKZ and antioxidant protein-1 activate NF-kappaB synergistically. *European Journal of Biochemistry/FEBS* **270**, 76-83.
- Massey D., Traverso V., Rigal A. & Maroux S.** (1991). Cellular and subcellular localization of annexin IV in rabbit intestinal epithelium, pancreas and liver. *Biology of the Cell/Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* **73**, 151-156.
- Massey-Harroche D., Mayran N. & Maroux S.** (1998). Polarized localizations of annexins I, II, VI and XIII in epithelial cells of intestinal, hepatic and pancreatic tissues. *Journal of Cell Science* **111 (Pt 20)**, 3007-3015.
- Matthys B., Bobieva M., Karimova G., Mengliboeva Z., Jean-Richard V., Hoimnazarova M., Kurbonova M., Lohourignon L. K., Utzinger J. & Wyss K.** (2011). Prevalence and risk factors of helminths and intestinal protozoa infections among children from primary schools in western Tajikistan. *Parasites & Vectors* **4**, doi: 10.1186/1756-3305-4-195.
- May R. M. & Nowak M. A.** (1995). Coinfection and the evolution of parasite virulence. *Proceedings. Biological Sciences/The Royal Society* **261**, 209-215.



- McClung J. K., Jupe E. R., Liu X. T. & Dell'Orco R. T.** (1995). Prohibitin: potential role in senescence, development, and tumor suppression. *Experimental Gerontology* **30**, 99-124.
- McCoy K. D., Stoel M., Stettler R., Merky P., Fink K., Senn B. M., Schaer C., Massacand J., Odermatt B., Oettgen H. C., Zinkernagel R. M., Bos N. A., Hengartner H., Macpherson A. J. & Harris N. L.** (2008). Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection. *Cell Host & Microbe* **4**, 362-373.
- McDermott J. R., Bartram R. E., Knight P. A., Miller H. R., Garrod D. R. & Grencis R. K.** (2003). Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7761-7766.
- McDermott J. R., Humphreys N. E., Forman S. P., Donaldson D. D. & Grencis R. K.** (2005). Intraepithelial NK cell-derived IL-13 induces intestinal pathology associated with nematode infection. *Journal of Immunology* **175**, 3207-3213.
- McGeachy M. J. & Cua D. J.** (2007). T cells doing it for themselves: TGF-beta regulation of Th1 and Th17 cells. *Immunity* **26**, 547-549.
- McGuckin M. A., Linden S. K., Sutton P. & Florin T. H.** (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews. Microbiology* **9**, 265-278.
- McMaster R. P., Huffman J. E. & Fried B.** (1995). The effect of dexamethasone on the course of *Echinostoma caproni* and *E. trivolvis* infections in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Parasitology Research* **81**, 518-521.
- McSorley H. J., Harcus Y. M., Murray J., Taylor M. D. & Maizels R. M.** (2008). Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite *Brugia malayi*. *Journal of Immunology* **181**, 6456-6466.
- Meece J. K. & Nollen P. M.** (1996). A comparison of the adult and miracidial stages of *Echinostoma paraensei* and *E. caproni*. *International Journal for Parasitology* **26**, 37-43.
- Mehlen P. & Puisieux A.** (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews. Cancer* **6**, 449-458.

- Melo R. C., Spencer L. A., Dvorak A. M. & Weller P. F.** (2008). Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *Journal of Leukocyte Biology* **83**, 229-236.
- Menzies M., Reverter A., Andronicos N., Hunt P., Windon R. & Ingham A.** (2010). Nematode challenge induces differential expression of oxidant, antioxidant and mucous genes down the longitudinal axis of the sheep gut. *Parasite Immunology* **32**, 36-46.
- Meunier B., Dumas E., Piec I., Bechet D., Hebraud M. & Hocquette J. F.** (2007). Assessment of hierarchical clustering methodologies for proteomic data mining. *Journal of Proteome Research* **6**, 358-366.
- Michels C., Goyal P., Nieuwenhuizen N. & Brombacher F.** (2006). Infection with *Syphacia obvelata* (pinworm) induces protective Th2 immune responses and influences ovalbumin-induced allergic reactions. *Infection and Immunity* **74**, 5926-5932.
- Miles L. A., Dahlberg C. M., Plescia J., Felez J., Kato K. & Plow E. F.** (1991). Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* **30**, 1682-1691.
- Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H. G., Lin H. K., Liebermann D. A., Hoffman B. & Reed J. C.** (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* **9**, 1799-1805.
- Mizoguchi A., Mizoguchi E., Chiba C., Spiekermann G. M., Tonegawa S., Nagler-Anderson C. & Bhan A. K.** (1996). Cytokine imbalance and autoantibody production in T cell receptor-alpha mutant mice with inflammatory bowel disease. *The Journal of Experimental Medicine* **183**, 847-856.
- Molkanen T., Tyynele J., Helin J., Kalkkinen N. & Kuusela P.** (2002). Enhanced activation of bound plasminogen on *Staphylococcus aureus* by staphylokinase. *FEBS Letters* **517**, 72-78.
- Moll R., Divo M. & Langbein L.** (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology* **129**, 705-733.

- Monastyrskaya K., Babiychuk E. B. & Draeger A.** (2009). The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **66**, 2623-2642.
- Moncada D., Keller K. & Chadee K.** (2003). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infection and Immunity* **71**, 838-844.
- Montoudis A., Seidman E., Boudreau F., Beaulieu J. F., Menard D., Elchebly M., Mailhot G., Sane A. T., Lambert M., Delvin E. & Levy E.** (2008). Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion beta-oxidation and cholesterol uptake. *Journal of Lipid Research* **49**, 961-972.
- Moon D. K. & Geczy C. L.** (1988). Recombinant IFN-gamma synergizes with lipopolysaccharide to induce macrophage membrane procoagulants. *Journal of Immunology* **141**, 1536-1542.
- Moore K. W., de Waal Malefyt R., Coffman R. L. & O'Garra A.** (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* **19**, 683-765.
- Morales A. & Espino A. M.** (2012). Evaluation and characterization of *Fasciola hepatica* tegument protein extract for serodiagnosis of human fascioliasis. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* **19**, 1870-1878.
- Moran A. P., Gupta A. & Joshi L.** (2011). Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* **60**, 1412-1425.
- Moreels T. G., De Man J. G., Bogers J. J., De Winter B. Y., Vrolix G., Herman A. G., Van Marck E. A. & Pelckmans P. A.** (2001). Effect of *Schistosoma mansoni*-induced granulomatous inflammation on murine gastrointestinal motility. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **280**, G1030-1042.
- Morimoto M., Morimoto M., Whitmire J., Xiao S., Anthony R. M., Mirakami H., Star R. A., Urban J. F., Jr & Gause W. C.** (2004). Peripheral CD4 T cells rapidly accumulate at the host: parasite interface during an inflammatory Th2 memory response. *Journal of Immunology* **172**, 2424-2430.
- Morimoto M. & Utsumiya K.** (2011). Enhanced protection against *Heligmosomoides polygyrus* in IL-2 receptor beta-chain overexpressed transgenic mice with intestinal

mastocytosis. *The Journal of Veterinary Medical Science/The Japanese Society of Veterinary Science* **73**, 849-851.

**Moser T. L., Kenan D. J., Ashley T. A., Roy J. A., Goodman M. D., Misra U. K., Cheek D. J. & Pizzo S. V.** (2001). Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6656-6661.

**Moss S. F., Krivosheyev V., de Souza A., Chin K., Gaetz H. P., Chaudhary N., Worman H. J. & Holt P. R.** (1999). Decreased and aberrant nuclear lamin expression in gastrointestinal tract neoplasms. *Gut* **45**, 723-729.

**Mowat A. M.** (1989). Antibodies to IFN-gamma prevent immunologically mediated intestinal damage in murine graft-versus-host reaction. *Immunology* **68**, 18-23.

**Mullaly S. C., Oudhoff M. J., Min P. H., Burrows K., Antignano F., Rattray D. G., Chenery A., McNaghy K. M., Ziltener H. J. & Zaph C.** (2013). Requirement for core 2 O-glycans for optimal resistance to helminth infection. *PloS One* **8**, doi: 10.1371/journal.pone.0060124.

**Munoz L. E., Frey B., Pausch F., Baum W., Mueller R. B., Brachvogel B., Poschl E., Rodel F., von der Mark K., Herrmann M. & Gaipf U. S.** (2007). The role of annexin A5 in the modulation of the immune response against dying and dead cells. *Current Medicinal Chemistry* **14**, 271-277.

**Muñoz-Antolí C.** (1997). Contribución al conocimiento de la sistemática, biología y ecología de la Subfamilia Echinostomatidae Faust, 1929 (Trematoda: Echinostomatidae) en el Parque Natural de la Albufera de Valencia (España). Tesis Doctoral, Facultat de Farmàcia, Universitat de València; 366 pp.

**Muñoz-Antolí C., Carpena I., Espert A., Esteban J. G., & Toledo R.** (2004). The effect of host species on the development of *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) adult worms. *Revista Ibérica de Parasitología* **64**, 81-87.

**Muñoz-Antolí C., Cortés A., Sotillo J., Fried B., Esteban J. G. & Toledo R.** (2014). Differential expression and glycosylation of proteins in the rat ileal epithelium in response to *Echinostoma caproni* infection. *Journal of Proteomics* **101**, 169-178.

- Muñoz-Antolí C., Sotillo J., Monteagudo C., Fried B., Marcilla A. & Toledo R. (2007).** Development and pathology of *Echinostoma caproni* in experimentally infected mice. *The Journal of Parasitology* **93**, 854-859.
- Muñoz-Antolí C., Toledo R. & Esteban J. G. (2013).** The influence of adult worm age and definitive host on the transmission of *Echinostoma caproni*: egg hatchability and miracidial infectivity. *Journal of Helminthology* **87**, 42-45.
- Musial J., Gluszko P., Undas A., Mahdi F., Kang S., Szczeklik A. & Schmaier A. H. (1998).** Gamma interferon administration to patients with atopic dermatitis inhibits fibrinolysis and elevates C1 inhibitor. *Thrombosis Research* **89**, 253-261.
- Na B. K., Kang J. M. & Sohn W. M. (2008).** CsCF-6, a novel cathepsin F-like cysteine protease for nutrient uptake of *Clonorchis sinensis*. *International Journal for Parasitology* **38**, 493-502.
- Nagaoka T., Banskota A. H., Tezuka Y., Saiki I. & Kadota S. (2002).** Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**, 3351-3359.
- Nair M. G., Guild K. J., Du Y., Zaph C., Yancopoulos G. D., Valenzuela D. M., Murphy A., Stevens S., Karow M. & Artis D. (2008).** Goblet cell-derived resistin-like molecule beta augments CD4+ T cell production of IFN-gamma and infection-induced intestinal inflammation. *Journal of Immunology* **181**, 4709-4715.
- Nakano T., Fujino T., Washioka H., Tonosaki A., Goto K. & Fried B. (2003).** Tegumentary papillae of *Echinostoma caproni* cercariae (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology Research* **89**, 446-450.
- Nam S. Y., Kim N., Lee C. S., Choi K. D., Lee H. S., Jung H. C. & Song I. S. (2005).** Gastric mucosal protection via enhancement of MUC5AC and MUC6 by geranylgeranylacetone. *Digestive Diseases and Sciences* **50**, 2110-2120.
- Natarajan K., Singh S., Burke T. R., Jr, Grunberger D. & Aggarwal B. B. (1996).** Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 9090-9095.

- Nava P., Kamekura R., Quiros M., Medina-Contreras O., Hamilton R. W., Kolegraff K. N., Koch S., Candelario A., Romo-Parra H., Laur O., Hilgarth R. S., Denning T. L., Parkos C. A. & Nusrat A.** (2014). IFN $\gamma$ -induced suppression of beta-catenin signaling: evidence for roles of Akt and 14.3.3zeta. *Molecular Biology of the Cell* **25**, 2894-2904.
- Nava P., Koch S., Laukoetter M. G., Lee W. Y., Kolegraff K., Capaldo C. T., Beeman N., Addis C., Gerner-Smidt K., Neumaier I., Skerra A., Li L., Parkos C. A. & Nusrat A.** (2010). Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. *Immunity* **32**, 392-402.
- Navabi N., Johansson M. E., Raghavan S. & Linden S. K.** (2013). *Helicobacter pylori* infection impairs the mucin production rate and turnover in the murine gastric mucosa. *Infection and Immunity* **81**, 829-837.
- Neal J. V. & Potten C. S.** (1981). Circadian rhythms in the epithelial cells and the pericryptal fibroblast sheath in three different sites in the murine intestinal tract. *Cell and Tissue Kinetics* **14**, 581-587.
- Neill D. R., Wong S. H., Bellosi A., Flynn R. J., Daly M., Langford T. K., Bucks C., Kane C. M., Fallon P. G., Pannell R., Jolin H. E. & McKenzie A. N.** (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* **464**, 1367-1370.
- Nguyen H. T., Amine A. B., Lafitte D., Waheed A. A., Nicoletti C., Villard C., Letisse M., Deyris V., Roziere M., Tchiakpe L., Danielle C. D., Comeau L. & Hiol A.** (2006). Proteomic characterization of lipid rafts markers from the rat intestinal brush border. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **342**, 236-244.
- Niemantsverdriet M., Wagner K., Visser M. & Backendorf C.** (2008). Cellular functions of 14-3-3 zeta in apoptosis and cell adhesion emphasize its oncogenic character. *Oncogene* **27**, 1315-1319.
- Nieuwenhuizen N. E., Meter J. M., Horsnell W. G., Hoving J. C., Fick L., Sharp M. F., Darby M. G., Parihar S. P., Brombacher F. & Lopata A. L.** (2013). A cross-reactive monoclonal antibody to nematode haemoglobin enhances protective immune responses to *Nippostrongylus brasiliensis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**, doi: 10.1371/journal.pntd.0002395.

- Nijtmans L. G., de Jong L., Artal Sanz M., Coates P. J., Berden J. A., Back J. W., Muijsers A. O., van der Spek H. & Grivell L. A.** (2000). Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *The EMBO Journal* **19**, 2444-2451.
- Noikong W., Wongsawad C., Chai J. Y., Saenphet S. & Trudgett A.** (2014). Molecular analysis of echinostome metacercariae from their second intermediate host found in a localised geographic region reveals genetic heterogeneity and possible cryptic speciation. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**, doi: 10.1371/journal.pntd.0002778.
- Noland G. S. & Graczyk T. K.** (2009). Concurrent infections of Echinostomes with Helminths and Protozoans. In: B. Fried & R. Toledo (Eds.) *The Biology of the Echinostomes, from the Molecule to the Community*, Springer, New York, pp. 281-293.
- Nollen P. M.** (1996). Mating behaviour of *Echinostoma caproni* and *E. paraensei* in concurrent infections in mice. *Journal of Helminthology* **70**, 133-136.
- O'Connell K., Doran P., Gannon J. & Ohlendieck K.** (2008). Lectin-based proteomic profiling of aged skeletal muscle: decreased pyruvate kinase isozyme M1 exhibits drastically increased levels of N-glycosylation. *European Journal of Cell Biology* **87**, 793-805.
- O'Connor W., Jr, Kamanaka M., Booth C. J., Town T., Nakae S., Iwakura Y., Kolls J. K. & Flavell R. A.** (2009). A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nature Immunology* **10**, 603-609.
- Odaibo A. B., Christensen N. O. & Ukoli F. M. A.** (1988). Establishment, survival and fecundity of *Echinostoma caproni* (Trematoda) infections in NMRI mice. *Proceedings of Helminthological Society of Washington* **55**, 265-269.
- Odaibo A. B., Christensen N. O. & Ukoli F. M. A.** (1989). Further studies on the population regulation in *Echinostoma caproni* infections in NMRI mice. *Proceedings of Helminthological Society of Washington* **56**, 192-198.
- Öge H., Ayaz E., Ide T. & Dalgic S.** (2000). The effect of doramectin, moxidectin and netobimin against natural infections of *Syphacia muris* in rats. *Veterinary Parasitology* **88**, 299-303.

- Ohnmacht C., Pullner A., King S. B., Drexler I., Meier S., Brocker T. & Voehringer D.** (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine* **206**, 549-559.
- Ohnmacht C., Schwartz C., Panzer M., Schiedewitz I., Naumann R. & Voehringer D.** (2010). Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths. *Immunity* **33**, 364-374.
- Okamoto M., Urushima H. & Hasegawa H.** (2009). Phylogenetic relationships of rodent pinworms (genus *Syphacia*) in Japan inferred from 28S rDNA sequences. *Parasitology International* **58**, 330-333.
- Okamoto M., Urushima H., Iwasa M. & Hasegawa H.** (2007). Phylogenetic relationships of rodent pinworms (genus *Syphacia*) in Japan inferred from mitochondrial CO1 gene sequences. *The Journal of Veterinary Medical Science/The Japanese Society of Veterinary Science* **69**, 545-547.
- Olsen E., Rasmussen H. H. & Celis J. E.** (1995). Identification of proteins that are abnormally regulated in differentiated cultured human keratinocytes. *Electrophoresis* **16**, 2241-2248.
- Olsen R. K., Andresen B. S., Christensen E., Bross P., Skovby F. & Gregersen N.** (2003). Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Human Mutation* **22**, 12-23.
- Omary M. B., Coulombe P. A. & McLean W. H.** (2004). Intermediate filament proteins and their associated diseases. *The New England Journal of Medicine* **351**, 2087-2100.
- Onori P., DeMorrow S., Gaudio E., Franchitto A., Mancinelli R., Venter J., Kopriva S., Ueno Y., Alvaro D., Savage J., Alpini G. & Francis H.** (2009). Caffeic acid phenethyl ester decreases cholangiocarcinoma growth by inhibition of NF-kappaB and induction of apoptosis. *International Journal of Cancer*. **125**, 565-576.
- Orban Z., Mitsiades N., Burke T. R., Jr, Tsokos M. & Chrousos G. P.** (2000). Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation* **7**, 99-105.



- Oren M.** (1999). Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 36031-36034.
- Orsolíć N., Terzić S., Mihaljević Z., Sver L. & Basic I.** (2005). Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **28**, 1928-1933.
- Oswald I. P., Wynn T. A., Sher A. & James S. L.** (1994). NO as an effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines. *Comparative Biochemistry and Physiology. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **108**, 11-18.
- Oyadomari S. & Mori M.** (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death and Differentiation* **11**, 381-389.
- Pácha J. & Sumová A.** (2013). Circadian regulation of epithelial functions in the intestine. *Acta Physiologica* **208**, 11-24.
- Pačlik D., Berndt U., Guzy C., Dankof A., Danese S., Holzloehner P., Rosewicz S., Wiedenmann B., Wittig B. M., Dignass A. U. & Sturm A.** (2008a). Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice. *Journal of Molecular Medicine* **86**, 1395-1406.
- Pačlik D., Lohse K., Wiedenmann B., Dignass A. U. & Sturm A.** (2008b). Galectin-2 and -4, but not galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing *in vitro* through a TGF-beta-independent mechanism. *Inflammatory Bowel Diseases* **14**, 1366-1372.
- Palazon A., Goldrath A. W., Nizet V. & Johnson R. S.** (2014). HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* **41**, 518-528.
- Pancholi V.** (2001). Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* **58**, 902-920.
- Panjwani N.** (2014). Role of galectins in re-epithelialization of wounds. *Annals of Translational Medicine* **2**, doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.09.
- Panter H. C.** (1969). Studies on host-parasite relationships. *Syphacia obvelata* in the mouse. *The Journal of Parasitology* **55**, 74-78.

- Park H., Hong K. M., Sakanari J. A., Choi J. H., Park S. K., Kim K. Y., Hwang H. A., Paik M. K., Yun K. J., Shin C. H., Lee J. B., Ryu J. S. & Min D. Y.** (2001). *Paragonimus westermani*: cloning of a cathepsin F-like cysteine proteinase from the adult worm. *Experimental Parasitology* **98**, 223-227.
- Park K. Y., Lee K. J., Kim I. S., Yang E. J., Lim S. J., Lim B.H. & Ryang Y.S.** (2005). Reaction of mast cells and goblet cells in the small intestine of C57BL/6 and C3H/HeN mice infected with *Echinostoma hortense*. *The Korean Journal of Biomedical Laboratory Sciences* **11**, 259-266.
- Patel N., Kreider T., Urban J. F., Jr & Gause W. C.** (2009). Characterisation of effector mechanisms at the host:parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. *International Journal for Parasitology* **39**, 13-21.
- Pearson D. J. & Taylor G.** (1975). The influence of the nematode *Syphacia obvelata* on adjuvant arthritis in the rat. *Immunology* **29**, 391-396.
- Peck A. & Mellins E. D.** (2010). Precarious balance: Th17 cells in host defense. *Infection and Immunity* **78**, 32-38.
- Pegg A. E. & McCann P. P.** (1982). Polyamine metabolism and function. *The American Journal of Physiology* **243**, C212-221.
- Pelicano H., Carney D. & Huang P.** (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* **7**, 97-110.
- Peréc-Matysiak A., Okulewicz A., Hildebrand J. & Zalesny G.** (2006). Helminth parasites of laboratory mice and rats. *Wiadomosci Parazytologiczne* **52**, 99-102.
- Peréc-Matysiak A. & Okulewicz A.** (2006). The presence of *Syphacia obvelata* in laboratory mice (BALB/c)-parasite antigens in immune response. *Helminthologia* **43**, 203-207.
- Pérez M.** (1999). Aportaciones a la sistemática y biología de un representante del género *Echinostoma* Rudolphi, 1890 (Trematoda: Echinostomatidae) del grupo "revolutum" en el Parque Natural de la Albufera de Valencia (España). Tesis Doctoral, Facultat de Farmàcia, Universitat de València; 246 pp.

- 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 Suppl 1**, S226-236.
- Perona-Wright G., Jenkins S. J. & MacDonald A. S.** (2006). Dendritic cell activation and function in response to *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* **36**, 711-721.
- Perretti M. & D'Acquisto F.** (2009). Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nature Reviews. Immunology* **9**, 62-70.
- Phillipson M., Johansson M. E., Henriksnas J., Petersson J., Gendler S. J., Sandler S., Persson A. E., Hansson G. C. & Holm L.** (2008). The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **295**, G806-812.
- Phythian-Adams A. T., Cook P. C., Lundie R. J., Jones L. H., Smith K. A., Barr T. A., Hochweller K., Anderton S. M., Hammerling G. J., Maizels R. M. & MacDonald A. S.** (2010). CD11c depletion severely disrupts Th2 induction and development *in vivo*. *The Journal of Experimental Medicine* **207**, 2089-2096.
- Pinto R. M., Gomes D. C. & Noronha D.** (2003). Evaluation of coinfection with pinworms (*Aspicularis tetraptera*, *Dentostomella translucida*, and *Syphacia obvelata*) in gerbils and mice. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science/American Association for Laboratory Animal Science* **42**, 46-48.
- Pinto R. M., Goncalves L., Noronha D. & Gomes D. C.** (2001). Worm burdens in outbred and inbred laboratory rats with morphometric data on *Syphacia muris* (Yamaguti, 1935) Yamaguti, 1941 (Nematoda, Oxyuroidea). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**, 133-136.
- Pitt J. J.** (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist. Reviews/Australian Association of Clinical Biochemists* **30**, 19-34.
- Platt T. R., Burnside L. & Bush E.** (2009). The role of light and gravity in the experimental transmission of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae) cercariae to the second intermediate host, *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata). *The Journal of Parasitology* **95**, 512-516.

- Platt T. R., Graf E., Kamrath A. & Zelmer D. A.** (2010). Diurnal migration of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae) in ICR mice. *The Journal of Parasitology* **96**, 1072-1075.
- Potten C. S. & Allen T. D.** (1977). Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa. *Journal of Ultrastructure Research* **60**, 272-277.
- Poulsen N. A., Andersen V., Moller J. C., Moller H. S., Jessen F., Purup S. & Larsen L. B.** (2012). Comparative analysis of inflamed and non-inflamed colon biopsies reveals strong proteomic inflammation profile in patients with ulcerative colitis. *BMC Gastroenterology* **12**, doi: 10.1186/1471-230X-12-76.
- Prasanna S. J., Saha B. & Nandi D.** (2007). Involvement of oxidative and nitrosative stress in modulation of gene expression and functional responses by IFN $\gamma$ . *International Immunology* **19**, 867-879.
- Price A. E., Liang H. E., Sullivan B. M., Reinhardt R. L., Easley C. J., Erle D. J. & Locksley R. M.** (2010). Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 11489-11494.
- Pritchett K. R. & Johnston N. A.** (2002). A review of treatments for the eradication of pinworm infections from laboratory rodent colonies. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science/American Association for Laboratory Animal Science* **41**, 36-46.
- Puhar A., Tronchere H., Payrastre B., Nhieu G. T. & Sansonetti P. J.** (2013). A *Shigella* effector dampens inflammation by regulating epithelial release of danger signal ATP through production of the lipid mediator PtdIns5P. *Immunity* **39**, 1121-1131.
- Punnonen J., de Waal Malefyt R., van Vlasselaer P., Gauchat J. F. & de Vries J. E.** (1993). IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *Journal of Immunology* **151**, 1280-1289.
- Quaroni A., Calnek D., Quaroni E. & Chandler J. S.** (1991). Keratin expression in rat intestinal crypt and villus cells. Analysis with a panel of monoclonal antibodies. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 11923-11931.

- Quentin J. C.** (1971). Comparative morphology of cephalic and genital structures in Oxyuria of the genus *Syphacia*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **46**, 15-60.
- Rabinovich G. A., Liu F. T., Hirashima M. & Anderson A.** (2007). An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scandinavian Journal of Immunology* **66**, 143-158.
- Rajan T. V., Porte P., Yates J. A., Keefer L. & Shultz L. D.** (1996). Role of nitric oxide in host defense against an extracellular, metazoan parasite, *Brugia malayi*. *Infection and Immunity* **64**, 3351-3353.
- Rakshit S., Chandrasekar B. S., Saha B., Victor E. S., Majumdar S. & Nandi D.** (2014). Interferon-gamma induced cell death: Regulation and contributions of nitric oxide, cJun N-terminal kinase, reactive oxygen species and peroxynitrite. *Biochimica et Biophysica Acta* **1843**, 2645-2661.
- Ramajo-Hernández A., Pérez-Sánchez R., Ramajo-Martín V. & Oleaga A.** (2007). *Schistosoma bovis*: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Experimental Parasitology* **115**, 83-91.
- Ramalingam T., Porte P., Lee J. & Rajan T. V.** (2005). Eosinophils, but not eosinophil peroxidase or major basic protein, are important for host protection in experimental *Brugia pahangi* infection. *Infection and Immunity* **73**, 8442-8443.
- Ramesh T. P., Kim Y. D., Kwon M. S., Jun C. D. & Kim S. W.** (2009). Swiprosin-1 regulates cytokine expression of human mast cell line HMC-1 through actin remodeling. *Immune Network* **9**, 274-284.
- Rausch S., Huehn J., Loddenkemper C., Hepworth M. R., Klotz C., Sparwasser T., Hamann A., Lucius R. & Hartmann S.** (2009). Establishment of nematode infection despite increased Th2 responses and immunopathology after selective depletion of Foxp3+ cells. *European Journal of Immunology* **39**, 3066-3077.
- Redlitz A., Fowler B. J., Plow E. F. & Miles L. A.** (1995). The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *European Journal of Biochemistry/FEBS* **227**, 407-415.

- Redpath S. A., van der Werf N., Cervera A. M., MacDonald A. S., Gray D., Maizels R. M. & Taylor M. D.** (2013). ICOS controls Foxp3(+) regulatory T-cell expansion, maintenance and IL-10 production during helminth infection. *European Journal of Immunology* **43**, 705-715.
- Renehan A. G., Bach S. P. & Potten C. S.** (2001). The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine. *Canadian Journal of Gastroenterology* **15**, 166-176.
- Rhee S. G., Chae H. Z. & Kim K.** (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine* **38**, 1543-1552.
- Richard J. & Brygoo E. R.** (1978). Life cycle of the trematode *Echinostoma caproni* Richard, 1964 (Echinostomatoidea). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **53**, 265-275.
- Riddell J. R., Maier P., Sass S. N., Moser M. T., Foster B. A. & Gollnick S. O.** (2012). Peroxiredoxin 1 stimulates endothelial cell expression of VEGF via TLR4 dependent activation of HIF-1alpha. *PLoS One* **7**, doi: 10.1371/journal.pone.0050394.
- Rikihisa Y., Letonja T., Pratt N. & Chin Lin Y.** (1984). *Taenia taeniaeformis*: characterization of larval metabolic products and growth of host gastric cells *in vitro*. *Experimental Parasitology* **58**, 230-238.
- Rinaldi M., Dreesen L., Hoorens P. R., Li R. W., Claerebout E., Goddeeris B., Vercruyse J., Van Den Broek W. & Geldhof P.** (2011). Infection with the gastrointestinal nematode *Ostertagia ostertagi* in cattle affects mucus biosynthesis in the abomasum. *Veterinary Research* **42**, doi: 10.1186/1297-9716-42-61.
- Roeber F. Jex A. R. & Gasses R. B.** (2013). Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance – an Australian perspective. *Parasites & Vectors* **6**, doi: 10.1186/1756-3305-6-153.
- Robinson M. W., Dalton J. P. & Donnelly S.** (2008a). Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends in Biochemical Sciences* **33**, 601-608.

- Robinson M. W., Tort J. F., Lowther J., Donnelly S. M., Wong E., Xu W., Stack C. M., Padula M., Herbert B. & Dalton J. P.** (2008b). Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* **7**, 1111-1123.
- Robles M. R.** (2010). La importancia de los nematodos Syphaciini (Syphaciinae-Oxyuridae) como marcadores específicos de sus hospedadores. *Mastozoología Neotropical* **17**, 305-315.
- Robles M R. & Navone G. T.** (2010). Redescription of *Syphacia venteli*, Travassos 1937 (Nematoda: Oxyuridae) from *Nectomys squamipes* in Argentina and Brazil and description of a new species of *Syphacia* from *Melanomys caliginosus* in Colombia. *Parasitology Research* **106**, 1117-1126.
- Robles M. R. & Navone G. T.** (2007a). A new species of *Syphacia* (Nematoda: Oxyuridae) from *Akodon azarae* (Rodentia: Cricetidae) in Argentina. *The Journal of Parasitology* **93**, 383-391.
- Robles M. R. & Navone G. T.** (2007b). A new species of *Syphacia* (Nematoda: Oxyuridae) from *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Cricetidae) in Argentina. *Parasitology Research* **101**, 1069-1075.
- Robson S. C., Sevigny J. & Zimmermann H.** (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* **2**, 409-430.
- Rodríguez E., Romaris F., Lorenzo S., Moreno J., Bonay P., Ubeira F. M. & Gárate T.** (2006). A recombinant enolase from *Anisakis simplex* is differentially recognized in natural human and mouse experimental infections. *Medical Microbiology and Immunology* **195**, 1-10.
- Rondelaud D. & Barthe D.** (1978). Arguments and proposals for a new developmental interpretation of *Fasciola hepatica* L. in *Lymnaea (Galba) truncatula* Muller. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **53**, 201-213.
- Ross C. R., Wagner J. E., Wightman S. R. & Dill S. E.** (1980). Experimental transmission of *Syphacia muris* among rats, mice, hamsters and gerbils. *Laboratory Animal Science* **30**, 35-37.

- Rothenberg M. E., Mishra A., Brandt E. B. & Hogan S. P.** (2001). Gastrointestinal eosinophils. *Immunological Reviews* **179**, 139-155.
- Russell D. H.** (1985). Ornithine decarboxylase: a key regulatory enzyme in normal and neoplastic growth. *Drug Metabolism Reviews* **16**, 1-88.
- Rutitzky L. I., Bazzone L., Shainheit M. G., Joyce-Shaikh B., Cua D. J. & Stadecker M. J.** (2008). IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. *Journal of Immunology* **180**, 2486-2495.
- Rutitzky L. I., Lopes da Rosa J. R. & Stadecker M. J.** (2005). Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. *Journal of Immunology* **175**, 3920-3926.
- Ryang Y. S., Yang E. J., Kim J. L., Lee K. J., Sung H. J., Kim J. B. & Kim I. S.** (2007). Immune response and inhibitory effect of ketotifen on the BALB/c and C3H/HeN mice infected with *Echinostoma hortense*. *Parasitology Research* **101**, 1103-1110.
- Rybarczyk B. J., Lawrence S. O. & Simpson-Haidaris P. J.** (2003). Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration. *Blood* **102**, 4035-4043.
- Sáenz S. A., Siracusa M. C., Perrigoue J. G., Spencer S. P., Urban J. F., Jr, Tocker J. E., Budelsky A. L., Kleinschek M. A., Kastelein R. A., Kambayashi T., Bhandoola A. & Artis D.** (2010). IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses. *Nature* **464**, 1362-1366.
- Sajid M. & McKerrow J. H.** (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology* **120**, 1-21.
- Sajid M. S., Iqbal Z., Muhammad G. & Iqbal M. U.** (2006). Immunomodulatory effect of various anti-parasitics: a review. *Parasitology* **132**, 301-313.
- Sakatani T., Kaneda A., Iacobuzio-Donahue C. A., Carter M. G., de Boom Witzel S., Okano H., Ko M. S., Ohlsson R., Longo D. L. & Feinberg A. P.** (2005). Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science* **307**, 1976-1978.



- Salas P. J., Rodriguez M. L., Viciano A. L., Vega-Salas D. E. & Hauri H. P.** (1997). The apical submembrane cytoskeleton participates in the organization of the apical pole in epithelial cells. *The Journal of Cell Biology* **137**, 359-375.
- Salim E. I., Morimura K., Menesi A., El-Lity M., Fukushima S. & Wanibuchi H.** (2008). Elevated oxidative stress and DNA damage and repair levels in urinary bladder carcinomas associated with schistosomiasis. *International Journal of Cancer*. **123**, 601-608.
- Santhanam S., Rajamanickam S., Motamarri A., Ramakrishna B. S., Amirtharaj J. G., Ramachandran A., Pulimood A. & Venkatraman A.** (2012). Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in the colonic mucosa in ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* **18**, 2158-2168.
- Sasaki S., Yoneyama H., Suzuki K., Suriki H., Aiba T., Watanabe S., Kawauchi Y., Kawachi H., Shimizu F., Matsushima K., Asakura H. & Narumi S.** (2002). Blockade of CXCL10 protects mice from acute colitis and enhances crypt cell survival. *European Journal of Immunology* **32**, 3197-3205.
- Sato Y.** (1993). Influence of mouse pinworm (*Syphacia obvelata*) infection on the immune system. *Japanese Journal of Veterinary Research* **41**, 45.
- Sato S. & Nieminen J.** (2004). Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconjugate Journal* **19**, 583-591.
- Sato Y., Ooi H. K., Nonaka N., Oku Y. & Kamiya M.** (1995). Antibody production in *Syphacia obvelata* infected mice. *The Journal of Parasitology* **81**, 559-562.
- Satriano J.** (2004). Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids* **26**, 321-329.
- Scalfone L. K., Nel H. J., Gagliardo L. F., Cameron J. L., Al-Shokri S., Leifer C. A., Fallon P. G. & Appleton J. A.** (2013). Participation of MyD88 and interleukin-33 as innate drivers of Th2 immunity to *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity* **81**, 1354-1363.
- Schafer M. & Werner S.** (2008). Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **9**, 628-638.

- Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D. & Rose-John S.** (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta* **1813**, 878-888.
- Scheving L. E. & Pauly J. E.** (1973). Cellular mechanism involving biorhythms with emphasis on those rhythms associated with the S and M stages of the cell cycle. *International Journal of Chronobiology* **1**, 269-286.
- Schiff M., Froissart R., Olsen R. K., Acquaviva C. & Vianey-Saban C.** (2006). Electron transfer flavoprotein deficiency: functional and molecular aspects. *Molecular Genetics and Metabolism* **88**, 153-158.
- Schmid M., Fellermann K., Fritz P., Wiedow O., Stange E. F. & Wehkamp J.** (2007). Attenuated induction of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease. *Journal of Leukocyte Biology* **81**, 907-915.
- Schmidt C., Lepsverdize E., Chi S. L., Das A. M., Pizzo S. V., Dityatev A. & Schachner M.** (2008). Amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells. *Molecular Psychiatry* **13**, 953-969.
- Schmidt S., Hoving J. C., Horsnell W. G., Mearns H., Cutler A. J., Brombacher T. M. & Brombacher F.** (2012). *Nippostrongylus*-induced intestinal hypercontractility requires IL-4 receptor alpha-responsiveness by T cells in mice. *PLoS One* **7**, doi: 10.1371/journal.pone.0052211.
- Schopf L. R., Hoffmann K. F., Cheever A. W., Urban J. F., Jr & Wynn T. A.** (2002). IL-10 is critical for host resistance and survival during gastrointestinal helminth infection. *Journal of Immunology* **168**, 2383-2392.
- Schreiber O., Petersson J., Walden T., Ahl D., Sandler S., Phillipson M. & Holm L.** (2013). iNOS-dependent increase in colonic mucus thickness in DSS-colitic rats. *PLoS One* **8**, doi: 10.1371/journal.pone.0071843.
- Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T. & Hume D. A.** (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* **75**, 163-189.

- Schulze K. & Schultheiss H. P.** (1995). The role of the ADP/ATP carrier in the pathogenesis of viral heart disease. *European Heart Journal* **16 Suppl O**, 64-67.
- Schwager I. & Jungi T. W.** (1994). Effect of human recombinant cytokines on the induction of macrophage procoagulant activity. *Blood* **83**, 152-160.
- Scott M. E. & Gibbs H. C.** (1986). Long-term population dynamics of pinworms (*Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera*) in mice. *The Journal of Parasitology* **72**, 652-662.
- Sevimli F. K., Kozan E., Sevimli A., Dogan N. & Bulbul A.** (2009). The acute effects of single-dose orally administered doramectin, eprinomectin and selamectin on natural infections of *Syphacia muris* in rats. *Experimental Parasitology* **122**, 177-181.
- Shea-Donohue T., Sullivan C., Finkelman F. D., Madden K. B., Morris S. C., Goldhill J., Pineiro-Carrero V. & Urban J. F., Jr.** (2001). The role of IL-4 in *Heligmosomoides polygyrus*-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. *Journal of Immunology* **167**, 2234-2239.
- Shekels L. L., Anway R. E., Lin J., Kennedy M. W., Garside P., Lawrence C. E. & Ho S. B.** (2001). Coordinated Muc2 and Muc3 mucin gene expression in *Trichinella spiralis* infection in wild-type and cytokine-deficient mice. *Digestive Diseases and Sciences* **46**, 1757-1764.
- Shen L. & Turner J. R.** (2006). Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**, G577-582.
- Sheng Y. H., Hasnain S. Z., Florin T. H. & McGuckin M. A.** (2012). Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **27**, 28-38.
- Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J. V. & Mann M.** (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* **1**, 2856-2860.
- Shi H., Hayes M. T., Kirana C., Miller R. J., Keating J. P. & Stubbs R. S.** (2013). Overexpression of aminoacylase 1 is associated with colorectal cancer progression. *Human Pathology* **44**, 1089-1097.

- Shi H., Hood K. A., Hayes M. T. & Stubbs R. S.** (2011). Proteomic analysis of advanced colorectal cancer by laser capture microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Journal of Proteomics* **75**, 339-351.
- Shimi T., Butin-Israeli V., Adam S. A. & Goldman R. D.** (2010). Nuclear lamins in cell regulation and disease. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **75**, 525-531.
- Shimi T., Butin-Israeli V., Adam S. A., Hamanaka R. B., Goldman A. E., Lucas C. A., Shumaker D. K., Kosak S. T., Chandel N. S. & Goldman R. D.** (2011). The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes & Development* **25**, 2579-2593.
- Sifroni K. G., Damiani C. R., Stoffel C., Cardoso M. R., Ferreira G. K., Jeremias I. C., Rezin G. T., Scaini G., Schuck P. F., Dal-Pizzol F. & Streck E. L.** (2010). Mitochondrial respiratory chain in the colonic mucosal of patients with ulcerative colitis. *Molecular and Cellular Biochemistry* **342**, 111-115.
- Silva A. J., Pham K. & Benitez J. A.** (2003). Haemagglutinin/protease expression and mucin gel penetration in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **149**, 1883-1891.
- Silva T. S., Richard N., Dias J. P. & Rodrigues P. M.** (2014). Data visualization and feature selection methods in gel-based proteomics. *Current Protein & Peptide Science* **15**, 4-22.
- Simons B. D. & Clevers H.** (2011). Stem cell self-renewal in intestinal crypt. *Experimental Cell Research* **317**, 2719-2724.
- Simonsen P. E. & Andersen B. J.** (1986). *Echinostoma revolutum* in mice; dynamics of the antibody attack to the surface of an intestinal trematode. *International Journal for Parasitology* **16**, 475-482.
- Simonsen P. E., Bindseil E. & Koie M.** (1989). *Echinostoma caproni* in mice: studies on the attachment site of an intestinal trematode. *International Journal for Parasitology* **19**, 561-566.
- Simonsen P. E., Estambale B. B. & Agger M.** (1991). Antibodies in the serum of golden hamsters experimentally infected with the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. *Journal of Helminthology* **65**, 239-247.

- Simonsen P. E., Vennervald B. J. & Birch-Andersen A.** (1990). *Echinostoma caproni* in mice: ultrastructural studies on the formation of immune complexes on the surface of an intestinal trematode. *International Journal for Parasitology* **20**, 935-941.
- Singh P. K. & Hollingsworth M. A.** (2006). Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends in Cell Biology* **16**, 467-476.
- Sirag S. B., Christensen N. O., Frandsen F., Monrad J. & Nansen P.** (1980). Homologous and heterologous resistance in *Echinostoma revolutum* infections in mice. *Parasitology* **80**, 479-486.
- Si-Tahar M., Merlin D., Sitaraman S. & Madara J. L.** (2000). Constitutive and regulated secretion of secretory leukocyte proteinase inhibitor by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **118**, 1061-1071.
- Sivitz W. I. & Yorek M. A.** (2010). Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**, 537-577.
- Slomiany B. L. & Slomiany A.** (2006). Cytosolic phospholipase A2 activation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-induced interference with gastric mucin synthesis. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* **58**, 217-223.
- Smith N. C.** (1989). The role of free oxygen radicals in the expulsion of primary infections of *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology Research* **75**, 423-438.
- Smithgall M. D., Comeau M. R., Yoon B. R., Kaufman D., Armitage R. & Smith D. E.** (2008). IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *International Immunology* **20**, 1019-1030.
- Snapper C. M., McIntyre T. M., Mandler R., Pecanha L. M., Finkelman F. D., Lees A. & Mond J. J.** (1992). Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *The Journal of Experimental Medicine* **175**, 1367-1371.
- Soga K., Yamauchi J., Kawai Y., Yamada M., Uchikawa R., Tegoshi T., Mitsufuji S., Yoshikawa T. & Arizono N.** (2008). Alteration of the expression profiles of acidic

mucin, sialyltransferase, and sulfotransferases in the intestinal epithelium of rats infected with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology Research* **103**, 1427-1434.

**Sohn W. M., Woo H. C. & Hong S. J.** (2002). Tegumental ultrastructures of *Echinoparyphium recurvatum* according to developmental stages. *The Korean Journal of Parasitology* **40**, 67-73.

**Song B. J., Akbar M., Abdelmegeed M. A., Byun K., Lee B., Yoon S. K. & Hardwick J. P.** (2014). Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein modifications. *Redox Biology* **3C**, 109-123.

**Sorensen R. E., Curtis J. & Minchella D. J.** (1998). Intraspecific variation in the rDNA its loci of 37-collar-spined echinostomes from North America: implications for sequence-based diagnoses and phylogenetics. *The Journal of Parasitology* **84**, 992-997.

**Sotillo J., Cortés A., Muñoz-Antolí C., Fried B., Esteban J. G. & Toledo R.** (2014). The effect of glycosylation of antigens on the antibody responses against *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology* **141**, 1333-1340.

**Sotillo J., Muñoz-Antolí C., Marcilla A., Fried B., Guillermo Esteban J. & Toledo R.** (2007). *Echinostoma caproni*: kinetics of IgM, IgA and IgG subclasses in the serum and intestine of experimentally infected rats and mice. *Experimental Parasitology* **116**, 390-398.

**Sotillo J., Trelis M., Cortés A., Fried B., Marcilla A., Esteban J. G. & Toledo R.** (2011). Th17 responses in *Echinostoma caproni* infections in hosts of high and low compatibility. *Experimental Parasitology* **129**, 307-311.

**Sotillo J., Trelis M., Cortés A., Valero M. L., Sánchez del Pino M., Esteban J. G., Marcilla A. & Toledo R.** (2012). Proteomic analysis of the pinworm *Syphacia muris* (Nematoda: Oxyuridae), a parasite of laboratory rats. *Parasitology International* **61**, 561-564.

**Sotillo J., Trelis M., Fried B., Marcilla A., Esteban J. G. & Toledo R.** (2012). Cellular immune responses in *Echinostoma caproni* experimentally infected mice. *Parasitology Research* **110**, 1033-1036.

- Sotillo J., Trudgett A., Halferty L., Marcilla A., Esteban J. G. & Toledo R.** (2010). *Echinostoma caproni*: differential tegumental responses to growth in compatible and less compatible hosts. *Experimental Parasitology* **125**, 304-309.
- Sotillo J., Valero L., Sánchez Del Pino M. M., Fried B., Esteban J. G., Marcilla A. & Toledo R.** (2008). Identification of antigenic proteins from *Echinostoma caproni* (Trematoda) recognized by mouse immunoglobulins M, A and G using an immunoproteomic approach. *Parasite Immunology* **30**, 271-279.
- Soumelis V., Reche P. A., Kanzler H., Yuan W., Edward G., Homey B., Gilliet M., Ho S., Antonenko S., Lauerma A., Smith K., Gorman D., Zurawski S., Abrams J., Menon S., McClanahan T., de Waal-Malefyt Rd R., Bazan F., Kastelein R. A. & Liu Y. J.** (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology* **3**, 673-680.
- Specian R. D. & Oliver M. G.** (1991). Functional biology of intestinal goblet cells. *The American Journal of Physiology* **260**, C183-93.
- Sripa B., Brindley P. J., Mulvenna J., Laha T., Smout M. J., Mairiang E., Bethony J. M. & Loukas A.** (2012). The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*--multiple pathways to cancer. *Trends in Parasitology* **28**, 395-407.
- Stahl W.** (1963). Studies on the life cycle of *Syphacia muris*, the rat pinworm. *The Keio Journal of Medicine* **12**, 55-60.
- Stahl W.** (1961). *Syphacia muris*, the rat pinworm. *Science* **133**, 576-577.
- Stange J., Hepworth M. R., Rausch S., Zajic L., Kuhl A. A., Uyttenhove C., Renauld J. C., Hartmann S. & Lucius R.** (2012). IL-22 mediates host defense against an intestinal intracellular parasite in the absence of IFN-gamma at the cost of Th17-driven immunopathology. *Journal of Immunology* **188**, 2410-2418.
- Stanley E. L., Hume R. & Coughtrie M. W.** (2005). Expression profiling of human fetal cytosolic sulfotransferases involved in steroid and thyroid hormone metabolism and in detoxification. *Molecular and Cellular Endocrinology* **240**, 32-42.
- Stassen M., Schmitt E. & Bopp T.** (2012). From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1247**, 56-68.

- Stelekati E. & Wherry E. J.** (2012). Chronic bystander infections and immunity to unrelated antigens. *Cell Host & Microbe* **12**, 458-469.
- Stepek G., Buttle D. J., Duce I. R. & Behnke** (2007). Human gastrointestinal nematode infections: are new control methods required? *International Journal of Experimental Parasitology* **87**, 325-341.
- Stockinger B., Veldhoen M. & Martin B.** (2007). Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunology* **19**, 353-361.
- Su C. W., Cao Y., Kaplan J., Zhang M., Li W., Conroy M., Walker W. A. & Shi H. N.** (2011). Duodenal helminth infection alters barrier function of the colonic epithelium via adaptive immune activation. *Infection and Immunity* **79**, 2285-2294.
- Sun R. & Gao B.** (2004). Negative regulation of liver regeneration by innate immunity (natural killer cells/interferon-gamma). *Gastroenterology* **127**, 1525-1539.
- Supali T., Verweij J. J., Wiria A. E., Djuardi Y., Hamid F., Kaisar M. M., Wammes L. J., van Lieshout L., Luty A. J., Sartono E. & Yazdanbakhsh M.** (2010). Polyparasitism and its impact on the immune system. *International Journal for Parasitology* **40**, 1171-1176.
- Swartz J. M., Dyer K. D., Cheever A. W., Ramalingam T., Pesnicak L., Domachowske J. B., Lee J. J., Lee N. A., Foster P. S., Wynn T. A. & Rosenberg H. F.** (2006). *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood* **108**, 2420-2427.
- Symons L. E.** (1978). Epithelia cell mitosis and morphology in worm-free regions of the intestines of the rat infected by *Nippostrongylus brasiliensis*. *The Journal of Parasitology* **64**, 958-959.
- Synnestvedt K., Furuta G. T., Comerford K. M., Louis N., Karhausen J., Eltzschig H. K., Hansen K. R., Thompson L. F. & Colgan S. P.** (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *The Journal of Clinical Investigation* **110**, 993-1002.
- Szabo S. J., Sullivan B. M., Stemmann C., Satoskar A. R., Sleckman B. P. & Glimcher L. H.** (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* **295**, 338-342.



- Taffs L. F.** (1976). Pinworm infections in laboratory rodents: a review. *Laboratory animals* **10**, 1-13.
- Takagi R., Higashi T., Hashimoto K., Nakano K., Mizuno Y., Okazaki Y. & Matsushita S.** (2008). B cell chemoattractant CXCL13 is preferentially expressed by human Th17 cell clones. *Journal of Immunology* **181**, 186-189.
- Takahashi I., Nochi T., Yuki Y. & Kiyono H.** (2009). New horizon of mucosal immunity and vaccines. *Current Opinion in Immunology* **21**, 352-358.
- Takeda K., Hashimoto K., Uchikawa R., Tegoshi T., Yamada M. & Arizono N.** (2010). Direct effects of IL-4/IL-13 and the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* on intestinal epithelial cells in vitro. *Parasite Immunology* **32**, 420-429.
- Taniguchi K., Petersson M., Hoglund P., Kiessling R., Klein G. & Karre K.** (1987). Interferon gamma induces lung colonization by intravenously inoculated B16 melanoma cells in parallel with enhanced expression of class I major histocompatibility complex antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 3405-3409.
- Taylor A., Akdis M., Joss A., Akkoc T., Wenig R., Colonna M., Daigle I., Flory E., Blaser K. & Akdis C. A.** (2007). IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120**, 76-83.
- Taylor M. D., LeGoff L., Harris A, Malone E., Allen J. E. & Maizels R. M.** (2005). Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasitic clearance *in vivo*. *Journal of Immunology* **174**, 4924-4933.
- Taylor A., Verhagen J., Akkoc T., Wenig R., Flory E., Blaser K., Akdis M. & Akdis C. A.** (2009). IL-10 suppresses CD2-mediated T cell activation via SHP-1. *Molecular Immunology* **46**, 622-629.
- Taylor K., Lutje V. & Mertens B.** (1996). Nitric oxide synthesis is depressed in *Bos indicus* cattle infected with *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* and does not mediate T-cell suppression. *Infection and Immunity* **64**, 4115-4122.
- Taylor M. D., van der Werf N. & Maizels R. M.** (2012). T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. *Trends in Immunology* **33**, 181-189.

- Tendler M., Brito C. A., Vilar M. M., Serra-Freire N., Diogo C. M., Almeida M. S., Delbem A. C., Da Silva J. F., Savino W., Garratt R. C., Katz N. & Simpson A. S.** (1996). A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 269-273.
- Tergaonkar V.** (2006). NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**, 1647-1653.
- Theiss A. L., Vijay-Kumar M., Obertone T. S., Jones D. P., Hansen J. M., Gewirtz A. T., Merlin D. & Sitaraman S. V.** (2009). Prohibitin is a novel regulator of antioxidant response that attenuates colonic inflammation in mice. *Gastroenterology* **137**, 199-208.
- Thornton D. J., Rousseau K. & McGuckin M. A.** (2008). Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annual Review of Physiology* **70**, 459-486.
- Thumbi S. M., Bronsvoort B. M., Poole E. J., Kiara H., Toye P. G., Mbole-Kariuki M. N., Conradie I., Jennings A., Handel I. G., Coetzer J. A., Steyl J. C., Hanotte O. & Woolhouse M. E.** (2014). Parasite co-infections and their impact on survival of indigenous cattle. *PLoS One* **9**, doi: 10.1371/journal.pone.0076324.
- Thylur R. P., Kim Y. D., Kwon M. S., Oh H. M., Kwon H. K., Kim S. H., Im S. H., Chun J. S., Park Z. Y. & Jun C. D.** (2009). Swiprosin-1 is expressed in mast cells and up-regulated through the protein kinase C beta 1/eta pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* **108**, 705-715.
- Toledo R.** (1992). Contribución al conocimiento de la morfología, biología y ecología de *Echinoparyphium* sp. aff. *recurvatum* (von Linstow, 1873) (Trematoda: Echinostomatidae) en el Parque Natural de la Albufera de Valencia, España. Tesis Doctoral, Facultat de Farmàcia, Universitat de València; 297 pp.
- Toledo R.** (2009b). Echinostomes in the definitive host: a model for the study of host-parasite relationships. In: B. Fried & R. Toledo (Eds.) *The Biology of the Echinostomes, from the Molecule to the Community*, Springer, New York, pp. 89-110.
- Toledo R.** (2009a). Immunology and pathology of echinostome infections in the definitive host. In: B. Fried & R. Toledo (Eds.) *The Biology of the Echinostomes, from the Molecule to the Community*, Springer, New York, pp. 185-206.

- Toledo R., Carpena I., Espert A., Sotillo J., Muñoz-Antolí C. & Esteban J. G.** (2006c). A quantitative approach to the experimental transmission success of *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) in rats. *The Journal of Parasitology* **92**, 16-20.
- Toledo R., Espert A., Carpena I., Muñoz-Antolí C., Fried B. & Esteban J. G.** (2004a). The comparative development of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) adults in experimentally infected hamsters and rats. *Parasitology Research* **93**, 439-444.
- Toledo R., Espert A., Muñoz-Antolí C., Marcilla A., Fried B. & Esteban J. G.** (2003). Development of an antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Echinostoma caproni* (Trematoda) in experimentally infected rats: kinetics of coproantigen excretion. *Journal of Parasitology* **89**, 1227-1231.
- Toledo R., Espert A., Muñoz-Antolí C., Marcilla A., Fried B. & Esteban J. G.** (2005). Kinetics of antibodies and antigens in serum of mice experimentally infected with *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae). *The Journal of Parasitology* **91**, 978-980.
- Toledo R., Espert A., Muñoz-Antolí C., Marcilla A., Fried B. & Esteban J. G.** (2004b). Kinetics of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) antigens in feces and serum of experimentally infected hamsters and rats. *The Journal of Parasitology* **90**, 752-758.
- Toledo R., Esteban J. G. & Fried B.** (2012). Current status of food-borne trematode infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* **31**, 1705-1718.
- Toledo R., Esteban J. G. & Fried B.** (2009). Chapter 3. Recent advances in the biology of echinostomes. *Advances in Parasitology* **69**, 147-204.
- Toledo R., Esteban J. G. & Fried B.** (2006a). Immunology and pathology of intestinal trematodes in their definitive hosts. *Advances in Parasitology* **63**, 285-365.
- Toledo R. & Fried B.** (2005). Echinostomes as experimental models for interactions between adult parasites and vertebrate hosts. *Trends in Parasitology* **21**, 251-254.
- Toledo R., Monteagudo C., Espert A., Fried B., Esteban J. G. & Marcilla A.** (2006b). *Echinostoma caproni*: intestinal pathology in the golden hamster, a highly compatible

host, and the Wistar rat, a less compatible host. *Experimental Parasitology* **112**, 164-171.

**Toledo R., Muñoz-Antolí C. & Esteban J. G.** (2000). The life-cycle of *Echinostoma friedi* n. sp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Spain and a discussion on the relationships within the 'revolutum' group based on cercarial chaetotaxy. *Systematic Parasitology* **45**, 199-217.

**Tominaga A., Takaki S., Koyama N., Katoh S., Matsumoto R., Migita M., Hitoshi Y., Hosoya Y., Yamauchi S. & Kanai Y.** (1991). Transgenic mice expressing a B cell growth and differentiation factor gene (interleukin 5) develop eosinophilia and autoantibody production. *The Journal of Experimental Medicine* **173**, 429-437.

**Towatari T., Nikawa T., Murata M., Yokoo C., Tamai M., Hanada K. & Katunuma N.** (1991). Novel epoxysuccinyl peptides. A selective inhibitor of cathepsin B, *in vivo*. *FEBS Letters* **280**, 311-315.

**Townsend M. J., Fallon P. G., Matthews D. J., Jolin H. E. & McKenzie A. N.** (2000). T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *The Journal of Experimental Medicine* **191**, 1069-1076.

**Traenckner E. B., Wilk S. & Baeuerle P. A.** (1994). A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *The EMBO Journal* **13**, 5433-5441.

**Trelis M.** (2004).- *Echinostoma friedi* Toledo et al., 2000 (Trematoda: Echinostomatidae): estudio biológico experimental del binomio miracidio-gasterópodo y caracterización molecular del adulto. Tesis Doctoral, Facultat de Farmàcia, Universitat de València; 247 pp.

**Trelis M., Corteés A., Fried B., Marcilla A., Esteban J. G. & Toledo R.** (2013). Protective immunity against *Echinostoma caproni* in rats is induced by *Syphacia muris* infection. *International Journal for Parasitology* **43**, 453-463.

**Trelis M., Sotillo J., Monteagudo C., Fried B., Marcilla A., Esteban J. G. & Toledo R.** (2011). *Echinostoma caproni* (Trematoda): differential *in vivo* cytokine responses in high and low compatible hosts. *Experimental Parasitology* **127**, 387-397.

- Tsubokawa D., Nakamura T., Goso Y., Takano Y., Kurihara M. & Ishihara K.** (2009). *Nippostrongylus brasiliensis*: increase of sialomucins reacting with anti-mucin monoclonal antibody HCM31 in rat small intestinal mucosa with primary infection and reinfection. *Experimental Parasitology* **123**, 319-325.
- Turano C., Gaucci E., Grillo C. & Chichiarelli S.** (2011). ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cellular & Molecular Biology Letters* **16**, 539-563.
- Turner J. E., Stockinger B. & Helmbly H.** (2013). IL-22 mediates goblet cell hyperplasia and worm expulsion in intestinal helminth infection. *PLoS Pathogens* **9**, doi: 10.1371/journal.ppat.1003698.
- Uber C. L., Roth R. L. & Levy D. A.** (1980). Expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* by mice deficient in mast cells. *Nature* **287**, 226-228.
- Urban J. F., Jr, Schopf L., Morris S. C., Orekhova T., Madden K. B., Betts C. J., Gamble H. R., Byrd C., Donaldson D., Else K. & Finkelman F. D.** (2000). STAT6 signaling promotes protective immunity against *Trichinella spiralis* through a mast cell- and T cell-dependent mechanism. *Journal of Immunology* **164**, 2046-2052.
- Usia T., Banskota A. H., Tezuka Y., Midorikawa K., Matsushige K. & Kadota S.** (2002). Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *Journal of Natural Products* **65**, 673-676.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M. & Telser J.** (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**, 44-84.
- van der Flier L. G. & Clevers H.** (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology* **71**, 241-260.
- Van Remmen H., Williams M. D., Guo Z., Estlack L., Yang H., Carlson E. J., Epstein C. J., Huang T. T. & Richardson A.** (2001). Knockout mice heterozygous for *Sod2* show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **281**, H1422-1432.
- Vaz F. M. & Wanders R. J.** (2002). Carnitine biosynthesis in mammals. *The Biochemical Journal* **361**, 417-429.

- Veerkamp J. H. & van Moerkerk H. T.** (1993). Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Molecular and Cellular Biochemistry* **123**, 101-106.
- Veldhoen M., Uyttenhove C., van Snick J., Helmby H., Westendorf A., Buer J., Martin B., Wilhelm C. & Stockinger B.** (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* **9**, 1341-1346.
- Vercruysse J., Knox D. P. Schetters T. P. & Willadsen P.** (2004). Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends in Parasitology* **20**, 488-492.
- Vermeulen K., Van Bockstaele D. R. & Berneman Z. N.** (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology* **84**, 627-639.
- Vermeulen N., Arijs I., Joossens S., Vermeire S., Clerens S., Van den Bergh K., Michiels G., Arckens L., Schuit F., Van Lommel L., Rutgeerts P. & Bossuyt X.** (2008). Anti-alpha-enolase antibodies in patients with inflammatory Bowel disease. *Clinical Chemistry* **54**, 534-541.
- Vermeulen N., Vermeire S., Arijs I., Michiels G., Ballet V., Derua R., Waelkens E., Van Lommel L., Schuit F., Rutgeerts P. & Bossuyt X.** (2011). Seroreactivity against glycolytic enzymes in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **17**, 557-564.
- Villar D., Cray C., Zaias J. & Altman N. H.** (2007). Biologic effects of fenbendazole in rats and mice: a review. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* **46**, 8-15.
- Voehringer D.** (2009). The role of basophils in helminth infection. *Trends in Parasitology* **25**, 551-556.
- Wagner M.** (1988). The effect of infection with the pinworm (*Syphacia muris*) on rat growth. *Laboratory Animal Science* **38**, 476-478.
- Wald F. A., Oriolo A. S., Casanova M. L. & Salas P. J.** (2005). Intermediate filaments interact with dormant ezrin in intestinal epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 4096-4107.
- Walford H. H. & Doherty T. A.** (2013). STAT6 and lung inflammation. *Jak-Stat* **2**, e25301.

- Wallace D. C.** (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics* **39**, 359-407.
- Walsh G. M.** (2001). Eosinophil granule proteins and their role in disease. *Current Opinion in Hematology* **8**, 28-33.
- Wang C. H., Wu S. B., Wu Y. T. & Wei Y. H.** (2013). Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Experimental Biology and Medicine* **238**, 450-460.
- Wang H. & Sama A. E.** (2012). Anti-inflammatory role of fetuin-A in injury and infection. *Current Molecular Medicine* **12**, 625-633.
- Wang H., Zhang M., Soda K., Sama A. & Tracey K. J.** (1997). Fetuin protects the fetus from TNF. *Lancet* **350**, 861-862.
- Wang L., Srinivasan S., Theiss A. L., Merlin D. & Sitaraman S. V.** (2007). Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells: potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 8219-8227.
- Wang Q., Zhou Y., Weiss H. L., Chow C. W. & Evers B. M.** (2011). NFATc1 regulation of TRAIL expression in human intestinal cells. *PLoS One* **6**, doi: 10.1371/journal.pone.0019882.
- Wang X., Hu F., Hu X., Chen W., Huang Y. & Yu X.** (2014). Proteomic identification of potential *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products capable of binding and activating human hepatic stellate cells. *Parasitology Research* **113**, 3063-3071.
- Wang X., Jin H., Du X., Cai C., Yu Y., Zhao G., Su B., Huang S., Hu Y., Luo D., She R., Luo X., Zeng X., Yi X. & Wang B.** (2008). The protective efficacy against *Schistosoma japonicum* infection by immunization with DNA vaccine and levamisole as adjuvant in mice. *Vaccine* **26**, 1832-1845.
- Wasinger V. C., Cordwell S. J., Cerpa-Poljak A., Yan J. X., Gooley A. A., Wilkins M. R., Duncan M. W., Harris R., Williams K. L. & Humphery-Smith I.** (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**, 1090-1094.

- Watanabe H., Numata K., Ito T., Takagi K. & Matsukawa A.** (2004). Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* **22**, 460-466.
- Watanabe Y., Suzuki O., Haruyama T. & Akaike T.** (2003). Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry* **89**, 244-253.
- Watmough N. J. & Frerman F. E.** (2010). The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1797**, 1910-1916.
- Watson A. J.** (1995). Necrosis and apoptosis in the gastrointestinal tract. *Gut* **37**, 165-167.
- Watson A. J. & Pritchard D. M.** (2000). Lessons from genetically engineered animal models. VII. Apoptosis in intestinal epithelium: lessons from transgenic and knockout mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **278**, G1-5.
- Weaver H.J. & Smales L.R.** (2010). Three new species of *Syphacia* (*Syphacia*) (Oxyurida: Oxyuridae) from Queensland, Australia, and key to the species present in the Australian Bioregion. *Comparative Parasitology* **77**, 9-19.
- Weaver H.J. & Smales L.R.** (2008) New species of *Syphacia* (*Syphacia*) Securata (Oxyurida: Oxyuridae) from *Pseudomys* species (Rodentia: Muridae) from central Australia. *Zootaxa* **1775**, 39-50.
- Webb E. L., Ekii A. O. & Pala P.** (2012). Epidemiology and immunology of helminth-HIV interactions. *Current opinion in HIV and AIDS* **7**, 245-253.
- Webb R. A., Hoque T. & Dimas S.** (2007). Expulsion of the gastrointestinal cestode, *Hymenolepis diminuta* by tolerant rats: evidence for mediation by a Th2 type immune enhanced goblet cell hyperplasia, increased mucin production and secretion. *Parasite Immunology* **29**, 11-21.
- Wei Y. H., Wu S. B., Ma Y. S. & Lee H. C.** (2009). Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Medical Journal* **32**, 113-132.



- Weinstein M. S. & Fried B.** (1991). The expulsion of *Echinostoma trivolvis* and retention of *Echinostoma caproni* in the ICR mouse: pathological effects. *International Journal for Parasitology* **21**, 255-257.
- Wessel D. & Flugge U. I.** (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* **138**, 141-143.
- WHO.** (2015). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases.
- WHO.** (2013). Sustaining the drive to overcome global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases.
- Wightman S. R., Wagner J. E. & Corwin R. M.** (1978). *Syphacia obvelata* in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): natural occurrence and experimental transmission. *Laboratory Animal Science* **28**, 51-54.
- Williams C. M. & Galli S. J.** (2000). The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105**, 847-859.
- Willshaw A., Grant K., Yan J., Rockliffe N., Ambavarapu S., Burdyga G., Varro A., Fukuoka S. & Gawler D.** (2004). Identification of a novel protein complex containing annexin A4, rabphilin and synaptotagmin. *FEBS Letters* **559**, 13-21.
- Wojciechowski W., Harris D. P., Sprague F., Mousseau B., Makris M., Kusser K., Honjo T., Mohrs K., Mohrs M., Randall T. & Lund F. E.** (2009). Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*. *Immunity* **30**, 421-433.
- Wojtowicz J. M. & Kee N.** (2006). BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nature Protocols* **1**, 1399-1405.
- Worthington J. J., Klementowicz J. E., Rahman S., Czajkowska B. I., Smedley C., Waldmann H., Sparwasser T., Grecis R. K. & Travis M. A.** (2013). Loss of the TGFbeta-activating integrin alpha v beta 8 on dendritic cells protects mice from chronic intestinal parasitic infection via control of type 2 immunity. *PLoS Pathogens* **9**, doi: 10.1371/journal.ppat.1003675.

- Xian C. J., Cool J. C., Howarth G. S. & Read L. C.** (2002). Effects of TGF- $\alpha$  gene knockout on epithelial cell kinetics and repair of methotrexate-induced damage in mouse small intestine. *Journal of Cellular Physiology* **191**, 105-115.
- Xue X., Ramakrishnan S. K. & Shah Y. M.** (2014). Activation of HIF-1 $\alpha$  does not increase intestinal tumorigenesis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **307**, G187-195.
- Yakob L., Williams G. M., Gray D. J., Halton K., Solon J. A. & Clements A. C.** (2013). Slaving and release in co-infection control. *Parasites & Vectors* **6**, doi: 10.1186/1756-3305-6-157.
- Yamamoto K., Qi W. M., Yokoo Y., Miyata H., Udayanga K. G., Kawano J., Yokoyama T., Hoshi N. & Kitagawa H.** (2010). Lectin histochemical detection of special sugars on the mucosal surfaces of the rat alimentary tract. *The Journal of Veterinary Medical Science/The Japanese Society of Veterinary Science* **72**, 1119-1127.
- Yamauchi J., Kawai Y., Yamada M., Uchikawa R., Tegoshi T. & Arizono N.** (2006). Altered expression of goblet cell- and mucin glycosylation-related genes in the intestinal epithelium during infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* in rat. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* **114**, 270-278.
- Yamaguti S.** (1935). Studies on the helminth fauna of Japan. Part 13. Mammalian Nematodes. *Japanese Journal of Zoology* **6**, 433-457.
- Yamaguti S.** (1941). Studies on the helminth fauna of Japan. Part 35. Mammalian nematodes, II. *Japanese Journal of Zoology* **9**, 409-439.
- Yang Z., Grinchuk V., Urban J. F., Jr, Bohl J., Sun R., Notari L., Yan S., Ramalingam T., Keegan A. D., Wynn T. A., Shea-Donohue T. & Zhao A.** (2013). Macrophages as IL-25/IL-33-responsive cells play an important role in the induction of type 2 immunity. *PLoS One* **8**, doi:10.1371/journal.pone.0059441.
- Yao G., Huffman J. E. & Fried B.** (1991). The effects of crowding on adults of *Echinostoma caproni* in experimentally infected golden hamsters. *Journal of Helminthology* **65**, 548-254.

- Yasuda K., Muto T., Kawagoe T., Matsumoto M., Sasaki Y., Matsushita K., Taki Y., Futatsugi-Yumikura S., Tsutsui H., Ishii K. J., Yoshimoto T., Akira S. & Nakanishi K.** (2012). Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 3451-3456.
- Yen T. H. & Wright N. A.** (2006). The gastrointestinal tract stem cell niche. *Stem Cell Reviews* **2**, 203-212.
- Ying S., O'Connor B., Ratoff J., Meng Q., Mallett K., Cousins D., Robinson D., Zhang G., Zhao J., Lee T. H. & Corrigan C.** (2005). Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *Journal of Immunology* **174**, 8183-8190.
- Yu L. C. & Perdue M. H.** (2001). Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. *Immunological Reviews* **179**, 61-73.
- Yuan C., Chen W. X., Zhu J. S., Chen N. W., Lu Y. M., Ou Y. X. & Chen H. Q.** (2013). IL-10 treatment is associated with prohibitin expression in the Crohn's disease intestinal fibrosis mouse model. *Mediators of Inflammation* **2013**, doi: 10.1155/2013/617145.
- Yuan J. & Kroemer G.** (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes & Development* **24**, 2592-2602.
- Yusuf S., Nok A. J., Ameh D. A., Adelaiye A. B. & Balogun E. O.** (2005). Correlation of gastric mucosal damage with sialic acid profile in rats: effect of hydrochloric acid, pepsin and hypertonic saline. *Cell Biochemistry and Function* **23**, 339-345.
- Zaidi M. R., Davis S., Noonan F. P., Graff-Cherry C., Hawley T. S., Walker R. L., Feigenbaum L., Fuchs E., Lyakh L., Young H. A., Hornyak T. J., Arnheiter H., Trinchieri G., Meltzer P. S., De Fabo E. C. & Merlino G.** (2011). Interferon-gamma links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. *Nature* **469**, 548-553.
- Zaiss M. M., Maslowski K. M., Mosconi I., Guenat N., Marsland B. J. & Harris N. L.** (2013). IL-1 $\beta$  suppresses innate IL-25 and IL-33 production and maintains helminth chronicity. *PLoS Pathogens* **9**, doi: 10.1371/journal.ppat.1003531.
- Zhang M., Caragine T., Wang H., Cohen P. S., Botchkina G., Soda K., Bianchi M., Ulrich P., Cerami A., Sherry B. & Tracey K. J.** (1997). Spermine inhibits proinflammatory

cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *The Journal of Experimental Medicine* **185**, 1759-1768.

**Zhang M., Wang H. & Tracey K. J.** (2000). Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. *Critical Care Medicine* **28**, N60-66.

**Zhang W., Du X., Zhao G., Jin H., Kang Y., Xiao C., Liu M. & Wang B.** (2009). Levamisole is a potential facilitator for the activation of Th1 responses of the subunit HBV vaccination. *Vaccine* **27**, 4938-4946.

**Zhang Y., Jia L., Lee S. J. & Wang M. M.** (2007). Conserved signal peptide of Notch3 inhibits interaction with proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**, 245-251.

**Zhao A., McDermott J., Urban J. F., Jr, Gause W., Madden K. B., Yeung K. A., Morris S. C., Finkelman F. D. & Shea-Donohue T.** (2003). Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on STAT6 and enteric nerves. *Journal of Immunology* **171**, 948-954.

**Zhao A., Urban J. F., Jr, Anthony R. M., Sun R., Stiltz J., van Rooijen N., Wynn T. A., Gause W. C. & Shea-Donohue T.** (2008). Th2 cytokine-induced alterations in intestinal smooth muscle function depend on alternatively activated macrophages. *Gastroenterology* **135**, 217-225.

**Zhao A., Urban J. F., Jr, Sun R., Stiltz J., Morimoto M., Notari L., Madden K. B., Yang Z., Grinchuk V., Ramalingam T. R., Wynn T. A. & Shea-Donohue T.** (2010). Critical role of IL-25 in nematode infection-induced alterations in intestinal function. *Journal of Immunology* **185**, 6921-6929.

**Zhao L. & Ackerman S. L.** (2006). Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology* **18**, 444-452.

**Zhao Y., Oberley T. D., Chaiswing L., Lin S. M., Epstein C. J., Huang T. T. & St Clair D.** (2002). Manganese superoxide dismutase deficiency enhances cell turnover via tumor promoter-induced alterations in AP-1 and p53-mediated pathways in a skin cancer model. *Oncogene* **21**, 3836-3846.

- Zhao Y., Xue Y., Oberley T. D., Kiningham K. K., Lin S. M., Yen H. C., Majima H., Hines J. & St Clair D.** (2001). Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor formation by modulation of activator protein-1 signaling in a multistage skin carcinogenesis model. *Cancer Research* **61**, 6082-6088.
- Zhou L., Lopes J. E., Chong M. M., Ivanov I. I., Min R., Victora G. D., Shen Y., Du J., Rubtsov Y. P., Rudensky A. Y., Ziegler S. F. & Littman D. R.** (2008a). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* **453**, 236-240.
- Zhou Y., Weyman C. M., Liu H., Almasan A. & Zhou A.** (2008b). IFN-gamma induces apoptosis in HL-60 cells through decreased Bcl-2 and increased Bak expression. *Journal of Interferon & Cytokine research: the Official Journal of The International Society for Interferon and Cytokine Research* **28**, 65-72.
- Zhu K. J., Huang H., Chu H., Yu H. & Zhang S. M.** (2014). Alterations in enterocyte mitochondrial respiratory function and enzyme activities in gastrointestinal dysfunction following brain injury. *World Journal of Gastroenterology: WJG* **20**, 9585-9591.