

TESIS DOCTORAL  
ALICIA GALIANO HERNÁNDEZ

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

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE *STRONGYLOIDES*  
*STERCORALIS* DE UTILIDAD PARA EL DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE LA  
ENFERMEDAD MEDIANTE TÉCNICAS “ÓMICAS”.**

DIRIGIDA POR:  
ANTONIO MARCILLA DÍAZ





VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA



Facultat de Farmàcia

---

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I PARASITOLOGIA  
FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

## TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Parasitología Humana y Animal

# Identificación y caracterización de proteínas de *Strongyloides stercoralis* de utilidad para el diagnóstico y control de la enfermedad mediante técnicas “ómicas”

por

**ALICIA GALIANO HERNÁNDEZ**

Director

**Dr. ANTONIO MARCILLA DÍAZ**

Profesor Titular de Parasitología

Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia

Facultat de Farmàcia, Universitat de València

Valencia, 2016



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

CERTIFICA: que Doña ALICIA GALIANO HERNÁNDEZ ha realizado íntegramente el trabajo experimental titulado *“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE STRONGYLOIDES STERCORALIS DE UTILIDAD PARA EL DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD MEDIANTE TÉCNICAS ÓMICAS”*, en el Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València con el fin de optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Valencia a 28 de enero de 2016.

Fdo: Dr. A. Marcilla Díaz



***“habéis evolucionado del gusano al hombre, y hay en vosotros todavía  
mucho del gusano”***

Friedrich Nietzsche (Así habló Zaratustra)



## ***Agradecimientos:***

Me gustaría aprovechar este espacio para expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar agradecer a mi director Antonio Marcilla Díaz, Profesor titular de Parasitología del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, por darme la oportunidad de participar en este proyecto. Agradezco especialmente la confianza depositada en mí, su constante apoyo en el desarrollo de mi carrera científica y su contagiosa pasión por el mundo de la investigación.

También me gustaría hacer una mención especial al Dr. José Guillermo Esteban Sanchís, Profesor titular del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, ya que ha sido uno de los principales impulsores de este proyecto, y al que agradezco sus esfuerzos para que yo pudiera participar en el mismo.

A los profesores del Área de Parasitología, Márius Fuentes, M<sup>a</sup> Teresa Galán, Santiago Mas-Coma, M<sup>a</sup> Dolores Bargues, Adela Valero, Rafael Toledo y con afecto a Carla Muñoz por su apoyo en mis primeros pasos en el Departament. Especialmente agradecerle a la profesora María Trelis su ayuda, tanto en el laboratorio como fuera de él, y es que personas como ella hacen mucha falta. También, agradecer a la Técnico del laboratorio Araceli Terrones, por hacer más fácil nuestro trabajo con su esfuerzo y por sus ánimos durante las horas de laboratorio; a Clemente Bañuls, administrativo del Departament, que siempre nos socorre en los momentos de desesperación burocrática.

Especialmente y con mucho cariño, agradezco a la Dra. Dolores Bernal la ayuda que me ha brindado para poder finalizar esta memoria y por hacer que me esfuerce cada día más para ser mejor en mi trabajo. Para mí, una grandísima maestra e investigadora con la que he tenido la suerte de compartir este

tiempo y una persona preciosa siempre dispuesta a ayudar a los demás. Gracias de todo corazón.

A todos los compañeros de laboratorio con los he coincidido a lo largo de estos años y con los que he pasado tantos buenos ratos, compartido inquietudes, risas y algún que otro momento de desesperación, al Dr. Ignacio Pérez, a Patricio Artigas, siempre dispuesto a echar una mano a quien lo necesite, al paciente Messaud Kouhbane, a mi compañera de máster y ahora amiga Raquel Peixoto, a las “supertrabajadoras” y ya doctoras Alba Cortés y Ángela Debenedeti, a mi “ayudanta” Irene Iglesias, a María José Irisarri, una de las personas más buenas que he conocido, y a Lucía de Mateo y Vivi Lima que siempre han estado ahí cuando las he necesitado. También a las nuevas incorporaciones del laboratorio, Sonia Adam, M<sup>a</sup> Ángeles Martínez, Marta Reguera y Javi Roig. Gracias y ánimo muchachada!

Me gustaría agradecer especialmente a las doctoras Melissa Higón y Elena Madrid, que han sido más amigas que compañeras, así como a Carla Quesada y Rai Seguí, ya que, aunque de momento no vayamos a compartir aventuras en el laboratorio espero sigamos haciéndolo fuera de él.

Sin duda, el agradecimiento más sentido para mí es hacia mi familia. A mis hermanos Pablo y Carolina, que siempre están a mi lado para afrontar la vida con más que una sonrisa, una carcajada; a mi mamá, que me apoya en todos mis proyectos por raros que le parezcan; y a mi papá y mi “abueli”, un ejemplo en la vida para mí, todo por y para ellos. Siempre en mi corazón.

No puedo terminar estos agradecimientos sin mencionar a aquellas personas que han vivido todo este proceso a mi lado en primera persona, ofreciéndome su apoyo constantemente, y aguantando mis lamentos en los momentos de adversidad, mis buenas amigas traídas por el azar y el amor perruno Laura, Kenya y Nuria; amigos que aun estando lejos se hacen sentir cerquita, Lis, Rita, Chusa, Jose y Luis. A mis grandes amigas de ayer, hoy y siempre, María, Marina, Almu y Karol, que afortunada me siento de teneros en mi vida, nunca me defraudáis. A Gabri, por tantos momentos felices que me ha traído, por sus

ánimos y apoyo que han sido tan importantes, y por ayudarme a ver quién puedo ser y lo que soy capaz de hacer.

Durante mis cinco años en Valencia he conocido a muchísima gente bonita que me ha regalado grandes momentos y experiencias, a todos ellos, y a la ciudad que ha sido mi hogar este tiempo, les agradezco su calor, sus risas, su amor y su compañía a lo largo de este camino.

Y por supuesto a mi perrita Musa, que me mira con esos preciosos ojos de adoración y amor infinitos y me alegra el corazón.

Agradecer a las Dras. Esperanza Rodríguez y Teresa Gárate, del Instituto de Salud Carlos III por facilitarnos sueros de pacientes afectos de diferentes helmintiasis. Del mismo modo, agradecer a las Dras. Araceli Molina de Diego y María Victoria Domínguez, pertenecientes cuando se inició el estudio, a los Hospitales de Gandía y La Ribera, respectivamente, por la cesión de sueros de pacientes de estrogiloidiasis.

A la Dra. Elizabeth Ferrer de la Universidad de Carabobo, Valencia (Venezuela) por su ayuda en la puesta a punto de los ensayos con péptidos sintéticos. A mi compañero del máster Pau Laullón, con quien se llevaron a cabo los primeros ensayos de evaluación de dichos péptidos.

Para la realización de esta Tesis he disfrutado de un contrato predoctoral dentro del Programa Prometeo de la Conselleria d'Educació, Universitat i Ciència de la Generalitat Valenciana (España), que me ha dado la oportunidad tanto de realizar esta investigación, como de colaborar en tareas docentes.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida de las siguientes Ayudas:

-PROMETEO/2009/081 de la Conselleria d'Educació, Universitat i Ciència (Generalitat Valenciana);

-PS09/02355 del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Ministerio de Ciencia e Innovación y fondos FEDER



## **Resumen:**

El nematodo *Strongyloides stercoralis* es el principal causante de la estrogiloidiasis humana. Debido a la capacidad del parásito de perpetuar un ciclo autoinfectivo la infección puede prolongarse durante años en el hospedador, dando lugar a una enfermedad crónica en personas inmunocompetentes, mientras que en condiciones de inmunosupresión puede desembocar en cuadros clínicos graves con elevadas tasas de mortalidad. La región de La Safor valenciana ha sido considerada foco endémico de este parásito desde hace más de un siglo, habiéndose diagnosticado cientos de casos desde entonces, suponiendo un problema sanitario en la región.

La presente Tesis contribuye a la mejora en el conocimiento proteómico de la larva infectante del parásito, L3i, con el fin de identificar nuevas moléculas para el diagnóstico de la enfermedad. Para ello se ha realizado un análisis de los transcritos más abundantes de la larva L3i, clonándose 8 de ellos, y obteniendo finalmente 5 fragmentos de proteínas recombinantes: Antígeno principal-*Major antigen*, 14-3-3 zeta, Aminopeptidasa sensible a puromicina, Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4. Se han realizado diferentes ensayos para valorar la antigenicidad de estos fragmentos proteicos y su capacidad de ser reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes enfermos. Además, se generaron anticuerpos policlonales frente a fragmentos de las proteínas 14-3-3 zeta, Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4, evaluándose su posible utilidad como herramienta diagnóstica específica para *S. stercoralis*.

Con idéntico fin, se han producido péptidos sintéticos a partir de las proteínas 14-3-3, Metaloproteinasa, TROPOMIOSINA y GALECTINA identificadas en larvas L3i de *S. stercoralis*. Los ensayos inmunoenzimáticos, utilizando sueros de pacientes de diversos orígenes, han demostrado mayor reconocimiento para 2 de los 9 péptidos sintetizados, obteniéndose buenos resultados en cuanto a sensibilidad (hasta del 93%).

Finalmente se han realizado estudios de inmunolocalización de las proteínas 14-3-3 zeta, Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4 en cortes de vermes utilizando los anticuerpos policlonales producidos, y se ha contribuido a mejorar el conocimiento morfológico de la L3i, realizando un estudio de la superficie del parásito mediante microscopía electrónica de barrido.



## **Resum:**

El nematode *Strongyloides stercoralis* és el principal causant de l'estrongiloidiasis humana. Degut a la capacitat del paràsit per a perpetuar el cicle autoinfectiu, la infecció pot prolongar-se durant anys en l'hoste, donant lloc a una malaltia crònica en persones immunocompetents, mentre que en condicions d'immunosupressió pot desembocar en quadres clínics greus amb elevades taxes de mortalitat. La regió de La Safor valenciana ha sigut considerada focus endèmic d'aquest paràsit des de fa més d'un segle, havent-se diagnosticat centenars de casos des d'aleshores i ha suposat un problema sanitari en la regió.

La present Tesis contribueix a la millora del coneixement proteòmic de la larva infectant del paràsit (L3i), amb la finalitat d'identificar noves mol·lècules que presenten aplicació en el diagnòstic de la malaltia. Per tal de dur-ho a terme s'ha realitzat un anàlisi dels transcrits més abundants de la larva L3i, clonant-se vuit d'ells i obtenint 5 fragments de proteïnes recombinants corresponents a: Antigen principal-*Major antigen*, 14-3-3 zeta, Aminopeptidasa sensible a puromicina, Ferritina 1 i Proteasa aspàrtica. S'han realitzat assatjos per tal de valorar l'antiguitat d'aquests fragments proteics i la seua capacitat per a ser reconeguts pels anticossos presents als sèrums de pacients afectats per la malaltia. Els fragments de proteïnes recombinants s'han utilitzat per a generar anticossos policlonals específics enfront de les proteïnes 14-3-3, Ferritina i Proteasa aspàrtica, com una ferramenta diagnòstica de *S. stercoralis*.

Amb el mateix fi, s'han produït pèptids sintètics a partir de les proteïnes de L3i de *S. stercoralis*, Metaloproteinase, Tropomiosina i Galectina. Els assatjos immunoenzimàtics, utilitzant sèrums de pacients de diversos orígens, han demostrat una major capacitat immunogènica per a 2 dels 9 pèptids sintetitzats, obtenint-se bons resultats pel que fa a l'especificitat i la sensibilitat (fins al 93%).

Finalment s'han realitzat estudis d'immunolocalització de les proteïnes 14-3-3, zeta Ferritina 1 y Proteasa aspàrtica 4 en talls de vermes utilitzant els anticossos policlonals produïts, i s'ha contribuït a millorar el coneixement morfològic de la L3i, realitzant un estudi de la superfície del parasite per mitj de SEM



## **Abstract:**

The nematode *Strongyloides stercoralis* is the causative agent of human strongyloidiasis. Since the life cycle of this parasite allows autoinfections, strongyloidiasis can become a chronic disease in immunocompetent individuals, while in immunocompromised is not rare the evolution to a severe and even a fatal course of the infection. The region of La Safor valenciana has been considered an endemic focus of the parasite since more than a century ago, with hundreds of cases diagnosed since then; strongyloidiasis is a sanitary problem in this region.

This Doctoral Thesis provides new information about the protein content of the infective stage of the parasite, L3i larvae, in order to identify new molecules that could be applied in diagnosis. An analysis of the most abundant transcripts of L3i larvae was performed, cloning 8 of them, and finally obtaining 5 fragments of recombinant proteins: Major antigen, 14-3-3 zeta protein, Puromycin-sensitive aminopeptidase, Ferritin 1 and Aspartic protease 4. Also, several assays to evaluate antigenicity of these fragments, as well as the capacity of recognition by antibodies in serum of infected patients were done. In the same way, polyclonal antibodies have been generated against 3 fragments of recombinant proteins: 14-3-3 zeta, Ferritin 1 and Aspartic protease, which were employed as a diagnostic tool for the identification of the parasite.

With the same purpose, synthetic peptides from the proteins of L3i larvae, Metalloproteinase, Tropomyosin and Galectin, were produced. Immunoenzymatic assays using serum of infected patients demonstrate greater immunogenic potential in 2 of the 9 synthetic peptides, with good sensitivity (up to 93%).

Finally, an immunolocalization study of 14-3-3 zeta, Ferritin 1 and Protease aspartic 4 proteins was performed on larvae L3i cuts of *S. stercoralis*, using the polyclonal antibodies produced previously at the laboratory, also it has contributed to the improvement of the morphological knowledge of the surface of the L3i larvae, carried on by analysis with Scanning Electron Microscopy (SEM).



### ***Listado de abreviaturas:***

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BSA: Albúmina sérica bovina

CDC: Centro para el control y prevención de enfermedades EE.UU

DMSO: Dimetilsulfóxido

ED: Estrongiloidiasis diseminada

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

E/S: Excreción-secreción

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzima

GAH: Suero anti-inmunoglobulina humana generado en cabra

GAR: Suero anti-inmunoglobulina de conejo generado en cabra

HTLV-1: Virus linfotrópico humano de células T tipo 1

IFAT: Ensayo de inmunofluorescencia

IL: Interleucina

INF: Interferón

IPTG: Isopropil b-D-tiogalactopiranosido

L1r: Fase larvaria 1 ó rabaditoide

L3i: Fase larvaria filariforme 3 ó infectante

LB: Medio Luria Bertani

LIPS: Sistema de inmunoprecipitación de luciferasa

NCBI: Centro nacional de información biotecnológica EE.UU

OPD: Orto-fenilen-diamina

PBS: Tampón fosfato salino

PMSF: Metil-fenilensulfóxido

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SDS: Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SH: Síndrome de hiperinfección

TCA: Ácido tricloroacético

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TBS: Tampón Tris salino

TBS-T: Tampón Tris salino-Tween 20

Th1: Linfocitos T cooperadores de tipo 1

Th2: Linfocitos T cooperadores de tipo 2

TNF: Factor de necrosis tumoral

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Aspectos generales sobre <i>Strongyloides stercoralis</i>.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Morfología y ciclo de vida.....	5
<b>1.2. Estrongiloidiasis .....</b>	<b>10</b>
1.2.1. Epidemiología de la enfermedad.....	10
1.2.2. Clínica de la enfermedad .....	12
1.2.2.1. Estrongiloidiasis aguda .....	12
1.2.2.2. Estrongiloidiasis crónica .....	13
1.2.2.3. Síndrome de hiperinfección (SH).....	13
1.2.2.4. Estrongiloidiasis diseminada .....	14
1.2.3. Tratamiento .....	15
1.2.4. Diagnóstico .....	18
1.2.4.1. Métodos parasitológicos .....	19
1.2.4.2. Métodos inmunológicos.....	20
1.2.4.3. Métodos moleculares.....	24
<b>1.3. Respuesta inmunitaria del hospedador frente a la infección por <i>S. stercoralis</i> ...</b>	<b>25</b>
<b>1.4. Grupos de riesgo frente a la infección por <i>S. stercoralis</i> .....</b>	<b>27</b>
1.4.1. Co-infectados con VIH .....	27
1.4.2. Co-infectados con HTLV-1.....	28
1.4.3. Pacientes en tratamiento con corticosteroides.....	29
1.4.4. Pacientes con órganos trasplantados .....	29
1.4.5. Alcoholismo .....	30
<b>1.5. Estudios de proteómica sobre <i>Strongyloides</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Material parasitario.....</b>	<b>39</b>
3.1.1. Larvas L3i de <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	39
3.1.2. Otros parásitos .....	39

<b>3.2. Muestras biológicas humanas .....</b>	<b>40</b>
3.2.1. Muestras de heces.....	40
3.2.2. Sueros .....	40
<b>3.3. Bacterias y condiciones de crecimiento .....</b>	<b>41</b>
<b>3.4. Plásmidos vectores.....</b>	<b>42</b>
3.4.1. Vector de clonación .....	42
3.4.2. Vector de expresión.....	43
<b>3.5. Nucleótidos cebadores .....</b>	<b>44</b>
<b>3.6. Péptidos sintéticos .....</b>	<b>46</b>
<b>3.7. Métodos coproparasitológicos .....</b>	<b>47</b>
<b>3.8. Clonación de cDNA codificantes para los fragmentos proteicos .....</b>	<b>49</b>
3.8.1. Extracción del RNA total a partir de larvas L3i.....	49
3.8.2. Amplificación de los cDNA codificantes mediante RT-PCR.....	49
3.8.3. Obtención de bacterias competentes y transformación de bacterias por choque térmico.....	51
3.8.4. Construcción de los plásmidos en el vector pJET .....	52
3.8.5. Construcción de los plásmidos en el vector de expresión.....	52
<b>3.9. Obtención de proteínas recombinantes en bacterias .....</b>	<b>54</b>
3.9.1. Inducción de la expresión de los genes codificantes .....	54
3.9.2. Purificación de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	55
3.9.3. Obtención de proteínas recombinantes mediante dilución en DMSO .....	56
<b>3.10. Análisis de proteínas .....</b>	<b>56</b>
3.10.1. Obtención de proteínas .....	56
3.10.2. Cuantificación de Proteínas .....	57
3.10.3. Electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida .....	57
3.10.4. Tinción de geles .....	58
3.10.5. Transferencia a membrana ( <i>Western blot</i> ).....	58
3.10.6. Tinción de membranas .....	58
3.10.7. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas.....	59

<b>3.11. Evaluación de la reactividad de proteínas recombinantes frente a suero de pacientes mediante <i>Slot blot</i>.....</b>	<b>60</b>
<b>3.12. Producción de anticuerpos policlonales.....</b>	<b>61</b>
3.12.1. Inmunización de conejos .....	61
3.12.2. Purificación de anticuerpos .....	62
<b>3.13. Ensayos inmunoenzimáticos.....</b>	<b>62</b>
3.13.1. ELISA indirecto .....	62
3.13.2. ELISA de captura .....	64
<b>3.14. Inmunolocalización de proteínas en cortes de vermes mediante microscopía láser confocal.....</b>	<b>64</b>
3.14.1. Preparación de muestras para inmunohistoquímica.....	65
3.14.2. Protocolo de tinción de las muestras .....	65
<b>3.15. Estudio microscópico de la superficie y cortes de <i>S. stercoralis</i> .....</b>	<b>66</b>
3.15.1. Preparación de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) ...	66
<b>3.16. Análisis comparativo de las secuencias codificantes para las proteínas objeto del estudio en diferentes fases del parásito .....</b>	<b>67</b>
<b>3.17. Programas informáticos de análisis de secuencias aminoacídicas y nucleotídicas .....</b>	<b>67</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1. Evaluación de la capacidad diagnóstica de péptidos sintéticos correspondientes a proteínas de larvas L3i de <i>S. stercoralis</i> mediante <i>ELISA</i> indirecto.....</b>	<b>71</b>
<b>4.2. Análisis de las secuencias más abundantes del transcriptoma de la larva L3i de <i>S. stercoralis</i> .....</b>	<b>84</b>
<b>4.3. Estudio de la expresión en diferentes fases del ciclo de vida de <i>S. stercoralis</i> de los transcritos codificantes para las proteínas objeto del estudio .....</b>	<b>90</b>
<b>4.4. Clonación de los cDNA codificantes y secuenciación para la producción de proteínas recombinantes. ....</b>	<b>92</b>
<b>4.5. Obtención de las proteínas recombinantes .....</b>	<b>99</b>

<b>4.6. Evaluación de la capacidad diagnóstica de las proteínas recombinantes obtenidas .....</b>	<b>103</b>
<b>4.7. Obtención y evaluación de anticuerpos policlonales con finalidad diagnóstica</b>	<b>104</b>
4.7.1. Estudio de la especificidad de los anticuerpos policlonales frente a las proteínas mediante <i>Western blot</i> .....	104
<b>4.8. Inmunolocalización de proteínas objeto de estudio en cortes histológicos de larvas L3i de <i>Strongyloides stercoralis</i> .....</b>	<b>107</b>
<b>4.9. Estudio morfológico mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie de larvas L3i de <i>S. stercoralis</i> .....</b>	<b>109</b>
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>113</b>
5.1. Sobre el análisis de proteínas de la larva L3i de <i>S. stercoralis</i> para su producción como proteínas recombinantes.....	118
5.2 Sobre el uso de proteínas recombinantes para el desarrollo de nuevos sistemas diagnósticos .....	126
5.3. Sobre la utilidad diagnóstica de los péptidos sintéticos obtenidos a partir de proteínas inmunogénicas de larvas L3i .....	128
5.4. Sobre el estudio morfológico de la superficie de la larva L3i.....	134
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>137</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>141</b>

# ***1. Introducción***



## 1. Introducción

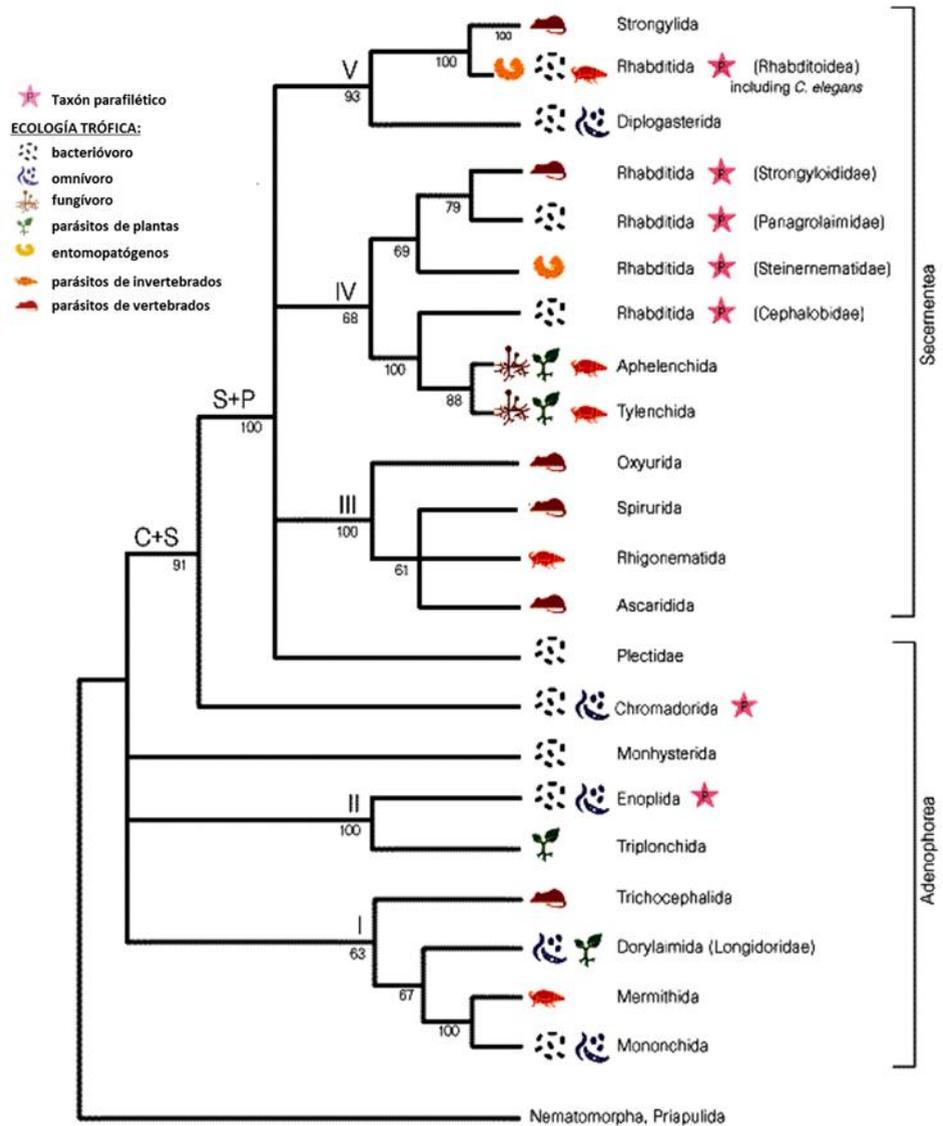
### 1.1. Aspectos generales sobre *Strongyloides stercoralis*

Los helmintos del género *Strongyloides*, el cual comprende más de 50 especies de parásitos gastrointestinales, afectan a una gran variedad de vertebrados, la mayoría de ellos mamíferos, existiendo también especies propias de anfibios, reptiles y aves (Speare, 1989).

El género *Strongyloides* se encuentra incluido en la familia Strongyloididae, y forma parte a su vez de la superfamilia Strongyloidoidea, dentro del orden Rhabditida y de la Clase Secernentea (Phasmidia).

Según los estudios llevados a cabo por Blaxter *et al.* (1998) relativos a la filogenia del Phylum Nematoda y basados en el análisis comparativo de DNA de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSU) de 53 especies, el género *Strongyloides* queda incluido en el Clado IV, junto con otras especies parásitas de plantas e insectos y especies bacteriófagas de vida libre (Figura 1.1). Estos análisis han sido apoyados por trabajos posteriores (Dorris *et al.*, 2002).

Los integrantes de este género presentan, además, gran especificidad con sus hospedadores, de manera que frecuentemente cada especie parasita a una sola, o bien a un grupo reducido de especies hospedadoras (Viney & Lok, 2015). Los trabajos llevados a cabo por Dorris *et al.* (2002), basados en el estudio de genes de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rDNA) de varios miembros del género *Strongyloides*, así como de otros nematodos relacionados con el mismo, pusieron de manifiesto la alta semejanza molecular existente entre las especies que componen este género. Ello podría implicar que la gran variedad de especies de *Strongyloides* existentes y su estrecha asociación con sus hospedadores, son debidas a un fenómeno de radiación explosiva y posterior colonización de nuevos hospedadores, y no como consecuencia de una larga co-evolución parásito-hospedador.



**Figura 1.1:** Relaciones filogenéticas dentro del *Phylum* Nematoda, basadas en el estudio de las secuencias de SSU. Modificado de Blaxter *et al.*, 1998.

Otra peculiaridad de este género es su ciclo biológico, con parasitismo facultativo, en el cual se produce alternancia de generaciones de las fases adultas, habiendo machos y hembras de vida libre que copulan en el medio externo, mientras que la fase adulta parásita son siempre hembras que se reproducen mediante partenogénesis en el intestino del hospedador (Schad, 1989). En el caso de *S. stercoralis*, este hecho, llevó en un principio al error de creer que se trataban de dos especies diferentes (Bavay, 1876; Bavay, 1877), hasta que se descubrió que realmente eran estadios diferentes de un mismo parásito (Grassi, 1879).

Tres son las especies del género causantes de estrongiloidiasis en el ser humano: *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876), que también es capaz de infectar a perros y otros primates y es la especie más extendida; *Strongyloides fuelleborni fuelleborni* (von Linstow, 1905), especie propia de primates no humanos en África, pero cuya su posible transmisión al ser humano ha sido demostrada y la subespecie *Strongyloides fuelleborni kelleyi* (Kelly *et al.*, 1976; Viney *et al.*, 1991), aislada tanto en primates como en seres humanos en Papúa Nueva Guinea.

### **1.1.1. Morfología y ciclo de vida**

Las principales características morfológicas de los estadios más importantes que aparecen a lo largo del ciclo de vida de *S. stercoralis* (Little, 1966; Carrada-Bravo, 2008) se detallan a continuación:

Hembra adulta de vida libre: El cuerpo es pequeño con forma de huso y presenta una fina estriación transversal. Puede alcanzar los 1,5 mm de longitud con un diámetro de 85  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Presenta un esófago rabditoide. Los ovarios son didelfos, con la vulva cerca de la mitad del cuerpo. La vagina es muy corta, con receptáculo seminal. El útero puede contener hasta 28 huevos, que no se disponen en fila uno tras otro (Figura 1.2.A, D).

Macho adulto de vida libre: Algo más pequeño que la hembra de vida libre, con un máximo de 1,2 mm de longitud y 55  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente. Esófago rabditoide al igual que en la hembra de vida libre. Presenta dos espículas cortas e iguales entre sí en el extremo caudal, el cual una vez fijado el ejemplar, queda ligeramente curvado (Figura 1.2.B).

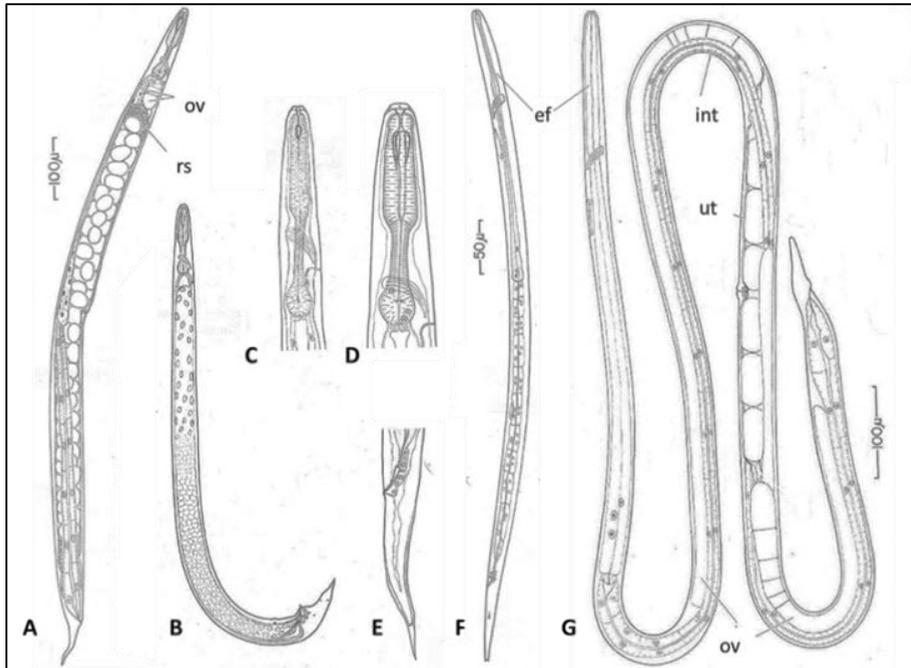
Hembra adulta parásita: Presenta un cuerpo delgado con el extremo final romo y la cutícula finamente estriada. Es más larga que la hembra de vida libre con una longitud de 2-4 mm y 75  $\mu\text{m}$  de diámetro. El esófago es filariforme y largo, ocupando el primer tercio de su cuerpo. El sistema reproductor es similar al de la hembra de vida libre pero más largo y carece de receptáculo seminal, además la vulva se abre en el tercio final del cuerpo. El útero es corto, y generalmente no contiene más de 6 huevos, dispuestos en fila uno tras otro (Figura 1.2.G).

Huevo: Tanto los que proceden de la hembra de vida libre como los de la hembra parásita, son de apariencia prácticamente idéntica, pudiendo haber pequeñas variaciones en cuanto al tamaño. Son de forma elipsoidal, de 40-70  $\mu\text{m}$  longitud, siendo su longitud el doble que la anchura, aproximadamente. En el caso de las hembras parásitas, suelen eclosionar en el interior del intestino del hospedador, mientras que en el caso de los que proceden de hembras de vida libre, suelen hacerlo al ser depositados en el suelo, pero también en el propio útero de la hembra.

Primer estadio larvario o larva rabditoide (L1r): Cuerpo entre 150-390  $\mu\text{m}$  de longitud y entre 14 y 20  $\mu\text{m}$  de ancho. Presentan una cápsula bucal corta y esófago rabditoide, similar al de los adultos de vida libre, que se extiende hasta el primer tercio del cuerpo. Presentan un primordio genital prominente. El extremo caudal es afilado (Figura 1.2.C, E).

Estadio infectante o larva filariforme (L3i): El cuerpo es delgado entre 400 y 700  $\mu\text{m}$  de longitud y 12-20  $\mu\text{m}$  de diámetro. El esófago es filariforme como en la hembra adulta parásita, y ocupa alrededor del 40% del cuerpo. El extremo

posterior está truncado, lo cual es un rasgo característico de este tipo de larvas (Figura 1.2.F).



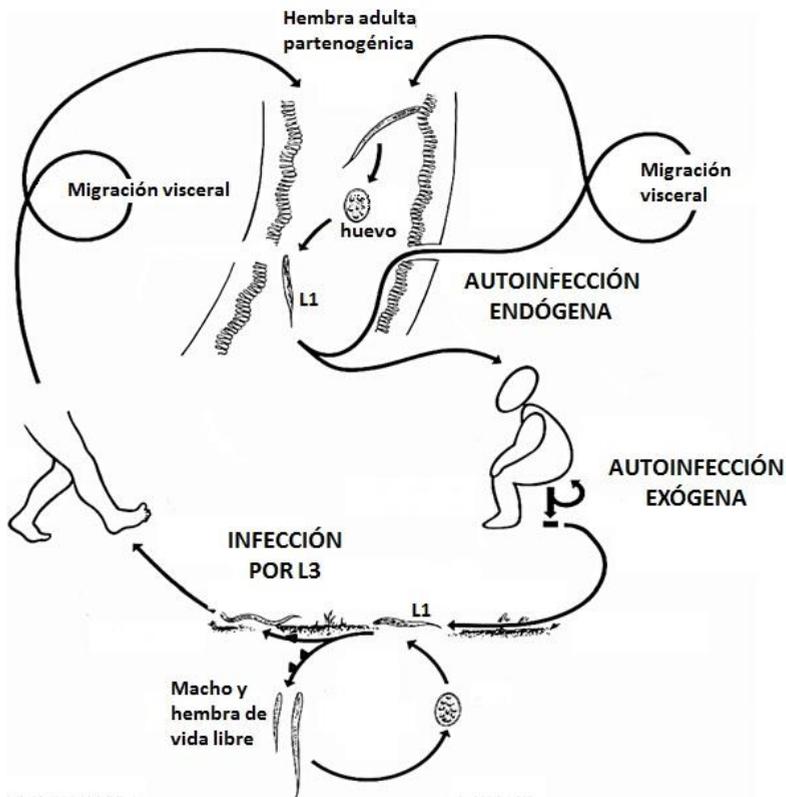
**Figura 1.2:** Esquema de las fases de *S. stercoralis*. A) Hembra adulta de vida libre; B) Macho adulto de vida libre; C) Extremo anterior de la larva rabditoide L1r; D) Extremo anterior de la hembra de vida libre; E) Extremo posterior de L1r; F) Larva filariforme L3i; G) Hembra adulta parásita. ef: esófago filariforme; int: intestino; ov: ovario; rs: receptáculo seminal; ut: útero. Modificado de Little (1966).

Como se comentó anteriormente, los miembros del género *Strongyloides* presentan alternancia de generaciones, por lo tanto, puede darse un ciclo homogónico, que tiene lugar en el interior del hospedador y donde la forma adulta parásita son siempre hembras que se reproducen mediante partenogénesis, o un ciclo heterogónico, en el medio externo, con machos y hembras de vida libre que copulan y dan lugar a una nueva generación (Figura 1.3).

## Introducción

La infección se produce cuando la L3i, que se encuentra en el medio externo generalmente en zonas húmedas y frescas, entra en contacto con la piel del hospedador y penetra a través de ella. Una vez en el interior del cuerpo, las larvas alcanzan los capilares, y a través de ellos experimentan una migración por el cuerpo del hospedador. Tras llegar a los alveolos pulmonares, ascienden por los bronquios, la tráquea y son deglutidos para llegar finalmente al duodeno. Las larvas L3i experimentan dos mudas durante esta migración hasta pasar a ser hembras adultas parásitas. Éstas se hayan embebidas en la submucosa del duodeno, en el interior de las criptas de Lieberkühn, donde liberan los huevos. En el caso de *S. stercoralis*, los huevos maduran rápidamente, así que en las heces ya aparece el primer estadio larvario (L1r). En el caso de las especies de *S. fuelleborni*, el desarrollo es algo más lento, por lo que es común encontrar huevos en las heces de personas infectadas.

En ocasiones, las L1r desarrollan rápidamente y pasan a L3i en el lumen intestinal del hospedador. Estas L3i son capaces de atravesar las paredes del duodeno y acceder al sistema circulatorio, generando un ciclo de autoinfección endógeno. Esta capacidad del parásito de perpetuar el ciclo infeccioso sin necesidad de salir de un mismo hospedador, es exclusiva de *S. stercoralis* y puede desembocar en la cronicidad de la enfermedad parasitaria, capaz de prolongarse durante décadas (Prendki *et al.*, 2011; Bailey *et al.*, 2015). También puede darse un ciclo de autoinfección exógeno cuando las L3i perpetúan la infección penetrando a través de los márgenes perianales, siendo esta situación más común en casos en los que la higiene personal es inadecuada. Una vez en el exterior, las L1r pueden, o bien experimentar dos mudas hasta convertirse nuevamente en L3i, o bien experimentar 4 mudas y dar lugar a adultos de vida libre, machos y hembras. Los adultos de vida libre copulan y las hembras liberan los huevos de los que emergen L1r, que tras 2 mudas evolucionan siempre a la forma L3i, ya que en el caso de *S. stercoralis*, solo existe una generación de vida libre (Streit, 2008). Las L3i no se alimentan en el medio externo, y pueden sobrevivir hasta 2 semanas antes de infectar a un nuevo hospedador (Grove, 1989).



**Figura 1.3:** Ciclo de vida de *S. stercoralis*, donde se indican las tres posibles vías de infección: Autoinfección endógena, Autoinfección exógena y a través de la piel. Modificado de Olsen *et al.*, 2009.

Aún no se conocen con exactitud los mecanismos que determinan el curso que van a seguir las L1r al emerger del huevo, esto es si madurarán dando lugar a adultos de vida libre (machos y hembras) o lo harán a la forma adulta parásita. En el caso de la sexualidad, ésta puede estar determinada genéticamente, lo que implica que el sexo se establece en el momento en el que el nuevo individuo se está formando, o bien puede depender de factores ambientales (Pires-da Silva, 2007). Se ha demostrado, que la sexualidad de las larvas de *S. stercoralis* está influenciada por el estado inmunológico del hospedador, de manera que un incremento de la respuesta inmunitaria de éste, conduce a una

mayor proporción de nuevos machos (Streit, 2008). Además, estudios citológicos han demostrado la existencia de cromosomas X, de manera que las hembras poseen 6 cromosomas (dos pares de autosomas y dos cromosomas X), mientras que los machos tienen 5 (dos pares de autosomas y uno X) (Hammond & Robinson, 1994; Streit, 2014). Así, en el caso concreto de *S. stercoralis*, la sexualidad de la nueva generación, está influenciada tanto por factores genéticos como ambientales.

## **1.2. Estrongiloidiasis**

### **1.2.1. Epidemiología de la enfermedad**

La estrongiloidiasis es endémica en regiones tropicales y subtropicales de países en vías de desarrollo, donde se reúnen las condiciones climáticas óptimas de temperatura y humedad, y las medidas higiénico sanitarias son deficientes, lo que facilita la transmisión del parásito (Bethony *et al.*, 2006; Olsen *et al.*, 2009). Existen además focos de parasitación en regiones con clima templado, tales como el Sureste de EE.UU (Starr & Montgomery, 2011; Russell *et al.*, 2014), Japón (Hirata *et al.*, 2007), y puntos de Europa (Sprott *et al.*, 1987; Alcaraz *et al.*, 2004). Se considera que entre 30-100 millones de personas están afectadas por este parásito en todo el mundo, sin embargo, las últimas estimaciones llevadas a cabo por Bisoffi *et al.* (2013), indican que esta cifra podría ascender hasta los 370 millones de personas e incluso ser aún más elevada. La información sobre la prevalencia de *S. stercoralis* es escasa, sobre todo si se compara con la disponible para otros helmintos que también se transmiten por el suelo (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*). Además, los métodos utilizados habitualmente en los estudios de prevalencia de estos helmintos, como el examen directo o el Kato-Katz, son muy poco sensibles para poner de manifiesto la infección por *S. stercoralis* (Bethony *et al.*, 2006; Bisoffi *et al.*, 2013). Las revisiones recientemente publicadas por Schär *et al.* (2013) y Buonfrate *et al.* (2015), sobre estudios relativos a la epidemiología de *S.*

*stercoralis*, ponen de manifiesto la falta de información y la importancia de elegir una técnica diagnóstica adecuada si se quiere obtener una estimación realista sobre la prevalencia de esta parasitosis.

En España se han publicado casos puntuales de estrongiloidiasis en diferentes puntos como Alicante (López *et al.*, 1990), Castellón (Tirado *et al.*, 2002), Zaragoza (Mayayo *et al.*, 2005), Murcia (Toldos *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 2001), Cantabria (Olmos *et al.*, 2004) y Galicia (San Miguel-Fraile *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría de casos diagnosticados en nuestro país proceden de la región de La Safor Valenciana, la cual fue considerada foco de endemia de *S. stercoralis*, conociéndose casos desde 1895, cuando se describió el primer caso autóctono (Pérez Valdés, 1895). Se han publicado varios estudios sobre la prevalencia del parásito en esta comarca, llegándose a establecer valores de parasitación del 0,3% en la población general, y hasta del 12,4% en población de riesgo (Rodríguez-Calabuig *et al.*, 1998; Román-Sánchez *et al.*, 2003). Se considera que la presencia del parásito en esta región fue debida al cultivo manual del arroz, así como a la limpieza de acequias, tareas que eran llevadas a cabo con los pies descalzos en contacto con aguas fangosas, por lo que fueron consideradas actividades de riesgo de infección (Igual-Adell & Domínguez, 2007). Actualmente se piensa que ya no existe transmisión activa en esta región, debido a varios factores como la reconversión de los terrenos de marjal en cultivos de cítricos y hortalizas, mecanización en la recolección de los cultivos, canalización de aguas residuales, uso de pesticidas y urbanización de estas zonas (Alcaraz *et al.*, 2004; Martínez-Pérez & López-Vélez, 2015). No obstante, debido a la capacidad autoinfectiva de *S. stercoralis*, aunque no se produzcan casos nuevos, en esta área existen pacientes afectados con la forma crónica de la enfermedad, lo cual puede suponer un grave riesgo para la salud de estas personas, ante ciertas situaciones de riesgo que impliquen inmunodepresión.

Los casos que se diagnostican actualmente en nuestro país corresponden a i) aquellos que contrajeron la enfermedad en España en zona endémica, cuando existía transmisión activa, y que desde entonces mantienen la

infección crónica sin saberlo (Catalán *et al.*, 2009); ii) aquellos que se infectan al viajar a países endémicos donde la infección está activa (González *et al.*, 2010; Ramírez-Olivencia *et al.*, 2014); iii) inmigrantes que llegan a España desde países tropicales o subtropicales donde existe la enfermedad en la actualidad (González *et al.*, 2010; Valerio *et al.*, 2013; Ramírez-Olivencia *et al.*, 2014; Cabezas-Fernández *et al.*, 2015).

### **1.2.2. Clínica de la enfermedad**

Las manifestaciones clínicas de la estrongiloidiasis varían en función del estado inmunológico de la persona afectada. La enfermedad cursa desde una forma totalmente asintomática, que puede pasar desapercibida; a formas complicadas capaces de ocasionar cuadros clínicos de severa gravedad, e incluso conllevar a la muerte del paciente.

#### *1.2.2.1. Estrongiloidiasis aguda*

La intensidad de la sintomatología está determinada tanto por la carga parasitaria como por la respuesta inmunológica del hospedador (Concha *et al.*, 2005). La infección se produce cuando las larvas L3i entran en contacto con el hospedador, y penetran activamente a través de su piel. Dentro de las primeras 24 horas tras la infección, puede aparecer edema, urticaria y petequias en el punto de entrada de las larvas (Toledo *et al.*, 2015), que generalmente se localizan en pies y/o piernas. La infección suele ir acompañada de eosinofilia, asociada a la fase de migración tisular, y puede presentarse una ligera fiebre. Los síntomas pulmonares son similares a los de un resfriado, con o sin expectoración y disnea (Kunst *et al.*, 2011), produciéndose en los casos más severos el denominado síndrome de Loeffler, con edema pulmonar y deficiencia respiratoria (Marcos *et al.*, 2008). En ocasiones, las L3i durante su migración sanguínea pueden producir la rotura de capilares causando pequeñas hemorragias e inflamación. Cuando el parásito alcanza la mucosa del duodeno pueden producirse algunos síntomas

intestinales, como distensión y dolor abdominales, pérdida de peso, diarrea, e hinchazón de la mucosa intestinal (Carrada-Bravo, 2008).

#### 1.2.2.2. *Estrongiloidiasis crónica*

Se produce generalmente en zonas endémicas cuando se establece el ciclo de autoinfección del parásito dentro del hospedador, de manera que éste puede permanecer durante años parasitado. Esta forma es generalmente asintomática, pudiendo aparecer algunos síntomas intestinales como estreñimiento, diarrea o vómitos intermitentes. También pueden producirse alteraciones de la piel, del tipo urticaria, petequias, *rash* cutáneo y ocasionalmente puede aparecer una *larva currens*, especialmente en la región del torso o en la región perianal (al producirse autoinfección exógena). Esta *larva currens* constituye el único síntoma patognomónico de estrongiloidiasis en la fase crónica (Gaus *et al.*, 2011; Showler & Boggild, 2012). El síntoma más común, y que debe alertar de la posibilidad de estar infectado por *S. stercoralis*, es el aumento en el número de eosinófilos. Aunque la eosinofilia también es típica de otras helmintiasis intestinales que incluyen en su ciclo infectivo una migración intraorgánica, en el caso de *Strongyloides* suele ser más frecuente en la fase crónica que en otros parásitos, tal vez debido al hecho de que la hembra parásita se localiza en la submucosa, y no en el lumen intestinal (Repetto *et al.*, 2010).

#### 1.2.2.3. *Síndrome de hiperinfección (SH)*

La hiperinfección se produce cuando el paciente con estrongiloidiasis crónica sufre un déficit inmunitario por enfermedad o tratamientos inmunosupresores, o bien cuando una persona inmunodeprimida adquiere la infección (Greaves *et al.*, 2013). En cualquier caso, el sistema inmunológico no es capaz de mantener bajo control el ciclo autoinfectivo del parásito, y como consecuencia, se produce un aumento significativo del número de vermes en el organismo, pero tanto larvas como adultos se mantienen confinados en los órganos implicados en su ciclo de infección normal. Existen una serie de

situaciones de riesgo que hacen que algunas personas sean especialmente susceptibles a desarrollar SH, tales como estar sometidas a terapias inmunosupresoras con corticosteroides, co-infección con el virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1), malnutrición y alcoholismo (Keiser & Nutman, 2004) (ver Apartado 1.4).

La sintomatología es semejante a la que se produce en la forma crónica de la enfermedad, pero los síntomas a menudo son más intensos como consecuencia de la mayor carga parasitaria. A nivel digestivo se puede producir dolor abdominal, diarrea acuosa, pérdida de peso, náusea y vómitos. Se produce inflamación en el duodeno, que puede llegar incluso a causar obstrucción intestinal (Cruz *et al.*, 2010). A nivel pulmonar también se pueden producir síntomas semejantes a los de un resfriado, incluyendo tos, asma y hemorragias pulmonares. En estos pacientes puede presentarse eosinofilia, pero con frecuencia esto no ocurre, como consecuencia de la inmunosupresión. Se ha visto que pacientes con SH que muestran eosinofilia suelen tener mejor pronóstico que aquellos que muestran carencia de eosinófilos en sangre (Jamil & Hilton, 1992).

#### *1.2.2.4. Estrongiloidiasis diseminada*

La estrongiloidiasis diseminada (ED) se produce cuando, además de aumentar su número, los parásitos invaden órganos que no están involucrados en su migración habitual, tales como estómago, pulmones e incluso cerebro. En estos casos la mortalidad asciende hasta un 87% (Marcos *et al.*, 2011). Esta elevada mortalidad se asocia principalmente con infecciones bacterianas secundarias, ya que en su migración errática, los parásitos transportan enterobacterias intestinales adheridas a su superficie (Izquierdo *et al.*, 2013).

Los síntomas de la ED incluyen fuertes diarreas, dolor abdominal, fiebre, hipotensión, pérdida de peso, fallo respiratorio, meningitis, sangrado gastrointestinal y hemorragia pulmonar (Plata-Menchaca *et al.*, 2015).

Al igual que en el caso de la SH, la ED se produce en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en aquellos que están bajo tratamientos inmunosupresores que incluyan corticosteroides (Concha *et al.*, 2005; Vadlamudi *et al.*, 2006; Agarwala *et al.*, 2014).

### 1.2.3. Tratamiento

La estrongiloidiasis debe tratarse siempre, aun cuando no haya sintomatología de ningún tipo, con el fin de evitar que la enfermedad pueda evolucionar a las formas severas que representan un alto riesgo para la vida del paciente.

La elección de un fármaco u otro, así como la duración y la vía de administración del tratamiento, varían dependiendo de la severidad de la infección, ya que lo que es aconsejable en la fase crónica de la enfermedad a menudo no lo es en el caso de ED o SH. También el estado de salud del paciente es importante a la hora de decidir el tratamiento más apropiado.

No todos los fármacos disponibles tienen la capacidad de eliminar las larvas que se encuentran en migración ni los huevos, por lo tanto, es recomendable repetir el tratamiento pasadas 2 ó 3 semanas, para evitar que la infección se mantenga en el organismo mediante autoinfección. Es por ello que es importante mantener un control de los pacientes después del tratamiento durante al menos un año, para confirmar que el parásito ha sido erradicado del organismo.

En el caso de infección crónica, los fármacos más utilizados son ivermectina, y los derivados de azoles, albendazol y tiabendazol, siendo la ivermectina administrada de forma oral, el tratamiento de elección en estos casos.

La ivermectina actúa incrementando la polaridad de los iones cloruro a través de la membrana celular del verme, causando parálisis y finalmente su muerte (Arena *et al.*, 1995; Satoh & Kokaze, 2004). Es también el fármaco de elección para el tratamiento de la Onchocerciasis (*Onchocerca volvulus*), y se ha comprobado que puede ser efectivo frente a otras filariasis, nematodos

## Introducción

intestinales e incluso algunos ectoparásitos como garrapatas del género *Rhipicephalus* (Ottesen & Campbell, 1994; Crump & Omura, 2011). En el caso de la infección por *S. stercoralis*, la dosis recomendada son 200 µg/kg/día durante dos días. La ventaja de este fármaco es su alta eficacia a la hora de acabar con el parásito, y su buena tolerancia por parte de los pacientes (Shikiya *et al.*, 1992; Segarra-Newnham, 2007; Luvira *et al.*, 2014).

El tiabendazol fue durante muchos años el fármaco más utilizado para el tratamiento de la estrogiloidiasis. La dosis recomendada es de 25 mg/kg/día durante 3 días y su eficacia es semejante a la de la ivermectina (Iguar-Adell *et al.*, 2004; Bisoffi *et al.*, 2011), pero se tolera peor y se asocia a un mayor y más frecuente número de efectos secundarios que incluyen dolor de cabeza, mareos, náusea, pérdida de apetito y epigastralgia.

Otra opción utilizada frente a la estrogiloidiasis es el tratamiento con albendazol en dosis de 400 mg al día durante 3 días. Se ha demostrado que la eficacia del albendazol es mucho menor que la de la ivermectina, con porcentajes de eliminación total de los parásitos del 38% y 83%, respectivamente (Datry *et al.*, 1994). En otro estudio llevado a cabo recientemente por Suputtamongkol *et al.* (2011), en el que se comparó la eficacia del tratamiento con ivermectina en una dosis única y en dos dosis administradas con 15 días de diferencia, frente al tratamiento con albendazol en altas dosis durante una semana, y se confirmó que la ivermectina presentaba mayor efectividad frente al albendazol en cualquier caso. Otros estudios similares apoyan estos resultados (Marti *et al.*, 1996; Muenning *et al.*, 2004).

El mebendazol también se utiliza ocasionalmente para el tratamiento de la estrogiloidiasis, pero debido a que su eficacia es baja, no suele ser el fármaco de elección. La dosis recomendada es de 100 mg dos veces al día durante 3 días, presentando un porcentaje de eliminación del 50%, que puede ser mayor si se prolonga el tratamiento. Es por ello, que suele utilizarse en tratamientos

frente a *S. stercoralis* en combinación con otros fármacos (Reddy & Swarnalata, 2005).

En caso de formas severas de estrongiloidiasis como SH y ED, los tratamientos convencionales pueden no ser suficientes para acabar con la infección. También en estos casos, la ivermectina es el fármaco más recomendable, pero la dosis, vía de administración y duración del tratamiento varían en función del caso. Generalmente se recomienda la administración por vía oral de 200 mg/kg/día hasta que la sintomatología remita, o bien hasta que ya no se visualicen larvas en cultivo de heces durante dos semanas (Mejía & Nutman, 2012). En el caso de que existan problemas de malabsorción, debido a una obstrucción intestinal, o en caso de post-operatorio, se recomienda el uso de ivermectina por vía parenteral en dosis de 75-200 µg/kg/día, aplicada subcutáneamente (Donadello *et al.*, 2013). También se han descrito casos en los que se ha aplicado el fármaco vía rectal con éxito (Tarr *et al.*, 2003; Said *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2008).

En muchas ocasiones, en el caso de formas severas, se recurre a la combinación de ivermectina con algún otro fármaco, ya sea tiabendazol (Patel *et al.*, 2008), mebendazol (Reddy & Swarnalata, 2005) y más frecuentemente albendazol (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2009; Hamilton *et al.*, 2011; Le *et al.*, 2014).

Debe tenerse en cuenta, que las drogas derivadas de azoles, son metabolizadas por el hígado y excretadas a través del riñón, de manera que deben ser utilizadas con precaución en caso de aquellos pacientes que se hayan sometido a un trasplante de alguno de estos órganos (Sadjadi *et al.*, 2013).

En el caso de ED, algunas de las complicaciones más comunes son neumonía, meningitis y fallo respiratorio causadas por microorganismos, generalmente entéricos que son diseminados por los parásitos (Fardet *et al.*, 2007). Así mismo, la co-infección con otros organismos oportunistas como hongos u otros parásitos son comunes en aquellos pacientes que presentan una fuerte

inmunodepresión. Por tanto, en ambos casos es importante proporcionar junto con el tratamiento antihelmíntico, los fármacos correspondientes para eliminar estas infecciones.

#### **1.2.4. Diagnóstico**

Realizar un diagnóstico temprano de la estrongiloidiasis es de vital importancia para comenzar a administrar el tratamiento adecuado y eliminar totalmente al parásito del organismo. No obstante, debido al bajo número de huevos emitidos por la hembra parásita, y la falta de sintomatología específica asociada a la enfermedad, el diagnóstico de esta parasitosis no siempre resulta sencillo ni rápido.

El aumento en el número de eosinófilos en sangre periférica ( $>500$  eosinófilos/mm<sup>3</sup>), es la alteración más común en caso de estrongiloidiasis crónica, y el signo que, unido a un historial de viajes o procedencia de un país donde el parásito es endémico, debe alertar sobre su presencia. Se ha visto que en viajeros e inmigrantes procedentes de zonas endémicas las infecciones por helmintos son la principal causa de eosinofilia (Checkley *et al.*, 2010; Salas-Coronas *et al.*, 2015), pero en el caso concreto de parasitación por *S. stercoralis*, es mayor y más frecuente que en cualquier otra helmintiasis, habiéndose establecido valores de eosinofilia en el 57-63% de los casos (González *et al.*, 2010; Corti *et al.*, 2011; Requena-Méndez *et al.*, 2013). No obstante, en pacientes crónicos, este aumento en el número de eosinófilos puede ser intermitente, y se ha visto además, que el rango de eosinofilia disminuye a medida que aumenta la edad del paciente (Sharifdini *et al.*, 2014). Así mismo, la eosinofilia es más pronunciada en personas sanas que en inmunodeprimidas, por lo tanto, pacientes con SH o ED no suelen presentar un aumento en el número de eosinófilos, lo cual dificulta aún más su diagnóstico, con el consecuente riesgo que ello implica (Marcos *et al.*, 2011; Sharifdini *et al.*, 2014).

A continuación se describen brevemente los métodos disponibles actualmente para diagnosticar la estrongiloidiasis:

#### 1.2.4.1. Métodos parasitológicos

Estos métodos consisten en poner de manifiesto la presencia del parásito en el organismo mediante visualización de alguna fase del mismo. Generalmente están basados en la búsqueda de larvas en heces, pero se han reportado casos en los que se han localizado los parásitos en otro tipo de muestras biológicas como orina (Pasqualotto *et al.*, 2009), fluido cerebroespinal (Takayanagui *et al.*, 1995) y esputo (Cheong *et al.*, 2014).

El examen de heces se basa en la búsqueda de larvas L1r o L3i en muestras fecales. Como se mencionó anteriormente, la hembra partenogénica pone un bajo número de huevos, aproximadamente 50 diarios, además, en enfermos crónicos esta liberación es intermitente, por lo que el diagnóstico parasitológico en muestras de heces es menos sensible que las técnicas inmunológicas o moleculares (Dreyer *et al.*, 1996). Además, los métodos parasitológicos basados en examen de heces suelen resultar laboriosos y requerir personal entrenado para la identificación de larvas. La visión directa es un método sencillo y barato, pero normalmente se recurre a métodos de concentración, como la sedimentación espontánea (Hoffmann *et al.*, 1934), el método de Baermann (Baermann, 1917) o técnica de sedimentación en formol-éter (Ritchie 1948), o bien a cultivos de heces como el método de Harada-Mori (Harada & Mori, 1955), y cultivo en placa de agar (Arakaki *et al.*, 1990). Según el meta-análisis realizado por Campo-Polanco *et al.* (2014), que compara la eficacia de los siguientes métodos: directo, de concentración de Baermann, formol éter y cultivo en placa de agar, se concluye que en estos cuatro métodos la especificidad es del 100%, mientras que la sensibilidad varía desde 21% para examen directo, 48% en formol-éter, 72% con método de Baermann y 89% para placa de agar. Por lo tanto, el método que parece más adecuado para el diagnóstico etiológico es el cultivo de heces en placas de agar, pero cuenta con el inconveniente de ser laborioso y se necesitan entre

24-72 horas para obtener resultados. Se ha demostrado también que una sola muestra de heces es, generalmente, insuficiente para establecer un diagnóstico correcto, y que la efectividad del mismo, aumenta con el número de muestras tomadas del paciente (Hirata *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2010; Requena-Méndez *et al.*, 2013).

También puede evidenciarse la infección con métodos de imagen como la endoscopia, gracias a la cual se aprecian las lesiones típicas de estrongiloidiasis como ulceración, edema y sangrado de la mucosa, y la toma de biopsias de tejido para analizar las muestras en el laboratorio en busca de especímenes. Mediante imágenes obtenidas con rayos X pueden evidenciarse afecciones a consecuencia de la presencia de *S. stercoralis*, que apunten a la infección por este parásito (Puthiyakunnon *et al.*, 2014).

#### 1.2.4.2. Métodos inmunológicos

Se han desarrollado numerosos métodos inmunológicos para el diagnóstico de la estrongiloidiasis, mostrando variabilidad en la sensibilidad y especificidad según el antígeno utilizado, el isotipo de inmunoglobulina y el tipo de población objeto de estudio (Olsen *et al.*, 2009).

Las técnicas basadas en la detección de anticuerpos específicos, presentan el inconveniente de la limitación que supone el obtener antígeno de larvas de *S. stercoralis* en cantidad suficiente, por lo que en ocasiones se recurre al uso de antígenos heterólogos de otras especies como *S. venezuelensis* o *S. ratti* (Toledo *et al.*, 2015; Bosqui *et al.*, 2015). Además, muchas veces no permiten discernir entre una infección pasada, actual o reciente, y su rendimiento en pacientes inmunodeprimidos es en ocasiones deficiente, ya que el título de anticuerpos puede presentar valores muy bajos produciéndose un falso negativo (Abdul-Fattah *et al.*, 1995; Schaffel *et al.*, 2001). Se ha visto además, que estas pruebas serológicas son útiles para diagnóstico de estrongiloidiasis crónicas en personas procedentes de países endémicos, pero lo son menos en el caso de viajeros (Levenhagen & Costa-Cruz, 2014). Otro problema que suele

presentarse es el de la reactividad cruzada con otras helmintiasis, especialmente con filarias.

La técnica más utilizada es el ensayo de ELISA indirecto, que puede estar basado en la detección de distintos isotipos de IgG (IgG1, IgG4) (de Jesus Inês *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2014), IgE (de Jesús Inês *et al.*, 2013) o IgA (Ribeiro *et al.*, 2010; Bosqui *et al.*, 2015), siendo la muestra más utilizada suero de pacientes, aunque también hay descritos ensayos con saliva, leche o heces (Mota-Ferreira *et al.*, 2009).

Para solucionar el problema de la escasez de material parasitario necesario para llevar a cabo estos ensayos de ELISA, se han desarrollado protocolos en los que se utilizan productos de excreción/secreción (E/S) de *S. stercoralis*, o bien antígenos recombinantes. Tal es el caso del antígeno de 31 kDa denominado NIE, publicado por Ravi *et al.* (2002), y que mostró valores de sensibilidad y especificidad similares a los de ELISA convencionales con antígeno crudo, o el antígeno inmunorreactivo SsIR de Ramanathan *et al.* (2008).

Los ensayos ELISA son también útiles para determinar la eficiencia de los tratamientos frente a estrongiloidiasis, realizando pruebas serológicas a los pacientes a distintos tiempos post-tratamiento y evaluando el descenso en el título de anticuerpos (Biggs *et al.*, 2009). Con el fin de mejorar esta aplicación y poder además discernir entre infecciones pasadas y presentes, Gonzaga *et al.* (2011), desarrollaron un ensayo ELISA de avidéz-IgG, que permitiera discriminar entre infección activa y pasada, que resultan en falsos positivos con otros ensayos.

Actualmente hay disponibles dos kits comerciales, Bordier-ELISA, que detecta IgG usando un antígeno somático de larvas de *S. ratti*, y el sistema IVD-ELISA, que detecta anticuerpo IgG usando antígenos somáticos de larvas de *S. stercoralis* (Bisoffi *et al.*, 2014).

Para mejorar la eficiencia de los ensayos de ELISA se han desarrollado otras técnicas como los sistemas de inmunoprecipitación con luciferasa (LIPS), en combinación con antígenos recombinantes como NIE o SsRI. En estudios llevados a cabo por Ramanathan *et al.* (2008) se demostró que NIE-LIPS es más sensible y específico que los ensayos de NIE-ELISA, con un 100% y 95% de sensibilidad respectivamente, además, se comprobó que en el caso de NIE-LIPS, no se producían reacciones cruzadas con filariasis. En este mismo trabajo se utilizó un segundo antígeno (SsIR) que en ensayos LIPS en combinación con el antígeno NIE, mejoraba la sensibilidad y especificidad de la técnica al 100%. Krolewiecki *et al.* (2010), confirmaron estos resultados en un estudio en el que compararon distintas técnicas diagnósticas para la estrogiloidiasis.

Los ensayos de inmunofluorescencia (IFAT), también basados en la detección de anticuerpos específicos frente a la enfermedad, son altamente útiles, y presentan la ventaja de arrojar resultados cuantitativos, de modo que se puede evaluar el título de anticuerpos, lo que resulta de gran utilidad a la hora de su uso en la evaluación de los tratamientos (Levenhagen & Costa-Cruz, 2014). También se ha demostrado la eficacia de este método para el diagnóstico de enfermos de estrogiloidiasis en situación de inmunodepresión (Gottardi *et al.*, 2015). En un estudio comparativo llevado a cabo recientemente por Bisoffi *et al.* (2014) se midió la eficacia de varios test inmunológicos para el diagnóstico de *S. stercoralis* incluyendo IFAT, así como los previamente descritos NIE-ELISA, NIE-LIPS, y los ELISA comerciales Bordier-ELISA y IVD-ELISA, concluyéndose que el IFAT es el test más sensible con un 94,6%, mientras que el NIE-LIPS resulta ser el más específico, con un 99,6%. En este mismo trabajo se concluye que la técnica NIE-LIPS es la más precisa para el diagnóstico serológico de *S. stercoralis*. Complementario a este estudio, Buonfrate *et al.* (2015b), compararon estos 5 test para determinar cual es más efectivo para el seguimiento de pacientes post-tratamiento de la estrogiloidiasis, concluyendo que el NIE-ELISA mostraba los mejores resultados.

Otras pruebas que han mostrado utilidad para el diagnóstico de la estrongiloidiasis son los ensayos de tipo *immunoblot*, en los que se ha observado niveles de sensibilidad y especificidad similares a los de ELISA indirecto. En general, las proteínas más inmunogénicas descritas mediante esta técnica presentan pesos moleculares que van de 26-28, 31-33, 41,45, 120-160 y 205 kDa (Levenhagen & Costa-Cruz, 2014; Toledo *et al.*, 2015). Algunos estudios indican que pacientes con algún tipo de inmunosupresión pueden presentar una reducción en su respuesta, y por lo tanto mostrar menor número de bandas en el *blot* (Sudre *et al.*, 2007).

Las pruebas de inmunocromatografía con tiras reactivas resultan una alternativa sencilla de utilizar y requieren una escasa cantidad de antígeno; van Doorn *et al.* (2007), demostraron que la sensibilidad y especificidad de las tiras diagnósticas, son semejantes a las obtenidas con los ensayos de ELISA comerciales. No obstante, este método precisa aún ser analizado y testado en más pacientes en estudios futuros.

Las técnicas inmunológicas basadas en la detección de antígenos, utilizan ensayos de ELISA de captura para detectar antígenos solubles en suero, o coproantígenos cuando la muestra con la que se trabaja son heces. La gran ventaja de estos métodos es que un positivo es indicativo de infección actual, siendo los test que utilizan anticuerpos monoclonales más sensibles y específicos que los que emplean anticuerpos policlonales. En los trabajos llevados a cabo por El-Badry (2009) en los que se inmunizó conejos con proteínas de E/S de *S. stercoralis*, y en los posteriormente desarrollados por Sykes & McCarthy (2011), en los que se utilizó E/S de *S. ratti*, se obtuvieron buenos resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad, y no se produjeron reacciones cruzadas con otros helmintos. No obstante, en ambos ensayos surgieron problemas como la conservación de las muestras y la eficacia de los tests en función de la carga parasitaria, por lo que son necesarias más investigaciones para poner a punto este sistema que podría resultar sencillo y económico.

Otro sistema utilizado recientemente para el diagnóstico es la detección de inmunocomplejos generados durante la infección parasitaria. Al igual que en el caso de las técnicas basadas en detección de antígenos del parásito, con la detección de inmunocomplejos es posible diferenciar entre infecciones presentes y pasadas. La técnica es similar a un ELISA de captura, pero utilizando un conjugado anti-IgG para la detección. Los trabajos de Gonçalves *et al.* (2012) en los que se utilizó IgG anti-huevo, IgG anti-hembras partenogénicas e IgG anti-larvas de *S. venezuelensis* para la detección de inmunocomplejos, mostraron buenos resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad.

#### 1.2.4.3. Métodos moleculares

En los últimos años se han desarrollado técnicas para el diagnóstico de la estrongiloidiasis basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas técnicas, en general, han mostrado buenos resultados en la detección de DNA del parásito en heces (Buonfrate *et al.*, 2015c). No obstante, también presentan limitaciones, debidas a la intermitente liberación de larvas en heces, la presencia de factores inhibitorios de la reacción en las muestras, la laboriosa estandarización de la técnica, y el elevado coste económico de la misma. Repetto *et al.* (2013) presentaron en sus trabajos algunas modificaciones en la purificación del DNA del parásito, para optimizar la técnica y aumentar su sensibilidad. Así mismo, se han realizado estudios basados en PCR tanto convencional como a tiempo real (Verweij *et al.*, 2009; Saugar *et al.*, 2015), PCR anidada (Ahmad *et al.*, 2013), y recientemente Watts *et al.* (2014) han desarrollado un sistema diagnóstico basado en el método de amplificación isotérmica mediada por bucle de ácidos nucleicos (LAMP), con el que se han obtenido esperanzadores resultados, al lograrse 27 resultados positivos en 28 muestras totales.

Muy recientemente, Becker *et al.* (2015) han realizado un análisis comparativo entre varias técnicas parasitológicas frente a una PCR a tiempo real, concluyendo que esta técnica molecular resulta ser la más específica en el

diagnóstico de la enfermedad, y que en combinación con las parasitológicas, se mejora sustancialmente el diagnóstico. En otro estudio realizado por de Paula *et al.* (2015), en el que se comparó la eficacia en la detección de DNA del parásito en heces entre una PCR convencional y PCR cuantitativa a tiempo real, se obtuvieron sensibilidades de 76,7% y 90% respectivamente.

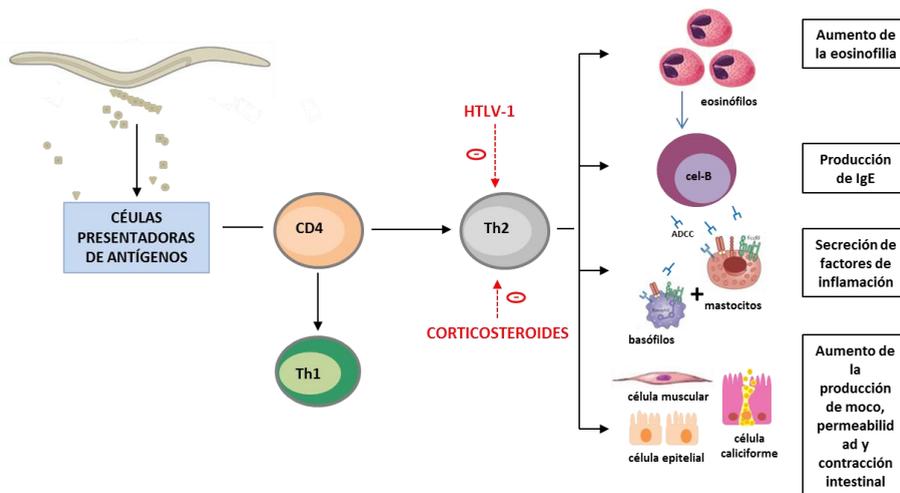
### **1.3. Respuesta inmunitaria del hospedador frente a la infección por *S. stercoralis***

Al igual que ocurre con otras helmintiasis, la respuesta inmunitaria del hospedador frente a la infección por *S. stercoralis* está polarizada hacia el tipo Th2, que se caracteriza por la producción de altos niveles de citoquinas del tipo IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, eosinófilos, mastocitos e inmunoglobulinas específicas frente al parásito (Marcos *et al.*, 2011).

La diferenciación, activación y proliferación de los eosinófilos se ve favorecida por la citoquina IL-5. Muchas personas con estrongiloidiasis muestran altos niveles de eosinófilos, siendo este aumento más frecuente en pacientes crónicos inmunocompetentes, que en aquellos con SH o ED en los que es común que los niveles sean inferiores, quizá debido a una débil respuesta Th2. Esta escasez de eosinófilos puede enmascarar la enfermedad, ya que la eosinofilia es el síntoma más característico de la misma; además se ha visto que el pronóstico de la enfermedad en aquellos pacientes con SH o ED que presentan altos valores de eosinofilia periférica es mejor que en aquellos que carecen de esta (Keiser & Nutman, 2004). Los eosinófilos juegan un papel muy importante en la respuesta innata del organismo frente a la infección parasitaria, ya que secretan sustancias citotóxicas que resultan letales para el parásito. Además, se ha demostrado que los eosinófilos también son de vital importancia en la respuesta inmunitaria adquirida, ya que son capaces de actuar como células presentadoras de antígenos cuando son expuestos a la presencia del parásito, de modo que pueden estimular la producción de

anticuerpos específicos frente a la infección y favorecer aún más la liberación de IL-4 e IL-5 (Padigel *et al.*, 2006).

Las citoquinas IL-4 e IL-5 estimulan la liberación de otras citoquinas como IL-8, y la producción de inmunoglobulinas de los isotipos IgE e IgG4, las cuales favorecen aún más la migración de eosinófilos. La presencia de IgE específicas frente a *S. stercoralis* puede tener una función crucial en la inmunidad adquirida frente a este parásito, y se ha demostrado que, además, estas IgE inducen a los mastocitos a la degranulación y a las células caliciformes a la producción de moco (Figura 1.4). El moco ayuda a la eliminación de los parásitos localizados en el intestino, mientras que los mastocitos previenen de la invasión de las paredes intestinales por parte de estos, además de favorecer los movimientos peristálticos del intestino con el fin de eliminar a los vermes (Siegel & Simon, 2012).



**Figura 1.4:** Esquema de la respuesta inmunitaria frente a la infección por *S. stercoralis*.

En pacientes con estrongiloidiasis severa hay una disminución estadísticamente significativa en los niveles de IgG e IgM, comparados con los

de pacientes con formas asintomáticas, lo cual confirma la implicación de estos anticuerpos en la defensa del organismo frente a las larvas del parásito (Iriemenam *et al.*, 2010). El papel de los anticuerpos IgA, aún no está totalmente claro y no se ha determinado una correlación con las diferentes formas clínicas de la enfermedad.

En lo relativo a la adquisición de inmunidad frente a nuevas infecciones por L3i, en modelos experimentales utilizando ratones, se ha visto que en la protección frente a la reinfección están involucradas IgM, eosinófilos, neutrófilos y la activación del complemento (Nolan *et al.*, 1995; Rotman *et al.*, 1996; Kerepesi *et al.*, 2006). Sin embargo, en el caso de infección en humanos, la inmunidad no protege de la autoinfección parasitaria, por lo que es posible que estas L3i autoinfectivas presenten un patrón de reconocimiento antigénico diferente (Iriemenam *et al.*, 2010).

#### **1.4. Grupos de riesgo frente a la infección por *S. stercoralis***

Como ya se ha mencionado, la infección por *S. stercoralis* en personas inmunocompetentes cursa generalmente de forma asintomática dando lugar a una enfermedad crónica en la que la vida del paciente no se encuentra comprometida. El problema surge cuando el estado inmunológico se ve alterado, favoreciéndose la evolución a formas hiperinfectiosas o diseminadas de la enfermedad, que pueden suponer un serio riesgo para la salud de quienes la padecen. Se han establecido una serie de grupos de riesgo que son más susceptibles a sufrir estas formas severas de estrongiloidiasis, y por tanto, deben ser tenidos en cuenta para realizar un diagnóstico precoz.

##### **1.4.1. Co-infectados con VIH**

En muchos de los países donde *S. stercoralis* es endémico, también existen altas prevalencias de infección por VIH. La estrongiloidiasis fue considerada una infección oportunista en enfermos de VIH hasta 1986, cuando CDC y OMS decidieron excluirla de esta lista por falta de evidencias (WHO, 1986). Son muy

pocos los casos publicados en los que una infección crónica por *S. stercoralis* desemboca en formas severas en pacientes que presentan co-infección con VIH, ya que la mayoría de estos casos son debidos a la administración de esteroides acompañando al tratamiento frente a otras infecciones oportunistas como *Peumocystis jirovecii* o bien a la co-infección con el virus HTLV-1 (Janssen *et al.*, 2013). Una explicación podría ser que los enfermos de SIDA presentan una polarización de la respuesta inmunitaria a Th2, que sería la responsable de mantener bajo control la infección por *S. stercoralis* (Siegel & Simon, 2012). Romero-Cabello *et al.* (2012), han publicado un caso clínico en el que sugieren que en enfermos avanzados con VIH, la estrongiloidiasis puede resultar letal, volviendo a plantear la influencia de la infección por VIH en casos de estrongiloidiasis. Independientemente de la relación entre SIDA y SH o ED, sí que se ha demostrado que la infección por *S. stercoralis* es más habitual en enfermos de VIH que en personas sanas (Assefa *et al.*, 2009; Schär *et al.*, 2013).

#### **1.4.2. Co-infectados con HTLV-1**

El virus linfotrópico de células T humanas es un retrovirus que afecta a las células CD4+, y está asociado con la aparición de leucemia de células T adultas (ATLL) y mielopatía. Se ha demostrado que la infección con del virus HTLV-1 en personas infectadas con *S. stercoralis*, favorece el desarrollo de las formas hiperinfectiva y diseminada de estrongiloidiasis (Gotuzzo *et al.*, 1999). Asimismo, se ha observado que la infección por el parásito afecta al curso de la enfermedad causada por este virus, y es capaz de aumentar la probabilidad de desarrollar ATLL (Sato *et al.*, 2002; Salles *et al.*, 2013). En la infección por HTLV-1, se produce un predominio de la respuesta Th1, aumentando la producción de TNF- $\alpha$ , mientras que la respuesta Th2 disminuye, por lo que la capacidad del organismo de hacer frente a la infección helmíntica es menor (Marcos *et al.*, 2011). Además, debido a que el IFN- $\gamma$  suprime la liberación de IL-4 y por consiguiente de IgE, los tratamientos convencionales frente a la estrongiloidiasis resultan menos efectivos en los casos de co-infección con

HTLV-1, haciéndose necesarias dosis más elevadas de los fármacos (Hirata *et al.*, 2006).

#### **1.4.3. Pacientes en tratamiento con corticosteroides**

Se ha demostrado que existe una relación en la administración de glucocorticoides y la multiplicación de los parásitos en el organismo del paciente. Los corticosteroides son fármacos que se utilizan para tratar un elevado número de enfermedades como lupus, linfoma, poliomielitis, úlceras corneales, etc. La hiperinfección parasitaria se ha observado al administrar este tipo de fármacos, independientemente de la duración del tratamiento y la dosis del mismo (Alsharif *et al.*, 2015; Won *et al.*, 2015).

Una de las teorías que trata de explicar este comportamiento en los parásitos apunta a la capacidad de los glucocorticoides de suprimir la eosinofilia y la activación linfocitaria. Hay autores que apuntan a que los glucocorticoides tienen un efecto directo sobre las larvas de *Strongyloides*, acelerando su transformación de Lr1 a L3i (Keiser & Nutman, 2004).

#### **1.4.4. Pacientes con órganos trasplantados**

Muchos casos descritos en la literatura sobre hiperinfección y diseminación de los parásitos, corresponden a personas que se han sometido al trasplante de un órgano. En la mayoría de estos casos, el receptor del órgano recibe terapia inmunosupresora basada en la administración de corticosteroides para evitar el rechazo del mismo. Se han documentado casos de reactivación de infecciones crónicas existentes en el receptor, que ante la inmunodrepsión pasan a formas severas (Catalán *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2012), y en los últimos años, se han incrementado las publicaciones en las que la fuente de la infección era el órgano trasplantado (Hsu *et al.*, 2013; Le *et al.*, 2014; Abanyie *et al.*, 2015). Por lo tanto, resulta de vital importancia realizar pruebas serológicas tanto a individuos receptores como a donantes, si se sospecha de la infección con el parásito. Se han descrito hiperinfecciones posteriores al

trasplante de distintos órganos como riñón, pulmón, corazón, intestino o hígado.

#### **1.4.5. Alcoholismo**

Se han encontrado mayores tasas de infección en personas alcohólicas que en aquellas que no lo son (Schär *et al.*, 2013). Esto puede deberse a que el consumo regular de alcohol conduce a cambios en el sistema inmunitario, alteración en las barreras intestinales o bien a su capacidad de alterar el metabolismo de los corticosteroides, favoreciendo de esta manera la infección por *S. stercoralis* (Zago-Gomes *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2010). Por lo tanto, sería importante evaluar el estado de salud de personas alcohólicas que residen en zonas endémicas de *S. stercoralis*, para realizar un diagnóstico precoz de la parasitosis.

#### **1.5. Estudios de proteómica sobre *Strongyloides***

La identificación y caracterización de proteínas de superficie de los parásitos, así como de sus productos de E/S es de gran importancia, ya que éstas son las moléculas que participan en la interacción directa con las células del hospedador. En los últimos años se ha producido un aumento en el número de trabajos orientados a ampliar el conocimiento sobre la composición molecular de la superficie de multitud de helmintos parásitos y de sus productos de E/S (Bernal *et al.*, 2006; Pérez-Sánchez *et al.*, 2008; Bennuru *et al.*, 2009; Mulvenna *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2009).

Sin embargo, en el caso concreto del género *Strongyloides*, aún son pocos los estudios que se han desarrollado en relación al conocimiento de su proteoma. Se han identificado mediante ensayos de SDS-PAGE tanto monodimensionales como bidimensionales y *Western blot*, algunas proteínas inmunogénicas de *S. stercoralis* comprendidas entre los 6 y 129 kDa (Sudre *et al.*, 2007). Numerosos estudios hacen especial mención a una banda de 26 kDa reconocida

frecuentemente por los sueros de pacientes enfermos de estrogiloidiasis y poco en el caso de otros grupos de población.

La caracterización de proteínas de *S. stercoralis* es escasa, quizás a consecuencia de la dificultad para conseguir material parasitario con el que trabajar, siendo la mayor parte de las secuencias depositadas en bases de datos resultado de deducción de secuencias de DNA (Toledo *et al.*, 2015). Se han caracterizado algunos antígenos del parásito tales como el NIE o SsIR (Ravi *et al.*, 2002; Ramanathan *et al.*, 2008), que han mostrado gran utilidad en el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas para la enfermedad.

Marcilla *et al.* (2010) realizaron un primer análisis proteómico de la larva L3i de *S. stercoralis*, identificando un total de 26 proteínas mediante espectrometría de masas. De éstas, 13 se identificaron tras someter a las larvas a digestión breve con tripsina, lo cual sugiere que son proteínas localizadas en la superficie del parásito. En los últimos años, gracias al estudio del transcriptoma, se han identificado gran cantidad de proteínas putativas del parásito. Actualmente, se dispone de las secuencias del transcriptoma de las larvas L1r, L2r, L3i, de la hembra parásita y de adultos de vida libre de *S. ratti* (Thompson *et al.*, 2005), de 4 de las fases de *S. venezuelensis*, incluyendo la larva L3 pulmonar (Nagayasu *et al.*, 2013) y la larva L1 de vida libre y de la larva L3i de *S. stercoralis* (Mitreva *et al.*, 2004; Ramanathan *et al.*, 2011; Marcilla *et al.*, 2012). En los trabajos de Marcilla *et al.* (2012), se caracterizaron un total de 8037 proteínas putativas, siendo el grupo más representativo el de proteínas enzimáticas, y 41 proteínas potencialmente antigénicas que pueden resultar de gran utilidad a la hora del inmunodiagnóstico de la enfermedad.



## ***2. Objetivos***



Como se ha comentado no existe un *gold standard* para el diagnóstico de la estrongiloidiasis, ya que los métodos disponibles no son 100% sensibles ni específicos. La identificación y caracterización de proteínas de *Strongyloides*, especialmente las de sus fases parásitas, pueden ofrecer una importante aplicabilidad en la búsqueda de nuevas dianas diagnósticas.

En la Comarca de La Safor en la Comunidad Valenciana (España) son muchos los casos de infección documentados, asociados principalmente al cultivo manual del arroz, al trabajo en pozos y limpieza de acequias (Román-Sánchez *et al.*, 2003; Igual-Adell & Domínguez, 2007). Actualmente no se considera que exista transmisión activa en esta comarca, no obstante, al tratarse de una enfermedad crónica que pasa desapercibida y que puede complicarse desarrollando formas más severas en caso de inmunodepresión, es de vital importancia poner de manifiesto estos casos y tratar a las personas afectadas antes de que implique un riesgo para su vida.

Este hecho, unido a la imperiosa necesidad de desarrollar nuevos métodos diagnósticos de la enfermedad, motivaron al grupo de investigación del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València, en colaboración con los Dres. Rodríguez-Calabuig e Igual-Adell, a impulsar nuevos enfoques en el estudio de este parásito. De este modo, en los últimos años, nuestro grupo de investigación ha contribuido a la mejora en el conocimiento de este helminto, a nivel proteómico, transcriptómico y genómico, con el fin de identificar nuevas moléculas que ayuden a desarrollar test diagnósticos más sensibles y específicos ante la enfermedad. En esta línea cabe destacar el estudio publicado por Marcilla *et al.* (2010), que identificó 13 proteínas asociadas a la superficie del parásito, de posible interés diagnóstico. En este mismo contexto se enmarca la Tesis Doctoral realizada por la Dra. Ana Pérez García (2010), en la que se identificaron las proteínas de larvas L3i más antigénicas reconocidas por sueros de pacientes, obteniéndose algunas de ellas de forma recombinante para su caracterización y posible uso para el diagnóstico de la enfermedad. La presente Tesis Doctoral continúa esta línea de investigación, dando un paso más en la identificación y caracterización de



## Objetivos

proteínas de larvas L3i del parásito, y el estudio de su posible utilidad en el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico de la enfermedad, tomando como punto de partida el transcriptoma de la larva L3i del parásito publicado por nuestro grupo (Marcilla *et al.*, 2012).

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el de profundizar en el conocimiento proteómico y genómico de la fase larvaria L3i del parásito *Strongyloides stercoralis*, con el fin de identificar nuevas dianas diagnósticas frente a la estrongiloidiasis. Para alcanzar dicho objetivo general se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Análisis de las secuencias aminoacídicas de proteínas antigénicas del parásito identificadas a partir de larvas L3i de *S. stercoralis*, diseño y producción de péptidos sintéticos y evaluación de su capacidad de reconocimiento por sueros de pacientes.
2. Identificación y selección de los transcritos (mRNAs) más abundantes de larvas L3i de *S. stercoralis* y análisis de las secuencias obtenidas a partir del transcriptoma con posible utilidad para el desarrollo de test diagnósticos.
3. Clonación y obtención de fragmentos de proteínas en forma recombinante a partir de las secuencias de mRNA seleccionadas, estudio de su aplicabilidad al diagnóstico inmunológico de la estrongiloidiasis.
4. Obtención de anticuerpos policlonales frente a los fragmentos de proteínas recombinantes producidas y estudio de su posible uso como nuevo sistema diagnóstico.
5. Profundización en el conocimiento de larvas L3i de *S. stercoralis* mediante estudios de localización de proteínas en las mismas y de microscopía electrónica de barrido.

### ***3. Materiales y métodos***



## **MATERIALES**

### **3.1. Material parasitario**

#### **3.1.1. Larvas L3i de *Strongyloides stercoralis***

Se ha contado con ejemplares del parásito *S. stercoralis*, concretamente con larvas infectantes (L3i). Las larvas fueron recolectadas a partir de cultivos en placa de agar, realizados con muestras fecales de pacientes afectados por la parasitosis, procedentes de hospitales de la comarca de La Safor (Valencia), considerada zona endémica de parasitación.

Se estudió la superficie de estas larvas del parásito mediante técnicas de microscopía láser confocal y electrónica de barrido (SEM). Las larvas se procesaron para la obtención de ácidos nucleicos.

#### **3.1.2. Otros parásitos**

Para llevar a cabo estudios de especificidad frente a los anticuerpos producidos en el laboratorio durante la realización de la tesis se ha utilizado extracto total de proteínas a partir de los siguientes helmintos parásitos:

*Fasciola hepatica*: Se obtuvieron vermes adultos a partir de hígados de vacas infectadas, procedentes de un matadero de Valencia (Martínez Loriente S.A., Valencia, España), y gracias a la colaboración del veterinario D. Fernando Cantalapiedra.

*Toxocara canis*: Los adultos se recuperaron vivos a partir de muestras fecales de perros infectados. El material fue recolectado gracias a la colaboración del veterinario D. Pablo Peláez.

*Anisakis sp.*: La fase larvaria de este nematodo, responsable de la patología en humanos (L3), fue recolectada en el laboratorio de Parasitología a



partir de bacaladillas adquiridas en grandes superficies comerciales, y que no habían sido previamente evisceradas.

### 3.2. Muestras biológicas humanas

#### 3.2.1. Muestras de heces

Las muestras fecales de personas infectadas por el parásito se obtuvieron a partir de pacientes que habían sido atendidos en el Hospital Francesc de Borja de Gandía, gracias a la colaboración de la Dra. Araceli Molina de Diego. Dichos pacientes eran residentes en la comarca de La Safor, concretamente en las poblaciones de Xeraco y Tavernes de la Valldigna. Corresponden a casos endémicos del litoral Mediterráneo Español, ya que dichos pacientes declararon no haber realizado ningún viaje a otra zona de endemia. Se obtuvo consentimiento oral de los pacientes siguiendo los protocolos de protección de datos personales de cada centro hospitalario. En el propio hospital se procesaron las muestras y se realizaron las pruebas diagnósticas pertinentes para confirmar la parasitosis. Por cada paciente, se recibió un total de tres muestras recogidas en días consecutivos, cada una de ellas en un recipiente estéril diferente, adecuadamente etiquetada y sin ninguna clase de fijador. Una vez en el laboratorio, se procedió a realizar la técnica de cultivo en placas de agar, ya que es considerada la técnica de referencia (Campo-Polanco *et al.*, 2014) para obtener el mayor número de larvas L3i.

#### 3.2.2. Sueros

Para llevar a cabo varios de los experimentos incluidos en el presente trabajo se ha dispuesto de un total de 91 sueros, de los cuales 87 correspondían a pacientes afectados por algún tipo de helmintiasis. Los 4 sueros restantes pertenecían a personas con diagnóstico negativo ante cualquier enfermedad parasitaria, y fueron utilizados como controles negativos. Del total de sueros positivos, 26 fueron de casos diagnosticados de estrongiloidiasis en la región de La Safor (casos endémicos), y fueron facilitados por los Servicios de

Microbiología de los Hospitales La Ribera de Alzira, y Francesc de Borja de Gandía, gracias a las Dras. Victoria Domínguez y Araceli Molina De Diego, respectivamente. Además, también se contó con 61 sueros correspondientes a pacientes afectados por diversas helmintiasis, concretamente: estrongiloidiasis, esquistosomiasis (*Schistosoma* sp.), triquinelosis (*Trichinella* sp.), gnatostomiasis (*Gnathostoma* spp.), anisakiasis (*Anisakis* sp.), y toxocariasis (*Toxocara canis*). Todos ellos cedidos por las Dras. Teresa Gárate y Esperanza Rodríguez, del Instituto de Salud Carlos III de Madrid.

**Tabla 3.1:** Número de sueros utilizados correspondientes a cada parasitosis, y centro de procedencia.

Total de sueros	Parasitosis	Procedencia
16	Estrongiloidiasis	Hospital de La Ribera, Alzira
10	Estrongiloidiasis	Hospital Francesc de Borja, Gandía
15	Estrongiloidiasis	Instituto de Salud Carlos III, Madrid
15	Esquistosomiasis	Instituto de Salud Carlos III, Madrid
10	Triquinelosis	Instituto de Salud Carlos III, Madrid
8	Gnatostomiasis	Instituto de Salud Carlos III, Madrid
5	Anisakiasis	Instituto de Salud Carlos III, Madrid
8	Toxocariasis	Instituto de Salud Carlos III, Madrid

### 3.3. Bacterias y condiciones de crecimiento

Para la clonación y expresión de los genes de interés se utilizaron tres cepas de la bacteria *Escherichia coli*: M15, SG13009 y BL21 (DE3) pLysS. Las dos primeras cepas presentan un plásmido represor (pREP4), que proporciona a las bacterias



## Material es y métodos

portadoras resistencia al antibiótico Kanamicina, y expresa constitutivamente el gen represor *lac*, necesario para regular el nivel de la transcripción.

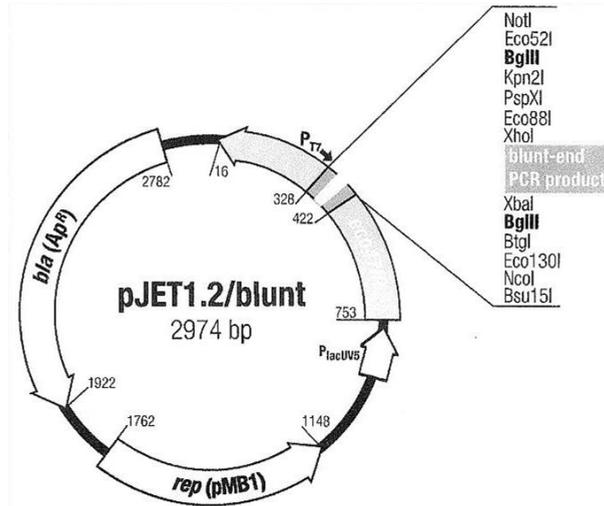
Las células bacterianas se crecieron a 37 °C en medio de Luria-Bertani (LB), compuesto por extracto de levadura 0,5%, triptona 1% y NaCl 1%, ajustando el conjunto a pH 7. Para la preparación de medios sólidos se añadió un 1,5% de agar. Para la selección de cepas de *E.coli* M15 y *E.coli* SG13009, portadoras de plásmidos, se añadió Ampicilina (100 µg/mL) y Kanamicina (25 µg/mL) al medio, y únicamente Kanamicina (25 µg/mL) para la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

### 3.4. Plásmidos vectores

Para realizar la clonación del DNA codificante para los fragmentos de proteínas de interés, se han utilizado dos tipos de vectores:

#### 3.4.1. Vector de clonación

Con el fin de obtener múltiples copias de los DNAs amplificados, dichos fragmentos fueron clonados en el plásmido pJET 1.2 (Fermentas). Este vector contiene un sitio de restricción enzimática múltiple, así como el promotor T7 para transcripción *in vitro* (Figura 3.1). Este sistema permite una selección positiva de los clones ya que contiene un gen letal que expresa una enzima de restricción que mata a las células de *E. coli* tras la transformación, y que es desactivado al ligar un inserto de DNA en el sitio de clonación, de manera que solamente las células que incorporen plásmidos recombinantes serán capaces de crecer en el medio de cultivo selectivo.



**Figura 3.1:** Mapa del Vector pJET 1.2 (Fermentas).

### 3.4.2. Vector de expresión

Para producir las proteínas recombinantes en bacterias, se utilizaron vectores de expresión de la serie pQE30 (QIAGEN). Este vector permite la clonación del gen de interés como proteína de fusión a un péptido de histidinas (6xHis-tag). Presenta un sitio de restricción enzimática múltiple, además de contar con el gen para  $\beta$ -lactamasa, que confiere resistencia al antibiótico ampicilina, y por tanto, permite la selección positiva de las bacterias transformadas (Figura 3.2). La producción de las proteínas recombinantes es inducida mediante adición del inductor Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), el cual se une a la proteína represora *lac* inactivándola, y de esta manera la RNA polimerasa de la bacteria puede transcribir el gen codificado, que es traducido en la proteína recombinante.

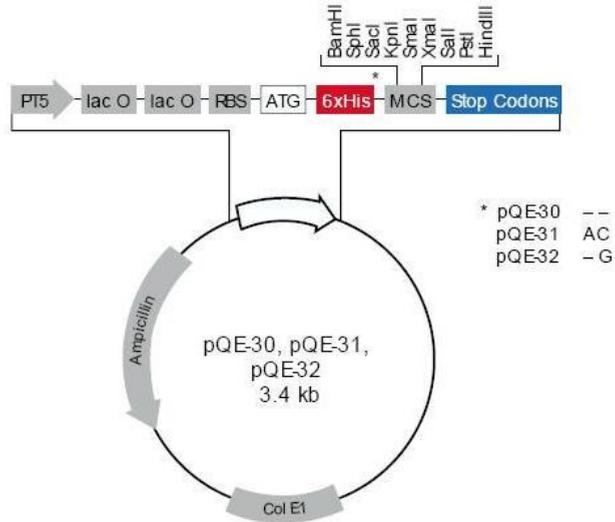


Figura 3.2: Mapa del vector pQE30-32 (QIAGEN).

### 3.5. Nucleótidos cebadores

Para amplificar la región génica codificante para los fragmentos de las proteínas de interés, se diseñaron parejas de cebadores basándose en la secuencia conocida del transcriptoma de larvas L3i de *S. stercoralis* (Marcilla *et al.*, 2012). A cada cebador se le añadió una secuencia reconocida por una enzima de restricción, para su posterior inclusión en el vector de expresión (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2:** Parejas de cebadores diseñados. Se indica el nombre de la proteína de la cual se amplifica cada fragmento, la enzima de restricción elegida para su posterior ligación en el vector de expresión (sombreado) y el tamaño del DNA amplificado en pb.

<b>Proteína</b>	<b>Enzima restricción</b>	<b>Cebador</b>	<b>Long (pb)</b>
Antígeno principal-mayor antigen	<i>Bam</i> HI	Fw ACG GAT CCA TCT GAT GCA GCT AT	710
	<i>Pst</i> I	Rv AGC TGC AGT AGC ATT GTC ATC GTG	
Trehalasa	<i>Bam</i> HI	Fw ACG GAT CCA CAC TTT GTT GAT ATG CCT	1467
	<i>Hind</i> III	Rv TGA AGC TTC CAA CCA AAC CCT TCT TG	
Troponina T	<i>Bam</i> HI	Fw ACG GAT CCA GCT CAA AAG AAA CGT CAT G	795
	<i>Pst</i> I	Rv AGC TGC AGC CAT GAG CAA TCT TAA AC	
14-3-3 zeta	<i>Bam</i> HI	Fw ACG GAT CCA TGG CTG AAA ATA AGG ATG AAC	707
	<i>Pst</i> I	Rv AGC TGC AGC CAT TGG TAT CAG ATG TC	
Catepsina L	<i>Bam</i> HI	Fw CGA GGA TCC GGT GCT GTT AAA AGT AAT	547
	<i>Pst</i> I	Rv CGA CTG CAG CAC CAT GAT CAA GAT T	
Aminopeptidas a sensible a puomicina (ASP)	<i>Sac</i> I	Fw ACG AGC TCA TTC CAG GTA AGA AGG	1470
	<i>Kpn</i> I	Rv ATG GTA CCA GCA GTT CCA TCC TCT	
Ferritina 1	<i>Bam</i> HI	Fw ACG GAT CCA TTT TAG TGA TGA AGT	465
	<i>Pst</i> I	Rv AGC TGC AGA GTC TTC ACC AAT TCC	
Proteasa aspártica 4	<i>Sal</i> I	Fw ACG TCG ACG GTA GTT CAA ATC TTT G	472
	<i>Pst</i> I	Rv AGC TGC AGC ACG AGT AAC TGA CAC ATA TG	



### 3.6. Péptidos sintéticos

Se diseñaron una serie de péptidos sintéticos a partir de secuencias aminoacídicas deducidas de proteínas presentes en larvas L3 del parásito (Marcilla *et al.*, 2010), y que mostraron reconocimiento por sueros de pacientes afectados por la parasitosis (Pérez-García, 2010). Se localizaron regiones que presentaran baja homología entre *S. stercoralis* y otros parásitos, y a partir de éstas se diseñaron los péptidos correspondientes (Tabla 3.3).

Las proteínas a partir de las cuales se diseñaron los péptidos fueron: proteína 14-3-3 (péptido 14), Tropomiosina (péptidos TRO1, TRO2 y TRO3), Galectina (péptidos GAL1 y GAL2) y Metaloproteinasa (péptidos MET1 y MET2). Se diseñó un péptido Quimera, fusionando las secuencias de MET1 y TRO1 (péptido QUIM1).

**Tabla 3.3:** Secuencia aminoacídica de los péptidos sintéticos diseñados a partir de proteínas de la L3i de *S. stercoralis*.

Péptido	Proteína	Secuencia aminoacídica	nº aminoácidos
14	14-3-3	TNGDDQDIGAEGG	13
GAL1	Galectina	ETPYTALANL	10
GAL2	Galectina	KSLSLFKYGGILF	13
MET1	Metaloproteinasa	EIKYLADKAVSGAMLCGKI	19
MET2	Metaloproteinasa	LPLKWSFPIDYYV	13
QUIM 1	Tropomiosina- Metaloproteinasa	EIKYLADKAVSGAMLCGKI- Acp-MAVENDLDKYM	31
TRO1	Tropomiosina	MAVENDLDKYM	11
TRO2	Tropomiosina	EKMEEASANC	10
TRO 3	Tropomiosina	IATEKMEEASANC	13

Los péptidos fueron sintetizados por Biomatik Corporation (Wilmington) llegando liofilizados al laboratorio. Para su preparación se siguieron las indicaciones del fabricante, disponiendo disoluciones de cada uno de los

péptidos a una concentración final de 2 mg/mL. Se requirió el uso del disolvente orgánico acetonitrilo, en proporción 1:4, en aquellos casos en los que la solubilización en agua era ineficiente.

## **MÉTODOS:**

### **3.7. Métodos coproparasitológicos**

Las muestras coprológicas de pacientes infectados por *S. stercoralis*, fueron recogidas en recipientes estériles de plástico sin añadirles ningún tipo de fijador. Una vez en el laboratorio se procedió a realizar la técnica en cultivo en Placa de Agar, por ser la técnica de laboratorio con la que se consigue obtener el mayor número de larvas L3i. Para la preparación de las placas, se diluyó agar bacteriológico Tipo Europeo (Cultimed) en agua en ebullición a una concentración de 1,5% y se vertió la mezcla en placas Petri de plástico de 90 mm de diámetro. Para el cultivo se tomó la misma cantidad de cada una de las muestras fecales (alrededor de 2 gramos), se situó en el centro de cada placa, y moldeó hasta lograr una forma de volcán, humedeciendo la depresión central con agua corriente (Figura 3.3.A). Las placas se sellaron con film transparente para mantener la temperatura y humedad en su interior y se dejaron en una estufa a 25 °C (Figura 3.3.B). Si la muestra resultaba positiva, las larvas, al desplazarse por la placa diseminaban las bacterias adosadas a su cuerpo, de manera que a las 24h de incubación podía verse el rastro de bacterias que dejan las larvas en el agar. Una vez confirmada su positividad, las placas fueron examinadas todos los días para observar la evolución de las larvas, y cuando la cantidad de larvas L3i en las gotas de condensación de la cubierta fue significativa (Figura 3.3.C), se procedió a su recolección a la lupa, con la ayuda de una micropipeta.

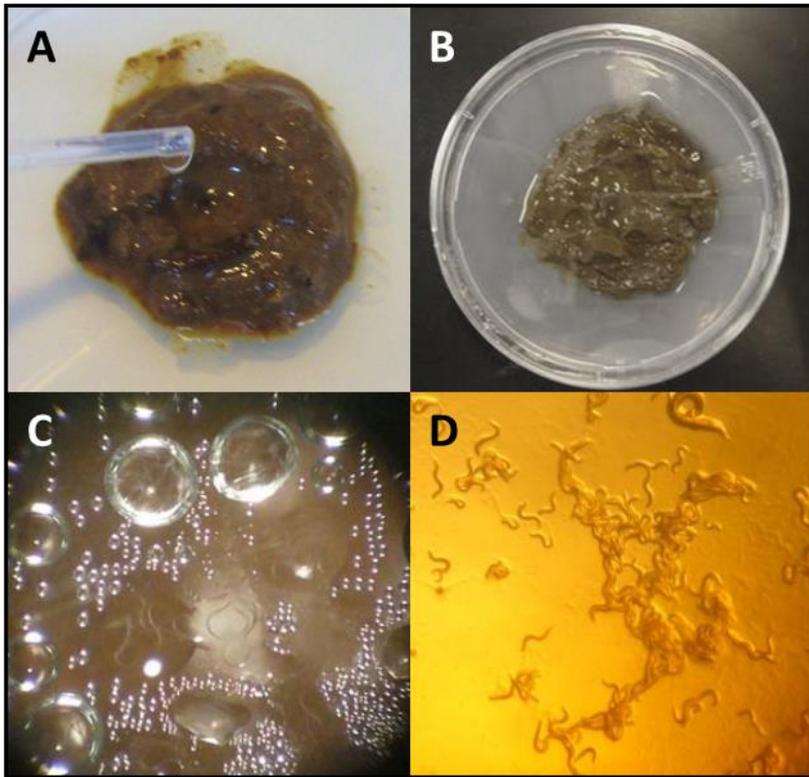
Las larvas se recogieron en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se lavaron dos veces en PBS, para eliminar la mayor cantidad de suciedad procedente del cultivo. Las larvas se recuperaron tras centrifugación suave a 8000 rpm durante 10



## Material es y métodos

min, se congeló el *pellet* de larvas en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

En el caso de las larvas presentes en los cultivos (Figura 3.3.D), que fueron destinados a ensayos de microscopía electrónica, una vez realizados los lavados con PBS, se incluyeron en glutaraldehído 2% para su fijación y se conservaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.3:** Cultivo de heces en placa de agar. A) Forma de volcán del cultivo en una placa, e hidratación de la muestra. B) Placa sellada con la muestra en contacto con la cubierta de la misma. C) Imágenes de larvas L3i de *S. stercoralis* en las gotas originadas por la condensación en la cubierta de la placa. D) Imagen tanto de larvas L3i como de adultos de vida libre del parásito en agar.

### **3.8. Clonación de cDNA codificantes para los fragmentos proteicos**

#### **3.8.1. Extracción del RNA total a partir de larvas L3i**

A partir de los vermes obtenidos del cultivo en placa de agar, y almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se extrajo el RNA total mediante la utilización del kit comercial *Real Total RNA Spin Plus* (Real), siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante.

Las larvas L3i están provistas de una cutícula muy resistente, que fue necesario quebrar para que el contenido celular fuera accesible a los reactivos de extracción. Por esta razón, las larvas L3i, se homogeneizaron en tampón de lisis con la ayuda de un pistón y el homogeneizado se pasó repetidas veces por una jeringuilla de 0,3 mm de diámetro. Las larvas eran analizadas a lo largo del proceso mediante observación al microscopio óptico, para confirmar el éxito de la lisis.

Para comprobar la integridad del RNA obtenido se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

El RNA total obtenido se utilizó directamente como molde para la síntesis de la primera cadena del DNA complementario (cDNA). Para llevar a cabo la reacción de transcripción inversa se utilizó el sistema comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). La retrotranscripción se realizó en un termociclador C1000 (Bio-Rad).

#### **3.8.2. Amplificación de los cDNA codificantes mediante RT-PCR**

Una vez obtenido el cDNA de cadena simple, éste fue utilizado como molde en una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la amplificación de las secuencias correspondientes de los fragmentos génicos de interés. Para ello se diseñaron parejas de cebadores específicos para cada gen a partir de la secuencia conocida del transcrito del parásito (ver Tabla 3.2).



## Material es y métodos

La mezcla de reacción fue la misma en cada una de las reacciones, consistente en tampón *DreamTaq 1x*, dNTPs mix 0,2 mM cada uno, Taq polimerasa 0,625 u (*DreamTaq DNA polymerase* -Thermo Scientific), 1  $\mu$ L de cDNA molde y mezcla de cebadores forward y reverse, específicos en cada caso, 0,4 mM cada uno. La reacción se ajustó con H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 25  $\mu$ L.

Todas las reacciones se iniciaron con un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguidamente se realizaron ciclos específicos para cada amplificación en función de las características de cada pareja de cebadores así como de la longitud del fragmento a amplificar (Tabla 3.4). Se terminó con un paso de elongación final de los fragmentos a 72 °C durante 5 min.

**Tabla 3.4:** Programas utilizados para amplificar los diferentes fragmentos génicos.

Gen interés	Desnaturalización	T <sup>a</sup> alineamiento	Elongación	Nº ciclos
Antígeno principal	94 °C - 3''	52 °C - 30''	72 °C - 1'	30
Trehalasa	94 °C - 3''	56 °C - 30''	72 °C - 2'	35
Troponina T	94 °C - 3''	53 °C - 30''	72 °C - 1'	35
14-3-3 zeta	94 °C - 3''	52 °C - 30''	72 °C - 1'	45
Catepsina L	94 °C - 3''	46 °C - 30''	72 °C - 1'	40
A.S.P.	94 °C - 3''	52 °C - 30''	72 °C - 2'	35
Ferritina 1	94 °C - 3''	47 °C - 30''	72 °C - 1'	45
Proteasa aspártica 4	94 °C - 3''	52 °C - 30''	72 °C - 1'	45

Para comprobar el éxito de la amplificación de los fragmentos de DNA codificantes para las proteínas de interés, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (*Gene Ruler*, Fermentas) y un marcador de ácidos nucleicos *Safe View* (NBS biologicals).

### **3.8.3. Obtención de bacterias competentes y transformación de bacterias por choque térmico**

Para incorporar material genético en células bacterianas es necesario el uso de bacterias *E. coli* competentes. Para ello, se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

En primer lugar, se inoculó 4 mL de cultivo de bacterias en fase estacionaria en 1 L de medio de cultivo LB, y se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar una D.O<sub>600</sub> de 0,45-0,5. Se centrifugó el cultivo a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C. Las células se resuspendieron en 500 mL de solución SALT (CaCl<sub>2</sub> 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 70 mM, AcONa 40 mM, a un pH de 5,5) y se mantuvieron durante 45 min en hielo. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C. El *pellet* celular se resuspendió nuevamente en 50 mL de la solución SALT fría y se añadió 9,4 mL de Glicerol al 80% a 4 °C. La mezcla se homogeneizó mediante una suave agitación y se procedió a repartir las bacterias competentes en alícuotas de 200 µL que se almacenaron en el congelador a -80 °C hasta su uso.

Para transformar las bacterias competentes, se siguió el protocolo descrito por Hanahan (1985). En primer lugar se descongelaron a 4 °C alícuotas de 200 µL de bacterias competentes. Una vez descongeladas, en el hielo, se añadió 10 µL del producto de ligación, y esta mezcla se incubó durante 30 min a 4 °C. Transcurrido el tiempo se sometió a las bacterias al choque térmico, pasando a una incubación a 37 °C por 5 min y seguidamente 2 min a 4 °C. Posteriormente se añadió 1 mL de medio LB a 37 °C y se incubó durante 90 min a 37 °C y agitación de 200 rpm. Tras la incubación se centrifugó el cultivo a 13000 rpm durante 3 min, se descartó el sobrenadante y sembró en masa 100 µL de *pellet* de bacterias en cada placa de LB-agar suplementado con antibióticos. Las placas se incubaron 24 h a 37 °C.



### 3.8.4. Construcción de los plásmidos en el vector pJET

Con el fin de obtener múltiples copias de los productos amplificados en la PCR, se procedió a clonarlos en el vector pJET 1.2, utilizando el kit *CloneJet PCR Cloning* (Fermentas). Se tomó 1  $\mu\text{L}$  del producto de PCR directamente para su ligación en dicho vector, siguiendo las indicaciones del fabricante. No fue necesaria la purificación de los genes tras la PCR, ya que no hubo amplificación inespecífica de otros productos durante los ciclos de PCR.

Se transformó con 10  $\mu\text{L}$  del producto de ligación tal y como se ha comentado anteriormente. El vector pJET 1.2 permite una selección positiva de manera que solamente las células bacterianas que incorporen plásmidos recombinantes serán capaces de crecer en el medio de cultivo selectivo. El éxito de la transformación se comprobó mediante una PCR de varias colonias al azar que habían crecido en el medio. Se utilizó como cebadores el *forward* del vector pJET 1.2 y el *reverse* del inserto, siguiendo las mismas condiciones para la PCR que las descritas en la amplificación del cDNA en el apartado 3.8.2.

Posteriormente se inoculó una de estas colonias positivas en un tubo de ensayo con 5 mL de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se dejó incubando a 37 °C durante 24 h a 200 rpm. A partir de este cultivo se purificaron los plásmidos con el inserto utilizando el kit *PowerPrep™ Express Plasmid Miniprep* (Marligen), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Mediante secuenciación automática (realizada en la Sección de Genómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental, SCSIE-UV) se comprobó que no se había producido ningún error en las cadenas nucleotídicas durante la amplificación.

### 3.8.5. Construcción de los plásmidos en el vector de expresión.

En el presente trabajo se indujo la producción de proteínas recombinantes en un sistema de expresión bacteriano. Para ello, en primer lugar fue necesario

insertar el DNA codificante para las proteínas de estudio en el vector de expresión pQE30-32.

En primer lugar se realizó la digestión con enzimas de restricción tanto de los plásmidos pJET 1.2 generados como del vector de expresión. Esto fue posible ya que en el diseño de los cebadores se había incluido una secuencia reconocida por enzimas de restricción específicas. Para ello se utilizó el sistema comercial *FastDigest Enzymes* (Thermo Scientific). Para cada reacción de digestión se añadió 1  $\mu\text{L}$  de cada enzima de restricción, 2  $\mu\text{L}$  del tampón *FastDigest 10x*, y 10  $\mu\text{L}$  del vector correspondiente ajustando el volumen final de cada reacción a 20  $\mu\text{L}$ . Siguiendo las indicaciones del fabricante, se incubaron los productos a digerir durante 5 min a 37 °C.

Los productos obtenidos tras la digestión enzimática fueron purificados antes de proceder a la ligación de los mismos en el vector de expresión. La purificación del DNA tiene como finalidad eliminar fragmentos de DNA no deseado en la muestra con la que se está trabajando. En el caso de los insertos, se corrieron los productos de digestión en un gel de agarosa al 1% y el DNA se purificó a partir de la banda del gel correspondiente al inserto, utilizando el *kit UltraClean 15 DNA Purification* (MOBIO), en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Para los vectores de expresión se utilizó el *kit UltraClean PCR* (MOBIO), y la muestra se eluyó en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . En ambos casos se siguió el protocolo proporcionado por los fabricantes de dichos kits.

Una vez que tanto inserto como vector se hubieron digerido y purificado, se procedió a cuantificar cada producto. Para ello se corrió un gel de agarosa al 1% y se utilizó como marcador de peso molecular *Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker*, el cual es útil como indicador de tamaño molecular, y también como herramienta de cuantificación del DNA en gel de electroforesis.

La cantidad requerida tanto de inserto como de vector que se empleó en cada reacción de ligación vino determinada por la siguiente ecuación:



## Material es y métodos

$$\text{inserto (ng)} = \frac{50 \text{ ng} \times \text{tamaño inserto (pb)} \times \text{ratio molar}}{\text{tamaño vector (pb)}}$$

Una vez calculadas las cantidades adecuadas, tanto de vector como de inserto, se procedió a la ligación de los mismos. Para ello se utilizó el *kit Rapid DNA ligation* (Fermentas). Se añadió a cada reacción 4  $\mu\text{L}$  del tampón de ligación 4x y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima Ligasa, completando el volumen con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta 20  $\mu\text{L}$ . Se incubó la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente (22 °C aproximadamente). Tomando 10  $\mu\text{L}$  de la reacción de ligación anterior se transformaron bacterias competentes de *E. coli* mediante choque térmico.

El éxito de la transformación de las bacterias se comprobó mediante PCR, utilizando como cebadores el *forward* del vector y el *reverse* del inserto, a partir de colonias crecidas en medio de cultivo sólido suplementado con el antibiótico correspondiente en función de la cepa bacteriana utilizada.

### 3.9. Obtención de proteínas recombinantes en bacterias

#### 3.9.1. Inducción de la expresión de los genes codificantes

Para la inducción de la expresión de los cDNAs clonados en los vectores PQE se partió de una colonia aislada de bacterias transformadas con el plásmido recombinante, se inoculó en 5 mL de medio LB suplementado con antibióticos y se incubó durante toda la noche a 37 °C y 200 rpm. 500  $\mu\text{L}$  de dicho cultivo se añadieron a 35 mL de medio LB con antibióticos y se incubó en agitación a 37°C hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 0,5-0,7. Se tomó una alícuota de 1 mL de cultivo y se añadió el inductor de expresión, isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) incubándose en agitación. Se tomaron alícuotas de 1 mL de cultivo a varios tiempos post-inducción, para determinar el momento óptimo de expresión de los genes para cada proteína recombinante.

### **3.9.2. Purificación de proteínas en condiciones desnaturalizantes**

Para la purificación de proteínas recombinantes se utilizó el sistema de columnas Ni-NTA Spin (Qiagen®), las cuales poseen una resina de gran capacidad y alto rendimiento para purificación por afinidad rutinaria de proteínas de fusión con cola de histidinas. El soporte de la resina consiste en agarosa derivatizada con ácido nitrilotriacético que actúa como quelante de los iones de níquel divalente ( $\text{Ni}^{2+}$ ). De esta forma los iones de  $\text{Ni}^{2+}$  quedan unidos por 4 enlaces a la columna, haciendo muy difícil su desprendimiento. A través de los dos enlaces restantes, se unen las proteínas con las colas de histidina que se quieren purificar. Esta resina, en combinación con la matriz de sílice de las columnas, proporciona una superficie hidrofóbica, de modo que se minimiza el establecimiento de uniones inespecíficas.

Se purificó las proteínas recombinantes bajo condiciones desnaturalizantes, puesto que no era necesario obtener las proteínas en su conformación nativa. Se siguió el protocolo de purificación utilizando los tampones que se indican en la tabla 3.5. El *pellet* de bacterias transformadas con el plásmido recombinante se resuspendió en 600  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis y se centrifugó durante 20 min a máxima velocidad. El sobrenadante se cargó en la columna previamente equilibrada con el mismo tampón, y se centrifugó a baja velocidad (2000 rpm) durante 2 min. De este modo, la proteína recombinante quedó unida a la columna, y se procedió a realizar un par de lavados con el tampón de lavado (2000 rpm durante 2 min) para eliminar las proteínas o residuos que se hubieran podido unir de forma inespecífica a la columna. Finalmente se añadió 200  $\mu\text{L}$  de tampón de elución y centrifugó 2 min a 2000 rpm, para eluir la proteína recombinante.



**Tabla 3.5:** Tampones utilizados para purificar las proteínas recombinantes bajo condiciones desnaturalizantes.

Tampón	Composición
Tampón de lisis	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M, TrisCl 0,01M, Urea 8M, pH 8,0
Tampón de lavado	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M, TrisCl 0,01M, Urea 8M, pH 6,3
Tampón de elución	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M, TrisCl 0,01M, Urea 8M, pH 4,5

Se tomó una fracción en cada uno de los pasos de la purificación para su posterior análisis en gel de poliacrilamida al 10%.

### 3.9.3. Obtención de proteínas recombinantes mediante dilución en DMSO

En el caso de la proteína recombinante Aminopeptidasa-Sensible a Puromicina (ASP), se optó por diluir directamente la banda procedente del filtro de nitrocelulosa en el disolvente orgánico Dimetilsulfóxido (DMSO). Para ello, se corrió el extracto total obtenido a partir de las bacterias transformadas en un gel de poliacrilamida al 10% y posteriormente se realizó una transferencia húmeda a papel de Nitrocelulosa. Tras la tinción de la membrana con rojo Ponceau S, la banda correspondiente a la proteína recombinante se cortó y se añadió la cantidad mínima necesaria de DMSO hasta que quedó totalmente disuelta.

## 3.10. Análisis de proteínas

### 3.10.1. Obtención de proteínas

Para obtener las proteínas a partir de lisados de los distintos parásitos utilizados en esta Tesis, se realizaron distintos lavados de los mismos con tampón PBS para eliminar material contaminante. Se cortó, con ayuda de unas tijeras, los distintos parásitos en trozos pequeños y se añadió tampón PBS con el inhibidor de proteasas metil-fenilensulfóxido (PMSF) 0,8 mM. Se trituró utilizando un taladro y pistones hasta que la mezcla fue totalmente

homogénea. Posteriormente se realizaron dos centrifugaciones de 10 y 20 min a 10000 rpm. El sobrenadante con el extracto de proteínas se cuantificó y se almacenó a -20 °C su uso.

Para la obtención de proteínas a partir de células bacterianas se recogió 1 mL de cultivo por centrifugación (13000 rpm durante 5 minutos). A continuación se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en en 75 µL de tampón Laemmli 2X (Tris-HCl 31,25 mM pH 6,8; SDS 2%, glicerol 10% y mercaptoetanol 5%).

### **3.10.2. Cuantificación de Proteínas**

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el sistema comercial *Protein Assay* (Bio-Rad), basado en el método Bradford de cuantificación de proteínas solubles (Bradford, 1976). Ésta se fundamenta en los cambios de coloración que se producen en el Azul de Coomasie brillante G-250 ante diferentes concentraciones de proteína.

Para la cuantificación de cada muestra se mezcló 10 µL de cada una de ellas con 200 µL del reactivo de Bradford diluido 1:5. Se realizó una recta patrón empleando concentraciones crecientes de una dilución de BSA (de 0,1 mg/mL a 10 mg/mL), para la valoración de los resultados. Cada muestra se analizó por duplicado. Se procedió a la lectura de los datos de absorbancia a 595 nm en lector *iMark Microplate* (Bio-Rad), y utilizando el software *Microplate Manager5.0* (Bio-Rad).

### **3.10.3. Electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida**

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), según el protocolo descrito por Laemmli (1970), utilizando el sistema MiniProtean 3 (BioRad). Estos geles constan de una zona superior de empaquetamiento (acrilamida:bisacrilamida al 6%, Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0,1%) y una zona



## Material es y métodos

inferior de separación (acrilamida:bisacrilamida al 10%, Tris-HCl 375 mM pH 8.8, SDS 0,1%). Las muestras se hirvieron durante 5 min a 95 °C para la desnaturalización de las proteínas y se cargó cada pocillo con un máximo 40 µg de lisado total de proteínas en un volumen de 25 µL de muestra. En cada gel se cargó un marcador de peso molecular para proteínas *PAGERuler Prestained Protein Ladder 4-20% Tris-glycine SDS-PAGE* (Fermentas). La primera parte de la electroforesis (empaquetamiento) se realizó a 40 V mientras que para la segunda parte (resolución) se utilizó 100 V. El tampón de electroforesis utilizado fue SDS-PAGE 1X (glicina 0,19 M, SDS 0,1% pH 8.3 ajustado con Tris).

### 3.10.4. Tinción de geles

Cuando se necesitó visualizar las proteínas corridas en el gel, tras la electroforesis, éste se tiñó con una solución de Azul de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue R-250*, Bio-Rad) durante 45 min en agitación, y posteriormente se decoloró con una solución decolorante (Metanol 25%; ácido acético 0,7%) durante toda la noche.

### 3.10.5. Transferencia a membrana (*Western blot*)

Una vez separadas por electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond-ECL, Healthcare). Para la transferencia se utilizó el set Mini-Trans Blot (Bio-Rad) y el tampón de transferencia TOWBIN (Glicina 0,19 M, SDS 0,01%, Metanol 20% pH 8.3 ajustado con Tris). La transferencia se realizó aplicando una corriente constante de 200 mA durante 90 min a 4 °C.

### 3.10.6. Tinción de membranas

Terminada la transferencia, se tiñó la membrana con la disolución colorante rojo *Ponceau S* (Sigma) para comprobar la eficiencia de la transferencia proteica y obtener un control interno de carga. Para ello, se sumergieron las membranas en la solución colorante (0.1 % (p/v) en ácido acético glacial 1%)

durante 5 min en agitación. Posteriormente, se eliminó el exceso de colorante por medio de la solución de lavado (ácido acético glacial 1%).

### 3.10.7. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas

En primer lugar se bloquearon todos los sitios de unión no específicos de las membranas utilizando una solución de bloqueo (Tween 20 0,1 %, NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.6, leche desnatada 4%) durante al menos 1h en agitación. Una vez bloqueadas, se retiró la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo primario a una dilución específica para cada caso (Tabla 3.6), incluyendo sueros de pacientes, y se incubó durante 1 h como mínimo a temperatura ambiente en agitación. A continuación se realizaron 3 lavados de 15 min en TBS-Tween 20 (Tween 20 0,1%, NaCl150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.6). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-inmunoglobulinas obtenidas en cabra y acopladas a peroxidasa en dilución variable en función del caso (Tabla 3.6), durante 1h a temperatura ambiente, y se volvió a lavar la membrana 3 veces x 15 min en TBST para retirar el exceso de anticuerpo secundario.

**Tabla 3.6:** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos de *Western blot*, mostrando la dilución utilizada en cada caso.

Anticuerpo primario	Dilución	Proveedor	Anticuerpo secundario	Dilución	Proveedor
ANTI-HIS	1/3000	GE Healthcare	GAM (Goat Anti-Mouse)	1/20000	Bio-Rad
Sueros pacientes	1/200	Hospitales La Safor	GAH (Goat Anti-Human)	1/20000	Bio-Rad
Anticuerpos policlonales	1/1000	Nuestro laboratorio	GAR (Goat Anti-Rabbit)	1/15000	Bio-Rad



Se reveló la reacción de la peroxidasa con el *kit Lumi-light Western blotting substrate* (Roche), incubando la membrana durante 5 min, y se visualizó el resultado mediante quimioluminiscencia con el equipo Chemi Doc™ XRS (Bio-Rad), y utilizando el programa informático Quantity one 4.6.6 (Bio-Rad).

En los casos en los que fue necesaria la reutilización de las membranas, estas se incubaron previamente durante 30 min a 50 °C en un tampón que contenía β-mercaptoetanol 100mM, SDS 2% y Tris-HCl 62,5 mM pH 6.7, y después de 3 lavados, las membranas se reincubaron con otro anticuerpo como se ha descrito anteriormente.

### **3.11. Evaluación de la reactividad de proteínas recombinantes frente a suero de pacientes mediante *Slot blot***

Para analizar si las proteínas recombinantes purificadas eran reconocidas específicamente por sueros de pacientes positivos para estrongiloidiasis, se llevó a cabo un ensayo de *slot blot*. Se prepararon 2 diluciones con diferente concentración de cada una de las proteínas recombinantes purificadas (500 ng y 1 µg) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando un equipo MINIFOLD I de Schleisser & Schuell. Se tiñó la membrana durante 5 min con rojo Ponceau S (Sigma) para confirmar el éxito de la transferencia. Se bloqueó la membrana con BSA 3% en TBST durante 1h, y se incubó con sueros de pacientes (positivos y negativos a la enfermedad) a diferentes diluciones (1/200, 1/500 y 1/1000) durante 1h. Se incubó con el anticuerpo secundario GAH (*Goat Anti-Human*) 1/20000, durante 1h a temperatura ambiente. Entre cada incubación se lavó la membrana 3 x 10 min con TBST. Todas las incubaciones y lavados se llevaron a cabo en agitación y a temperatura ambiente. Se reveló la membrana incubando durante 5 min con el *kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (Healthcare Sciences), y posterior visualización mediante quimioluminiscencia en el sistema Chemi-Doc™ XRS de Bio-Rad.

## **3.12. Producción de anticuerpos policlonales**

### **3.12.1. Inmunización de conejos**

Para obtener anticuerpos policlonales frente a diferentes proteínas recombinantes se utilizaron conejos hembra albinos de la cepa Nueva Zelanda, inmunizándose dos conejos con cada proteína.

Se dejaron transcurrir unos días de la llegada de los animales al animalario de la Sección de Producción animal (SCSIE) de la Universitat de València, para que se aclimataran antes de iniciar la inmunización. Para obtener el suero pre-inmune de cada uno de los conejos se extrajeron entre 7 y 8 mL de sangre de cada animal mediante punción en la arteria auricular. La sangre se recogió en tubos estériles que contenían heparina como anticoagulante. Para obtener el suero, se realizaron dos centrifugaciones de la sangre durante 10 min a 8000 rpm cada una. Finalmente el sobrenadante se guardó a -20 °C en alícuotas de 500 µL. Se realizó un ensayo de *Western blot* con sueros pre-inmunes frente a proteínas recombinantes para asegurar que no hubiera reconocimiento previo a la inmunización.

Se siguió el protocolo de inmunización que se detalla a continuación:

Semana 1: Los conejos fueron inmunizados vía intramuscular con las proteínas recombinantes. Se inoculó 100 µg de cada proteína diluidas en el mismo volumen de coadyuvante completo de Freund (Sigma). El volumen total inoculado fue de 200 µL a cada animal.

Semana 3: Se repitió el protocolo de inmunización, pero en esta ocasión se utilizó el coadyuvante incompleto de Freund (Sigma).

Semana 4: Se extrajo 6-7 mL de sangre de cada conejo. Se obtuvo el suero y se almacenó a -20 °C.

Semana 5: Se realizó una nueva inmunización con 100 µg de cada proteína diluida en coadyuvante incompleto de Freund (Sigma).



## Material es y métodos

Semana 6: Se extrajo nuevamente sangre de los animales.

Semana 7: Se volvió a inmunizar a los conejos con otros 100 µg de proteína y coadyuvante incompleto de Freund (Sigma).

Semana 8: Se extrajo sangre de los animales. Se realizó un ensayo de ELISA con los sueros para valorar si los animales ya presentaban inmunidad frente a las proteínas.

Semana 9: Se procedió al sacrificio de todos los conejos. Se suministró un anestésico a los animales, consistente en una mezcla de ketamina (35mg/kg/intramuscular) y xilacina (5mg/kg/intramuscular), y posteriormente se extrajo el mayor volumen posible de sangre a través de la arteria auricular. Finalmente los animales fueron sacrificados utilizando el anestésico pentobarbital a niveles letales (75mg/kg/intravenoso), y se desangraron totalmente mediante punción cardiaca. El suero se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### **3.12.2. Purificación de anticuerpos**

Para la purificación de los anticuerpos a partir de sueros de conejos inmunizados se utilizó el *kit Protein A HP SpinTrap* (GE Healthcare), basado en la afinidad de la proteína A por la región Fc de las inmunoglobulinas de gran variedad de especies. Se siguieron las indicaciones del fabricante y finalmente se obtuvieron dos eluciones de cada anticuerpo de 200 µL que se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### **3.13. Ensayos inmunoenzimáticos**

#### **3.13.1. ELISA indirecto**

Mediante este ensayo se valoró la capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes y de los péptidos sintéticos generados en este trabajo, y su

utilidad como posible herramienta diagnóstica. Además también se empleó esta técnica para comprobar el éxito en la inmunización de los conejos.

Para realizar el ensayo de ELISA, se tapizaron placas de poliestireno de 96 pocillos con las muestras diluidas en una solución tampón carbonatos 0,1 M, pH 9,6, en un volumen de 100  $\mu$ L/pocillo, y se incubó durante toda la noche a 4°C. Tras bloquear las placas con una solución de BSA al 3% en PBS-Tween 20 0,05% (PBST), durante 1h a 37 °C y en agitación suave (60 rpm), cada muestra se incubó con los diferentes sueros individuales durante 90 min a 37 °C y en agitación. La dilución de los sueros utilizada en cada experimento se muestra en la tabla 3.7. El anticuerpo secundario se incubó durante 1h a 37 °C. Tras cada incubación se realizaron tres lavados de la placa con PBST.

**Tabla 3.7:** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados cada ensayo de ELISA indirecto, mostrando las diluciones empleadas en cada caso.

Tapizado	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Péptidos sintéticos	Sueros pacientes	1/200	GAH	1/20000
Proteínas recombinantes	Sueros pacientes	1/100	GAH	1/5000
		1/200		1/10000
		1/400		1/15000
Proteínas recombinantes	Sueros conejos inmunizados	1/200 1/400	GAR	1/15000

Después del último lavado, la placa se reveló utilizando como sustrato orto-fenilendiamina (OPD) (Sigma), a una concentración de 0,4% mg/mL en una solución tampón (ácido cítrico 0,1 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M). Se incubó en oscuridad



## Material es y métodos

durante 10 min, tras los cuales se paró la reacción añadiendo HCl 3N. Se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector *iMark Microplate* (Bio-Rad), utilizando el *software Microplate Manager* 5.0. (Bio-Rad).

Cada muestra se evaluó por triplicado, y el resultado se expresó como la densidad óptica (DO) media con la desviación estándar (DS) correspondiente. El límite de positividad de cada muestra (“*cut-off*”) se estableció como la DO media  $\pm$  3 DS del control negativo.

### 3.13.2. ELISA de captura

Para evaluar la capacidad diagnóstica de los anticuerpos policlonales obtenidos en esta Tesis se realizó inicialmente un ensayo tipo ELISA de captura de inmunocomplejos en suero de pacientes humanos.

Para ello se tapizó cada pocillo de la placa con 100  $\mu$ L de *coating buffer* conteniendo 50  $\mu$ g del anticuerpo correspondiente. Se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Se bloqueó la placa con BSA 5% en PBS durante 45 min a 37 °C. Posteriormente se incubó con los sueros de pacientes, tanto positivos como negativos a la enfermedad, en dilución 1/50 en PBST durante 45 min a 37 °C, siguiendo el protocolo descrito por Levenhagen *et al.* (2015). Finalmente se incubó con el anticuerpo secundario GAH, dilución 1/10000, 45 min a 37 °C. Entre cada incubación se realizaron 3 lavados con TBST. Para la lectura de los resultados se siguió el mismo procedimiento que el descrito en el apartado anterior.

### 3.14. Inmunolocalización de proteínas en cortes de vermes mediante microscopía láser confocal.

Se ha estudiado la localización de las proteínas del estudio en cortes semifinos de larvas L3i de *S. stercoralis*. Las muestras se visualizaron en el microscopio láser confocal Olympus FV1000, en la Sección de Microscopía del SCSIE de la UV.

### **3.14.1. Preparación de muestras para inmunohistoquímica**

Las larvas L3i, obtenidas a partir de cultivos en placa de agar se fijaron en una solución de glutaraldehído 2%. Una vez fijado, se incluyó el material en agar 0,4% para poder manipularlo, ya que, debido al pequeño tamaño de las larvas y ausencia de color de las mismas, resulta difícil trabajar con ellas. Posteriormente se lavó en tampón fosfato 0,1 mM a pH 7,3, y se realizó una post-fijación con osmio 2%. Se lavó con agua destilada y se sometió a deshidratación mediante baños en concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) de 10 min cada uno. Una vez deshidratadas, se infiltró en resina LR-White, se orientó las muestras en el bloque y se dejó polimerizar la resina. Finalmente se realizaron cortes de 1  $\mu\text{m}$  de grosor, aproximadamente, en el equipo *Ultracut UC6* (Leica).

### **3.14.2. Protocolo de tinción de las muestras**

Los cortes semifinos de larvas L3i se bloquearon con BSA al 5% en PBST y Tritón X-100 (Sigma) a una concentración final de 0,2%, durante 1 h. Seguidamente se incubaron con sueros conteniendo el anticuerpo primario (anticuerpos policlonales obtenidos previamente) a una dilución 1/20 en PBST-Tritón X-100 0,2%, durante 2h. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa, GAR (Goat Anti-Rabbit) 1/500 en PBST-Tritón X-100 0,2%, durante 1h, y por último con el anticuerpo fluorescente, antiperoxidasa generado en cabra y conjugado con fluoresceína (FITC), 1/200, durante 1h y en oscuridad (Bio-Rad). El espectro de emisión de este fluorocromo presenta un máximo en los 517 nm (verde). Finalmente se realizó una incubación con el marcador fluorescente 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) durante 1 min en oscuridad (Sigma). Éste se une a DNA, emitiendo a 461 nm (azul). Este fluorocromo facilita la identificación de estructuras y orientación de la muestra, para así poder determinar la ubicación de las proteínas reconocidas por los anticuerpos en el interior de la larva. Entre cada incubación se realizaron 3 lavados de 5 min de duración cada uno, con PBST,



salvo en el último paso, que se hizo un único lavado de 10 min con PBST. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y en agitación en cámara húmeda. Finalmente se montó la preparación con medio de montaje acuoso (Sigma).

Por cada muestra se dispuso de un control negativo, con el fin de determinar posibles uniones inespecíficas del fluorocromo y/o autofluorescencia de la muestra. Estos fueron incubados con DAPI, pero no con el anticuerpo primario correspondiente en cada caso.

### **3.15. Estudio microscópico de la superficie y cortes de *S. stercoralis***

#### **3.15.1. Preparación de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

Del mismo modo que para la preparación de muestras para inmunohistoquímica, las larvas L3i se lavaron con PBS y se fijaron con glutaraldehído 2%, se incluyeron en agar al 0,4% para facilitar la manipulación y se lavaron en tampón fosfato 0,1 mM a pH 7,3. Para SEM el material se deshidrató con baños a concentración creciente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% y 100%). Se llevó la muestra a punto crítico, procedimiento que consiste en sustituir el etanol 100% por CO<sub>2</sub> líquido, y seguidamente calentar este CO<sub>2</sub> para que pase a estado gaseoso bajando la presión lentamente para preservar la estructura de la muestra sin agua. Para orientar las larvas correctamente, se fijaron en un portamuestras especial para el equipo que iba a ser empleado para visualizarlas, un SEM Hitachi S-4800. Se sombreó la muestra con una fina capa nanométrica de oro/paladio, con el fin de hacer la muestra conductora y así poder obtener imágenes sin ruido de fondo y con un buen contraste.

### **3.16. Análisis comparativo de las secuencias codificantes para las proteínas objeto del estudio en diferentes fases del parásito**

Se ha llevado a cabo un análisis de secuencias de RNA, con el fin de confirmar si los genes identificados a partir de los transcritos realmente se expresaban mayoritariamente en el estadio larvario infectivo L3i. Además se realizó una comparación del nivel de expresión en tres fases del parásito: hembras adultas parásitas, hembras adultas de vida libre y larvas L3i.

Para ello, se rastrearon dichas secuencias en los proyectos de secuenciación de RNA de distintas fases evolutivas del parásito (en colaboración con los Dres. Vicky Hunt y Mark Viney, de la Universidad de Bristol, UK).

### **3.17. Programas informáticos de análisis de secuencias aminoacídicas y nucleotídicas**

Para realizar la búsqueda de secuencias nucleotídicas codificantes para proteínas de helmintos homólogas a las de *S. stercoralis* se utilizó el buscador BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para el diseño de los cebadores utilizados para amplificar los genes codificantes de las proteínas del estudio se utilizó el software Vector NTI® Express, así como el programa *Oligo Analyzer* de IDT Integrate DNA technologies (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Para el alineamiento múltiple de secuencias homólogas, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, se empleó el programa *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Se utilizó la herramienta (<http://web.expasy.org/translate/>), del portal bioinformático ExPASy, para obtener la secuencia aminoacídica deducida a partir de las secuencias de nucleótidos correspondientes.



## *Material es y métodos*

También del portal ExPASy, se utilizó el programa ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/pscale/Hphob.Doolittle.html>), con el fin de determinar las regiones más hidrofóbicas e hidrofílicas de las proteínas del estudio.

El análisis de los dominios antigénicos se realizó con el programa EMBOSS (<http://embo ss.bioinformatics.nl/>).

## ***4. Resultados***



La primera parte de este apartado describe la evaluación, con posible utilidad diagnóstica de una serie de péptidos sintéticos correspondientes a proteínas identificadas como antigénicas en larvas L3i de *S. stercoralis*.

En segundo lugar, y siguiendo en la línea de búsqueda de nuevas dianas diagnósticas, se procedió a la identificación, clonación y producción en bacterias de algunas de las proteínas correspondientes a los transcritos más abundantes de larvas L3i de *S. stercoralis*. Así mismo, se produjeron anticuerpos policlonales frente a algunas de ellas, y se llevaron a cabo ensayos de ELISA de captura y estudios de inmunolocalización en cortes de larvas L3i del parásito para confirmar su presencia y determinar su localización.

Finalmente se ha realizado un estudio mediante SEM de la superficie de las L3i de *S. stercoralis*, con el fin de contribuir a una mejora del conocimiento morfológico que se tiene sobre las mismas.

#### **4.1. Evaluación de la capacidad diagnóstica de péptidos sintéticos correspondientes a proteínas de larvas L3i de *S. stercoralis* mediante ELISA indirecto**

Como se comentó en el apartado de Materiales y Métodos, se diseñaron una serie de péptidos sintéticos con la finalidad de mejorar la sensibilidad y la especificidad en el diagnóstico de la estrongiloidiasis con respecto a los métodos inmunológicos comerciales que se utilizan actualmente.

Los péptidos sintéticos utilizados se obtuvieron a partir de las proteínas Galectina, Tropomiosina, proteína 14-3-3 y del precursor de la Metaloproteinasa. En trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, estas proteínas fueron identificadas en lisado total de las larvas L3i del parásito. En estos estudios, también se llevó a cabo un análisis de las proteínas de la superficie del parásito, sometiendo a las L3i a una digestión breve con tripsina, identificándose entre las proteínas liberadas tras 30 min de incubación la Tropomiosina y 14-3-3, lo cual sugiere que ambas están



## Resultados

asociadas a la superficie larvaria (Marcilla *et al.*, 2010). Además, en ensayos de *Western blot* en los que se enfrentó lisado total de L3i de *S. stercoralis* con *pools* de sueros de individuos sanos y enfermos de estrongiloidiasis, se identificó entre las proteínas que reaccionaban exclusivamente con los sueros de pacientes enfermos la Tropomiosina, 14-3-3 y la Galectina (Pérez-García, 2010).

Una vez seleccionadas las proteínas a partir de las cuales se iban a diseñar los péptidos, se realizó una búsqueda en bases de datos (NCBI) de las secuencias aminoacídicas deducidas correspondientes a estas proteínas, tanto de *S. stercoralis* como de otros helmintos parásitos, y se realizó el alineamiento de las mismas mediante el programa CLUSTAL W. Se seleccionaron las regiones que presentaban menor homología entre los distintos parásitos analizados, y posteriormente se realizó un análisis bioinformático para determinar cuáles de estas regiones eran potencialmente más inmunógenas, utilizando para tal fin el programa EMBOSS (<http://emboss.bioinformatics.nl/>). Finalmente se produjeron un total de 9 péptidos sintéticos: TRO 1, TRO 2 y TRO 3, a partir de Tropomiosina; MET 1 y MET2 a partir del precursor de Metaloproteinasas; GAL 1 y GAL2 a partir de la Galectina; y QUIM1, péptido quimérico generado de la fusión de los péptidos MET1 Y TRO1 (Tabla 3.3).

Con el fin de estudiar la posible utilidad diagnóstica de dichos péptidos se realizó, inicialmente, un ensayo de ELISA indirecto para evaluar en qué medida los sueros de pacientes afectados por *S. stercoralis*, procedentes de una zona endémica de la Comunidad Valenciana, eran capaces de reconocer los péptidos diseñados. Se utilizaron un total de 26 sueros positivos a la enfermedad y 4 sueros negativos, empleados como control negativo en el experimento.

El ensayo se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 3.13.1, tapizando placas de poliestireno con 50 ng de péptido, y probando cada suero por triplicado. Tras varias pruebas se utilizó una dilución 1/200 de los sueros y 1/20000 del anticuerpo secundario GAH.

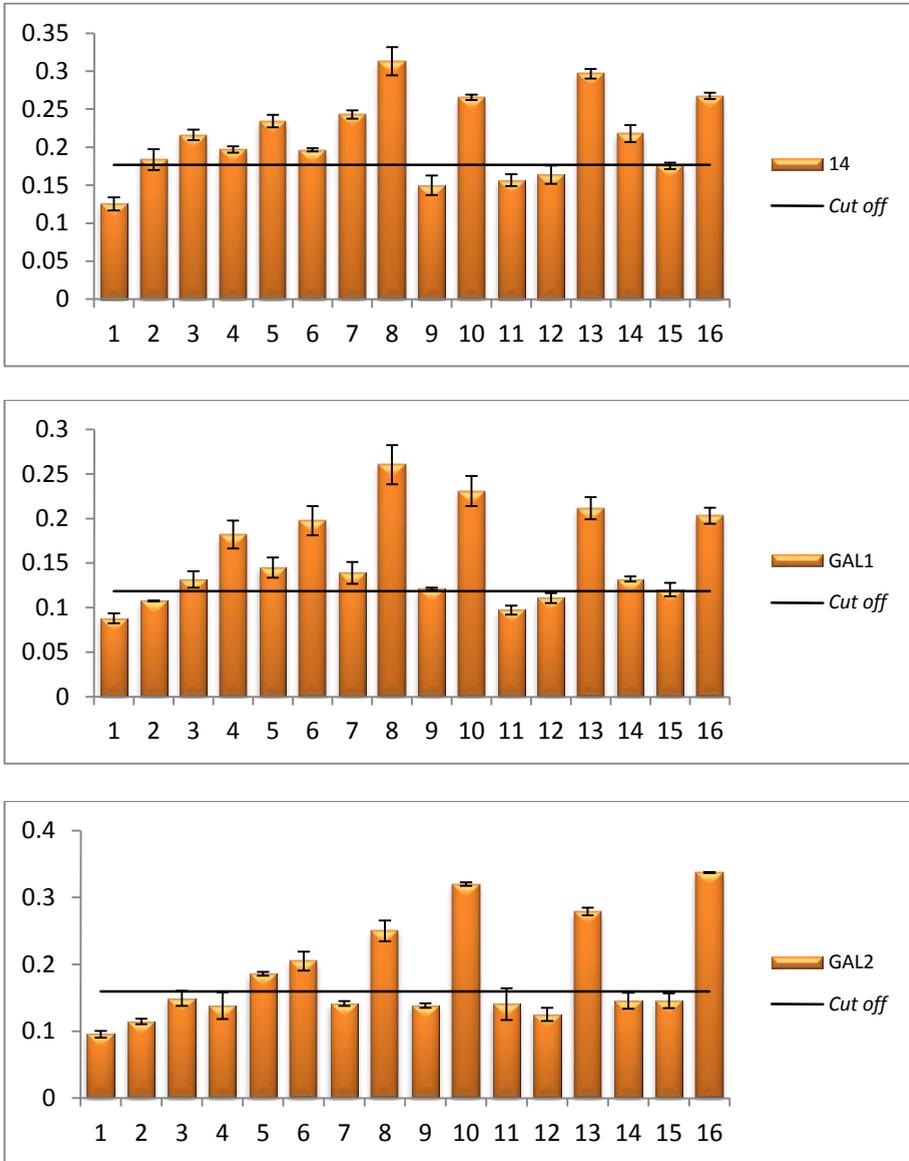
Como control negativo de parasitosis se utilizó un *pool* con 4 sueros de pacientes sanos.

Inicialmente, cada uno de los 9 péptidos sintéticos producidos se enfrentó a 16 sueros de pacientes positivos a estrongiloidiasis, y remitidos por el **Hospital de La Ribera, Alzira**, correspondientes todos ellos con casos endémicos de parasitación de la Comarca de La Safor (Valencia).

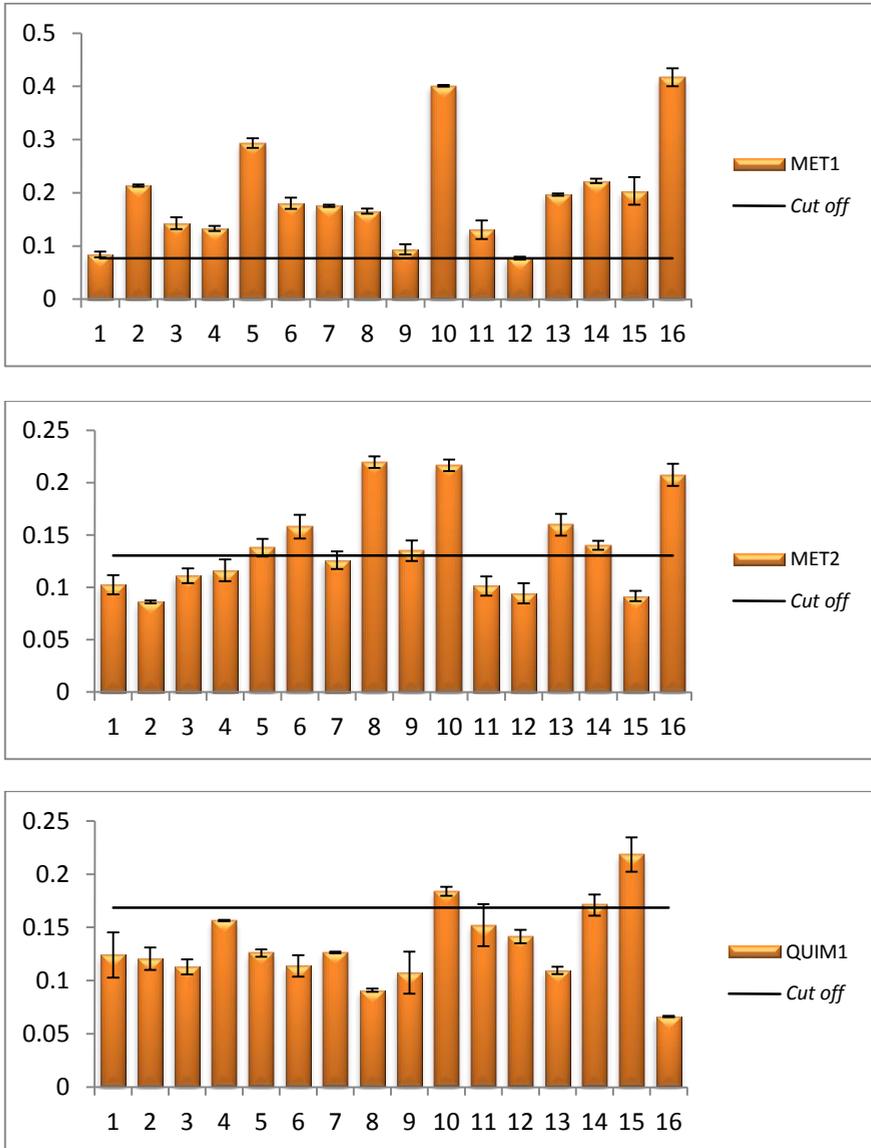
En las figuras 4.1, 4.2 y 4.3 se muestran los resultados obtenidos para cada suero individual frente a cada uno de los péptidos analizados, tras procesar los datos obtenidos con los ensayos de ELISA indirecto.

Los péptidos que originaron una respuesta más fuerte, y que por tanto, demostraron mayor reconocimiento por los sueros fueron MET1 y TRO1, con incrementos de hasta 4 veces respecto al control. Los péptidos que fueron reconocidos por un mayor número de sueros fueron también MET1, con 15 positivos y TRO1 con 14, esto es, mostraron valores de sensibilidad del 93,75% y 87,5% respectivamente. Por otro lado, los péptidos menos reconocidos fueron GAL2, MET2 con 6 positivos cada uno (37,5% de sensibilidad), y QUIM1, con solo 2 positivos (12,5% de sensibilidad), mostrando su escasa utilidad diagnóstica.

 Resultados

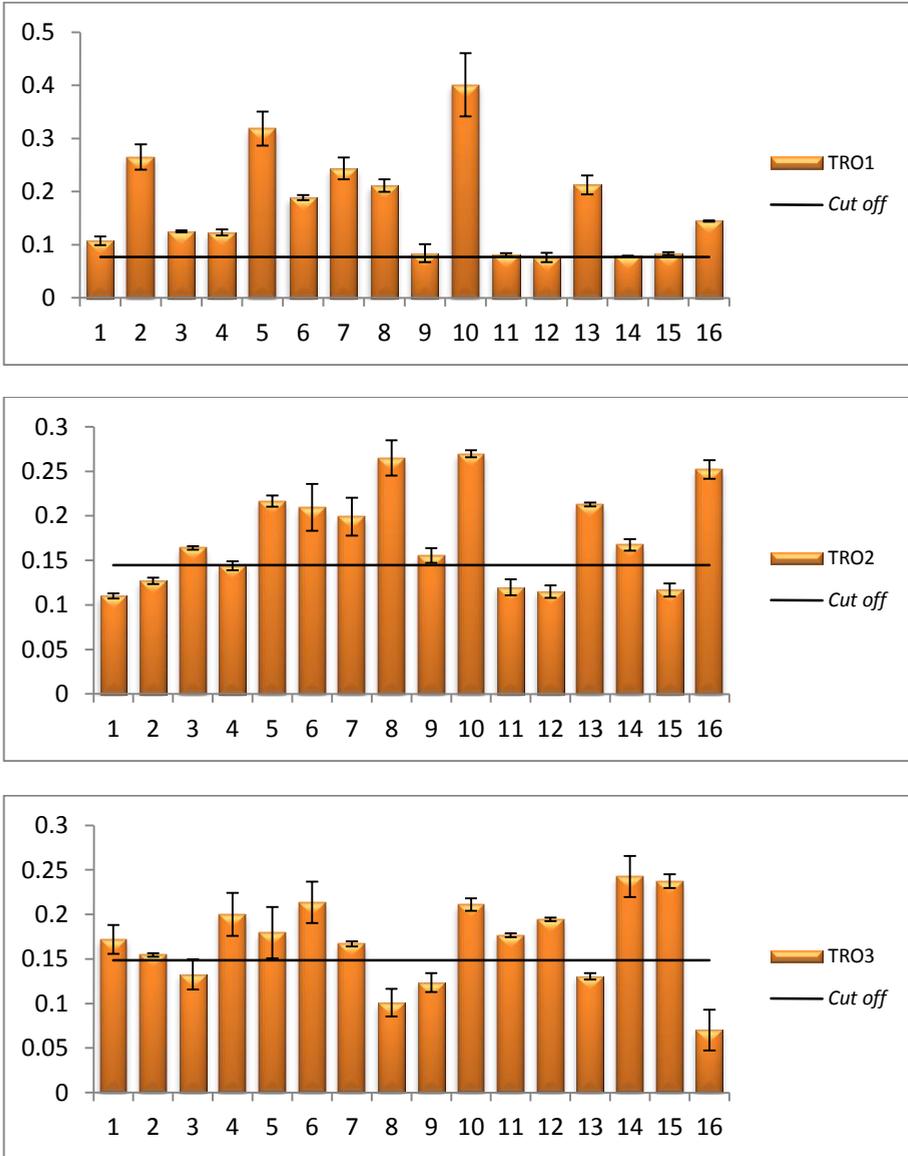


**Figura 4.1:** Reconocimiento de 16 sueros de pacientes de estrongiloidiasis del Hospital de La Ribera detectado mediante ELISA indirecto frente a los péptidos 14, GAL1 y GAL2. Cada suero se ensayó por triplicado. El *cut off* se estableció como la media  $\pm$  3SDS del control negativo.



**Figura 4.2:** Reconocimiento de 16 sueros de pacientes de estrongiloidiasis del Hospital de La Ribera detectado mediante ELISA indirecto frente a los péptidos MET1, MET2 y QUIM1. Cada suero se ensayó por triplicado. El *cut off* se estableció como la media  $\pm$  3DS del control negativo.

 **Resultados**



**Figura 4.3:** Reconocimiento de 16 sueros de pacientes de estrongiloidiasis del Hospital de La Ribera detectado mediante ELISA indirecto frente a los péptidos TRO1, TRO2 y TRO3. Cada suero se ensayó por triplicado. El *cut off* se estableció como la media  $\pm$  3DS del control negativo.

Los resultados obtenidos con cada uno de los péptidos sintéticos analizados se suman en la tabla 4.1.

**Tabla 4.1:** Reactividad de los 16 sueros del Hospital de La Ribera, Alzira, frente a los 9 péptidos sintéticos estudiados. Se marcan en verde los sueros que reaccionaron ante un mayor número de péptidos.

		PÉPTIDOS								
		14	GAL1	GAL2	MET1	MET2	QUIM1	TRO1	TRO2	TRO3
SUEROS	1	-	-	-	+	-	-	+	-	+
	2	-	-	-	+	-	-	+	-	+
	3	+	+	-	+	-	-	+	+	-
	4	+	+	-	+	-	-	+	-	+
	5	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	7	+	+	-	+	-	-	+	+	+
	8	+	+	+	+	+	-	+	+	-
	9	-	+	-	+	-	-	-	+	-
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	11	-	-	-	+	-	-	+	-	+
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	13	+	+	+	+	+	-	+	+	-
	14	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	15	-	-	-	+	-	+	+	-	+
	16	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Total positivos		10	11	6	15	6	2	14	10	11

Los sueros que reconocieron con mayor intensidad a los péptidos fueron el 10 y 16, produciéndose en el caso del primero reactividad con todos los péptidos analizados en el presente ensayo.

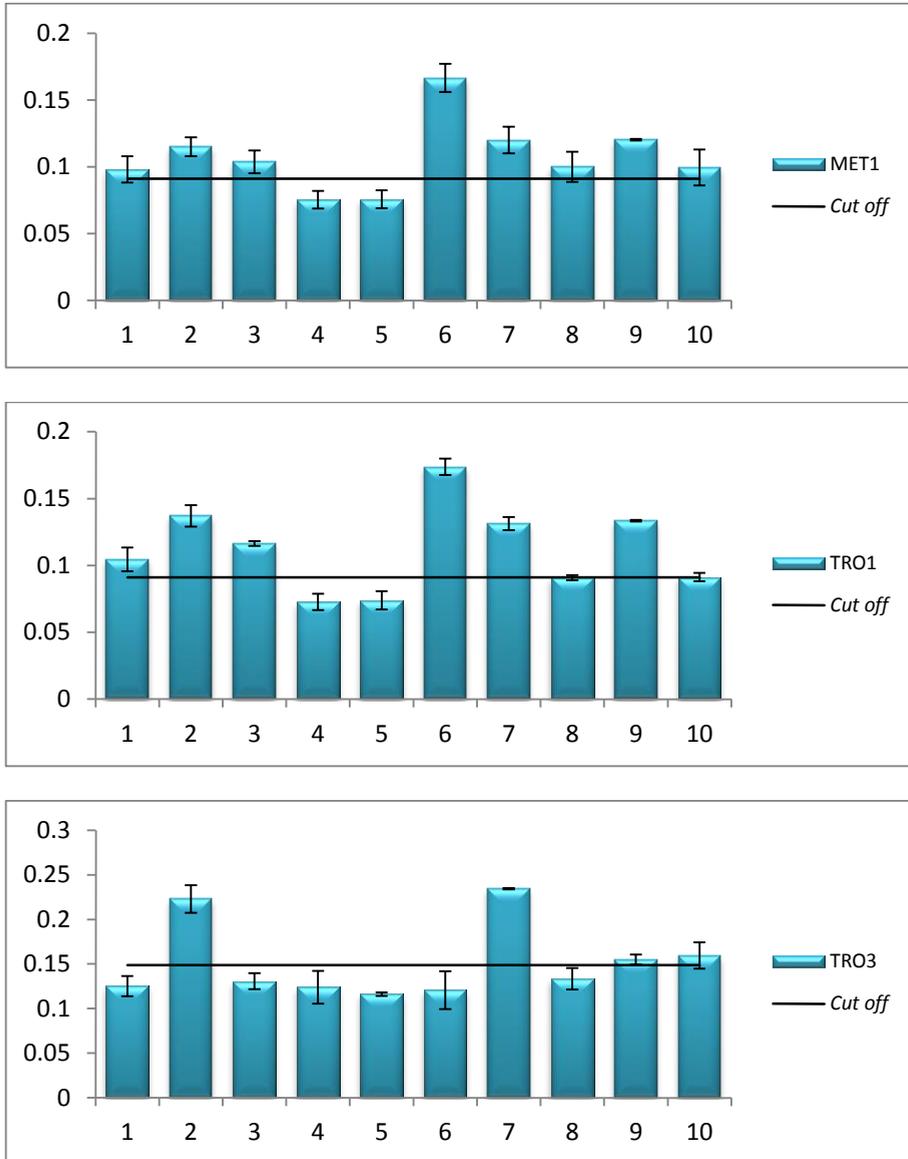


## Resultados

A tenor de los resultados con los sueros del Hospital de La Ribera, se seleccionaron 3 de los péptidos para realizar un nuevo ensayo de ELISA frente a otros 10 sueros de pacientes positivos a la infección por *S. stercoralis*, procedentes en este caso del **Hospital Francesc de Borja de Gandía**, y también correspondientes a casos autóctonos de la Comarca de La Safor.

Se eligió los péptidos MET1 y TRO1 para este ensayo ya que fueron los péptidos reconocidos por un mayor número de sueros procedentes del Hospital La Ribera de Alzira y generaron respuestas más intensas. También se probó el péptido TRO3, debido también a su alta reactividad frente a los sueros de La Ribera, pero también porque el patrón de reconocimiento de sueros para este péptido resultó diferente al del resto de péptidos estudiados.

Los resultados para cada suero individual frente a cada uno de los péptidos seleccionados tras el ELISA indirecto se muestran en la figura 4.4.



**Figura 4.4:** Reconocimiento de 11 sueros de pacientes de estrogiloidiasis del Hospital Francisc de Borja, detectado mediante ELISA indirecto frente a los péptidos MET1, TRO1 y TRO3. Cada suero se ensayó por triplicado. El *cut off* se estableció como la media  $\pm$  3DS del control negativo.

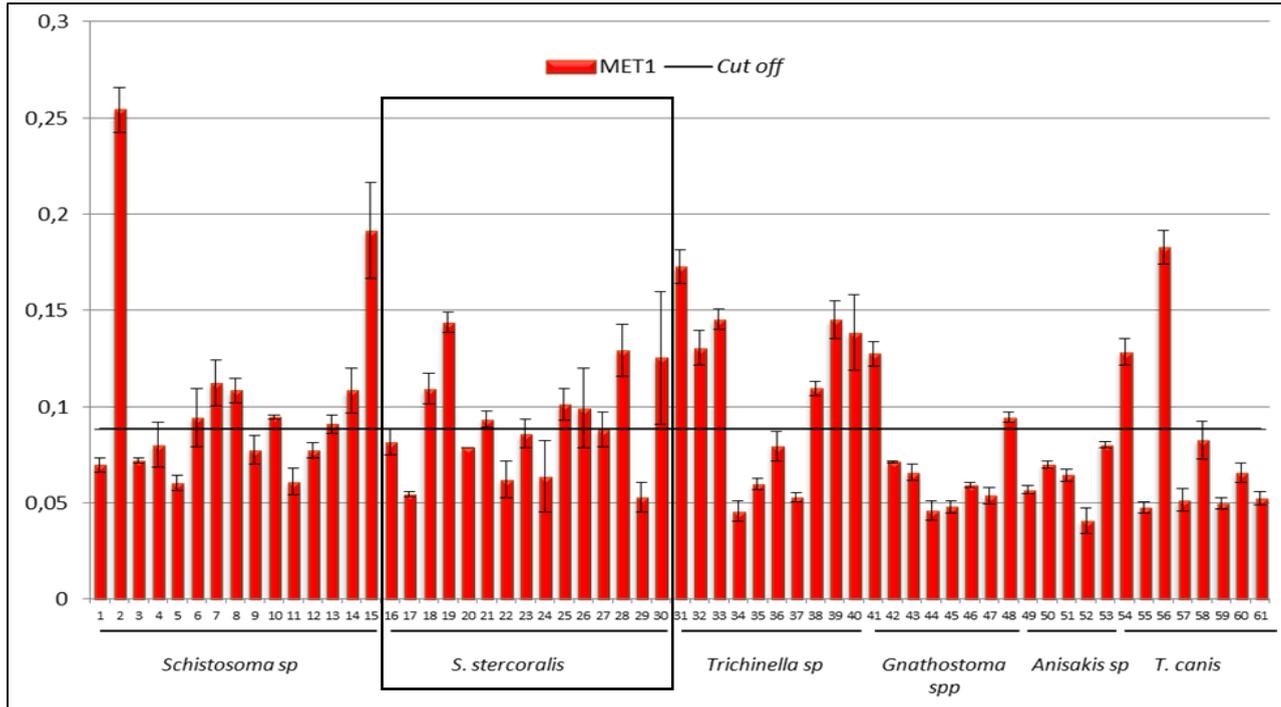
## Resultados

Los péptidos que fueron reconocidos por un mayor número de sueros fueron de nuevo TRO1 con 6 positivos, y MET1 con 5 positivos, equivalente a una sensibilidad del 60% y 50%, respectivamente. Los sueros 2 y 7, reaccionaron frente a los tres péptidos. Ninguno de los tres péptidos recombinantes fue reconocido por los sueros 4, 5, mientras que los sueros 8 y 10 dieron un patrón de reconocimiento que podría explicarse por una baja concentración de anticuerpos en dichos sueros.

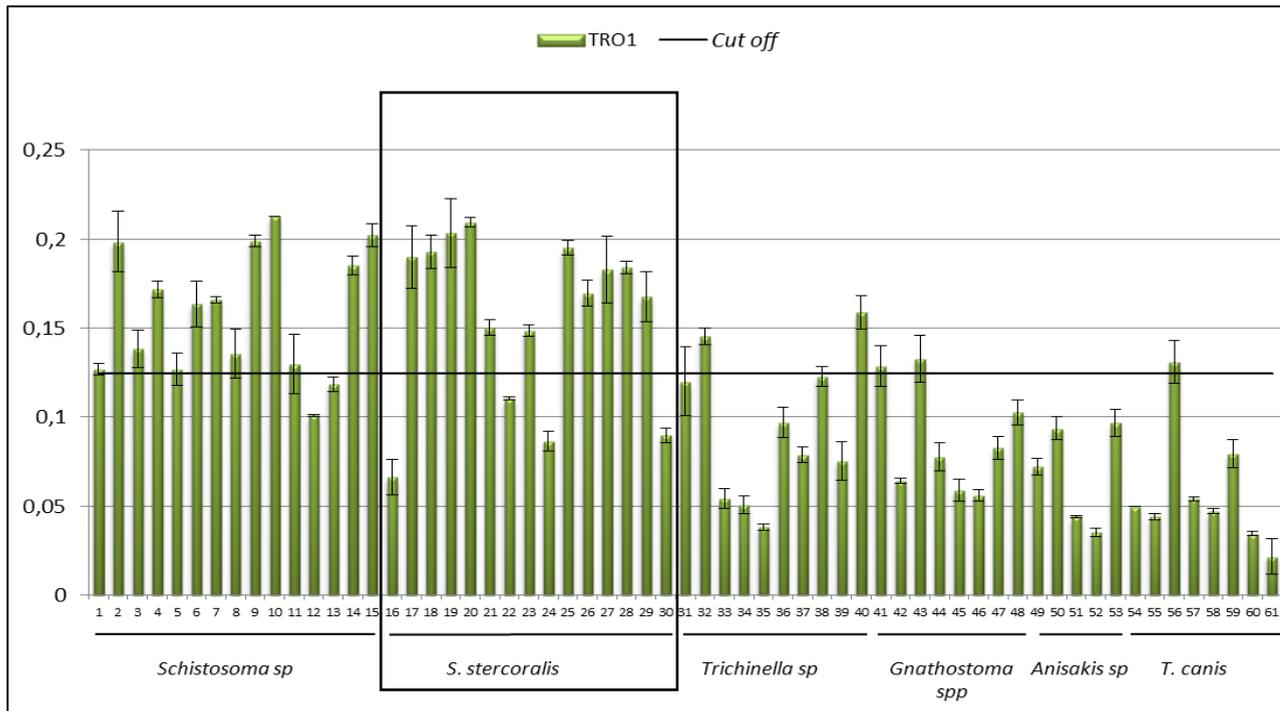
Finalmente se llevó a cabo un nuevo ensayo de ELISA para valorar la especificidad de los péptidos sintéticos MET1 y TRO1, ya que se confirmaron como los péptidos reconocidos por mayor número de sueros de pacientes de la región de La Safor. En este caso se utilizó una batería de 61 sueros cedidos por el Servicio de Parasitología del Instituto de **Salud Carlos III de Madrid**, y correspondientes a casos de pacientes afectados por diferentes helmintiasis y procedentes de otras zonas de endemia diferentes a la región de La Safor. Como control negativo se utilizó el mismo pool de 4 sueros negativos de los ensayos anteriores. Se siguió el mismo protocolo y se probó cada suero por triplicado en ensayos ciegos (donde no se conocía con anterioridad el diagnóstico correspondiente a cada código de muestra).

Estos pacientes habían sido previamente diagnosticados en el Instituto de Salud Carlos III, utilizando ensayos de detección de anticuerpos específicos de cada enfermedad. Los sueros fueron identificados numéricamente como se indica a continuación: sueros positivos a *Schistosoma* sp. (1-15), positivos a *S. stercoralis* (16-30), positivos a *Trichinella* sp. (31-40), positivos a *Gnathostoma* spp. (41-48), positivos a *Anisakis* sp. (49-53) y positivos a *T. canis* (54-61).

Los resultados obtenidos de dichos ensayos con los péptidos MET1 y TRO1 se muestran en las figuras 4.5 y 4.6, respectivamente.



**Figura 4.5:** Reconocimiento de 61 sueros de pacientes procedentes del Instituto de Salud Carlos III, detectado mediante ELISA frente al péptido MET1. Cada suero se ensayó por triplicado. El *cut off* se estableció como la media  $\pm$  3DS del control negativo.



**Figura 4.6:** Reconocimiento de 61 sueros de pacientes procedentes del Instituto de Salud Carlos III detectado mediante ELISA frente al péptido TRO1. Cada suero se ensayó por triplicado. El *cut off* se estableció como la media  $\pm$  3DS del control negativo.

El péptido sintético TRO1 resultó ser mucho más sensible que MET1 en el caso de sueros de pacientes que habían sido diagnosticados de estrogiloidiasis, procedentes de otras zonas de endemia diferentes a la región de La Safor, con un total de 11 resultados positivos (73,3% de sensibilidad), frente a MET1, que reaccionó con 5 de los sueros de pacientes positivos a la enfermedad (33,3% de sensibilidad). Además, la señal de reconocimiento de TRO1 fue de mayor intensidad en todos los casos.

En cuanto a la especificidad, ambos péptidos fueron reconocidos por algunos de los sueros afectados por otras helmintiasis. En el caso de MET1, se produjo reacción positiva frente a 6 de los 15 sueros con *Schistosoma* sp., 6 de 10 de *Trichinella* sp., 2 de 8 de *Gnathostoma* sp., 2 de 8 de *T. canis*, pero no hubo reacción cruzada con ninguno de los sueros correspondientes con *Anisakis* sp. En total, la especificidad mostrada fue del 64,4%. Por otro lado, TRO1 reaccionó con 7 sueros de los 15 disponibles para *Schistosoma* sp., 2 de 10 de *Trichinella* sp., mientras que en el caso de los sueros de pacientes afectados con *Gnathostoma* sp, *Anisakis* sp. y *T. canis* no se produjo reacción cruzada con ninguno de ellos, mostrando una especificidad del 80,4%.

Por tanto, el péptido TRO1 sería el péptido más sensible y el más específico entre todos los péptidos diseñados en este ensayo. Sin embargo, es evidente, a la vista de los datos obtenidos, que ambos péptidos diseñados reaccionaban con varios de los sueros de pacientes diagnosticados como positivos para *Schistosoma* sp. Estos pacientes procedían de zonas en las que ambas enfermedades son endémicas, por lo que podrían estar infectados no solo con *Schistosoma* sp., sino también estarlo, o haberlo estado en algún momento de su vida, con *S. stercoralis*. Para comprobar esta posibilidad, los sueros de los pacientes que habían presentado reacción cruzada más fuerte se sometieron a nuevas pruebas diagnósticas frente a estrogiloidiasis en el Servicio de Microbiología del Instituto Carlos III, tanto serológicas como etiológicas. Tras este análisis, el suero número 2, se confirmó ahora como positivo a estrogiloidiasis, mientras que con los sueros número 7 y 15 se obtuvieron resultados en el test serológico que suscitaban dudas respecto a una posible

infección mixta con *S. stercoralis*, ello podría incrementar la especificidad del péptido TRO1 del 80,4% hasta el 86,6%.

#### **4.2. Análisis de las secuencias más abundantes del transcriptoma de la larva L3i de *S. stercoralis***

Como aproximación complementaria en la búsqueda de antígenos de *S. stercoralis* con posible utilidad diagnóstica, se decidió abordar el estudio de otras proteínas del parásito. Como punto de partida se tomó el trabajo publicado por nuestro grupo de investigación en el cual se llevó a cabo un análisis transcriptómico de la larva L3i de *S. stercoralis* (Marcilla *et al.*, 2012). De este estudio se obtuvieron un total de 2532666 secuencias crudas, que fueron ensambladas en 11250 secuencias contiguas solapantes (*contigs*), la mayor parte de las cuales resultaron ser nuevas. Se caracterizaron un total de 8037 proteínas putativas basándose en su homología con secuencias de otros organismos depositadas en bases de datos. Siguiendo esta línea de investigación, en el presente estudio se realizó una selección de algunas de estas secuencias codificantes de proteínas parasitarias para llevar a cabo un análisis más detallado de las mismas. Se prestó especial atención a aquellos transcritos que fueran más abundantes y que codificaran para proteínas descritas previamente en productos de excreción/secreción (E/S) de *S. stercoralis* y sus homólogos en otros helmintos, y/o que poseyeran potencial carácter inmunogénico.

En base a estos criterios se seleccionaron 16 transcritos codificantes para proteínas presentes de la larva L3i (Tabla 4.2). Todos ellos se incluían entre los 50 transcritos más abundantes.

**Tabla 4.2:** Transcritos más abundantes seleccionados a partir del transcriptoma de la larva L3i de *S. stercoralis* (Marcilla *et al.*, 2012).

Secuencia	Nº lecturas	Identidad	Organismo	% similitud
<i>Singleton2, contig19</i>	1849	Antígeno principal ( <i>Major antigen</i> )	<i>A. suum</i>	76.0
<i>Contig3</i>	1680	Trehalasa	<i>A. suum</i>	70.0
<i>Contig12, singleton5</i>	1024	Troponina T	<i>A. suum</i>	76.0
<i>Singletons8,102, 813, 1298, 9079, 8848</i>	594	Calpaina 1	<i>C. elegans</i>	84.0
<i>Singleton28, contig53</i>	520	Tropomiosina 2	<i>B. xylophilus</i>	97.0
<i>Singletons14,6361,2792,</i>	512	Fosfoenol piruvato carboxikinasa (PEPCK) GTP	<i>A. suum</i>	84.0
<i>Singletons39,2792,2367,24 87,7706, contig49</i>	471	Proteína 14-3-3	<i>A. suum</i>	94.2
<i>Contig24, singletons120,390</i>	444	Galectina	<i>T. circumcincta</i>	89.0
<i>Contig28, singletons503,2363,3531,3 925,7939,298,704,1873,45 31</i>	432	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	<i>C. remanei</i>	93.2
<i>Singleton20</i>	352	Catepsina L	<i>S. vulgaris</i>	84.0
<i>Singleton80</i>	310	Aminopeptidasa sensible a puromicina (ASP)	<i>L. loa</i>	64.2
<i>Singletons57,5472,6186,96 54, 904, 1614, 4314</i>	279	Proteína de choque térmico 70 (HSP70)	<i>O. volvulus</i>	96.0
<i>Contig27</i>	241	Ferritina 1	<i>C. briggsae</i>	75.0
<i>Singletons99,461</i>	171	Proteasa aspártica SP-2	<i>S. ratti</i>	89.6
<i>Singletons133,415,2963,80 56</i>	150	Enolasa	<i>C. elegans</i>	94.0
<i>Singleton333</i>	137	Paramiosina	<i>O. volvulus</i>	96.0

En primer lugar se analizaron las secuencias nucleotídicas consenso codificantes para las proteínas. Dichas secuencias fueron obtenidas a partir del ensamblaje de los diferentes *contigs* o secuencias individuales (*singletons*), resultantes del análisis del transcriptoma mencionado (disponible en [biolinux.uv.es/marcilla](http://biolinux.uv.es/marcilla)). Una vez obtenidas las secuencias de nucleótidos, se

## Resultados

confirmó su identidad con ayuda del programa de búsqueda BLAST (NCBI), y se comparó con las secuencias tanto nucleotídicas (BLASTn) como aminoacídicas (BLASTx) deducidas de otros organismos. Puesto que el fin del presente estudio era el de identificar nuevas proteínas para el diagnóstico de la estrongiloidiasis, las secuencias que presentaran un alto grado de homología con las de otros organismos parásitos podían presentar problemas de reactividad cruzada. Por ello, tras el análisis comparativo de nuestras secuencias con las de otros organismos depositadas en bases de datos, se rechazaron todas aquellas proteínas que presentaran una homología mayor del 75% con las de otros parásitos.

De este modo, las proteínas Tropomiosina, PEPCK, Galectina, GAPDH, proteína de choque térmico HSP70, Enolasa y Paramiosina fueron descartadas por su alto grado de conservación entre organismos. En el caso de la proteína 14-3-3 zeta, pese a pertenecer a una familia de proteínas bastante conservadas entre organismos eucariotas, se decidió seguir trabajando con ella ya que había sido identificada tanto en superficie como extracto total de las larvas L3i de *S. stercoralis*, así como en productos de E/S de otros nematodos parásitos (Mulvenna *et al.*, 2010, Wang, T. *et al.*, 2013). Además esta proteína, como se mencionó anteriormente, se había identificado como antigénica reconocida por sueros de pacientes con estrongiloidiasis y no por sueros de personas sanas (Pérez García, 2010). Todo ello, convierten a esta proteína en una candidata interesante para su estudio, pese a su similitud con la de otras especies.

Tras descartar los transcritos mencionados, se procedió a realizar un análisis más detallado de las secuencias parciales codificantes para el resto de proteínas seleccionadas: Antígeno principal, Trehalasa, Troponina T, 14-3-3 zeta, Catepsina L, Aminopeptidasa sensible a puromicina, Ferritina 1 y Proteasa aspártica. Se tradujo la secuencia nucleotídica utilizando la aplicación *translate* del programa EXPASY (<http://web.expasy.org/translate/>). Las secuencias aminoacídicas deducidas resultantes se sometieron a un análisis bioinformático con la finalidad de determinar que regiones de cada uno de los

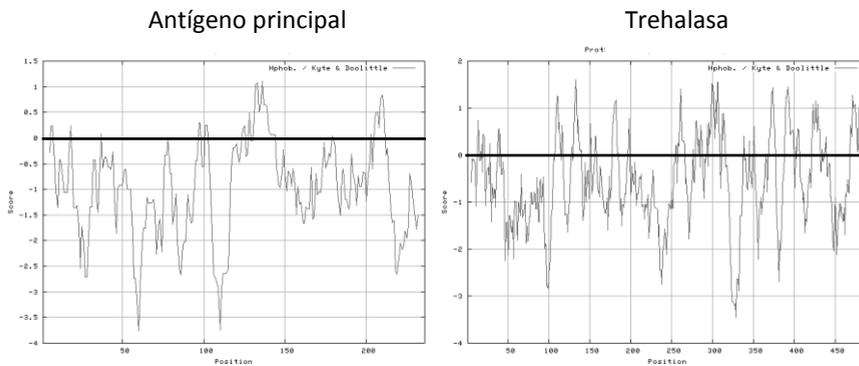
fragmentos proteicos disponibles pudieran presentar carácter inmunogénico. Con este fin, se determinaron los dominios más antigénicos utilizando el programa EMBOSS (<http://emboss.bioinformatics.nl/>) que sigue el método de Kolaskar & Tongaonkar (1990), (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3:** Dominios antigénicos de los fragmentos proteicos de las proteínas que se indican, obtenidos con el programa EMBOSS ordenados de más a menos antigénicos.

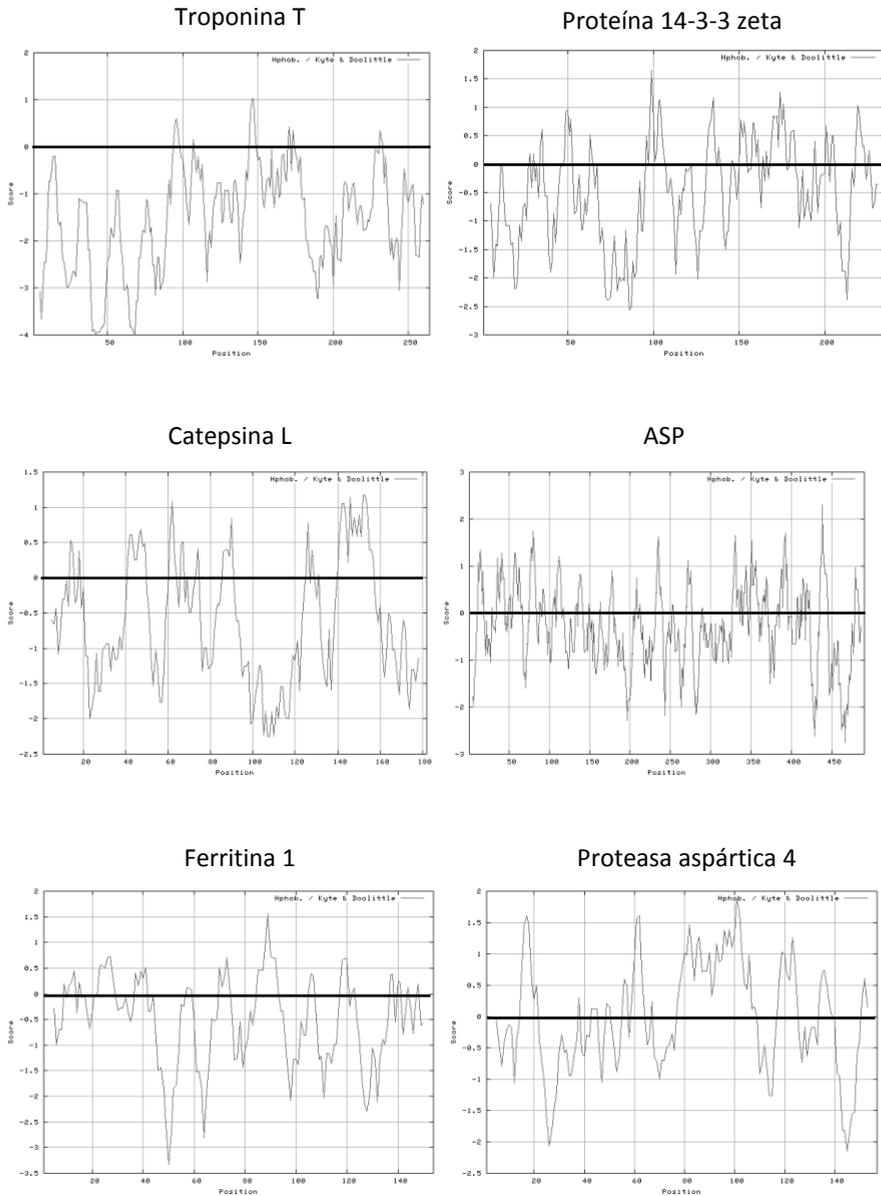
Proteína	Dominios antigénicos (posición aminoácidos)
<b>Antígeno principal- Major Antigen</b>	30-43, 204-210, 190-198, 126-133, 90-104, 63-68, 167-176, 179-184
<b>Trehalasa</b>	292-309, 222-234, 167-185, 311-321, 249-257, 104-118, 87-96, 25-43, 386-401, 468-475, 403-410, 359-365, 369-376, 11-19, 4-9, 67-83, 126-139, 480-485, 435-442, 205-218, 423-429, 450-456, 259-265, 195-201
<b>Troponina T</b>	140-152, 223-236, 164-182, 246-261, 11-18, 107-113, 203-209, 122-127, 32-37
<b>14-3-3 zeta</b>	146-186, 45-57, 93-110, 127-137, 7-16, 116-122, 188-196, 61-67, 77-82
<b>Catepsina L</b>	139-159, 36-49, 10-21, 59-76, 87-93, 166-174, 114-119
<b>Aminopeptidasa sensible a puromicina</b>	431-445, 72-87, 360-372, 230-241, 389-398, 477-484, 336-345, 135-154, 53-64, 171-182, 327-334, 352-358, 9-21, 267-277, 401-410, 28-33, 317-323, 248-255, 412-421, 162-168, 90-96, 110-119
<b>Ferritina 1</b>	116-125, 67-74, 18-40, 82-95, 103-109, 54-59, 42-47, 138-147
<b>Proteasa aspártica 4</b>	55-67, 91-108, 5-24, 149-154, 111-125, 79-88

El perfil hidrofóbico de una proteína proporciona información sobre la ubicación de la proteína en la célula y resulta además, una herramienta muy útil para la predicción de los sitios más antigénicos de la molécula. Para analizar el perfil hidrofóbico de los fragmentos de cada de proteína de interés, que incluyeran los distintos dominios antigénicos determinados utilizando el programa EMBOSS, se utilizó el programa ProtScale del portal EXPASY (<http://web.expasy.org/protscale/>) siguiendo los parámetros de Kyte & Doolittle (1982), según el cual los valores más negativos corresponden con las regiones hidrófilas, y los valores más positivos con las regiones más hidrófobas. Los perfiles de cada una de las secuencias aminoacídicas deducidas, correspondientes a las proteínas mencionadas de larvas L3i, se muestran en las figuras 4.7 y 4.8.

En general los fragmentos proteicos analizados mostraron un perfil hidrofílico, mostrando picos con carácter marcadamente hidrofílico coincidiendo con algunos de los dominios antigénicos mostrados en la tabla 4.3. Ello sugiere que estas regiones se hallan en zonas expuestas de la proteína, lo que les convierte en buenas candidatas para su uso en diagnóstico.



**Figura 4.7:** Perfiles de hidrofobicidad de las secuencias aminoacídicas obtenidas con el programa ProtScale. Las regiones más hidrofílicas son aquellas que figura por debajo de 0.



**Figura 4.8:** Perfiles de hidrofobicidad de las secuencias aminoacídicas obtenidas con el programa ProtScale. Las regiones más hidrofílicas son aquellas que figura por debajo de 0.

Los resultados obtenidos de los análisis bioinformáticos mostraron ser de gran utilidad en la localización de las potenciales regiones más antigénicas, lo cual puede aplicarse en el diseño de nuevas moléculas con fines diagnósticos.

### **4.3. Estudio de la expresión en diferentes fases del ciclo de vida de *S. stercoralis* de los transcritos codificantes para las proteínas objeto del estudio**

En colaboración con el grupo del Dr. Mark Viney, de la Universidad de Bristol (UK), se realizó un análisis de los niveles de expresión de los transcritos seleccionados. El grupo del Dr. Viney ha participado en la secuenciación del genoma de *S. stercoralis* y dispone de los transcriptomas (*microarrays*) de tres fases evolutivas del parásito: larvas L3i, hembra adulta parásita y hembra adulta de vida libre.

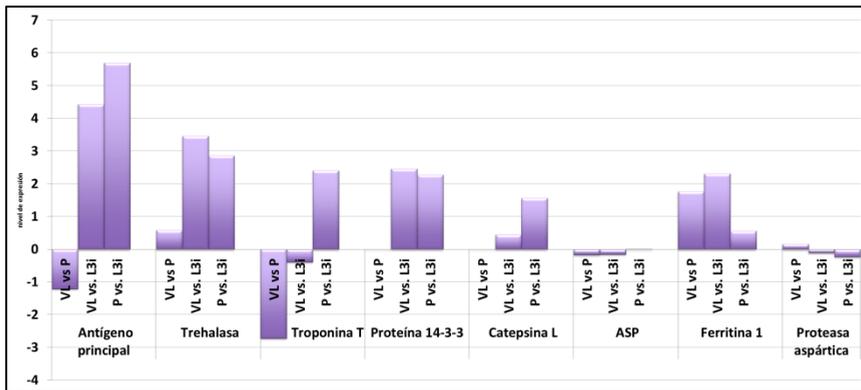
El análisis de dichas bases de datos con las secuencias de los transcritos obtenidos en nuestro laboratorio mostró un enriquecimiento en la fase L3i en comparación con hembras adultas parásitas de las proteínas siguientes: Antígeno principal-*major antigen*, Trehalasa, Troponina T, 14-3-3 zeta y Catepsina L. Mientras que las proteínas Aminopeptidasa sensible a puromicina (ASP), Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4 no presentaron gran variación en cuanto a la expresión relativa en la fase adulta parásita frente a larvas L3i.

Cuando se compararon los niveles de los transcritos de las larvas L3i frente a hembras adultas de vida libre, solo la Ferritina 1 mostró mayor expresión relativa en la fase adulta de vida libre, mientras que se observó mayor expresión relativa en larvas L3i de las proteínas Antígeno principal-*major antigen*, Trehalasa y 14-3-3 zeta. No se observaron diferencias significativas para Troponina T, Catepsina L, ASP y Proteasa aspártica 4.

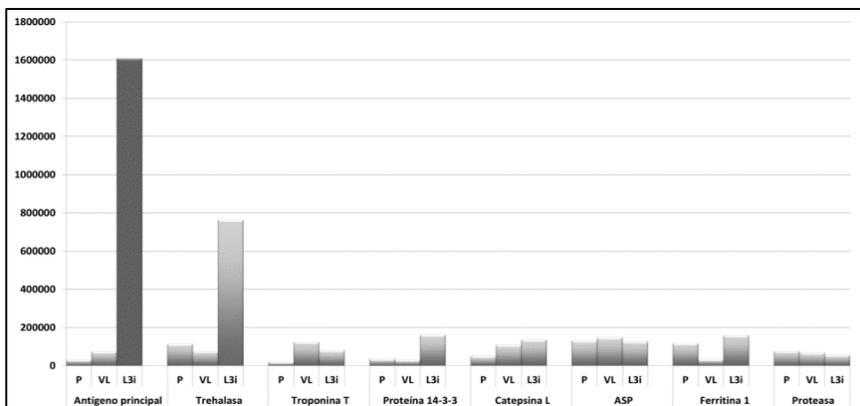
Finalmente, al comparar los niveles de RNA en hembras adultas de vida libre con las parásitas, se observó un enriquecimiento relativo de RNA de Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4 en hembras adultas parásitas, y una mayor expresión de

Antígeno principal-*major antigen* y Troponina T en hembras adultas de vida libre, no detectándose diferencias significativas en la abundancia relativa de los transcritos para los otros genes (Figura 4.9).

En la figura 4.10, se muestran los datos absolutos del conteo del número de secuencias de RNA correspondientes a cada uno de los transcritos de las proteínas objeto de estudio.



**Figura 4.9:** Abundancia relativa de los transcritos entre las fases de vida de *S. stercoralis*. P: hembra adulta parásita, VL: hembra adulta de vida libre, L3i: larva infectante.



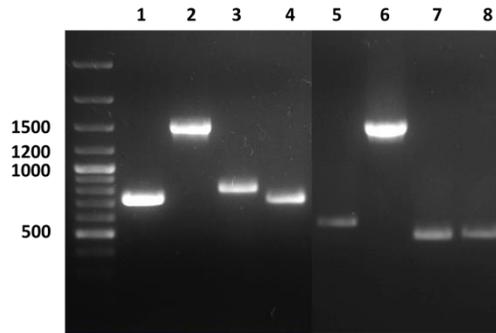
**Figura 4.10:** Número total de copias de RNA en las fases de vida de *S. stercoralis* para cada uno de los transcritos objeto del estudio. P: hembra adulta parásita, VL: hembra adulta de vida libre, L3i: larva infectante.

#### **4.4. Clonación de los cDNA codificantes y secuenciación para la producción de proteínas recombinantes.**

Tras el proceso analítico anteriormente descrito, se confirmaron y seleccionaron 8 de los transcritos disponibles más abundantes con el objetivo de producir los fragmentos proteicos recombinantes, potencialmente más inmunogénicos, para testar su capacidad diagnóstica: Antígeno principal-*major Antigen* (236 aminoácidos), Trehalasa (489 aminoácidos), Troponina T (264 aminoácidos), 14-3-3 zeta (235 aminoácidos), Catepsina L (182 aminoácidos), Aminopeptidasa sensible a puromicina (ASP) (490 aminoácidos), Ferritina 1 (154 aminoácidos) y Proteasa aspártica 4 (157 aminoácidos).

Partiendo de las secuencias nucleotídicas obtenidas tras el estudio del transcriptoma de larvas L3i, se diseñaron parejas de oligonucleótidos cebadores para amplificar los fragmentos génicos codificantes para los fragmentos proteicos mencionados (Tabla 3.2). Para tal fin, se utilizó el software Vector NTI Express, y el programa *Oligo Analyzer* de IDT (Integrate DNA technologies). Con estos programas se pueden diseñar cebadores controlando un amplio número de variables y analizar las características de cada pareja de cebadores con el fin de optimizar su actividad durante el proceso de amplificación de los genes.

A partir de larvas L3i se obtuvo el RNA total que se utilizó como molde para la síntesis del cDNA mediante retrotranscripción inversa, como se describe en el apartado 3.8.1 de Materiales y Métodos. Una vez obtenido el cDNA de cadena simple, éste fue utilizado como molde para la amplificación de las secuencias correspondientes de los fragmentos génicos de interés mediante PCR, según las condiciones especificadas en la tabla 3.4. Tras la visualización de los productos de la PCR, mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, todos los productos amplificados mostraron el tamaño esperado (Figura 4.11).



**Figura 4.11:** Amplificación de los fragmentos de DNA codificantes para las proteínas de interés. Se muestra perfil de electroforesis en gel de agarosa al 1% de dichos fragmentos, visualizados con tinción con *Safe View*. (M): marcador 100 pb (Fermentas), (1) Antígeno principal-*Major Antigen* (710 pb); (2) Trehalasa (1467 pb); (3) Troponina T (795 pb); (4) Proteína 14-3-3 zeta (707 pb); (5) Catepsina L (547 pb); (6) ASP (1470 pb); (7) Ferritina 1 (465 pb); (8) Proteasa aspártica (472 pb)

Los fragmentos amplificados fueron subclonados en el vector pJET 1.2. Los clones seleccionados se secuenciaron para confirmar que la secuencia de nucleótidos fuera correcta (Figura 4.12)

#### **Antígeno principal-*Major Antigen* (710 pb)**

```

ATCTGATGCAGCTATAAAAAGAACTGCCCTTACAACGTGAAGCCATTGAAAAGTCTCTTA
ATGCTATGGAAAGAGAAAATAGGGAATTATACAAAAATTGTGCTCAACTTCAACATCAA
ATTGCACAACCTTGAAATGGAAAATGGTAATCGTGTTATTGAAATGACTAATAAGCAACG
TGAAGAACAAGAAAGAGTTTTATCACGTATGCGTAATGAAAAAGCTCAAAATTGAAAAGA
TTATTGAAAGTAGAGAAAGAACATACAAAGGAAGAATAAAGCAACTTGAAGATCAGTTA
GCTATATTTAAAGAACAACCTTGAAACTGAAAGACGCCGTCGTCGTGAGCTTATGGATAG
AAACTTAATTACAGACATTGGTCGATACACTGTAAGCGGACTTGGGGGTGGTATTGGAA
GTGGTATTGGTGGAAGTAGATTAGGTAGTGGTTATAATTCTGCCGGTGGTAATTTCTAC
CATGGTGATAATATTGATCATTCATATGGAAGTAACCTAAGACATATTAGAACAACATT
TGCTTCAAATCCTTTAACACCACCAAGAGGTAATTTAACTCCAACACATACTGTTAGAA
AGACTATTGAAACAACATCATCATCTACCGTTCATTAATGACAAATATTGGCGAGGAA
GGATATGATCATCATCGTTCTTCAACACCAACATCAAGAAGTATTACGATGACAATGC
TA
    
```

**Trehalasa (1467 pb)**

ACGGATCCACACTTTGTTGATATGCCTCTTAAATATGATGCTGATATTGTAATTAAGAA  
ATGGACAAATTTACTTGATAGTTGTGAGGGTAAAGTAGATAAAATTACAAGTTGAAAAAT  
TTGTAATTTGAAAAATTTTGATGAACCTGGTAATGAATTGGAAGAATATATGCCTCAAGAT  
TACAACATTGGTCCAGACAATCTTAAACAAATATCTGATAGTCACTATCGTCAATGGGC  
TTTAGATCTTCACGATCGTTGGCCAACACTATGTAGACAGGTTAAACAAAAATGTCAAAG  
ATAATAAAGATAGATATTTCTATTATTCCATTACCTAAACCTTTTATTGTTCCCTGGTGGT  
AGATTTTCGTGAAATGTATTATTGGGATAGTTTTTTTTTACAATCAAAGGGTTATTAGCAAG  
TAAAATGTATAAAACAGTTTCGTGATATGATTGATAATATGGGATATATGATTGAAGAGT  
ATGGTTTTTATACCTAATGGTAATAGAATATATTATTTAAATAGATCACAACCACCATTA  
TTAAGTTGGTGTATTGATGCTTATATTAAAGAAACAGGTGATTATGATTTTTATTCGTAC  
ATCATTACCTTGGATAGAGAAAGAGCTTCAATTTTTTAAACCTATAAAACTGTAAAC  
TTGATGAATGGAAAAGTTATCTTTATAGATATCATGTTAATGTTGACTCACCAAGACCT  
GAAAGTTATCGTGAAGATATAGAACTTCTGAAGATTGTGAACTTTAAAAATGTAAACA  
AATTTTTATGGGGTGAACCTTGCCTGCAGCAGAAAGTGAAGAGATTTTAGTTCAAGGT  
GGTTTGCCTAATGTCAATTCAGTAATGGGAAATATAAAATCTATACGAACTAGCCATGTT  
CTTCCTGTTGACTTAAATGCAATATTGTTAAAAATCCTTAGTATTGCAGAAGAAATATTG  
TATTTATGTTGGAGAACATGAAAAATCAGAAAAATATAGAAATGAAAAGGAAGAAATTA  
AAGAAATGATTCAAAAATATTTATGGAATGATGATTTAGGATGTTGGTTTGATTTTGAT  
ATGGATAAAGAACATCAAATTTAACATATTATGATACAAATTTTTTTCCTCTTGTAAC  
TGGTATAAACTCTTGATGAACATAATCAAGAAAAAATTGCAAGTTATATAACAACCTGTTG  
GTATTTTAAAAATACCAGTGGTATACCAACATCATTACAGTTCTTGAGAAACAATGG  
GATTTTTCCAAATGCTTGGGCACCAACAACATGGATTCTTATTGAAGGTTTAAATAAAAT  
TGGCTTACAAGAATTGGCTAAATATATTGCTGATAAATGGTTAAGAAAAAATTAATCTG  
TTTATAGAGATGCTGATGGAAAGATGTTTGAAAAATATAATGTCACAACCTGGTTGTGCA  
TTAAATATTGCTGGTGGAGGTGAATATATTGTTCAAGAAGGGTTTGGTTGG

**Troponina T (795 pb)**

AGCTCAAAGAAACGTCATGAAGAGGAACAAGCTGCTAAACTTCTTGATTATAGTGAAA  
GACGTCGTATTGAAAAAGAACAACAAGAGGAAGAAATACGCTTTTTGAAAGAAAAACAA  
GAAAGACGTCGTCAAGAAAGAGAACAAGAGGAGAGAGGTTTGCAGAAATGAGAAAGAAC  
AGCTGAAGAAAATAGAAGACGTTGAGGAAGAGGAACGCAAAGCTCGTTTAGAAGCTGAAA  
AAGCTAGAAAAAATGAAGAAAACCTTAAAGAGACAACAATGATGGCTGGAAAGTTTGTCT  
GGACATTTCTTCTGGAACCAATGGACCTAACCTTTGTTATCCAAAAAGGAGAGCATGGTAA  
TAATAAATTTACCTAATCTTTCTGGTTCTCAAAAAGAAAACCTGCTCTTACTAAAGAACAAC  
TTGAAGAACA AAAAGCCGCTTATCTTGCAGCTGTTACAAGAAAACCAGATATTTACAC  
ATGATGCCAAATGACTTGAAGAAGCCATTAATCTCTTCATTCAAGAATCGTTAAACT  
TGAAGCTGAGAAATATGACCTCGAAAAAAGAAGTGAAGACAAGAGTATGATCTTAAAG  
AATTAATGAAAGACAACGCCAAGTTGCTCGTAATAAAGCTATCCAAAGAGGTTTAGAC  
CCAGATGAGGCATCAAACCTCAACTCACCCACCAAAAGTTACCGTCTTTTCTAAATTTGA  
TCGTCAAATGATAGAAGATCTTATGGTGATCGTAGAGTTCTCTTTGAAAAACCACCAC  
AAAAACCAAGTTTAAAGATTGCTCATGG

### 14.3.3 zeta (707 pb)

ATGGCTGAAAATAAGGATGAAC TTGTTCAACGTGCTAAACTTGCTGAGCAAGCTGAAAG  
ATATGATGATATGTCGTTGTCAATGAAAAAGGTAACCGAAATGGTGCTGAATTGACAA  
ATGAAGAAAGAAATCTTCTTTCTGTAGCTTATAAAAAATGTTGTTGGAGCGCTCGTTCG  
TCTTGGAGAGTTATTTCTTCTATTGAACAAAAAACTGAAGGAGCTGAAAAGAAACAACA  
ATTGGCTAAGGAATATAGAGAAAAAATAGAACAAGAATTTAAAAGAAATTTGTGAAGATG  
TTCTTTCTCTTCTTGA AAAATATCTTATTCCAAAAGCTGGAAATCCAGAATCAAAAAGTT  
TTTTATTTAAAATGAAAGGAGATTATTATAGATATCTTGCTGAAGTTGCTATAGGGGA  
TGCACGTAGTGGAGCTAGTAACAATTCGCTGTTGCC TACTCGGAAGCACTTGAAGTTG  
CCAAAACATCCTTGGCTCCAAC TCATCCAGTTCGCTTGGGCTTGC ACTTAATTATCT  
GTCTACTTTTACGAAGTTGCTTCATCTCCGATCGTGC TTGTCAACTTGCCAAACAGGC  
TTTTGATGACGCTATAGCTGAATTGGATACTCTTAATGAAGATCTTACAAAGACAGCA  
CATTGATCATGCAGCTTCTTAGAGATAATCTTACATTATGGACATCTGATACCAATGG

### Catepsina L (547 pb)

GGTGCTGTTAAAAGTAATGCTACAAAATGGTTACCCCATTTAAACGTAAAAATCCCTGA  
TAGTGTGATTGGAGAAAAGAAGGATATGTTACCGAAGTTAAAATCAAAAAGCTTGCG  
GAAGTTGTTATTCATTTTCTGCTACTGGTGCTCTTGAGGGGCAACATAAAAAGAGTTACT  
GGTGATCTTGATCTTTATCTGAACAAAATATTGTTGATTGCTCTACTTCTTACGGTAA  
TAATGGGTGTAATGGTGGTTTTAATGGATTATGTATTTGAATACATAAAAAGAAAATAAAG  
GTGTTGATACTGAAGAATCATATCCATACAAAAGGAAAGGAGGGAAAAATGCATTTTAAA  
AAACGTGATGTTGGAGCTACTGATATTGGATATTTTGATCTTCTGAAAGGAGATGAAGA  
AGCATTGAAAGTTGCTGTTGCAACTCAAGGTCCAATTTCTGTGCTATTGATGCTGGAC  
ATCTTCTTTTCAAATGTATAAAAAAGGAATATATTATGAACCAAATTTGTAGTCCGGAA  
AATCTTGATCATGGTG

### Amino peptidasa sensible a puromicina (1470 pb)

ATTCCAGGTAAGAAGGATCAAGGGCATTTTGC TTTAGAAAGTTGGAATCAAAGCTTTAGA  
TTACTTTAACGAATGGTTTTGATTTTACTTATCCTGTTTCAAAAATGGATATGATAGCTA  
TTCTGATTTTTCTATGGGTGCTATGGAAAATACTGGTCTTTTAACTTTCCGTGAAGTT  
GCTCTTTTAAATGGATCCAGCAAAGACTTCTATTAAGCAAAAAGTTATATATCTTTAGT  
TATTGCTCATGAGATTGCTCATCAATGGTTTTGGAAATATAGTTACACATGCATGGTGG  
ATCAATTATGGTTAAAAGAAGGATTTGCTTCTTTTATGGAATACCTTATGGTTGGTTCA  
AACTATCCAGAATTTAATATTTGGCAACAATTTTTAAATGATGAAGTAAACAGCTGGTCT  
TTCATTAGATTCAC TCAGATCTTCTCATCCAATTTGAAGTGCCAATTTGAGAAATCCATCTG  
AGTTAGAAGAAAATATACGATGCTATTACGTATCAAAAAGTCTAAATCTGTATTGAGAAATG  
TTATATGGTCATTTGGGAGAGCCAAC TTTTTCAGAAAGCACTTCGTAACATATATAAAAA  
ACATCAATATAGTAACACGGTTACTGCAGATCTTTGGAAATGCTTTGTG CAGAAGCTTCAG  
GGCAGAATATTCAGCAAATGATGGATACATGGACAAAACAAGTTGGATTTCCATTTGTA  
TCTGTAAGTCAAAAATTTGAAGGTAACAAAAGGATTTTAAACATTTGTCTCAAAGAGATT  
CATTGCCGATGGAGGTGATAGTGAAACTCCACAATTTGTGGCATATTCCTATTTCAATCT



## Resultados

CCACTACATCATCAAAAAGATCAACCAAAATTTAAATTTCTTATGACAAAAGCAAATGAA  
ACTTTCACTATTGAAAAATGTCGACCCATCCGAATGGGTTAAATTTAAACACTGGAACAAC  
AGGTTTTTATAGAGTTGAATATTCTGAAAGTATGTTAGATAGTCTTATATCTGCTGTTC  
GTGATGGAACCTTCCAGTTTTGGATAGATTCCGAATAGCTAATGATATGTTTGCCTTG  
GTAAGCTGGAATAATGGAATGGATGGAGTTCATTACTTAAAAATTATTTGAAGCATCTGTTAA  
TGAAAATAATTATATTGTTTCGTTATACCCCTTGATGGTGGTATTGGAGCACTTTCAAATG  
TTTTAGCCAGATTTGAAGATGCAGATGTCGTTAAACGCTTTGATAATTTGTTATCAAAA  
AACTTAGAACCTCTAGCTGCTAAACTTGGTTGGGAAGCTAAACAAGACGAGCATGGAAA  
AGTATCTTTACTTCGAGCACTTGTATTATAAGATTAGCTCGATCTGGTCATAGACCAA  
CTATTGATGCTGCCCGTGAAGATTTTATGATCATTATAAAAAATAAAACAAATATTGAT  
CCAAACTTAAGAAATGCTATATATTCTGTAATCGGAAGAGAGGATGGAACCTGCT

### Ferritina 1 (465 pb)

ATTTTAGTGATGAAGTCGAGAAAGCTTTAAATGCTCAAATTTATGTATGAGTTGAATGCT  
TCACATGCCTACATGCTTTTGGCTGCTTATTATATGAGACCAGAAGTTGCCCTTAGAAAA  
TGTTGCAAAGTGGTTTTTGAAGCAATCTGAGGAGGAAAAGAGAACATGCTGTTGGATTCA  
TAAAATATCAAAATAAACGTTGGAGGAAAAGTTGTCTTAAAAGACATCAAGGCTAGTAGT  
CCACAAGAATTCAAATCTCTTGTGAAGCTTCCAAATTTGCTTTAGATTTGGAAAAAAG  
TAACAATGAAGTTTTATTAAGACTTCATGAAATCTCTTCTGAAAAATAAGATATTGATT  
TTTGCACCTTTTTAGAGGACAAATATCTTGAGGAACAACTCGTTCCATTGAAGAAATC  
GGAAGATTTGTCACTAAATTAAGAGACTCGGCTCTGGAATTTGGTGAAGACT

### Proteasa aspártica 4 (472 pb)

GGTAGTTCAAATCTTTGGATACCATCAAAAAAATGTCCAATATATAAATATTGCTTGCCCT  
TTTACATAATAAATATGATAGTTCTTTCATCATCAACATATGTTACTGATGGAAGAACAA  
TGGCTATTCAATATGGAACAGGATCAATGAAAGGTTTTCTTTCAAAGGACAAAGTTTGT  
GTTGCTGATATTTGTGCTGATGACCAAACATTTGCTGAAGCTACTAGTGAACCAGGTAT  
AACATTTATTGCCGCTAAATTTGATGGTATCCTTGGAAATGGCATATCAAAGTATTGCTG  
TATTAGGAGTTAAACCTGTATTTAATACATTTATTGATCAACATAAAGTTTCTCAACCA  
ATTTTTGCATTTTGGTTAAATCGTATTGCTGATGATAGTGTGGTGGTGAATAACACT  
TGGTGGTATGGATCCAAAACATTATAAAGGTGATATAACATATGTGTCAGTTACTCGTG

**Figura 4.12:** Secuencias nucleotídicas correspondientes a los fragmentos de cDNAs amplificados para las proteínas objeto de este estudio.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron registradas en la base de datos EMBL (<http://www.embl.fr/index.php>), con los códigos que se muestran en la tabla 4.4.

**Tabla 4.4:** Código de acceso en bases de datos de los cDNA que codifican para los fragmentos de las proteínas objeto de estudio.

Proteína	Código de acceso
Antígeno principal- <i>Major antigen</i>	LN715173
Trehalasa	LN715174
Troponina T	LN715175
14-3-3 zeta	LN715176
Catepsina L	LN715177
ASP	LN715178
Ferritina 1	LN715179
Proteasa aspártica 4	LN715180

A partir de la secuencia de nucleótidos, se obtuvieron las secuencias aminoacídicas deducidas correspondientes, utilizando el programa *Translate* de la plataforma EXPASY (<http://web.expasy.org/translate/>). Dichas secuencias, así como el número de aminoácidos de cada una de ellas, peso molecular y punto isoelectrico deducidos se muestran en la figura 4.13.

Secuencias aminoácidas deducidas	aa	Mr	pl
<b>Antígeno principal-Major Antigen</b>			
SDAAIKETALQREAIEKSLNAMERENRELYKNCAQLQHQIA QLEMENGNRVIEMTNKQREEQERVLSRMRNEKAQIEKI IES RERTYKGRIKQLEDQLAIFKEQLE'TERRRRRELMDRNLI TD IGRYTVSGLGGGIGSGIGGSRLGSGYNSAGGNFYHGDNI DH SYGSNLRHIRTTFASNPLTPPRGNLTPHTVTKTIETSSS TVPLMTNIGEEGYDHRSSTPTSRSIHDDNA	236	26,7	8,6
<b>Trehalasa</b>			
TDPHFVDMPLKYDADIVIKKWTNLLDSCEGKVDKLVKEKVV IENFDEPGNELEEYMPQDYNIGPDNLKQISDSHYRHWALDL HDRWPTLCRQVKQNVKDNKDYSIIPLPKPFIVPGRFREM YYWDSFFTIKGLLASKMYKTVRDMIDNMGYMIIEYGFIPNG NRIYYLNRSQPPLLSWCIDAYIKETGDYDFIRTSPLWIEKE LQFFKTYKTVKLEWKSILYRYHVNVDSPRPESYREDIETS EDCETLKCKQILWGEAAAAESGRDFSSRWFANVNSVMGNI KSIRTSVLPVDLNAIILLKNLSIAEEYCIYVGEHEKSEKYR NEKEELKEMIQKILWNDDLGCWFDFDMDKEHQILTYDYTNF FPLVTGINLDEHNQEKIASYITTVGILKYPGGIPTSLOVSG EQWDFPNAWAPTTWILIEGLNKIGLQELAKYIADKWLKKNY TVYRDADGKMFKEYNVTGTCALNIAGGGEYIVQEGFGW	489	57,4	5,1
<b>Troponina T</b>			
AQKKRHEEEQAAKLLDYSERRRIEKEQEQEEI RLLKEKQER RRQEREQEERFAEMRRTAEENRRREERKARLEAEKARK NEEKLKRQQMMAGSFAGHSSGTNGPNFVIQKGEHGNNKLPN LSGSQKKTALTKEQLEEQAAYLAAVTRKPDISHMMPNDLK EAIKLSHSRIVKLEAEKYDLEKRSEYDLKELNERQRQV ARNKAIQRGLDPDEASNSTHPPKVTVFSKFDQRIDRRSYGD RRVLFKPPQKPKFKIAH	264	31,3	9,6
<b>14.3.3 zeta</b>			
MAENKDELVQRAKLAEQAERYDDMSLSMKKVTIEGAELTNE ERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVISSIEQKTEGAEEKQQLAK EYREKIEQELKEICEDVLSLLEKYLIPKAGNPESKVFYLMK KGDYRYRLAEVAIGDARSGASNN SAVAYSEALEVAKTSLAP THPVRLGLALNYSVYFYEVA SSPDRACQLAKQAFDDAIAEL DTLNEDSYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDTN	235	26,5	4,9
<b>Catepsina L</b>			
GAVKSNATKWLPLPNVKIPDSVDWRKEGYVTEVKNQKACGS CYSFSATGALEGQHKRVTDGLVSLSEQNIVDCSTSYGNNGC NGGLMDYVFEYIKENKGVDTSESYPYKGEKGFHFKKRDVG ATDIGYFDLPEGDEEALKVAVATQGPISVAIDAGHSSFQMY KKGIIYEPNCSPENLDHG	182	19,9	5,2

### Aminopectidasa sensible a puromicina

IPGKKDQGHFALEVGIKALDYFNEWFDFTYPVSKMDMIAIP  
 DFMSGAMENTGLLTFREVALLMDDPAKTSIKQKSYISLVIAH  
 EIAHQWFGNIVTHAWWNQLWLKEGFASFMEYLMVGSNYPEF  
 NIWQQFLNDEVTAGLSLDSLRSHPPIEVPIENPSELEEIYD  
 AITYQKSNSVLRMLYGHLEPTFQKALRNYIKKHQYSNTVT  
 ADLWNALSEASGQNIQQMMDTWTQVGFVSVSQKIEGNK **490** **55,6** **5,8**  
 RILTLSQKRFIADGGDSETPQLWHIPISISTTSSKDQPKFK  
 FLMTKANETFTIENVDPSEWVKLNTGTTGFYRVEYSEMLD  
 SLISAVRDGTLPLVDRFGIANDMFALVKAGKLDGVHYLKL  
 EASVNNENYIVRYTLDGGIGALS NVLARFEDADVVKRFDNF  
 VIKNLEPLAAKLGWEAKQDEHGKVSLLRALVINRLARSGHR  
 PTIDAAREKFYDHYKNKTNIDPNLRNAIYSVIGREDGTA

### Ferritina 1

FSDEVEKALNAQIMYELNASHAYMSLAAYMRPEVALENVA  
 KWFLKQSEEREHAVGFIKYQNKRGKVVVKDIDKASSPQEF **154** **17,7** **5,0**  
 NSLVEAFQFALDLEKSNNEGLLRHEISSENKIDIDFCTLLE  
 DKYLEEQTRSIEEIGRFVTKLKRLLGSGIGED

### Proteasa aspártica 4

GSSNLWIPSKKCPYIYNIACLLHNKYDSSSSSTYVTDGRTMA  
 IQYGTGSMKGFSLKDKVCVADICADDQTFAEATSEPGITFI **157** **17,0** **6,3**  
 AAKFDGILGMAYQSIAVLGVPVFNTFIDQHKVSQPIFAFW  
 LNRIADDSVGGIEITLGGMDPKHYKGDITYVSVTR

**Figura 4.13:** Secuencias aminoácidas deducidas de los fragmentos de las proteínas objeto de estudio. Se indica el número total de aminoácidos de cada proteína (aa), así como el peso molecular (Mr) y punto isoelectrónico (pI) deducidos (EXPASY).

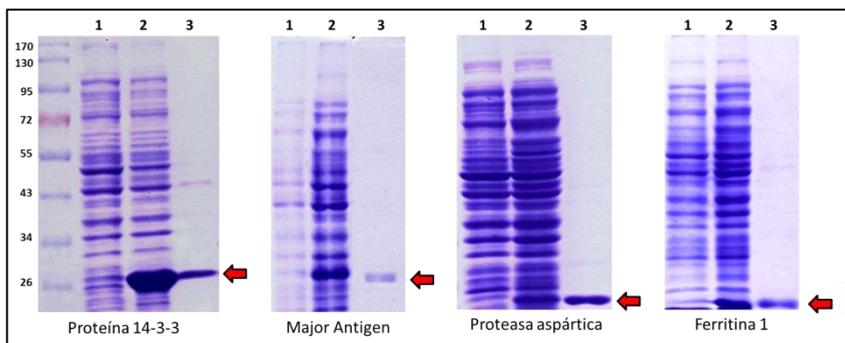
## 4.5. Obtención de las proteínas recombinantes

Para obtener las proteínas recombinantes, los cDNAs se clonaron en los vectores de expresión pQE30-32 (QIAGEN), para generar proteínas recombinantes fusionadas a un residuo de 6 histidinas, a partir de las construcciones generadas en el plásmido pJET 1.2, tal y como se detalla en el apartado 3.8.5 de Materiales y Métodos. Las colonias de bacterias transformadas con la construcción plásmido-gen de interés se identificaron mediante PCR. Las colonias positivas se sometieron a ensayo de inducción a pequeña escala para determinar las condiciones óptimas para producción de las proteínas recombinantes. En todos los casos se obtuvo mayor rendimiento

## Resultados

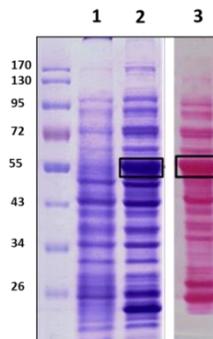
utilizando la cepa de bacteriana *E. coli* M15 incubando a temperatura de 37 °C y concentración de IPTG de 1mM. La mayor cantidad de proteína recombinante se detectó tras incubar los cultivos durante toda la noche, salvo en el caso de la proteína Antígeno principal-*Major antigen*, cuyo óptimo de producción se observó a las 2 h de incubación. Una vez se determinaron las condiciones óptimas de obtención de cada una de las proteínas, se llevó a cabo un ensayo a mayor escala para obtener mayor cantidad de cada una de ellas.

De las 8 proteínas cuyos cDNAs habían sido clonados, se logró producir con éxito 5 de ellas en cantidad suficiente: Antígeno principal-*Major antigen*, Proteína 14.3.3 zeta, Aminopeptidasa sensible a puromicina, Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4. Las proteínas se purificaron en condiciones desnaturalizantes, lisando las bacterias inducidas en un tampón que contenía urea (Tabla 3.5). A partir de los lisados bacterianos, se purificaron las proteínas de interés mediante cromatografía de afinidad en columnas de Níquel (Ni-NTA), para poder separar las proteínas recombinantes (unidas a 6 histidinas afines por dicho metal) del resto de proteínas bacterianas. Se realizó una electroforesis en geles de acrilamida cargando 40 µg del lisado bacteriano previo y posterior a la inducción, así como 10 µg de las proteínas recombinantes purificadas (Figura 4.14).



**Figura 4.14** Proceso de purificación de las proteínas recombinantes: Antígeno principal-*Major antigen*; Proteína 14.3.3 zeta; Proteasa aspártica 4 y Ferritina 1. (1) Lisado total de bacterias sin inducir, (2) Lisado total de bacterias con proteína inducida, (3) Proteína recombinante purificada.

La proteína Aminopeptidasa sensible a puromicina no se pudo purificar mediante columnas de  $\text{Ni}^{2+}$  ya que mostró acumularse en cuerpos de inclusión insolubles. Para solubilizar dicha proteína recombinante se probaron diferentes condiciones, que incluyeron variación en la temperatura de incubación de las bacterias recombinantes, distintas concentraciones de IPTG, cepas bacterianas utilizadas y tiempo de incubación post-inducción. También se intentó su solubilización empleando un tampón de lisis con guanidina ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100mM, Tris-Cl 10mM, GuHCl 6M, pH 8,0), pero en ningún caso se logró purificar la proteína en una cantidad suficiente que permitiese análisis posteriores. Por ello, se procedió a purificar a la proteína ASP a partir de geles de electroforesis y transferencia a papel de nitrocelulosa, a partir de los cuales se extrajo la banda correspondiente a la proteína, de donde se disolvió con el agente orgánico DMSO (Figura 4.15).

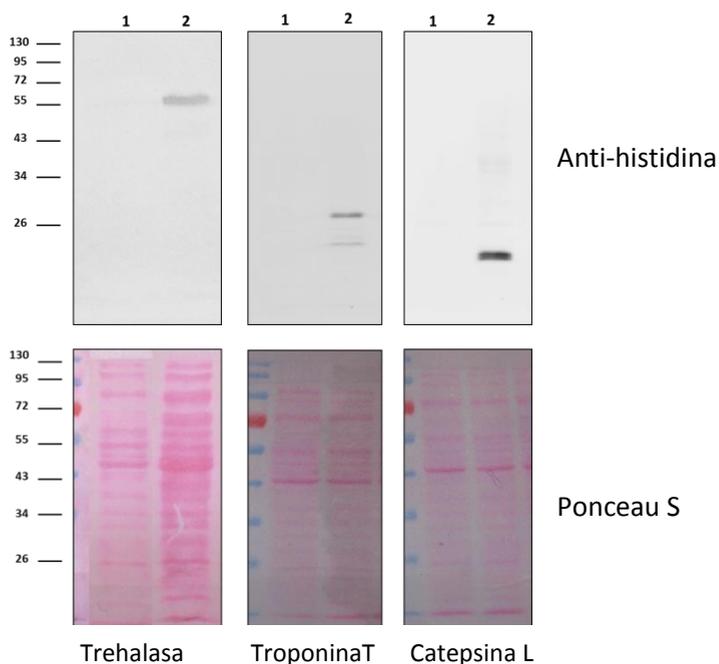


**Figura 4.15:** Proceso de purificación de la proteína Aminopeptidasa sensible a puromicina. (1) Lisado total de bacterias sin inducir, (2) Lisado total de bacterias con proteína inducida. (3) Lisado total de bacterias inducidas transferido a papel de nitrocelulosa y teñido con Ponceau S.

En el caso de las proteínas Trehalasa, Troponina T y Catepsina L, se probaron diferentes condiciones de inducción variando la temperatura de incubación de los cultivos bacterianos (4 °C; 24 °C; 37 °C), en combinación con variaciones en la concentración del inductor de expresión (0,1 mM; 0,4 mM; 0,8 mM; 1mM; 2 mM), y probando con tres cepas de bacterias *E. coli* diferentes (M15, SG13009 y BL21 (DE3) pLysS) a diferentes tiempos de incubación. A pesar de los esfuerzos realizados, no se logró que las proteínas recombinantes fueran

## Resultados

expresadas por ninguna de las cepas de bacterias en cantidad suficiente para su posterior purificación mediante el sistema de columnas Ni-NTA. Sin embargo, mediante análisis *Western blot* utilizando anticuerpos anti-histidina (Apartado 3.10.7) se pudo confirmar la presencia de dichas proteínas recombinantes en los lisados totales de bacterias transformadas e inducidas.



**Figura 4.16:** Identificación de proteínas recombinantes mediante *Western blot* con anticuerpos anti-histidina: Trehalasa; Troponina T y Catepsina L. Se muestra la tinción con Ponceau S como control de carga. (1) Lisado total de bacterias sin inducir; (2) lisado total de bacterias inducidas.

Se observó que en los lisados totales de bacterias post-inducción se producía reconocimiento, por parte del anticuerpo anti-histidina, de bandas localizadas en el peso molecular esperado para cada una de las proteínas recombinantes producidas (Figura 4.16), mientras que no se observó ninguna señal al incubar el lisado de proteínas de bacterias no inducidas frente a dicho anticuerpo. Por tanto, se confirmaba la producción de estas proteínas pero no en la cantidad

suficiente para permitir su purificación, por lo que se decidió no continuar trabajando con ellas.

#### **4.6. Evaluación de la capacidad diagnóstica de las proteínas recombinantes obtenidas**

Con el objetivo de determinar si las proteínas recombinantes obtenidas podrían ser reconocidas por sueros de pacientes de estrongiloidiasis, se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección, inicialmente de tipo *slot blot* como se detalló en el apartado 3.11. Cada proteína recombinante se incubó frente a diluciones crecientes de mezclas tanto de sueros de pacientes positivos como negativos para estrongiloidiasis (véase apartado 3.2.2). Asimismo, se probaron diferentes concentraciones del anticuerpo secundario anti inmunoglobulinas humanas (GAH).

El resultado de dicho ensayo no mostró diferencias significativas en el reconocimiento entre sueros positivos y negativos a la enfermedad, ya que las proteínas recombinantes eran reconocidas tanto por la mezcla de sueros de pacientes sanos como enfermos.

Dado que los ensayos de *slot blot* pueden dar reactividad cruzada con varias proteínas del extracto total bacteriano, se procedió a separar las proteínas mediante SDS-PAGE para estudios de *Western blot* y realizar también análisis ELISA. En todos los ensayos llevados a cabo las proteínas eran reconocidas por mezclas de sueros tanto positivos como negativos, pese a que se probaron diferentes diluciones tanto de proteína para tapizar las placas y membranas, como de los sueros analizados.

A la vista de los resultados se concluyó que los fragmentos proteicos obtenidos de forma recombinante en el laboratorio, no parecían de gran utilidad para el diagnóstico inmunológico de la enfermedad, utilizándolos como antígenos para la detección de anticuerpos frente a ellos en sueros de pacientes con estrongiloidiasis.

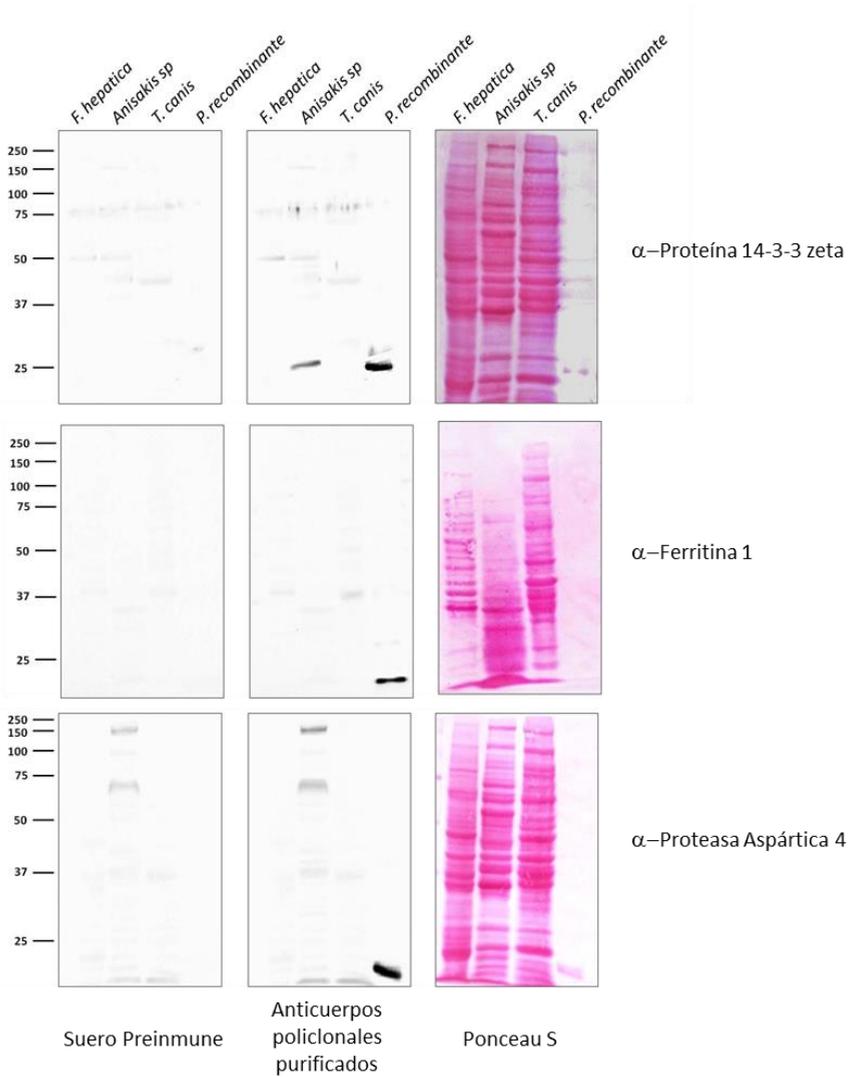
## **4.7. Obtención y evaluación de anticuerpos policlonales con finalidad diagnóstica**

Una vez confirmada la poca especificidad del reconocimiento de los antígenos recombinantes por sueros de pacientes, la siguiente aproximación para establecer un método diagnóstico fué utilizar dichas proteínas recombinantes purificadas para generar anticuerpos policlonales en conejo, y probar su utilidad en la detección de antígenos en muestras de pacientes. Los anticuerpos policlonales se generaron como se describe en el apartado 3.12.1. Dichos anticuerpos fueron purificados a partir de los sueros, divididos en alícuotas y congelados hasta su uso.

### **4.7.1. Estudio de la especificidad de los anticuerpos policlonales frente a las proteínas mediante *Western blot***

Se realizó un ensayo de *Western blot* utilizando lisados totales de varios helmintos parásitos para valorar la especificidad de los anticuerpos presentes en los sueros de los conejos inmunizados con las proteínas recombinantes de la L3i de *S. stercoralis*. Se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE 40 µg del extracto de proteínas de cada uno de los parásitos disponibles, *T. canis*, *F. hepatica* y *Anisakis* sp. Tras la transferencia, las membranas fueron incubadas con una dilución 1/200, bien de suero de conejo inmunizado con cada una de las proteínas, bien de suero preinmune, como control negativo del experimento. Como control positivo del ensayo se utilizaró 4 µg de cada proteína recombinante del parásito, ya que no se disponía de material parasitario suficiente como para obtener lisado total de larvas L3i.

En el caso de los ensayos con anticuerpos anti-Ferritina 1 y anti-Proteasa 4 aspártica, los resultados obtenidos mostraron que no se producía reconocimiento específico de ninguna proteína en los lisados de los otros helmintos estudiados por parte de los sueros de conejos inmunizados, mientras que sí que reconocía la banda correspondiente con la proteína recombinante homóloga de *S. stercoralis* (Figura 4.17).



**Figura 4.17:** Análisis de la especificidad de los anticuerpos policlonales mediante *Western blot*. Como antígenos se utilizaron lisados totales a partir de las especies de helmintos indicadas. Las proteínas recombinantes objeto de estudio se utilizan como control positivo

## Resultados

Estos resultados sugieren que los anticuerpos producidos frente a estos fragmentos de proteínas de la larva L3i de *S. stercoralis* no presentan reactividad cruzada con los helmintos parásitos analizados, y que son altamente específicos, y por tanto podrían resultar útiles para el diagnóstico de la estrongiloidiasis.

En el caso de los anticuerpos anti-14-3-3 zeta, se produjo reconocimiento de la proteína homóloga en el extracto total de *Anisakis* sp. al incubar con el suero de conejos inmunizados (Figura 4.17). Como se comentó anteriormente, la proteína 14-3-3 pertenece a una familia de proteínas bastante conservadas entre distintos organismos, por lo que probablemente el anticuerpo policlonal producido en el presente trabajo reconoció algún epítipo común en las proteínas de ambos nematodos.

Para evaluar la utilidad de dichos anticuerpos en muestras de pacientes se llevaron a cabo ensayos de tipo ELISA de captura de inmunocomplejos en sueros positivos y negativos a estrongiloidiasis. Con este tipo de ensayos se pretende aumentar la sensibilidad y especificidad, ya que amplifican la señal de reconocimiento. Los experimentos se desarrollaron tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos 3.13.2.

Los resultados de esta aproximación no fueron satisfactorios, no observándose diferencias significativas en el reconocimiento de los *pools* de sueros positivos y los controles negativos en ninguno de los tres anticuerpos analizados (datos no mostrados). Por lo tanto, serían necesarios nuevos ensayos variando algunos parámetros de los experimentos, así como distintos tipos de muestras, para valorar la utilidad diagnóstica de los anticuerpos producidos en la presente Tesis.

#### **4.8. Inmunolocalización de proteínas objeto de estudio en cortes histológicos de larvas L3i de *Strongyloides stercoralis***

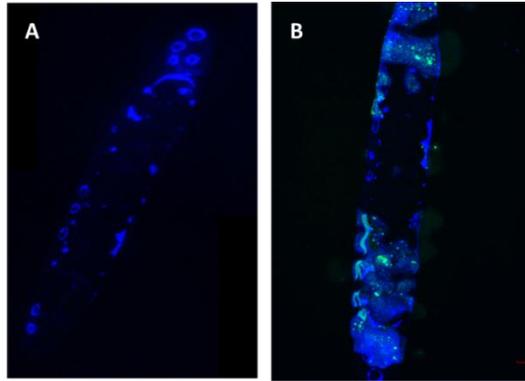
Con el objetivo de estudiar la localización de las proteínas 14.3.3 zeta, Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4, en larvas L3i de *S. stercoralis*, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia en cortes de larvas de 1  $\mu\text{m}$  de grosor. Las muestras se incubaron con los anticuerpos policlonales obtenidos previamente frente a dichas proteínas y se realizó un análisis por microscopía láser confocal (Apartado 3.14).

Se utilizó el fluorocromo FITC, acoplado a anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulinas de conejo, de manera que la fluorescencia color verde corresponde a las proteínas objeto de estudio. Así mismo, se marcaron los núcleos celulares mediante tinción con DAPI, que marca DNA, y cuya fluorescencia es de color azul, que se utilizó tanto en los controles negativos como en las muestras incubadas con los anticuerpos.

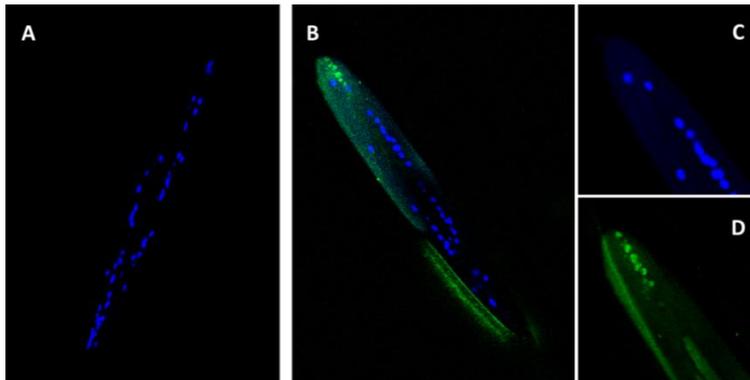
En los cortes incubados con sueros negativos (control) solamente se apreció fluorescencia azul correspondiente al DAPI, no apareciendo fluorescencia de color verde. Por el contrario, en todos los cortes incubados con los sueros que contenían los anticuerpos policlonales frente a las proteínas objeto de estudio, se detectó fluorescencia de color verde, lo que indicaba la detección de las proteínas analizadas en larvas L3i de *S. stercoralis* (Figuras 4.18, 4.19 y 4.20).

En los tres ensayos se produjo reconocimiento por parte de los anticuerpos tanto en regiones localizadas en el interior de las larvas, como en la superficie de las mismas. Esto último puede indicar que se localizarían en la cutícula, facilitando su reconocimiento por parte del sistema inmunitario. En el caso concreto del suero anti-Proteasa aspártica 4, se detectaron acúmulos de proteína próximos a uno de los extremos de la larva, lo que puede sugerir su posible excreción/secreción al exterior.

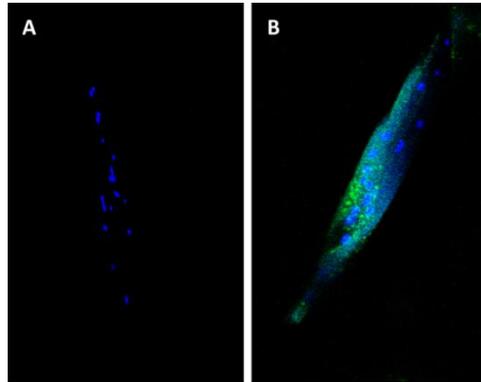
 **Resultados**



**Figura 4.18:** Imágenes obtenidas mediante microscopía láser confocal sobre cortes de larvas de *S. stercoralis*. A) Control negativo. B) Corte de larva L3i incubado con suero anti-proteína 14-3-3 zeta marcado con FITC.



**Figura 4.19:** Imágenes obtenidas mediante microscopía laser confocal sobre cortes de larvas de *S. stercoralis*. A) Control negativo. B) Corte de larva L3i incubado con suero anti-proteína Proteasa aspártica 4 marcado con FITC. C) y D) Detalle del extremo de la larva incubada con el antisuero, donde se observa por separado el marcaje con DAPI (C), y el correspondiente a la proteína marcada con FITC (D).



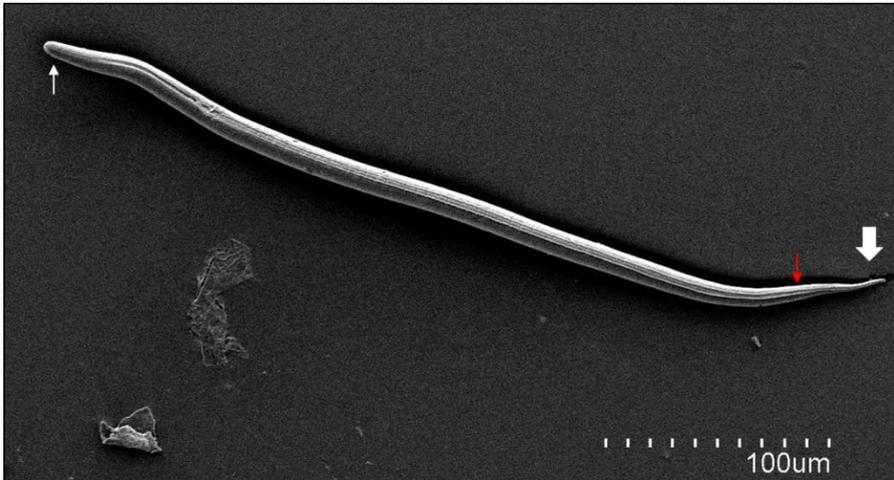
**Figura 4.20:** Imágenes obtenidas mediante microscopía laser confocal sobre cortes de larvas de *S. stercoralis*. A) Control negativo. B) Corte de larva L3i incubado con suero anti-proteína Ferritina 1 marcado con FITC.

#### **4.9. Estudio morfológico mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie de larvas L3i de *S. stercoralis***

En el presente trabajo, además del estudio de los transcritos más abundantes en larvas L3i de *S. stercoralis*, y de la caracterización de algunas de sus proteínas, también se ha querido hacer una contribución para mejorar el conocimiento morfológico de dichas larvas.

Se realizaron fotografías con microscopio electrónico de barrido de larvas enteras recuperadas de muestras de pacientes mediante cultivo en placa de agar, a las que se trató mediante el proceso de punto crítico para su posterior observación, tal y como se indicó en el apartado 3.15.1 de Materiales y Métodos.

En la figura 4.21 se muestra una fotografía de una larva completa, en la que se indican sus extremos anterior y posterior, y donde se aprecia su forma y tamaño.



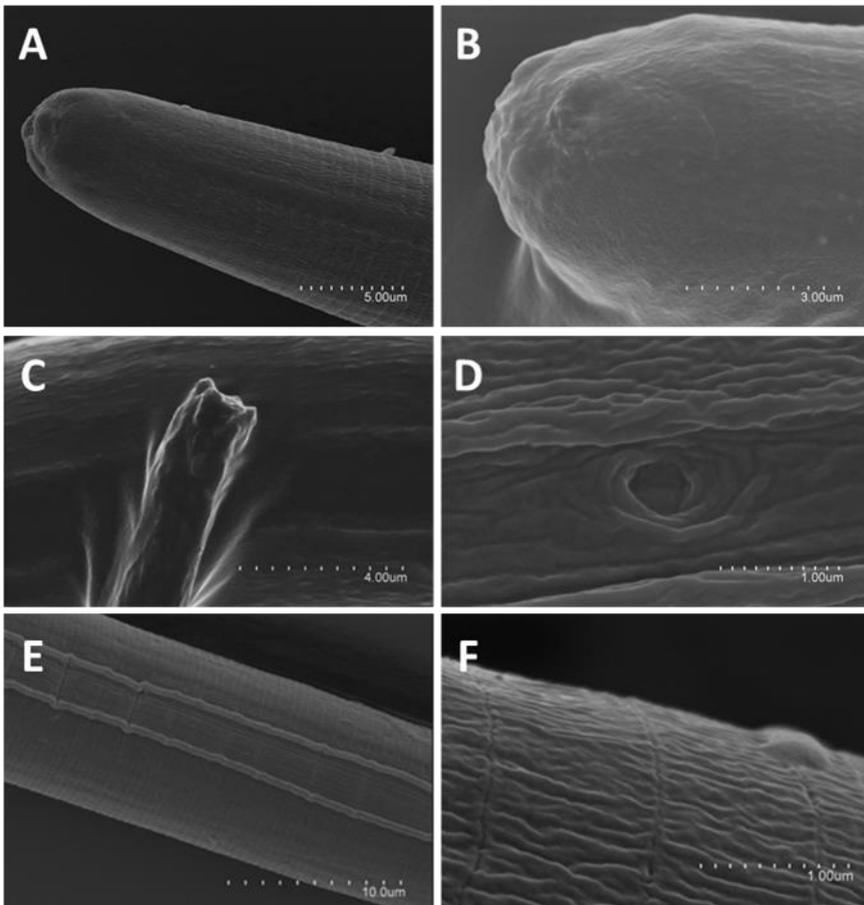
**Figura 4.21:** Fotografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de la larva completa L3i de *S. stercoralis*. La flecha fina indica el extremo anterior y la gruesa el posterior. La flecha roja marca la posición donde se sitúa el fasmidio.

De esta manera se pudieron apreciar detalles de la cutícula de la larva, tales como la suave estriación transversal (Figura 4.22. F), así como los campos laterales, que recorren lateralmente ambos lados de la larva y constituyen el punto de anclaje de la musculatura en los nematodos (Figura 4.22. E).

En la región cefálica se aprecia una boca pequeña, tipo poro. Además se observaron las papilas cefálicas, subsorsales y subventrales, todas ellas de reducido tamaño y situadas a ambos lados de la cavidad bucal. Estas papilas tienen funciones receptoras (Figura 4.22. A, B).

En el tercio posterior, se pudieron apreciar con detalle los fasmidios (Figura 4.22. D), órganos pares situados en los campos laterales, característicos del grupo Phasmidia. A los fasmidios también se les atribuyen funciones receptoras.

Finalmente, se pudo apreciar el extremo posterior, con la característica terminación tetrafurcada en la punta (Figura 4.22. C).



**Figura 4.22:** Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie de larvas L3i de *S. stercoralis*. A-B) Extremo anterior de la larva, donde se aprecia en detalle la cavidad bucal y las papilas. C) Detalle del extremo posterior truncado D) Fasmidio. E) Campos laterales. F) Estriación de la cutícula.



## ***5. Discusión***



El parásito *S. stercoralis* tiene la capacidad de establecer un ciclo autoinfectivo en su hospedador, lo cual unido a la escasa sintomatología asociada a la parasitosis, desemboca en una enfermedad crónica. Si no se lleva a cabo un diagnóstico precoz y el subsecuente tratamiento, el curso de la enfermedad puede complicarse poniendo en riesgo la vida de quien la padece.

Se estima que este parásito afecta entre 30 y 100 millones de personas en todo el mundo, pero esta cifra se considera infraestimada ya que, como se mencionó anteriormente, las técnicas diagnósticas utilizadas en la mayoría de los estudios epidemiológicos sobre geohelmintiasis presentan baja sensibilidad para *Strongyloides* spp. (Bisoffi *et al.*, 2013). Además, la escasez de sintomatología asociada a la presencia del parásito favorece que muchos casos pasen desapercibidos y no sean diagnosticados, ya que en las regiones donde esta enfermedad es endémica, habitualmente el acceso al sistema sanitario es difícil para la población general. Todo ello conduce al desconocimiento del alcance real de esta parasitosis, convirtiéndola en una enfermedad olvidada estrechamente asociada a situaciones de pobreza donde las condiciones higiénico-sanitarias son deficientes y permiten la conservación del ciclo infectivo del parásito. El desarrollo de sistemas de diagnóstico rápido de la estrongiloidiasis, que sean sencillos de utilizar y económicos, resultaría de gran utilidad para poner de manifiesto la situación real de la enfermedad, proporcionar el tratamiento adecuado a quien la padezca y, de esta manera reducir el número de casos.

La distribución del parásito, pese a estar principalmente restringida a regiones con clima tropical y subtropical, también puede ampliarse a zonas templadas donde las condiciones higiénico-sanitarias permitan la perpetuación de su ciclo vital e infectivo. Tal es el caso de la Comarca de La Safor valenciana, lugar considerado foco de parasitación endémica desde que se confirmaran los primeros casos en el siglo XIX. Aunque actualmente no se producen nuevas infecciones en esta zona (Martínez-Pérez & López-Vélez, 2015), sí que existen todavía casos no diagnosticados de estrongiloidiasis crónica asociados a infecciones que se produjeron años atrás.



## Discusión

Hoy en día la mayoría de los casos que se diagnostican en nuestro país corresponden a infecciones producidas en otros países endémicos, bien de personas oriundas de dichos países y que actualmente residen en España, bien de españoles que han viajado o residido temporalmente en estos países (Ramírez-Olivencia *et al.*, 2014). En el estudio de Ramos *et al.* (2015), realizado en el Hospital General Universitario de Alicante, se analizó la prevalencia de algunas enfermedades parasitarias y víricas en 180 inmigrantes latinoamericanos residentes en España, y se determinó que el 26,8% de los pacientes analizados eran positivos a *S. stercoralis*. Similares fueron los resultados hallados por Cabezas-Fernández *et al.* (2015), del Hospital de Poniente en Almería, que encontraron un 23% de casos positivos en los 1384 pacientes analizados procedentes de distintos países, siendo la mayoría de los positivos nativos de regiones subsaharianas. Por lo tanto, pese a que en nuestro país ya no se produzcan nuevos casos autóctonos de infección por *S. stercoralis*, la enfermedad sigue presente. Es muy importante tener este hecho en cuenta, especialmente en aquellas personas que vayan a ser sometidas a tratamientos inmunosupresores y en cuyo historial clínico aparezca eosinofilia y hayan viajado o residido en zonas endémicas.

Para la realización de los experimentos incluidos en esta Tesis se ha requerido tanto de sueros como de larvas L3i del parásito, procedentes de muestras de heces, de enfermos crónicos de La Safor, gentilmente facilitadas por centros hospitalarios localizados en estos antiguos focos de endemia.

Como se comentó en el apartado de Introducción, existe una amplia gama de técnicas diagnósticas para esta enfermedad, pero en la actualidad aún no hay ningún *gold standard* en el diagnóstico. Las técnicas parasitológicas son las que muestran mejores resultados en cuanto a especificidad principalmente, pero presentan el inconveniente de ser técnicas laboriosas de realizar y precisar de personal cualificado para la identificación de las larvas, mientras que las inmunológicas, a pesar de ser más sensibles que las parasitológicas, presentan algunos problemas tales como la reactividad cruzada con otras helmintiasis. Es por ello que se necesita identificar nuevas moléculas del parásito para el

desarrollo de técnicas sencillas más sensibles y específicas que ayuden a obtener un diagnóstico temprano de la estrogiloidiasis.

Actualmente aún no se ha publicado la secuenciación del genoma completo de *S. stercoralis*, y la información sobre el proteoma es aún muy escasa. En los trabajos llevados a cabo por Mitreva *et al.* (2004) se analizaron 10921 ESTs de las fases larvarias L1r y L3i de *S. stercoralis* y se compararon con las fases homólogas del nematodo de vida libre *C. elegans*. Posteriormente, Ramanathan *et al.* (2011) realizaron un estudio en esta misma línea comparando mediante *microarrays* de RNA la expresión diferencial de genes entre la L1r y la L3i de *S. stercoralis*, identificando 935 genes expresados de forma diferencial entre ambos estadios larvarios. La presente Tesis parte de los datos obtenidos del estudio del transcriptoma de la fase L3i del parásito llevados a cabo por Marcilla *et al.* (2012), donde se identificaron un total de 8037 proteínas putativas. Todos estos trabajos son muy valiosos para poner de manifiesto proteínas que puedan resultar empleadas como dianas terapéuticas, diagnósticas o moléculas útiles para el desarrollo de vacunas. Como se comentó, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue el de identificar y caracterizar proteínas de larvas L3i de *S. stercoralis* que pudieran ser utilizadas para mejorar el diagnóstico actual de la enfermedad en sus fases aguda y crónica. De modo que, teniendo en cuenta estos estudios y el hecho de que las secuencias de proteínas de las que se dispone en base de datos son aún muy escasas, se decidió realizar un análisis más detallado de algunas de las proteínas correspondientes a los mRNAs más abundantes en el transcriptoma de larvas L3i del parásito. La selección de proteínas contempló además que hubieran sido previamente identificadas en productos de E/S o en la superficie de otros helmintos parásitos o incluso de *S. stercoralis*. Se prestó especial atención a aquellas proteínas cuya secuencia no mostrara elevada homología con las secuencias depositadas en base de datos de otros nematodos parásitos para evitar reactividad cruzada entre especies.

A partir de las secuencias obtenidas en el estudio del transcriptoma de la L3i se clonaron fragmentos génicos codificantes para las proteínas seleccionadas con



el fin de probar su reactividad frente a asueros de personas infectadas con *S. stercoralis*. Además, se obtuvieron anticuerpos policlonales frente a estos fragmentos proteicos para valorar su capacidad de reconocer antígenos del parásito en muestras de suero de pacientes con estrongiloidiasis, así como para llevar a cabo ensayos de inmunolocalización en cortes de larvas de estas proteínas.

Con el mismo fin de búsqueda de moléculas útiles en diagnóstico, también se trabajó con péptidos sintéticos diseñados a partir de secuencias aminoacídicas deducidas de proteínas que habían sido identificadas como antigénicas en enfermos de estrongiloidiasis en estudios previos (Pérez-García, 2010).

### **5.1. Sobre el análisis de proteínas de la larva L3i de *S. stercoralis* para su producción como proteínas recombinantes**

Uno de los objetivos del presente trabajo fue el de identificar y caracterizar proteínas de larvas L3i de *S. stercoralis* que pudieran ser útiles en el desarrollo de un sistema de diagnóstico rápido para la estrongiloidiasis.

Como se comentó anteriormente, los antígenos de superficie y los presentes en los productos de E/S de parásitos han demostrado ser de gran utilidad en el desarrollo de nuevas técnicas serológicas para el diagnóstico de enfermedades. El problema estriba en la dificultad de obtención de estas proteínas en cantidad suficiente, ya que en muchas ocasiones, y en nuestro caso en particular, el acceso al material parasitario es limitado y el mantenimiento de ciclos infectivos en el laboratorio resulta muy dificultoso y costoso. Por esta razón, la obtención de proteínas recombinantes es de gran utilidad, permitiendo la caracterización de moléculas del parásito que pueden ser útiles para diagnóstico, tratamiento y vacunación (Marcilla *et al.*, 2007; Higón *et al.*, 2008; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009; Edaye *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014). En los últimos años, los ensayos con proteínas recombinantes han demostrado ser muy útiles para el diagnóstico tanto de *S. stercoralis* (Ravi *et al.*, 2002; Ramanathan *et al.*, 2008), como de otras

helminthiasis (Gonzales *et al.*, 2013; Jawaharlal *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2014; Saenseeha *et al.*, 2014).

En el caso concreto de *S. stercoralis* son pocas las proteínas tanto de superficie como de E/S que han sido caracterizadas, probablemente debido a la dificultad en obtener un número suficiente de ejemplares para su estudio en el laboratorio. Es por ello que el trabajo que se ha realizado en la presente Tesis constituye una importante contribución a la mejora del conocimiento proteómico de este helminto.

En nuestro estudio se ha trabajado con proteínas de la larva L3i, ya que esta es la forma infectiva del parásito, tanto en primoinfecciones a través de la piel del hospedador como en autoinfección, traspasando las paredes intestinales hasta alcanzar el torrente sanguíneo. Debido a la migración sistémica que experimenta esta larva, se genera una reacción inmunitaria que, como se indicó en el apartado 1.3, se caracteriza por la liberación de citoquinas y la producción de eosinófilos y anticuerpos específicos de isotipos IgG, IgA, IgE e IgM. El isotipo IgG es el mayoritario en el suero de las personas infectadas, por lo que la mayoría de los métodos diagnósticos están basados en la detección de esta inmunoglobulina frente a antígenos de la larva (Marcos *et al.*, 2011; Bosqui *et al.*, 2015). Siguiendo esta línea, en el presente trabajo, se ha optado por trabajar con proteínas de larvas L3i para la detección de IgG. El isotipo IgA es el segundo más frecuente en suero, siendo el mayoritario en superficie y secreciones de la mucosa, por lo que podría ser una alternativa en futuros estudios (Levenhagen & Costa-Cruz, 2014; Bosqui *et al.*, 2015).

A partir de los datos obtenidos del análisis del transcriptoma de larvas L3i llevado a cabo por Marcilla *et al.* (2012), se realizó un análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas para seleccionar aquellas que pudieran estar más representadas en la fase larvaria, pero que no presentaran un alto grado de homología con las de otros helmintos parásitos. Entre los 50 transcritos más abundantes se encontraron los mRNAs correspondientes a algunas proteínas previamente identificadas como antigénicas frente a sueros de pacientes con



estrongiloidiasis crónica en estudios anteriores (Pérez García, 2010). Tal es el caso de la proteína HSP70, que también ha sido identificada en los productos de E/S en otros helmintos parásitos (Higón *et al.*, 2008; Oleaga *et al.*, 2009), así como formando parte del tegumento de estos (Higón *et al.*, 2008; Pérez-Sánchez *et al.*, 2008). Sin embargo, esta proteína fue descartada para nuestro estudio debido a su alta homología con la HSP70 de otras especies de nematodos (Wang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013). Otra molécula encontrada entre los transcritos más abundantes de la larva L3i fue la Paramiosina, proteína citoesquelética que había sido identificada en la superficie de *S. stercoralis* por Marcilla *et al.* (2010), como también lo ha sido en la superficie de otros helmintos como *Schistosoma* sp, (Gobert & McManus, 2005; Pérez-Sánchez *et al.*, 2008), así como en productos de E/S de *Echinostoma friedi* (Bernal *et al.*, 2006). Al igual que en el caso de la HSP70, la Paramiosina fue descartada para el presente estudio por su elevada semejanza con las secuencias de esta proteína depositadas en las bases de datos correspondientes a otros nematodos.

Gracias a las herramientas bioinformáticas disponibles, se pudo realizar un análisis más detallado de los fragmentos génicos codificantes para las proteínas de *S. stercoralis* que nos permitiera seleccionar las más adecuadas para nuestro estudio. Mediante el estudio del perfil hidrofóbico así como de los dominios más antigénicos, se pudo determinar qué fragmentos proteicos poseían un perfil marcadamente antigénico a lo largo de toda su secuencia. Con todos estos datos se decidió clonar las secuencias codificantes para amplificar fragmentos de las proteínas siguientes: Antígeno principal-*major antigen*, Trehalasa, Troponina T, 14-3-3 zeta, Catepsina L, Aminopeptidasa sensible a puromicina, Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4.

El mRNA de la proteína denominada Antígeno principal-*major antigen*, presentó el mayor número de copias tras el análisis del transcriptoma de las larvas de L3i de *S. stercoralis*, y fue identificada como tal proteína por su homología con las secuencias depositadas en las bases de datos tanto de *Ascaris suum* (Wang *et al.*, 2011), como de *T. canis* (Zhu *et al.*, 2015). Además

también se observó homología de secuencia con la proteína *Lin-5*, identificada en nematodos de vida libre del género *Caenorhabditis*, y considerada como un componente esencial del huso mitótico y necesaria para la correcta replicación celular (Lorson *et al.*, 2000).

La Troponina T es una de las tres subunidades proteicas que constituyen el complejo de la troponina, el cual se une a la Tropomiosina permitiendo la interacción de la Miosina y la Actina y por tanto la contracción muscular. En los trabajos de van Balkom *et al.* (2005), se identificó la Troponina T en la fracción proteica no tegumentaria de adultos de *Schistosoma mansoni*. Esta localización se confirmó en los estudios llevados a cabo por Ludolf *et al.* (2014), en los que también se demostró la capacidad antigénica de esta proteína y su posible uso para el diagnóstico de esquistosomiasis, ya que en estos ensayos la Troponina T reaccionó únicamente con *pools* de sueros de pacientes infectados por el parásito. Mayta *et al.* (2009) clonaron un antígeno de 42 kDa con un dominio semejante al de la Troponina T que se comprobó era exclusivo de la fase de oncosfera de *Taenia solium*, aunque no obtuvieron buenos resultados en el uso de este antígeno en diagnóstico de la cisticercosis/teniasis humana. Esta molécula también ha sido identificada como alérgena en nematodos (Fitzsimmons *et al.*, 2014). No obstante, existen pocos estudios acerca de la utilidad de la Troponina T en inmunodiagnóstico, por lo que es interesante ahondar más en el conocimiento y utilidad de esta proteína, no solo como diana diagnóstica, sino también para el desarrollo de vacunas. En esta línea, Wang *et al.* (2014), clonaron y expresaron el gen de la Troponina T de *Schistosoma japonicum*, demostrando la capacidad de esta molécula de inducir inmunidad parcial en ratones.

Otras proteínas estructurales responsables de la contracción muscular como Actina, Tropomiosina y Miosina han sido identificadas en el tegumento de *S. stercoralis* (Marcilla *et al.*, 2010), así como en el de otros helmintos como *Schistosoma bovis* (Pérez-Sánchez *et al.*, 2008), *S. mansoni* (MacGregor & Shore, 1990) y *S. japonicum* (Mulvenna *et al.*, 2010). Así mismo, la Tropomiosina es uno de los alérgenos bien caracterizados presentes en



nematodos (Fitzsimmons *et al.*, 2014). En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación la Tropomiosina fue clonada y expresada para su uso en diagnóstico de estrogiloidiasis, comprobándose su eficacia en el reconocimiento de *pools* de sueros de pacientes infectados por *S. stercoralis* (Pérez-García, 2010).

En el caso de la proteína 14-3-3, ésta ha sido identificada previamente en larvas L3i de *S. stercoralis* y caracterizada como una proteína de superficie (Marcilla *et al.*, 2010). La 14-3-3 pertenece a una familia de proteínas bastante conservadas y presentes en todos los organismos eucariotas. Estas proteínas están implicadas en multitud de procesos celulares tales como la transducción de señal, apoptosis, respuesta frente al estrés o en la organización del citoesqueleto (Hermeking & Benzinger, 2006). Además, la 14-3-3 ha sido identificada en el tegumento de *Echinococcus multilocularis* (Siles-Lucas *et al.*, 1998), *S. mansoni* (Schechtman *et al.*, 2001) y *S. bovis* (Pérez-Sánchez *et al.*, 2008), así como en material de E/S de numerosos parásitos, entre los que se encuentran *Echinococcus granulosus* (Siles-Lucas *et al.*, 2000), *S. mansoni* (van Hellemond *et al.*, 2007), *S. japonicum* (Liu *et al.*, 2009), *Ancylostoma caninum* (Mulvenna *et al.*, 2009) y *A. suum* (Wang, T.*et al.*, 2013). Es por todo ello, que la 14-3-3, pese a ser una proteína conservada entre especies, resulta una candidata muy interesante para un estudio más detallado en *S. stercoralis*, debido a su importancia en multitud de procesos celulares y su localización tegumentaria en la L3i de este parásito.

La Ferritina es una proteína citosólica encargada del almacenamiento de hierro y juega un importante papel en el mantenimiento del balance intracelular del mismo. Pese a ser una proteína intracelular se ha demostrado su presencia en el secretoma de *Opistorchis felinus* (L'vova *et al.*, 2014), y en materiales de E/S de *Angiostrongylus cantonensis* (Morassutti *et al.*, 2012). Además, estudios recientes han demostrado la existencia de Ferritina en vesículas de secreción, denominadas exosomas en trematodos (Marcilla *et al.*, 2012a), lo que puede explicar la presencia de algunas proteínas no superficiales, como la Ferritina, en la interfase parásito-hospedador. Precisamente el descubrimiento de los

exosomas en 1983, se realizó con el receptor de Ferritina en reticulocitos (Johnstone *et al.*, 2005). Se han caracterizado Ferritinas de *S. mansoni* (Dietzel *et al.*, 1992), *S. japonicum* (Glanfield *et al.*, 2007), *Paragonimus westermani* (Kim *et al.*, 2002), *Taenia saginata* (Benítez *et al.*, 1996), *Echinococcus granulosus* (Ersfeld & Craig, 1995), *Clonorchis sinensis* (Tang *et al.*, 2006) y *F. hepatica* (Cabán-Hernández *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado la inmunogenicidad de esta proteína, y se han desarrollado ensayos de inmunodiagnóstico utilizando Ferritina recombinante. Tal es el caso de los trabajos llevados a cabo por Cabán-Hernández *et al.* (2014), en los que se ha utilizado una Ferritina recombinante de *F. hepatica* (FhFth-1) en ELISA, obteniéndose un 96,6 % de sensibilidad y 95,7% de especificidad frente a fascioliasis. Liu *et al.* (2012) llevaron a cabo ensayos de inmunoprotección utilizando una proteína recombinante de Ferritina de *E. multilocularis*, logrando una inmunidad parcial en ratones frente a esta enfermedad.

En el proceso de selección de moléculas candidatas llevado a cabo en la presente Tesis, también se prestó especial atención a aquellas proteínas que tuvieran función enzimática o que pudieran ser importantes en el metabolismo del parásito por el interés que pueden tener no solo como dianas diagnósticas, sino también terapéuticas o incluso para ensayos de inmunización y desarrollo de vacunas. Tal es el caso de las proteínas Trehalasa, Catepsina L, Proteasa aspártica 4 y Aminopeptidasa sensible a puromicina.

La Catepsina L es una cisteína-proteasa incluida en la familia de las catepsinas, las cuales son proteínas lisosomales presentes en una amplia gama de organismos, desde bacterias a vertebrados. En mamíferos están presentes en todos los tipos celulares (Bond & Butler, 1987), estando demostrada su función como enzimas intracelulares implicadas en la degradación de proteínas en el interior de los lisosomas (Britton & Murray, 2002). Las cisteína-proteasas parasitarias están asociadas con la patogenicidad de estos organismos, la captación de nutrientes del hospedador, la penetración tisular y la evasión del sistema inmunitario (Sajid & McKerrow, 2002). Por ello, estas proteasas son



consideradas buenas dianas para el control de las enfermedades parasitarias, así como para su uso en técnicas de inmunodiagnóstico. Santana *et al.*, (2013), han obtenido excelentes resultados utilizando la Catepsina L de *F. hepatica* en ensayos de ELISA para diagnóstico de fascioliasis. Con este mismo fin, se ha caracterizado la Catepsina L de algunos helmintos parásitos como *C. sinensis* (Li *et al.*, 2012), *Taenia pisiformis* (Wang, Q. *et al.*, 2013), *Strongylus vulgaris* (Ultaigh *et al.*, 2009) y *E. multilocularis* (Sako *et al.*, 2007). Además, se ha identificado Catepsina L en productos de E/S de *F. hepatica* (Jefferies *et al.*, 2001), y recientemente Sansri *et al.* (2015) han llevado a cabo ensayos de vacunación en ratones con una Catepsina L recombinante de *F. gigantica*, obteniendo resultados prometedores.

La Trehalasa es una enzima encargada de hidrolizar el disacárido trehalosa en las dos moléculas de glucosa que lo forman. En nematodos, la trehalosa no solo tiene una función como fuente energética, sino que también es importante en la supervivencia siendo indispensable para completar el ciclo de vida en algunas especies (Behm, 1997; Dmitryjuk & Zoltowska, 2004). La presencia de Trehalasa ha sido demostrada en numerosos helmintos parásitos como *A. suum* (Gentner & Castro, 1974) en adultos de *Haemonchus contortus* y *Bunostomum trigonocephalum* (Gupta & Trivedi, 1986), en adultos y estados larvarios de *Trichinella spiralis* (Castro & Roy, 1974), en *Brugia malayi* y *O. volvulus* (Pellerone *et al.*, 2003), en larvas L3 y L4 de *A. simplex* (Lopienska-Biernat *et al.*, 2007), y en *Hysterothylacium aduncum* (Zoltowska *et al.*, 2002). En *A. suum*, helminto donde más se ha estudiado esta enzima, se ha confirmado su presencia en todos los tejidos del parásito, excepto en la hemolinfa (Fukushima, 1967). En los trabajos de Lopienska-Biernat *et al.* (2007), se demostró que la presencia de la Trehalasa era mayor en larvas L3 que en larvas L4 de *A. simplex*, lo que indica que esta enzima puede participar en la toma de azúcares del hospedador a través de la cutícula del parásito.

Las proteasas aspárticas son un grupo de enzimas proteolíticas, que incluyen pepsinas, reninas, catepsinas (D y E) y quimiosinas, y que están presentes en

multitud de organismos, desde retrovirus hasta humanos (Szecsi, 1992). Todas las proteasas aspárticas se caracterizan por la presencia de un residuo del aminoácido ácido aspártico en el sitio activo de la enzima. Se ha demostrado, que las proteasas aspárticas de parásitos son capaces de digerir la hemoglobina de su hospedador, proteínas del suero, así como macromoléculas de la epidermis, por lo tanto deben ser importantes en la penetración activa de éstos a través de la piel del hospedador. Este hecho, hace que sean consideradas buenos antígenos para el desarrollo de vacunas frente a helmintos y excelentes dianas para el tratamiento de las enfermedades parasitarias (Loukas, 2005; Hotez *et al.*, 2010). Se han caracterizado proteasas aspárticas de algunos helmintos como *A. caninum* (Harrop *et al.*, 1996), *H. contortus* (Longbottom *et al.*, 1997), *O. volvulus* (Jolodar & Miller, 1997), la Catepsina D de *C. elegans* (Tcherepanova *et al.*, 2000), *O. viverrini* (Suttiyapra *et al.*, 2009), *Uncinaria stenocephala* (Wasył *et al.*, 2013) y de *S. stercoralis* (Gallego *et al.*, 1998). Además también se han identificado proteasas en productos de E/S de otros helmintos parásitos como *O. felineus* (L'vova *et al.*, 2014 y *A. caninum* (Mulvenna *et al.*, 2009;).

Las aminopeptidasas son enzimas proteolíticas que hidrolizan aminoácidos aminoterminales de las proteínas produciendo péptidos más pequeños y aminoácidos libres. Están presentes en una gran variedad de seres vivos, desde plantas a mamíferos, y se localizan tanto en el interior de orgánulos como en citoplasma e incluso formando parte de las membranas celulares. En helmintos se han identificado algunos tipos de aminopeptidasas en materiales de E/S, procedentes de oncosferas de *T. saginata* (White *et al.*, 1996), en *F. hepatica* (Costa *et al.*, 1998), *B. malayi* (Hewitson *et al.*, 2008) y *O. felineus* (L'vova *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que algunas aminopeptidasas, como la Leucina aminopeptidasa (LAP) de *F. hepatica* son altamente inmunogénicas. Precisamente, la proteína recombinante LAP de *F. hepatica* mostró una fuerte reacción frente a sueros de pacientes con fascioliasis, lo cual sugiere que este tipo de proteínas pueden resultar útiles en diagnóstico de enfermedades parasitarias (Marcilla *et al.*, 2008). Como se comentó en resultados, la proteína



recombinante presentó escasa solubilidad, acumulándose en cuerpos de inclusión en *E. coli*. Precisamente esta característica podría ser ventajosa en ensayos de vacunación, como muy recientemente se ha descrito para una aminopeptidasa de *F. hepatica* (Rivera & Espino, 2016).

### **5.2 Sobre el uso de proteínas recombinantes para el desarrollo de nuevos sistemas diagnósticos**

Una vez analizadas y seleccionadas las secuencias de RNA de los transcritos más abundantes en la larva L3i, se clonaron los fragmentos de DNA codificantes para las proteínas mencionadas en el vector de expresión correspondiente. Ello permitió en primer lugar confirmar las secuencias completas para los fragmentos clonados y depositarlas en bases de datos tal y como se indica en el apartado de Resultados.

Posteriormente a la transformación de las bacterias con las construcciones plasmídicas, se indujo su expresión en distintas cepas de *E. coli* obteniéndose resultados similares de expresión en todas las cepas bacterianas empleadas tal y como se explica en el apartado de Resultados. Se logró obtener con éxito fragmentos de 5 de estas proteínas de forma recombinante: Antígeno principal-*major antigen*, 14-3-3 zeta, Aminopeptidasa sensible a puromicina, Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4, mientras que no se consiguió que el resto de proteínas clonadas fueran producidas por las bacterias en cantidad suficiente para su posterior purificación. En este último caso, se probaron diferentes condiciones de inducción de la producción de las proteínas (temperatura, concentración IPTG, tiempos de incubación del cultivo de bacterias), pero no se logró que fueran producidas en cantidad suficiente. Esto pudo deberse a que las proteínas resultaran tóxicas para las bacterias o bien que fuesen inestables al ser sintetizadas (Guevara-Hernández *et al.*, 2013). En un futuro se podría intentar clonar estas proteínas utilizando otro tipo de vector o bien recurrir a diferentes sistemas de expresión de proteínas como levaduras, células de insecto o células de mamífero. En cualquier caso, disponíamos de 5

proteínas recombinantes para determinar su utilidad para el desarrollo de un test diagnóstico rápido para la estrongiloidiasis.

Para ensayar los 5 fragmentos proteicos expresados se utilizó una batería de sueros pertenecientes a pacientes positivos a la enfermedad y que habían sido diagnosticados mediante cultivo en placa de agar en los centros hospitalarios que gentilmente facilitaron los sueros. En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos preliminares de *Slot blot*, y posteriormente ensayos ELISA y *Western blot* (Apartado 4.6), para evaluar la capacidad antigénica de las proteínas recombinantes frente a *pools* de sueros de pacientes positivos y negativos a la enfermedad, todos ellos de personas residentes en la comarca de La Safor. Se realizaron ensayos a concentraciones crecientes de las proteínas recombinantes obtenidas, así como utilizando diferentes diluciones tanto de anticuerpo primario como secundario. A pesar de todos los esfuerzos realizados, en ningún caso se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas respecto al reconocimiento de los *pools* sueros de pacientes sanos y frente a los obtenidos de enfermos, y eso para todas las proteínas recombinantes analizadas. De hecho, la señal obtenida fue bastante leve, lo que parece indicar baja antigenicidad por parte de las proteínas recombinantes testadas en nuestros ensayos. Esto puede ser debido a que las regiones de las proteínas recombinantes obtenidas en el laboratorio no generen una reacción inmunológica fuerte al enfrentarlas con sueros de pacientes crónicos por ser poco reconocidas en esta fase de la enfermedad. Los sueros con los que se ha trabajado correspondían a pacientes crónicos con infecciones antiguas, lo cual puede implicar un descenso en la concentración de anticuerpos y por tanto respuestas inmunitarias débiles frente a antígenos de la fase larvaria del parásito. Esto deja abierta su posible aplicabilidad al análisis de personas con infecciones agudas.

A pesar de no haber obtenido buenos resultados respecto a la utilidad diagnóstica de las proteínas recombinantes obtenidas frente a sueros de pacientes con estrongiloidiasis, éstas podrían ser útiles con otros fines, tales



como ser dianas de tratamiento, o incluso para generar protección frente a la infección por este helminto.

En este contexto, experimentos realizados sobre la adquisición de inmunidad a la infección por *S. stercoralis* en ratones, se ha comprobado que la inmunización con larvas L3i ofrece un alto grado de protección frente a nuevas infecciones (Abraham *et al.* 1995). En otros estudios se han utilizado antígenos concretos, bien de *S. ratti* (Nouir *et al.*, 2012), bien de *S. stercoralis* (Herbert *et al.*, 2002; Abraham *et al.* 2011), para inmunizar a los ratones, obteniéndose también buenos resultados en ambos casos. Ello apoya su posible utilidad en el desarrollo de nuevas vacunas frente a la estrongiloidiasis. Tal sería el caso de la proteína 14-3-3, que ha sido descrita como inmunogénica, y de localización tegumentaria en larvas L3i (Marcilla *et al.*, 2010). Los estudios de inmunolocalización llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral confirman su ubicación en la superficie de larvas L3i del parásito (Figura 4.18). Además de *S. stercoralis*, esta proteína se ha documentado en otros parásitos cercanos evolutivamente (Wang, T. *et al.*, 2013), y muestra un alto grado de homología entre diferentes especies, ya que pertenece a un grupo de proteínas altamente conservadas. Por lo tanto, en este caso no solo podría ser buena candidata para su uso en inmunoprotección frente a la infección por *S. stercoralis*, sino también frente a nematodos en general, tal y como ha ocurrido con antígenos de otros nematodos gastrointestinales (Mohamed-Fawzi *et al.*, 2013).

### **5.3. Sobre la utilidad diagnóstica de los péptidos sintéticos obtenidos a partir de proteínas inmunogénicas de larvas L3i**

Con el fin de identificar nuevas dianas diagnósticas frente a la estrongiloidiasis, otra de las aproximaciones que se ha abordado en esta Tesis consistió en el uso de péptidos sintéticos. Precisamente, uno de los inconvenientes del uso de proteínas de gran tamaño, especialmente en el diagnóstico de helmintiasis, es la posibilidad de que se produzcan reacciones cruzadas debido a la presencia de epítomos comunes en dichas moléculas. El uso de péptidos sintéticos de

menor tamaño puede ayudar a solventar este problema seleccionando tan solo las regiones más específicas y antigénicas de una proteína concreta del parásito.

En los últimos años existe una tendencia creciente en el uso de péptidos sintéticos derivados de proteínas parasitarias como moléculas diagnósticas. La mayoría de los estudios llevados a cabo son relativos al diagnóstico de la cisticercosis/neurocisticercosis utilizando para ello péptidos derivados de proteínas, bien de fases adultas de *T. saginata*, (Ferrer *et al.*, 2003), o de la fase larvaria de oncosfera (Fleury *et al.*, 2003; Ferrer *et al.*, 2005), o bien derivados de proteínas antigénicas del propio cisticerco (Hell *et al.*, 2009).

También se han realizado ensayos con péptidos sintéticos con fines diagnósticos en el caso de filariasis (Pandiaraja *et al.*, 2010), de cestodos como *E. granulosus* (González-Sapienza *et al.*, 2000), y de trematodos como *S. mansoni* (Noya *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2008) y *F. gigantica* (Jezek *et al.*, 2008).

El uso de péptidos sintéticos también se ha aplicado en ensayos de inmunización para algunos helmintos como *S. mansoni* (Auriault *et al.*, 1991; Noya *et al.*, 2001) y *A. costaricensis* (Solano-Parada *et al.*, 2010).

A partir de las secuencias de proteínas que habían sido caracterizadas en nuestro laboratorio como antigénicas frente a sueros de pacientes positivos a estrogiloidiasis (Pérez-García, 2010), se sintetizaron un total de 9 péptidos (Tabla 3.3). Para ello se seleccionaron las zonas de la proteína que presentaran menor homología en su secuencia de aminoácidos con las de otros helmintos parásitos.

Para evaluar la capacidad diagnóstica de los 9 péptidos se realizaron ensayos ELISA utilizando sueros de pacientes con estrogiloidiasis procedentes de la zona endémica de la Comunidad Valenciana. Se obtuvieron buenos resultados en cuanto a sensibilidad (hasta del 93,75%) con 2 de los péptidos, MET1 y



TRO1, ya que fueron los péptidos reconocidos por un mayor número de sueros y generaron respuestas más intensas.

A tenor de estos buenos resultados, se evaluó la especificidad de los péptidos MET1 y TRO1 utilizando 61 sueros correspondientes a pacientes con otras helmintiasis, procedentes de otras zonas de endemia diferentes, y cedidos por el Servicio de Parasitología del Instituto de Salud Carlos III de Madrid. Dichos péptidos mostraron reactividad también con sueros de pacientes de esquistosomiasis. Una explicación que justifique la elevada reactividad cruzada entre ambas helmintiasis puede ser que al proceder estos pacientes de zonas tropicales y subtropicales donde ambos parásitos coexisten, estos pacientes hubieran padecido (o padeciesen en la actualidad) también estrongiloidiasis, y por tanto, presentarían anticuerpos frente a estos péptidos en el suero.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Feliciano *et al.* (2014), quienes usaron péptidos fusionados a virus bacteriófagos para el diagnóstico de estrongiloidiasis humana, donde los 2 mejores péptidos presentaron valores de sensibilidad y especificidad del 85% y 77.5%, respectivamente. Dichos autores señalan como de gran importancia la capacidad de reconocimiento de estos péptidos por IgG de los pacientes y su posible uso como biomarcadores en ensayos diagnósticos de rutina (Feliciano *et al.*, 2014). En este contexto, los péptidos MET1 (correspondiente a Metaloproteasa) y TRO1 (de Tropomiosina), podrían asimismo considerarse como potenciales biomarcadores de infección por *S. stercoralis*. Futuros estudios con mayor número de muestras, y no solo de suero, podrían confirmar esta posibilidad.

#### **5.4. Sobre la producción de anticuerpos policlonales y su utilización como herramienta diagnóstica**

Como abordaje complementario, otro de los objetivos de este trabajo fue el de explorar la posibilidad de generar nuevos sistemas de diagnóstico basados en la detección de antígenos en muestras biológicas. Para ello se obtuvieron anticuerpos policlonales en conejos frente a alguna de las proteínas

recombinantes obtenidas en el presente trabajo. Así se obtuvieron y purificaron anticuerpos policlonales frente a las proteínas recombinantes 14-3-3 zeta, Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4.

Dichos anticuerpos mostraron diferentes resultados en cuanto especificidad cuando fueron evaluados frente a lisados totales de los helmintos parásitos *F. hepatica*, *T. canis*, y *Anisakis* sp. (Figura 4.17).

Solo uno de los anticuerpos generados, el obtenido frente a la proteína 14-3-3 zeta, reconoció una banda en lisados totales de proteínas de *Anisakis* sp., correspondiente probablemente a la proteína 14-3-3 de este parásito. No se dispone de la secuencia de esta proteína en *Anisakis* sp., pero sí que ha sido caracterizada en otros nematodos y, en todos ellos el peso de la proteína se sitúa en los 30 KDa aproximadamente. Por lo tanto, el anticuerpo policlonal generado contra el fragmento clonado de la proteína de *S. stercoralis*, no resultaría útil para su uso en diagnóstico cuando se sospeche infección por helmintos como *Anisakis* sp. Como se ha comentado anteriormente en este trabajo, la proteína 14-3-3 pertenece a una familia de proteínas bastante conservadas entre distintos organismos por lo que, probablemente, el anticuerpo policlonal producido en el presente trabajo reconoció algún epítipo común entre ambos nematodos.

Por el contrario, los otros dos anticuerpos policlonales, anti-Ferritina 1 y anti-Proteasa aspártica 4 no mostraron reactividad cruzada con ninguna de las proteínas de los parásitos analizados, siendo específicos para los fragmentos de proteínas recombinantes respectivos, lo que sugiere que los anticuerpos producidos frente a estas dos proteínas de larvas L3i de *S. stercoralis* podrían resultar útiles para el diagnóstico de la estrongiloidiasis.

El no disponer de suficiente material parasitario de *S. stercoralis* nos ha impedido realizar nuevos estudios de sensibilidad con lisados del parásito, con la idea de la puesta a punto de un método diagnóstico basado en la detección de proteínas propias de larvas L3i, de una forma fiable y rápida en heces del paciente. Futuros ensayos nos permitirán abordar esta parte del estudio.



Como prueba de concepto, se realizaron ensayos preliminares tipo ELISA de captura de inmunocomplejos en suero utilizando dichos anticuerpos. Para ello se emplearon los mismos sueros de pacientes autóctonos que en experimentos previos (Apartado 3.2.2). Dichos ensayos se realizaron de manera similar a los descritos muy recientemente por Levenhagen *et al.* (2015), en los que utilizó una fracción de inmunoglobulinas frente a la proteína HSP60 de *Strongyloides* sp. Aunque los primeros resultados no han sido muy satisfactorios, se espera mejorar dichos ensayos en un futuro cercano. Una vez se hayan puesto a punto en suero se podrán realizar ensayos con muestras fecales.

### **5.5. Sobre la localización *in situ* en larvas L3i de las proteínas estudiadas**

Utilizando los anticuerpos policlonales generados en el presente trabajo se realizaron ensayos de inmunolocalización mediante microscopía láser confocal de las proteínas nativas 14.3.3, Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4, en cortes histológicos de larvas L3i de *S. stercoralis*. La localización de las proteínas en las larvas puede resultar muy interesante de cara a su uso en el desarrollo de sistemas diagnósticos o terapéuticos, ya que las proteínas ubicadas en la superficie del parásito resultan candidatas ideales para estos fines por su accesibilidad. Para ello se siguió el protocolo establecido en el laboratorio de Parasitología para este tipo de ensayos. En este contexto existen muy pocos trabajos publicados; de hecho en uno de estos estudios, Abraham *et al.* (2011) realizaron ensayos de inmunolocalización del antígeno de *S. stercoralis* Ss-IR, pero en este caso utilizaron larvas enteras y no cortes de las mismas. En nuestro caso se optó por realizar cortes para poder no solo analizar la superficie parasitaria, sino también comprobar si las proteínas estaban siendo producidas y exportadas desde regiones del interior de la larva. Como se indicó en el apartado 4.8, se pudo localizar las tres proteínas en los cortes de larvas L3i tanto en superficie como en estructuras internas de las mismas, confirmando la utilidad de los anticuerpos en este tipo de técnicas.

No existen estudios previos en la literatura sobre localización en cortes de larvas de *S. stercoralis* de ninguna de las proteínas con las que se ha trabajado en la presente Tesis Doctoral. No obstante, sí que existen algunos trabajos publicados sobre la localización de proteínas homólogas a las analizadas en la presente memoria en otros nematodos relacionados. La proteína mejor estudiada en este contexto es la 14-3-3, con la que se han llevado a cabo estudios previos de inmunolocalización en otros helmintos como *C. sinensis*, donde se determinó que estaba extensamente distribuida en el adulto, especialmente por la superficie parasitaria y la ventosa, así como en la pared de la metacercaria (Wang *et al.*, 2012). Liu *et al.* (2003) llevaron a cabo ensayos de inmunolocalización de esta proteína en cercarias y adultos de *S. japonicum*, localizándola principalmente en tegumento, subtegumento, músculo y parénquima en ambas fases evolutivas. Similares fueron los resultados obtenidos por Schechtman *et al.* (2001), encontrando esta proteína igualmente distribuida en tegumento de adultos de *S. mansoni*, y también en el tracto reproductor femenino de este parásito. Todos estos estudios coinciden con los resultados obtenidos en la presente Tesis, ya que se confirmó la presencia de la proteína 14-3-3 en zonas tanto de la superficie como en regiones internas de la larva.

Sobre la localización de proteasas aspárticas en vermes, Jolodar *et al.* (2004), realizaron ensayos de inmunolocalización de una Catepsina D, en los que se observó marcaje en el interior de lisosomas situados en la hipodermis y epitelio del intestino y tracto reproductor en *O. volvulus*. En ese mismo trabajo se demostró la presencia de esta proteasa en oocitos maduros mientras que en los oocitos inmaduros no hubo señal positiva. En nuestros experimentos se confirmó la presencia de la proteína Proteasa aspártica en larvas L3i de *S. stercoralis*, localizándose dicha proteína en el interior y en la superficie larvaria. Además, también aparecieron acúmulos de marcaje fluorescente correspondiente a la detección de la proteína en la región próxima a uno de los extremos de la larva, lo que sugiere que se podría estar liberando esta proteína al medio externo como productos de E/S.



No hay estudios publicados relativos a la localización de la Ferritina en helmintos, de modo que nuestros estudios, en los que se ha confirmado la presencia de la proteína en la larva L3i, son pioneros en este aspecto.

Como se ha comentado a lo largo del presente trabajo, una de las principales dificultades con las que nos hemos enfrentado en el desarrollo de los experimentos, fue la de obtener suficiente material parasitario. Sería interesante llevar a cabo estudios comparativos sobre la localización de estas proteínas en distintas fases evolutivas del parásito. Del mismo modo, se podría también analizar los datos de expresión de genes obtenidos tanto de larvas L3i (Marcilla *et al.* 2012), como de otras fases evolutivas del parásito en colaboración con Viney *et al.*, y compararlos con los datos de proteómica, y confirmar si finalmente existe correspondencia entre el número de copias de mRNA de los transcritos correspondientes con la presencia real de dichas proteínas en helmintos.

### **5.6. Sobre el estudio morfológico de la superficie de la larva L3i**

Las técnicas de microscopía electrónica son una herramienta muy útil que no solo puede ayudarnos a conocer mejor la morfología externa (mediante barrido, o SEM), sino que además también es aplicable para estudios ultraestructurales (transmisión, TEM), e incluso para localizar las proteínas presentes en estructuras concretas (técnicas inmunohistoquímicas).

Son escasos los trabajos publicados hasta la fecha en los que se hayan utilizado técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) con el fin de estudiar la superficie y estructuras de *S. stercoralis*, tal vez debido a las dificultades tanto de obtención de materiales parasitarios, como de su manipulación (Arizono, 1976; Sakamoto *et al.*, 1981; Viney *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 2007). Sato *et al.* (2008) utilizaron SEM para comparar la anatomía del estoma de la región apical en hembras adultas parásitas de 8 especies del género *Strongyloides* (*S. robustus*, *S. callosciureus*, *S. planiceps*, *S. papillosus* y *S. myopotami*, *S. procyonis*, *S. martis* y *S. ransomi*).

En otros trabajos se ha utilizado microscopía electrónica de transmisión (TEM) para estudiar la penetración de larvas infectivas de *S. ratti* a través de la piel de su hospedador (Grove *et al.*, 1987). Dionisio *et al.* (2000), utilizando también TEM, realizaron un estudio ultraestructural de larvas de *S. stercoralis* recién eclosionadas en el interior del intestino del hospedador. La técnica de TEM se ha utilizado también para la inmunolocalización de diversas proteínas marcadas en cortes ultrafinos de helmintos (Cohen *et al.*, 2002; Bogitsh *et al.*, 2001). En este contexto, en cuanto se disponga de materiales parasitarios, se pretende realizar estudios utilizando TEM con los anticuerpos disponibles y marcados con oro coloidal, que pueden ayudar a realizar una localización ultraestructural de las proteínas de *S. stercoralis* con las que se ha trabajado en esta Tesis y, al igual que se mencionó en los ensayos de localización mediante microscopía láser confocal, podría compararse la producción y localización de las proteínas en diferentes fases del ciclo de vida del parásito.

En nuestro conocimiento no se han publicado estudios de SEM sobre larvas L3i de *S. stercoralis*, constituyendo el presente trabajo la primera aportación de este tipo de estudios. En el caso de *S. ratti*, Sakura & Uga (2010), confirmaron mediante ensayos SEM como la larva L3s es capaz de penetrar la piel del hospedador muy rápidamente.

Nuestros resultados mediante SEM han puesto de manifiesto que la técnica de preparación utilizada, mediante punto crítico, permite la adecuada preservación sin artefactos de las larvas L3 de *S. stercoralis*. Dicha técnica ya ha sido utilizada con éxito en estudios de larvas de otros nematodos como *Meloidogyne incognita*, confirmando su buena prestancia comparada con el uso de fijadores químicos como glutaraldehído, formaldehído, tanto solos o junto a alcoholes (Eisenback, 1986).

Los ensayos realizados han permitido identificar las estructuras típicas presentes en los helmintos del grupo Phasmidia previamente puestas de manifiesto en otras especies relacionadas, así como la presencia de campos laterales y de papilas a lo largo de la superficie de las larvas L3.



## ***6. Conclusiones***



**Primera:**

Se han producido péptidos sintéticos correspondientes a proteínas de *S. stercoralis*, donde dos de ellos TRO1 y MET1, correspondientes a regiones de las proteínas Tropomiosina y Metaloproteasa, respectivamente, pudieran tener utilidad en el diagnóstico de la estrogiloidiasis humana a partir de muestras de suero de pacientes.

**Segunda:**

Se ha confirmado la mayor abundancia de los mRNA codificantes para las proteínas Antígeno principal-*major antigen*, Trehalasa, 14-3-3 zeta, Catepsina L y Ferritina 1, en la fase larvaria L3i de *S. stercoralis* que en otras fases evolutivas del parásito.

**Tercera:**

Los fragmentos recombinantes producidos a partir de cinco de las proteínas de *S. stercoralis* correspondientes a los transcritos más abundantes: Antígeno principal-*major antigen*, 14-3-3 zeta, Aminopeptidasa sensible a puromicina, Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4, no han mostrado utilidad diagnóstica frente a la estrogiloidiasis humana en ensayos de detección de anticuerpos específicos en sueros de pacientes.

**Cuarta:**

Se han generado anticuerpos policlonales frente a dos de fragmentos proteicos, correspondientes a Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4, que han mostrado alta especificidad en ensayos inmunoenzimáticos, por lo que podrían ser buenos candidatos para su uso en ensayos de detección de antígenos en pacientes de estrogiloidiasis.

**Quinta:**

Se ha generado un tercer anticuerpo policlonal, frente a la proteína 14-3-3 zeta, que ha mostrado reactividad cruzada con la proteína 14-3-3 de *Anisakis* sp., pudiendo presentar aplicabilidad para el diagnóstico de anisakiasis cuando la infección por *S. stercoralis* haya sido descartada.

**Sexta:**

Se han localizado las proteínas 14-3-3 zeta, Ferritina 1 y Proteasa aspártica 4 en zonas próximas a la superficie y en estructuras del interior de larvas L3i de *S. stercoralis* utilizando los anticuerpos policlonales obtenidos. Dichos anticuerpos constituyen una buena herramienta para el estudio de dichas moléculas.

**Séptima:**

Se han realizado, que sepamos, los primeros estudios de larvas L3i mediante microscopía electrónica de barrido, mostrando la utilidad de la técnica empleada para no alterar el material parasitario y permitir la identificación de estructuras características de las mismas.

## ***7. Bibliografía***



Abanyie, F.A., Gray, E.B., Delli Carpini, K.W., Yanofsky, A., McAuliffe, I., Rana, M., Chin-Hong, P.V., Barone, C.N., Davis, J.L., Montgomery, S.P. & Huprikar, S. 2015, "**Donor-derived *Strongyloides stercoralis* infection in solid organ transplant recipients in the United States, 2009-2013**", American Journal of Transplantation, vol. 15, pp. 1369-1375.

Abdul-Fattah, M.M., Nasr, M.E., Yousef, S.M., Ibraheem, M.I., Abdul-Wahhab, S.E. & Soliman, H.M. 1995, "**Efficacy of ELISA in diagnosis of strongyloidiasis among the immune-compromised patients**", Journal of the Egyptian Society of Parasitology, vol. 25, pp. 491-498.

Abraham, D., Rotman, H.L., Haberstroh, H.F., Yutanawiboonchai, W., Brigandi, R.A., Leon, O., Nolan, T.J. & Schad, G.A. 1995, "***Strongyloides stercoralis*: protective immunity to third-stage larvae in BALB/cByJ mice**", Experimental Parasitology, vol. 80, pp. 297-307.

Abraham, D., Hess, J.A., Mejía, R., Nolan, T.J., Lok, J.B., Lustigman, S. & Nutman, T.B. 2011, "**Immunization with the recombinant antigen Ss-IR induces protective immunity to infection with *Strongyloides stercoralis* in mice**", Vaccine, vol. 29, pp. 8134-8140.

Agarwala, R., Wasielewski, J. & Biman, B. 2014, "**Pulmonary strongyloidiasis following renal transplantation without travel to an endemic area**", Oxford Medical Case Reports, vol. 7, pp. 83-85.

Ahmad, A.F., Hadip, F., Ngui, R., Lim, Y.A. & Mahmud, R. 2013, "**Serological and molecular detection of *Strongyloides stercoralis* infection among an Orang Asli community in Malaysia**", Parasitology Research, vol. 112, pp. 2811-2816.

Alcaraz, C.O., Adell, R.I., Sánchez, P.S., Blasco, M.J.V., Sánchez, O.A., Auñón, A.S. & Rodríguez-Calabuig, D.. 2004, "**Characteristics and geographical profile of strongyloidiasis in healthcare area 11 of the Valencian community (Spain)**", Journal of Infection, vol. 49, pp. 152-158.

Alsharif, A., Sodhi, A., Murillo, L.C., Headley, A.S. & Kadaria, D. 2015, "**Wait!!! no steroids for this asthma...**", The American Journal of Case Reports, vol. 16, pp. 398-400.

Arakaki, T., Iwanaga, M., Kinjo, F., Saito, A., Asato, R. & Ikeshiro, T. 1990, "**Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection**", The Journal of Parasitology, vol. 76, pp. 425-428.

Arena, J.P., Liu, K.K., Pares, P.S., Frazier, E.G., Cully, D.F., Mrozik, H. & Schaeffer, J.M. 1995, "**The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity**", The Journal of Parasitology, vol. 81, pp. 286-294.

Arizono, N. 1976, "***Thelazia callipaeda* from man and dogs in Kyoto and its scanning electron microscopy**", Japanese Journal of Parasitology, vol. 25, pp. 402-408.

Assefa, S., Erko, B., Medhin, G., Assefa, Z. & Shimelis, T. 2009, "**Intestinal parasitic infections in relation to HIV/AIDS status, diarrhea and CD4 T-cell count**", BMC Infectious Diseases, vol. 9, pp. 155.

Auriault, C., Wolowczuk, I., Gras-Masse, H., Marguerite, M., Boulanger, D., Capron, A. & Tartar, A. 1991, "**Epitopic characterization and vaccinal potential of peptides derived from a major antigen of *Schistosoma mansoni* (Sm28 GST)**", Peptide Research, vol. 4, pp. 6-11.

Baermann, G. 1917, "**Eine einfache methode zur auffindung von ankylostomum (Nematoden) larven in erdproben**", Geneeskunding Tijdschrift voor Nederlandsch-Indië, vol. 57, pp. 131-137.

Bailey, K.E., Danylo, A. & Boggild, A.K. 2015, "**Chronic *larva currens* following tourist travel to the Gambia and Southeast Asia over 20 years ago**", Journal of Cutaneous Medicine and Surgery, vol. 19, pp. 412-415.

Bavay, A. 1876, "**Sur l'*Anguillule stercorale***", Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, pp. 694-696.

Bavay, A. 1877, "**Sur l'*Anguillule intestinale (Anguillula intestinalis)*, nouveau ver nématode, trouvé par le Dr. Normand chez les malades atteints de diarrhée de Cochinchine**", Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, pp. 266-268.

Becker, S.L., Piraisoody, N., Kramme, S., Marti, H., Silue, K.D., Panning, M., Nickel, B., Kern, W.V., Herrmann, M., Hatz, C.F., N'Goran, E.K., Utzinger, J. & von Muller, L. 2015, "**Real-time PCR for detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool samples from Cote d'Ivoire: Diagnostic accuracy, inter-laboratory comparison and patterns of hookworm co-infection**", Acta Tropica, vol. 150, pp. 210-217.

Behm, C.A. 1997, "**The role of trehalose in the physiology of nematodes**", International Journal for Parasitology, vol. 27, pp. 215-229.

Benítez, L., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M.E. & Gárate, T. 1996, "**Sequence and immunogenicity of *Taenia saginata* Ferritin**", Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 82, pp. 113-116.

Bennuru, S., Semnani, R., Meng, Z., Ribeiro, J.M., Veenstra, T.D. & Nutman, T.B. 2009, "***Brugia malayi* excreted/secreted proteins at the host/parasite interface: stage- and gender-specific proteomic profiling**", PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 3, pp. e410.

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, vol. 6, pp. 2835-2843.

Bethony, J.M., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S.M., Loukas, A., Diemert, D. & Hotez, P.J. 2006, "**Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm**", The Lancet, vol. 367, pp. 1521-1532.

Biggs, B.A., Caruana, S., Mirhshahi, S., Jolley, D., Leydon, J., Chea, L. & Nuon, S. 2009, "**Management of chronic strongyloidiasis in immigrants and refugees: is serologic testing useful?**", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 80, pp. 788-791.

Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Angheben, A., Boscolo, M., Anselmi, M., Marocco, S., Monteiro, G., Gobbo, M., Bisoffi, G. & Gobbi, F. 2011, "**Randomized clinical trial on ivermectin versus thiabendazole for the treatment of strongyloidiasis**", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, pp. e1254.

Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Montresor, A., Requena-Méndez, A., Muñoz, J., Krolewiecki, A.J., Gotuzzo, E., Mena, M.A., Chiodini, P.L. & Anselmi, M. 2013, "***Strongyloides stercoralis*: a plea for action**", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, pp. e2214.

Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R.O., Krolewiecki, A.J., Albonico, M., Gobbo, M., Bonafini, S., Angheben, A., Requena-Mendez, A., Munoz, J. & Nutman, T.B. 2014, "**Diagnostic accuracy of five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* infection**", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, pp. e2640.

Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T. & Thomas, W.K. 1998, "**A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda**", *Nature*, vol. 392, pp. 71-75.

Bogitsh, B.J., Dalton, J.P., Brady, C.P. & Brindley, P.J. 2001, "**Gut-associated immunolocalization of the *Schistosoma mansoni* cysteine proteases, SmCL1 and SmCL2**", *The Journal of Parasitology*, vol. 87, pp. 237-241.

Bond, J.S. & Butler, P.E. 1987, "**Intracellular proteases**", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 56, pp. 333-364.

Bosqui, L.R., Gonçalves, A.L., Gonçalves-Pires, M.D., Custodio, L.A., de Menezes, M.C., Murad, V.A., de Paula, F.M., Pavanelli, W.R., Conchon-Costa, I.,

Costa-Cruz, J.M. & Costa, I.N. 2015, "**Detection of parasite-specific IgG and IgA in paired serum and saliva samples for diagnosis of human strongyloidiasis in northern Parana state, Brazil**", *Acta Tropica*, vol. 150, pp. 190-195.

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*, vol. 72, pp. 248-254.

Britton, C. & Murray, L. 2002, "**A cathepsin L protease essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes**", *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 122, pp. 21-33.

Buonfrate, D., Mena, M.A., Angheben, A., Requena-Méndez, A., Muñoz, J., Gobbi, F., Albonico, M., Gotuzzo, E., Bisoffi, Z. & COHEMI Project Study Group 2015a, "**Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: a systematic review of the literature**", *Epidemiology and Infection*, vol. 143, pp. 452-460.

Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R.O., Krolewiecki, A.J., Albonico, M., Degani, M., Tais, S., Angheben, A., Requena-Mendez, A., Munoz, J., Nutman, T.B. & Bisoffi, Z. 2015b, "**Accuracy of five serologic tests for the follow up of *Strongyloides stercoralis* infection**", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 9, pp. e0003491.

Buonfrate, D., Formenti, F., Perandin, F. & Bisoffi, Z. 2015c, "**Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection**", *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 21, pp. 543-552.

Cabán-Hernández, K., Gaudier, J.F. & Espino, A.M. 2012, "**Characterization and differential expression of a ferritin protein from *Fasciola hepatica***", *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 182, pp. 54-61.

Cabán-Hernandez, K., Gaudier, J.F., Ruíz-Jiménez, C. & Espino, A.M. 2014, "**Development of two antibody detection enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of human chronic fascioliasis**", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 52, pp. 766-772.

 Bibliografía

Cabezas-Fernández, M.T., Salas-Coronas, J., Lozano-Serrano, A.B., Vázquez-Villegas, J., Cabeza-Barrera, M.I. & Cobo, F. 2015, "**Strongyloidiasis in immigrants in Southern Spain**", Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, vol. 33, pp. 37-39.

Campo-Polanco, L., Gutiérrez, L.A. & Cardona-Arias, J. 2014, "**Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: meta-analysis on evaluation of conventional parasitological methods (1980-2013)**", Revista Española de Salud Pública, vol. 88, pp. 581-600.

Carrada-Bravo, T. 2008, "***Strongyloides stercoralis***", Rev Mexicana de Patología Clínica, vol. 55, pp. 88-110.

Castro, G.A. & Roy, S.A. 1974, "**Disaccharides in the nutrition of *Trichinella spiralis***", The Journal of Parasitology, vol. 60, pp. 887-889.

Catalán, S.B., Albiach, J.C., García, A.M., Martínez, E.G., Teruel, J.G. & Mateu, L.P. 2009, "***Strongyloides stercoralis* infection in kidney transplant patients**", Nefrología, vol. 29, pp. 482-485.

Checkley, A.M., Chiodini, P.L., Dockrell, D.H., Bates, I., Thwaites, G.E., Booth, H.L., Brown, M., Wright, S.G., Grant, A.D. & Mabey, D.C. 2010, "**Eosinophilia in returning travellers and migrants from the tropics: UK recommendations for investigation and initial management**", Journal of Infection, vol. 60, pp. 1-20.

Cheong, C.U., Gau, S.J. & Lai, C.C. 2014, "***Strongyloides stercoralis* in sputum**", QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians, vol. 107, pp. 235-236.

Cohen, M., Tzur, Y.B., Neufeld, E., Feinstein, N., Delannoy, M.R., Wilson, K.L. & Gruenbaum, Y. 2002, "**Transmission electron microscope studies of the nuclear envelope in *Caenorhabditis elegans* embryos**", Journal of Structural Biology, vol. 140, pp. 232-240.

Concha, R., Harrington Jr, W. & Rogers, A.I. 2005, "**Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome**", Journal of Clinical Gastroenterology, vol. 39, pp. 203-211.

Corti, M., Villafane, M.F., Trione, N., Risso, D., Abuin, J.C. & Palmieri, O. 2011, "**Infection due to *Strongyloides stercoralis*: epidemiological, clinical, diagnosis findings and outcome in 30 patients**", Revista chilena de infectología, vol. 28, pp. 217-222.

Costa, D., Goñi, F. & Carmona, C. 1998, "**Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica***", The Journal of Parasitology, vol. 84, pp. 1-7.

Crump, A. & Omura, S. 2011, "**Ivermectin, 'wonder drug' from Japan: the human use perspective**", Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences, vol. 87, pp. 13-28.

Cruz, R.J., Jr, Vincenzi, R. & Ketzer, B.M. 2010, "**Duodenal obstruction - an unusual presentation of *Strongyloides stercoralis* enteritis: a case report**", World Journal of Emergency Surgery: WJES, vol. 5, pp. 23-7922-5-23.

da Silva, H., de Carvalho, Célio José Victal, Levenhagen, M.A. & Costa-Cruz, J.M. 2014, "**The detergent fraction is effective in the detection of IgG anti-*Strongyloides stercoralis* in serum samples from immunocompromised individuals**", Parasitology International, vol. 63, no. 6, pp. 790-793.

Datry, A., Hilmarisdottir, I., Mayorga-Sagastume, R., Lyagoubi, M., Gaxotte, P., Biligui, S., Chodakewitz, J., Neu, D., Danis, M. & Gentilini, M. 1994, "**Treatment of *Strongyloides stercoralis* infection with ivermectin compared with albendazole: results of an open study of 60 cases**", Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 88, pp. 344-345.

de Jesus Inês, E., Silva, M.L.S., Souza, J.N., Teixeira, M.C.A. & Soares, N.M. 2013, "**The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides***

**stercoralis infection**", Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, vol. 76, pp. 31-35.

de Oliveira, E.J., Kanamura, H.Y., Takei, K., Hirata, R.D.C., Valli, L.C.P., Nguyen, N.Y., de Carvalho Rodrigues, I., de Jesus, A.R. & Hirata, M.H. 2008, "**Synthetic peptides as an antigenic base in an ELISA for laboratory diagnosis of schistosomiasis *mansoni***", Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 102, pp. 360-366.

de Paula, F.M., Malta Fde, M., Marques, P.D., Sitta, R.B., Pinho, J.R., Gryscek, R.C. & Chieffi, P.P. 2015, "**Molecular diagnosis of strongyloidiasis in tropical areas: a comparison of conventional and real-time polymerase chain reaction with parasitological methods**", Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 110, pp. 272-274.

Dietzel, J., Hirzmann, J., Preis, D., Symmons, P. & Kunz, W. 1992, "**Ferritins of *Schistosoma mansoni*: sequence comparison and expression in female and male worms**", Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 50, pp. 245-254.

Dionisio, D., Manneschi, L.I., di Lollo, S., Orsi, A., Tani, A., Papucci, A., Esperti, F. & Leoncini, F. 2000, "***Strongyloides stercoralis*: ultrastructural study of newly hatched larvae within human duodenal mucosa**", Journal of Clinical Pathology, vol. 53, pp. 110-116.

Dmitryjuk, M. & Zoltowska, K. 2004, "**Trehalose catabolism enzymes in tissues of *Ascaris suum* (Nematoda)**", Helminthologia, vol. 41, pp. 63-66.

Donadello, K., Cristallini, S., Taccone, F.S., Lorent, S., Vincent, J., De Backer, D. & Jacobs, F. 2013, "***Strongyloides* disseminated infection successfully treated with parenteral ivermectin: case report with drug concentration measurements and review of the literature**", International Journal of Antimicrobial Agents, vol. 42, pp. 580-583.

Dorris, M., Viney, M.E. & Blaxter, M.L. 2002, "**Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes**", International Journal for Parasitology, vol. 32, pp. 1507-1517.

Dreyer, G., Fernandes-Silva, E., Alves, S., Rocha, A., Albuquerque, R. & Addiss, D. 1996, "**Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials**", Journal of Clinical Microbiology, vol. 34, pp. 2569-2571.

Edaye, S. & Georges, E. 2015, "**Characterization of native PfABCG protein in *Plasmodium falciparum***", Biochemical Pharmacology, vol. 97, pp. 137-146.

Eisenback, J.D. 1986, "**A comparison of techniques useful for preparing nematodes for scanning electron microscopy**", Journal of Nematology, vol. 18, pp. 479-487.

El-Badry, A.A. 2009, "**ELISA-based coproantigen in human strongyloidiasis: a diagnostic method correlating with worm burden**", Journal of the Egyptian Society of Parasitology, vol. 39, pp. 757-768.

Ersfeld, K. & Craig, P.S. 1995, "**Cloning and immunological characterisation of *Echinococcus granulosus* ferritin**", Parasitology Research, vol. 81, pp. 382-387.

Fardet, L., Génereau, T., Poirot, J., Guidet, B., Kettaneh, A. & Cabane, J. 2007, "**Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients: case series and literature review**", Journal of Infection, vol. 54, pp. 18-27.

Feliciano, N.D., da Silva Ribeiro, V., Santos, Fabiana de Almeida Araújo, Fujimura, P.T., Gonzaga, H.T., Goulart, L.R. & Costa-Cruz, J.M. 2014, "**Bacteriophage-fused peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis**", PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 5, e2792.

Ferreira, C.J., Silva, D.A., Almeida, P.H., Silva, L.S., Carvalho, V.P., Coutinho, A.F., Pinheiro, F.G., Maia, R.P., Silva Junior, G.B. & Oliveira, R.A. 2012, "**Fatal**

**disseminated strongyloidiasis after kidney transplantation**", Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, vol. 45, pp. 652-654.

Ferrer, E., Benítez, L., Foster-Cuevas, M., Bryce, D., Wamae, L., Onyango-Abuje, J., Gárate, T., Harrison, L. & Parkhouse, R. 2003, "**Taenia saginata derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis**", Veterinary Parasitology, vol. 111, pp. 83-94.

Ferrer, E., Cortéz, M.M., Cabrera, Z., Rojas, G., Dávila, I., de Noya, B.A., Pérez, H.A., Fernández, I., Romero, H.U. & Harrison, L.J. 2005, "**Oncospheral peptide-based ELISAs as potential seroepidemiological tools for Taenia solium cysticercosis/neurocysticercosis in Venezuela**", Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 99, pp. 568-576.

Fitzsimmons, C.M., Falcone, F.H. & Dunne, D.W. 2014, "**Helminth allergens, parasite-specific IgE, and its protective role in human immunity**", Frontiers in immunology, vol. 5, pp. 61.

Fleury, A., Beltrán, C., Ferrer, E., Gárate, T., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M.E., García, E., Fragoso, G., Costa-Cruz, J. & Biondi, G. 2003, "**Application of synthetic peptides to the diagnosis of neurocysticercosis**", Tropical Medicine & International Health, vol. 8, pp. 1124-1130.

Fukushima, T. 1967, "**Trehalase activity in Ascaris lumbricoides**", Japanese Journal of Medical Science & Biology, vol. 20, pp. 107-109.

Gallego, S.G., Slade, R.W. & Brindley, P.J. 1998, "**A cDNA encoding a pepsinogen-like, aspartic protease from the human roundworm parasite Strongyloides stercoralis**", Acta Tropica, vol. 71, pp. 17-26.

Gaus, B., Toberer, F., Kapaun, A. & Hartmann, M. 2011, "**Chronische Strongyloides stercoralis infektion**", Der Hautarzt, vol. 62, pp. 380-383.

Gentner, H.W. & Castro, G.A. 1974, "**Origin of intestinal disaccharidases of Ascaris suum**", Experimental parasitology, vol. 35, pp. 125-131.

Glanfield, A., McManus, D.P., Anderson, G.J. & Jones, M.K. 2007, "**Pumping iron: a potential target for novel therapeutics against schistosomes**", Trends in Parasitology, vol. 23, no. 12, pp. 583-588.

Gobert, G.N. & McManus, D.P. 2005, "**Update on paramyosin in parasitic worms**", Parasitology International, vol. 54, pp. 101-107.

Gonçalves, A.L., Rocha, C.A., Gonzaga, H.T., Goncalves-Pires Mdo, R., Ueta, M.T. & Costa-Cruz, J.M. 2012, "**Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females, and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis**", Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, vol. 72, pp. 79-84.

Gonzaga, H.T., Ribeiro, V.S., Feliciano, N.D., Manhani, M.N., Silva, D.A., Ueta, M.T. & Costa-Cruz, J.M. 2011, "**IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection**", Immunology Letters, vol. 139, pp. 87-92.

González, A., Gallo, M., Valls, M.E., Muñoz, J., Puyol, L., Pinazo, M.J., Mas, J. & Gascón, J. 2010, "**Clinical and epidemiological features of 33 imported *Strongyloides stercoralis* infections**", Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 104, pp. 613-616.

González-Sapienza, G., Lorenzo, C. & Nieto, A. 2000, "**Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B**", Journal of Clinical Microbiology, vol. 38, pp. 3979-3983.

Gottardi, M., Paula, F.M., Corral, M.A., Meisel, D.M., Costa, S.F., Abdala, E., Pierrotti, L.C., Yamashiro, J., Chieffi, P.P. & Gryscek, R.C. 2015, "**Immunofluorescence assay for diagnosis of strongyloidiasis in immunocompromised patients**", Infectious Diseases (London, England), vol. 47, pp. 550-554.

Gotuzzo, E., Terashima, A., Álvarez, H., Tello, R., Infante, R., Watts, D.M. & Freedman, D.O. 1999, "***Strongyloides stercoralis* hyperinfection associated with human T cell lymphotropic virus type-1 infection in Perú**", The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 60, pp. 146-149.

Grassi, G.B. 1879, "***Sovra l'Anguillula intestinale***", Rendiconti del Reale Istituto Lombardo di Scienze e Lettere, Milano, second series, vol. 12, pp. 228-233.

Greaves, D., Coggle, S., Pollard, C., Aliyu, S.H. & Moore, E.M. 2013, "***Strongyloides stercoralis* infection**", British Medical Journal (Clinical research ed.), vol. 347, pp. f4610.

Grove, D.I., Warton, A., Northern, C. & Papadimitriou, J.M. 1987, "**Electron microscopical studies of *Strongyloides ratti* infective larvae: loss of the surface coat during skin penetration**", The Journal of Parasitology, vol. 73, pp. 1030-1034.

Grove, D.I. 1989, "**Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man**", Taylor and Francis Ltd, pp. 199–231.

Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutiérrez, L. & Sotelo-Mundo, R. 2013, "**Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial**", Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, vol. 15, pp. 8-17.

Gupta, S. & Trivedi, K. 1986, "**Biochemical studies on kinetic properties of trehalase in nematodes, *Bunostomum trigonocephalum* and *Haemonchus contortus* of veterinary importance**", International Journal of Helminthology, vol. 38, pp. 19-30.

Hamilton, K.W., Abt, P.L., Rosenbach, M.A., Bleicher, M.B., Levine, M.S., Mehta, J., Montgomery, S.P., Hasz, R.D., Bono, B.R., Tetzlaff, M.T., Mildiner-Early, S., Introcaso, C.E. & Blumberg, E.A. 2011, "**Donor-derived *Strongyloides stercoralis* infections in renal transplant recipients**", Transplantation, vol. 91, pp. 1019-1024.

- Hammond, M.P. & Robinson, R.D. 1994, "**Chromosome complement, gametogenesis, and development of *Strongyloides stercoralis***", *The Journal of Parasitology*, vol. 80, pp. 689-695.
- Hanahan, D. 1985, "**Techniques for transformation of *E. coli***", *DNA Cloning*, vol. 1, pp. 109-135.
- Harada, Y. & Mori, O. 1955, "**A new method for culturing hook worm**", *Yonago Acta Medica*, vol. 1, pp. 177-179.
- Harrop, S.A., Prociw, P. & Brindley, P.J. 1996, "**Acasep, a gene encoding a Cathepsin D-like aspartic protease from the hookworm *Ancylostoma caninum***", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 227, pp. 294-302.
- Hell, R., Amim, P., de Andrade, H., de Avila, R.M., Felicori, L., Oliveira, A., Oliveira, C., Nascimento, E., Tavares, C. & Granier, C. 2009, "**Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display**", *Clinical Immunology*, vol. 131, pp. 129-138.
- Herbert, D.R., Nolan, T.J., Schad, G.A., Lustigman, S. & Abraham, D. 2002, "**Immunoaffinity-isolated antigens induce protective immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice**", *Experimental Parasitology*, vol. 100, pp. 112-120.
- Hermeking, H. & Benzinger, A. 2006, "**14-3-3 proteins in cell cycle regulation**", *Seminars in Cancer Biology*, vol. 16, pp. 183-192.
- Hewitson, J.P., Hargus, Y.M., Curwen, R.S., Dowle, A.A., Atmadja, A.K., Ashton, P.D., Wilson, A. & Maizels, R.M. 2008, "**The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: proteomic profile of adult excretory-secretory products**", *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 160, pp. 8-21.
- Higón, M., Monteagudo, C., Fried, B., Esteban, J., 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*, vol. 135, pp. 1469-1477.

Hirata, T., Uchima, N., Kishimoto, K., Zaha, O., Kinjo, N., Hokama, A., Sakugawa, H., Kinjo, F. & Fujita, J. 2006, "**Impairment of host immune response against *Strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic virus type 1 infection**", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 74, pp. 246-249.

Hirata, T., Nakamura, H., Kinjo, N., Hokama, A., Kinjo, F., Yamane, N. & Fujita, J. 2007, "**Prevalence of *Blastocystis hominis* and *Strongyloides stercoralis* infection in Okinawa, Japan**", *Parasitology Research*, vol. 101, pp. 1717-1719.

Hoffman W.A., Pons J.A., Janer J. 1934, "**Sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni***" *Puerto Rican Journal of Publican Health Tropical Medicine*, vol. 9, pp. 283-289.

Hotez, P.J., Bethony, J.M., Diemert, D.J., Pearson, M. & Loukas, A. 2010, "**Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis**", *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, pp. 814-826.

Hsu, C.N., Tseng, S.H., Chang, S.W. & Chen, Y. 2013, "***Strongyloides stercoralis* infection in an intestinal transplant recipient**", *Transplant Infectious Disease*, vol. 15, pp. e139-43.

Hu, F., Hu, X., Ma, C., Zhao, J., Xu, J. & Yu, X. 2009, "**Molecular characterization of a novel *Clonorchis sinensis* secretory phospholipase A 2 and investigation of its potential contribution to hepatic fibrosis**", *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 167, pp. 127-134.

Igual-Adell, R. & Domínguez-Márquez, V. 2007, "**Strongiloidiasis: epidemiología, manifestaciones clínicas y diagnóstico. Experiencia en una zona endémica: la comarca de La Safor (Valencia)**", *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 25, pp. 38-44.

Igual-Adell, R., Alcaraz, C.O., Soler-Company, E., Sánchez-Sánchez, P., Matogo-Oyana, J. & Rodríguez-Calabuig, D. 2004, "**Efficacy and safety of ivermectin and thiabendazole in the treatment of strongyloidiasis**", Expert Opinion on Pharmacotherapy, vol. 5, pp. 2615-2619.

Iriemenam, N.C., Sanyaolu, A.O., Oyibo, W.A. & Fagbenro-Beyioku, A.F. 2010, "***Strongyloides stercoralis* and the immune response**", Parasitology International, vol. 59, pp. 9-14.

Izquierdo, I., Briones, J., Lluch, R., Arqueros, C. & Martino, R. 2013, "**Fatal *Strongyloides* hyperinfection complicating a gram-negative sepsis after allogeneic stem cell transplantation: a case report and review of the literature**", Case Reports in Hematology, doi: 10.1155/2013/860976.

Jamil, S.A. & Hilton, E. 1992, "**The *Strongyloides* hyperinfection syndrome**", New York State Journal of Medicine, vol. 92, pp. 67-68.

Janssen, S., Rossatanga, E.G., Jurriaans, S., ten Berge, I.J. & Grobusch, M.P. 2013, "**Triple infection with HIV-1, HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*, rendering CD4+ T-cell counts a misleading entity**", Antiviral Therapy, vol. 18, pp. 949-951.

Jawaharlal, J.P.P., Ravishankaran, R., Shridharan, R.N., Lawrence, A.V., Karande, A.A. & Perumal, K. 2014, "**Evaluation of *Brugia malayi* sheath protein (Shp-1) as a diagnostic antigen for human lymphatic filariasis**", Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, vol. 78, pp. 249-254.

Jefferies, J.R., Campbell, A.M., van Rossum, A.J., Barrett, J. & Brophy, P.M. 2001, "**Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products**", Proteomics, vol. 1, pp. 1128-1132.

Jezek, J., Ridi, R.E., Salah, M., Wagih, A., Aziz, H.W., Tallima, H., El Shafie, M.H., Khalek, T.A., Abo Ammou, F.F. & Strongylis, C. 2008, "***Fasciola gigantica* cathepsin L proteinase-based synthetic peptide for immunodiagnosis and prevention of sheep fasciolosis**", Peptide Science, vol. 90, pp. 349-357.

Johnstone, R.M. 2005, "**Revisiting the road to the discovery of exosomes**", Blood Cells, Molecules, and Diseases, vol. 34, pp. 214-219.

Jolodar, A. & Miller, D.J. 1997, "**Preliminary characterisation of an *Onchocerca volvulus* aspartic protease**", International Journal for Parasitology, no. 9, pp. 1087-1090.

Jolodar, A., Fischer, P., Büttner, D.W., Miller, D.J., Schmetz, C. & Brattig, N.W. 2004, "***Onchocerca volvulus*: expression and immunolocalization of a nematode cathepsin D-like lysosomal aspartic protease**", Experimental Parasitology, vol. 107, no. 3, pp. 145-156.

Keiser, P.B. & Nutman, T.B. 2004, "***Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised Population**", Clinical Microbiology Reviews, vol. 17pp. 208-217.

Kelly, A., Little, M.D. & Voge, M. 1976, "***Strongyloides fuelleborni*-like infections in man in Papua New Guinea**", The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 25, pp. 694-699.

Kerepesi, L.A., Hess, J.A., Nolan, T.J., Schad, G.A. & Abraham, D. 2006, "**Complement component C3 is required for protective innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice**", Journal of Immunology, vol. 176, pp. 4315-4322.

Kim, T.Y., Joo, I.J., Kang, S., Cho, S. & Hong, S. 2002, "***Paragonimus westermani*: molecular cloning, expression, and characterization of a recombinant yolk ferritin**", Experimental Parasitology, vol. 102, pp. 194-200.

Kolaskar, A. & Tongaonkar, P.C. 1990, "**A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens**", FEBS Letters, vol. 276, pp. 172-174.

Krolewiecki, A.J., Ramanathan, R., Fink, V., McAuliffe, I., Cajal, S.P., Won, K., Juarez, M., Di Paolo, A., Tapia, L., Acosta, N., Lee, R., Lammie, P., Abraham, D.

& Nutman, T.B. 2010, "**Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using recombinant antigen-based serologies in a community-wide study in northern Argentina**", *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 17, pp. 1624-1630.

Kunst, H., Mack, D., Kon, O.M., Banerjee, A.K., Chiodini, P. & Grant, A. 2011, "**Parasitic infections of the lung: a guide for the respiratory physician**", *Thorax*, vol. 66, pp. 528-536.

Kyte, J. & Doolittle, R.F. 1982, "**A simple method for displaying the hydropathic character of a protein**", *Journal of Molecular Biology*, vol. 157, no. 1, pp. 105-132.

Laemmli, U.K. 1970, "**Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**", *Nature*, vol. 227, pp. 680-685.

Le, M., Ravin, K., Hasan, A., Clauss, H., Muchant, D.G., Pasko, J.K., Cipollina, G., Abanyie, F., Montgomery, S.P., Loy, M., Ahmed, M., Mathur, M., Chokkalingam Mani, B., Mehr, J., Kotru, A., Varma, C., Maksimak, M., Schultz, M., Obradovic, G., Alvarez, R., Toyoda, Y., Birkenbach, M., Brunner, E. & Nelson, J. 2014, "**Single donor-derived strongyloidiasis in three solid organ transplant recipients: case series and review of the literature**", *American Journal of Transplantation*, vol. 14, pp. 1199-1206.

Levenhagen, M.A. & Costa-Cruz, J.M. 2014, "**Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis**", *Acta Tropica*, vol. 135, pp. 33-43.

Levenhagen, M.A., Santos, Fabiana de Almeida Araújo, Fujimura, P.T., Caneiro, A.P., Costa-Cruz, J.M. & Goulart, L.R. 2015, "**Structural and functional characterization of a novel scFv anti-HSP60 of *Strongyloides* sp.**", *Scientific Reports*, vol. 5, doi:10.1038/srep10447

Li, Y., Huang, Y., Hu, X., Liu, X., Ma, C., Zhao, J., Wu, Z., Xu, J. & Yu, X. 2012, "**41.5-kDa cathepsin L protease from *Clonorchis sinensis*: expression,**

**characterization, and serological reactivity of one excretory–secretory antigen"**, *Parasitology Research*, vol. 111, pp. 673-680.

Little, M. 1966, "**Comparative morphology of six species of *Strongyloides (Nematoda)* and redefinition of the genus"**, *The Journal of Parasitology*, vol. 52, pp. 69-84.

Liu, F., Cui, S.J., Hu, W., Feng, Z., Wang, Z.Q. & Han, Z.G. 2009, "**Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum***", *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 8, pp. 1236-1251.

Liu, L.H., Zhao, J.Q., Jiang, B., Chen, C.Y., Wang, Y., Wang, Y.N., Wang, J., Wang, S.J. & Zhao, W. 2012, "**Preliminary study on the difference in immune protection between *Echinococcus granulosus* recombinant ferritin and recombinant mMDH"**, *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, vol. 30, pp. 206-209.

Liu, Q.Z., Shen, J.L. & Wang, X.L. 2003, "**Immunolocalization of the signaling protein 14-3-3 of *Schistosoma japonicum***", *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, vol. 21, pp. 330-332.

Liu, Y., Hong, Y., Zhang, M., Han, Q., Cao, X., Li, S., Lu, K., Li, H., Fu, Z. & Lin, J. 2015, "**Cloning, expression of gene SjOST48 from *Schistosoma japonicum* and evaluation of the immunoprotective efficacy of rSjOST48 in mice"**, *Chinese Journal of Biotechnology*, vol. 31, pp. 501-511.

Longbottom, D., Redmond, D.L., Russell, M., Liddell, S., Smith, W.D. & Knox, D.P. 1997, "**Molecular cloning and characterisation of a putative aspartate proteinase associated with a gut membrane protein complex from adult *Haemonchus contortus***", *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 88, pp. 63-72.

López, M., Pasquau, F., Zaragoza, A., Prieto, M., Berbegal, J. & Amador, C. 1990, "**Estrongiloidiasis *stercoralis*. Estudio de cinco casos**", Resúmenes del IV Congreso de la SEIMC, Madrid, Abstract E 4/9.

Lopienska-Biernat, E., Zoltowska, K. & Rokicki, J. 2007, "**Trehalose catabolism enzymes in L3 and L4 larvae of *Anisakis simplex***", The Journal of Parasitology, vol. 93, pp. 1291-1294.

Lorson, M.A., Horvitz, H.R. & van den Heuvel, S. 2000, "**LIN-5 is a novel component of the spindle apparatus required for chromosome segregation and cleavage plane specification in *Caenorhabditis elegans***", The Journal of Cell Biology, vol. 148, pp. 73-86.

Loukas, A., Bethony, J.M., Mendez, S., Fujiwara, R.T., Goud, G.N., Ranjit, N., Zhan, B., Jones, K., Bottazzi, M.E. & Hotez, P.J. 2005, "**Vaccination with recombinant aspartic hemoglobinase reduces parasite load and blood loss after hookworm infection in dogs**", PLoS Medicine, vol. 2, pp. 1008.

Ludolf, F., Patrocínio, P.R., Corrêa-Oliveira, R., Gazzinelli, A., Falcone, F.H., Teixeira-Ferreira, A., Perales, J., Oliveira, G.C. & Silva-Pereira, R.A. 2014, "**Serological screening of the *Schistosoma mansoni* adult worm proteome**", PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 8, pp. e2745.

Luvira, V., Watthanakulpanich, D. & Pittisuttithum, P. 2014, "**Management of *Strongyloides stercoralis*: a puzzling parasite**", International Health, vol. 6, pp. 273-281.

L'vova, M.N., Duzhak, T.G., Tsentalovich, I., Katokhin, A.V. & Mordvinov, V.A. 2014, "**Secretome of the adult liver fluke *Opisthorchis felineus***", Parazitologija, vol. 48, pp. 169-184.

MacGregor, A. & Shore, S.J. 1990, "**Immunocytochemistry of cytoskeletal proteins in adult *Schistosoma mansoni***", International Journal for Parasitology, vol. 20, pp. 279-284.

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*, vol. 117, pp. 57-64.

Marcilla, A., De la Rubia, J.E., Sotillo, J., Bernal, D., Carmona, C., Villavicencio, Z., Acosta, D., Tort, J., Bornay, F.J., Esteban, J.G. & Toledo, R. 2008, "**Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections**", *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 15, pp. 95-100.

Marcilla, A., Sotillo, J., Pérez-García, A., Igual-Adell, R., Valero, M.L., Sánchez-Pino, M.M., Bernal, D., Muñoz-Antolí, C., Trelis, M., Toledo, R. & Esteban, J.G. 2010, "**Proteomic analysis of *Strongyloides stercoralis* L3 larvae**", *Parasitology*, vol. 137, pp. 1577-1583.

Marcilla, A., Garg, G., Bernal, D., Ranganathan, S., Forment, J., Ortiz, J., Muñoz-Antolí, C., Domínguez, M.V., Pedrola, L., Martínez-Blanch, J., Sotillo, J., Trelis, M., Toledo, R. & Esteban, J.G. 2012a, "**The transcriptome analysis of *Strongyloides stercoralis* L3i larvae reveals targets for intervention in a neglected disease**", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, pp. e1513.

Marcilla, A., Trelis, M., Cortés, A., Sotillo, J., Cantalapiedra, F., Mínguez, M.T., Valero, M.L., Del Pino, Manuel Mateo Sánchez, Muñoz-Antolí, C. & Toledo, R. 2012b, "**Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells**", vol. 7, pp. e45974.

Marcos, L.A., Terashima, A., Dupont, H.L. & Gotuzzo, E. 2008, "***Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease**", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 102, pp. 314-318.

Marcos, L.A., Terashima, A., Canales, M. & Gotuzzo, E. 2011, "**Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host**", Current Infectious Disease Reports, vol. 13, pp. 35-46.

Marti, H., Haji, H.J., Savioli, L., Chwaya, H.M., Mgeni, A.F., Ameir, J.S. & Hatz, C. 1996, "**A comparative trial of a single-dose ivermectin versus three days of albendazole for treatment of *Strongyloides stercoralis* and other soil-transmitted helminth infections in children**", The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 55, pp. 477-481.

Martínez-Pérez, A. & López-Vélez, R. 2015, "**Is strongyloidiasis endemic in Spain?**", PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 9, pp. e0003482.

Mayayo, E., Gómez-Aracil, V., Azua-Blanco, J., Azua-Romeo, J., Capilla, J. & Mayayo, R. 2005, "***Strongyloides stercoralis* infection mimicking a malignant tumour in a non-immunocompromised patient. Diagnosis by bronchoalveolar cytology**", Journal of Clinical Pathology, vol. 58, pp. 420-422.

Mayta, H., Hancock, K., Gilman, R.H., Zamudio, R., Castillo, J.P., Levine, M.Z., García, H.H., González, A.E. & Tsang, V.C. 2009, "**A novel *Taenia solium* protein that resembles troponin T proteins**", Journal of Parasitology, vol. 95, pp. 591-597.

Mejía, R. & Nutman, T.B. 2012, "**Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis***", Current Opinion in Infectious Diseases, vol. 25, pp. 458-463.

Mitreva, M., McCarter, J.P., Martin, J., Dante, M., Wylie, T., Chiapelli, B., Pape, D., Clifton, S.W., Nutman, T.B. & Waterston, R.H. 2004, "**Comparative genomics of gene expression in the parasitic and free-living nematodes *Strongyloides stercoralis* and *Caenorhabditis elegans***", Genome Research, vol. 14, pp. 209-220.

Mohamed-Fawzi, E., Cruz-Bustos, T., Gomez-Samblas, M., Gonzalez-Gonzalez, G., Solano, J., Gonzalez-Sanchez, M.E., De Pablos, L.M., Corral-Caridad, M.J., Cuquerella, M., Osuna, A. & Alunda, J.M. 2013, "**Intranasal immunization of lambs with serine/threonine phosphatase 2A against gastrointestinal nematodes**", *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 20, pp. 1352-1359.

Montes, M., Sawhney, C. & Barros, N. 2010, "***Strongyloides stercoralis*: there but not seen**", *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 23, pp. 500-504.

Morassutti, A.L., Levert, K., Pinto, P.M., da Silva, A.J., Wilkins, P. & Graeff-Teixeira, C. 2012, "**Characterization of *Angiostrongylus cantonensis* excretory–secretory proteins as potential diagnostic targets**", *Experimental Parasitology*, vol. 130, pp. 26-31.

Mota-Ferreira, D.M., Maria do Rosário, F., Júnior, A.F., Sopelete, M.C., Abdallah, V.O. & Costa-Cruz, J.M. 2009, "**Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis**", *Acta Tropica*, vol. 109, pp. 103-107.

Muennig, P., Pallin, D., Challah, C. & Khan, K. 2004, "**The cost-effectiveness of ivermectin vs. albendazole in the presumptive treatment of strongyloidiasis in immigrants to the United States**", *Epidemiology and Infection*, vol. 132, pp. 1055-1063.

Mulvenna, J., Hamilton, B., Nagaraj, S.H., Smyth, D., Loukas, A. & Gorman, J.J. 2009, "**Proteomics analysis of the excretory/secretory component of the blood-feeding stage of the hookworm, *Ancylostoma caninum***", *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 8, no. 1, pp. 109-121.

Mulvenna, J., Moertel, L., Jones, M.K., Nawaratna, S., Lovas, E.M., Gobert, G.N., Colgrave, M., Jones, A., Loukas, A. & McManus, D.P. 2010, "**Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument**", *International Journal for Parasitology*, vol. 40, pp. 543-554.

Nagayasu, E., Ogura, Y., Itoh, T., Yoshida, A., Chakraborty, G., Hayashi, T. & Maruyama, H. 2013, "**Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis***", Parasitology International, vol. 62, pp. 57-65.

Nolan, T.J., Rotman, H.L., Bhopale, V.M., Schad, G.A. & Abraham, D. 1995, "**Immunity to a challenge infection of *Strongyloides stercoralis* third-stage larvae in the jird**", Parasite Immunology, vol. 17, pp. 599-604.

Nour, N.B., Eschbach, M.L., Piedavent, M., Osterloh, A., Kingsley, M.T., Erttmann, K., Brattig, N., Liebau, E., Fleischer, B. & Breloer, M. 2012, "**Vaccination with *Strongyloides ratti* heat shock protein 60 increases susceptibility to challenge infection by induction of Th1 response**", Vaccine, vol. 30, pp. 862-871.

Noya, O., Alarcón de Noya, B., Ballén, D., Zerpa, N., Colmenares, C., Losada, S. & Bermúdez, H. 1998, "**Use of synthetic peptides derived from adult worm proteins of *Schistosoma mansoni*, in the diagnosis of schistosomiasis**", Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 93, pp. 157-158.

Noya, O., Noya, D., Alarcón, B., Ballen, D.E., Bermúdez, H., Bout, D. & Hoebeke, J. 2001, "**Immunogenicity of synthetic peptides from the Sm31 antigen (cathepsin B) of the *Schistosoma mansoni* adult worms**", Parasite Immunology, vol. 23, pp. 567-573.

Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., Pagés, E., Marcos-Atxutegi, C. & Simón, F. 2009, "**Identification of immunoreactive proteins from the dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections**", Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 166, pp. 134-141.

Oliveira, E.J.d., Kanamura, H.Y., Takei, K., Hirata, R.D.C., Nguyen, N.Y. & Hirata, M.H. 2006, "**Application of synthetic peptides in development of a serologic method for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni**", Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 101, pp. 355-357.

Olmos, J.M., Gracia, S., Villoria, F., Salesa, R. & González-Macías, J. 2004, "**Disseminated strongyloidiasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome**", European Journal of Internal Medicine, vol. 15, pp. 529-530.

Olsen, A., van Lieshout, L., Marti, H., Polderman, T., Polman, K., Steinmann, P., Stothard, R., Thybo, S., Verweij, J.J. & Magnussen, P. 2009, "**Strongyloidiasis--the most neglected of the neglected tropical diseases?**", Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 103, pp. 967-972.

Ottesen, E.A. & Campbell, W.C. 1994, "**Ivermectin in human medicine**", The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 34, pp. 195-203.

Padigel, U.M., Lee, J.J., Nolan, T.J., Schad, G.A. & Abraham, D. 2006, "**Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis***", Infection and Immunity, vol. 74, pp. 3232-3238.

Pandiaraja, P., Arunkumar, C., Hoti, S.L., Rao, D.N. & Kaliraj, P. 2010, "**Evaluation of synthetic peptides of WbSXP-1 for the diagnosis of human lymphatic filariasis**", Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, vol. 68, pp. 410-415.

Pasqualotto, A.C., Zborowski, M.F., dos Anjos, M., Poloni, J.A.T., dos Santos, A.P. & Torelly, A.P. 2009, "***Strongyloides stercoralis* in the urine**", Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 103, pp. 106-107.

Patel, G., Arvelakis, A., Sauter, B., Gondolesi, G., Caplivski, D. & Huprikar, S. 2008, "***Strongyloides* hyperinfection syndrome after intestinal transplantation**", Transplant Infectious Disease, vol. 10, pp. 137-141.

Pellerone, F.I., Archer, S.K., Behm, C.A., Grant, W.N., Lacey, M.J. & Somerville, A.C. 2003, "**Trehalose metabolism genes in *Caenorhabditis elegans* and filarial nematodes**", International Journal for Parasitology, vol. 33, pp. 1195-1206.

Pérez-García, A., 2010, "**Contribución al conocimiento proteómico de larvas L3e de *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) de la comarca de La Safor (Valencia, España)**", Tesis Doctoral, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Pérez Valdés, R. 1895, "**Un caso de *Anguillula intestinalis***", Revista Médica de Cirugía Práctica, vol. 38, pp. 338.

Pérez-Sánchez, R., Valero, M.L., Ramajo-Hernández, A., Siles-Lucas, M., Ramajo-Martín, V. & Oleaga, A. 2008, "**A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms**", Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 161, pp. 112-123.

Pires-da Silva, A. 2007, "**Evolution of the control of sexual identity in nematodes**", Seminars in Cell & Developmental Biology, vol. 18, pp. 362-370.

Plata-Menchaca, E.P., de León, V., Peña-Romero, A.G. & Rivero-Sigarroa, E. 2015, "**Pulmonary hemorrhage secondary to disseminated strongyloidiasis in a patient with systemic lupus erythematosus**", Case Reports in Critical Care, doi: 10.1155/2015/310185.

Prendki, V., Fenaux, P., Durand, R., Thellier, M. & Bouchaud, O. 2011, "**Strongyloidiasis in man 75 years after initial exposure**", Emerging Infectious Diseases, vol. 17, pp. 931-932.

Puthiyakunnon, S., Boddu, S., Li, Y., Zhou, X., Wang, C., Li, J. & Chen, X. 2014, "**Strongyloidiasis--an insight into its global prevalence and management**", PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 8, pp. e3018.

Rahman, S.M., Kim, J., Hong, S. & Choi, M. 2014, "**Diagnostic efficacy of a recombinant cysteine protease of *Spirometra erinacei* larvae for serodiagnosis of sparganosis**", The Korean Journal of Parasitology, vol. 52, pp. 41.

Ramanathan, R., Burbelo, P.D., Groot, S., Iadarola, M.J., Neva, F.A. & Nutman, T.B. 2008, "**A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection**", The Journal of Infectious Diseases, vol. 198, pp. 444-451.

Ramanathan, R., Varma, S., Ribeiro, J.M., Myers, T.G., Nolan, T.J., Abraham, D., Lok, J.B. & Nutman, T.B. 2011, "**Microarray-based analysis of differential gene expression between infective and noninfective larvae of *Strongyloides stercoralis***", PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 5, pp. e1039.

Ramírez-Olivencia, G., Espinosa, M.A., Martín, A.B., Nuñez, N.I., de Las Parras, E.R., Nuñez, M.L. & Puente, S.P. 2014, "**Imported strongyloidiasis in Spain**", International Journal of Infectious Diseases, vol. 18, pp. 32-37.

Ramos, J.M., León, R., Andreu, M., de las Parras, E.R., Rodríguez-Díaz, J.C., Esteban, A., Saugar, J.M. & Torrus, D. 2015, "**Serological study of *Trypanosoma cruzi*, *Strongyloides stercoralis*, HIV, human T cell lymphotropic virus (HTLV) and syphilis infections in asymptomatic Latin-American immigrants in Spain**", Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 109, pp. 447-453.

Ravi, V., Ramachandran, S., Thompson, R.W., Andersen, J.F. & Neva, F.A. 2002, "**Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae**", Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 125, pp. 73-81.

Reddy, I.S. & Swarnalata, G. 2005, "**Fatal disseminated strongyloidiasis in patients on immunosuppressive therapy: report of two cases**", Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology, vol. 71, pp. 38-40.

Repetto, S.A., Duran, P.A., Lasala, M.B. & Gonzalez-Cappa, S.M. 2010, "**High rate of strongyloidosis infection, out of endemic area, in patients with eosinophilia and without risk of exogenous reinfections**", The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 82, pp. 1088-1093.

Repetto, S.A., Alba Soto, C.D., Cazorla, S.I., Tayeldin, M.L., Cuello, S., Lasala, M.B., Tekiel, V.S. & Gonzalez Cappa, S.M. 2013, "**An improved DNA isolation technique for PCR detection of *Strongyloides stercoralis* in stool samples**", Acta Tropica, vol. 126, pp. 110-114.

Requena-Méndez, A., Chiodini, P., Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Gotuzzo, E. & Muñoz, J. 2013, "**The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review**", PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 7, pp. e2002.

Ribeiro, V.S., Feliciano, N.D., Gonzaga, H.T., Costa, I.N., Gonçalves-Pires, M.R., Ueta, M.T. & Costa-Cruz, J.M. 2010, "**Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples**", Immunology Letters, vol. 134, pp. 69-74.

Ritchie, L.S. 1948, "**An ether sedimentation technique for routine stool examinations**", Bulletin of the U.S.Army Medical Department. United States. Army Medical Department, vol. 8, pp. 326.

Rivera, F. & Espino, A.M. 2016, "**Adjuvant-enhanced antibody and cellular responses to inclusion bodies expressing FhSAP2 correlates with protection of mice to *Fasciola hepatica***", Experimental parasitology, vol. 160, pp. 31-38.

Robinson, M.W., Menon, R., Donnelly, S.M., Dalton, J.P. & Ranganathan, S. 2009, "**An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host**", Molecular & Cellular Proteomics, vol. 8, pp. 1891-1907.

Rodríguez-Calabuig, D., Alcaraz, C.O., Igual-Adell, R., Parra-Godoy, F., Martínez-Sánchez, J., Ángel-Ródenas, C., Llario-Sanjuán, M. & Sanjuán-Bautista, M. 1998, "**Treinta casos de estrongiloidiasis en un centro de atención primaria: características y posibles complicaciones**", Atención Primaria, vol. 21, pp. 271-274.

Rodríguez-Hernández, M., Ruiz-Pérez-Pipaon, M., Canas, E., Bernal, C. & Gavilán, F. 2009, "***Strongyloides stercoralis* hyperinfection transmitted by liver allograft in a transplant recipient**", American Journal of Transplantation, vol. 9, pp. 2637-2640.

Rodríguez-Mahillo, A.I., González-Muñoz, M. & Moneo, I. 2008, "**Identification and allergenic characterisation of a new isoform of the *A. simplex* allergen Ani s 4**", Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 160, pp. 152-156.

Román-Sánchez, P., Pastor-Guzmán, A., Moreno-Guillén, S., Igual-Adell, R., Suner-Generoso, S. & Tornero-Estébanez, C. 2003, "**High prevalence of *Strongyloides stercoralis* among farm workers on the Mediterranean coast of Spain: analysis of the predictive factors of infection in developed countries**", The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 69, pp. 336-340.

Romero-Cabello, R., Villagroy Gómez, J., Hernández González, M. & Romero Feregrino, R. 2012, "**Hyperinfection with *Strongyloides stercoralis***", Case Reports, doi: 10.1136/bcr-2012-006819.

Rotman, H.L., Yutanawiboonchai, W., Brigandi, R.A., Leon, O., Gleich, G.J., Nolan, T.J., Schad, G.A. & Abraham, D. 1996, "***Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice**", Experimental Parasitology, vol. 82, pp. 267-278.

Russell, E.S., Gray, E.B., Marshall, R.E., Davis, S., Beaudoin, A., Handali, S., McAuliffe, I., Davis, C. & Woodhall, D. 2014, "**Prevalence of *Strongyloides stercoralis* antibodies among a rural Appalachian population--Kentucky, 2013**", The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 91, pp. 1000-1001.

Sadjadi, S., Damodaran, C. & Sharif, M. 2013, "***Strongyloides stercoralis* infection in transplanted patients**", The American Journal of Case Reports, vol. 14, pp. 205.

Saenseeha, S., Penchom, J., Yamasaki, H., Laummaunwai, P., Tayapiwatana, C., Kitkhuandee, A., Maleewong, W. & Intapan, P.M. 2014, "**A dot-ELISA test using a *Gnathostoma spinigerum* recombinant matrix metalloproteinase protein for the serodiagnosis of human gnathostomiasis**", The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, vol. 45, pp. 990-996.

Said, T., Nampoory, M., Nair, M., Halim, M., Shetty, S., Kumar, A., Mokadas, E., Elsayed, A., Johny, K. & Samhan, M. 2007, "**Hyperinfection strongyloidiasis: an anticipated outbreak in kidney transplant recipients in Kuwait**", Transplantation Proceedings, vol. 39, pp. 1014.

Sajid, M. & McKerrow, J.H. 2002, "**Cysteine proteases of parasitic organisms**", Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 120, pp. 1-21.

Sakamoto, T., Kono, I. & Yasuda, N. 1981, "**Studies on Strongyloidiasis of the peacock: III. Scanning electron microscopy of *Stroglyoides pavonis* Sakamoto et Yamashita, 1970**", Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University, vol. 17, pp. 185-192.

Sako, Y., Yamasaki, H., Nakaya, K., Nakao, M. & Ito, A. 2007, "**Cloning and characterization of cathepsin L-like peptidases of *Echinococcus multilocularis* metacestodes**", Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 154, pp. 181-189.

Sakura, T. & Uga, S. 2010, "**Assessment of skin penetration of third-stage larvae of *Strongyloides ratti***", Parasitology Research, vol. 107, pp. 1307-1312.

Salas-Coronas, J., Cabezas-Fernández, M.T., Vázquez-Villegas, J., Soriano-Pérez, M.J., Lozano-Serrano, A.B., Pérez-Camacho, I., Cabeza-Barrera, M.I. & Cobo, F. 2015, "**Evaluation of eosinophilia in immigrants in Southern Spain using tailored screening and treatment protocols: A prospective study**", Travel Medicine and Infectious Disease, vol. 13, pp. 315-321.

Salles, F., Bacellar, A., Amorim, M., Orge, G., Sundberg, M., Lima, M., Santos, S., Porto, A. & Carvalho, E. 2013, "**Treatment of strongyloidiasis in HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis* coinfecting patients is associated with increased**

**TNFalpha and decreased soluble IL2 receptor levels"**, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 107, pp. 526-529.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989, "**Molecular cloning: a laboratory manual**", ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol. 3.

San Miguel-Fraile, P., Vasallo, F.J., Rodríguez-Conde, I. & Ortiz-Rey, J.A. 2006, "**Acute diarrhea in a patient with rheumatoid arthritis**", Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, vol. 24, pp. 347-348.

Sansri, V., Meemon, K., Changklungmoa, N., Kueakhai, P., Chantree, P., Chaichanasak, P., Lorsuwannarat, N., Itagaki, T. & Sobhon, P. 2015, "**Protection against *Fasciola gigantica* infection in mice by vaccination with recombinant juvenile-specific cathepsin L**", Vaccine, vol. 33, pp. 1596-1601.

Santana, B.G., Dalton, J.P., Camargo, F.V., Parkinson, M. & Ndao, M. 2013, "**The diagnosis of human fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant cathepsin L protease**", PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 7, pp. 2414.

Sato, H., Torii, H., Une, Y. & Ooi, H.K. 2007, "**A new rhabditoid nematode species in Asian sciurids, distinct from *Strongyloides robustus* in North American sciurids**", The Journal of Parasitology, vol. 93, pp. 1476-1486.

Sato, H., Tanaka, S., Une, Y., Torii, H., Yokoyama, M., Suzuki, K., Amimoto, A. & Hasegawa, H. 2008, "**The stomal morphology of parasitic females of *Strongyloides* spp. by scanning electron microscopy**", Parasitology Research, vol. 102, pp. 541-546.

Satoh, M., Toma, H., Sato, Y., Takara, M., Shiroma, Y., Kiyuna, S. & Hirayama, K. 2002, "**Reduced efficacy of treatment of strongyloidiasis in HTLV-I carriers related to enhanced expression of IFN-gamma and TGF-beta1**", Clinical and Experimental Immunology, vol. 127, pp. 354-359.

Satoh, M. & Kokaze, A. 2004, "**Treatment strategies in controlling strongyloidiasis**", Expert Opinion on Pharmacotherapy, vol. 5, pp. 2293-2301.

Saugar, J.M., Merino, F.J., Martín-Rabadán, P., Fernández-Soto, P., Ortega, S., Gárate, T. & Rodríguez, E. 2015, "**Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides* spp. in clinical samples in a reference center in Spain**", Acta Tropica, vol. 142, pp. 20-25.

Schad, G.A., 1989, "**Morphology and life history of *Strongyloides stercoralis***", In Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man, D.I. Grove, ed. (London: Taylor and Francis), pp. 85-104.

Schaffel, R., Nucci, M., Carvalho, E., Braga, M., Almeida, L., Portugal, R. & Pulcheri, W. 2001, "**The value of an immunoenzymatic test (enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies**", The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 65, pp. 346-350.

Schär, F., Trostdorf, U., Giardina, F., Khieu, V., Muth, S., Marti, H., Vounatsou, P. & Odermatt, P. 2013, "***Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors**", PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 7, pp. e2288.

Schechtman, D., Winnen, R., Tarrab-Hazdai, R., Ram, D., Shinder, V., Grevelding, C., Kunz, W. & Arnon, R. 2001, "**Expression and immunolocalization of the 14-3-3 protein of *Schistosoma mansoni***", Parasitology, vol. 123, pp. 573-582.

Schechtman, D., Winnen, R., Tarrab-Hazdai, R., Ram, D., Shinder, V., Grevelding, C.G., Kunz, W. & Arnon, R. 2001, "**Expression and immunolocalization of the 14-3-3 protein of *Schistosoma mansoni***", Parasitology, vol. 123, pp. 573-582.

Segarra-Newnham, M. 2007, "**Manifestations, diagnosis, and treatment of *Strongyloides stercoralis* infection**", The Annals of Pharmacotherapy, vol. 41, pp. 1992-2001.

Serrano, L.P., del Pozo, M.P., Guevara, M.R., Rincón, J.R., Toldos, M.M. & Huerta, F.H. 2001, "**Infestación por *Strongyloides stercoralis* en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica en la Vega del Segura (Murcia). Presentación de tres casos**", Revista Clínica Española, vol. 201, pp. 109-110.

Sharifdini, M., Eshrat Beigom, K., Ashrafi, K., Hosseini, M., Mirhendi, H., Mohebali, M. & Kamranrashani, B. 2014, "**An analysis of clinical characteristics of *Strongyloides stercoralis* in 70 indigenous patients in Iran**", Iranian Journal of Parasitology, vol. 9, pp. 155.

Shikiya, K., Kinjo, N., Uehara, T., Uechi, H., Ohshiro, J., Arakaki, T., Kinjo, F., Saito, A., Iju, M. & Kobari, K. 1992, "**Efficacy of ivermectin against *Strongyloides stercoralis* in humans**", Internal Medicine, vol. 31, pp. 310-312.

Showler, A. & Boggild, A.K. 2012, "**Strongyloidiasis presenting as *larva currens* 38 years after presumed exposure**", Journal of Cutaneous Medicine and Surgery, vol. 16, pp. 433-435.

Siegel, M.O. & Simon, G.L. 2012, "**Is human immunodeficiency virus infection a risk factor for *Strongyloides stercoralis* hyperinfection and dissemination**", PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 6, pp. e1581.

Siles-Lucas, M., Felleisen, R.S., Hemphill, A., Wilson, W. & Gottstein, B. 1998, "**Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in *Echinococcus multilocularis***", Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 91, pp. 281-293.

Siles-Lucas, M., Nunes, C.P., Zaha, A. & Breijo, M. 2000, "**The 14-3-3 protein is secreted by the adult worm of *Echinococcus granulosus***", Parasite Immunology, vol. 22, pp. 521-528.

Solano-Parada, J., González-González, G., de Pablos Torrón, L., dos Santos, M.B., Espino, A., Burgos, M. & Osuna, A. 2010, "**Effectiveness of intranasal vaccination against *Angiostrongylus costaricensis* using a serine/threonine phosphatase 2 A synthetic peptide and recombinant antigens**", Vaccine, vol. 28, pp. 5185-5196.

Speare, R. 1989, "**Identification of species of *Strongyloides***" In *Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man*, D.I. Grove, ed. (London: Taylor and Francis), pp. 11–84.

Sprott, V., Selby, C.D., Ispahani, P. & Toghill, P.J. 1987, "**Indigenous strongyloidiasis in Nottingham**", *British Medical Journal*, vol. 294, pp. 741-742.

Starr, M.C. & Montgomery, S.P. 2011, "**Soil-transmitted Helminthiasis in the United States: a systematic review-1940-2010**", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 85, pp. 680-684.

Streit, A. 2008, "**Reproduction in *Strongyloides* (Nematoda): a life between sex and parthenogenesis**", *Parasitology*, vol. 135, pp. 285-294.

Streit, A. 2014, "**How to become a parasite without sex chromosomes: a hypothesis for the evolution of *Strongyloides* spp. and related nematodes**", *Parasitology*, vol. 141, pp. 1244-1254.

Sudre, A.P., Siqueira, R.C., Barreto, M.G., Peralta, R.H., Macedo, H.W. & Peralta, J.M. 2007, "**Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis**", *Parasitology Research*, vol. 101, pp. 1117-1123.

Suputtamongkol, Y., Premasathian, N., Bhumimuang, K., Waywa, D., Nilganuwong, S., Karuphong, E., Anekthananon, T., Wanachiwanawin, D. & Silpasakorn, S. 2011, "**Efficacy and safety of single and double doses of ivermectin versus 7-day high dose albendazole for chronic strongyloidiasis**", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, pp. e1044.

Suttiprapa, S., Mulvenna, J., Huong, N.T., Pearson, M.S., Brindley, P.J., Laha, T., Wongkham, S., Kaewkes, S., Sripa, B. & Loukas, A. 2009, "**Ov-APR-1, an aspartic protease from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*: functional expression, immunolocalization and subsite specificity**", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 41, pp. 1148-1156.

- Sykes, A.M. & McCarthy, J.S. 2011, "**A coproantigen diagnostic test for *Strongyloides* infection**", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, pp. e955.
- Szecsí, P.B. 1992, "**The aspartic proteases**", *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation Supplementum.*, vol. 52, pp. 5-22.
- Takayanagui, O.M., Lofrano, M.M., Araugo, M.B. & Chimelli, L. 1995, "**Detection of *Strongyloides stercoralis* in the cerebrospinal fluid of a patient with acquired immunodeficiency syndrome**", *Neurology*, vol. 45, pp. 193-194.
- Tang, Y., Cho, P.Y., Kim, T.I. & Hong, S.J. 2006, "***Clonorchis sinensis*: molecular cloning, enzymatic activity, and localization of yolk ferritin**", *The Journal of Parasitology*, vol. 92, no. 6, pp. 1275-1280.
- Tarr, P.E., Miele, P.S., Peregoy, K.S., Smith, M.A., Neva, F.A. & Lucey, D.R. 2003, "**Case report: Rectal administration of ivermectin to a patient with *Strongyloides* hyperinfection syndrome**", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 68, pp. 453-455.
- Tcherepanova, I., Bhattacharyya, L., Rubin, C.S. & Freedman, J.H. 2000, "**Aspartic proteases from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and developmental and cell-specific expression of Asp-1**", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, pp. 26359-26369.
- Teixeira, M.C., Ines, E.J., Pacheco, F.T., Silva, R.K., Mendes, A.V., Adorno, E.V., Lima, F.M. & Soares, N.M. 2010, "**Asymptomatic *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in an alcoholic patient with intense anemia**", *The Journal of Parasitology*, vol. 96, pp. 833-835.
- Thompson, F.J., Mitreva, M., Barker, G.L., Martin, J., Waterston, R.H., McCarter, J.P. & Viney, M.E. 2005, "**An expressed sequence tag analysis of the life-cycle of the parasitic nematode *Strongyloides ratti***", *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 142, pp. 32-46.

Tirado, M.D., Gil, M., Galiano, J., Pardo, F., Moreno, R., Del Busto, A.G., Sabater, S. & Gomila, B. 2002, "**Respiratory and renal insufficiency in a COPD patient receiving corticoid treatment**", *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 20, pp. 401-402.

Toldos, M., Meseguer, M., Martín-Luengo, F., Serra, A., Artero, J. & Segovia, M. 1995, "**Eosinofilia en un paciente bronquítico crónico**", *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, vol. 13, pp. 375-376.

Toledo, R., Muñoz-Antolí, C. & Esteban, J.G. 2015, "**Strongyloidiasis with emphasis on human infections and its different clinical forms**", *Advances in Parasitology*, vol. 88, pp. 165-241.

Ultaigh, S.N.A., Carolan, J.C., Britton, C., Murray, L. & Ryan, M.F. 2009, "**A cathepsin L-like protease from *Strongylus vulgaris*: An orthologue of *Caenorhabditis elegans* CPL-1**", *Experimental Parasitology*, vol. 121, pp. 293-299.

Vadlamudi, R.S., Chi, D.S. & Krishnaswamy, G. 2006, "**Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome**", *Clinical and Molecular Allergy*, vol. 4, pp. 8.

Valerio, L., Roure, S., Fernández-Rivas, G., Basile, L., Martínez-Cuevas, O., Ballesteros, A.L., Ramos, X., Sabria, M. & North Metropolitan Working Group on Imported Diseases 2013, "***Strongyloides stercoralis*, the hidden worm. Epidemiological and clinical characteristics of 70 cases diagnosed in the North Metropolitan Area of Barcelona, Spain, 2003-2012**", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 107, pp. 465-470.

van Balkom, B.W., van Gestel, R.A., Brouwers, J.F., Krijgsveld, J., Tielens, A.G., Heck, A.J. & van Hellemond, J.J. 2005, "**Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome**", *Journal of Proteome Research*, vol. 4, pp. 958-966.

van Doorn, H.R., Wentink-Bonnema, E., Rentenaar, R.J. & van Gool, T. 2007, "**Specific cross-reactivity in sera from cystic echinococcosis patients in an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot for cysticercosis diagnostics**", Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 101, pp. 948-950.

van Hellemond, J.J., Van Balkom, B.W. & Tielens, A.G. 2007, "**Schistosome biology and proteomics: progress and challenges**", Experimental Parasitology, vol. 117, pp. 267-274.

Verweij, J.J., Canales, M., Polman, K., Ziem, J., Brienen, E.A., Polderman, A.M. & van Lieshout, L. 2009, "**Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR**", Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 103, pp. 342-346.

Viney, M.E. & Ashford, R.W. 1990, "**The ultrastructure of the peri-vulval region of *Strongyloides cebus***", Journal of Helminthology, vol. 64, pp. 23-28.

Viney, M.E., Ashford, R. & Barnish, G. 1991, "**A taxonomic study of *Strongyloides Grassi*, 1879 (Nematoda) with special reference to *Strongyloides fuelleborni* von Linstow, 1905 in man in Papua New Guinea and the description of a new subspecies**", Systematic Parasitology, vol. 18, pp. 95-109.

Viney, M.E. & Lok, J.B. 2015, "**The biology of *Strongyloides* spp.**", WormBook: the online review of *C.elegans* biology, pp. 1-17.

Wang, J., Czech, B., Crunk, A., Wallace, A., Mitreva, M., Hannon, G.J. & Davis, R.E. 2011, "**Deep small RNA sequencing from the nematode *Ascaris* reveals conservation, functional diversification, and novel developmental profiles**", Genome Research, vol. 21, pp. 1462-1477.

Wang, Q., Zhang, S., Luo, X., Hou, J., Zhu, X. & Cai, X. 2013, "**Cloning and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *Taenia pisiformis***", Veterinary Parasitology, vol. 194, pp. 26-34.

Wang, S., Zhu, X., Yang, Y., Yang, J., Gu, Y., Wei, J., Hao, R., Boireau, P. & Cui, S. 2009, "**Molecular cloning and characterization of heat shock protein 70 from *Trichinella spiralis***", Acta Tropica, vol. 110, pp. 46-51.

Wang, T., Van Steendam, K., Dhaenens, M., Vlaminck, J., Deforce, D., Jex, A.R., Gasser, R.B. & Geldhof, P. 2013, "**Proteomic analysis of the excretory-secretory products from larval stages of *Ascaris suum* reveals high abundance of glycosyl hydrolases**", PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 7, pp. e2467.

Wang, X., Chen, W., Li, X., Zhou, C., Deng, C., Lv, X., Fan, Y., Men, J., Liang, C. & Yu, X. 2012, "**Identification and molecular characterization of a novel signaling molecule 14-3-3 epsilon in *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products**", Parasitology Research, vol. 110, pp. 1411-1420.

Wang, X.Z., Hong, Y., Han, H.X., Li, C.J., Cao, X.D., Lu, K., Li, H., Zhu, C., Fu, C.G. & Lin, J.J. 2014, "**Cloning, expression and immuno-protection analysis of a gene encoding troponin T of *Schistosoma japonicum* (SjTnT)**", Chinese Journal of Schistosomiasis Control, vol. 26, pp. 394-398.

Wasył, K., Zawistowska-Deniziak, A., Bąska, P., Wędrychowicz, H. & Wiśniewski, M. 2013, "**Molecular cloning and expression of the cDNA sequence encoding a novel aspartic protease from *Uncinaria stenocephala***", Experimental Parasitology, vol. 134, pp. 220-227.

Watts, M.R., James, G., Sultana, Y., Ginn, A.N., Outhred, A.C., Kong, F., Verweij, J.J., Iredell, J.R., Chen, S.C. & Lee, R. 2014, "**A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye**", The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 90, pp. 306-311.

White Jr, A.C., Baig, S. & Robinson, P. 1996, "***Taenia saginata* oncosphere excretory/secretory peptidases**", The Journal of Parasitology, vol. 82, pp. 7-10.

World Health Organization, 1986, "**Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). WHO/CDC case definition for AIDS**", Weekly Epidemiological Record, vol. 61, pp. 69-73.

Won, E.J., Jeon, J., Koh, Y.I. & Ryang, D.W. 2015, "**Strongyloidiasis in a diabetic patient accompanied by gastrointestinal stromal tumor: cause of eosinophilia unresponsive to steroid therapy**", The Korean Journal of Parasitology, vol. 53, pp. 223-226.

Zago-Gomes, M.P., Aikawa, K.F., Perazzio, S.F., Gonçalves, C.S. & Pereira, F.E. 2002, "**Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients**", Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, vol. 35, pp. 571-574.

Zhang, H., Zhou, Q., Yang, Y., Chen, X., Yan, B. & Du, A. 2013, "**Characterization of heat shock protein 70 gene from *Haemonchus contortus* and its expression and promoter analysis in *Caenorhabditis elegans***", Parasitology, vol. 140, pp. 683-694.

Zhu, X., Korhonen, P.K., Cai, H., Young, N.D., Nejsum, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Boag, P.R., Tan, P., Li, Q. & Min, J. 2015, "**Genetic blueprint of the zoonotic pathogen *Toxocara canis***", Nature Communications, vol. 6, pp. 6145.

Zoltowska, K., Lopienska, E., Rokicki, J. & Dmitryjuk, M. 2002, "**The enzymes of glycogen and trehalose catabolism from *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae)**", Folia Parasitologica, vol. 49, pp. 239-242.





