

**UNIVERSITAT DE
VALÈNCIA**



**FACULTAT DE
FARMÀCIA**

GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

TRABAJO FIN DE GRADO

*REALIZADO EN EL DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA I
PARÀSITOLOGIA, FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA,
VALENCIA, ESPAÑA*

EFFECTOS DEL AJO EN RATONES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Por

MIGUEL GARCÍA FERRÚS

Directoras

Dra. CARLA TERESA MUÑOZ ANTOLÍ-CANDELA

Profesora Titular de Parásitología
Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i
Parásitologia
Facultat de Farmàcia, Universitat de València

Dra. ALBA CORTÉS CARBONELL

Investigadora Doctora Senior
Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i
Parásitologia
Facultat de Farmàcia, Universitat de València

23 de junio de 2017

RESUMEN

Debido a la inexistencia de vacunas antihelmínticas, el control de las infecciones por helmintos intestinales depende fundamentalmente de las medidas higiénico-sanitarias y de la quimioterapia. Sin embargo, la continua aparición de resistencias a los tratamientos habituales hace necesario desarrollar nuevos fármacos contra estos parásitos. En este trabajo, se han investigado los potenciales efectos antihelmínticos del ajo (*Allium sativum*), a dosis dietéticas, sobre trematodos intestinales transmitidos por alimentos, empleando para ello el modelo *Echinostoma caproni*-roedor. Los efectos potenciales del consumo del ajo en la prevención y/o tratamiento de la infección se analizaron siguiendo diferentes pautas de administración: antes de la infección; después de la infección; y de forma continua, antes y después de la infección. No se encontraron diferencias en los porcentajes de infección ni en la fecundidad de los adultos expuestos al ajo respecto a los controles. Sin embargo, mediante microscopía electrónica de superficie, se observaron alteraciones considerables en el tegumento de los vermes expuestos al ajo. El secretoma del parásito también se vio afectado en respuesta a la exposición al ajo, de manera dosis-dependiente. La secreción de proteínas totales se redujo considerablemente con la exposición, si bien se sobre-regularon proteínas importantes, como *major vault protein* o *tER-ATPasa*. Estos resultados pueden contribuir a esclarecer la actividad antihelmíntica de los compuestos activos del ajo, así como los mecanismos de respuesta a tóxicos de los parásitos, lo que podría ser de utilidad para el desarrollo racional de nuevos fármacos con actividad trematocida.

Palabras Clave: *Allium sativum*, *Echinostoma caproni*, trematodos, actividad antihelmíntica, tegumento.

ABSTRACT

Because of the inexistence of anthelmintic vaccines, the control of helminth infections fundamentally relies on hygienic-sanitary measures and chemotherapy. However, appearance of resistance to usual treatment is promoting the necessity of developing new drugs against these parasites. In this work, potential trematocidal effects of garlic (*Allium sativum*) in dietary doses, on intestinal foodborne trematodes, were investigated, employing the *Echinostoma caproni*-mouse model. Potential effects of garlic in prevention and/or treatment of infection were analyzed following different administration patterns: before infection; after infection; and continuously, before and after infection. No differences in worm recoveries and fecundity were found in exposed adults with respect to controls. However, using scanning electron microscopy, considerable alterations in the tegument were detected in garlic-exposed parasites. The parasite secretome was also affected in response to garlic, in a dose-dependent mode. Total protein secretion was markedly reduced after garlic-exposition, but up-regulation of several proteins, such as *major vault protein* and *tER-ATPase*, was found in exposed worms. The results presented herein provide new insights in the anthelmintic activity of active compounds of garlic and the way the parasites respond to toxins, and may contribute to the rational development of new trematocidal drugs.

Key Words: *Allium sativum*, *Echinostoma caproni*, trematodes, anthelmintic activity, tegument.

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| ACN | Acetonitrilo |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| BLAST | Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico |
| ABC | Bicarbonato amónico |
| ESPs | Productos de excreción/secreción |
| LC-MS/MS | Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas |
| MVP | <i>Major Vault Protein</i> |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PAGE | Gel de poliacrilamida |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute 1640 (medio de cultivo) |
| SCSIE | Servei Central de Suport a la Investigació Experimental |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SEM | Microscopía electrónica de superficie |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| tER-ATPasa | ATPasa del retículo endoplásmico transicional |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| TOF | Tiempo de vuelo |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Figura 1 | Ciclo biológico de <i>Echinostoma caproni</i> . | 6 |
| Figura 2 | Diseño experimental para la administración del preparado de <i>Allium sativum</i> a los diferentes grupos de hospedadores definitivos. | 7 |
| Figura 3 | Imagen de los distintos tonos de los medios RPMI tras añadir los adultos de <i>Echinostoma caproni</i> recogidos de los ratones infectados de cada uno de los grupos con diferente exposición al preparado de ajo. | 19 |
| Figura 4 | Cantidad de proteína excretada/secretada por adulto de <i>Echinostoma caproni</i> al medio de cultivo en cada uno de los grupos experimentales con diferente exposición al preparado de ajo. | 19 |
| Figura 5 | Imágenes de los productos de excreción/secreción en geles SDS-PAGE al 12% (A) y al 8% (B). | 20 |
| Figura 6 | Imágenes obtenidas por SEM de la superficie de la ventosa oral de <i>Echinostoma caproni</i> en los grupos Control y Continuo. | 24 |
| Figura 7 | Imágenes obtenidas por SEM de la superficie ventral de <i>Echinostoma caproni</i> en los grupos experimentales Control y Continuo. | 25 |
| Figura 8 | Imágenes obtenidas por SEM de la superficie dorsal de <i>Echinostoma caproni</i> en los grupos experimentales Control y Continuo. | 26 |
| Figura 9 | Imágenes obtenidas por SEM de la superficie lateral de <i>Echinostoma caproni</i> en los grupos experimentales Control y Continuo. | 27 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|----------------|--|----|
| Tabla 1 | Recuento de los adultos de <i>Echinostoma caproni</i> recuperados del intestino de los ratones infectados en cada uno de los grupos con diferente exposición al preparado de ajo. | 17 |
| Tabla 2 | Recuento del número de huevos de <i>Echinostoma caproni</i> por gramo de heces en los ratones infectados de cada uno de los grupos con diferente exposición al preparado de ajo. | 18 |
| Tabla 3 | Resultados de la identificación de las proteínas diferenciales en los productos de excreción/secreción de <i>Echinostoma caproni</i> recuperados de los diferentes grupos experimentales | 22 |

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1- INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2- OBJETIVOS | 4 |
| 3- MATERIALES Y MÉTODOS | 5 |
| 3.1- MATERIALES | 5 |
| 3.1.1- MATERIAL PARÁSITOLÓGICO | 5 |
| 3.1.2- MATERIAL DE HOSPEDADORES | 7 |
| 3.1.3- PREPARADO DE <i>ALLIUM SATIVUM</i> | 8 |
| 3.2- MÉTODOS | 9 |
| 3.2.1- MANEJO DE HOSPEDADORES DEFINITIVOS | 9 |
| 3.2.2- ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN/SECRECCIÓN | 10 |
| 3.2.2.1- OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS | 10 |
| 3.2.2.2- ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL | 11 |
| 3.2.2.3- IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS | 12 |
| 3.2.3- ESTUDIO DE LA SUPERFICIE DEL PARÁSITO | 14 |
| 3.2.3.1- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS | 14 |
| 3.2.3.2- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE SUPERFICIE (SEM) | 15 |
| 3.2.4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 15 |
| 4- RESULTADOS | 17 |
| 4.1- RECUENTO DE ESPECÍMENES ADULTOS | 17 |
| 4.2- RECUENTO DE HUEVOS EN HECES | 17 |
| 4.3- COMPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN/SECRECCIÓN | 18 |
| 4.4- IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DIFERENCIALES | 21 |
| 4.5- ESTUDIO DE LA SUPERFICIE MEDIANTE SEM | 21 |

| | |
|------------------------------|-----------|
| 5- DISCUSIÓN | 28 |
| 6- CONCLUSIONES | 33 |
| 7- BIBLIOGRAFÍA | 34 |
| ANEXO I | 40 |

1. INTRODUCCIÓN

Las helmintiasis intestinales son enfermedades con grandes repercusiones en la sanidad humana y animal, graves consecuencias en la salud pública y, en menor medida, en el ámbito socio-económico. Los estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) asocian estas enfermedades con una enorme morbilidad, calculando que alrededor del mundo hay más de 2000 millones de personas infectadas (WHO, 2015). Entre las complicaciones que estas enfermedades pueden causar se encuentran graves problemas nutricionales, como trastornos gastrointestinales, anemia, o malnutrición, lo que se ha relacionado con retraso en el crecimiento y con desarreglos en la función cognitiva, que afectan especialmente a los niños (Drake et al., 2000; WHO, 2015). Algunos estudios han puesto de manifiesto que los años de vida potencialmente perdidos (DALY) cada año como consecuencia de las helmintiasis intestinales en el mundo suponen más de 11 millones, un valor superior al de las enfermedades digestivas y a la mayoría de las deficiencias nutricionales, solo superado por la desnutrición energético-proteica y la deficiencia de hierro (University of Washington, 2010).

Actualmente, la continua aparición de resistencias frente a los fármacos habituales dificulta el control de las infecciones por trematodos transmitidos por alimentos (Keisser et al., 2010). Las trematodiasis de transmisión alimentaria han aumentado su incidencia en las dos últimas décadas, son las principales enfermedades tropicales olvidadas en algunos países del mundo como Japón, China o Korea del Norte, y han sido reconocidas como causa importante de discapacidad global (Hotez et al., 2014); además de que numerosos estudios las han relacionado con la aparición de colangiocarcinomas y diversas enfermedades hepáticas (WHO, 1994; Sripa et al., 2012). Ante esta situación, el desarrollo de vacunas parece el método más efectivo para la prevención y control de estas enfermedades, pero a pesar de los grandes estudios realizados, aun no se dispone de vacunas frente a helmintos intestinales. En los últimos años numerosos estudios han concluido que aún hace falta mucha investigación para alcanzar el desarrollo de vacunas efectivas, y que es necesario hallar nuevas estrategias dirigidas a su búsqueda (Vercruyse et al., 2004; Harris, 2011).

Frente a este problema, el control de las infecciones por helmintos intestinales y las trematodiasis de transmisión alimentaria sigue dependiendo en la actualidad de la quimioterapia. La pérdida de efectividad de los pocos fármacos habituales y el fracaso en el

desarrollo de las vacunas profilácticas hace necesario estudiar compuestos con actividad antihelmíntica, con el fin de encontrar nuevos fármacos útiles o de hallar nuevas dianas terapéuticas. Ante el continuo desarrollo de tolerancias y resistencias, en el año 2000 la OMS recomendó la evaluación de los productos derivados de plantas desde una perspectiva científica, lo que ha conducido en los últimos años una fuerte tendencia a utilizar y estudiar las plantas como posibles remedios antihelmínticos (Abdel-Ghaffar et al., 2011).

Sin embargo, no todas las plantas que poseen compuestos bioactivos son utilizadas exclusivamente para la obtención de medicamentos comerciales o la investigación de los mismos. Algunas plantas pueden ser reconocidas como una fuente importante de compuestos bioactivos y al mismo tiempo estar disponibles como un alimento más en nuestra dieta. Aquellos alimentos o extractos de alimentos de origen natural cuyo consumo, no solo satisface la nutrición básica, sino que además proporciona un efecto beneficioso para la salud, incluyendo la prevención de enfermedades, son conocidos como “nutracéuticos” (Brower, 1998). Los nutracéuticos, al ser de origen natural, presentan las ventajas de ser asequibles y económicos, además de no presentar tantos efectos adversos como los fármacos (Baby et al., 2013). No obstante, algunos autores diferencian entre los alimentos considerados remedios tradicionales a los que se les atribuyen propiedades saludables, considerados “nutracéuticos potenciales”, y aquellos nutracéuticos que han aportado datos clínicos eficaces sobre su beneficio para la salud, considerados nutracéuticos establecidos” (Kokate et al., 2002; Pandey et al., 2010). Aunque los nutracéuticos tienen en la actualidad un importante papel en la promoción de la salud y en la prevención de las enfermedades, es necesaria una investigación con base científica de sus compuestos bioactivos con el fin de esclarecer sus propiedades beneficiosas y condiciones de utilización de las mismas.

En este sentido, el ajo (*Allium sativum*) es una de las plantas más documentadas que se ha utilizado para el mantenimiento de la salud y el tratamiento de diversas enfermedades, y a la que se le atribuyen menos efectos adversos (Rivlin, 2001; Londhe et al., 2011). Los estudios realizados atribuyen a los compuestos derivados del ajo propiedades antiparasitarias, antiapoptóticas e inmunomoduladoras sobre diferentes tipos celulares (Gharavi et al., 2011; Arreola et al., 2015), y se ha comprobado su efecto inmunomodulador y antiinflamatorio en diferentes modelos animales (Keiss et al., 2003). Su efecto antihelmíntico ya ha sido probado en *Schistosoma mansoni* (Riad et al., 2009; Mantawy et al., 2011) e incluso autores como Riad et al. (2009) proponen utilizar el ajo como complemento al praziquantel en el tratamiento de este parásito.

A pesar de esto, existen trabajos que han obtenido resultados diferentes al evaluar el efecto de los extractos de plantas (cebolla, coco, higo...etc.) sobre trematodos (Abdel-Ghaffar et al., 2011), demostrando la falta de efecto en el número de adultos intestinales recuperados o en el número de huevos excretados en las heces. Los resultados obtenidos en estudios previos varían en función de múltiples factores, incluso hay estudios que no evidencian el efecto del ajo sobre trematodos, cestodos o nematodos como *Trichinella spiralis* (Melhorn et al., 2011) o *Ascaris lumbricoides* (Londhe et al., 2011). Los efectos antihelmínticos del ajo *in vitro* son difíciles de confirmar *in vivo*, entre otros motivos porque su efecto beneficioso resulta muy bajo a menos que se utilicen cantidades muy grandes (Melhorn et al., 2011). Todavía se desconocen los componentes bioactivos del ajo responsables de su efecto beneficioso para la salud, su mecanismo de acción, sus propiedades químicas, su dosis efectiva y su posología, de modo que sus propiedades beneficiosas pueden ser diferentes según la preparación del ajo y el tipo de extracto empleado (Arreola et al., 2015).

Este trabajo pretende estudiar las propiedades antihelmínticas del ajo *in vivo*, utilizando para ello el modelo animal *Echinostoma caproni*-roedor. El modelo *E. caproni*-roedor ha sido ampliamente utilizado en estudios previos, debido a que el parásito es capaz de infectar a diferentes especies de roedores de laboratorio, incluyendo ratones, ratas o hámsteres, entre otros. Numerosos estudios han demostrado que la evolución de la infección y las características de la misma están fuertemente condicionadas por factores propios del hospedador (Toledo et al., 2006; Sotillo et al., 2010a). De esta manera, el modelo ofrece la posibilidad de estudiar y determinar los factores dependientes del hospedador que condicionan la evolución de la infección y, al mismo tiempo, analizar los mecanismos del parásito que intervienen en su adaptación al entorno en que se desarrolla (Toledo, 2009; Cortés et al., 2016). Asimismo, el hecho de que el ciclo biológico resulte relativamente sencillo de mantener en los laboratorios facilita la utilización experimental de este parásito (Toledo & Fried, 2005).

2. OBJETIVOS

Este Trabajo de Fin de Grado es un proyecto experimental que tiene como objetivo general estudiar los efectos de *A. sativum* sobre la infección de *E. caproni in vivo*, en ratones de la cepa ICR. Para ello, en el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la eficacia del ajo en dosis dietéticas en la prevención y tratamiento de la infección por *E. caproni*;
- Estudiar los efectos del ajo sobre la fecundidad del parásito;
- Determinar los efectos del ajo sobre el secretoma de *E. caproni* desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo;
- Analizar los efectos del ajo sobre la superficie tegumentaria de *E. caproni*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1- MATERIAL

3.1.1- MATERIAL PARÁSITOLÓGICO

Para la realización de este trabajo se ha utilizado el helminto intestinal *E. caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) (Fujino & Fried, 1993), un trematodo digénido que presenta un ciclo biológico triheteroxeno acuático en el que intervienen un hospedador definitivo vertebrado y dos hospedadores intermediarios, que pueden ser distintas especies de animales de agua dulce (Figura 1). Tras la ingestión de las metacercarias, los adultos de *E. caproni* se desarrollan directamente en el intestino delgado del hospedador definitivo, concretamente en el íleon, sin fases de migración tisular previas. Además, este trematodo presenta otras características que lo convierten en un buen candidato para ser utilizado como modelo experimental en el estudio de las helmintiasis intestinales (Toledo & Fried, 2005). En el Área de Parasitología de la Universitat de València se mantiene desde hace años el ciclo biológico de *E. caproni* a partir del material cedido originariamente por el Dr. Bernard Fried, del Departamento de Biología del Lafayette College (Easton, Pensilvania, EE.UU.).

El mantenimiento del ciclo biológico de un parásito en el laboratorio permite disponer de todos sus estadios evolutivos, lo cual resulta fundamental para disponer del material parasitológico necesario según los requerimientos de cada estudio. Si bien en este trabajo no se han empleado directamente todas las fases que intervienen en el ciclo de *E. caproni*, se ha considerado apropiado hacer una breve descripción de los pasos a seguir para su reproducción experimental, con la finalidad de contextualizar el origen del material utilizado.

Para el mantenimiento del ciclo biológico de *E. caproni* en nuestro laboratorio se emplean diferentes especies de roedores de laboratorio (ratones y ratas) y el gasterópodo pulmonado *Biomphalaria glabrata*, que puede actuar al mismo tiempo como primer y segundo hospedador intermediario. Las metacercarias, que constituyen la forma infectante para el hospedador definitivo, son recogidas del riñón y cavidades pericárdicas de caracoles que actúan como segundos hospedadores intermediarios, infectados previamente con las

cercarías del parásito. Los vermes adultos se recuperan del intestino de los hospedadores definitivos en el momento de la disección. A partir de los adultos grávidos, por dilaceración del útero, se obtienen los huevos del parásito a partir de los cuales, tras su embrionación en las condiciones adecuadas, se obtienen las fases larvarias (miracidios) necesarias para infectar al primer hospedador intermediario. En el primer hospedador intermediario se desarrollan la fase esporocisto y varias generaciones de redias, para dar lugar por último a las cercarias, que emergen del caracol infectado en busca de un segundo hospedador intermediario, en el que se enquistan en forma de metacercaria, cerrando de esta manera el ciclo.

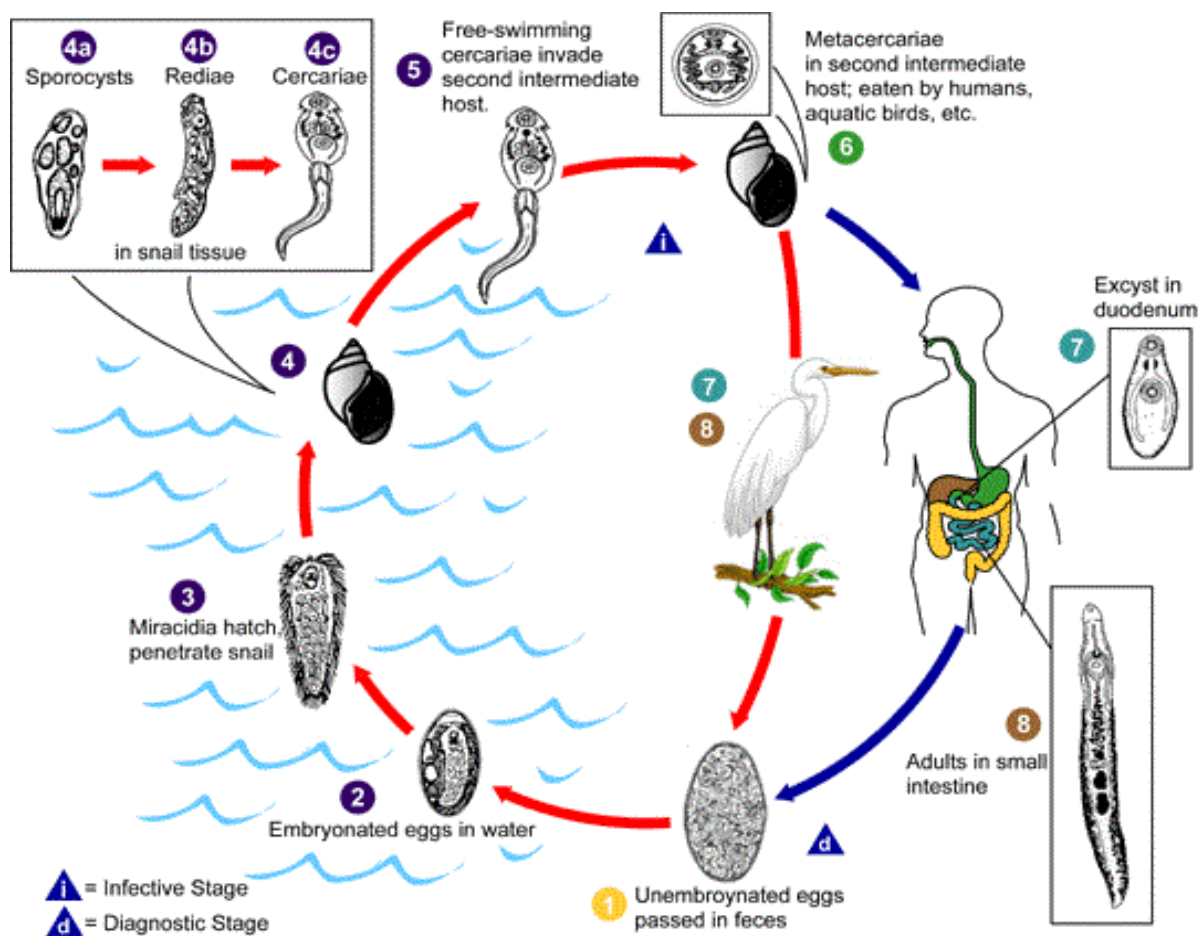


Figura 1.- Ciclo biológico de *Echinostoma caproni*. [Fuente: CDC (Centers for Disease Control and Prevention): www.cdc.gov].

Para llevar a cabo este trabajo se han empleado ejemplares adultos del parásito, recuperados a las 2 semanas post-infección del íleon de los ratones infectados experimentalmente. Asimismo, se recontaron los huevos emitidos por los parásitos en las heces de estos hospedadores.

3.1.2- MATERIAL DE HOSPEDADORES

En este trabajo se ha utilizado como hospedador definitivo de *E. caproni* ratones *Mus musculus* de la cepa ICR (también denominada CD1), que son considerados hospedadores de alta compatibilidad en los que el parásito desarrolla infecciones de carácter crónico (Muñoz-Antolí et al., 2007). Todos los animales utilizados procedían de laboratorios especializados en la cría y distribución de animales de experimentación (Charles River Laboratories).

Se emplearon un total de 16 ratones macho, de 5 semanas de edad, que se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos: Control, Profiláctico, Terapéutico y Continuo. Todos los animales se infectaron experimentalmente con una dosis de 50 metacercarias y se mantuvieron infectados durante 2 semanas. La pauta de administración del preparado de *A. sativum* (véase 3.1.3. Preparado de *Allium sativum*) fue diferente en cada grupo (Figura 2). Los animales del grupo Profiláctico recibieron una dosis diaria del preparado durante la semana previa a la infección (día -7 a día -1). En los ratones del grupo Terapéutico, en cambio, la administración se inició después de la inoculación de las metacercarias, desde el día 0 al día 14. El grupo Continuo recibió una dosis diaria del preparado antes y después de la infección (día -7 a día 14), mientras que los animales del grupo Control no fueron expuestos a ajo.



Figura 2.- Diseño experimental para la administración del preparado de *Allium sativum* a los diferentes grupos de hospedadores definitivos.

Los animales se mantuvieron en el estabulario de la Facultat de Farmàcia [SCSIE (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental)], que cuenta con el certificado de calidad ISO 9001:2008 (SCSIE, 2013). Todos los animales se mantuvieron en las condiciones adecuadas según la normativa vigente (Ley 32/2007; Directiva 2010/63/UE; Real Decreto 53/2013), con un régimen estándar de alimentación a base de pienso autoclavable y agua natural autoclavada *ad libitum*. Todos los procedimientos que implicaron la utilización de animales de experimentación fueron aprobados y autorizados por el Comitè d'Ètica i Benestar Animal de la Universitat de València (Ref#A18348501775).

3.1.3- PREPARADO DE *ALLIUM SATIVUM*

El preparado de ajo (*A. sativum*) se elaboró siguiendo el protocolo descrito por Riad et al. (2009). En primer lugar, se preparó un extracto crudo a partir de la materia prima. Los bulbos de ajo secos se abrieron y se separaron los dientes, que se pelaron, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. Un total de 500 g de dientes de ajo limpios se trituraron hasta obtener una pasta homogénea y de consistencia uniforme que se diluyó con 500 ml de agua destilada. El resultado fue una disolución madre de ajo, con una concentración de 1 g/ml, a partir de la cual se prepararon varias alícuotas que se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

La dosis del preparado de ajo empleada en este trabajo fue de 50 mg/Kg de peso. Esta dosis corresponde a la empleada por otros autores en estudios similares y equivale a la dosis diaria de ajo recomendada en humanos (Riad et al., 2009). La cantidad necesaria de producto por cada dosis se calculó teniendo en cuenta que el peso medio de los ratones a tratar era de 34 g, de manera que a cada ratón se le administraron 1,7 mg de ajo en un volumen de administración de 150 µl, siguiendo las pautas descritas anteriormente. Las dosis se preparaban diariamente, diluyendo la disolución madre de ajo (1 g/ml) en el volumen necesario de agua mineral autoclavada.

3.2- MÉTODOS

3.2.1- MANEJO DE HOSPEDADORES DEFINITIVOS

Para el desarrollo experimental de este trabajo se han manejado los hospedadores definitivos experimentales de *E. caproni* en diferentes circunstancias: 1) infección con las metacercarias; 2) administración del preparado de ajo; 3) toma de muestras para el análisis coprológico y 4) sacrificio y la necropsia de los animales.

Los ratones se infectaron con 50 metacercarias de *E. caproni* obtenidas de la disección de gasterópodos segundos hospedadores intermediarios, tal y como se ha descrito. Bajo la lupa binocular, las metacercarias se agrupan en la dosis requerida y, con una cánula metálica de 0,8 x 25 mm, acoplada a una jeringa de 1 ml de capacidad, se recogen en el mínimo volumen posible de agua mineral natural. Una vez inmovilizado el ratón se introduce la cánula, administrándole las metacercarias por vía oral. A continuación, se realizan varios lavados de la cánula, asegurando que no queden metacercarias en su interior. En tal caso, las metacercarias remanentes se reagrupan y se repite el mismo proceso. Todas las infecciones se realizaron en el animalario de la Facultat de Farmàcia.

Igualmente, la administración del preparado de ajo a los hospedadores definitivos experimentales se realizó empleando una cánula metálica acoplada a una jeringuilla. De acuerdo con el diseño experimental (Figura 2), A cada animal se le administró diariamente una dosis oral de 50 mg/Kg de ajo, disperso en 150 µl de agua mineral natural.

Una manera de controlar el establecimiento del parásito y evaluar el desarrollo del mismo consiste en examinar las heces de los hospedadores para detectar y recontar el número de huevos de *E. caproni*. Esto permite confirmar que la infección con las metacercarias ha resultado efectiva y, al mismo tiempo, estimar la fecundidad de los adultos establecidos. Para ello, transcurridos 15 días de la infección, los ratones se individualizaron y se recogieron las heces de cada ejemplar. Estas heces se analizaron mediante la técnica de Kato-Katz (Kato & Miura, 1954; Katz et al., 1972), que permite la detección y cuantificación de huevos de helmintos en heces formes. Para llevar a cabo esta técnica, las heces se raspan sobre una superficie dura con una espátula plana y se hacen pasar a través de un tamiz con una luz de malla de 500 µm. Una vez tamizadas, se recoge con la espátula la cantidad suficiente para rellenar un molde de 6 x 1,5 mm, que corresponde con 41,7 mg de muestra, de manera que contando todos los huevos de una preparación se puede calcular el número de huevos

emitidos por gramo de heces. Finalmente, se añade sobre las heces un trozo de papel de celofán impregnado en una solución de colorante verde malaquita, glicerina y agua y se extiende la muestra fecal de forma uniforme por compresión. Esta preparación se observa al microscopio buscando huevos, que permanecen sin teñir, por lo que resaltan sobre el fondo verde de la preparación. Los huevos de *E. caproni*, concretamente, son ovalados, operculados y de unas dimensiones de 122 x 75 μm (Fujino et al., 2000).

Para el desarrollo experimental de este trabajo fue necesaria la disección de los hospedadores definitivos, la cual se llevó a cabo en el laboratorio, tras el sacrificio de los animales por inhalación de vapor de isoflurano (IsoFlo[®], Esteve Veterinaria), de acuerdo con la normativa vigente.

Tras el sacrificio, los animales fueron diseccionados inmediatamente, realizando un corte longitudinal en el abdomen, desde la zona anal hasta el esternón y sendos cortes transversales a nivel torácico. Una vez abierta la cavidad abdominal se extraían las vísceras, recogiendo el intestino delgado, ya que el íleon es el lugar de fijación de las formas adultas de *E. caproni*. El intestino delgado se diseccionó longitudinalmente a la luz de la lupa binocular, recontando el número de adultos del parásito que se recuperó de cada uno de los hospedadores definitivos. Los adultos de *E. caproni*, que se encuentran fijados a la mucosa intestinal, se extraen cuidadosamente utilizando pinzas quirúrgicas y se trasladan a placas Petri con medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640) GlutaMAX[™] (Life Technologies[™]), precalentado a 37 °C.

3.2.2- ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN

3.2.2.1- OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Los productos de excreción/secreción (ESPs) son soluciones complejas, compuestas mayoritariamente por proteínas heterogéneas que son liberadas al medio externo por el parásito vivo. Para la obtención de los ESPs de los adultos de *E. caproni* en las distintas condiciones de exposición a ajo se llevó a cabo el procedimiento descrito por Cortés et al. (2016), que se detalla a continuación.

Tras su recolección y recuento, los adultos se lavaron para eliminar posibles restos intestinales pasándolos por varias placas Petri con medio RPMI GlutaMAX™ en agitación suave. Una vez limpios, los adultos recuperados de cada grupo de hospedadores (Control, Profiláctico, Terapéutico y Continuo) se recogieron en tubos de 15 ml con medio RPMI GlutaMAX™, conteniendo antibióticos (100 U de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina) e inhibidor de proteasas cOmplete, mini EDTA-free (Roche) a la concentración indicada por el fabricante. El medio de cultivo se añadió en todos los casos en la misma proporción (40 adultos/ml) y los vermes se incubaron en estufa a 37 °C, con agitación suave, durante 16 h. Tras la incubación, los adultos, que todavía estaban vivos, se desecharon y el medio de cultivo se dividió en varias alícuotas que se centrifugaron 2 veces a 4 °C y a una velocidad de 16.000 g para eliminar las partículas insolubles. El líquido clarificado se conservó a -80 °C hasta su utilización.

La concentración de proteínas en cada uno de los ESPs se cuantificó empleando el reactivo comercial Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), que está basado en el método de Bradford para la cuantificación de proteínas solubles (Bradford, 1976). El reactivo de Bradford es una mezcla de ácido fosfórico, etanol y el colorante azul de Coomassie. En medio acuoso el colorante presenta un tono pardo, pero al interactuar con proteínas solubles cambia a un color azul, cuya absorbancia a 595 nm es proporcional a la cantidad de proteínas que hay en el medio. La mezcla de reacción se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y se procedió a la lectura espectrofotométrica de la absorbancia a 595 nm en un lector de placas de ELISA iMark Microplate Absorbance Reader, empleando el software Microplate Manager™ 6.0 (Bio-Rad). Mediante la interpolación de los resultados en una recta patrón, hallada en las mismas condiciones a partir de una serie de diluciones de concentración creciente y conocida de albúmina de suero bovino, se calculó la concentración de proteínas en cada uno de los ESPs, los cuales se analizaron por triplicado.

3.2.2.2- ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL

Los ESPs se separaron mediante electroforesis monodimensional en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, de acuerdo con el método descrito por Sambrook et al. (1989). La electroforesis es una técnica de separación que consiste en la movilización de moléculas cargadas a través de un medio de soporte por la

acción de un campo eléctrico. Al aplicar una diferencia de potencial entre dos electrodos de carga opuesta las proteínas, cargadas negativamente por efecto del SDS, se desplazan por el medio de soporte a diferente velocidad en función de su peso. Este desplazamiento diferencial permite su separación en forma de bandas discretas a lo largo del medio de soporte.

Para la electroforesis, 40 µg de proteína de cada uno de los ESPs se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10%, lo que permite eliminar las sales, polisacáridos y otros componentes que pueden estar presentes en la muestra, aumentando la pureza de las proteínas. Se utilizó una disolución de TCA al 20%, que se mezcló en proporción 1:1 con cada una de las muestras. Tras su homogenización, las mezclas se dejaron en hielo, en agitación horizontal durante 30 min, para la formación de los agregados de proteínas. A continuación, se centrifugaron a 16.000 g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Los restos de ácido del precipitado se lavaron con 1 ml de agua destilada, centrifugando nuevamente durante 10 min a la misma velocidad. Finalmente, se desechó el sobrenadante y el pellet se dejó secar al aire antes de resuspenderlo en 15 µl de tampón Laemmli [2-mercaptoetanol 0,1%, glicerol 10% y SDS 2% en Tris [tris(hidroximetil)aminometano]-HCl 63 mM (pH 6,8) con trazas de azul de bromofenol]. Todas las muestras se hirvieron durante 5 min antes de cargarlas en el gel.

Los ESPs se separaron en geles SDS-PAGE (8,3 cm x 7 cm x 0,75 mm) al 12% o al 8%, empleando un sistema de electroforesis vertical modelo Mini-Protean[®] 3 Cell (Bio-Rad), en tampón de corrido Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS al 0,1%, fijando un potencial eléctrico de 80 V durante 20 min y, a continuación, de 100 V durante aproximadamente 2 h. Finalmente, los geles se tiñeron durante 1 h a temperatura ambiente en una solución de azul de Coomassie (30% metanol, 7% ácido acético y 0,09% azul de Coomassie) y el exceso de colorante se eliminó con una solución decolorante débil (25% metanol, 7% ácido acético) que se dejó actuar durante toda la noche. Los geles teñidos fueron fotografiados con el sistema de imagen ChemiDoc[™] MP (Bio-Rad) y el software Quantity One[®] para la toma de imágenes.

3.2.2.3- IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las bandas diferenciales que se observaron tras la electroforesis fueron recortadas manualmente de los geles de poliacrilamida y se llevaron a la Unitat de Proteòmica del SCSIE para su identificación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

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

Un total de 5 µl de la mezcla peptídica se cargaron en una columna trampa (NanoLC Column, 3 µm C18-CL, 350 µm x 0,5 mm; Eksigent) y se desalaron con TFA al 0,1% a un flujo de 3 µl/min durante 5 min. A continuación, los péptidos se cargaron en la columna analítica (LC Column, 3 µm C18-CL, 75 µm x 12 cm; Nikkyo) y se equilibraron con una solución de acetonitrilo (ACN) al 5% y ácido fórmico al 0,1%. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal: 5-45% de B en A durante 15 min (siendo A: ácido fórmico al 0,1% y B: ACN al 0,1% en ácido fórmico) a un flujo de 300 nl/min. Los péptidos fueron analizados en un espectrómetro híbrido, cuadrupolo tiempo de vuelo (TOF), nanoESI QqTOF (TripleTOF, AB Sciex) operado en modo de adquisición dependiente de información. El voltaje del ionspray se mantuvo a 2,8 kV y se empleó nitrógeno como gas de colisión. El resto de parámetros de la fuente y posición del spray se optimizaron previamente con una mezcla comercial de proteínas digeridas con tripsina (LC Packings, P/N 161088). Para la adquisición de los resultados se llevó a cabo un barrido de los productos TOF MS entre 350-1.250 m/z durante 0,25 s, seguido de un barrido de los productos de ionización entre 100-1.500 m/z durante 0,05 s, seleccionando los 50 iones (2-5 cargas) más intensos.

Para la identificación de las proteínas, los resultados obtenidos por LC-MS/MS fueron analizados por comparación con las secuencias disponibles en la base de datos del genoma de *E. caproni*, empleando el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science). La búsqueda fue llevada a cabo con especificidad tríptica, permitiendo una sola pérdida de sitio de corte, y con una tolerancia en la medición de la masa de 0,8 Da. La carbamidometilación de cisteína se definió como modificación fija, mientras que la oxidación de metionina y la deamidación de asparagina y glutamina se establecieron como modificaciones variables.

Para completar la identificación de las proteínas de interés, se tomó la secuencia de aminoácidos de la proteína de *E. caproni*, inferida a partir de la secuenciación del genoma del parásito (http://parasite.wormbase.org/Echinostoma_caproni_prjeb1207/Info/Index/), y se

enfrentó mediante BLASTp a las secuencias disponibles en la base de datos de proteínas no redundante del National Center for Biotechnology Information (nrNCBI), con la taxonomía fijada en Trematoda. Asimismo, con la finalidad de obtener una mayor fiabilidad en la identificación se compararon los pesos moleculares experimental y teórico de las proteínas identificadas, este último calculado empleando la herramienta disponible en el portal de recursos bioinformáticos ExPASy.

3.2.3- ESTUDIO DE LA SUPERFICIE DEL PARÁSITO

Con la finalidad de determinar los posibles efectos de *A. sativum* sobre la superficie de los adultos de *E. caproni* se analizaron varios individuos recuperados de ratones de los grupos Control (sin exposición al ajo) y Continuo (con mayor exposición al ajo) mediante microscopía electrónica de superficie (SEM) siguiendo el protocolo descrito por Sorrivias et al. (2014), que se detalla a continuación.

3.2.3.1- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los vermes adultos se lavaron en tampón fosfato 0,1 M, se fijaron por inmersión en fijador de Karnovsky (glutaraldehído 0,5 M y formaldehído 2,5 M) y se llevaron a la Sección de Microscopía del SCSIE, donde se finalizó su procesamiento para poder observarlos mediante SEM. La post-fijación se realizó en tetróxido de osmio al 2% durante 2 h. A continuación, los adultos se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% y 100%) y se secaron completamente llevándolas al punto crítico de este disolvente (punto de presión y temperatura en la que el etanol pasa a fase gaseosa sin generar calor latente de vaporización ni cambios de densidad que puedan deteriorar las muestras). Finalmente, las muestras se recubrieron superficialmente con una capa de 5-7 nm de oro/paladio, mediante pulverización catódica, para volverlas conductoras de calor y de electricidad, lo que proporciona mejores imágenes de SEM y previene la degradación térmica de las muestras bajo el haz de radiación.

3.2.3.2- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE SUPERFICIE (SEM)

La microscopía electrónica utiliza haces de electrones, en lugar de luz visible, como fuente de radiación. La ventaja de este tipo de microscopios es que tienen hasta 100 veces más poder de resolución que los microscopios ópticos, al utilizar una fuente de radiación que tiene menor longitud de onda que los fotones de luz. La SEM es una de las modalidades de microscopía electrónica, caracterizada porque la superficie del material a analizar se recubre de una capa metálica conductora y los detectores del microscopio registran la desviación de los electrones al impactar con la muestra. De este modo, la SEM permite generar una imagen tridimensional de la muestra y estudiar su superficie con detalle (Joy & Howitt, 2003).

En este trabajo se ha utilizado el microscopio electrónico de barrido HITACHI S-4100 de la Sección de Microscopía del SCISE, que cuenta con un cañón de emisión de campo con una resolución de 1,5 nm a 30 kV, un detector de electrones retrodispersados y un sistema de captación digital de imágenes. Se analizaron un total de 4 adultos de *E. caproni* para cada condición (control o exposición continua al ajo), que se fijaron a la placa soporte del microscopio mediante una cinta adhesiva conductora colocándolos, 2 en posición ventral y 2 en posición lateral-dorsal.

3.2.4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se basó en la aplicación de la prueba ANOVA de un factor para evaluar la influencia de la pauta de administración del preparado de *A. sativum* sobre el establecimiento de los adultos de *E. caproni* (número de adultos recuperados) y la fecundidad de los mismos (número de huevos emitidos por gramo de heces). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

Los test de análisis de la varianza o ANOVA son los más empleados para la comparación de medias entre grupos distintos. Concretamente, el test ANOVA de un factor se basa en la existencia de una única variable métrica, o dependiente, y una variable nominal o independiente, la cual puede tomar múltiples valores. La hipótesis nula asume que las medias de la variable métrica son iguales en todas las categorías o grupos. Puesto que se trata de un test paramétrico, requiere una distribución normal de los datos en cada grupo y la existencia

de homocedasticidad entre los grupos de la variable independiente. Es decir, que tengan varianzas iguales. La distribución de las series de datos (número de adultos recuperados o número de huevos por gramo de heces) se confirmó mediante el test de Shapiro-Wilk. Para cada serie de datos, la homogeneidad de las varianzas entre los distintos grupos (Control, Profiláctico, Terapéutico y Continuo) se comprobó empleando el test de Levene. Con motivo de los resultados obtenidos en la aplicación del test ANOVA de un factor, no fue necesario recurrir a un análisis *post hoc* que pusiera de manifiesto las diferencias significativas entre los grupos comparados. Todos los cálculos estadísticos se realizaron empleando el software SPSS Statistics (IBM).

4. RESULTADOS

4.1- RECUENTO DE ESPECÍMENES ADULTOS

Los resultados del recuento de los ejemplares adultos encontrados al diseccionar los 12 ratones infectados por *E. caproni* se muestran en la Tabla 1, donde se expresan tanto los valores absolutos como la media de los adultos obtenidos con su desviación estándar.

| Grupo | No Expuestos | | | Expuestos | | | | | | | | |
|------------------|---------------|----|----|--------------|----|----|--------------|----|----|--------------|----|----|
| | Control | | | Profiláctico | | | Terapéutico | | | Continuo | | |
| Hospedador N° | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| N° Adultos | 23 | 47 | 44 | 37 | 43 | 37 | 27 | 35 | 20 | 40 | 47 | 47 |
| Media Grupo ± DS | 38,00 ± 13,08 | | | 39,00 ± 3,46 | | | 27,33 ± 7,50 | | | 44,66 ± 4,04 | | |
| Media ± DS | 38,00 ± 13,08 | | | 37,00 ± 8,93 | | | | | | | | |

Tabla 1.- Recuento de los adultos de *Echinostoma caproni* recuperados del intestino de los ratones infectados en cada uno de los grupos con diferente exposición al preparado de ajo. Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar (DS) para cada grupo experimental y entre animales expuestos y no expuestos a ajo.

El análisis estadístico no muestra diferencias significativas en el número de especímenes adultos hallados en los diferentes grupos experimentales, indicando que el consumo de ajo antes y/o después de la infección no afecta al establecimiento del parásito en el intestino.

4.2- RECUENTO DE HUEVOS EN HECES

Los resultados del recuento de los huevos encontrados en las heces de los hospedadores definitivos mediante la técnica de Kato-Katz pueden verse en la Tabla 2. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en

el número de huevos emitidos por gramo de heces. La ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales, tanto en el número de adultos recuperados como en el número de huevos por gramo de heces, indica que el consumo de ajo no afecta a la fecundidad de *E. caproni*.

| | Control | Profiláctico | Terapéutico | Continuo |
|---|-------------|--------------|-------------|-------------|
| Nº Huevos (x10³) / g de heces | 4,02 ± 0,40 | 6,19 ± 0,50 | 3,52 ± 2,00 | 9,20 ± 3,80 |

Tabla 2.- Recuento del número de huevos de *Echinostoma caproni* por gramo de heces en los ratones infectados de cada uno de los grupos con diferente exposición al preparado de ajo. Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar para cada grupo experimental.

4.3- COMPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN

Los ESPs se obtuvieron al incubar los adultos de *E. caproni* de cada grupo experimental en medio de cultivo RPMI GlutaMAX™, que contiene rojo fenol como indicador de pH. La adición de los adultos de los grupos expuestos al preparado de ajo produjo en el medio de cultivo un cambio brusco del color, que pasó de rosa a naranja, lo que indica una acidificación rápida del medio. Por el contrario, el medio de cultivo del grupo Control mantuvo su color rosado después de la adición de los adultos (Figura 3). Tras las 16 h de incubación los adultos aún permanecían vivos, y todos los medios de cultivo adquirieron el mismo color amarillo pálido.

Respecto a la cuantificación de los ESPs, el contenido proteico de los secretomas de los distintos grupos experimentales decrece progresivamente conforme aumenta el tiempo de exposición al preparado de ajo (Figura 4). La cantidad de proteína secretada por adulto de *E. caproni* descendió de 8,24 µg en el grupo Control a un mínimo de 1,62 µg en el grupo Continuo. La cantidad de proteína secretada por adulto recuperado en el grupo control fue 1,9, 3,8 y 5,1 veces superior a la secretada por los grupos Profiláctico, Terapéutico y Continuo respectivamente. Estos resultados pueden verse representados en la Figura 4.

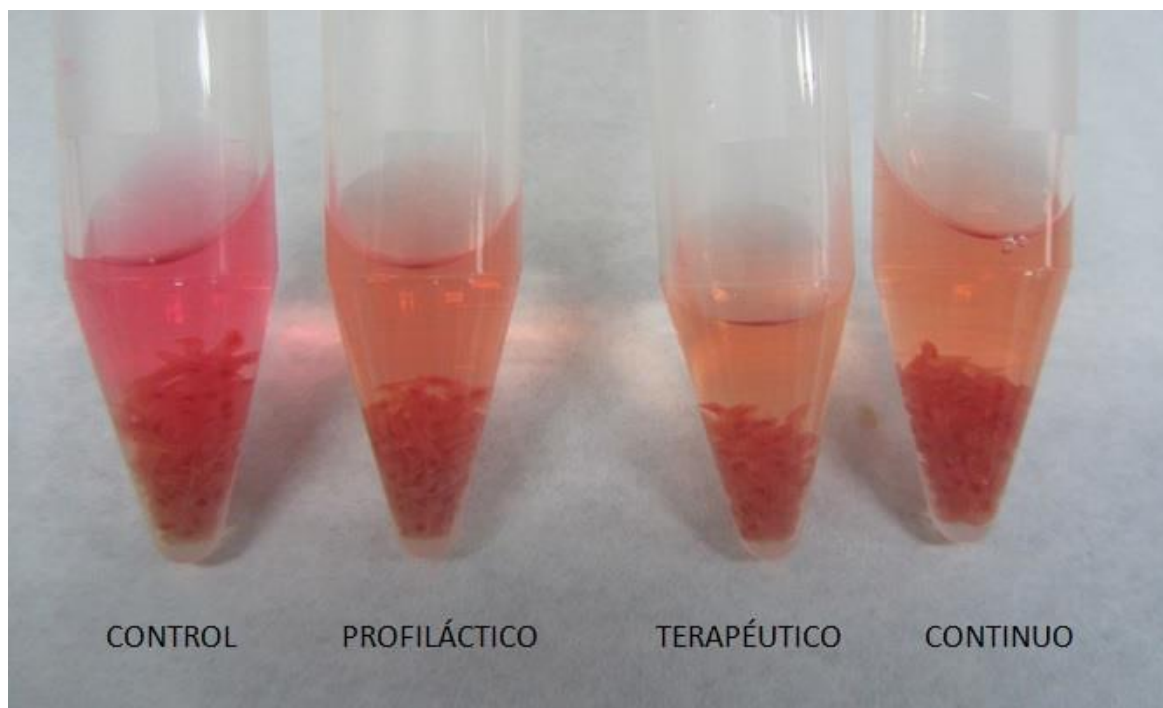


Figura 3.- Imagen de los distintos tonos de los medios RPMI GlutaMAX™ tras añadir los adultos de *Echinostoma caproni* recogidos de los ratones infectados de cada uno de los grupos con diferente exposición al preparado de ajo.

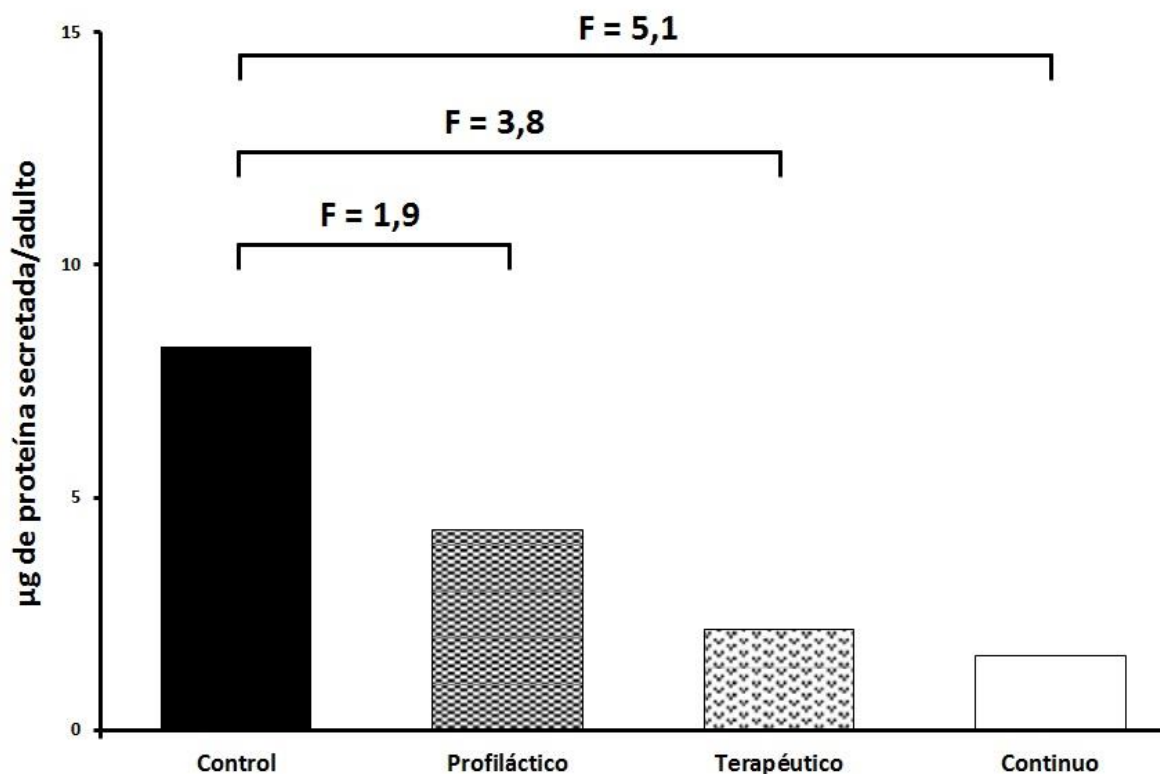


Figura 4.- Cantidad de proteína excretada/secretada por adulto de *Echinostoma caproni* al medio de cultivo en cada uno de los grupos experimentales con diferente exposición al preparado de ajo.

La misma cantidad de proteína de los ESPs de cada grupo experimental se separó mediante SDS-PAGE. Los diferentes perfiles electroforéticos pueden verse en la Figura 5. En los 4 grupos experimentales los perfiles proteicos fueron bastante similares, aunque se pueden observar algunas diferencias. Los geles de poliacrilamida al 12% revelaron diferencias en la cantidad de proteína de una banda a alrededor de 29 KDa y varias bandas de más de 100 KDa. Tras la resolución de las proteínas de alto peso molecular en geles de poliacrilamida al 8%, tres bandas de aproximadamente 80, 100 y 200 kDa respectivamente mostraron diferencias en la cantidad de proteína. Todas las proteínas diferenciales mostraron el mismo patrón dosis-dependiente, siendo más abundantes a medida que aumentaba la exposición del ajo.

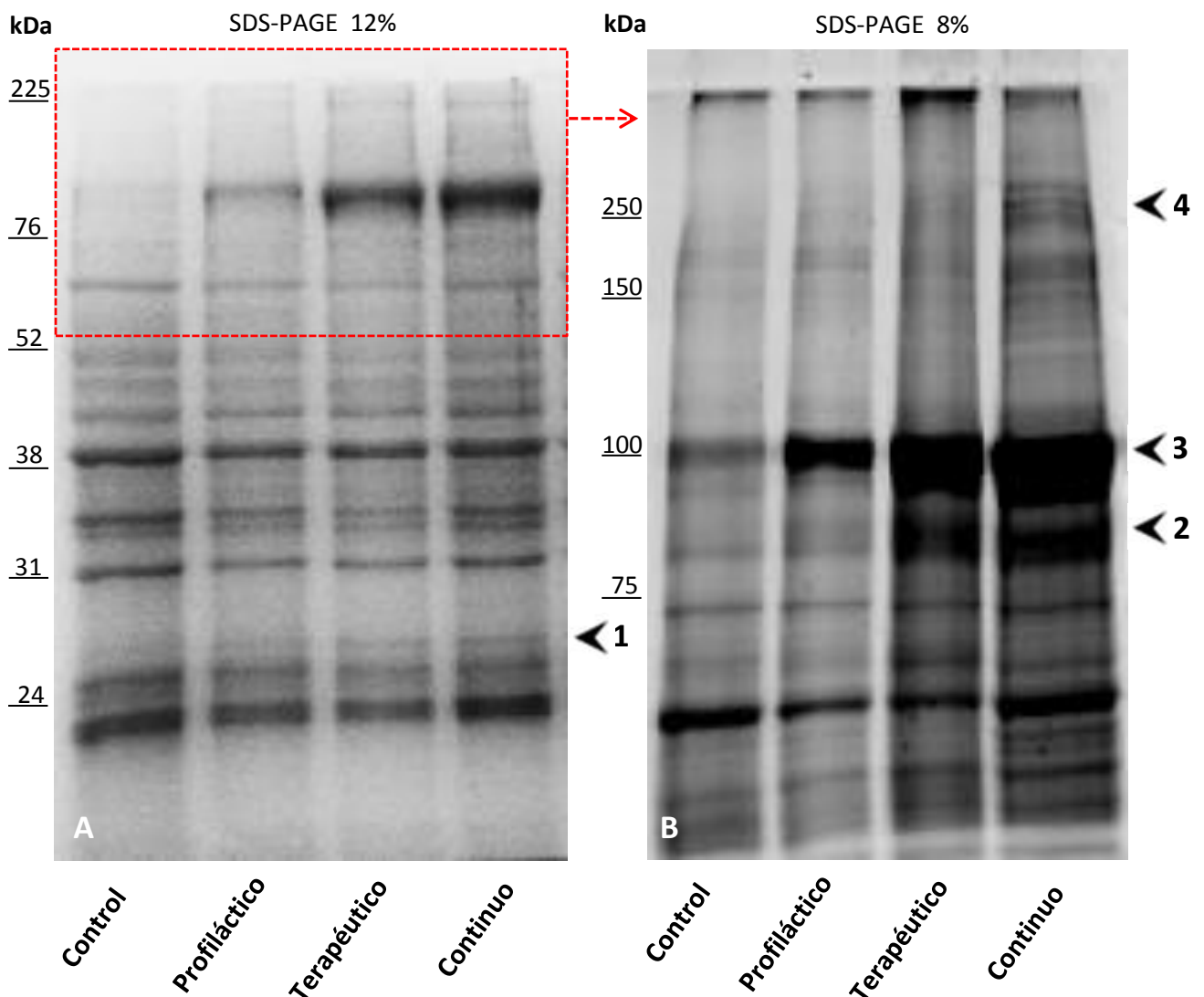


Figura 5.- Imágenes de los productos de excreción/secreción en geles SDS-PAGE al 12% (A) y al 8% (B). Las calles de cada gel contienen los ESPs de los grupos Control, Profiláctico, Terapéutico y Continuo respectivamente. Señaladas por flechas negras se encuentran las bandas de proteínas expresadas diferencialmente que se identificaron mediante espectrometría de masas (véase Tabla 3).

4.4- IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DIFERENCIALES

Los resultados del análisis de los datos proporcionados por la espectrometría de masas aparecen resumidos en la Tabla 3. Para cada banda se indican los resultados de la proteína identificada, al comparar los datos obtenidos por espectrometría de masas con la secuencia de aminoácidos de las proteínas de *E. caproni* inferidas a partir de la secuencia del genoma del parásito. Se identificaron un total de cuatro proteínas secretadas diferencialmente entre los grupos expuestos al preparado de ajo y el grupo Control. Entre ellas hay dos que se relacionan con la señalización celular, como son una proteína 14-3-3 (Banda 1) y la *major vault protein* (Banda 3); una ATPasa transicional del retículo endoplásmico (Banda 2); y un inhibidor de proteasas, como la proteína 1 tipo alfa-2-macroglobulina (Banda 4).

4.5- ESTUDIO DE LA SUPERFICIE MEDIANTE SEM

Cuatro especímenes del grupo Control (sin exposición a *A. sativum*) y cuatro del grupo Continuo (con máxima exposición a *A. sativum*) fueron seleccionados para el estudio de su superficie mediante SEM. El estudio se centró en 4 regiones anatómicas: la superficie alrededor de la ventosa oral, la superficie ventral, la superficie lateral y la superficie dorsal. Imágenes representativas de los adultos de cada grupo se muestran en las Figuras 6 a 9.

Tanto en los especímenes control como en los expuestos al ajo la superficie del collar cefálico, alrededor de la ventosa oral, muestra la misma estructura: una superficie lisa con estriaciones longitudinales que van desde la periferia al orificio de la ventosa, tal como puede verse en la Figura 6. Sin embargo, en uno de los adultos con exposición continua al preparado de *A. sativum* se observaron en esta región signos de descamación y de deterioro que podrían deberse al efecto del preparado de ajo (Figura 6).

Los resultados obtenidos al comparar la superficie ventral de los adultos pueden verse en la Figura 7. Se puede observar un cambio significativo en la morfología del tegumento y de las espinas de actina de los adultos expuestos al preparado de *A. sativum* respecto de los controles. Los especímenes control muestran el aspecto típico, con toda su superficie ventral recubierta de espinas, y un tegumento en su mayoría liso y uniforme. En los especímenes expuestos al ajo el tegumento se muestra hinchado y lleno de estriaciones. A consecuencia de

| Identificación | | Resultados MASCOT | | | | | Resultados BLASTp ^f | | | | PM Exp. (KDa) ^g | PM Teórico (KDa) | |
|--------------------|-------------------------------|---|---------------------------------------|-------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|-------|------------|------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Banda ^a | Numero de Acceso ^b | Proteína | Especies (Acc) ^c | Score | Coincidencias ^d | Péptidos ^e | Valor-E | Score | Cober. (%) | Ident. (%) | | Sec. aa BD ^h | Homol. BLASTp ⁱ |
| 1 | ECPE_0000984501-mRNA-1 | 14-3-3 | <i>Clonorchis sinensis</i> (GAA36880) | 5504 | 75 | 21 | 8·10 ⁻¹³⁴ | 380 | 93 | 77 | ± 29 | 28,78 | 35,20 |
| 2 | ECPE_0001043101-mRNA-1 | ATPasa transicional del Retículo Endoplásmico | <i>C. sinensis</i> (GAA28937) | 2855 | 63 | 42 | 0 | 1417 | 97 | 95 | ± 80 | 82,29 | 137,20 |
| 3 | ECPE_0001276401-mRNA-1 | Major Vault Protein | <i>Schistosoma mansoni</i> (CCD75353) | 2019 | 44 | 31 | 0 | 952 | 99 | 65 | ± 100 | 77,21 | 97,25 |
| 4 | ECPE_0000476901-mRNA-1 | Proteína 1 tipo Alfa-2-macroglobulina | <i>C. sinensis</i> (GAA52061) | 2222 | 52 | 33 | 0 | 927 | 99 | 39 | ± 200 | 152,56 | 218,10 |

^a Numero de referencia de la banda (ver Figura 5).

^b Número de acceso en la base de datos *Echinostoma caproni*.

^c Número de acceso en la base de datos de proteínas del NCBI.

^d Número de coincidencias significativas.

^e Número de péptidos significativos.

^f Detalles del BLAST de proteínas entre la proteína traducida del genoma de *E. caproni* frente a la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI.

^g Peso molecular experimental.

^h Peso molecular teórico de la proteína en la base de datos *E. caproni*.

ⁱ Peso molecular teórico de la proteína homóloga identificada por BLASTp.

Tabla 3.- Resultados de la identificación de las proteínas diferenciales en los productos de excreción/secreción de *Echinostoma caproni* recuperados de los diferentes grupos experimentales.

la hinchazón las espinas son mucho menos prominentes y con aspecto aplanado, y muchas presentan la punta rota. Estos cambios en la morfología de la espina son debidos a que están recubiertas en mayor medida por la capa superficial del tegumento.

La Figura 8 muestra los resultados de la superficie dorsal de los adultos controles y expuestos al preparado de ajo respectivamente. En esta parte la superficie *E. caproni* no posee espinas tegumentarias. Los especímenes control muestran un aspecto normal, con un tegumento liso, uniforme, sin espinas y con estriaciones largas, profundas y bastante gruesas. En este caso, los especímenes expuestos al preparado de *A. sativum* también muestran cambios evidentes en su estructura. El tegumento se encuentra hinchado lo que provoca que sus estriaciones se vuelvan suaves, menos pronunciadas y menos gruesas.

La superficie lateral de los adultos control y expuestos al preparado de ajo puede verse en la Figura 9. En esta parte, la superficie de *E. caproni* contiene espinas laterales que desaparecen progresivamente conforme se avanza de la zona más ventral hacia la zona más dorsal. En este caso los adultos control muestran el aspecto habitual en su tegumento y en sus espinas laterales. La morfología de las espinas laterales de los especímenes expuestos al preparado de ajo muestra los mismos cambios que los descritos para las espinas ventrales. El tegumento de la superficie lateral también se encuentra hinchado, y muestra los mismos cambios en su estructura que los descritos para la superficie ventral y la superficie dorsal.

CONTROL

EXPUESTO (CONTINUO)

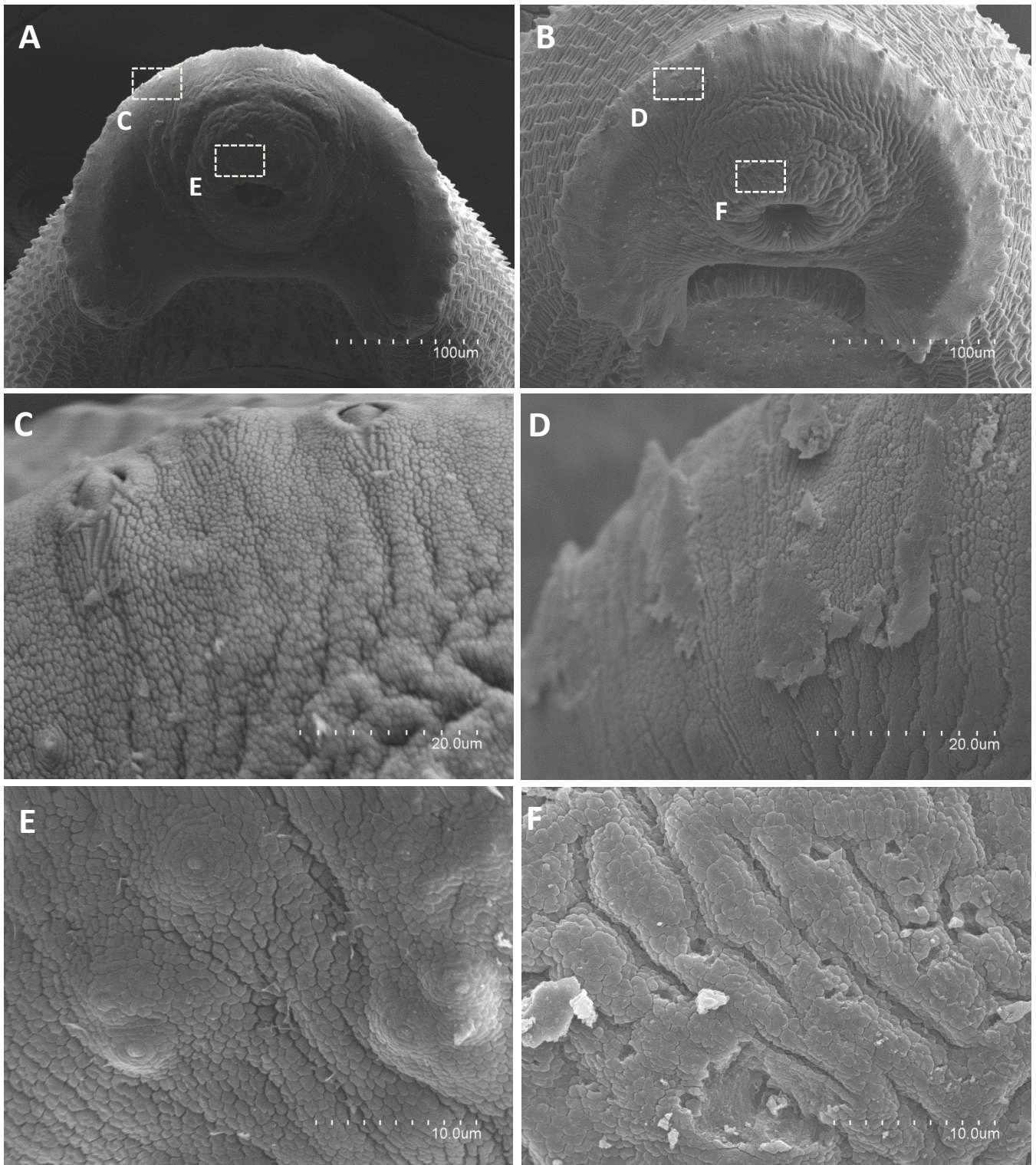


Figura 6.- Imágenes obtenidas por SEM de la superficie del collar cefálico y la ventosa oral de *Echinostoma caproni* en los grupos Control y Continuo. Los cuadros indican las zonas de la superficie que se han ampliado para mostrar la descamación (D) y el deterioro (F) del tegumento en esta zona en uno de los adultos expuestos a ajo respecto al grupo Control (C, E). Cada imagen incorpora su propia escala, dividida en segmentos que corresponden a la décima parte de la longitud indicada.

CONTROL

EXPUESTO (CONTINUO)

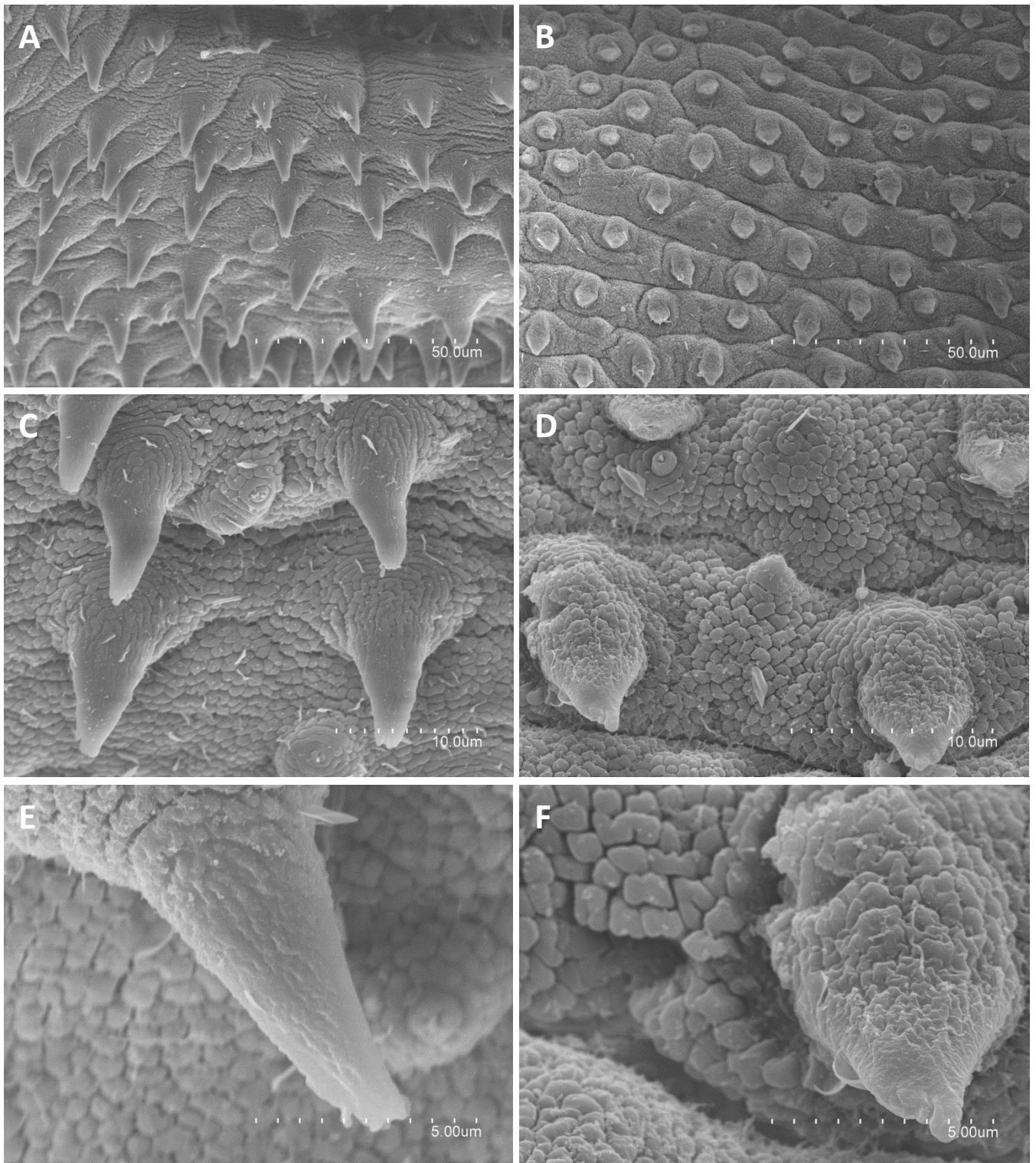


Figura 7.- Imágenes obtenidas por SEM de la superficie ventral de *Echinostoma caproni* en los grupos experimentales **Control** y **Continuo**. Cada imagen incorpora su propia escala, dividida en segmentos que corresponden a la décima parte de la longitud indicada. Los paneles C-F muestran en detalle la apariencia del tegumento y las espinas en cada grupo.

CONTROL

EXPUESTO (CONTINUO)

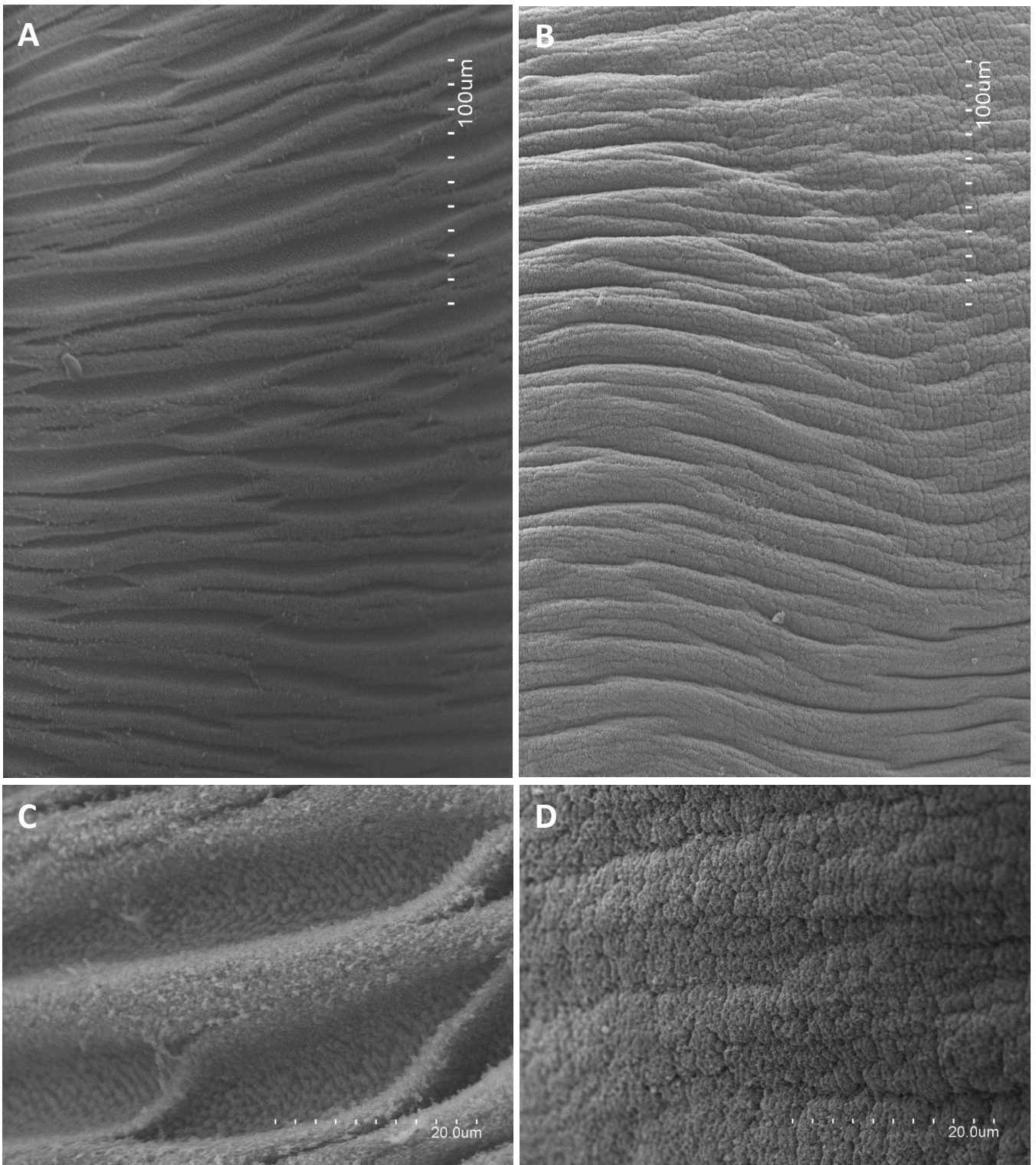
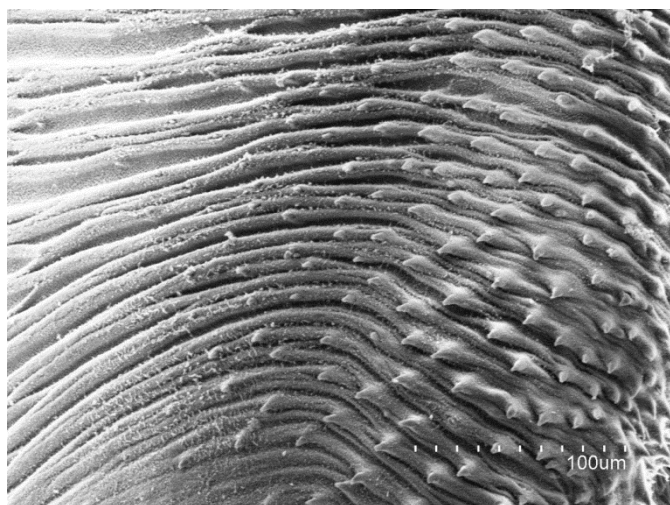


Figura 8.- Imágenes obtenidas por SEM de la superficie dorsal de *Echinostoma caproni* en los grupos experimentales **Control** y **Continuo**. Cada imagen incorpora su propia escala, dividida en segmentos que corresponden a la décima parte de la longitud indicada. Los paneles C y D muestran en detalle la superficie dorsal de los adultos de cada grupo.

CONTROL



EXPUESTO (CONTINUO)

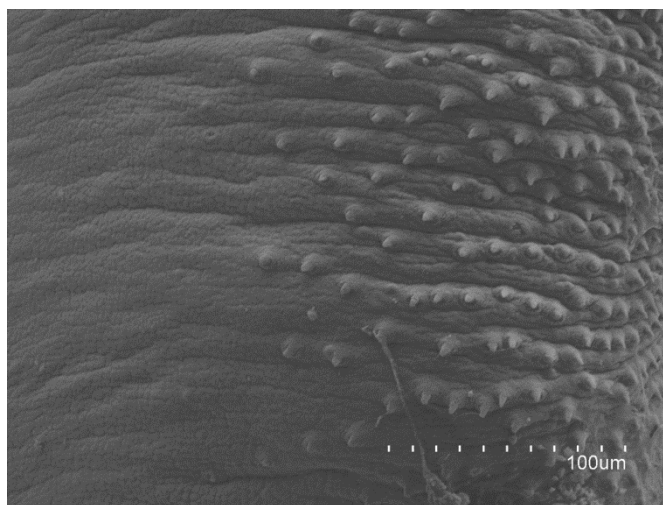


Figura 9.- Imágenes obtenidas por SEM de la superficie lateral de *Echinostoma caproni* en los grupos experimentales **Control y Continuo**. Cada imagen incorpora su propia escala, dividida en segmentos que corresponden a la décima parte de la longitud indicada.

5. DISCUSIÓN

La continua aparición de resistencias a los fármacos habituales y el actual fracaso en el desarrollo de las vacunas hace necesario estudiar nuevos compuestos con actividad antihelmíntica, con el fin de encontrar nuevos fármacos útiles y hallar nuevas dianas terapéuticas. Los potenciales beneficios para la salud del consumo de ajo se conocen desde antiguo (Rivlin, 2001) y su acción antihelmíntica ha sido documentada frente a *S. mansoni* (Riad et al., 2009; Mantawy et al., 2011, 2012) y platelmintos de la clase Monogenea (Fridman et al., 2014). El presente estudio busca analizar los efectos de *A. sativum in vivo* frente a la infección experimental con *E. caproni* en ratón.

Los resultados obtenidos muestran tasas de recuperación de adultos y recuentos de huevos por gramo de heces similares en los cuatro grupos experimentales estudiados, lo que indica que ni el establecimiento ni la fecundidad del parásito se ven afectados por el consumo de ajo en la dosis utilizada, en ninguna de las pautas de administración seguidas. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que el establecimiento y el desarrollo de *E. caproni* dependen directamente de la respuesta inmunitaria local generada por el hospedador (Toledo et al., 2004; Muñoz-Antolí et al., 2007, 2013; Sotillo et al., 2011; Trelis et al., 2011). Los ratones, que son hospedadores de alta compatibilidad, desarrollan infecciones crónicas que se correlacionan con el desarrollo de fuertes respuestas inflamatorias de tipo Th1, con niveles elevados de interferón gamma y óxido nítrico (Sotillo et al., 2011; Trelis et al., 2011). En cambio, en hospedadores de baja compatibilidad, como por ejemplo las ratas, la infección por *E. caproni* tiene un curso agudo y los parásitos son eliminados del intestino a las pocas semanas de la infección, coincidiendo con el desarrollo de respuestas locales de tipo Th2/Th17 (Sotillo et al., 2011; Trelis et al., 2011). La acción inmunomoduladora del ajo ha sido bien documentada (Arreola et al., 2015) y diversos estudios han publicado evidencias de cambios en la expresión de varias citoquinas en distintos tipos celulares en respuesta al ajo (Kang et al., 2001; Keiss et al., 2003; Makris et al., 2005). Sin embargo, Cortés et al. (2017) no observaron diferencias significativas en el perfil de expresión de citoquinas a nivel local en ratones infectados con *E. caproni* y expuestos a ajo en las mismas condiciones empleadas en este trabajo (Anexo 1). Esto sugiere que las alteraciones inducidas por el ajo que se describen en el presente trabajo no están mediadas por la respuesta inmunitaria del hospedador.

A pesar de que no se obtuvieron diferencias en cuanto al establecimiento de la infección, sí que se observaron cambios notables en varias características de los vermes expuestos al preparado de ajo, concretamente a dos niveles: 1) en la superficie del tegumento y 2) en la composición del secretoma.

Se observaron cambios importantes en la superficie del parásito, en el tegumento de los adultos de *E. caproni* recuperados de ratones expuestos al preparado de ajo. La apariencia del tegumento en los adultos del grupo Control observado por SEM coincide con las descripciones previas realizadas por otros autores (Keiser et al., 2006; Sotillo et al., 2010b). En cuanto a las alteraciones observadas en los parásitos sometidos al ajo, estas son similares a las que inducen algunos fármacos trematocidas sobre el tegumento de otros trematodos transmitidos por alimentos. La hinchazón y las estriaciones de la superficie externa que se observaron en nuestro estudio se han descrito previamente en otras especies de trematodos en respuesta al tratamiento con clorsulón (Meaney et al., 2005), triclabendazol (Halferty et al., 2009), artesunato (O' Neill et al., 2015) y praziquantel (Gonçalves et al., 2013). Sin embargo, en este estudio no se han observado otras lesiones más severas descritas por estos autores, como la erosión del tegumento, la formación de ampollas, o la pérdida de espinas tegumentarias. La ausencia de cambios en la estructura de las ventosas oral y ventral, implicadas en los procesos de alimentación y adhesión a la mucosa intestinal del hospedador, respectivamente, puede explicar las altas tasas de recuperación adultos obtenidas en los ratones expuestos al ajo, a pesar de las alteraciones tegumentarias descritas. Los cambios en la superficie tegumentaria suelen ir acompañados por alteraciones en las subestructuras internas del tegumento y en la organización de sus componentes (Halferty et al., 2009; Riad et al., 2009; Gonçalves et al., 2013; O' Neill et al., 2015). Cortés et al. (2017) han descrito, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), numerosas alteraciones en la estructura del tegumento y sub-tegumento de *E. caproni* como consecuencia de la exposición al ajo. Por ejemplo, se ha observado engrosamiento del sincitio tegumentario y la lámina basal; alteraciones en los cuerpos secretores; pérdida de empaquetamiento de los haces de fibras musculares y el parénquima; y alteraciones en las células formadoras del tegumento. Estos cambios en la estructura interna del tegumento (Anexo 1) contribuyen a explicar las alteraciones observadas en el presente trabajo en la superficie tegumentaria y el secretoma de los adultos expuestos al ajo.

El análisis de los ESPs de los diferentes grupos experimentales mostró un descenso importante en la secreción de proteína total tras la exposición al ajo, lo que puede explicarse

por las alteraciones en los cuerpos secretores del tegumento descritas por Cortés et al. (2017). En cambio, se observó que la secreción de varias proteínas aumenta en respuesta al ajo de forma dosis-dependiente. Se identificaron un total de cuatro proteínas secretadas diferencialmente entre los grupos expuestos y el Control, las cuales podrían jugar un papel importante en la respuesta del parásito a la toxicidad inducida por el preparado de ajo.

Una de las proteínas sobre-reguladas tras la exposición al ajo fue una proteína 14-3-3. Las 14-3-3 son una superfamilia de proteínas altamente conservadas en todos los eucariotas, claves en la señalización celular, que participan en la regulación de una gran variedad de procesos tales como el ciclo celular, la apoptosis o la respuesta celular al estrés (Siles-Lucas & Gottstein, 2003). En trematodos las proteínas 14-3-3 se encuentran ampliamente distribuidas en el tegumento, el sub-tegumento, el tejido muscular, el parénquima y en el espacio externo (Schechtman et al., 2001a; Wang et al., 2012), lo que ha llevado a que diversos autores las propongan como candidatas para su estudio en la elaboración de vacunas contra helmintos (Schechtman et al., 2001b; Wang et al., 2012).

Otra proteína sobre-regulada en los adultos recuperados de ratones expuestos al preparado de ajo fue la ATPasa del retículo endoplásmico transicional (tER-ATPasa), también conocida como proteína con valosina (VCP/p97). Se trata de una proteína altamente conservada en el retículo endoplásmico, implicada en la homeostasis de proteínas de las células eucariotas, y que tiene un papel en procesos celulares como la respuesta a las lesiones en el DNA, el control del ciclo celular, los intercambios endosomales, la autofagia o el control de la calidad mitocondrial (Yamanaka et al., 2012). Se ha comprobado que la tER-ATPasa del protozoo *Leishmania sp.* presenta un dominio de unión a integrinas y está implicada en la adhesión celular (Peyssele et al., 2013), de modo que su sobre-expresión en el secretoma de *E. caproni* sugiere que puede tener un papel importante en la interacción parásito-hospedador.

La major vault protein (MVP), otra proteína implicada en la señalización celular, se encontró aumentada en los ESPs en respuesta a la exposición a ajo. MVP es el componente principal de los *vaults* o bóvedas, un tipo de ribonucleoproteínas extremadamente conservadas en múltiples especies, aunque ausente en algunos organismos modelo como *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster* entre otros. La función celular de las *vaults* no se conoce con detalle. Sin embargo, numerosos estudios sugieren su papel en la multiresistencia a fármacos, en la transmisión de señales y en la respuesta inmunitaria (Berger et al., 2009).

Recientemente se ha documentado la sobre-expresión de MVP en diversos estadios de *S. mansoni* resistente al praziquantel (Reis et al., 2014). Aunque los mecanismos exactos de la resistencia mediada por las *vaults* son poco conocidos, la mayor producción de MVP en los adultos de *E. caproni* expuestos al ajo sugiere el papel de este complejo en la respuesta a compuestos tóxicos, y puede ser indicativo de la activación de mecanismos de resistencia que promuevan la supervivencia del parásito.

Una proteína de tipo alfa-2-macroglobulina se encontró también sobre-regulada en los adultos expuestos al ajo. Las alfa-2-macroglobulinas son inhibidores de proteasas de amplio espectro, que actúan por unión directa a la proteasa diana (Armstrong, 2006). Mientras que las proteasas son factores de virulencia que favorecen la infección, estas alfa-2-macroglobulinas se consideran parte del sistema inmunitario innato de vertebrados, moluscos y artrópodos (Armstrong, 2006). Aunque actualmente se conoce la secuencia de los dominios funcionales de las alfa-2-macroglobulinas, no se dispone de información acerca de sus funciones concretas en helmintos. No obstante, la sobre-regulación de esta proteína en el contexto de un ambiente tóxico sugiere que puede estar implicada en la respuesta defensiva del parásito y/o en su interacción con el hospedador.

En conjunto, el aumento en la producción y/o liberación al medio de estas 4 proteínas en por parte de los adultos de *E. caproni* expuestos al preparado de ajo sugiere que pueden ser importantes en los mecanismos defensivos del parásito contra compuestos tóxicos, tales como la respuesta celular al estrés, la respuesta inmunitaria innata, la interacción parásito-hospedador, o la resistencia a fármacos, por lo que podrían ser consideradas como dianas potenciales para el futuro desarrollo de nuevos fármacos trematocidas y/o vacunas anti-helmínticas.

La alteración de las estructuras internas del tegumento de *E. caproni* por efecto del ajo es consistente con el cambio de color del medio de cultivo observado en los adultos expuestos al ajo. En otros trematodos la acidificación del medio de cultivo se debe a la secreción de ácido láctico, un producto final del metabolismo de la glucosa que debe ser eliminado para evitar la inhibición de rutas metabólicas y para mantener índices altos de glicólisis. En *S. mansoni* el lactato es transportado al exterior a través de una aquaporina tegumentaria (Gihtui et al., 2006; Faghiri et al., 2010), una proteína transmembrana que actúa como poro selectivo para el transporte de agua entre el interior y el exterior de la célula (Gonen & Walz, 2006). Los helmintos necesitan aquaporinas funcionales para regular su contenido acuoso en respuesta a

cambios en la tonicidad del medio y poder mantener su viabilidad (Faghiri & Skelly, 2009). La acidificación rápida del medio de cultivo coincidió con los grupos experimentales en los que se observó hinchazón del tegumento, sugiriendo que ambas alteraciones podrían estar relacionadas y deberse a la perturbación de la capacidad osmoreguladora de *E. caproni* por efecto del ajo.

En resumen, los resultados de este trabajo ponen de manifiesto los potenciales efectos trematocidas de los compuestos de *A. sativum*. Aunque el consumo de ajo a dosis dietéticas no parece ser eficaz como antihelmíntico, se han observado cambios perjudiciales dosis-dependientes en los parásitos expuestos a sus compuestos. Los efectos perjudiciales observados sobre la superficie tegumentaria son similares a los ocasionados por algunos fármacos con actividad trematocida. Dado que la integridad del tegumento es esencial para las funciones vitales del parásito, tales como su nutrición, inmunoprotección y osmoregulación, podrían esperarse efectos letales a dosis más altas. El estudio del secretoma del parásito en respuesta a la exposición al ajo proporciona nuevos datos que pueden ser útiles en la identificación de potenciales dianas farmacológicas y, por otra parte, contribuye a esclarecer los mecanismos moleculares a través de los cuales el parásito responde a ambientes tóxicos y que conducen al desarrollo de resistencias.

Aunque aún son necesarios estudios adicionales sobre la identificación de los sitios activos, dosis terapéuticas, modos de la acción...etc. de los compuestos de *A. sativum*, este estudio ha demostrado *in vivo* los efectos directos del ajo en helmintos intestinales. Además, uno de los resultados más interesantes ha sido que algunos efectos, como los cambios cuantitativos y cualitativos en la secreción de proteínas o la acidificación rápida del medio de cultivo, ocurren también en los helmintos que no fueron expuestos al ajo directamente, sino cuando este se administró como profiláctico. Este hecho abre la posibilidad de que, además de los efectos directos observados sobre el parásito, los compuestos del ajo puedan actuar indirectamente, induciendo cambios más o menos duraderos en el intestino del hospedador que podrían afectar a los adultos que se establecen posteriormente.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este Trabajo de Fin de Grado son las siguientes:

1. No se recomienda la utilización del ajo con finalidad profiláctica ni terapéutica frente a infecciones por trematodos intestinales, puesto que su consumo en dosis dietéticas ha demostrado no ser eficaz en la prevención ni la eliminación de la infección por *E. caproni*;
2. Sin embargo, dosis dietéticas de *A. sativum* en diferentes pautas de exposición provocan cambios dosis-dependientes en la concentración y en el perfil proteico del secretoma de *E. caproni*;
3. Al menos 4 proteínas resultan diferencialmente excretadas/secretadas tras la exposición a dosis dietéticas de *A. sativum*. Estas proteínas pueden estar implicadas en los mecanismos defensivos de *E. caproni* contra compuestos tóxicos, por lo que podrían ser consideradas como dianas potenciales para el futuro desarrollo de fármacos y/o vacunas contra helmintos intestinales;
4. La exposición a dosis dietéticas de *A. sativum* induce cambios evidentes en la morfología de la superficie tegumentaria de *E. caproni*. Estos cambios morfológicos podrían relacionarse con cambios en su estructura interna, lo que revela la potencial utilidad de los compuestos activos de *A. sativum* en el desarrollo de nuevos fármacos trematocidas;
5. Los resultados obtenidos sugieren que el ajo puede ser estudiado como una fuente potencial de compuestos con actividad trematocida.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Ghaffar F, Semmler M, Al-Rasheid KA et al. 2011. The effects of different plant extracts on intestinal cestodes and on trematodes. *Parásitol Res.* 108: 979-984.

Arreola R, Quintero-Fabian S, Lopez-Roa RI et al. 2015. Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds. *J Immunol Res.* 2015: 401630.

Armstrong PB. 2006. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology.* 211(4): 263-281.

Baby C, Gopal K, Nazia K & Shahid HA. 2013. Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review. *J Adv Pharm Technol Res.* 4(1): 4-8.

Berger W, Steiner E, Grusch M, Elbling L & Micksche M. 2009. Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci.* 66(1): 43-61.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Brower V. 1998. Nutraceuticals: Poised for a healthy slice of the healthcare market?. *Nat Biotechnol.* 16: 728-731.

Cortés A, Sotillo J, Muñoz-Antolí C, Trelis M, Esteban JG & Toledo R. 2016. Definitive host influences the proteomic profile of excretory/secretory products of the trematode *Echinostoma caproni*. *Parasit Vectors.* 31(9): 185.

Cortés A, García-Ferrús M, Sotillo J, Esteban JG, Toledo R & Muñoz-Antolí C. 2017. Effects of dietary intake of garlic on intestinal trematodes. *Parásitol Res.* Epub ahead of print.

Drake LH, Jukes MCH, Sternberg RJ & Bundy DAP. 2000. Geohelminth infections (ascariasis, trichuriasis, and hookworm): Cognitive and developmental impacts. *Sem Pediatr Inf Dis.* 11(4): 245-251.

Directiva 2010/63/UE del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. (Diario Oficial L 276 de 20.10.2010).

Faghiri Z, Camargo SM, Huggel K et al. 2010. The tegument of the human parasitic worm *Schistosoma mansoni* as an excretory organ: the surface aquaporin SmaQP is a lactate transporter. *PloS One.* 3(5): e10451.

- Faghiri Z & Skelly PJ. 2009. The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake. *FASEB J.* 23: 2780-2789.
- Fridman S, Sinai T & Zilberg D. 2014. Efficacy of garlic based treatments against monogenean parasites infecting the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). *Vet Parasitol.* 203: 51-58.
- Fujino T & Fried B. 1993. Expulsion of *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914) Kanev, 1985 and retention of *E. caproni* Richard, 1964 (Trematoda: Echinostomatidae) in C3H mice: pathological, ultrastructural, and cytochemical effects on the host intestine. *Parásitol Res.* 79(4): 286-292.
- Fujino T, Nakano T, Washioka H, Tonosaki A, Ichikawa H & Fried B. 2000. Comparative ultrastructure of eggs in *Echinostoma paraensei*, *E. caproni*, and *E. trivolvis* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parásitol Res.* 86(5): 427-430.
- Gharavi MJ, Nobakht M, Khademvatan S, Fani F, Bakhshayesh M & Roozbehani M. 2011. The effect of aqueous garlic extract on Interleukin-12 and 10 levels in *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) infected macrophages. *Iran J Public Health.* 40(4): 105–111.
- Githui EK, Damian RT & Aman RA. 2006. *Schistosoma mansoni*: biochemical characterization of lactate transporters or similar proteins. *Exp Parasitol.* 114: 180-188.
- Gonçalves JP, Oliveira-Menezes A, Maldonado A, Carvalho TM. & Souza W. 2013. Evaluation of praziquantel effects on *Echinostoma paraensei* ultrastructure. *Vet Parasitol.* 194: 16-25.
- Gonen T & Walz T. 2006. The structure of aquaporins. *Quarterly reviews of biophysics.* 39: 361-396.
- Halferty L, Brennan GP, Trudgett A, Hoey L & Fairweather I. 2009. Relative activity of triclabendazole metabolites against the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol.* 159: 126-138.
- Harris NL. 2011. Advances in helminth immunology: optimism for future vaccine design?. *Trends Parasitol.* 27(7): 288-293.
- Hotez PJ, Alvarado M, Basañez MG et al. 2014. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *Negl Trop Dis.* 24(7): e2465.
- Joy DC & Howittb DG, 2003. Scanning Electron Microscopy. En: Meyers RA, Joy DC, Howittb DG et al. *Encyclopedia of Physical Science and Technology.* 3^a Ed. Elsevier Science Ltd, California; pp: 457-467.
- Kang NS, Moon EY, Cho CG & Pyo S. 2001. Immunomodulating effect of garlic component, allicin, on murine peritoneal macrophages. *Nut Res.* 21: 617-626.
- Kato K & Miura M. 1954. Comparative examinations. *Jap J Parasit.* 3: 35.

- Katz N, Chavez A & Pellegrino J. 1972. A simple device for quantitative stool thick smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 14: 397-400.
- Keiss HP, Dirsch VM, Hartung T et al. 2003. Garlic (*Allium sativum* L.) modulates cytokine expression in lipopolysaccharide-activated human blood thereby inhibiting NF-kappaB activity. J Nutr. 133: 2171-2175.
- Keiser J, Shu-Hua X & Utzinger J. 2006. Effect of tribendimidine on adult *Echinostoma caproni* harbored in mice, including scanning electron microscopic observations. J Parasitol. 92(4): 858-862.
- Keiser J, Duthaler U & Utzinger J. 2010. Update on the diagnosis and treatment of food-borne trematode infections. Curr Opin Infect Dis. 23: 513-520.
- Kokate CK, Purohit AP & Gokhale SB. 2002. Nutraceutical and cosmeceutical. En: Kokate CK, Purohit AP & Gokhale SB. Pharmacognosy. 21^a ed. Editorial Pune, India; pp: 542-549.
- Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. Modificada por: Ley 6/2013, de 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. (BOE núm. 268 de 8 de noviembre de 2007).
- Londhe VP, Gavasane AT, Nipate SS, Bandawane DD & Chaudhari PD. 2011. Role of garlic (*Allium sativum*) in various diseases: an overview. JPRO. 1: 129-134.
- Makris A, Thornton CE, Xu B & Hennessy A. 2005. Garlic increases IL-10 and inhibits TNFalpha and IL-6 production in endotoxin-stimulated human placental explants. Placenta. 26: 828-834.
- Mantawy MM, Ali HF & Rizk MZ. 2011. Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 53: 155-163.
- Mantawy MM, Aly HF, Zayed N & Fahmy ZH. 2012. Antioxidant and schistosomicidal effect of *Allium sativum* and *Allium cepa* against *Schistosoma mansoni* different stages. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 16(Suppl. 3): 69-80.
- Meaney M, Haughey S, Brennan GP & Fairweather I. 2005. A scanning electron microscope study on the route of entry of clorsulon into the liver fluke, *Fasciola hepatica*. Parasitol Res. 95(2): 117-128.
- Mehlhorn H, Al-Quraishy S, Al-Rasheid KA, Jatzlau A & Abdel-Ghaffar F. 2011. Addition of a combination of onion (*Allium cepa*) and coconut (*Cocos nucifera*) to food of sheep stops gastrointestinal helminthic infections. Parasitol Res. 108: 1041-1046.
- Muñoz-Antoli C, Sotillo J, Monteagudo C, Fried B, Marcilla A, & Toledo R. 2007. Development and pathology of *Echinostoma caproni* in experimentally infected mice. J Parasitol. 93: 854-859.


- Muñoz-Antolí C, Toledo R & Esteban JG. 2013. The influence of adult worm age and definitive host on the transmission of *Echinostoma caproni*: egg hatchability and miracidial infectivity. *J Helminthol.* 87(1): 42-45.
- O'Neill JF, Johnston RC, Halferty L, Brennan GP & Fairweather I. 2015. Ultrastructural changes in the tegument and gut of adult *Fasciola hepatica* following in vivo treatment with artesunate. *Exp Parasitol.* 154: 143-154.
- Pandey M, Verma RK & Saraf SA. 2010. Nutraceuticals: New era of medicine and health. *Asian J Pharm Clin Res.* 3: 11–15.
- Peysselelon F, Launay G, Lisacek F, Duclos B & Ricard-Blum S. 2013. Comparative analysis of *Leishmania* exoproteomes: implication for host-pathogen interactions. *Biochim Biophys Acta.* 1834: 2653-2662.
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. (BOE núm. 34 de 8 de febrero de 2013).
- Reis EV, Pereira RV, Gomes M et al. 2014. Characterisation of major vault protein during the life cycle of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitology international.* 63: 120-126.
- Riad NHA, Hoda AT & Yomna IM. 2009. Effects of garlic on albino mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*: a parasitological and ultrastructural study. *Trop Biomed.* 26: 40-50.
- Rivlin RS. 2001. Historical perspective on the use of garlic. *J Nutr.* 131: 951S-954S.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE). Universitat de Valencia. Ficha de la Sección de Producción Animal. Internet: www.uv.es/otri/buscador-de-oc/recursos/octrs-scsie-ani.pdf (Actualizado 2013; Acceso 9 Mayo de 2017).
- Schechtman D, Winnen R, Tarrab-Hazdai R et al. 2001. Expression and immunolocalization of the 14-3-3 protein of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* 123: 573-582.
- Schechtman D, Tarrab-Hazdai R & Arnon R. 2001. The 14-3-3 protein as a vaccine candidate against schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 23: 213-217.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV & Mann M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc.* 1: 2856-2860.
- Siles-Lucas MM & Gottstein B. 2003. The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. *Trends Parasitol.* 19: 575-581.
- Sorrivas V, Morales A & Yañez MJ, 2014. *Principios y práctica de la microscopía electrónica.* UAT-Conicet, Bahía Blanca.

- Sotillo J, Valero ML, Sánchez Del Pino MM et al. 2010. Excretory/secretory proteome of the adult stage of *Echinostoma caproni*. *Parásitol Res.* 107(3): 691-697.
- Sotillo J, Trudgett A, Halferty L, Marcilla A, Esteban JG & Toledo R. 2010. *Echinostoma caproni*: differential tegumental responses to growth in compatible and less compatible hosts. *Exp Parasitol.* 125(3): 304-309.
- Sotillo J, Trelis M, Cortes A, Fried B et al. 2011. Th17 responses in *Echinostoma caproni* infections in hosts of high and low compatibility. *Exp Parasitol.* 129: 307-311.
- Sripa B, Brindley PJ, Mulvenna J et al. 2012. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*—multiple pathways to cancer. *Trends Parasitol.* 28: 395–407.
- Toledo R, Espert A, Carpena I, Muñoz-Antoli C, Fried B & Esteban JG. 2004. The comparative development of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) adults in experimentally infected hamsters and rats. *Parásitol Res.* 93(6): 439-444.
- Toledo R & Fried B. 2005. Echinostomes as experimental models for interactions between adult parasites and vertebrate hosts. *Trends Parasitol.* 21(6): 251-254.
- Toledo R, Muñoz-Antolí C, Marcilla A, Fried B & Esteban JG. 2006. Los echinostomátidos como modelo para el estudio de las interacciones parásito-hospedador. *Rev Ibérica Parasitol.* 66(1-4): 83-93.
- Toledo R, 2009. Echinostomes in the definitive host: a model for the study of host-parasite relationships. En: Fried B & Toledo R. *The Biology of the Echinostomes, from the molecule to the community*. Springer, New York; pp: 89-110.
- Trelis M, Sotillo J, Monteagudo C et al. 2011. *Echinostoma caproni* (Trematoda): differential in vivo cytokine responses in high and low compatible hosts *Exp Parasitol.* 127: 387-397.
- University of Washington. The Global Burden of Disease: generating evidence and guiding policy. Internet: <http://www.healthdata.org/gbd> (Actualizada 2010; Acceso 9 Mayo de 2017).
- Vercruyse J, Knox DP, Schetters TP & Willadsen P. 2004. Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends Parasitol.* 20(10): 488-492.
- Wang X, Chen W, Li X et al. 2012. Identification and molecular characterization of a novel signaling molecule 14-3-3 epsilon in *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products. *Parásitol Res.* 110: 1411-1420.
- World Health Organization. 1994. Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felineus* and *Clonorchis sinensis*). *Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 61: 121–175.
- World Health Organization, Initiative to estimate the Global Burden of Foodborne Diseases. Internet: http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/ferg/en/index.html (Actualizada 3 Diciembre de 2015; Acceso 9 Mayo de 2017).

Yamanaka K, Sasagawa Y & Ogura T. 2012. Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochim Biophys Acta*. 1823: 130-137.

ANEXO I

Effects of dietary intake of garlic on intestinal trematodes

Alba Cortés¹ · Miguel García-Ferrús¹ · Javier Sotillo^{1,2} · J. Guillermo Esteban¹ · Rafael Toledo¹ · Carla Muñoz-Antolí¹ 

Received: 8 February 2017 / Accepted: 11 May 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract The current strategy for the control of helminth infections relies on chemotherapy. However, resistance appearance is promoting the necessity of developing new drugs against trematodes. Herein, potential trematocidal effects of garlic (*Allium sativum*) are investigated in the context of intestinal foodborne trematodes, employing the *Echinostoma caproni*-mouse model. Daily administration of dietary doses of garlic was conducted in three groups of mice: (i) before infection (prophylaxis), (ii) after infection (therapeutic) and (iii) both, before and after infection (continuous). A fourth group of mice, not exposed to garlic, was used as control. No differences in worm recovery, fecundity and local cytokine expression profiles were found with respect to control infections. However, considerable alterations in tegument structure, including swelling, furrowing, vacuolization and changes in secretory bodies were detected in garlic-exposed parasites using scanning and transmission electron microscopy. Protein secretion was markedly reduced in response to garlic, whereas up-regulation of several proteins, such as major vault protein and tER-ATPase, was observed in treated worms. The results presented herein provide new insights in the

anthelmintic activity of bioactive garlic compounds and the manner that parasites respond to toxins.

Keywords *Allium sativum* · *Echinostoma caproni* · Trematoda · Anthelmintic activity · Tegument

Introduction

Over 100 species of foodborne trematodes are known to cause infection in humans, and more than one billion persons are at risk of infection, mainly in Asia and Latin America (Fürst et al. 2012; WHO 2015). The current global strategy to control foodborne trematode infections, both in humans and livestock, relies on the use of trematocidal drugs, basically praziquantel and triclabendazole. However, it is well known that most of chemical products employed to combat infectious diseases lose their efficacy after several years of use because resistance develops (Mehlhorn et al. 2011). Drug tolerance and resistance are arising against available drugs; hence, there is a need to discover and develop new drugs for the prevention and treatment of these helminthiases (Keiser et al. 2010). In this sense, a strong trend to revisit the pre-chemotherapeutic era has arisen, using natural products as anthelmintic remedies (Abdel-Ghaffar et al. 2011; Klimpel et al. 2011). In 2000, the World Health Organization recommended evaluation of therapeutic uses of plant-derived products. Hence, research into the use of traditional, plant-based medicines is gaining popularity, and the number of studies using plant extracts and other natural products as potential remedies has increased.

Garlic (*Allium sativum*) is one of the earliest documented examples of plants used for maintenance of health and treatment of several diseases with few side effects (Rivlin 2001; Londhe et al. 2011). Medical use of garlic appears to have originated in Central Asia and then spread to China and the

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00436-017-5511-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Carla Muñoz-Antolí
carla.munoz@uv.es

¹ Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

² Centre for Biodiscovery and Molecular Development of Therapeutics, Australian Institute of Tropical Health and Medicine, James Cook University, QTHA, Building E4, McGregor Rd, Smithfield, AUS, Cairns, QLD 4878, Australia

Mediterranean region, before arriving in northern Africa and Mexico (Rivlin 2001). Bioactive compounds of garlic are reported to perform antiparasitic and immunomodulatory effects (Arreola et al. 2015). Particularly, anti-helminthic effects of garlic have been reported against different stages of *Schistosoma mansoni* (Riad et al. 2009; Mantawy et al. 2011, 2012), *Fasciola gigantica* (Singh et al. 2009) and the monogeneans *Gyrodactylus* and *Dactylogyrus* (Fridman et al. 2014). Nematocidal effect against *Haemonchus contortus* larvae has been also described (Palacio-Landín et al. 2015), though it showed no effect against the adult stages of *Trichuris muris* (Klimpel et al. 2011) and *Ascaridia galli* (Velkers et al. 2011).

Sutton and Haik (1999) stated that the antiparasitic activity of garlic is not due to a pharmacological elimination of the parasite, but through the enhancement of the host immune response to the parasite. It has been documented that different garlic preparations significantly reduce the production of inflammatory cytokines and shift the Th1-Th2 balance towards a Th2 response (Liu et al. 2009). Other studies, however, suggest that garlic enhances pro-inflammatory responses against intracellular parasites (Feng et al. 2012). Effects on different immune cells such as macrophages (Shin et al. 2013), dendritic cells (Feng et al. 2012), natural killer cells and $\gamma\delta$ lymphocytes (Nantz et al. 2012) have also been described. Other authors have attributed the parasite clearance to the enhancement of antioxidant enzymes in the host's tissues (Mantawy et al. 2012) or to direct effects of garlic on the parasite surface (Riad et al. 2009).

The present work aimed to undertake further studies to evaluate anthelmintic properties of garlic in vivo using the *Echinostoma caproni*-mouse model (Toledo et al. 2009). *E. caproni* is an intestinal trematode with no tissue phase in the definitive host, which allows quicker patent infections in the definitive hosts than other trematode species, providing rapid and cost-effective results (Keiser 2010). Potential anthelmintic effects are addressed from different approaches, including parasitological, immunological and proteomic analyses, together with ultrastructural studies of the tegument by electron microscopy.

Materials and methods

Animals, experimental infections and garlic administration

A total of 20 male CD1 mice (30–35 g) were randomly allocated in four experimental groups, five mice each, according to the schedule of garlic administration (prophylaxis, treatment, continuous and control).

The garlic preparation was made according to Riad et al. (2009). Briefly, garlic cloves were peeled, washed with

distilled water and dried before crushing in a blender to obtain a paste of uniform consistency. This paste was diluted in spring water to obtain a stock solution of 1 g/ml, which was aliquoted and stored at -20°C until use. Individual doses of 50 mg/kg were prepared daily from the stock solution and administered intragastrically. The dose selected is expected to be equivalent to the daily amount of garlic recommend in humans (4 g, approximately) (Riad et al. 2009).

The strain of *E. caproni* and the infection procedures were described previously (Fujino and Fried 1993). In short, encysted metacercariae were removed from kidneys and pericardial cavities of experimentally infected *Biomphalaria glabrata* snails. All mice were infected with 50 metacercariae of *E. caproni*, orally administered by gastric gavage. At 2 weeks post-infection (wpi), stool samples were taken and mice were sacrificed to collect the adult worms from the small intestine. Triplicate Kato-Katz thick smears, using standard 41.7 mg templates, were prepared from each stool sample. The Kato-Katz thick smears were examined with a microscope and the number of *E. caproni* eggs per gram of faeces (EPG) was recorded.

Mice in each experimental group were treated as follows: (i) Prophylaxis: mice were given a dose of the garlic preparation daily during the week before infection; (ii) Treatment: garlic was administered from the first day of infection until the end of the experiment at 2 wpi; (iii) Continuous: animals received a daily dose of garlic from 1 week before infection until 2 wpi; and (iv) Control: control mice were not exposed to garlic, but given the same volume of spring water.

Total RNA extraction, RT and real time-PCR

Total RNA was isolated from full-thickness sections of the ileum of mice using Real Total RNA Spin Plus Kit (Durviz), and cDNA was synthesized using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. For quantitative PCR, 9 μl of the product of reverse transcription, diluted 1/10 in sterile water, was added to 10 μl of TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) and 1 μl of the pertinent TaqMan® Gene Expression Assay (Supplementary Table 1). β -Actin was used as a housekeeping gene to normalize for differences in the efficiency of sample extraction and/or cDNA synthesis. Reactions were performed on the StepOnePlus Real Time-PCR System (Applied Biosystems), with the following thermal cycler conditions: an initial step of 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s denaturation at 95°C and 1 min of anneal/extension at 60°C each. Samples were analysed in triplicate. The threshold cycle (C_t) was calculated for the genes of interest and the housekeeping in each sample and negative control, and a comparative quantification method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) was applied to evaluate the effect of the infection on gene expression (Livak and Schmittgen 2001).

The method is based on the fact that the difference in threshold cycles (ΔC_t) between the gene of interest and the housekeeping is proportional to the relative expression of the gene of interest. The fold change in the target genes was normalized to β -actin and relativized to the expression in control animals (not exposed to garlic) to get a relative quantification of the expression levels (Klein 2002).

Obtaining of ESPs and SDS-PAGE

The excretory/secretory products (ESPs) were obtained by incubation of *E. caproni* adults from each experimental group in pre-heated RPMI 1640 culture medium (Gibco, Life Technologies) and maintained at a concentration of 40 worms/ml for 12 h at 37 °C in RPMI 1640 containing 100 U penicillin, 100 mg/ml streptomycin and complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). After incubation, the media were collected and centrifuged at 15,000g for 30 min at 4 °C. Then, the supernatant was collected and protein concentration was measured using Bio-Rad protein assay.

To analyse the protein profiles, the ESPs were subjected to sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions. A total amount of 30 μ g of each ESP was electrophoresed in either 12 or 8% resolving SDS-PAGE gels, run in Tris-glycine SDS buffer. The electrophoretic profiles were compared visually and differential bands were manually excised from gels for protein identification.

Protein identification by LC-MS/MS and database search

Gel bands were washed twice with double-distilled water and digested with sequencing grade trypsin (Promega). For liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), digested samples were diluted in 12 μ l of 5% formic acid and 6 μ l of the resulting suspension was injected onto a 50 mm \times 300 μ m C18 trap column (Agilent Technologies) using a Shimadzu Prominane Nano HPLC. Samples were desalted on the trap column for 5 min using 0.1% formic acid (aq) at 30 μ l/min. Peptides were then eluted onto an analytical nano HPLC column (150 mm \times 75 μ m 300SBC18, 3.5 μ m, Agilent Technologies) at a flow rate of 300 nl/min and separated using a 35 min gradient of 1–40% buffer B followed by a steeper gradient from 40 to 80% buffer B in 5 min. Buffer B contained 90/10 acetonitrile/0.1% formic acid, and buffer A consisted of 0.1% formic acid (aq). The column eluates were subsequently ionized using a 5500 QTRAP system (AB Sciex) operated in an Information Dependent Acquisition, IDA, mode. Full scan TOFMS data was acquired over the mass range 350–1400, and for product ion, MS/MS 80–1400 m/z ions observed in the TOF-MS scan exceeding a threshold of 100 counts and a charge state of +2 to +5 were

set to trigger the acquisition of product ion, MS/MS spectra of the resultant 20 most intense ions.

Database search was performed using MASCOT 2.5 (Matrix-Science) search engine on the *E. caproni* genome database, available on-line at http://parasite.wormbase.org/Echinostoma_caproni_prjeb1207/Info/Index/. Searches were done with tryptic specificity, allowing one missed cleavage and a tolerance in mass measurement of 100 ppm in MS mode and 0.6 Da for MS/MS ions. Carbamidomethylation of Cys was used as fixed modification and oxidation of Met and deamidation of Asn and Gln as variable modifications. Only proteins identified with two or more significant peptides were taken into account. BLASTp was performed against NCBI nr protein database with taxonomy set in Trematoda.

Electron microscopy: SEM and TEM

A total of 10 adult worms recovered from control mice and 10 from mice exposed to garlic prior to and after infection (continuous group) were analysed. For scanning electron microscopy (SEM), *E. caproni* adults were fixed in Karnovsky's fixative (0.5 M glutaraldehyde, 2.5 M formaldehyde), washed in buffer solution and post-fixed in 2% osmium tetroxide in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, for 2 h before dehydration by critical point. Mounted specimens were sputter-coated with gold-palladium and examined in a Hitachi S4100 scanning electron microscope at 5 kV.

Inclusion in LR-white resin for transmission electron microscopy (TEM) was performed by fixing the adult parasites in glutaraldehyde 2.5%, washing in phosphate buffer 0.1 M pH 7.2, and then post-fixing in 2% osmium tetroxide in phosphate buffer. After several washes in distilled water, parasites were sequentially dehydrated in 30, 50, 70 and 96% EtOH. Finally, the worms were sequentially incubated for 2 h in 33% LR-white resin in 96% EtOH, 66% LR-white resin in 96% EtOH, 66% LR-white resin in 100% EtOH and 100% LR-white resin in 100% EtOH. Samples were filtered in resin and polymerized at 60 uC for 48 h. Ultra-thin slices (60 nm) were stained with 2% uranyl acetate prior to visualization by TEM at 60 kV in a microscope Jeol JEM1010. Images were acquired using a digital camera MegaView III with Olympus Image Analysis software.

Statistical analysis

Significant differences among groups in the number of worms recovered, EPG and relative gene expression were analysed by one-way ANOVA. Bonferroni *t* test was performed as a post hoc analysis, and differences between means were considered statistically significant when $p < 0.05$. Prior to analysis, data were log transformed to achieve normality and verified by Shapiro-Wilk test.

Results

Worm recovery and egg production

No significant differences among groups were detected in the number of worms recovered per mouse, nor the EPG (Table 1). These results indicate that garlic consumption at a daily dose of 50 mg/kg is not effective in preventing, nor curing, *E. caproni* infection in CD1 mice and does not affect the egg production of adult worms.

Local cytokine expression

The immunomodulatory effects of garlic were studied by analysing the gene expression of several cytokines at the site of the infection. At 2 wpi, the different garlic-exposed groups showed a local cytokine expression profile very similar to that in non-exposed mice. Significant statistical differences were not detected among groups for any of the cytokines analysed (Supplementary Fig. 1).

Protein secretion and electrophoretic profile of ESPs

The ESPs were obtained by incubation of *E. caproni* adults from each experimental group in RPMI 1640 containing phenol red as pH indicator. A striking fact was that the colour of the culture medium immediately changed from pink to orange when it was added over the worms recovered from all the groups exposed to garlic, indicating a rapid acidification of the medium. Conversely, it did not shift but kept the pink-coloured tone in the control group (Supplementary Fig. 2). After 16 h of incubation, all media showed the same pale-yellow tone and the worms remained alive. The protein content in each ESP decreased progressively as garlic exposure increased. The quantity of protein secreted per worm diminished from 8.24 µg in the control group to a minimum of 1.62 µg in parasites recovered from mice belonging to the continuous group. The amount of protein per worm was 1.9, 3.8 and 5.1 times higher in the control group with respect to prophylactic, therapeutic and continuous groups, respectively (Fig. 1a).

Table 1 *Echinostoma caproni* adults recovery from mice with different exposure to garlic

| | Control | Prophylaxis | Treatment | Continuous |
|---------------------------------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Worm recovery ^a | 38.0 ± 13.1 | 39.0 ± 3.5 | 27.7 ± 7.0 | 44.7 ± 4.0 |
| EPG (×10 ^{3*}) ^b | 4.0 ± 0.4 | 6.2 ± 0.5 | 3.5 ± 2.0 | 9.21 ± 3.8 |

Number of *E. caproni* eggs per gram of faeces in each group

^a Number of worms recovered per mouse (mean ± standard deviation)

^b Number of *Echinostoma caproni* eggs per gram of faeces (mean ± standard deviation) counted by Kato-Katz technique

The same amount of protein from each ESP was separated by 1D protein electrophoresis. Figure 1b shows the electrophoretic profile of the ESPs for each experimental group. Protein patterns were very similar among all the groups, though some differences were noticed. Twelve per cent polyacrylamide gels revealed differences in protein amount of one band at around 29 kDa and several bands over 100 kDa. To get a better resolution of the proteins of high molecular weight, the ESPs were separated in 8% polyacrylamide gels. Three bands of approximately 80, 100 and 200 kDa, respectively, showed differences in protein quantity. All the differential proteins showed the same dose-dependent pattern, being more abundant as garlic exposure increased (Fig. 1b).

Protein identification

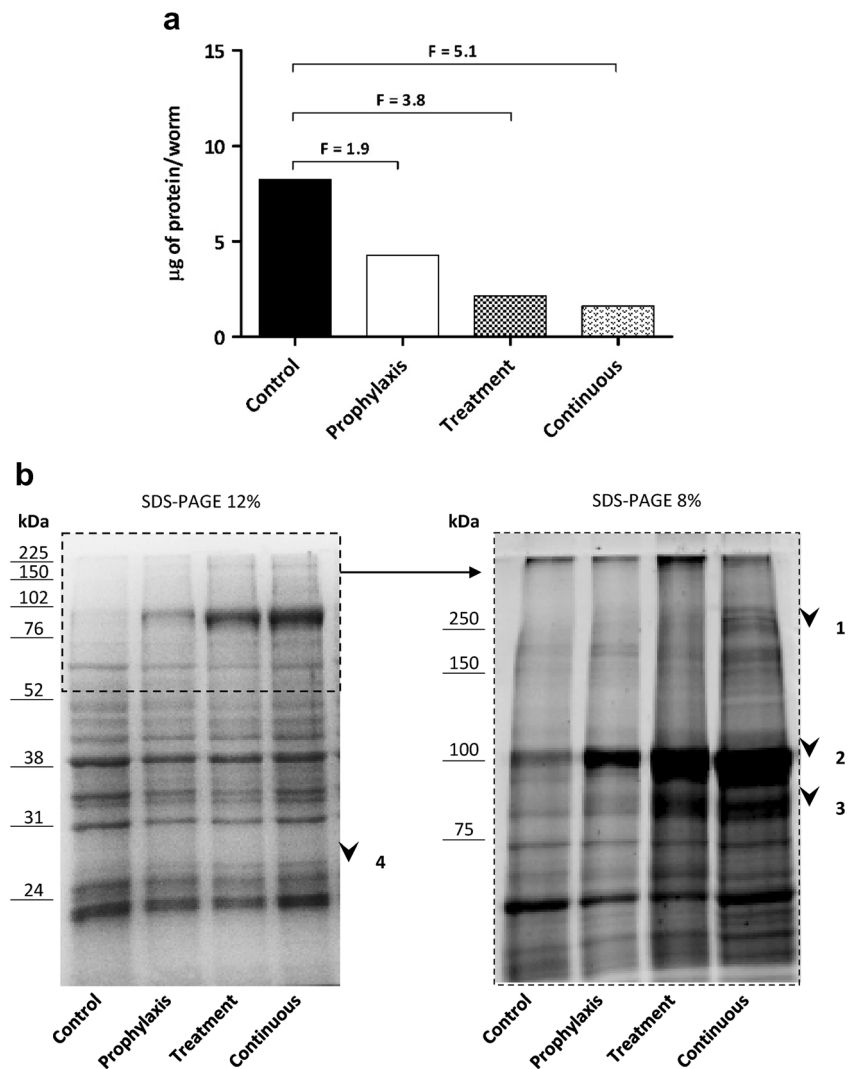
The results for the identification of differential proteins are compiled in Table 2. Among the proteins identified, two involved in cell signaling, such as 14–3-3 protein and major vault protein (MVP) (bands 4 and 2, respectively), an ATPase from the transitional endoplasmic reticulum (tER-ATPase, band 3) and a secreted proteinase inhibitor, α-2-macroglobulin-like protein 1 (band 1). All the proteins showed very close experimental and theoretical molecular weights, in addition to high values of MASCOT score and emPAI. Furthermore, BLASTp results were also satisfactory, with nearly nil e-values and query coverage over the 90% in all cases (Table 2).

Results of scanning electron microscopy

The potential effects of garlic over the surface of *E. caproni* were analysed on adult specimens recovered from control mice and mice exposed to garlic before and after the experimental infection. Changes on the surface of parasites were compared in different parts of the body, including the cephalic region, ventral sucker, and ventral, lateral and dorsal sides. No substantial differences were observed at the cephalic region. The surface of the collar encircling the oral sucker was smooth, with longitudinal striations from the periphery to the opening of the sucker, both in control and exposed worms. However, there were evident signs of lesion in one specimen from the continuous group, which may be attributable to the effect of garlic. Concretely, areas of desquamation and mild erosion were observed on the surface of the collar (Supplementary Fig. 3a). Furthermore, this specimen displayed eruption and sloughing off of the tegument on the ventral surface (Supplementary Fig. 3b). Alterations in the ventral sucker were not present.

In contrast, the tegumentary surface both at ventral and dorso-lateral sides was damaged in those worms exposed to garlic. The surface of control worms had the typical appearance, with the body surface covered by tegumentary spines,

Fig. 1 **a** Quantity of protein excreted/secreted per worm in culture. Fold difference between the protein amount in control and each garlic-exposed groups (F). **b** 1D-electrophoretic profile of the excretory/secretory products of *Echinostoma caproni* recovered from mice with different exposure to garlic. *Arrowheads* point at the differential bands that were identified by mass spectrometry and database search (see Table 2)



except in the dorsal part (Fig. 2a, c, e). The ventral side, which shows the highest spine density, appeared smooth and uniform in the control specimens. In garlic-exposed adults, however, both ventral and lateral surfaces were markedly swollen (Fig. 2b, d). Consequently, the actin spines were much less prominent and almost entirely covered by tegument, which gave them a flattened appearance (Fig. 2b, inset). Most of the spines showed shattered tips. Moreover, the tegument surface in exposed worms was not smooth but furrowed (Fig. 2b, d). On the sides of the body, the spines appeared sunken, with their tips protruding from the swollen tegument (Fig. 2d, inset).

The dorsal side of *E. caproni* adults is characterized by the absence of tegumentary spines. Conversely, in this part of the body, the tegument forms grooves (Fig. 2e). Unlike control specimens, a markedly swollen dorsal tegument was observed in garlic-exposed worms. In these parasites, the grooves had disappeared and the tegument displayed a furrowed aspect (Fig. 2f).

Results of transmission electron microscopy

Tegumental and sub-tegumental ultrastructures were studied in worms recovered from mice in control and continuous groups. A normal structure was observed in control specimens (Figs. 3a and 4a). The external surface of the parasite is lined up by a definite, highly folded plasma membrane that forms the microvilli along the body. The syncytial tegument is highly packed with membrane-bound vesicles of different morphologies. Elongated vesicles or T2-like secretory bodies are the most frequently observed in the distal part, showing a characteristic distribution pattern. These are disposed perpendicularly to the external membrane in the microvilli and the apical part of the syncytium but are oriented parallel to the basal lamina further interiorly. Circular vesicles, filled with intermediate electron dense material, appear mainly underneath the microvilli, whereas T1-like secretory bodies are, in general, very scarce. Extracellular vesicles of various sizes are frequently seen outside the tegument. A number of

Table 2 Identification details of garlic-modulated proteins in excretory/secretory products using MASCOT search engine on the *Echinostoma caproni* genome database and BLASTp against NCBI protein database

| Band ^a | Identification details | | | | BLASTp details ^f | | | | | |
|-------------------|-------------------------------|---|---------------------------------------|--------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------|-------------|---------------|-----------|
| | Accession number ^b | Protein | Species (Acc. ^c) | MASCOT Score | Matches ^d | Peptides ^e | E-value | Total score | Query Cov (%) | Ident (%) |
| 1 | ECPE_0000476901-mRN-A-1 | Alpha-2-macroglobulin-like protein 1 | <i>Clonorchis sinensis</i> (GAA52061) | 2222 | 52 | 33 | 0 | 927 | 99 | 39 |
| 2 | ECPE_0001276401-mRN-A-1 | Putative major vault protein | <i>Schistosoma mansoni</i> (CCD75353) | 2019 | 44 | 31 | 0 | 952 | 99 | 65 |
| 3 | ECPE_0001043101-mRN-A-1 | Transitional endoplasmic reticulum ATPase | <i>C. sinensis</i> (GAA28937) | 2855 | 63 | 42 | 0 | 1417 | 97 | 95 |
| 4 | ECPE_0000984501-mRN-A-1 | 14-3-3 | <i>C. sinensis</i> (GAA36880) | 5504 | 75 | 21 | 8·10 ⁻¹³⁴ | 380 | 93 | 77 |

^a Band reference number (see Fig. 1)

^b Accession number in the *Echinostoma caproni* genome database

^c Accession number in the protein database of NCBI

^d Number of significant matches

^e Number of significant peptides

^f Details of protein blast of translated genome annotations against the NCBI protein database

mitochondria are present in the syncytium, except in the apex (Fig. 3a). Beneath the basal lamina, there is the muscular layer, which consists of densely packed longitudinal and transversal bundles of muscle fibres. The tegument-forming cells are located further inside and are fused to the syncytium through cytoplasmic connections (Fig. 4a).

Alterations in the normal ultrastructure of the tegument were observed in worms exposed to garlic in vivo (Figs. 3b, 4b, c and 5). The tegumental syncytium was abnormally thick in exposed specimens (Fig. 3b). Anomalous T2-like secretory bodies, which were larger and often filled with an unusually electron dense material, were common (Fig. 5a). Moreover, the organized disposition of these bodies in the syncytium was lost beneath the microvilli. Circular vesicles were highly abundant in the apex, whereas a fewer mitochondrion was present. In contrast, the formation and release of extracellular vesicles seemed not to be affected (Fig. 5a). Occasionally, vacuolization of the syncytium was observed (Fig. 5b), while swelling of the basal lamina and basal infolds was more common (Fig. 3b). Several alterations were also seen in the sub-tegument (Fig. 4b, c). Disruption of muscle bundles was seen in some cases. Below the basal lamina, small spaces appeared between muscle bundles, both longitudinal and transversal, and the parenchymal tissue was loosely packed and disorganized (Fig. 4b). Signs of injury were observed sometimes in tegumental cell bodies. These consist in alterations in the morphology of the nucleus, presence of swollen mitochondria and

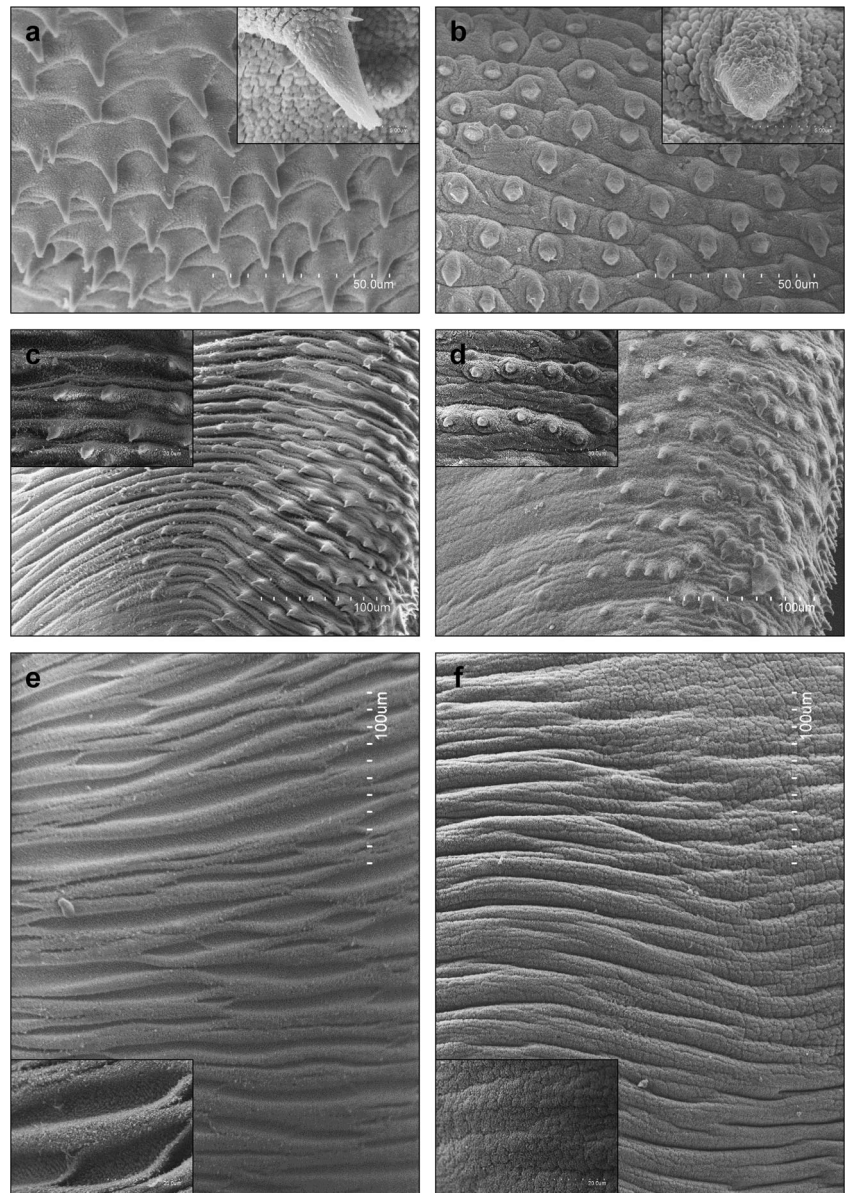
autophagic vesicles, and a disorganized, loosely packed cytoplasm (Fig. 4c).

Discussion

Potential health benefits of garlic have been recognized from ancient times to date (Rivlin 2001). Although in vivo anti-helminthic effects have been previously reported against *S. mansoni* (Riad et al. 2009; Mantawy et al. 2011, 2012) and monogeneans (Fridman et al. 2014), the results presented herein indicate that daily consumption of garlic at dietary doses is not effective in preventing nor curing *E. caproni* infections in mice. However, garlic-induced changes in parasite tegument and protein secretion reveal the potential usefulness of bioactive compounds in garlic for the development of new trematocidal drugs.

The immunomodulatory activity of garlic is well documented (Arreola et al. 2015). Herein, key cytokines in the regulation of *E. caproni* infections (Sotillo et al. 2011; Trellis et al. 2011), together with cytokines that are known to be modulated by garlic (Kang et al. 2001; Keiss et al. 2003; Makris et al. 2005), were studied. No statistical differences in the local cytokine expression profile were observed among experimental groups, indicating that garlic-induced changes are not mediated by the host immune response.

Fig. 2 Representative micrographs of scanning electron microscopy of control (**a, c, e**) and garlic-exposed *Echinostoma caproni* adults (**b, d, f**). Ventral (**a, b**), lateral (**c, d**) and dorsal (**e, f**) sides are shown. *Insets* show detailed regions of each full image. *Dots in scale bars* delimitate a tenth part of the indicated length



However, remarkable alterations were noticed in several phenotypic features of adult worms in response to garlic. Changes in tegumental structure were evident. Tegument ultrastructure of control *E. caproni* observed by SEM and TEM coincided with previous descriptions (Sotillo et al. 2010; Andresen et al. 1989; Simonsen et al. 1990). It is noteworthy that garlic-induced alterations are similar to those induced by trematocidal drugs in other foodborne trematodes. Swelling and furrowing of the external surface, together with sunken spines, have been described in other trematode species in response to clorsulon (Meaney et al. 2005), triclabendazole (Halferty et al. 2009), artesunate (O'Neill et al. 2015) and praziquantel (Goncalves et al. 2013). However, severe lesions including bebbing, peeling and erosion of the tegument or loss of tegumentary spines were not observed herein. The lack

of changes in oral and ventral suckers, which are involved in vital processes such as feeding and mucosal attachment, respectively, may explain the high worm recoveries obtained in garlic-exposed mice.

Alterations in the ultrastructure of tegument and subtegument were also evident in exposed worms. The large increase in the thickness of the tegumental syncytium and basal lamina may account for the swelling seen externally. Loosely packing of muscle bundles, parenchymal tissue and tegument-forming cells were observed in some areas and can contribute to this result. Similar changes have been described in *F. hepatica* following triclabendazole and artesunate administration and were associated with disruption of the osmoregulatory capacity of the tegument (Halferty et al. 2009; O'Neill et al. 2015). Likewise, appearance of vacuoles in the

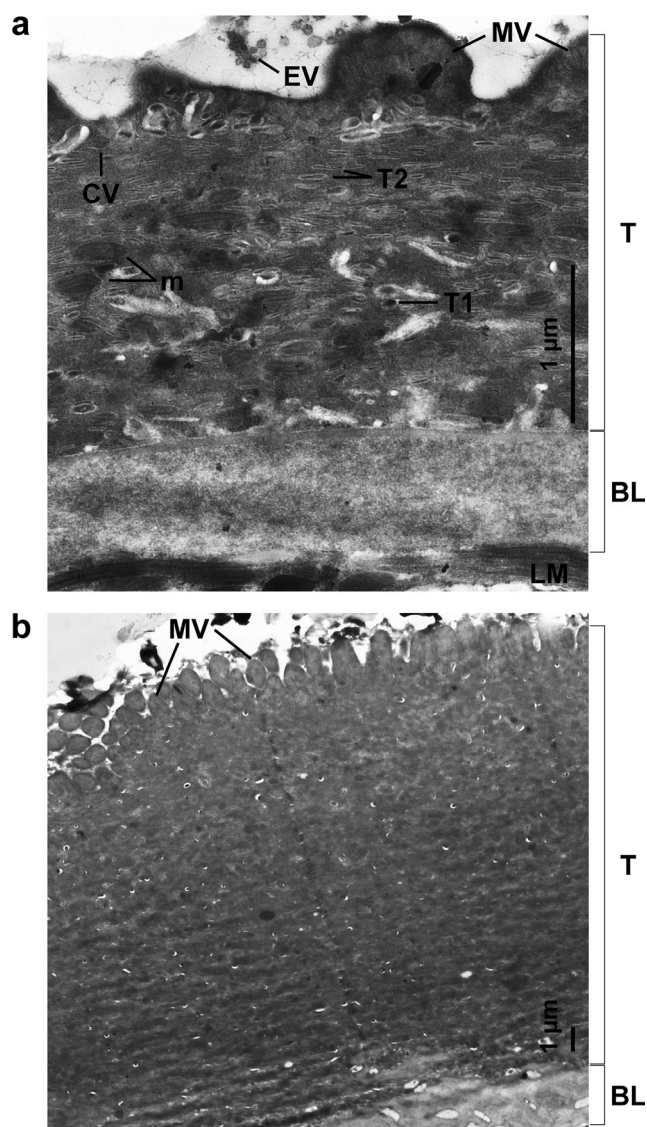


Fig. 3 Representative micrographs of transmission electron microscopy of the tegument of **a** control and **b** garlic-exposed *Echinostoma caproni* adults. Note the enlarged tegumental syncytium (*T*) and basal lamina (*BL*) in exposed worms. *MV* microvilli, *EV* extracellular vesicles, *CV* circular vesicle, *T1* T1-like secretory bodies, *T2* T2-like secretory bodies, *m* mitochondria, *LM* longitudinal muscle

syncytium has been reported in *E. paraensei* (Goncalves et al. 2013), *F. hepatica* (O'Neill et al. 2015) and *S. mansoni* (Xiao et al. 2002) after exposure to different trematocidal drugs. Edema, vacuolization and disruption of tegument-forming cells were also observed in *S. mansoni* adults recovered from mice daily exposed to the same dose of garlic employed in this paper (Riad et al. 2009).

Reduction in the number of secretory bodies is also a common fact after drug exposure (Goncalves et al. 2013; O'Neill et al. 2015) and may precede the loss of the tegumental syncytium, as they are crucial to maintain the syncytial layer (Fairweather et al. 1999). Although a substantial reduction in the number of secretory bodies was not noticed herein,

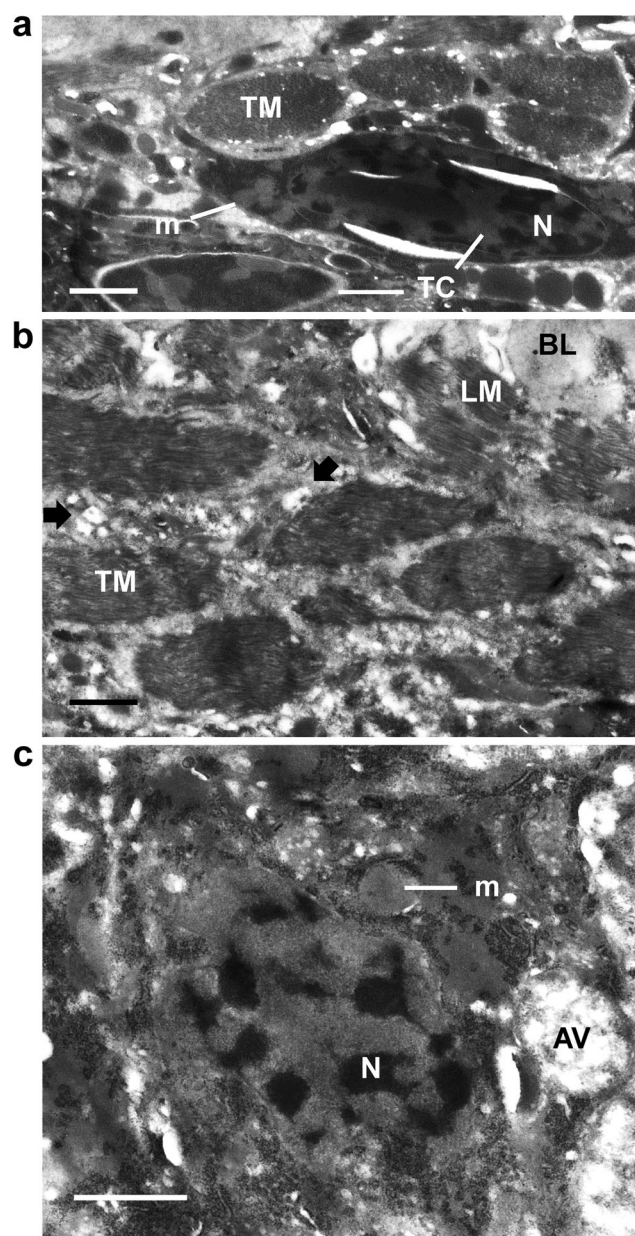


Fig. 4 Representative micrographs of transmission electron microscopy of the sub-tegument of **a** control and **b, c** garlic-exposed *Echinostoma caproni* adults. Note the disruption of the connective tissue between muscle bundles (arrows) and parenchymal tissue (**b**) and damaged tegument-forming cell showing anomalous nucleus, swollen mitochondria and autophagic vacuole (**c**). *BL* basal lamina, *TM* transversal muscle, *LM* longitudinal muscle, *TC* tegument-forming cell, *N* nucleus, *m* mitochondria, *AV* autophagic vacuole. Scale bar = 1 µm

circular vesicles became highly abundant. The increase of circular vesicles at the apex of the tegument may indicate a stress response to guarantee the integrity of the external plasma membrane (O'Neill et al. 2015). A dominance of these vesicles and the accumulation of anomalous T2-like secretory bodies below the microvilli may be the cause of decreased protein secretion, which became dramatically reduced as garlic exposure increased.

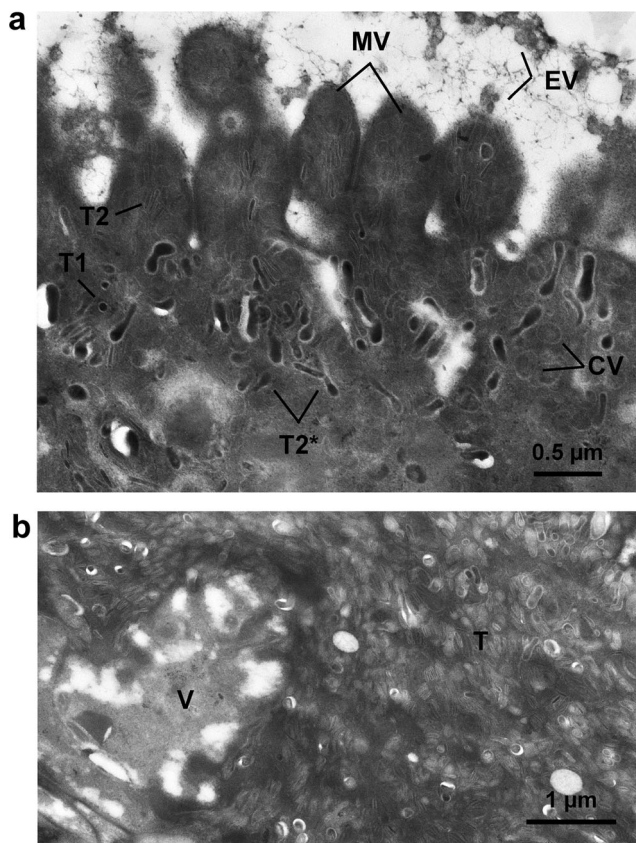


Fig. 5 Representative micrographs of transmission electron microscopy of garlic-induced alterations in the tegumental syncytium of *Echinostoma caproni* adults. **a** Accumulation of anomalous T2-like secretory bodies beneath the microvilli. **b** Vacuolization of tegumental syncytium. MV microvilli, EV extracellular vesicle, CV circular vesicle, T1 T1-like secretory bodies, T2 T2-like secretory bodies, T2* anomalous T2-like secretory bodies, V vacuole, T tegumental syncytium. Normal appearance of the tegumental syncytium in control worms (not exposed to garlic) is shown in Fig. 3a

Analysis of the secretome showed that several proteins were up-regulated in response to garlic in a dose-dependent manner. Four differentially secreted proteins were identified. The 14-3-3 proteins are key signaling molecules that participate in the regulation of several processes, including cell response to stress (Siles-Lucas and Gottstein 2003). In parasitic trematodes, 14-3-3 proteins are found in the tegument, sub-tegument, muscle, parenchyma and ESP (Schechtman et al. 2001a; Wang et al. 2012) and have been proposed as vaccine candidates (Wang et al. 2012; Schechtman et al. 2001b). tER-ATPase is involved in endosomal trafficking, autophagy and mitochondrial quality control (Yamanaka et al. 2012). Thus, the up-regulation of this protein could be linked to changes in the tegument ultrastructure observed by TEM, such as alterations in vesicle and mitochondrial numbers, mitochondrial swelling and vacuolization. Enhanced production of a 14-3-3 and tER-ATPase in *E. caproni* exposed to garlic suggests that they may be important in the stress response generated

against toxic compounds and can be considered as potential drug targets.

MVP, another protein involved in cell signaling, was up-regulated in response to garlic. MVP is the main component of vaults, a sort of ribonucleoprotein extremely conserved across multiple species. The cellular function of vaults is not fully understood. However, several studies suggest a role of these complexes in multidrug resistance, signal transmission and immune response (Berger et al. 2009). Recently, up-regulation of MVP has been reported in different stages of *S. mansoni* resistant to praziquantel (Reis et al. 2014). Up-regulation of MVP in garlic-exposed *E. caproni* adults suggests a role of this complex in the response to toxic compounds and may be indicative of the activation of resistance mechanisms to promote parasite survival. An alpha-2-macroglobulin-like protein was also up-regulated in garlic-exposed worms. Alpha-2-macroglobulins are broad spectrum protease inhibitors that operate through the entrapment of the target proteases, which are considered to be part of the innate immune system of metazoans (Armstrong 2006). Although sequence identity in key functional domains does exist, there is a lack of functional data on alpha-2-macroglobulins in helminths. Up-regulation of this protein in the context of a toxic environment suggests that it may be involved in the defence response of the parasite and/or its interaction with the host.

A striking result was the rapid acidification of the culture medium in garlic-exposed worms with respect to controls. Medium acidification in other trematodes is due to the release of lactic acid, which needs to be eliminated to avoid poisoning metabolic pathways and maintain high rates of glycolysis. In *S. mansoni*, lactate is exocytosed through the tegumental protein aquaporin (Githui et al. 2006; Faghiri et al. 2010). Functional aquaporins are needed to worm swelling in response to changes in the tonicity of the medium and to maintain parasite viability (Faghiri and Skelly 2009). In garlic-exposed *E. caproni*, rapid acidification of the culture medium coincided with marked swelling of the tegument, suggesting that both alterations may share a common cause.

Overall, the results presented herein demonstrate that, although dietary consumption of garlic appeared not to be effective as an anthelmintic, dose-dependent detrimental changes have been observed in exposed parasites. Injurious effects on the tegumental surface, which resemble those inflicted by commercially available trematocidal drugs, were evident. Since tegument integrity is essential for vital functions such as nutrition, immunoprotection and osmoregulation, lethal effects can be expected at higher doses. Study of the secretome in response to garlic exposure provides a novel approach that may be valuable for the identification of new molecular drug targets. Moreover, this throws light on the molecular mechanisms through which the parasite responds and that may lead to development of resistance. The present study has the advantage that patent effects of garlic on intestinal helminths

have been identified *in vivo*. Indeed, one of the most attractive results is that some effects, such as quantitative and qualitative changes in protein secretion or rapid acidification of the culture medium, occur also in worms that were not exposed to garlic directly, but when it was given as prophylaxis. This fact opens the possibility that garlic compounds may also act indirectly, inducing more or less permanent changes in the intestine of the host that may affect the parasites established later on.

Acknowledgements This work was supported by the Projects BFU2016-75639-P from Ministerio de Economía y Competitividad (Madrid, Spain), PROMETEO2014-083 Fase II from Conselleria d'Educació, Generalitat Valenciana (Valencia, Spain) and No. RD12/0018/0013, Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales – RICET, IV National Program of I + D + I 2008–2011, ISCIII – Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa and FEDER from the Ministerio de Sanidad y Consumo (Madrid, Spain).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures involving animals were approved by Ethical Committee of Animal Welfare and Experimentation of the University of Valencia (Ref#A18348501775). Protocols adhered to Spanish (Real Decreto 53/2013) and European (2010/63/UE) regulations.

References

- Abdel-Ghaffar F, Semmler M, Al-Rasheid KA, Strassen B, Fischer K, Aksu G, Klimpel S, Mehlhorn H (2011) The effects of different plant extracts on intestinal cestodes and on trematodes. *Parasitol Res* 108:979–984
- Andresen K, Simonsen PE, Andersen BJ, Birch-Andersen A (1989) *Echinostoma caproni* in mice: shedding of antigens from the surface of an intestinal trematode. *Int J Parasitol* 19:111–118
- Armstrong PB (2006) Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology* 211:263–281
- Arreola R, Quintero-Fabian S, Lopez-Roa RI, Flores-Gutierrez EO, Reyes-Grajeda JP, Carrera-Quintanar L, Ortuno-Sahagun D (2015) Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds. *J Immunol Res* 2015:401630
- Berger W, Steiner E, Grusch M, Elbling L, Micksche M (2009) Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci* 66:43–61
- Faghiri Z, Skelly PJ (2009) The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake. *FASEB J* 23:2780–2789
- Faghiri Z, Camargo SM, Huggel K, Forster IC, Ndegwa D, Verrey F, Skelly PJ (2010) The tegument of the human parasitic worm *Schistosoma mansoni* as an excretory organ: the surface aquaporin SmAQP is a lactate transporter. *PLoS One* 5:e10451
- Fairweather I, Threadgold LT, Hanna REB (1999) Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In: Dalton JP (ed) Fasciolosis. CAB International, Wallingford, pp 47–111
- Feng Y, Zhu X, Wang Q, Jiang Y, Shang H, Cui L, Cao Y (2012) Allicin enhances host pro-inflammatory immune responses and protects against acute murine malaria infection. *Malar J* 11:268–2875 -11-268
- Fridman S, Sinai T, Zilberg D (2014) Efficacy of garlic based treatments against monogenean parasites infecting the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). *Vet Parasitol* 203:51–58
- Fujino T, Fried B (1993) *Echinostoma caproni* and *E. trivolvis* Alter the binding of glycoconjugates in the intestinal mucosa of C3H mice as determined by lectin histochemistry. *J Helminthol* 67:179–188
- Fürst T, Keiser J, Utzinger J (2012) Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 12:210–221
- Githui EK, Damian RT, Aman RA (2006) *Schistosoma mansoni*: biochemical characterization of lactate transporters or similar proteins. *Exp Parasitol* 114:180–188
- Goncalves JP, Oliveira-Menezes A, Maldonado Junior A, Carvalho TM, de Souza W (2013) Evaluation of praziquantel effects on *Echinostoma paraensei* ultrastructure. *Vet Parasitol* 194:16–25
- Halferty L, Brennan GP, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I (2009) Relative activity of triclabendazole metabolites against the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 159:126–138
- Kang NS, Moon EY, Cho CG, Pyo S (2001) Immunomodulating effect of garlic component, allicin, on murine peritoneal macrophages. *Nutr Res* 21:617–626
- Keiser J (2010) *In vitro* and *in vivo* trematode models for chemotherapeutic studies. *Parasitology* 137:589–603
- Keiser J, Duthaler U, Utzinger J (2010) Update on the diagnosis and treatment of food-borne trematode infections. *Curr Opin Infect Dis* 23:513–520
- Keiss HP, Dirsch VM, Hartung T, Haffner T, Trueman L, Auger J, Kahane R, Vollmar AM (2003) Garlic (*Allium sativum* L.) modulates cytokine expression in lipopolysaccharide-activated human blood thereby inhibiting NF-kappaB activity. *J Nutr* 133:2171–2175
- Klein D (2002) Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 8:257–260
- Klimpel S, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid KA, Aksu G, Fischer K, Strassen B, Mehlhorn H (2011) The effects of different plant extracts on nematodes. *Parasitol Res* 108:1047–1054
- Liu CT, Su HM, Lii CK, Sheen LY (2009) Effect of supplementation with garlic oil on activity of Th1 and Th2 lymphocytes from rats. *Planta Med* 75:205–210
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} method. *Methods* 25:402–408
- Londhe VP, Gavasane AT, Nipate SS, Bandawane DD, Chaudhari PD (2011) Role of garlic (*Allium sativum*) in various diseases: an overview. *J Pharm Res Opin* 4:129–134
- Makris A, Thornton CE, Xu B, Hennessy A (2005) Garlic increases IL-10 and inhibits TNF alpha and IL-6 production in endotoxin-stimulated human placental explants. *Placenta* 26:828–834
- Mantawy MM, Ali HF, Rizk MZ (2011) Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 53:155–163
- Mantawy MM, Aly HF, Zayed N, Fahmy ZH (2012) Antioxidant and schistosomicidal effect of *Allium sativum* and *Allium cepa* against *Schistosoma mansoni* different stages. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16(Suppl 3):69–80
- Meaney M, Haughey S, Brennan GP, Fairweather I (2005) A scanning electron microscope study on the route of entry of clorsulon into the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res* 95:117–128
- Mehlhorn H, Al-Quraishy S, Al-Rasheid KA, Jatzlau A, Abdel-Ghaffar F (2011) Addition of a combination of onion (*Allium cepa*) and coconut (*Cocos nucifera*) to food of sheep stops gastrointestinal helminthic infections. *Parasitol Res* 108:1041–1046

- Nantz MP, Rowe CA, Muller CE, Creasy RA, Stanilka JM, Percival SS (2012) Supplementation with aged garlic extract improves both NK and gamma delta-T cell function and reduces the severity of cold and flu symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled nutrition intervention. *Clin Nutr* 31:337–344
- O'Neill JF, Johnston RC, Halferty L, Brennan GP, Fairweather I (2015) Ultrastructural changes in the tegument and gut of adult *Fasciola hepatica* following in vivo treatment with artesunate. *Exp Parasitol* 154:143–154
- Palacio-Landín J, Mendoza-de Gives P, Salinas-Sánchez DO, López-Arellano ME, Liébano-Hernández E, Hernández-Velázquez VM, Valladares-Cisneros MG (2015) In vitro and in vivo Nematocidal activity of *Allium sativum* and *Tagetes erecta* extracts against *Haemonchus contortus*. *Turk Parazitol Derg* 39:260–264
- Reis EV, Pereira RV, Gomes M, Jannotti-Passos LK, Baba EH, Coelho PM, Mattos AC, Couto FF, Castro-Borges W, Guerra-Sa R (2014) Characterisation of major vault protein during the life cycle of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Int* 63:120–126
- Riad NHA, Hoda AT, Yomna IM (2009) Effects of garlic on albino mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*: a parasitological and ultrastructural study. *Trop Biomed* 26:40–50
- Rivlin RS (2001) Historical perspective on the use of garlic. *J Nutr* 131:951S–954S
- Schechtman D, Winnen R, Tarrab-Hazdai R, Ram D, Shinder V, Grevelding CG, Kunz W, Aron R (2001a) Expression and immunolocalization of the 14-3-3 protein of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 123:573–582
- Schechtman D, Tarrab-Hazdai R, Aron R (2001b) The 14-3-3 protein as a vaccine candidate against schistosomiasis. *Parasite Immunol* 23:213–217
- Shin IS, Hong J, Jeon CM, Shin NR, Kwon OK, Kim HS, Kim JC, Oh SR, Ahn KS (2013) Diallyl-disulfide, an organosulfur compound of garlic, attenuates airway inflammation via activation of the Nrf-2/HO-1 pathway and NF-kappaB suppression. *Food Chem Toxicol* 62:506–513
- Siles-Lucas MM, Gottstein B (2003) The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. *Trends Parasitol* 19:575–581
- Simonsen PE, Vennervald BJ, Birch-Andersen A (1990) *Echinostoma caproni* in mice: ultrastructural studies on the formation of immune complexes on the surface of an intestinal trematode. *Int J Parasitol* 20:935–941
- Singh TU, Kumar D, Tandan SK, Mishra SK (2009) Inhibitory effect of essential oils of *Allium sativum* and *Piper longum* on spontaneous muscular activity of liver fluke, *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol* 123:302–308
- Sotillo J, Trudgett A, Halferty L, Marcilla A, Esteban JG, Toledo R (2010) *Echinostoma caproni*: differential tegumental responses to growth in compatible and less compatible hosts. *Exp Parasitol* 125:304–309
- Sotillo J, Treliis M, Cortes A, Fried B, Marcilla A, Esteban JG, Toledo R (2011) Th17 responses in *Echinostoma caproni* infections in hosts of high and low compatibility. *Exp Parasitol* 129:307–311
- Sutton GA, Haik R (1999) Efficacy of garlic as an anthelmintic in donkeys. *Isr J Vet Med* 54:66–78
- Toledo R, Esteban JG, Fried B (2009) Recent advances in the biology of echinostomes. *Adv Parasitol* 69:147–204
- Treliis M, Sotillo J, Monteagudo C, Fried B, Marcilla A, Esteban JG, Toledo R (2011) *Echinostoma caproni* (Trematoda): differential in vivo cytokine responses in high and low compatible hosts. *Exp Parasitol* 127:387–397
- Velkers FC, Dieho K, Pecher FW, Vermooij JC, van Eck JH, Landman WJ (2011) Efficacy of allicin from garlic against *Ascaridia galli* infection in chickens. *Poult Sci* 90:364–368
- 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. *Parasitol Res* 110:1411–1420
- WHO (2015) Initiative to estimate the global burden of foodborne diseases. http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/ferg/en/index.html. (accessed 9 May 2017)
- Xiao S, Shen B, Utzinger J, Chollet J, Tanner M (2002) Ultrastructural alterations in adult *Schistosoma mansoni* caused by artemether. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:717–724
- Yamanaka K, Sasagawa Y, Ogura T (2012) Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochim Biophys Acta* 1823:130–137