

## Evaluación de un bi-epítipo de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y de Desorganización Muscular en la protección de ovinos contra *Haemonchus contortus*

### Evaluation of a bi-epitope of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and Disorganized Muscle in the protection of sheep against *Haemonchus contortus*

Arnielis Díaz<sup>1</sup>, Yipsi García<sup>1,4</sup>, Yuliet Sánchez<sup>1</sup>, Andreia Buzatti<sup>2</sup>, Yanexis Rodríguez<sup>3</sup>, Maritza Infante<sup>3</sup>, Ubaldo Torres<sup>3</sup>, Amilcar Arenal<sup>1</sup>, Marcelo Molento<sup>2</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de protección en ovinos contra *Haemonchus contortus* de un péptido que mimifica epítipos de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y Desorganización Muscular (DIM-1) de *H. contortus*. Se hizo una búsqueda en una biblioteca de fagos (7 aa-GGG) con el empleo de un anticuerpo policlonal (IgG) anti-*H. contortus*. Después de tres rondas de selección se secuenciaron 120 clones y se hizo el análisis de secuencia de cada clon. Se seleccionaron clones cuya secuencia de péptidos fue similar a la proteína de DIM-1 y a la GAPDH, y se sintetizó un péptido con estos dos epítipos. Los animales se inmunizaron los días 0, 7, 14 y 28. Una semana después de la última vacunación todos los animales se desafiaron con 1250 L3 de *H. contortus*. La media de huevos por gramo de heces (hpg) y la carga parasitaria en el abomaso del grupo vacunado a los 70 días de la infestación se redujeron en 57.9 y 52.7%, respectivamente. Los niveles de IgG en suero fueron significativamente más altos en el grupo vacunado; además aumentó el número de eosinófilos y subió el valor de la hemoglobina.

**Palabras clave:** DIM-1; GAPDH; biblioteca de fagos; péptidos; multiepítipos

#### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the protection capacity in sheep against *Haemonchus contortus* using a peptide that mimics epitopes of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Disorganized Muscle (DIM-1) of *H.*

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Morfofisiología, Universidad de Camagüey, Cuba

<sup>2</sup> Laboratorio de Enfermedades Parasitarias, Universidad Federal de Paraná, Curitiba, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey Carlos J. Finlay, Camagüey, Cuba

<sup>4</sup> E-mail: yipsi.garcia@reduc.edu.cu

Recibido: 14 de diciembre de 2017

Aceptado para publicación: 2 de septiembre de 2018

*contortus*. A genotypic phage library (7 aa-GGG) was evaluated with the use of a polyclonal anti-*H. contortus* antibody IgG. After three rounds of selection, 120 clones were sequenced and the amino acid sequences were aligned. Peptide sequences similar to DIM-1 and GAPDH were selected, and a peptide with these two epitopes was synthesized. A group of four rams with the bi-epitope and another similar group with the adjuvant were immunized on days 0, 7, 14 and 28. One week after the last vaccination all the animals were challenged with 1250 L3 larvae of *H. contortus*. The average number of eggs per gram of feces (hpg) and the parasitic load in the abomasum of the group vaccinated 70 days after the infestation were reduced by 57.9 and 52.7%, respectively. Serum IgG levels were significantly higher in the vaccinated group; it also increased the number of eosinophils and increased the hemoglobin.

**Keywords:** DIM-1; GAPDH; phage library; peptides; multiepitopes

## INTRODUCCIÓN

Los métodos actuales para el control de nematodos gastrointestinales se basan principalmente en el empleo de antihelmínticos químicos, cuyo uso indiscriminado durante largo tiempo provoca el desarrollo de la resistencia de los parásitos al tratamiento. Además, se describe la contaminación del medio ambiente y la presencia de residuos tóxicos en la cadena alimentaria que llega hasta el hombre (Wardhaugh, 2005).

Una alternativa de control de los nematodos gastrointestinales puede ser la inmunización con proteínas nativas. La H11 de *H. contortus* es una glicoproteína eficaz como inmunógeno (Tavernor *et al.*, 1992). La vacunación con extractos de proteínas de excreción/secreción de *H. contortus* también es efectiva en la protección de la infestación parasitaria (Lacroux *et al.*, 2006). La purificación de proteínas de excreción/secreción como la HC58 (cisteína proteasa y galectina) reducen parcialmente la infección que produce *H. contortus* (Muleke *et al.*, 2007; Yanming *et al.*, 2007). No obstante, la obtención de pequeñas cantidades de estas proteínas por vía natural es una limitante para convertirlas en un producto comercial, de allí que la búsqueda de otras alternativas como la tecnología del ADN recombinante se convierte en una necesidad.

El uso de proteínas recombinantes presenta limitaciones para el control de los parásitos, ya que no contienen las modificaciones pos-traduccionales apropiadas para retener la capacidad protectora de las moléculas naturales; por ejemplo, carecen o forman puentes disulfuros erróneos, otro o ningún patrón de glicosilación y diferente plegamiento en el espacio (Newton y Meeusen, 2003).

En el trabajo de Yan *et al.* (2010) sobre inmunoproteómica de hembras y machos adultos de *H. contortus* se describen 23 proteínas del metabolismo o estructurales, con alta identidad de proteínas en nematodos, entre ellas, la enzima GAPDH y DIM-1.

DIM-1 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Es una proteína estructuralmente localizada en la región de la membrana celular del músculo alrededor de los cuerpos densos y se ancla en los filamentos de actina. Esta puede desempeñar un papel en la estabilización de los componentes finos y filamentosos del sarcómero (Rogalski *et al.*, 2003). DIM-1 es altamente conservada a nivel de aminoácidos con su homólogo en nematodos como *Caenorhabditis briggsae* (99%), *Brugia malayi* (77%) y *Ascaris suum* (77%). El antígeno AS37 de *A. suum*, con alta identidad con DIM-1, se reconoce por sueros de ovejos infestados con L3 (Tsuji *et al.*, 2002). Un estudio preliminar sugiere que la vacuna de ADN DIM-1 indu-

ce respuesta inmune parcial en cabras contra el *H. contortus* (Yan *et al.*, 2013).

Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa muestra un potencial de protección como inmunógeno frente a diferentes helmintos. En *Schistosoma mansoni*, GAPDH produce respuestas significativas de células B y células T, e induce inmunidad protectora (Erttmann *et al.*, 2005). La aplicación del gen de GAPDH como candidato vacunal en ovejas induce protección parcial frente a *H. contortus* (Han *et al.*, 2012).

Los recientes avances en la tecnología de bibliotecas de fago llevan esta metodología a convertirse en una herramienta valiosa para la investigación (Han *et al.*, 2012). Por ejemplo, en el empleo para mimificar epítomos de parásitos como *Fasciola hepatica* (Villa-Mancera *et al.*, 2008), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Prudencio *et al.*, 2010), *Taenia solium* (Assana *et al.*, 2010), *Schistosoma japonicum* (Wu *et al.*, 2006) y *Plasmodium falciparum* (Ambroggio *et al.*, 2013). En helmintos se recomienda el empleo de vacunas multiepítomos debido a la complejidad de los mecanismos de infestación (Gnanasekar *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006); sin embargo, no se ha descrito su uso en *H. contortus*. El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de protección en ovinos contra *Haemonchus contortus* de un péptido que mimifica epítomos de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y Desorganización Muscular (DIM-1) de *Haemonchus contortus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron bajo el protocolo del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Camagüey (01/2013).

### Material Biológico

Se extrajeron muestras de sangre (10 ml) de la vena yugular de 48 carneros adul-

tos que se encontraban bajo pastoreo. El suero se obtuvo por centrifugación a 1500 g durante 10 min y se almacenó a -20 °C hasta su análisis por ELISA.

Cinco gramos de *H. contortus* adultos, obtenidos de un animal sacrificado en un matadero y que tenía una alta carga parasitaria, fueron macerados en nitrógeno líquido. Las proteínas se extrajeron con Tritón X-100 al 1% [volumen/volumen] ([v/v]) en TFS 1X (tampón fosfato salino) (NaCl 136.8 mmol L<sup>-1</sup>; KCl 2.7 mmol L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.2 mmol L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7.1). Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (1976).

### ELISA

Las placas de ELISA se recubrieron con 5 µg/ml de la proteína de *H. contortus* (o un péptido sintético en el caso indicado), diluido en tampón carbonato (34.9 mmol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 15 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH 9.6). Se siguió la metodología descrita por Díaz *et al.* (2015). Las placas se leyeron a 450 nm en el lector de ELISA de microplacas Biotek (Gen5). Controles positivos y negativos estándar se incluyeron en cada placa. Los controles positivos fueron sueros de los animales que tenían altos títulos, mientras que los controles negativos fueron sueros de animales que la lectura estuvo por debajo de la línea de corte. Los sueros negativos empleados para determinar la línea de corte fueron obtenidos de 18 animales estabulados que nunca estuvieron contacto con *H. contortus*. La línea de corte fue determinada por análisis ROC. La sensibilidad del test fue de 100% y la especificidad de 94.44%.

### Selección en Biblioteca de Fago

La búsqueda se hizo utilizando una biblioteca de fagos de 7-mer (7 aa-GGG) (Cat. E8100S, New England Biolabs). El protocolo de selección se realizó según las instrucciones del fabricante. Se realizaron tres rondas de selección por afinidad. El suero de un animal con altos títulos contra *H. contortus* se

recubrió a una dilución de 1:100 en tampón carbonato. Las placas se incubaron a 4 °C durante la noche. Luego, las placas se bloquearon con tampón de bloqueo (TFST suplementado con 5% de BSA) a temperatura ambiente durante 1 h. Las placas se lavaron tres veces con TFST. Se tomó 10 µl del bacteriófago ( $10^{11}$  unidades formadoras de placas [pfu]) con péptidos de 7-mer (7 aa-GGG) diluidos en TFST y se añadió al suero negativo para evitar interacciones inespecíficas. Se colocó el contenido en el suero positivo. La placa se lavó con TFST; luego, los fagos absorbidos se eluyeron con glicina 0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 2.5 y se neutralizaron con Tris-HCl pH 8. Los fagos eluidos se amplificaron mediante la infección de *Escherichia coli* y se purificaron por precipitación con 20% [peso/volumen] de PEG 8000/ NaCl 2.5 mol L<sup>-1</sup>.

### Secuenciación

El ADN de los clones de fagos positivos se extrajo con fenol cloroformo. Las muestras se secuenciaron por capilaridad (ABI3130, BigDie v. 3.1 y POP 7 polímero) (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Myleus, Brasil). Después se realizó el análisis bioinformático del ADN secuenciado con el empleo del Vector NTI v. 7.0 (<https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html>).

### Vacunación

Se utilizaron ocho carneros de 12-13 meses y con peso de  $53 \pm 2$  kg. Los animales fueron estabulados y desparasitados 28 y 14 días antes del inicio del experimento. El día 0 se inicia el experimento con la primera vacunación de los animales. Los ovinos se dividieron en dos grupos, uno (n=4) fue vacunado con el bi-epítipo GAPDH y DIM-1 (Mlu2: GSGNAIMGGSFLSDTRS, PM 1713.83 gmol<sup>-1</sup>, 78.2% pureza en Genescript, EEUU) a 2 µg/kg de peso del animal y adyuvante (Montanide 50VG-2). El grupo placebo (n=4) solo recibió el adyuvante. Se realizaron cuatro inmunizaciones en sema-

nas consecutivas y los animales fueron infestados con 1250 larvas L3 de *H. contortus* el día 35 del experimento. Las larvas se obtuvieron por la técnica de Bearmann de un coprocultivo de huevos colectados a partir de la ovoposición de *H. contortus* adultos del animal sacrificado en matadero (MAFF, 1986).

Se colectaron muestras de sangre con EDTA los días 0, 35 y 70 del experimento. Se determinó el hematocrito por el método del micro-hematocrito y la hemoglobina por el método de la cianometahemoglobina, y se realizó el recuento diferencial de células. Las muestras de heces fueron colectadas directamente del recto los días 0, 14, 28, 35, 42, 49, 56, 63 y 70 y el número de huevos por gramo de heces (HPG) fue determinado a través del método de McMaster (Gordon and Whitlock, 1939). Todos los carneros de los dos grupos fueron sacrificados a los 70 días del experimento y se contaron los nemátodos adultos del abomaso.

### Análisis Estadístico

Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba no paramétrica de Mann Whitney. Se empleó el paquete estadístico SPSS para Windows 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación de la Respuesta Natural

La Figura 1 muestra la respuesta inmunológica (IgG) de los 48 animales que estaban en pastoreo contra proteínas del extracto de *H. contortus*. La respuesta natural en el 71% de los animales fue superior a 1.25 de densidad óptica. Todos los valores de absorbancia quedaron situados por encima de la línea de corte, lo que indica que todos han tenido contacto con el parásito y han generado anticuerpos contra esta infestación natural. Esto concuerda con la respuesta natural

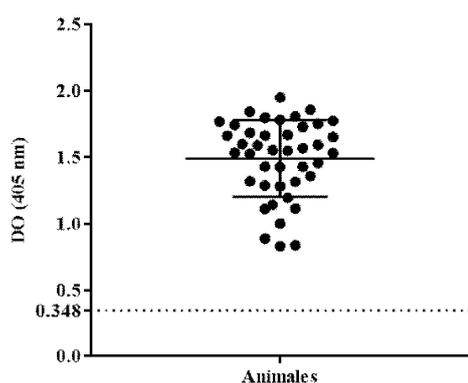


Figura 1. Detección de títulos de IgG anti-*Haemonchus contortus* en sueros de 48 carneros adultos a través de ELISA con placas recubiertas con proteína de un extracto de *H. contortus*. La barra horizontal indica la media de los títulos. Las T muestran la desviación estándar. La línea discontinua representa el valor de la línea de corte (según análisis ROC)

de IgG e IgA que se describe en ovejas cuando se infestan al pastar (Terefe *et al.*, 2007). La respuesta natural resulta independiente del nivel de infestación y protege a los animales de una reinfestación. Los niveles de título de IgG están relacionados con la protección del hospedero (LeJambre *et al.*, 2008). Así mismo, se reporta que cruces genéticos de ovinos con mayor resistencia a *H. contortus* presentan mayores títulos de IgG (Shakya *et al.*, 2011). En este estudio, todos los animales con altos títulos (>1.25) presentaban bajo HPG (0-200 huevos), lo que confirma que esta respuesta los hace resistente al parásito.

### Selección en una Biblioteca de Fago

De 120 clones aislados a partir del pesquisaje en una biblioteca de fago con un suero de altos títulos de anticuerpos que reconocen proteínas de *H. contortus*, solo nueve mostraron alta identidad con las 23 proteínas declaradas en la inmunoproteómica de adultos del parásito (Yan *et al.*, 2010). La Figura 2 muestra el alineamiento de los clones (46, 103, 32, 90, 69, 66, 60, 111, 117) con pro-

teínas endógenas de *H. contortus*. El análisis de secuencia de los clones positivos reveló alta identidad entre ellos y con algunas de las proteínas que forman parte de la constitución de *H. contortus*. El clon 46 mostró identidad en cuatro (Gly, Ala, His, Asp) de sus siete aminoácidos con la proteína glutamato deshidrogenasa. De manera similar ocurrió con los clones 103, 32 y 90 que mostraron una secuencia consenso con alta identidad a la ATPasa de segregación de cromosoma, ya que cuatro aminoácidos (Glu, Ala, Leu, Thr) coinciden con los de esta proteína. Asimismo, el clon 69 también presentó identidad con un fragmento de la glutatión serín transferasa, con cuatro aminoácidos que coinciden y otros dos con estructuras químicamente parecidas (Asp-Glu e Ile-Val).

La secuencia peptídica correspondiente al clon 66 es la de mayor identidad (71.4%) con un fragmento de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, ya que cinco aminoácidos son iguales (Phe, Ser, Asp, Thr, Ser) y uno químicamente semejante (Leu-Val). Por su parte la secuencia peptídica correspondiente del clon 60 posee solo dos Phe iguales y tres aminoácidos químicamente parecidos (Asp-Glu, Phe-Tyr y Met-Leu). Por último, la secuencia correspondiente a los clones 111 y 117 presenta cuatro aminoácidos idénticos a un fragmento de DIM-1 (Gly, Gly, Asp, Ala), además de uno químicamente similar (Ser-Lys).

A pesar de secuenciar 120 clones no fue posible obtener secuencias consensos, posiblemente porque los sueros naturales reconocen varios epítopos (de diferentes proteínas) al mismo tiempo. Prudencio *et al.* (2010) trabajaron con una biblioteca de fago presentadora de péptidos, con un anticuerpo policlonal para garrapata, sin observar identidad después de secuenciar 36 clones. Así mismo, Villa-Mancera *et al.* (2008) identificaron siete secuencias no consenso con un antisuero para cathepsina L1/L2 de *Fasciola hepatica*. Arnon *et al.* (2000), usando un anticuerpo monoclonal que protege frente a la infección de *Schistosoma mansoni* no detectaron secuencias consenso, por ejem-

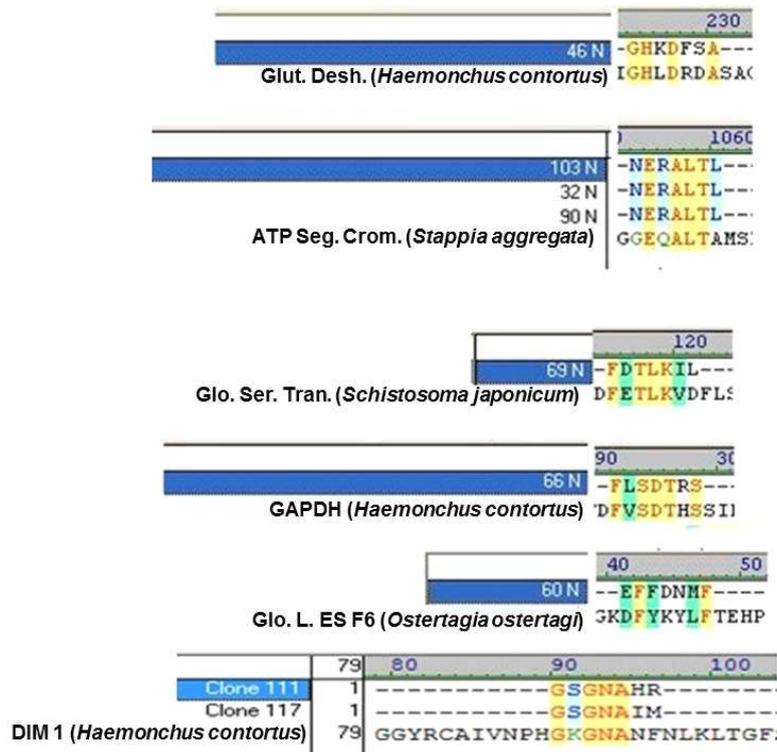


Figura 2. Mayor identidad de péptidos provenientes de los clones de la biblioteca de fagos alineados con diferentes proteínas registradas en bases de datos internacionales. Glut. Desh.: glutamato deshidrogenasa; ATP Seg. Crom.: ATPasa de segregación cromosomal; Glo. Ser. Tran.; globin serin transferasa; GAPDH; Glo. L. ES F6: globin-like de excreción/secreción proteína F6; DIM 1: proteína de Desorganización Muscular

plo, con *Schistosoma japonicum* (Tang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2011), *Entamoeba histolytica* (Melzer *et al.*, 2002) y *Rhipicephalus microplus* (Bishop-Hurley *et al.*, 2010).

### Vacunación

La Figura 3 muestra el conteo de huevos por gramo de heces (hpg) de los animales de cada grupo experimental. La ovoposición comenzó a los 63 días (28 días después de la infestación), lo que coincide con el periodo de prepatencia del *H. contortus*. El promedio de hpg el día 70 (día del sacrificio) fue 57.9% menor (2130 hpg) en el grupo vacunado con el péptido Mlu2 que en el grupo control (5060 hpg) ( $p < 0.05$ ).

La carga de parásitos adultos en el abomaso de los animales del grupo vacunado fue 52.3% menor que en el grupo control ( $p < 0.01$ ). La proporción de hembras en el grupo vacunado (55/104) fue similar al grupo control (116/218). Para Sargison *et al.* (2011), el nivel de infestación puede variar por la edad de los animales, la supresión inmune y las cepas de *H. contortus* presentes; así como el número de larvas que se usen para el desafío. Yan *et al.* (2013) reportaron en sus estudios 8000 hpg y 524 nemátodos adultos, mientras que Zhao *et al.* (2012) hallaron 13 000 hpg y 742 nemátodos adultos.

El gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa es uno de los péptidos de más empleo en ensayos de vacunación para proteger con-

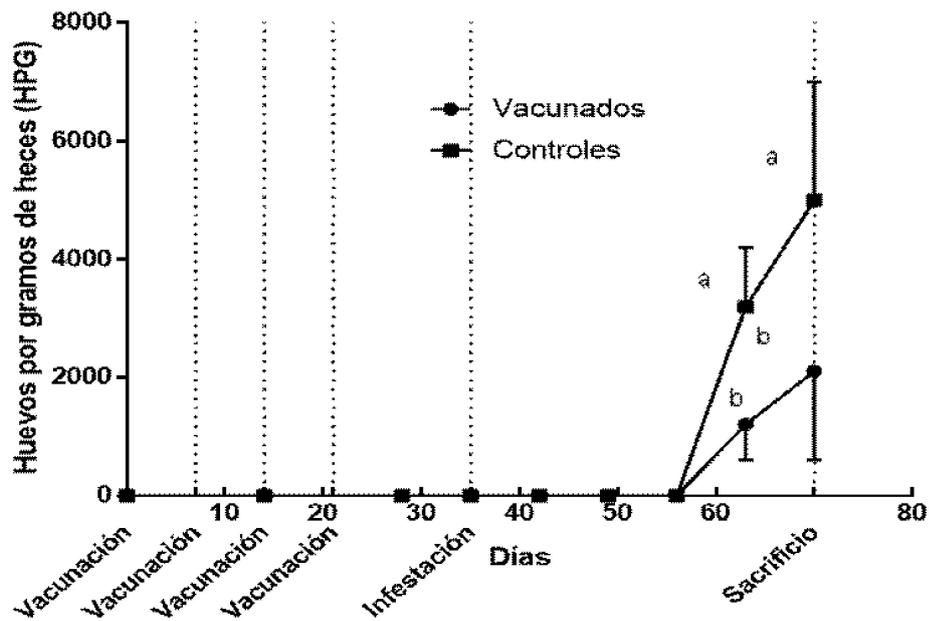


Figura 3. Dinámica de huevos por gramos de heces (media  $\pm$  d.e.) en carneros vacunados con el bipéptido Mlu2 (GSGNAIMGGGSFLSDTRS). El día 0 corresponde al primer día de la vacunación. El control fue un placebo vacunado solamente con el adyuvante. Los dos grupos fueron infestados con 1250 L3 de *H. contortus*. Las líneas discontinuas indican los días de vacunación, el día de la infestación y el momento del sacrificio. Las T muestran la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

tra parásitos gastrointestinales. En *Schistosoma mansoni* se evaluaron seis péptidos deducidos de la secuencia primaria de GAPDH, y con la combinación de cuatro de ellos redujeron significativamente el hpg y la carga parasitaria. La vacunación de cabras con ADN de GAPDH de *H. contortus* redujo la producción de huevos (34.9%) y la carga parasitaria en el abomaso (37.7%) (Yan *et al.*, 2013). Aunque los resultados del presente estudio son superiores, se reafirma el hecho de usar GAPDH como candidato vacunal contra *H. contortus*, que en este caso es un péptido que mimifica la respuesta inmunológica.

La proteína de Desorganización Muscular 1 (DIM-1) es un nuevo candidato como antígeno para proteger frente a diversos parásitos. La vacunación en cabras con el gen de DIM-1 redujo la producción de huevos y

carga parasitaria en el abomaso en 45.7 y 51.1%, respectivamente (Yan *et al.*, 2013). Así mismo, la inyección de BS-Ag3 (idéntica a DIM-1) de *Baylisascaris schroederi* (ascariasis de panda) redujo significativamente en 62.9% la carga de parásitos (Wang *et al.*, 2008). Los resultados del presente estudio confirman los hallazgos de usar esta proteína como candidato vacunal. Aunque el mecanismo de protección con el uso de DIM-1 y GAPDH como antígenos es aún desconocido, se discute que puede estar dada por el incremento de anticuerpos y eosinófilos.

El número de eosinófilos fue más alto en el grupo vacunado que en el grupo control ( $p < 0.01$ ). Así mismo, el valor de hemoglobina fue menor en el grupo control a partir del día 56, siendo 20% menor el día del sacrificio (Cuadro 1). El aumento de eosinófilos en sangre periférica es considerado como un mar-

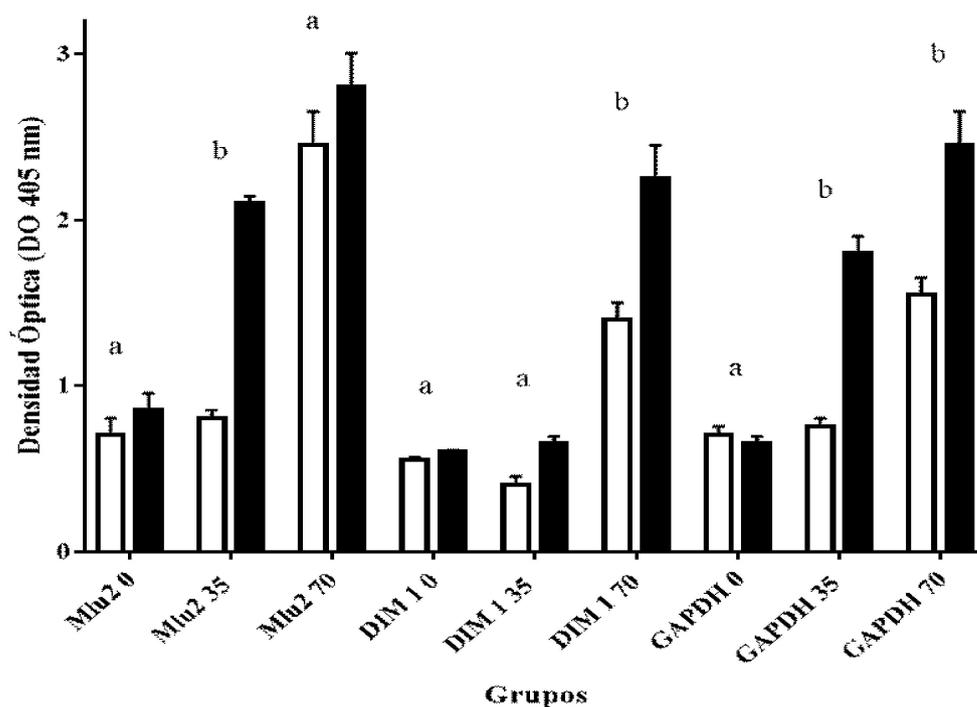


Figura 4. Títulos de IgG que reconocen los péptidos Mlu2 (GSGNAIMGGGSFLSDTRS), DIM-1 (GSGNAIM), GAPDH (FLSDTRS). 0: primera vacunación. 35: día de la infestación; 70: día del sacrificio. Las T muestran la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

cador potencial del hospedero para la resistencia contra *H. contortus* (Douch *et al.*, 1996). Los eosinófilos pueden dañar y probablemente matar las larvas del parásito en el tracto gastrointestinal (Balic *et al.*, 2006). En un estudio *in vitro*, eosinófilos extraídos de lavados mamarios de ovejas infestadas repetidamente, inhibieron la movilidad y mataron las L3 de *H. contortus* en presencia de anticuerpo de superficie anti-L3 (Rainbird *et al.*, 1998).

Los niveles en sangre de IgG que reconocen el epítipo fueron máximos en el día del sacrificio. El mismo comportamiento se observó para ambos péptidos independientes; aunque en el caso de GAPDH hubo una respuesta más rápida, comparado con DIM-1 en el momento de la infestación y en el sacrificio (Figura 4).

Altos títulos de IgG específicos se relacionan con la defensa del huésped contra el desafío de *H. contortus*. Por ejemplo, la inmunización con una fracción de la proteasa catepsina B provocó altos títulos de IgG e indujo una reducción del 47% en la carga de parásitos y del 77% de la producción de huevos (Knox y Smith, 2001). Además, el aumento de los niveles séricos de IgG1 e IgG2 se asociaron con el recuento fecal de huevos disminuido (Schallig *et al.*, 1995). De manera similar, en ovejas resistentes se encontraron antígenos para producir mayores niveles de IgG1 e IgE (Gill *et al.*, 1993). Los resultados aquí descritos fueron consistentes con informes anteriores, porque confirman que el mecanismo de protección puede estar mediado por anticuerpos y la participación de los eosinófilos.

Cuadro 1. Recuento de eosinófilos y niveles de hemoglobina y hematocrito en cuatro corderos vacunados contra *Haemonchus contortus* y cuatro corderos control no vacunados

	Tiempo (días)	Control	Vacunados (Mlu2) <sup>1</sup>
Eosinófilos (1 x 10 <sup>9</sup> ) mL <sup>-1</sup>	0	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
	28	0.01 ± 0 <sup>b</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>a</sup>
	56	0.06 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>a</sup>
	70	0.08 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.07 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g L <sup>-1</sup> )	0	102.2 ± 5.8 <sup>a</sup>	100.6 ± 14.3 <sup>a</sup>
	28	91.4 ± 6.8 <sup>a</sup>	91.0 ± 7.4 <sup>a</sup>
	56	74.2 ± 5.3 <sup>b</sup>	87.2 ± 3.8 <sup>a</sup>
	70	62.6 ± 7.0 <sup>b</sup>	77.4 ± 6.9 <sup>a</sup>
Hematocrito (%)	0	33.8 ± 2.2 <sup>b</sup>	33.1 ± 2.9 <sup>a</sup>
	28	31.1 ± 3.2 <sup>b</sup>	32.0 ± 1.8 <sup>a</sup>
	56	27.3 ± 4.0 <sup>a</sup>	31.5 ± 7.9 <sup>a</sup>
	70	20.7 ± 3.5 <sup>b</sup>	25.5 ± 2.4 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Mlu2 bipéptido (GSGNAIMGGGSFLSDTRS, PM 1713.83 g/mol, 78.2% pureza en Genescript, EEUU) que contiene los epítomos de DIM-1 y GAPDH de *H. contortus*

## CONCLUSIONES

- La respuesta natural contra *Haemonchus contortus* permitió la selección de péptidos a través del biopanning de la biblioteca de fago que mimifican epítomos del parásito.
- Los epítomos que mimifican a DIM-1 y GAPDH confieren protección frente al parásito, a través de una respuesta IgG.

## Agradecimientos

Los autores manifiestan su agradecimiento a los revisores por sus consejos para la mejora del manuscrito, a CAPES por permitir la realización de la mayor parte de los experimentos de este trabajo a través del financiamiento otorgado para la beca predoctoral de Arnielis Díaz, y a UNU-BIOLAC por la beca concedida que facilitó la realización de experimentos del trabajo.

## LITERATURA CITADA

1. **Ambroggio X, Jiang L, Aebig J, Obiakor H, Lukszo J, Narum D. 2013.** The epitope of monoclonal antibodies blocking erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* map to the dimerization and receptor glycan binding sites of EBA-175. PloS One 8(2): e56326. doi: 10.1371/journal.pone.0056326
2. **Arnon R, Tarrab Hazdai R, Steward M. 2000.** A mimotope peptide based vaccine against *Schistosoma mansoni*: synthesis and characterization. Immunology 101: 555-562. doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00139.x
3. **Assana E, Gauci CG, Kyngdon CY, Zoli AP, Dorny P, Geerts S, Lightowers MW. 2010.** Antibody responses to the host-protective *Taenia solium* oncosphere protein TSOL18 in

- pigs are directed against conformational epitopes. *Parasite Immunol* 32: 399-405. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01197.x
4. **Balic A, Cunningham C, Meeusen E. 2006.** Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol* 28: 107-115. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00816.x
  5. **Bishop-Hurley SL, Strachan KA, Sutherland IA. 2010.** The application of phage-displayed peptide libraries to ligand detection in eggs and larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 173: 173-177. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.05.02
  6. **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. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
  7. **Díaz A, Arenal A, França J Gomes AL, Machado MA, Sossanovicz M, Yoshitani U, et al. 2015.** Optimization of an immunoenzymatic (ELISA) assay for detecting ovine antibodies against *Haemonchus contortus*. *Rev Cubana Cienc Agric* 49: 477-485.
  8. **Douch P, Green R, Morris C, McEwan J, Windon R. 1996.** Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *Int J Parasitol* 26: 899-911. doi: 10.1016/S0020-7519(96)80062-2
  9. **Erttmann KD, Kleensang A, Schneider E, Hammerschmidt S, Büttner DW, Gallin M. 2005.** Cloning, characterization and DNA immunization of an *Onchocerca volvulus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Ov-GAPDH). *Biochim Biophys Acta* 1741: 85-94. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.12.010
  10. **Gill H, Watson D, Brandon M. 1993.** Monoclonal antibody to CD4+ T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Immunology* 78: 43-49.
  11. **Gnanasekar M, Rao KV, He YX, Mishra PK, Nutman TB, Kaliraj P, Ramaswamy K. 2004.** Novel phage display-based subtractive screening to identify vaccine candidates of *Brugia malayi*. *Infect Immun* 72: 4707-4715. doi: 10.1128/IAI.72.8.4707-4715.2004
  12. **Gordon HM, Whitlock H. 1939.** A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Council Sci Ind Res* 12: 50-52.
  13. **Han K, Xu L, Yan R, Song C, Li X. 2012.** Vaccination of goats with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase DNA vaccine induced partial protection against *Haemonchus contortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 149: 177-185. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.06.016
  14. **Knox DP, Smith W. 2001.** Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Vet Parasitol* 100: 21-32. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00480-0
  15. **Lacroux C, Nguyen THC, Andreoletti O, Prevot F, Grisez C, Bergeaud JP, Gruner L, et al. 2006.** *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet Res* 37: 607-622. doi: 10.1051/vetres:2006022
  16. **LeJambre LF, Windon RG, Smith WD. 2008.** Vaccination against *Haemonchus contortus*: performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Vet Parasitol* 153: 302-312. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.01.03
  17. **Liu Y, Brindley PJ, Zeng Q, Li Y, Zhou J, Chen Y, Yang S, et al. 2011.** Identification of phage display peptides with affinity for the tegument of *Schistosoma japonicum* schistosomula. *Mol Biochem Parasitol* 180: 86-98. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.09.001
  18. **[MAFF] Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1986.** Manual of veterinary parasitological laboratory

- techniques. London, UK.: London: Her Majesty's Stationery Office. 160 p.
19. **Melzer H, Fortugno P, Mansouri E, Felici F, Marinets A, Wiedermann G, Kollaritsch H, et al. 2002.** Antigenicity and immunogenicity of phage library selected peptide mimics of the major surface proteophosphoglycan antigens of *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 24: 321-328.
  20. **Muleke CI, Yan R, Sun Y, Zhao G, Xu L, Li X. 2007.** Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with a recombinant cysteine protease. *Small Ruminant Res* 73: 95-102. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.11.006
  21. **Newton SE, Meeusen ENT. 2003.** Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Parasite Immunol* 25: 283-296. doi: 10.1046/j.1365-3024.2003.00631.x
  22. **Prudencio CR, Marra AO, Cardoso R, Goulart LR. 2010.** Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 172: 122-131. doi: 10.1016/j.vetpar.-2010.04.012
  23. **Rainbird M, Macmillan D, Meeusen EN. 1998.** Eosinophil mediated killing of *Haemonchus contortus* larvar: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin 5. *Parasite Immunol* 20: 93-103. doi: 10.1046/j.1365-3024.1998.00132.x
  24. **Rogalski TM, Gilbert MM, Devenport D, Norman KR, Moerman DG 2003.** DIM-1, a novel immunoglobulin superfamily protein in *Caenorhabditis elegans*, is necessary for maintaining bodywall muscle integrity. *Genetics* 163: 905-915.
  25. **Sargison N, Jackson F, Gilleard J. 2011.** Effects of age and immune suppression of sheep on fecundity, hatching and larval feeding of different strains of *Haemonchus contortus*. *Vet J* 189: 296-301. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.-08.001
  26. **Shakya KP, Miller JE, Lomax LG, Burnett DD. 2011.** Evaluation of immune response to artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs. *Vet Parasitol* 181: 239-247. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.051
  27. **Schallig HD, Hornok S, Cornelissen JB. 1995.** Comparison of two enzyme immunoassays for the detection of *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Vet Parasitol* 57: 329-338. doi: 10.1016/0304-4017(94)00693-7
  28. **Tang LF, Yi XY, Zeng XF, Wang LQ, Zhang SK. 2004.** *Schistosoma japonicum*: isolation and identification of peptides mimicking ferritin epitopes from phage display library *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 36: 206-210.
  29. **Tavernor AS, Smith TS, Langford CF, Graham M, Munn EA. 1992.** Immune response of Clun Forest sheep to vaccination with membrane glycoproteins from *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol* 14: 671-675. doi: 10.1111/j.1365-3024.1992.tb00038.x
  30. **Terefe G, Lacroux C, Andréoletti O, Grisez C, Prevot F, Bergeaud JP, Penicaud J, et al. 2007.** Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. *Parasite Immunol* 29: 415-424. doi: 10.1111/j.1365-3024.2007.00958.x
  31. **Tsuji N, Kasuga-Aoki H, Isobe T, Arakawa T, Matsumoto Y. 2002.** Cloning and characterisation of a highly immunoreactive 37 kDa antigen with multi-immunoglobulin domains from the swine roundworm *Ascaris suum*. *Int J Parasitol* 32: 1739-1746. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00179-0
  32. **Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D, Ibarra F, Reyes-Pérez M, Reyes-Vivas H, López-Velázquez G, et al. 2008.** Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage

- display library. *Parasitology* 135: 1437-1445. doi: 10.1017/S003118200800471X
33. **Wang T, He G, Yang G, Fei Y, Zhang Z, Wang C, Yang Z, et al. 2008.** Cloning, expression and evaluation of the efficacy of a recombinant *Baylisascaris schroederi* Bs-Ag3 antigen in mice. *Vaccine* 26: 6919-6924. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.09.079
34. **Wardhaugh KG 2005.** Insecticidal activity of synthetic pyrethroids, organophosphates, insect growth regulators, and other livestock parasiticides: an Australian perspective. *Environ Toxicol Chem* 24: 789-796. doi: 10.1897/03-588.1
35. **Wu HW, Hu XM, Wang Y, Kurtis JD, Zeng FJ, McGarvey ST, Wu GL, et al. 2006.** Protective immunity induced by phage displayed mitochondrial related peptides of *Schistosoma japonicum*. *Acta Trop* 99: 200-207. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.08.006
36. **Yan F, Xu L, Liu L, Yan R, Song X, Li X. 2010.** Immunoproteomic analysis of whole proteins from male and female adult *Haemonchus contortus*. *Vet J* 185: 174-179. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.05.021
37. **Yan R, Sun W, Song X, Xu L, Li X. 2013.** Vaccination of goats with DNA vaccine encoding Dim-1 induced partial protection against *Haemonchus contortus*: a preliminary experimental study. *Res Vet Sci* 95: 189-199. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.02.020
38. **Yanming S, Ruofeng Y, Muleke CI, Guangwei Z, Lixin X, Xiangrui L. 2007.** Vaccination of goats with recombinant galectin antigen induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *Parasite Immunol* 29: 319-326. doi: 10.1111/j.1365-3024.2007.00949.x
39. **Zhao G, Yan R, Muleke CI, Sun Y, Xu L, Li X. 2012.** Vaccination of goats with DNA vaccines encoding H11 and IL-2 induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *Vet J* 191: 94-100. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.12.023