

UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



**universidad
de león**

TESIS DOCTORAL

**NUEVOS ENFOQUES PARA EL DIAGNÓSTICO Y EL CONTROL DE LA
DICROCOELIOSIS, IMPORTANTE PARASITOSIS HEPÁTICA**

DE LOS RUMIANTES

ANA MARÍA MARTÍNEZ IBEAS

León, 2013

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en León, en el Instituto de Ganadería de Montaña (IGM), centro mixto entre el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de León (ULE).

Dña. Ana M^a Martínez Ibeas ha disfrutado de un contrato a través de la convocatoria de la Junta de Castilla y León para “Personal investigador de reciente titulación universitaria” (ODEN EDU/1933/2008 de 11 de noviembre, B.O. C. y L. n^o 44, 13 de noviembre de 2008), con destino en el Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), como TITULADA SUPERIOR DE ACTIVIDADES TÉCNICAS Y PROFESIONALES, cofinanciado por el Fondo Social Europeo.

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), del Ministerio de Ciencia y Educación de España y por el Fondo Social Europeo, a través del Proyecto Ref. AGL2007-62824/GAN. Una parte de la investigación realizada ha sido financiada por la Junta de Castilla y León a través del Proyecto Ref. CSI01A06.

Agradecimientos

A continuación quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han contribuido de alguna manera, científica o personalmente, a la realización de esta Tesis Doctoral:

A la Dra. M^a Yolanda Manga González, Directora de esta Tesis Doctoral, Investigadora Científica del CSIC y Jefa del departamento de Sanidad Animal del Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto y haber depositado su confianza en mí. Porque sin ella este proyecto nunca habría salido adelante.

A las Dras. M^a del Camino González Lanza y María Martínez Valladares, Codirectoras de esta Tesis, por su inestimable apoyo durante estos años.

A las Dras. M^a Teresa Gárate y M^a Jesús Perteguer, así como a todo el equipo del Servicio de Parasitología del Instituto Carlos III de Majadahonda, por su incalculable ayuda profesional en la construcción y cribado de la genoteca y en la obtención de proteínas recombinantes, por haberme dado la oportunidad de aprender a su lado y haberme acogido como un miembro más de su equipo. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento y profundo cariño a Chus, Teresa, Carolina, Luciano, Pamela, Inés, M^a Eugenia y Ramona por su afecto durante los meses que estuve en Madrid, porque me hicieron sentir como en casa.

A la Dra. Ana Oleaga y al Dr. Ricardo Pérez Sánchez, del IRNASA (CSIC) de Salamanca, por haberme acogido allí en los comienzos de la Tesis para enseñarme las técnicas de proteómica, por su asesoramiento durante todo el proyecto, y por el buen trato que siempre recibí de ellos. Quiero agradecer también a Edu, Ana y Vero su ayuda y amistad mientras estuve en Salamanca y en los congresos en los que hemos coincidido.

Al Dr. Baltasar Miñambres, por enseñarme los fundamentos de la biología molecular y ayudarme a dar los primeros pasos en el desarrollo de este trabajo científico, durante su estancia en el CSIC.

A M^a Paz del Pozo, Carmen Espiniella y M^a Luz Carcedo, miembros del equipo de Parasitología del CSIC, por su asistencia técnica durante la realización de esta Tesis.

A la Dra. Luz Valero, de la Unidad de Proteómica del “Centro de Investigación Príncipe Felipe” — miembro de Proteored (Valencia) —, y al Dr. Emilio Camafeita del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (Madrid), por su asistencia técnica en los análisis de Espectrometría de Masas.

Al Dr. Paniagua y al Dr. Barreiro de los Institutos INBIOMIC e INBIOTEC, de la Universidad de León, por su ayuda en los análisis proteómicos.

Al Dr. Octavio Rivero de la Unidad de Investigación del Hospital de León, por su asesoramiento en la construcción de la genoteca de expresión.

A la Dra. Mercedes Mezo (Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-INGACAL, A Coruña) y al Prof. Dr. José María Alunda (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid) por cedernos los sueros heterólogos utilizados durante los ensayos de ELISA.

Al Prof. Dr. Domenico Otranto de la Universidad de Bari (Italia), por proporcionarnos los ejemplares adultos de *Dicrocoelium chinensis*.

A mis padres, Álvaro y Paz, por su constante apoyo y comprensión, por sus consejos, por animarme a seguir siempre hacia delante, por todos los sacrificios que han hecho en su vida para que podamos cumplir nuestros sueños. A mi hermana y mi mejor amiga, Raquel, por estar siempre dispuesta a escuchar. Gracias a todos por haber confiado en mí y por estar siempre a mi lado.

A Fran, por sus constantes ánimos, porque nunca dudó de que consiguiera mis propósitos. A todos los amigos y compañeros de trabajo con los que he compartido tantos momentos en estos años, por su cariño y amistad. Gracias a todos.

A mis padres: Álvaro y Paz

*Por haber sido el mejor ejemplo a seguir en la vida, nada de esto habría
sido posible sin vosotros.*

LISTADO DE ABREVIATURAS:

2D: Bidimensional

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARNLr: Subunidad grande del gen ARNr

ARNm: ARN mitocondrial

ARNr: ARN ribosomal

ARNSr: Subunidad pequeña del gen ARNr

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BSA: Albúmina de suero bovino

Cox1: Citocromo C oxidasa 1

Cox3: Citocromo C oxidasa 3

Cytb: Citocromo oxidasa B

DAB: Diaminobencidina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ES: Extracto de excreción-secreción

EST: Expressed Sequence Tag

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa

GGB: Gamma-globulina bovina

GO: Gene Ontology

GST: Glutation-S-transferasa

HSPs: Proteínas de choque térmico

Ig: Inmunoglobulina

IPTG: β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo

IS: Índice serológico

ITS-2: Internal transcribed spacer

LB: Luria-Bertani

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

MS: Espectrometría de Masas

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ND4: NADH deshidrogenasa IV

Ni-NTA: Níquel-ácido nitrilotriacético

ORF: Open Reading Frame

p.i.: Post-infección

PBS: Tampón fosfato salino

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

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: Protein Data Bank

pi: Punto isoelectrico

Pm: Peso molecular

SDS: Dodecilsulfato sodico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

TAE: Tris-acetato-EDTA

TBE: Tris-borato-EDTA

TBS: Tampón tris salino

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

TCA: Ácido tricloroacético

TEMED: Tetramethylethylenediamine

TG: Extracto de tegumento

X-Gal: 5-bromo-4cloro-3indol- β -D-galactósido

WB: Western Blot

SOLUCIONES Y TAMPONES UTILIZADOS:

I. EN EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

TAE 1X

Tris-acetato: 40 mM

EDTA: 1 mM

II. EN LA PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS

TBS

Tris-HCl: 10 mM

ClNa: 150 mM

Ph: 7,5

Triton X-100 1%

TBS: 100 ml

Tritón: 1g

Solución tampón de inhibidores de proteasas

EDTA: 1 mM

PMSF: 0,33 mM

TPCK: 0,1 mM

PEPSTATIN: 0,1 µM

Medio de cultivo RPMI

N-acetil-L-alanil-L-glutamina: 200 mM

NaHCO₃ (7,5%): 4 ml/l

Gentamicina: 40 mg/l

PBS

NaCl: 137 mM

KCl: 2,7 mM

Na₂HPO₄: 10 mM

KH₂PO₄: 2 mM

pH: 7,4

III. EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Archilamida-Bisacrilamida 30%

Archilamida: 292 g/l

Bisacrilamida: 8 g/l

Persulfato amónico

Persulfato amónico: 10%

Tampón para gel de separación

Tris-HCl: 1,5 M

pH: 8,8

Tampón para gel de empaquetamiento

Tris-HCl: 0,5 M

pH: 6,8

Tampón de carga 1X

Tris-HCl (pH: 6, 8): 62, 5 mM

SDS: 10%

Azul de bromofenol: 0,5%

Glicerol: 10%

Beta-mercaptoetanol: 0,5%

Tampón de rehidratación

Urea: 7 M

Tiourea: 2 M

CHAPS: 4%

DDT: 50 mM

Anfolitos: 0,2%

Azul de bromofenol: 0,002%

Tampón de equilibrado

Urea: 6 M

Tris-HCl (pH: 8,8): 50 mM

Glicerol: 20%

SDS: 2%

Trazas de Azul de bromofenol

Tampón de electroforesis SDS-PAGE

Tris: 25 mM

Glicina: 92 mM

SDS: 1%

pH: 8,3

IV. EN LA TINCIÓN DE GELES

Tinción con Coomassie coloidal

Azul de Coomassie R-250: 0,12%

Sulfato amónico: 10%

Metanol: 20%

Ácido fosfórico: 10%

Solución de fijación

Metanol: 40%

Ácido acético: 10%

V. EN LAS TÉCNICAS DE ELECTROTRANSFERENCIA Y WB

Tampón de transferencia

Tris (pH: 8,3): 25 mM

Glicina: 192 mM

Metanol: 20%

Rojo Ponceau al 1%

Rojo Ponceau: 1%

Ácido acético: 10%

Agua milli-Q: 89%

Solución de bloqueo

PBS

Tween 20: 0,05%

BSA: 3%

Solución de lavado de membrana

PBS

Tween 20: 0,05%

VI. EN LA CONSTRUCCIÓN DE LA GENOTECA DE ADN_c

STE

Tris-HCl (pH: 8): 10 mM

NaCl: 0,1 mM

EDTA: 1 mM

Tampón SM

NaCl: 100 mM

Tris-HCl (pH: 7,5): 50 mM

MgSO₄: 10 mM

Gelatina: 0,01%

VII. MEDIOS DE CULTIVO

Medio LB líquido

Triptona: 10 g/l

Extracto de levadura: 5 g/l

ClNa: 5 g/l

pH: 7

Medio LB sólido

Añadir al medio líquido agar al 1.5%

Medio LB con Suplementos

Añadir al medio LB

Maltosa: 0,2%

MgSO₄: 10 mM

Medio LB agar cobertura

Añadir al medio LB
Agar: 8 g/l

VIII. EN LA PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Solución RF1

RbCl: 100 mM
MnCl₂·4H₂O: 50 mM
KAc: 30 mM
CaCl₂·2H₂O: 10 mM
Glicerol: 15%
pH: 5,8

Solución RF2

MOPS: 10 mM
RbCl: 10 mM
CaCl₂·2H₂O: 10 mM
Glicerol: 15%
pH: 6,8

IX. EN LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Tampón enzima Prescission Protease Cleavage

Tris-HCl: 50 mM
NaCl: 150 mM
EDTA: 1 mM
DTT: 1 mM
pH: 7.5

X. EN LOS ENSAYOS DE LA TÉCNICA ELISA

Tampón de tapizado carbonato/bicarbonato

CO₃Na₂: 1,59 gr/l
CO₃Na: 2,93 gr/l
H₂O destilada: 1l
pH: 9,6

Tampón citrato

Ácido cítrico: 2,14 gr
PO₄ H Na₂ 12 H₂O: 3,54 gr
H₂O destilada: 400 ml
pH: 5

Contenido

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS	19
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	27
1. <i>DICROCOELIUM DENDRITICUM</i> Y DICROCOELIOSIS.....	29
1.1. CICLO BIOLÓGICO.....	30
1.2. HOSPEDADORES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	33
1.3. PATOLOGÍA Y CLÍNICA	35
1.4. LESIONES	38
1.5. TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL.....	39
1.6. DIAGNÓSTICO DE LA DICROCOELIOSIS.....	43
1.6.1. Detección en hospedadores intermediarios	43
1.6.2. Diagnóstico de la dicrocoeliosis en hospedadores definitivos.....	44
2. TÉCNICAS MOLECULARES.....	48
2.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN <i>D. DENDRITICUM</i>	48
2.2. ESTUDIOS MOLECULARES REALIZADOS EN OTRAS PARASITOSIS	50
2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	51
2.2.2. Proteínas recombinantes	53
2.2.3. Anticuerpos monoclonales.....	56
2.2.4. Análisis proteómico.....	58
2.2.5. Genotecas de ADNc.....	63
III. MATERIALES Y MÉTODOS	67
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	69
1.1. PARÁSITOS ADULTOS	69
1.2. HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS.....	69
1.2.1. Moluscos infectados de forma natural	69
1.2.2. Moluscos infectados de forma experimental	71

1.2.3.	Hormigas infectadas de forma natural.....	72
1.3.	SUEROS.....	73
1.4.	VECTORES DE CLONACIÓN	74
1.4.1.	Fagos.....	74
1.4.2.	Plásmidos	75
1.5.	CEPAS BACTERIANAS.....	78
2.	MÉTODOS.....	79
2.1.	DETECCIÓN DE <i>D. dendriticum</i> MEDIANTE PCR EN LOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS	79
2.1.1.	Extracción de ADN.....	79
2.1.2.	Obtención y análisis de un fragmento de ADN mitocondrial de <i>D. dendriticum</i>	79
2.1.3.	Detección de la infección mediante amplificación del fragmento de ADN mitocondrial	84
2.1.4.	Detección de la infección mediante amplificación de la región ITS-2.....	85
2.2.	ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS ANTÍGENOS DE TEGUMENTO Y EXCRETOR/SECRETOR DE <i>D. dendriticum</i>	87
2.2.1.	Extracción del antígeno de Tegumento (TG).....	87
2.2.2.	Método de Bradford para la cuantificación de proteínas	87
2.2.3.	Extracción del antígeno Excretor-Secretor (ES)	88
2.2.4.	Separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional.....	88
2.2.5.	Tinciones de geles	92
2.2.6.	Transferencia y Western Blot (WB).....	93
2.2.7.	Electroforesis monodimensional, transferencia y Western Blot	94
2.2.8.	Adquisición y análisis de las imágenes 2D.....	95
2.2.9.	Identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas	95
2.3.	CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE <i>D. dendriticum</i>	98
2.3.1.	Obtención del ARN total de vermes adultos de <i>D. dendriticum</i>	98
2.3.2.	Obtención de ARNm.....	98

2.3.3.	Precipitación y concentración de la muestra de ARNm	99
2.3.4.	Construcción de la Genoteca de ADNc	99
2.3.5.	Inmunocribado de la genoteca de expresión.....	104
2.3.6.	Cribado al azar de la genoteca de expresión del adulto de <i>D. dendriticum</i>	105
2.3.7.	Preparación de células competentes	107
2.3.8.	Clonación en el vector pGEM®-T Easy.....	108
2.3.9.	PCR de colonias	108
2.3.10.	Extracción de ADN plasmídico de los fragmentos clonados	109
2.4.	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE <i>D. dendriticum</i>	110
2.4.1.	Análisis bioinformático de las secuencias	110
2.4.2.	Clonación en vectores de expresión	111
2.4.3.	Inducción y expresión de las proteínas de fusión	113
2.4.4.	Purificación de las proteínas de fusión	114
2.5.	EVALUACIÓN DE LOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DICROCOELIOSIS	116
2.5.1.	Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos (ELISA)	116
IV.	RESULTADOS	119
1.	DETECCIÓN DE <i>D. dendriticum</i> MEDIANTE PCR EN LOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS 121	
1.1.	DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE ADN MITOCONDRIAL	121
1.1.1.	Análisis de la secuencia del fragmento de ADN mitocondrial	121
1.1.2.	Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR basada en ADN mitocondrial 123	
1.2.	DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE DEL GEN ITS-2	124
2.	ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS ANTÍGENOS DE TG Y ES DE <i>D. dendriticum</i>	127
2.1.	EXTRACCIÓN DE ANTÍGENOS	127

2.2.	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	127
2.3.	PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.....	128
2.4.	ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL ANTÍGENO DE TEGUMENTO.....	130
2.5.	IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DEL TG DE <i>D. dendriticum</i>	136
2.6.	ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL ANTÍGENO DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN	140
2.7.	IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DEL ES DE <i>D. dendriticum</i>	144
2.8.	ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS.....	147
3.	CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE ADULTOS DE <i>D. dendriticum</i>	151
3.1.	INMUNOCRIBADO DE LA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE <i>D. dendriticum</i>	153
3.2.	CRIBADO AL AZAR DE LA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE <i>D. dendriticum</i>	153
3.3.	ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	161
3.4.	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE <i>D. dendriticum</i>	163
3.4.1.	Análisis de la secuencia del clon de la Mioglobina.....	163
3.4.2.	Análisis de la secuencia del clon de la proteína 8-kDa.....	167
3.4.3.	Análisis de la secuencia del clon de la proteína Cistatina	169
3.4.4.	Clonación en vectores de expresión	171
3.4.5.	Inducción y expresión de las proteínas de fusión	172
3.4.6.	Purificación de las proteínas de fusión	175
4.	EVALUACIÓN DE LOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DICROCOELIOSIS.....	178
4.1.	EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA DE 8-KDA PARA EL DIAGNÓSTICO POR ELISA.....	179
V.	DISCUSIÓN	181
1.	DETECCIÓN DE <i>D. dendriticum</i> MEDIANTE PCR EN LOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS 183	
2.	ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS ANTÍGENOS TG Y ES DE <i>D. dendriticum</i>	188
3.	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE <i>D. dendriticum</i>	194

4. EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA DE 8-kDa PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DICROCOELIOSIS	
200	
VI. RESUMEN	203
VII. SUMMARY	211
VIII. CONCLUSIONES	217
IX. BIBLIOGRAFIA	223
X. ANEXOS. PUBLICACIONES	259

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Introducción y Objetivos

La dicrocoeliosis causada por *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 es una importante trematodosis hepática que afecta a un amplio rango de especies de mamíferos, principalmente rumiantes, y que ocasionalmente puede afectar al hombre. La dicrocoeliosis está ampliamente distribuida. Se ha detectado la infección por el parásito en distintos países de Europa, Asia, América, y Norte de África (Otranto & Traversa, 2003). En España, se han hallado prevalencias de parasitación en varias provincias (Del Rio, 1967; Uriarte *et al.*, 1985; Reina *et al.*, 1987; Manga-González *et al.*, 1991, 2007; González-Lanza *et al.*, 1993; Cordero *et al.*, 1994; Ferre *et al.*, 1994). El parásito adulto vive en los conductos biliares y vesícula biliar de los hospedadores definitivos, donde pone huevos embrionados que salen al exterior con las heces del animal. Dicho parásito tiene un ciclo biológico extraordinariamente complejo, en el que intervienen, además de los mamíferos, numerosas especies de moluscos terrestres y hormigas que actúan como primeros y segundos hospedadores intermediarios, respectivamente (Manga-González *et al.*, 2001; Manga-González & González-Lanza, 2005). La importancia económica y sanitaria de la dicrocoeliosis se debe, principalmente, a las pérdidas directas ocasionadas por el decomiso de hígados alterados y a los costes indirectos causados por los trastornos digestivos derivados de las alteraciones hepatobiliares que producen los parásitos (Sánchez-Campos *et al.*, 1996; Manga-González *et al.*, 2004; Ferreras-Estrada *et al.*, 2007). Asimismo, hay que tener en cuenta los costes adicionales originados por la aplicación de tratamientos antihelmínticos a los animales (Himonas & Liakos, 1980; Cordero-del-Campillo *et al.*, 1982; Rojo-Vázquez *et al.*, 1989) que, además, por el momento no resultan eficaces frente a formas inmaduras del parásito, por lo que el control de la dicrocoeliosis continúa siendo insatisfactorio (Ecker & Hertzberg, 1994; Manga-González *et al.*, 2010). Para la aplicación de programas estratégicos de control de la dicrocoeliosis en un área determinada es imprescindible realizar estudios epidemiológicos previos y precisos (Manga-González *et al.*, 2010), para lo que se requieren métodos de diagnóstico del parásito sensibles y específicos, tanto en sus hospedadores definitivos como intermediarios.

La detección e identificación de las fases larvianas de *D. dendriticum* en los caracoles y hormigas, hospedadores intermediarios, se ha basado habitualmente en las características morfológicas observadas por técnicas microscópicas (Manga-González, 1983, 1987; Manga-González *et al.*, 2001). Sin embargo, estas técnicas requieren de una gran experiencia, consumen mucho tiempo y, a menudo, resultan

Introducción y Objetivos

insuficientes, ya que en el caso de los moluscos infectados naturalmente es necesario contar con fases larvianas de *D. dendriticum* obtenidas de moluscos infectados experimentalmente (González-Lanza *et al.*, 1997) para su comparación. Además, en el caso de las metacercarias halladas en las hormigas sería necesario confirmar su determinación específica, infectando con ellas hospedadores definitivos para obtener el parásito adulto (Campo *et al.*, 2000). Sin embargo, no siempre se puede llevar a cabo dicha infección, ni se puede contar con metacercarias y larvas cerebrales procedentes de hormigas infectadas experimentalmente con *D. dendriticum*, lo que hace arriesgada la identificación de las fases larvianas encontradas en hormigas infectadas en la naturaleza. Además, hay que tener en cuenta que los hospedadores intermediarios pueden albergar fases larvianas de otras especies de trematodos, por lo que la determinación parasitaria mediante la sola observación directa al estereomicroscopio y microscopio a menudo puede resultar bastante complicada. Teniendo en cuenta todo lo mencionado, y el hecho de que se requieren al menos 50 días p.i. para la primera observación del parásito al estereomicroscopio, en moluscos infectados experimentalmente y mantenidos en condiciones de laboratorio (González-Lanza *et al.*, 1997), y hasta 9 meses en moluscos infectados experimentalmente (en Octubre) y mantenidos en condiciones naturales de campo (Manga-González *et al.*, 1995), es fácil deducir que los estudios epidemiológicos realizados hasta el momento carecen de exactitud, debido a los posibles falsos negativos obtenidos cuando se emplean estos métodos tradicionales de identificación.

El extraordinario avance de la biotecnología ha permitido el desarrollo de técnicas muy eficaces en el estudio y caracterización de individuos a través del ADN. En los últimos años se han desarrollado múltiples aplicaciones tecnológicas de biología molecular en Parasitología (Hyde, 1990; Rivas & López, 1993; Prichard, 1997; Hu *et al.*, 2004). Las investigaciones se han enfocado tanto a la identificación como a la tipificación molecular de los agentes etiológicos, lo que ha permitido establecer perfiles genéticos característicos de numerosos parásitos, entre ellos algunos trematodos (Mas-Coma *et al.*, 2001; Magalhaes *et al.*, 2004; Cucher *et al.*, 2006; Littlewood *et al.*, 2006). Sin embargo, en el caso de *D. dendriticum* la información es muy escasa (Sandoval *et al.*, 1999, 2013; Olson *et al.*, 2003; Maurelli *et al.*, 2007). Por otra parte, existen diferentes métodos moleculares para la identificación de parásitos en sus hospedadores intermediarios. Entre los más usados está la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), que permite realizar un análisis altamente sensible,

Introducción y Objetivos

específico y reproducible. Dicha técnica se fundamenta en la amplificación de un fragmento de ADN conocido, utilizando para ello dos oligonucleótidos específicos. La PCR se ha empleado satisfactoriamente en la detección de fases larvarias de algunos trematodos (*Schistosoma* y *Fasciola*) en moluscos acuáticos que actúan como sus hospedadores intermediarios (Hanelt *et al.*, 1997; Kozak & Wedrowicz, 2010). Sin embargo, de acuerdo con nuestra información, hasta el inicio de esta Tesis Doctoral no existían trabajos sobre la utilización de la técnica de PCR para la detección precoz e identificación de las fases larvarias de *D. dendriticum* en los moluscos terrestres y hormigas, a excepción del realizado por Heussler *et al.* (1998), quienes utilizaron una sonda de ADN para la detección molecular de *D. dendriticum* en las hormigas.

El diagnóstico de la dicrocoeliosis en los hospedadores definitivos se realiza, primordialmente, por técnicas coprológicas convencionales, mediante la detección de huevos en las heces de los mismos. Estas técnicas son poco sensibles y, además, no permiten detectar la infección durante el periodo de prepatencia, es decir entre los días 48 y 79 días p.i. en corderos, de acuerdo con diferentes autores (Tarry, 1969; Chandra, 1973; Campo *et al.*, 2000). Este retraso en la detección y la poca sensibilidad de la técnica puede traer como consecuencia el daño hepático en los animales y la contaminación de los pastos con los huevos del parásito eliminados con las heces. Los tests inmunológicos indirectos que se han realizado hasta el momento, para la detección de anticuerpos en suero, utilizaban como antígeno mezclas complejas de proteínas que están presentes en varios parásitos y que pueden originar reacciones cruzadas (González-Lanza *et al.*, 2000; Sánchez-Andrade *et al.*, 2003; Simsek *et al.*, 2006; Broglia *et al.*, 2009; Colwell & Goates, 2010). Además, existen muy pocas investigaciones sobre la dinámica de la respuesta inmune humoral en animales natural o experimentalmente infectados con *D. dendriticum* (González-Lanza *et al.*, 2000; Şimşek *et al.*, 2006).

En cuanto a la composición de las fracciones antigénicas, sobre todo aquellas específicas de este parásito, la información disponible es muy escasa y está basada sólo en estudios convencionales realizados mediante Western Blot y SDS-PAGE (Gundlach & Sadzikhowski, 1987; Savitskii & Benediktov, 1988; Şimşek *et al.*, 2006). Revilla-Nuín *et al.* (2005), en un trabajo sobre la composición proteica de los extractos ES (Excreción/Secreción) y somático de este parásito, purificaron parcialmente por cromatografía una proteína de 130 kDa, que era la que presentaba mayor

Introducción y Objetivos

especificidad inmunológica. De acuerdo con sus resultados, dicha proteína podría ser utilizada para el diagnóstico serológico y para ensayos de protección. Sin embargo, las investigaciones preliminares realizadas en ese sentido (González-Lanza *et al.*, 2006) pusieron de manifiesto el grave inconveniente que supone la baja concentración de esta proteína, cuando se obtiene mediante las técnicas bioquímicas convencionales. Este tipo de técnicas para purificar proteínas tiene muchas limitaciones, ya que requieren mucho tiempo y son difíciles de estandarizar entre los distintos laboratorios (Knox *et al.*, 2001). Por ello, actualmente muchos científicos han dirigido sus esfuerzos a la obtención de antígenos recombinantes mediante técnicas de biología molecular, que han sido utilizados para el diagnóstico de distintas trematodosis y en ensayos de protección como antígenos vacunales (Martínez-Fernández *et al.*, 2004; López-Abán *et al.*, 2008; Martínez-Sernández *et al.*, 2011; Muiño *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2011; Gaudier *et al.*, 2012). Sin embargo, según nuestra información, hasta el comienzo de esta Tesis Doctoral, no se han llevado a cabo estudios de este tipo en lo que a *D. dendriticum* se refiere.

Para poder implementar un método de diagnóstico sensible y precoz de la dicrocoeliosis en los hospedadores definitivos es necesario identificar, aislar y caracterizar antígenos parasitarios específicos. En este sentido, la combinación de estudios proteómicos e inmunológicos constituyen una poderosa herramienta en la identificación de proteínas útiles en el diagnóstico de esta parasitosis. Debido a que las moléculas involucradas en la interfase parásito-hospedador se encuentran entre las que el parásito expone al hospedador durante la infección —tales como las proteínas de los extractos ES o tegumento (TG)— el conocimiento de estas proteínas es un factor clave para mejorar la comprensión de las complejas interacciones parásito-hospedador. Además, el estudio de estas fracciones permitiría la identificación de dianas terapéuticas, candidatos vacunales o antígenos para el diagnóstico de la enfermedad. El análisis de estas fracciones tiene, además, la ventaja de facilitar los estudios proteómicos por poseer una composición más sencilla que los extractos parasitarios completos (Wilson *et al.*, 2004). Sin embargo, según nuestra información, no se han llevado a cabo investigaciones sobre los proteomas del TG y ES de *D. dendriticum*, estudios que sí se han realizado en otros trematodos (Pérez-Sánchez *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011).

Introducción y Objetivos

Por otra parte, el análisis de secuencias de expresión (EST), mediante el cribado de genotecas de ADNc, ha demostrado ser otra potente herramienta en la caracterización de conjuntos masivos de secuencias de genes, que se expresan de manera específica en una determinada etapa del desarrollo (Adams *et al.*, 1995). En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios de este tipo para identificar proteínas específicas de parásitos, que podrían ser interesantes antígenos para el diagnóstico de diversas enfermedades parasitarias (Oliveira, 2007; Young *et al.*, 2010a; Yoo *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012). Sin embargo, al comienzo de esta Tesis Doctoral no existía información alguna relacionada con *D. dendriticum* en la base de datos EST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST.html>).

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente dicho, y ante la falta de información molecular del parásito, el **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral fue mejorar el diagnóstico de la dicrocoeliosis, tanto en sus hospedadores definitivos como intermediarios, mediante técnicas moleculares e inmunológicas con el fin de establecer medidas profilácticas y de control más eficaces.

Para llevar a cabo dicho objetivo general nos propusimos abordar los siguientes **objetivos parciales**:

1. Puesta a punto y validación de un método analítico basado en la técnica de PCR que permita identificar, con precisión y de forma precoz, *D. dendriticum* en los moluscos y hormigas, primeros y segundos hospedadores intermediarios.
2. Identificación de las proteínas mayoritarias y antigénicas de los extractos de tegumento y de excreción/secreción de adultos de *D. dendriticum*, mediante el uso de técnicas de electroforesis bidimensional (2D) y espectrometría de masas (MS).
3. Construcción de una genoteca de expresión de *D. dendriticum* y cribado de la misma, para la identificación de nuevos genes del parásito, con el fin de ampliar la información molecular del mismo.
4. Secuenciación y caracterización de aquellos genes que pudieran tener interés como antígenos en el diagnóstico de la dicrocoeliosis.
5. Clonación, expresión y purificación de dichas proteínas en su forma recombinante.

Introducción y Objetivos

6. Evaluación de los antígenos recombinantes obtenidos mediante Western Blot y ELISA para la realización del diagnóstico serológico de la dicrocoeliosis.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. *DICROCOELIUM DENDRITICUM* Y DICROCOELIOSIS

El género *Dicrocoelium* Dujardin, 1845 se encuadra, de acuerdo con Manga-González (1999), en las siguientes categorías taxonómicas:

Phylum Platyhelminthes

Clase Trematoda

Subclase Digenea

Orden Plagiorchiida

Familia Dicrocoeliidae

Las principales especies del género *Dicrocoelium* que causan dicrocoeliosis en rumiantes son: *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899; *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 y *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov & Ryjikov, 1951) Tang & Tang, 1978.

En cuanto a la especie *D. dendriticum*, parásito objeto de nuestro estudio, se localiza en los conductos biliares y vesícula biliar de un gran número de especies de mamíferos domésticos y silvestres, principalmente rumiantes. Ocasionalmente puede afectar al hombre (Mohamed & Mummery, 1990).

Su ciclo biológico es extremadamente complejo, ya que en él intervienen, además de mamíferos, distintas especies de moluscos terrestres y hormigas, que actúan como primeros y segundos hospedadores intermediarios, respectivamente (Manga-González *et al.*, 2001; Manga-González & González-Lanza, 2005). Dicha complejidad hace difícil la aplicación de medidas profilácticas y de control del parásito.

La dicrocoeliosis causada por *D. dendriticum* es una parasitosis hepática importante desde un punto de vista económico y sanitario. Produce pérdidas económicas directas por el decomiso del hígado y aplicación de tratamientos, así como indirectas, debidas a las alteraciones hepatobiliares, tales como: disminución del peso de los animales, retraso en el crecimiento, reducción de la producción de leche (Cavani *et al.*, 1982; Karanfilovski, 1983; Sánchez-Campos *et al.*, 1996; Campo *et al.*, 2000; Manga-

González *et al.*, 2004; Ferreras-Estrada *et al.*, 2007). Esta parasitosis es cosmopolita ya que se han hallado rumiantes parasitados tanto en España (Del Rio, 1967; Uriarte *et al.*, 1985; Reina *et al.*, 1987; Manga-González *et al.*, 1991, 2007; González-Lanza *et al.*, 1993; Cordero-del-Campillo *et al.*, 1994; Ferre *et al.*, 1994; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012), como en distintos países de Europa, Asia, América, y Norte de África (Kalkan, 1971; Ben Amer & Ahmed, 1980; Liakos, 1985; Otranto & Traversa, 2002).

El parásito adulto es de color pálido y se caracteriza por tener un cuerpo fusiforme, de 5 a 12 mm de longitud y de 1,5 a 2,5 mm de anchura, estar aplanado dorsoventralmente y ser más afilado en su parte anterior que en la posterior. Por ser un trematodo del tipo distoma posee dos prominentes ventosas en la superficie de su cuerpo. En el extremo anterior se encuentra la ventosa oral (0,3-0,4 mm) (en la que se abre la boca), que es de tamaño ligeramente menor que la ventral (0,55 mm) (Manga-González, 1999; Manga-González & Quiroz-Romero, 1999).

1.1. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *D. dendriticum* es extremadamente complejo, porque requiere la intervención de moluscos terrestres y hormigas como primeros y segundos hospedadores intermediarios, respectivamente. Krull & Mapes (1952, 1953) fueron los primeros en describir el **ciclo biológico** completo.

Los parásitos **adultos** se localizan en la vesícula y conductos biliares de los hospedadores definitivos, donde ponen los huevos embrionados, que pasan a través del intestino para ser eliminados con las heces. Dichos huevos, de 36-45 x 22-30 µm de tamaño, son operculados, de pared gruesa y color marrón oscuro con dos manchas grandes más intensas, que corresponden a las masas germinales (Manga-González & Quiroz-Romero, 1999).

La eclosión de los huevos y la liberación del **miracidio** ocurren exclusivamente en el intestino de las especies de moluscos terrestres que actúan como primeros hospedadores intermediarios. La eclosión se produce mediante diversos estímulos físico químicos del intestino, bajo pH y condiciones reductoras. El miracidio, de 20 x 25 µm, posee cilios en la parte anterior y una papila provista de un estilete, pero carece de manchas oculares. El miracidio libre atraviesa la pared intestinal del molusco, pierde los cilios y se establece en los espacios interlobulares del hepatopáncreas

Revisión Bibliográfica

cercano al corazón y al riñón. Allí se transforma en el esporocisto madre o de primer orden, el cual adopta la forma del espacio entre los lóbulos del hepatopáncreas, porque carece de pared.

Esta fase larvaria produce una segunda generación de **esporocistos**, a partir de las masas germinales, los cuales son sacciformes, poseen pared propia y tocostoma, pero carecen de aparato digestivo. Migran hasta asentarse en diferentes partes del hepatopáncreas del molusco. En infecciones intensas también pueden localizarse en el aparato reproductor. Su tamaño oscila entre 140 y 4005 μm , de acuerdo principalmente con su grado de madurez y la especie de molusco que los alberga (Manga-González, 1987; Manga-González & Quiroz-Romero, 1999; Manga-González *et al.*, 2001).

En el interior de los esporocistos se desarrollan unas masas germinales, que cuando alcanzan un adecuado estado de desarrollo, se transforman en **cercarias** de tipo distoma y xifidiocercaria. El cuerpo de dichas cercarias mide 360-760 x 50-165 μm , tiene en su parte anterior la ventosa oral, que incluye la boca y un estilete perforador, y en la parte central la ventosa ventral. Además posee una larga cola de 100-200 μm de longitud (Manga-González & Quiroz-Romero, 1999).

El período que transcurre desde la ingestión del huevo por el caracol hasta que las cercarias están maduras oscila entre 3 y 6 meses como mínimo (Manga-González & Quiroz-Romero, 1999; Manga-González *et al.*, 2001), y varía con la especie de molusco y la temperatura. Las cercarias abandonan los esporocistos cuando están maduras, a través del tocostoma, y mediante el aparato circulatorio se dirigen a la cámara respiratoria del molusco, donde son recubiertas por mucus, formando pequeñas esférulas de 1-2 mm, las cuales contienen un número elevado de cercarias (108-600, media 364) (Del Río, 1967).

Varias de estas esférulas (de 3 a 13, según Del Río, 1967 y de 5 a 15 según Borchert, 1981) se asocian a modo de racimo y constituyen la bola de mucus, que puede albergar miles de cercarias que son expulsadas al exterior a través del pneumostoma, del molusco mediante los movimientos respiratorios del mismo.

Cuando estas bolas de mucus son ingeridas por diferentes especies de hormigas de la familia Formicidae, que actúan como segundos hospedadores intermediarios, las cercarias atraviesan el buche de las hormigas, con la ayuda del estilete, y pierden la

Revisión Bibliográfica

cola tras las primeras horas después de su ingestión, transformándose en **metacercarias**. Una de ellas (a veces 2 ó 3) llamada “larva cerebral” se sitúa en el ganglio subesofágico y el resto de metacercarias, con pared quística más consistente, se alojan en el abdomen o gáster de la hormiga, en número variable (de 1 a 580), dependiendo de la especie de hormiga (Manga-González *et al.*, 2001). El tamaño de las metacercarias del abdomen oscila entre 325-465 x 135-310 μm , y el grosor de la cubierta varía entre 10-40 μm (Manga-González & Quiroz-Romero, 1999; Manga-González *et al.*, 2001). Cuando la temperatura baja, la larva del cerebro altera el comportamiento de la hormiga, causando una parálisis de los músculos mandibulares (tetania), debido a lo cual, la hormiga permanece unida temporalmente a la hierba, lo que favorece su ingestión por parte de los hospedadores definitivos. Para llegar a ser infectantes las metacercarias necesitan vivir aproximadamente 45 días en el interior de la hormiga.

Cuando los hospedadores definitivos ingieren las hormigas infectadas, las metacercarias abdominales maduras se desenquistan en el tubo digestivo y por vía del conducto colédoco y, a veces, de la circulación portal, llegan al hígado, situándose en los conductos biliares, donde se transforman en vermes adultos. Cuando están maduros ponen huevos que iniciarán su salida al exterior con las heces del hospedador, entre los días 47 y 79 p.i. en ganado ovino (Campo *et al.*, 2000), lo que permitirá que continúe el ciclo biológico de *D. dendriticum*.

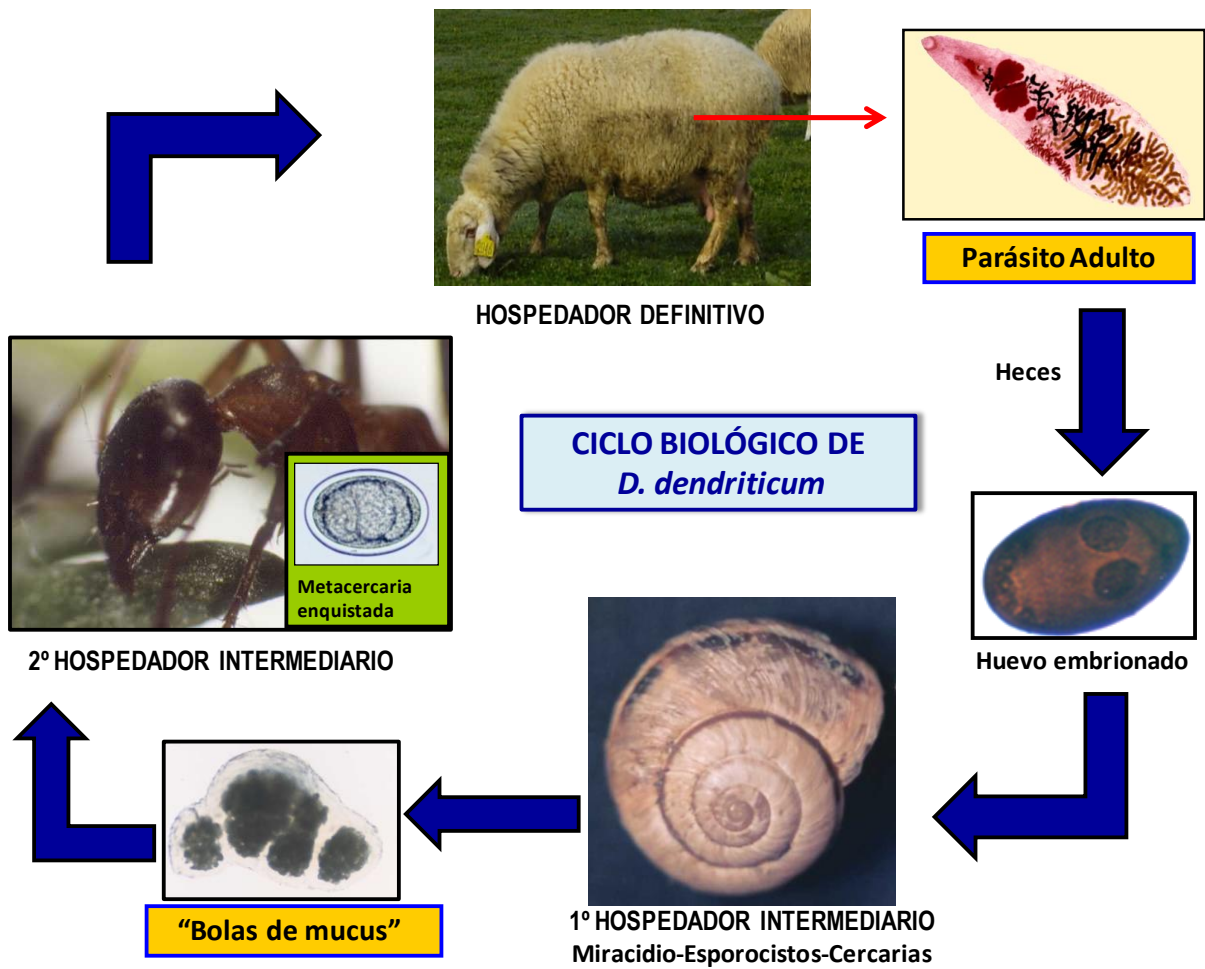


Fig. 1. Esquema del ciclo biológico de *D. dendriticum*.

1.2. HOSPEDADORES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Dicrocoelium dendriticum afecta a un amplio rango de especies de mamíferos, tanto domésticos como silvestres. Como se ha mencionado anteriormente, para completar su ciclo biológico necesita desarrollarse en moluscos terrestres y hormigas, que actúan como primeros y segundos hospedadores intermedios, respectivamente.

A) Hospedadores definitivos: mamíferos.

Se han citado numerosas especies de mamíferos que actúan como hospedadores definitivos de *D. dendriticum*, principalmente pequeños rumiantes tales como ovejas y cabras, aunque las primeras son más receptivas al parásito que las segundas

(Jithedran & Bhat, 1996). Este trematodo también afecta al ganado bovino y a un gran número de especies silvestres, habiéndose encontrado en el ciervo, corzo, gamo, alce, venado, búfalo, cerdo, jabalí, caballo, liebre y roedores entre otras (Duchacek & Lamka, 2003). Asimismo se ha descrito la infección en camélidos (llamas y alpacas) en Sudamérica (Wenker *et al.*, 1998; Gunsse *et al.*, 1999), en yaks (Somvanshi & Kaul, 1989; Jithedran & Bhat, 1996), en búfalos en la India (Jithedran & Baht, 1999) y en muflones en Europa Central (Skálová *et al.*, 2007). En España se ha citado en muflones, cabra montesa, ciervos y gamos (Lavin *et al.*, 1998; Ramajo Martín *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2012). La baja especificidad parasitaria de *D. dendriticum* provoca que un elevado número de animales silvestres actúen como reservorios del parásito, lo que contribuye a mantener los pastos contaminados con huevos. Este hecho dificulta la aplicación de medidas de control de la dicrocoeliosis.

B) Primeros Hospedadores Intermediarios: Moluscos

Como se comentó al describir el ciclo biológico de *D. dendriticum*, los huevos están completamente maduros al ser eliminados por el hospedador definitivo. La eclosión de los mismos y la liberación del miracidio sólo tiene lugar en el tubo digestivo de moluscos terrestres adecuados, que actúan como primeros hospedadores intermediarios.

Se han llevado a cabo numerosos estudios, tanto en condiciones naturales como experimentales, para identificar las especies de moluscos que actúan como primeros hospedadores intermediarios y conocer los aspectos relacionados con su biología y grado de desarrollo larvario en los hospedadores. Al menos 100 especies de moluscos (Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora) han sido citadas en todo el mundo como primeros hospedadores intermediarios (naturales y experimentales) de *D. dendriticum* (Manga-González *et al.*, 2001). En la provincia de León se han encontrado, mediante estudios morfoanatómicos, once especies de Helicidae infectadas naturalmente con fases larvarias de *D. dendriticum* (Manga, 1987, 1992; Manga-González *et al.*, 2001), dichas especies son: *Cerņuella (Cerņuella) virgata* (Da Costa); *Cerņuella (Microxeromagna) vestita* (Rambur); *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (Schmidt); *Helicella corderoi* (Gittenberger & Manga); *Helicella itala* (Linnaeus); *Helicella jamuzensis* (Gittenberger & Manga); *Helicella madritensis* (Rambur); *Helicella ordunensis* (Kobelt); *Cochicella barbara* (Linnaeus); *Monacha (Monacha) cartusiana*

(Muller) y *Cepaea nemoralis* (Linnaeus). Además, Del Río (1967) halló también parasitada la especie *Cionella lubrica* (Familia Cochlicopidae).

Teniendo en cuenta los datos de Manga-González *et al.* (2001), Del Río (1967) y Alunda & Rojo-Vazquez (1982), las especies más importantes en la epidemiología de la dicrocoeliosis en España, principalmente en el Norte son *C. (X.) cespitum arigonis* en las zonas de llanura y *H. (H.) itala* en las de montaña.

C) Segundos Hospedadores Intermediarios: Hormigas

La participación de las hormigas en el ciclo biológico de *D. dendriticum* se demostró por vez primera en los años 50 en el estado de Nueva York (Krull & Mapes, 1952, 1953). Desde entonces, se han realizado diversos trabajos encaminados a determinar cuáles son las especies de formícidos que actúan como hospedadores intermediarios de *D. dendriticum* en distintos países.

Al menos 21 especies de hormigas, principalmente del género *Formica* (subfamilia Formicinae), han sido mencionadas como segundos hospedadores intermediarios de *D. dendriticum* en distintos países (Manga-González *et al.*, 2001). En España, únicamente se han realizado estudios de este tipo en la provincia de León (Del Río, 1967; Manga-González *et al.*, 2001), habiéndose detectado infección por metacercarias del parásito en 4 especies del género *Formica*: *Formica cunicularia*, *Formica pratensis* (= *F. nigricans*), *Formica rufibarbis* y *Formica sanguinea*. De acuerdo con estos resultados, las especies *F. pratensis* Retzius y *F. rufibarbis* Fabricius parecen ser las más importantes en la epidemiología de la dicrocoeliosis (Manga-González *et al.*, 2001).

1.3. PATOLOGÍA Y CLÍNICA

Los estudios llevados a cabo para establecer de forma precisa los efectos patogénicos de la dicrocoeliosis son muy escasos, debido principalmente a la dificultad de producir las infecciones experimentales que se requieren para poder identificar el mecanismo patógeno.

Las metacercarias de *D. dendriticum*, una vez ingeridas por el hospedador definitivo, se desenquistan en el estómago por la acción del jugo gástrico (Srivastava *et al.*, 1978), o en la porción duodenal del intestino por la acción de las enzimas

Revisión Bibliográfica

pancreáticas. Desde el intestino migran directamente a través del conducto colédoco sin penetrar en la pared del intestino, la cápsula hepática o el parénquima hepático, como ocurre en la fasciolosis. Aunque, en general, las metacercarias migran a través de esta ruta, Ayupov (1967) observó en ovejas fistuladas que bajo circunstancias desconocidas, las metacercarias pueden alcanzar el hígado por vía portal. Manga-González *et al.* (2004) describieron también la presencia de tres vermes adultos en las venas hepáticas de dos corderos infectados experimentalmente. Finalmente, los vermes se establecen en los conductos biliares y vesícula biliar, donde se transforman en adultos y se alimentan de bilis, moco y células biliares descamadas (Alzieu & Ducos, 1991).

Las alteraciones orgánicas provocadas por el parásito afectan principalmente al sistema biliar y se deben a la intensidad de la carga parasitaria y a la duración de la infección (Manga-González *et al.*, 2004). Aunque la relación entre la carga parasitaria y las lesiones no ha sido identificada con claridad, Jithendran & Bhat (1996) observaron una fibrosis más marcada en aquellos animales que tenían mayor carga parasitaria.

En la patogenia de la dicrocoeliosis parece existir una acción mecánica, ya que la presencia de *D. dendriticum* en los pequeños conductos biliares, de reducido tamaño y plasticidad, provoca la obstrucción de los mismos. Sin embargo, Camara *et al.* (1996) sugirieron que esta acción irritativa no era capaz de inducir una fibrosis por sí sola, y que estaban involucradas otras células como los leucocitos observados en las células epiteliales biliares de corderos, ovejas y cabras infectadas (Rahko, 1972; Wolff *et al.*, 1984; Manga-González *et al.*, 2004).

Algunos autores consideran que *D. dendriticum* produce una acción tóxica derivada de los efectos de los productos metabólicos eliminados por el parásito (Frank *et al.*, 1984). Estos productos tienen una acción hepatotóxica para el hospedador, ya que se ha observado colangitis en los conductos biliares interlobulares, en los cuales no se han encontrado huevos, ni parásitos, lo que indica que ésta acción tóxica afecta a todo el tejido hepático, induciendo una respuesta inflamatoria (Sánchez-Campos *et al.*, 1996, 2000). En la dicrocoeliosis se ha señalado también una acción antigénica dada la presencia de anticuerpos fijadores de complemento, una acción inoculadora, sobre todo de gérmenes anaerobios (*Clostridium*) y, finalmente, una acción cancerígena, por la proliferación del epitelio de los conductos biliares (Alzieu & Ducos De Lahitte, 1991).

Revisión Bibliográfica

A menudo la dicrocoeliosis no manifiesta síntomas clínicos, ni siquiera en infecciones intensas y muchas veces las lesiones hepáticas sólo se observan durante el examen post-mortem (Theodoris *et al.*, 1991). Los síntomas además no son patognomónicos, y aparecen muchas veces enmascarados por infecciones concomitantes. Los síntomas se deben principalmente a la disfunción hepática y estos incluyen: pérdida de peso, anemia, edema, emaciación y en casos más avanzados cirrosis hepática (Otranto & Traversa, 2002). La aparición de síntomas clínicos depende en gran medida de la intensidad de la carga parasitaria. Algunos autores (Calamel & Giauffret, 1976; Rojo-Vázquez *et al.*, 1981; Ambrosi, 1991) consideran que la presencia de 1000 vermes de *D. dendriticum*, o menos, no tienen significación clínica ni repercusiones económicas; que las infecciones producidas por 1000 a 3000 helmintos tienen influencia sobre el rendimiento en la producción animal y, por consiguiente, en la económica, y que cuando la carga parasitaria sobrepasa los 5000 vermes se debe considerar clínicamente importante. Otros autores creen que en infecciones con más de 1000 vermes, ya existen repercusiones económicas (pérdida de peso, lana y leche). Hörhst & Lämmler (1962) observaron diarrea y pérdida de peso en corderos infectados con 3000 metacercarias.

La reducción en la ganancia de peso durante la infección por *D. dendriticum* es más marcada hasta que los parásitos alcanzan la madurez sexual (Salimova, 1972; Manga-González *et al.*, 2004).

En estudios más recientes, Sargison *et al.* (2012) identificaron por primera vez la dicrocoeliosis como causa predisponente de fotosensibilización hepatógena, descrito en un rebaño de corderos en la isla de Coll (Reino Unido). En Grecia, Katsoulos *et al.* (2011) también han descrito la dicrocoeliosis como un factor de riesgo que promueve el desarrollo de colelitiasis en ovejas.

En relación con los parámetros bioquímicos, Manga-González *et al.* (2004) observaron un incremento en los valores séricos de algunas enzimas, especialmente los de AST y ALT en los corderos infectados experimentalmente con 3000 metacercarias de *D. dendriticum*. El mayor aumento de los valores de estas enzimas lo detectaron en las fases iniciales de la infección debido al daño hepático producido por la migración de los parásitos. En ese mismo estudio también observaron que los valores más elevados de neutrófilos y leucocitos se producían en aquellos corderos con mayor carga parasitaria. Por otra parte, en la dicrocoeliosis aguda se incrementa la tasa microbiana

de la bilis, mientras que disminuye en la crónica (Manga-González & Quiroz-Romero, 1999).

Sánchez-Campos *et al.* (1996) observaron, en estudios experimentales realizados en cricetos, que la capacidad del hígado para metabolizar drogas y xenobióticos se veía reducida como consecuencia de la infección.

1.4. LESIONES

Manga-González *et al.* (2004) en corderos infectados experimentalmente con dosis de 1000 y 3000 metacercarias, observaron que la induración hepática era un hecho constante en todo el período p.i. En el total de dichos animales encontraron conductos biliares dilatados y blanquecinos sobre la superficie visceral del hígado, que en la sección se correspondían con conductos biliares distendidos por la presencia de parásitos y moco en su interior. También observaron frecuentemente un aumento en el tamaño de los nódulos linfáticos, sobre todo en los animales infectados con 3000 metacercarias y sacrificados el día 180 p.i. Aliev (1966) y Steele (1982) describieron linfadenitis y perilinfadenitis en ganado ovino en las fases iniciales de la infección.

En la dicrocoeliosis ovina se ha descrito colangitis y colangiectasia por varios autores tanto en infecciones naturales como experimentales (Massoud, 1981; Ranucci *et al.*, 1981; Wolff *et al.*, 1984; Manga-González *et al.*, 2004) y, en estados avanzados de la infección, cirrosis biliar y degeneración celular (Prunescu *et al.*, 1979; Jithendran & Bhat, 1996). Además, Ranucci *et al.* (1981) describieron tractos necróticos y hemorrágicos producidos por la migración de los parásitos a través del parénquima. La intensidad de las lesiones parece estar estrechamente relacionada con la carga parasitaria (Jithendran & Bhat, 1996; Manga-González *et al.*, 2004). Los infiltrados de linfocitos en los conductos biliares de gran calibre son característicos durante el período de migración del parásito y se han descrito por diversos autores (Rahko, 1972; Wolff *et al.*, 1984; Manga-González *et al.*, 2004), lo que sugiere que podrían estar involucrados en el desarrollo de la fibrosis periductal. Este hecho también ha sido señalado por Sánchez-Campos *et al.* (2000) en cricetos, quienes también apuntaban a que la presencia de metabolitos tóxicos secretados por el parásito podría causar el intenso daño hepático encontrado en su estudio.

Un aspecto destacado de la dicrocoeliosis crónica es la proliferación de fibras colágenas y, más tarde, de fibras elásticas en el estroma hepático, no sólo en las áreas porta, sino entre los lobulillos hepáticos (fibrosis interlobulillar) (Manga-González & Quiroz-Romero, 1999). En los estudios realizados por Prunescu *et al.* (1979) y por Jithendran & Bhat (1996) en ovino observaron que la presencia de cirrosis era un hecho constante. Sánchez-Campos *et al.* (1996), en experiencias realizadas en cricetos observaron además de hiperplasia biliar y cirrosis portal, granulomas de cuerpo extraño que contenían células gigantes multinucleadas, organizadas alrededor de los huevos del parásito, en el parénquima hepático. Asimismo, detectaron ectasia sinusoidal, discretos infiltrados portales de células mononucleadas, colangitis e hiperplasia papilar del epitelio y presencia de infiltrados inflamatorios en la vesícula biliar.

En cuanto a las infecciones de *D. dendriticum* en la especie humana, aunque son escasas, se ha descrito una fibrosis portal moderada, colangitis crónica e incluso alteraciones nerviosas, debidas a la llegada del parásito o sus huevos por vía sanguínea al cerebro (Sigquier *et al.*, 1952, citado por Malek, 1980).

1.5. TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL

Como hemos comentado en apartados anteriores, el complejo ciclo de vida del parásito junto con la baja especificidad que presenta en relación a los hospedadores, han provocado que las medidas de control contra la dicrocoeliosis no hayan resultado eficaces hasta el momento. Actualmente, el método más efectivo es la administración de tratamientos antihelmínticos al ganado. La aplicación de estrategias de control efectivas requiere de un conocimiento epidemiológico exhaustivo del área, así como del uso de un antihelmíntico apropiado. Además, no se puede olvidar que es posible la inaccesibilidad de los fármacos a los lugares de localización parasitaria o que ocurra una biotransformación del fármaco en el hospedador. Por otra parte, la utilización indiscriminada de antihelmínticos, sin tener en cuenta para su aplicación la epidemiología de la dicrocoeliosis, podría dar lugar a la aparición de resistencias, como ocurre en el caso de *F. hepatica* (Overend & Bowen, 1995; Mitchell *et al.*, 1998; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Aunque existen varios fármacos disponibles para el tratamiento de esta parasitosis, hay que tener en cuenta que ninguno de ellos es efectivo contra las formas inmaduras del parásito, y las que lo son como la

Revisión Bibliográfica

diamfentanida es a dosis tan elevadas (240 mg/kg pv, vo) que produce serios efectos adversos después de su administración (Stratan, 1986).

Se han alcanzado eficacias altas contra el parásito adulto al tratar a los animales con algunos fármacos del grupo de benzimidazol-carbamatos (tiabendazol, fendendazol, mebendazol, albendazol, tiofanato y netobimín) y amidas aromáticas (dianfenetida y praziquantel) (Himonas & Liakos, 1980; Cordero-del-Campillo *et al.*, 1982; Rojo-Vázquez *et al.*, 1989; Corba & Crupicer, 1992; Schuster & Hiepe, 1993; Senlik *et al.*, 2008; Manga-González *et al.*, 2010), aunque se requieren dosis mayores que las empleadas en otras parasitosis gastrointestinales (Onar, 1990).

El albendazol es uno de los compuestos más utilizados contra la dicrocoeliosis. Se ha observado que dosis de 15-20 mg/kg vo o intrarruminalmente a dosis doble (intervalo de 7 días) producen reducciones en el número de parásitos encontrados en el hígado del 98,2% y 99,6%, respectivamente (Himonas & Liakos, 1980). Sin embargo, una dosis única de 10 mg/Kg vo produjo una reducción del 92,2% (Cordero *et al.*, 1994). Čorba & Krupicer (1992) obtuvieron una eficacia del 91,8% mediante la administración del albendazol en bolos de liberación lenta a dosis de 42 mg/día, aunque encontraron un pequeño número de parásitos adultos en el hígado de todos los animales tratados.

El efecto del netobimín ha sido estudiado en varias ocasiones. Dosis de 15 mg/kg pv (Rojo-Vázquez *et al.*, 1989) y 20 mg/kg pv (Sanz *et al.*, 1987) presentaron una eficacia del 92 y 99%, respectivamente. Senlik *et al.* (2008) demostraron que las suspensiones orales de netobimín del 5% y 15% (a dosis de 20 mg/kg) son equivalentes en términos de eficacia (91%), por lo que sería recomendable el uso de la suspensión del 15%, ya que la cantidad que hay que administrar por animal es menor y se facilita así su aplicación en rebaños grandes.

De acuerdo con lo señalado por Eckert & Hertzberg (1994) el control de la dicrocoeliosis sigue siendo insatisfactorio. Éste se ha basado principalmente en prácticas agrícolas, evitar el pastoreo a primeras horas de la mañana y últimas de la tarde, control de los hospedadores intermediarios y tratamiento de los animales (Otranto y Traversa, 2002). Sin embargo, los métodos de control de los hospedadores intermediarios sólo resultarían viables en zonas pequeñas, debido a los altos costes derivados de su uso generalizado. Además, ya que son muchas y abundantes las especies de moluscos que actúan como hospedadoras de *D. dendriticum*, la aplicación

Revisión Bibliográfica

de molusquicidas habría de hacerse de forma indiscriminada, lo que no resultaría factible por razones ecológicas. Tampoco estaría indicado el control biológico de los moluscos. De igual forma, la lucha contra las hormigas es muy difícil y la aplicación de insecticidas sería nefasta porque mataría también especies de hormigas y de otros insectos, algunas protegidas, no implicadas en el ciclo de *D. dendriticum*, lo que podría alterar además, el equilibrio ecológico.

Por todo lo dicho, en la práctica la profilaxis de la dicrocoeliosis en áreas endémicas está basada en la aplicación de tratamientos antihelmínticos a todos los animales del rebaño, ya que hasta la fecha no existen vacunas contra este trematodo. Sin embargo, para que los tratamientos sean eficaces debe conocerse previamente el modelo epidemiológico con el fin de administrarlos en épocas estratégicas. Así, teniendo en cuenta los abundantes datos epidemiológicos sobre la dicrocoeliosis obtenidos a lo largo de numerosos años en León (Manga-González & González-Lanza, 2005), se planificó y realizó un estudio posterior con el fin de conocer las épocas más adecuadas para la aplicación de tratamientos antihelmínticos (albendazol, dosis 20 mg/Kg vo; no efectivo frente a parásitos inmaduros) estratégicos frente a *D. dendriticum* en ganado ovino mantenido en pastoreo (Manga-González *et al.*, 2010). De acuerdo con los resultados obtenidos en este último estudio, la mejor pauta sería aplicar un tratamiento al comienzo de Noviembre (cuando la eliminación de huevos es elevada y empieza la hibernación de las hormigas), para matar los vermes adultos y, posteriormente, administrar otro tratamiento en Enero, para eliminar el resto de vermes que alcanzaron la fase de adultos después del último tratamiento. De esta manera se consigue reducir al mínimo la eliminación de huevos en la época en que es más alta, y en el período en que los huevos permanecen viables por más tiempo debido a las bajas temperaturas. Esta pauta de tratamientos antihelmínticos estratégicos llevada a cabo durante varios años seguidos permitiría reducir la contaminación de los pastos con huevos viables y, por tanto, reducir la tasa de infección tanto de los hospedadores intermediarios como definitivos (Manga-González *et al.*, 2010).

En cuanto al desarrollo de posibles vacunas contra la dicrocoeliosis, González-Lanza *et al.* (2006) estudiaron la capacidad protectora de una proteína de 130 kDa contra la infección experimental en cricetos, sin embargo los resultados obtenidos demostraron que la proteína no confería protección, bajo las condiciones del estudio. Además se puso de manifiesto el grave inconveniente de la escasez de material obtenido cuando

Revisión Bibliográfica

se purifican proteínas directamente de extractos parasitarios. Por lo que estos métodos no resultan viables para fines diagnósticos o para la elaboración de vacunas.

1.6. DIAGNÓSTICO DE LA DICROCOELIOSIS

1.6.1. Detección en hospedadores intermediarios

En lo que respecta a la detección e identificación de las fases larvarias de *D. dendriticum* en los moluscos, hasta ahora, se ha realizado principalmente por técnicas de disección al estereomicroscopio y estudios morfoanatómicos al microscopio y, en escasas ocasiones mediante técnicas quetotáxicas, histológicas e isoenzimáticas (Manga-González *et al.*, 2001; Manga-González & González-Lanza, 2005).

Sin embargo, dichos estudios no son suficientes, puesto que la detección de las fases larvarias de *D. dendriticum* en los moluscos, mediante la disección y observación por métodos microscópicos, es tardía. Así, se necesitaron al menos 50 días para la primera observación del parásito (esporocistos hijos con masas germinales indiferenciadas) en moluscos de la especie *C. (X.) cespitum arigonis*, infectados experimentalmente con huevos del parásito y mantenidos en el laboratorio a 20°C (González-Lanza *et al.*, 1997). Además, en condiciones de campo, dicho periodo de observación se alarga aún más, habiendo llegado hasta un máximo de 9 meses en moluscos infectados experimentalmente en octubre, y mantenidos en un ambiente natural en una zona llana próxima a la ciudad de León (Manga-González *et al.*, 1995; Manga-González & González-Lanza, 2005). Por otra parte, la identificación morfoanatómica de las fases larvarias de *D. dendriticum*, en moluscos infectados en la naturaleza requiere, además de experiencia, contar con material obtenido de moluscos infectados experimentalmente para su comparación. Asimismo, por tratarse de fases larvarias que todavía necesitan evolucionar en un segundo hospedador intermediario, no puede corroborarse su identidad mediante la infección de hospedadores definitivos. También hay que tener en cuenta que las mismas especies de moluscos pueden actuar como hospedadores intermediarios de otras especies de trematodos.

En lo que concierne a la identificación de las metacercarias en las hormigas, hasta ahora se ha realizado mediante estudios morfoanatómicos (Manga-González *et al.*, 2001) y por la infección de hospedadores definitivos para obtener el parásito adulto (Campo *et al.*, 2000). Sin embargo, durante los estudios epidemiológicos, no siempre se puede llevar a cabo la infección de hospedadores definitivos, lo que hace arriesgada la identificación de las metacercarias encontradas en las hormigas

pertencientes a distintas especies y recolectadas en diferentes lugares y épocas del año. Además, Manga-González *et al.* (2001) observaron que no todas las hormigas halladas en tetania contenían metacercarias de *D. dendriticum* en el abdomen, debido probablemente a que sólo contenían la larva cerebral alojada en el cerebro, que era la responsable del cambio en el comportamiento de dichas hormigas.

También se ha utilizado una sonda de ADN específica del parásito (Heussler *et al.*, 1998), para poder detectar las larvas de *D. dendriticum* en hormigas infectadas. Esta sonda, marcada radiactivamente, es capaz de hibridar con secuencias repetitivas del ADN genómico del trematodo de forma específica y con elevada sensibilidad. Manga-González *et al.* (2001) llevaron a cabo un estudio isoenzimático de las metacercarias de *D. dendriticum* obtenidas de hormigas de la especie *F. rufibarbis*. Extrajeron muestras de una misma hormiga, de hormigas recogidas en la misma zona y de hormigas recogidas en distintos áreas, y establecieron que el mejor sistema para caracterizar las metacercarias de *D. dendriticum* de los especímenes de *F. rufibarbis* lo constituyen las enzimas LDH, GPI y PGM.

De lo anteriormente expuesto se deduce, que las técnicas convencionales utilizadas para detectar la infección natural de moluscos y hormigas son muy poco sensibles y producen un elevado número de falsos negativos que pueden derivarse de la observación tardía del parásito, además de las posibles identificaciones erróneas de las fases larvianas halladas.

Para aplicar con éxito los programas de control estratégicos contra la dicrocoeliosis, se necesita un estudio previo de su epidemiología (Manga-González *et al.*, 2010). Esto requiere llevar a cabo un diagnóstico específico y precoz utilizando técnicas fiables que detecten la presencia de *D. dendriticum* en sus hospedadores intermediarios de forma inequívoca.

1.6.2. Diagnóstico de la dicrocoeliosis en hospedadores definitivos

Esta trematodosis permanece a menudo sin diagnosticar, debido a su naturaleza subclínica y a que sus efectos patógenos están enmascarados muchas veces por

otras parasitosis concomitantes. El diagnóstico en el ganado se realiza principalmente, mediante técnicas coprológicas convencionales (Manga-González *et al.*, 1991; González-Lanza *et al.*, 1993; Campo *et al.*, 2000; Otranto & Traversa, 2002, Şenlik *et al.*, 2006), o técnicas inmunológicas (González-Lanza *et al.*, 2000; Sánchez-Andrade *et al.*, 2003; Simsek *et al.*, 2006; Broglia *et al.*, 2009). También se ha utilizado el examen post-mortem para el recuento de parásitos adultos en el hígado, observación de lesiones y realización de estudios inmunohistoquímicos (Campo *et al.*, 2000; Manga-González *et al.*, 2004; Ferreras-Estrada *et al.*, 2007).

1.6.2.1. Técnicas coprológicas

Las técnicas coprológicas convencionales son las más utilizadas para la detección de la dicrocoeliosis y permiten evidenciar la presencia de huevos embrionados en las heces. Mediante las técnicas cuantitativas de sedimentación y McMaster modificado se realiza el recuento de huevos por gramo de heces, sin embargo los resultados obtenidos por estos métodos son variables, observándose un alto porcentaje de falsos negativos. Por otra parte, debido al prolongado período prepatente de la infección (de 49 a 77 días post-infección, Campo *et al.*, 2000), cuando se detecta la presencia de huevos en las heces ya se ha producido gran parte del daño hepático (Manga-González *et al.*, 2004) y se ha iniciado la contaminación de los pastos con huevos infectantes para los caracoles. Además, Ambrosi (1991) apuntó que infecciones de menos de 100 parásitos da resultados negativos en este tipo de test.

Rehbein *et al.* (1999) realizaron un estudio para comparar la precisión del método modificado de McMaster, utilizando diferentes soluciones de flotación, con la técnica de sedimentación para el recuento de huevos de *D. dendriticum* en heces. El objetivo era evaluar distintas soluciones y, a la vez, conocer la influencia del tiempo de flotación en la recuperación posterior de huevos. Observaron que la técnica de sedimentación produce una menor recuperación de huevos que la de flotación. También que es con la solución Hgl₂/KI con la que se obtiene un mayor porcentaje de huevos recuperados de las heces y que el tiempo de flotación no influye en la precisión de la técnica. Jithendran & Bath (1996) compararon los resultados del examen coprológico de ovejas y cabras con el examen anatomopatológico del hígado y encontraron que por coprología sólo se detectó la infección en uno de cada tres casos, lo que pone de manifiesto la baja sensibilidad de la misma.

Para incrementar la sensibilidad de las técnicas coprológicas, Cringoli (2006) diseñó el sistema FLOTAC, que es un método copromicroscópico sensible y preciso para detectar la presencia de huevos, lavas, ooquistes y quistes en heces. Esta técnica utiliza el aparato FLOTAC que permite preparar hasta 1 g de heces para el análisis al microscopio (Cringoli, 2006; Cringoli *et al.*, 2010). Éste método fue comparado posteriormente por Rinaldi *et al.* (2011) con las técnicas estándar utilizadas hasta el momento. El método FLOTAC con la solución de sulfato de zinc ha proporcionado los mejores resultados en términos de sensibilidad y reproducibilidad, por lo que puede considerarse como el método de elección para el recuento de huevos de *D. dendriticum* en heces.

Sin embargo, a pesar del aumento en la sensibilidad, este tipo de técnicas coprológicas continúan teniendo importantes inconvenientes, tales como la no detección del parásito a lo largo del período prepatente de la enfermedad y la poca sensibilidad en infecciones leves. Además, son muy laboriosas y consumen mucho tiempo. Para superar estos inconvenientes se han ensayado distintas técnicas serológicas, para aumentar la sensibilidad y precocidad del diagnóstico de la dicrocoeliosis.

1.6.2.2. Técnicas serológicas

El diagnóstico durante el período prepatente de la infección podría realizarse mediante la detección de anticuerpos circulantes o antígenos parasitarios, en heces o suero. Varios autores han estudiado la respuesta inmune humoral con distintas técnicas, así Calamel & Giauffret (1976) utilizaron el test de inmunofluorescencia indirecta, empleando como antígeno secciones congeladas de parásitos adultos. Schröder (1979) y Schröder & Geyer (1976) evaluaron los test de precipitación, hemaglutinación indirecta y el test de fijación de complemento en cricetos infectados de forma experimental, y más tarde Bode & Geyer (1981) sugirieron que la técnica ELISA podría considerarse como el método de elección para la detección de anticuerpos en cricetos infectados experimentalmente. También Piergili Fioretti *et al.* (1980) y Baldelli *et al.* (1981) señalaron que la técnica ELISA era un método adecuado para la detección de anticuerpos frente a *D. dendriticum* en ovejas, debido a su alta sensibilidad.

Más tarde, Jithendran *et al.* (1996) evaluaron la capacidad para el diagnóstico de los tests de precipitación en gel, contraelectroforesis y hemaglutinación pasiva en

Revisión Bibliográfica

ovejas y cabras infectadas de manera natural, estableciendo que la prueba más sensible y rápida era la contrainmunolectroforesis.

Hoy en día, entre las pruebas más utilizadas está el análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA), usando como antígeno productos ES o antígeno somático completo. Varios autores han utilizado esta técnica para estudiar la respuesta inmune humoral en animales natural o experimentalmente infectados con *D. dendriticum* (González-Lanza *et al.*, 2000; Sánchez-Andrade *et al.* 2003; Simsek *et al.* 2006; Broglia *et al.* 2009; Colwell & Goates, 2010). González-Lanza *et al.* (2000) observaron, en corderos infectados experimentalmente la primera detección de anticuerpos a los 30 días p.i., aunque el máximo nivel lo obtuvieron a los 60 días p.i., fecha a partir de la cual disminuyó ligeramente, aunque se mantuvo alto hasta el final del experimento a los 180 días p.i.

La ventaja de esta técnica sobre las coprológicas convencionales es la detección más temprana de la infección, pero tiene el inconveniente de no distinguir entre infecciones activas e infecciones previas. Las técnicas de SDS-PAGE y WB también se han usado como test de confirmación en el diagnóstico de distintas infecciones. Así, Şimşek *et al.* (2006) determinaron bandas proteicas específicas del antígeno de ES de *D. dendriticum* mediante SDS-PAGE y WB. Estos autores concluyeron que dichas técnicas eran más sensibles y específicas que la técnica ELISA para la detección de la dicrocoeliosis en ovejas.

Por último, hay que tener en cuenta que los antígenos utilizados hasta el momento para la detección de anticuerpos son mezclas muy complejas de proteínas, que pueden estar presentes en varios parásitos, y dar lugar a reacciones cruzadas, como ocurre entre especies de *Fasciola* y *Dicrocoelium* (Savitskii & Ponomareva, 1984; Sadzikhowski, 1988; Fagbemi & Guobadia, 1995). Este hecho corrobora la necesidad de disponer de antígenos específicos de *D. dendriticum* para mejorar las técnicas inmunológicas.

Existe muy poca información sobre la composición de las fracciones antigénicas de *D. dendriticum*, y especialmente de aquellas que son específicas del parásito. Gundlach & Sadzikhowski (1987) estudiaron la composición antigénica del extracto somático de *D. dendriticum*. Savitskii & Benediktov (1988) obtuvieron 6 fracciones proteicas, aunque sólo 3 comprendidas entre 31 y 40 kDa presentaron actividad serológica,

mientras que Wedrychowicz *et al.* (1996) obtuvieron entre 7-8 polipéptidos en antígenos ES y de superficie de *D. dendriticum*, de los cuales sólo las fracciones de 29 y 41 kDa eran inmunógenas en conejos. Revilla-Nuín *et al.* (2005) estudiaron la composición proteica de los antígenos ES y somáticos de *D. dendriticum* mediante las técnicas de SDS-PAGE y Western Blot (WB), utilizando sueros homólogos y heterólogos de corderos infectados experimentalmente. Dichos autores detectaron tres bandas inmunoreactivas específicas de *D. dendriticum*, de aproximadamente 130, 42 y 24 kDa. Asimismo, purificaron parcialmente por cromatografía la proteína de 130 kDa, ya que era la que presentaba la mayor especificidad inmunógena. De acuerdo con estos resultados la proteína de 130 kDa podría ser utilizada para el diagnóstico inmunológico y para ensayos de protección. Sin embargo, las investigaciones preliminares realizadas en ese sentido (González-Lanza *et al.*, 2006) pusieron de manifiesto el grave inconveniente que supone la baja concentración de esta proteína.

En la práctica, una de las mayores limitaciones para el diseño y desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico por métodos inmunológicos es la producción de antígenos y anticuerpos específicos para las moléculas de interés. La producción de proteínas por medio de técnicas de biología molecular hace posible la obtención de reactivos de alta pureza en grandes cantidades. Knox *et al.* (2001) destacaron las limitaciones de las técnicas bioquímicas convencionales en la purificación de proteínas, a partir de los extractos parasitarios, por la reducida cantidad obtenible, la posible presencia de impurezas, los grandes costos de producción y la dificultad en la estandarización de la técnica.

2. TÉCNICAS MOLECULARES

2.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN *D. DENDRITICUM*

Los estudios moleculares de adultos de *D. dendriticum* son muy escasos y están enfocados principalmente al análisis de variabilidad genética. Campo *et al.* (1998) estudiaron la actividad isoenzimática de parásitos adultos procedente de ganado bovino, ovino y caprino, principalmente de la Provincia de León, utilizando la técnica de isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida. La mayor actividad la observaron en las enzimas: Lactato deshidrogenasa (LDH); Fosfato glucosa isomerasa (GPI); Fosfatoglucomutasa (PGM) y Fosfatasa ácida (AcP). No obstante, fue escasa la

Revisión Bibliográfica

variación fenotípica entre los individuos recogidos de un mismo hospedador, o de distintos hospedadores. También se ha estudiado la variabilidad genética de parásitos adultos recogidos de ovejas de diferentes razas y localidades geográficas españolas, utilizando la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) (Sandoval *et al.*, 1999). Con la misma técnica también se estudió la variación de *D. dendriticum* en una única población de vacas en Ucrania (Morozova *et al.*, 2002). Asimismo, se han caracterizado molecularmente las especies de *D. dendriticum* y *D. chinensis* mediante la secuenciación parcial del 18S rADN y el ITS-2 y, además, se ha llevado a cabo un análisis filogenético con 20 especies de Plagiorchiidae (Otranto *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha realizado la caracterización del gen 28S y del ITS2 del ADN ribosomal de adultos de *D. dendriticum* obtenidos de ovejas y vacas (Italia) y de *D. hospes* obtenido de *Bos indicus* (Senegal) (Maurelli *et al.*, 2007). En los últimos años, se ha llevado a cabo la determinación de la región intergénica ribosomal (ITS2) en adultos de cuatro especies de trematodos obtenidos de rumiantes: *F. hepatica*, *Fascioloides magna*, *D. dendriticum* y *Paramphistomum cervi*, habiéndose obtenido la secuencia completa del ITS-2 por primera vez en las dos últimas especies mencionadas (Bazsalovicsova *et al.*, 2010).

Al realizar una búsqueda en las bases de datos, el número de genes caracterizados del género *Dicrocoelium* es extremadamente bajo, y se refiere principalmente a genes mitocondriales o ribosomales. Además, el conocimiento del proteoma de *D. dendriticum* es prácticamente nulo. Mediante la búsqueda en las bases de datos NCBI nr sólo encontramos 140 registros de la familia Dicrocoeliidae, que se corresponden con las secuencias de 4 proteínas: mioglobina, NADH deshidrogenasa parcial y las secuencias parciales de los citocromos C y B oxidasa. Tampoco existen registros en la base de datos EST (Expressed Sequence Tag), que correspondan a género alguno de la familia Dicrocoeliidae, lo que pone de manifiesto la urgente necesidad de desarrollar investigaciones que amplíen la información molecular del parásito.

El “Wellcome Trust Sanger Institute” en colaboración con “The Genome Institute” de la Universidad de Washington y “Gene Pool” de la Universidad de Edimburgo han publicado recientemente los datos SRA (Sequence Read Archive) de *D. dendriticum* (ERX040312, ERX062737) dentro del proyecto “50 Helminth Genomes Initiative”. Esta información supone un gran avance en el conocimiento molecular del parásito, lo que

mejorará la comprensión de las complejas interacciones parásito-hospedador, en un futuro. Sin embargo, aún no se han realizado las anotaciones del genoma y se requieren estudios bioinformáticos que permitan interpretar la compleja información contenida en estas secuencias.

Los estudios referidos a la aplicación de técnicas moleculares para el diagnóstico de la dicrocoeliosis en rumiantes son muy escasos. En cuanto a las técnicas basadas en la PCR para la detección de ADN de huevos del parásito, hay que tener en cuenta que es necesario primero que el ADN sea liberado de los huevos mediante la desintegración de la cáscara por distintos métodos antes de poder realizar el diagnóstico molecular. En este sentido Oberhauserová *et al.* (2010) utilizaron con éxito el método del teflón para la desintegración de huevos procedentes de muestras fecales y posterior aislamiento de ADN intacto. A continuación amplificaron una región de ADN ribosomal ITS-2, mediante la técnica de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de *F. hepatica*, *Fascioloides magna*, *D. dendriticum* y *Paramphistomum cervi*. Recientemente, Sandoval *et al.* (2013) obtuvieron también resultados satisfactorios al utilizar el método de congelación/descongelación, que permitió la apertura del opérculo del huevo de *D. dendriticum* y la liberación del miracidio. Posteriormente, mediante una técnica de PCR basada en la secuencia 18S del ARNr, pudieron detectar una banda de ADN específica del parásito. Con esta herramienta los autores detectaron hasta un mínimo de 40 huevos del parásito en heces de corderos infectados. Sin embargo, los propios autores sugirieron la conveniencia de mejorar el método para extraer y cuantificar ADN de un único huevo, lo que ayudaría no sólo a evaluar la precisión de la técnica, sino también a evitar los falsos negativos que se obtienen cuando se realiza el recuento de huevos mediante técnicas coprológicas de sedimentación o flotación y McMaster.

Sin embargo, estas técnicas basadas en la detección de huevos en las heces siguen presentando los inconvenientes de no detectar el parásito durante el período prepatente y de su baja sensibilidad, sobre todo en casos de infecciones leves. Estos inconvenientes pueden ser superados mediante el empleo de técnicas serológicas basadas en el uso de proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales.

2.2. ESTUDIOS MOLECULARES REALIZADOS EN OTRAS PARASITOSIS

Ante los escasos estudios moleculares sobre *D. dendriticum* realizados hasta el comienzo de esta Tesis Doctoral, creímos conveniente incluir en esta revisión los llevados a cabo en otros parásitos con técnicas utilizadas por vez primera para *D. dendriticum* en el presente estudio. Las aplicaciones de biología molecular en parasitología desarrolladas en los últimos 20 años han sido múltiples (Hyde, 1990; McManus & Bowles, 1996; Prichard, 1997; Hu *et al.*, 2004). Existen diferentes métodos moleculares para la caracterización de individuos, que han demostrado tener una especificidad y sensibilidad mayores que las técnicas convencionales (Monis *et al.*, 2002).

2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Aunque ya mencionamos su uso para el diagnóstico del miracidio de *D. dendriticum* en el apartado anterior, vamos a comentar aquí el fundamento de la misma.

Los métodos de detección de ácidos nucleicos de agentes patógenos han mejorado en gran medida el diagnóstico de las enfermedades parasitarias (Zhao *et al.*, 2012), en concreto la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**, desarrollada por Kary Mullis en 1983 (Karp, 2006), permite la amplificación enzimática de fragmentos genéticos, a partir de mínimas cantidades de ácidos nucleicos extraídos de material parasitario. Esta técnica se basa en la aplicación de distintos ciclos consecutivos de altas y bajas temperaturas alternas, que permiten que la doble cadena de ADN genómico se desnaturalice, separándose ambas hebras y los oligonucleótidos hibriden con sus secuencias complementarias. Posteriormente se produce la fase de extensión de las cadenas de ADN, mediante la adición de desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP) por la enzima ADN polimerasa termoestable. De esta forma, el ADN molde se replica de manera exponencial durante cada ciclo, obteniendo al final del proceso millones de copias del fragmento de interés. Además, los métodos de detección basados en PCR no dependen de la fase larvaria del parásito, lo que implica una ventaja en la identificación de los mismos.

Para el desarrollo de una técnica de PCR, que permita la determinación específica del parásito, es esencial elegir una región de ADN diana adecuada para la amplificación. Esta región debería contener zonas conservadas flanqueadas por otras hipervariables de tamaño apropiado, así como una organización definida de clusters génicos que varíe de unos organismos a otros y que permita la identificación específica. Varias

Revisión Bibliográfica

regiones diana se han utilizado para la caracterización de especies de parásitos, entre ellas ADN ribosomal (ADNr), mitocondrial (ADNmt) y también elementos repetitivos de ADN (Gasser, 2006). La mayoría de los estudios realizados en el caso de los trematodos han usado las secuencias relacionadas con la región de ADN “nuclear internal transcribed spacer” (ITS), mientras que sólo unos pocos han utilizado las secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (Cox1) (Nolan & Cribb, 2005). En los platelmintos dichas secuencias son muy variables y pueden proporcionar un elevado número de marcadores útiles para la identificación de especies (Vilas *et al.*, 2005). Asimismo, las regiones correspondientes al ITS, relativamente conservadas dentro de una especie o género, han resultado muy útiles en la determinación de líneas divisorias entre distintas especies de parásitos (Nolan & Cribb, 2005). Las investigaciones se han enfocado tanto a la identificación como a la tipificación molecular de los agentes etiológicos, lo que ha permitido establecer perfiles genéticos característicos de numerosos parásitos. Los trematodos más estudiados han sido *F. hepatica* y algunas especies de *Schistosoma* (Mas-Coma *et al.*, 2001; Magalhaes *et al.*, 2004; Cucher *et al.*, 2006; Littlewood *et al.*, 2006).

La técnica de PCR se ha utilizado satisfactoriamente en la detección de fases larvianas de parásitos en moluscos acuáticos, que actúan como sus hospedadores intermediarios, tales como: *S. mansoni* en *Biomphalaria* (Hanelt *et al.*, 1997); *F. hepatica* en *G. truncatula* (Kozak & Wedrowicz, 2010); *F. hepatica* en *L. columella* (Magalhaes *et al.*, 2004); *F. hepatica* en *L. columella* y *L. viatrix* (Cucher *et al.*, 2006); *F. gigantica* en *L. natalensis* (Mostafa *et al.*, 2003); *F. gigantica* en *L. auricularia* (Velusamy *et al.*, 2004). También se ha desarrollado una técnica de PCR múltiple capaz de identificar y discriminar entre larvas de *Calicophoron daubneyi* y *F. hepatica* en el hospedador intermediario *G. truncatula* (Martínez-Ibeas *et al.*, 2013). Sin embargo, de acuerdo con nuestra información, aunque se ha desarrollado un método de PCR para la detección de ADN del miracidio de *D. dendriticum* en las muestras de heces de animales infectados (Sandoval *et al.*, 2013), no existen trabajos sobre la utilización de la técnica de PCR para la identificación de las fases larvianas de *D. dendriticum* en los moluscos terrestres y hormigas, que actúan como hospedadores intermediarios. Esta técnica podría proporcionar una alternativa más sensible y específica que los métodos convencionales de observación al microscopio para los estudios epidemiológicos.

2.2.2. Proteínas recombinantes

En la actualidad se están utilizando nuevas herramientas y técnicas que permiten mejorar el diagnóstico de las enfermedades parasitarias, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, antígenos recombinantes o la combinación de varios antígenos definidos incluyendo los péptidos sintéticos (Zhang & McManus, 2003). Mediante los métodos bioquímicos clásicos se obtiene muy poca cantidad de antígeno parasitario y a menudo resulta insuficiente para implementar un test diagnóstico. Además frecuentemente existen problemas de especificidad y es muy difícil estandarizar los métodos de obtención. Los avances en la tecnología del ADN recombinante producidos en los últimos años ha permitido superar estos inconvenientes.

Las proteínas recombinantes han ganado importancia como antígenos en el inmunodiagnóstico de las enfermedades parasitarias, como fasciolosis (Martínez-Sernández *et al.* 2011; Muiño *et al.* 2011; Gaudier *et al.* 2012); clonorchiasis (Lv *et al.* 2011; Li *et al.* 2012); o schistosomiasis (Ángeles *et al.* 2011), aunque, de acuerdo con nuestra información no se ha realizado ningún estudio de este tipo para mejorar el diagnóstico de la dicrocoeliosis. La expresión de estas proteínas es una herramienta muy útil hoy en día, ya que es posible obtener altas cantidades de proteína con bajo costo de producción y alta pureza, al tiempo que la estandarización entre distintos laboratorios es fácil (Müller & Felleisen, 1995).

La obtención de proteínas recombinantes se logra mediante la inserción del gen que expresa la proteína de interés en un organismo diferente. Para ello, se requieren dos pasos cruciales: 1/ Introducción de ADN foráneo en una célula hospedadora y 2/ Transcripción de este ADN foráneo. Para ello es necesario, en primer lugar, identificar y aislar el gen que codifica la proteína que se pretende expresar, para después unirlo al ADN de un plásmido adecuado formando así el plásmido recombinante, con el cual se transforman las células competentes que van a expresar dicha proteína.

El avance que ha sufrido la biotecnología en los últimos años ha permitido comercializar un gran número de sistemas de expresión alternativos. Entre ellos, los fagos y los plásmidos de expresión en *Escherichia coli* han sido los más desarrollados y representan los vehículos más versátiles para la clonación de ADN foráneo y expresión de proteínas (Müller & Felleisen, 1995). La elección de un sistema de expresión apropiado va a depender del inserto que se quiera clonar, del sistema

Revisión Bibliográfica

hospedador que se vaya a utilizar, así como de la posterior manipulación que se vaya a realizar de la proteína recombinante. Actualmente existen distintas células hospedadoras tanto bacterianas como eucariotas: *E. coli*, *Bacillus subtilis*, levadura *Saccharomyces cerevisiae*, células de insecto y células animales (Shatzman, 1995). De todos ellos, *E. coli* sigue siendo el organismo de elección en muchas ocasiones por sus características, ya que, los cultivos crecen rápidamente y con alta densidad, la manipulación genética resulta sencilla y, además, puede expresar grandes cantidades de proteínas recombinantes (Olins & Lee, 1993). El desarrollo y la estandarización entre distintos laboratorios han permitido obtener un elevado número de proteínas recombinantes y han facilitado su aplicación en el campo de la parasitología.

Así, en el caso de la fasciolosis se han evaluado un amplio número de proteínas recombinantes para mejorar el diagnóstico inmunológico de la enfermedad. Carnevale *et al.* (2001) evaluaron con éxito una procathepsina L en un ELISA indirecto. Figueroa-Santiago *et al.* (2011) demostraron la utilidad de un antígeno recombinante en el diagnóstico de la fasciolosis crónica humana por ser más específico que los extractos ES. Paz-Silva *et al.* (2005) expresaron en *E. coli* una proteína recombinante de 2,9 kDa que había sido aislada previamente de una genoteca de ADNc. Este antígeno fue evaluado en un ELISA indirecto frente a sueros de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica*, antes y después de ser tratadas con triclabendazol. Al comparar estos resultados con los obtenidos utilizando como antígeno los productos ES observaron que la respuesta de IgG frente a la proteína recombinante seroconvertía a valores negativos una semana después del tratamiento, mientras que frente al antígeno ES permanecía elevada. Esto demostraba la utilidad de la proteína recombinante de 2,9 kDa tanto en el diagnóstico de la enfermedad, como en la evaluación de la quimioprofilaxis. Estos resultados fueron confirmados en un estudio posterior por Arias *et al.* (2007), quienes utilizaron el mismo sistema para estimar la prevalencia de la fasciolosis en ovejas infectadas de forma natural, lo que corroboró la ventaja de utilizar el antígeno recombinante de 2,9 kDa frente a extractos completos del parásito, por ofrecer un diagnóstico más sensible y precoz. Recientemente, Gaudier *et al.* (2012) han caracterizado otra molécula de 16,5 kDa del tegumento de *F. hepatica* que ha sido también evaluada como posible antígeno para el inmunodiagnóstico.

Revisión Bibliográfica

Asimismo, se han realizado numerosas investigaciones dirigidas a mejorar el diagnóstico de la schistosomiasis, enfocadas tanto al desarrollo de métodos moleculares basados en la detección de ADN, como a mejorar el inmunodiagnóstico de la enfermedad (trabajos recopilados por Zhao *et al.* 2012 y Cavalcanti *et al.*, 2013). Así, se ha desarrollado un ELISA indirecto basado en las proteínas recombinantes tiorredoxin peroxidasa y cuatro proteínas repetidas en tandem para diagnosticar *S. japonicum* en personas (Ángeles *et al.*, 2011) y en búfalos (Ángeles *et al.*, 2012). Jin *et al.* (2010) evaluaron la sensibilidad de cinco proteínas recombinantes de *S. japonicum* para su uso en el diagnóstico de la enfermedad de bovinos y conejos infectados, obteniendo los mejores resultados con la proteína rSjGCP-Sj23. También se han hecho importantes avances en el diagnóstico de la schistosomiasis bovina. Recientemente, De la Torre-Escudero *et al.* (2012) obtuvieron unos resultados prometedores en la evaluación de una proteína recombinante de 22,6 kDa, expresada en el tegumento de *S. bovis*, al ser utilizada como antígeno en un ELISA indirecto.

En el caso del trematodo hepático *C. sinensis* los estudios enfocados a mejorar el diagnóstico que encontramos en la bibliografía científica son muy abundantes. Entre los antígenos empleados con más frecuencia, las cistein-proteasas tienen un papel fundamental, por tratarse de proteínas que se excretan al medio y ser por tanto altamente antigénicas. Nagano *et al.* (2004) obtuvieron unos valores elevados de sensibilidad y especificidad al evaluar una cistein-proteasa recombinante en el diagnóstico de la clonorchiasis humana. Posteriormente Li *et al.* (2012) expresaron una catepsina L recombinante y la evaluaron como antígeno diagnóstico, sin embargo a pesar de mejorar la sensibilidad del ensayo, observaron numerosas reacciones cruzadas frente a sueros de otros parásitos. Lv *et al.* (2011) también utilizaron una cistein-proteasa recombinante aislada de una genoteca de ADNc para detectar anticuerpos anti-*C. sinensis* en el suero de personas infectadas. Sus resultados sugieren que estas proteínas podrían ser muy útiles en el diagnóstico de la enfermedad.

La importancia de las cistein-proteasas y sus inhibidores ha sido señalada en numerosas ocasiones, debido a las múltiples funciones vitales para el parásito en las que están involucradas. Así, se ha demostrado su implicación en los mecanismos fisiológicos y patológicos de los parásitos, tales como: catabolismo proteico, desenquistamiento, digestión de los tejidos del hospedador en los procesos de

nutrición o evasión del sistema inmune (Robinson *et al.*, 2008). Estas características los convierten en dianas eficaces para el desarrollo de vacunas o antígenos diagnósticos. Las cisteín-proteasas han sido utilizadas en el diagnóstico de trematodosis importantes como fasciolosis (Carnevale *et al.*, 2001); paragonimiasis (Ikeda *et al.*, 1996) o schistosomiasis (Klinkert *et al.*, 1991).

2.2.3. Anticuerpos monoclonales

A pesar de las numerosas ventajas que ofrece el inmunodiagnóstico mediante la detección de anticuerpos circulantes cuando se utilizan para ello proteínas recombinantes, también presenta algunos inconvenientes. Por un lado, normalmente no es posible discriminar entre infección pasada e infección activa (Jin *et al.*, 2010), además son frecuentes las reacciones cruzadas entre parásitos que están presentes de forma habitual en los animales mantenidos en pastoreo (Boukli *et al.*, 2011; Cavalcanti *et al.*, 2013). Para solventar estas desventajas, en los últimos años se han producido grandes avances en el uso de anticuerpos monoclonales, para el desarrollo de técnicas ELISA que permiten detectar antígenos parasitarios en muestras biológicas.

Los anticuerpos monoclonales fueron descubiertos en la primera mitad de los años setenta por Milstein y Köhler en el laboratorio de biología molecular en Cambridge (Reino Unido). Estos autores describieron por primera vez una técnica en la que se fusiona una línea celular de mieloma murino con células de bazo de un animal inmunizado. A través de este procedimiento fueron capaces de seleccionar sólo las células híbridas y los clones con especificidad conocida. Su trabajo fue publicado en Nature en 1975, y 9 años más tarde fueron galardonados con el premio Nobel por este descubrimiento. Con esta fusión de dos células, una programada para producir un anticuerpo específico —pero que no se multiplica indefinidamente (linfocito)— y otra con gran capacidad de crecimiento —pero que no produce inmunoglobulina (célula de mieloma)—, se combina la información genética necesaria para la síntesis del anticuerpo deseado y una capacidad de síntesis proteica, permitiendo su multiplicación indefinida tanto *in vitro* como *in vivo* (García Merino, 2011). En la actualidad, la tecnología recombinante disponible también permite la fabricación de varios tipos de fragmentos derivados de anticuerpos, que hacen posible superar algunos de los problemas relacionados con la molécula completa del anticuerpo, para mejorar la

Revisión Bibliográfica

avidez y potenciar la unión a ciertos objetivos. En los últimos años los anticuerpos monoclonales se han convertido en una herramienta de diagnóstico muy importante en el campo de la parasitología.

Entre los parásitos más estudiados se encuentra *F. hepatica*, trematodo frente al cual que se han desarrollado distintos métodos ELISA sándwich, basados en el uso de anticuerpos monoclonales (Espino *et al.*, 1994; Duménigo *et al.*, 1996; Abdel-Rahman *et al.*, 1998). De ellos uno de los más relevantes y que está disponible en su versión comercial (Bio-X Diagnostics, La Jemelle, Belgium) es el ELISA desarrollado por Mezo *et al.* (2004) utilizando el anticuerpo monoclonal MM3. Éste ha demostrado ser un método ultrasensible en la detección temprana de coproantígenos secretados por el parásito (Mezo *et al.*, 2004), así como de anticuerpos anti-*F. hepatica* en leche y suero (Mezo *et al.*, 2007).

También se han obtenido anticuerpos monoclonales para el diagnóstico específico de *F. gigantica*. Entre las investigaciones realizadas en este sentido se encuentran los estudios llevados a cabo por Anuracpureeda *et al.* (2009). Estos autores desarrollaron una técnica sensible y específica de ELISA sándwich que ha demostró su utilidad en ratones infectados experimentalmente. Con posterioridad, Anuracpreeda *et al.* (2013) produjeron un anticuerpo monoclonal frente a la proteína recombinante B3 de *F. gigantica*, que ha permitido detectar la infección tanto en ratones desde el día 1 p.i., como en ganado infectado naturalmente, lo que representa una gran ventaja en el diagnóstico temprano de la enfermedad. En el caso del diagnóstico de la schistosomiasis, la detección de antígenos en suero y orina de pacientes infectados mediante el uso de anticuerpos monoclonales se considera actualmente una prometedora estrategia para el control de esta enfermedad por las ventajas que presenta: fácil aplicación, viabilidad en condiciones de campo, disponibilidad comercial y bajos costes (Cavalcanti *et al.*, 2013).

El empleo de anticuerpos monoclonales presenta numerosas ventajas en el diagnóstico de las enfermedades parasitarias humanas, ya que es importante discriminar entre infecciones activas o pasadas y poder evaluar la tasa de curación tras un tratamiento antihelmíntico. Aunque en el caso de las parasitosis que afectan al ganado, como es la dicrocoeliosis, esta cuestión no es siempre tan relevante. Esto se debe a que en general las infecciones son crónicas y que en ocasiones el principal objetivo no es el diagnóstico individual, sino la detección de los focos o explotaciones

donde se encuentra el parásito para poder aplicar en esos lugares las oportunas medidas de control (de la Torre-Escudero *et al.* 2012).

En cualquier caso, la caracterización de antígenos diana es un requisito previo indispensable para poder desarrollar un sistema de diagnóstico sensible y específico. Para ello se requiere disponer de grandes cantidades de información molecular del parásito. Con este fin, se han desarrollado importantes herramientas, aunque en esta revisión únicamente nos centraremos en dos técnicas relevantes que han sido utilizadas para la consecución de los objetivos de la presente Tesis Doctoral: 1º Análisis proteómico y 2º Genotecas de ADNc. Dichas técnicas se han aplicado por primera vez en el estudio de *D. dendriticum*.

2.2.4. Análisis proteómico

La **proteómica**, que ha experimentado un fuerte avance en los últimos años, estudia la expresión de proteínas a nivel global, empleando para ello una serie de técnicas que permiten el análisis de todas las proteínas presentes en una muestra biológica (Blackstock & Weir, 1999; Tyers & Mann, 2003). En las dos décadas pasadas, se han realizado numerosas investigaciones dirigidas a la identificación y caracterización de proteínas de importancia inmunológica, especialmente candidatos para el inmunodiagnóstico o para la elaboración de vacunas (Zhang & McManus, 2006; Carmena *et al.*, 2007).

El análisis proteómico ha supuesto una herramienta poderosa en la investigación de estas proteínas parasitarias, incluyendo aquellos parásitos que no cuentan con el apoyo de un proyecto de genoma (Barret *et al.*, 2000). Puesto que la mayoría de las muestras biológicas son mezclas complejas de proteínas, los estudios proteómicos requieren el uso de una o varias técnicas de separación de proteínas previamente al análisis mediante MS (Espectrometría de Masas). En 1975 Patrick O'Farrell de la Universidad de California (San Francisco) desarrollo una técnica llamada electroforesis bidimensional o "2D". Esta técnica permite fraccionar mezclas complejas de proteínas basándose en el uso de dos propiedades diferentes de las moléculas (Karp, 2006). Consiste en la aplicación sucesiva de dos tipos de electroforesis realizadas sobre la misma muestra (Gorg *et al.*, 2000; Gygi *et al.*, 2000). En primer lugar se realiza un isoelectroenfoque ("isoelectric focusing", IEF) mediante el cual las proteínas se separan en un gradiente continuo de pH, en función de su punto isoelectrico (pI). A

Revisión Bibliográfica

continuación se lleva a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), en la que las proteínas se separan en función de su masa molecular. La dirección del movimiento de las proteínas en esta segunda etapa electroforética es perpendicular a la primera, de manera que se obtiene un mapa de “manchas proteicas” que se distribuye en dos dimensiones.

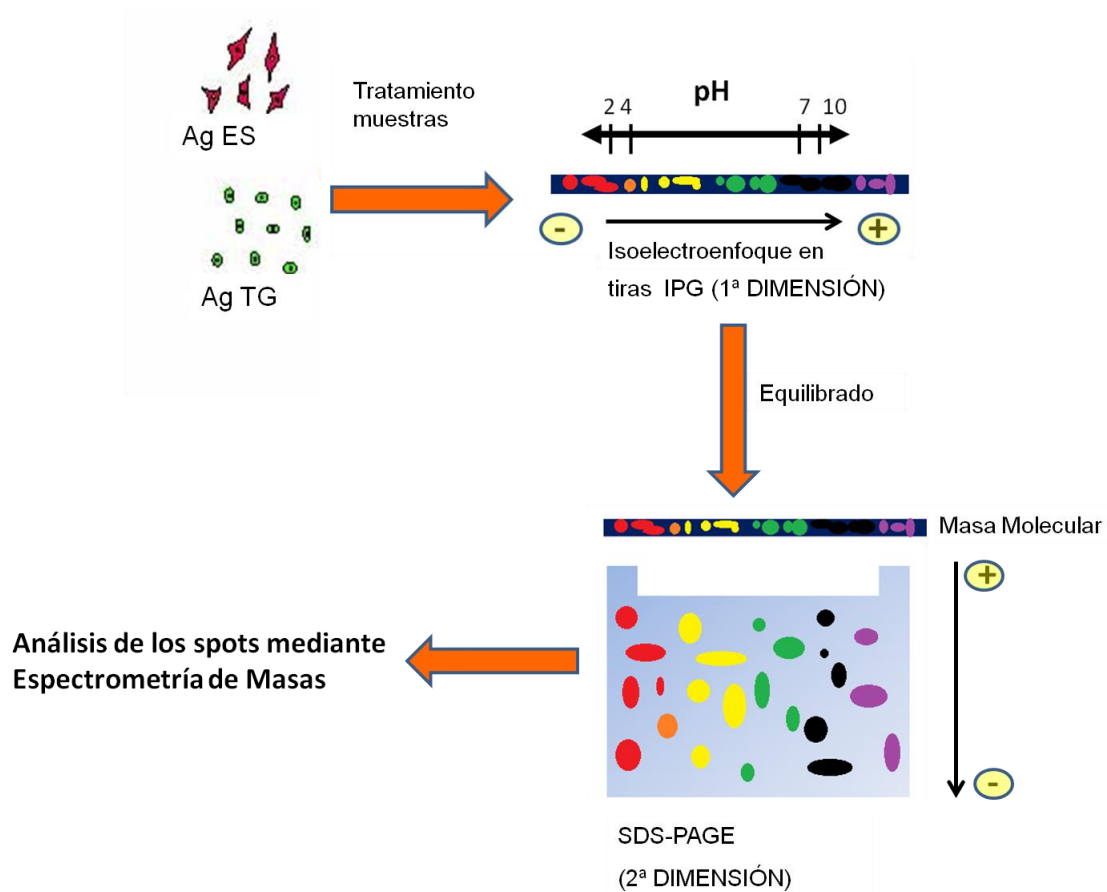


Fig. 2. Esquema de electroforesis 2D.

La técnica fue desarrollada inicialmente en los años 70 por Kenrick & Margolis (citado por Pandey & Mann, 2000), Klose (Klose, 1975) y O' Farrell (O' Farrell, 1975), pero su uso se generalizó a partir de los años 80, tras la invención de un método para generar gradientes de pH inmovilizados ("immobilized pH gradients", IPG) (Bjellqvist *et al.*, 1982). Los IPG mejoraron la reproducibilidad entre geles y permitieron la creación de bases de datos de geles bidimensionales, disponibles hoy día en Internet.

Revisión Bibliográfica

La espectrometría de masas (MS) es una tecnología analítica de gran potencia (Mann *et al.*, 2001; Aebersold & Mann, 2003) que requiere la conversión de los compuestos analizados a iones en fase gaseosa, los cuales se separan en función de su relación masa/carga (m/z), lo que permite averiguar su masa molecular con gran precisión (Mann *et al.*, 2001). El desarrollo a finales de los años 80 de las técnicas de ionización suave (Karas & Hillenkamp, 1988; Fenn *et al.*, 1989) que permiten generar iones a partir de analitos grandes y no volátiles, amplió la aplicabilidad de la espectrometría de masas a las biomoléculas (incluyendo las proteínas) e inició una rápida evolución de esta tecnología que continúa hoy en día (Aebersold & Goodlett, 2001; Aebersold & Mann, 2003).

Los espectrómetros de masas son instrumentos analíticos que miden masas moleculares, mediante la conversión de sustancias en iones gaseosos con cargas positivas, que se aceleran a través de un tubo curvo hacia una placa con carga negativa. Los iones golpean un detector electrónico que se localiza al final del tubo. Los más pequeños viajan más rápido y golpean el detector antes que los más grandes. Para realizar este análisis las proteínas suelen digerirse con tripsina y los péptidos se ionizan con suavidad y se convierten en gases, por uno de los dos procedimientos: 1/ MALDI-TOF (ionización por desorción con láser asistida por matriz) (Karas & Hillenkamp, 1988), con el que obtenemos el espectro de masas del conjunto de péptidos, también denominado “huella peptídica”; 2/ Espectrometría de masas tipo electrospray en combinación con un triple cuádruplo o una trampa iónica. Estas técnicas permiten la fragmentación del péptido y la generación de un espectro de masas, también llamado “espectro de fragmentación” o “espectro MS/MS”. Las huellas peptídicas y los espectros de fragmentación son característicos de cada proteína, y permiten identificarlas una a una en las base de datos, utilizando técnicas bioinformáticas.

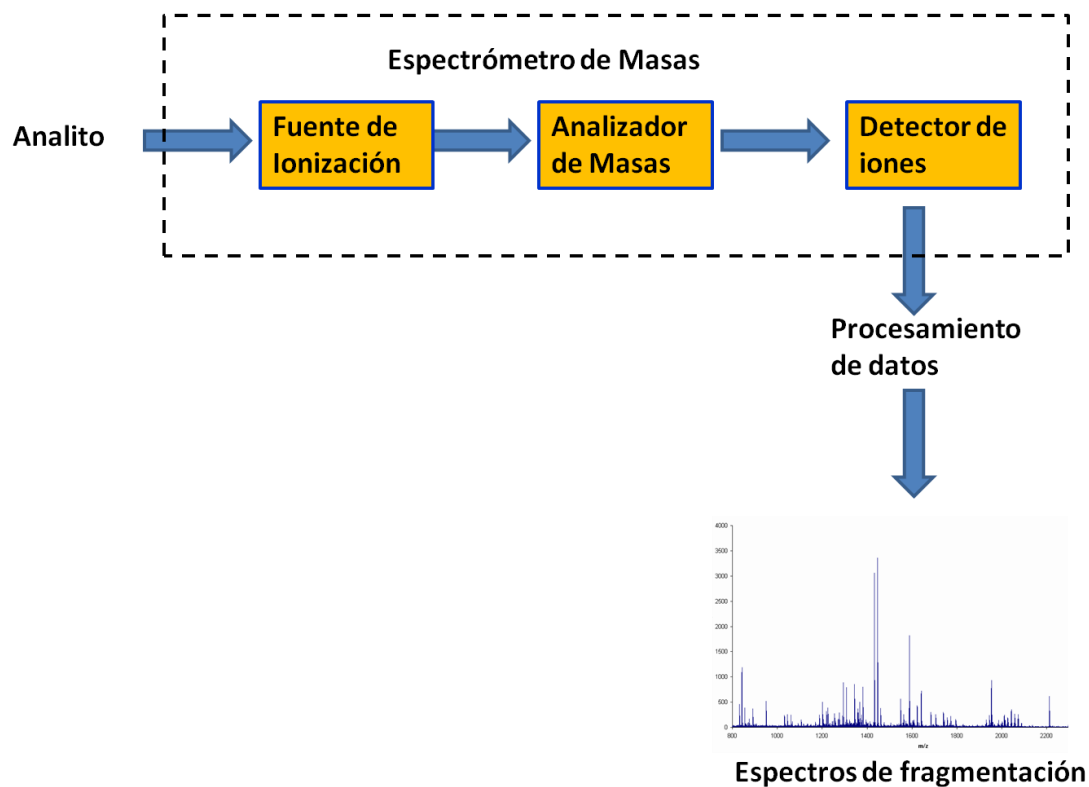


Fig. 3. Esquema de los elementos que integran un espectrómetro de masas.

Se han realizado numerosos estudios proteómicos para identificar moléculas de interés en enfermedades de importancia veterinaria, de los que cabe resaltar aquellos dirigidos a caracterizar las proteínas que forman parte de los extractos ES del parásito, ya que han demostrado ser clave en la búsqueda de dianas terapéuticas y diagnósticas (Varghese *et al.*, 2013). La identificación de las proteínas ES es crucial para comprender los mecanismos de evasión y modulación del sistema inmune por parte de los parásitos durante el establecimiento de las infecciones crónicas, proceso del que en *D. dendriticum* existe muy poca información. De este modo, se han estudiado los perfiles proteicos del secretoma de numerosos parásitos tales como: *Brugia malayi* (Hewitson *et al.*, 2008), *S. mansoni* (Knudsen *et al.*, 2005), *E. friedli* (Bernal *et al.*, 2006), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Cuervo *et al.*, 2009), *O. viverrini* (Mulvenna *et al.*, 2010a), *F. hepatica* (Gourbal *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2009), *S. japonicum* (Liu *et al.*, 2009 b) y *E. caproni* (Sotillo *et al.* 2010), entre otros.

Además de las proteínas excretadas al medio, también son claves aquellas que se expresan en la superficie del tegumento. Estos antígenos son esenciales en los

Revisión Bibliográfica

mecanismos de supervivencia y adaptación al medio del parásito dentro del hospedador. Muchas de las proteínas involucradas en la evasión del sistema inmune de los parásitos se localizan en el tegumento (Abath & Werkhauser, 1996). Estas proteínas, altamente inmunógenas, han demostrado ser prometedores candidatos en el desarrollo de vacunas (Tran *et al.*, 2006; Loukas *et al.*, 2007) y tratamientos antihelmínticos. Además, muchos estudios han demostrado también que las proteínas expresadas en la superficie del tegumento de los trematodos son altamente específicas y pueden ser adecuadas en el inmunodiagnóstico de las trematodosis (Gaudier *et al.*, 2012).

De este modo, se han realizado numerosos estudios proteómicos en *S. bovis* dirigidos a identificar las proteínas que se encuentran en la interfase parásito-hospedador (Pérez-Sánchez *et al.*, 2006, 2008; Ramajo-Hernández *et al.*, 2007; de la Torre-Escudero *et al.*, 2010, 2011). También han sido ampliamente estudiadas las proteínas del tegumento de *S. mansoni* (Van Balkom *et al.*, 2005; Braschi *et al.*, 2006 a, b; Braschi & Wilson, 2006), *O. viverrini* (Mulvenna *et al.*, 2010a) o *S. japonicum* (Mulvenna *et al.*, 2010b). Wilson *et al.* (2011) analizaron las proteínas localizadas en el tegumento de *F. hepatica* aplicando técnicas de enriquecimiento recientemente desarrolladas, que permiten identificar sólo aquellas proteínas que se encuentran en la capa más superficial, muchas de las cuales son importantes candidatos vacunales. Las técnicas de electroforesis 2D y espectrometría de masas también se han aplicado a la identificación de proteínas comunes en adultos de *F. hepatica* y *S. mansoni* (Boukli *et al.*, 2011). En muchos estudios se ha demostrado la importancia de este tipo de análisis en la búsqueda de antígenos para el diagnóstico (Tran *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2008).

De acuerdo con nuestra información, las investigaciones realizadas sobre el tegumento de *D. dendriticum*, que se remiten exclusivamente a su estudio mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), permitieron definir su organización celular a nivel ultraestructural (Cifrian & García-Corrales, 1988). Sin embargo, no conocemos investigaciones sobre la aplicación de técnicas de proteómica al estudio de las fracciones antigénicas de este parásito. Los trabajos realizados hasta el momento para identificar las proteínas expresadas en su superficie, o secretadas al medio se han llevado a cabo exclusivamente por técnicas convencionales como SDS-PAGE y

Western Blot (Gundlach & Sadzikowski, 1987; Savitskii & Benediktov, 1988; Revilla-Nuín *et al.*, 2005; Şimşek *et al.*, 2006).

2.2.5. Genotecas de ADNc

La construcción de **genotecas de ADNc** ha supuesto una importante herramienta en el descubrimiento de nuevos genes. Estas genotecas de expresión contienen la información codificada en los ARNm, por lo que tienen la ventaja de limitar la información a aquellos genes que se están expresando de forma específica en un tejido u organismo en una determinada etapa de desarrollo (Adams *et al.*, 1995). Dado que las moléculas de ARNm son extremadamente lábiles, la información codificada en ellas se transforma en una doble cadena de ADN complementario (ADNc) para después ser insertada en un vector, mediante la conversión enzimática del ARNm (Kimmel & Berger, 1987). Gubler & Hoffman (1983) desarrollaron el método original para la generación de genotecas de ADNc, combinando la síntesis clásica de la primera cadena con la síntesis de la segunda mediante el tratamiento con RNasa H. Esta enzima lleva a cabo el “mellado” del ARNm unido a la primera cadena de ADNc y la formación de múltiples fragmentos que sirven como cebadores a la ADN polimerasa I, lo que permite la conversión de la primera cadena de ADNc a segunda cadena sin pérdida significativa de información de la secuencia (Gubler & Hoffman, 1983). Se han realizado algunas modificaciones a lo largo de los años para mejorar la versatilidad del método (Rutledge *et al.*, 1988). Con la introducción de los bacteriófagos λ (Young & Davis, 1983; de Klickstein, 1989) fue posible aplicar los sistemas de empaquetamiento *in vitro* del ADN altamente eficientes a la construcción de genotecas de ADNc. En los últimos años se ha desarrollado un gran número de vectores disponibles para la clonación de fragmentos de ADN. Entre ellos cabe destacar el fago λ ZAP, que forma parte de una nueva generación de vectores que poseen un mayor rango de sitios potenciales para la clonación y expresión de ADNc, así como un método más simplificado para la recuperación y posterior manipulación del ADNc (Klickstein, 1989). La disponibilidad comercial de enzimas y reactivos de alta calidad ha hecho estos métodos bastante accesibles.

La información se puede estudiar con relativa facilidad una vez que está disponible en forma de ADNc. Además, la disponibilidad de los clones de ADNc facilita enormemente la clonación y expresión de moléculas de interés. Para aislar y estudiar

un determinado gen eucariota, que se transcribe en un momento determinado o en determinadas condiciones, generalmente se aísla dicho clon de la biblioteca de ADNc. La selección se puede llevar a cabo mediante el cribado de la misma por diversas técnicas: sondas de oligonucleótidos sintéticos, sondas de ADNc que representan diferencialmente ARNm expresados, o sondas de anticuerpos (Huynh *et al.*, 1984; de Klickstein, 1989). Actualmente están disponibles muchas técnicas para la construcción de genotecas de ADNc a partir de ARNm, algunas de ellas tan avanzadas que es posible su construcción desde una sola célula (Sambrook & Russell, 2001). Sin embargo, en muchas ocasiones es difícil obtener una población de ADNc de longitud completa, y generalmente se obtienen secuencias parciales de ADNc que se denominan Expressed Sequence Tag (EST).

El estudio de estas colecciones de EST ha demostrado ser una herramienta muy poderosa en el descubrimiento de nuevos genes y de su patrón de expresión. Algunos de los parásitos más ampliamente estudiados son aquellos que afectan al hombre como *S. mansoni* y *S. japonicum* (Gobert, 2010), de los cuales están publicados al menos 310.000 ESTs en las bases de datos, incluyendo la base de datos SchistoDB (Zerlotini *et al.*, 2009), y de los que también están disponibles los genomas completos (Berriman *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009a). En los últimos años se han publicado los transcriptomas de varios parásitos hepáticos como *F. hepatica*, *C. sinensis*, *Opistorchis viverrini* (Young *et al.*, 2010a, b; 2011), o *F. gigantica* (Young *et al.*, 2011), gracias a los cuales se han producido importantes avances en el campo de la patogénesis, metabolismo, expresión y regulación de genes, búsqueda de dianas terapéuticas o vacunales, o las involucradas en las interacciones parásito-hospedador (Gobert *et al.*, 2010). Robinson *et al.* (2009) realizaron un análisis integrado del transcriptoma y proteoma de *F. hepatica*, en el cual se estudiaron los 14.031 EST publicados de *F. hepatica* para conocer el perfil de las proteínas secretadas, que están involucradas en las interacciones entre el patógeno y el hospedador. Dichos autores establecieron una correlación entre la expresión de estas proteínas y la migración del parásito a través de los tejidos del hospedador, poniendo énfasis en las proteasas secretadas como factores de virulencia, por ser perjudiciales para los tejidos del hospedador.

Debido a la enorme complejidad en los ciclos de vida de estos trematodos, así como a su enorme capacidad adaptativa, es importante señalar también los estudios

Revisión Bibliográfica

realizados para caracterizar las diferencias en la expresión de proteínas a través de las distintas fases de desarrollo. Así, se ha estudiado el perfil de expresión de: metacercarias de *C. sinensis* (Cho *et al.*, 2008), cercarias de *S. mansoni* (Santos *et al.*, 1999), schistosómulas de *S. japonicum* (Wang *et al.*, 2009a), miracidios y esporocistos de *Echinostoma parensi* (Adema *et al.*, 2000) o fases juveniles recién desenquistadas de *F. hepatica* (Cancela *et al.*, 2010), entre otros. Gobert *et al.* (2010) resaltaron la importancia del estudio del transcriptoma de las fases larvarias de *S. mansoni* y *S. japonicum* en la identificación de posibles candidatos vacunales frente a la schistosomiasis. Esta importancia fue también subrayada por Jayaraj *et al.* (2009), quienes desarrollaron una vacuna multivalente frente a *F. hepatica* utilizando antígenos recombinantes expresados en las fases de adulto y juvenil del parásito, consiguiendo así aumentar la eficacia de la vacuna.

Como puede deducirse de la información aquí recogida, las aplicaciones de los análisis EST son enormes y abarcan muchos campos de la Parasitología. Sin embargo, no existen registros sobre la familia Dicrocoeliidae en las bases de datos EST, ni conocemos proyectos para secuenciar el transcriptoma. La marcada diferencia entre la información disponible de *D. dendriticum* y otros trematodos pone de manifiesto la urgente necesidad de ampliar dichas investigaciones.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. PARÁSITOS ADULTOS

Los vermes adultos de *D. dendriticum* utilizados en este trabajo fueron obtenidos del hígado de ovejas infectadas de forma natural, sacrificadas en el matadero de Pola de Gordón (León), y en el municipal de León. Una vez extraídos los parásitos se lavaron tres veces con PBS (Phosphate Buffered Saline pH 7,4) y gentamicina (40 mg/l) a 37°C y se introdujeron en viales, 50 parásito/vial para, posteriormente, proceder bien a su congelación en Nitrógeno (N) líquido y posterior conservación a -85°C, con el objeto de extraer ADN o ARNm, o bien a su incubación en estufa a 36°C con 5% de CO₂ para la obtención de antígenos parasitarios.

Asimismo, se utilizaron ejemplares adultos de *D. chinensis* obtenidos de *Cervus nippon* (Alemania) y preservados en alcohol, amablemente proporcionados por el Prof. Dr. Otranto de la Universidad de Bari (Italia), para extraer ADN de los mismos con el fin de comprobar la especificidad de la técnica de PCR.

Con la misma finalidad se recogieron ejemplares adultos de los trematodos *F. hepatica* Linnaeus, 1758 y *C. daubneyi* (Dinnik, 1962) del hígado de ovejas y del rumen de vacas, respectivamente, sacrificadas en el matadero de León. En ambos casos, los vermes, una vez lavados, fueron congelados en N líquido y mantenidos a -85°C hasta su procesamiento para la extracción del ADN.

1.2. HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS

1.2.1. Moluscos infectados de forma natural

Se recolectaron numerosos ejemplares de 10 especies de moluscos terrestres (Gasterópoda, Pulmonata, Stylomatophora) procedentes de distintas poblaciones de la provincia de León (Tabla 1), en las que previamente estas especies habían sido halladas infectadas con trematodos en el hepatopáncreas y en el riñón (Manga-González *et al.*, 1979; Manga-González & Cordero del Campillo, 1979, Manga-González, 1978, 1982, 1983; Manga-González *et al.*, 2001). Para cada caracol se efectuó, en primer lugar, una disección al estereomicroscopio para determinar si estaba o no parasitado. A continuación, en los moluscos infectados se estudiaba una muestra al microscopio para su identificación mediante técnicas morfoanatómicas, así

Materiales y Métodos

como para observar y anotar el grado de desarrollo de las fases larvianas halladas. Tanto las fases larvianas de *D. dendriticum* como las Brachylaimidae albergadas en los moluscos examinados se congelaron separadamente en N líquido y se conservaron a -85°C hasta su posterior extracción del ADN.



Fig. 4. *Monacha (Monacha) cartusiana*, hospedador intermediario de *D. dendriticum*

Se recogieron también numerosos ejemplares de la especie de molusco de agua dulce *G. truncatula* (Lymaneidae) infectados por fases larvianas de los trematodos: *F. hepatica*, *C. daubneyi*, Plagiorchiidae y Notocotylidae, utilizados también para comprobar la especificidad de la técnica de PCR. Todas las muestras obtenidas se congelaron en N líquido y se conservaron a -85°C, hasta la extracción de ADN.

Tabla 1. Especies de moluscos recolectadas en diferentes lugares de la provincia de León e infectadas de forma natural con *Dicrocoelium dendriticum*. La confirmación de la infección específica se efectuó mediante la técnica de PCR.

Especies de moluscos examinadas	Localidades de procedencia
<i>Cepaea nemoralis</i> (Linnaeus, 1758)	Cascantes Manzaneda de Torio Palacios de Torio Pedrún Ribota San Feliz de Torio Villalibre de la Jurisdicción
<i>Cerņuella (Cerņuella) virgata</i> (Da Costa, 1778)	Carucedo La Virgen del Camino Villamandos
<i>Cerņuella (Microxeromagna) vestita</i> (Rambur, 1868)	Valderas Villamañán

Materiales y Métodos

<i>Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis</i> (Schmidt, 1853)	Carucedo Valderas Vilecha Villafer Villalobar
<i>Helicella corderoi</i> Gittenberger & Manga, 1977	Getino Piedrafita Piedrafita de Babia
<i>Helicella itala</i> (Linnaeus, 1758)	Geras Mellanzos Sena de Luna Sorriba Villafalé Villarmún
<i>Helicella jamuzensis</i> Gittenberger & Manga, 1977	Alija del Infantado
<i>Helicella madritensis</i> (Rambur, 1968)	Campazas Valencia de Don Juan
<i>Helicella ordunensis</i> (Kobelt, 1883)	Barrio de Nuestra Señora Castrillo del Porma La Magdalena
<i>Monacha (Monacha) cartusiana</i> (Müller, 1774)	Villabúrbula

1.2.2. Moluscos infectados de forma experimental

Los moluscos utilizados para la infección experimental fueron recogidos en áreas no frecuentadas por rumiantes, mantenidos durante dos meses en el laboratorio y alimentados con lechuga *ad libitum*. La ausencia de infección natural fue confirmada al final de dicho período mediante un estudio helmintológico del 10% de los moluscos, utilizando técnicas microscópicas.

La infección experimental se realizó con huevos de *D. dendriticum* procedentes de vesículas biliares de ovejas sacrificadas en matadero y obtenidos mediante técnicas de sedimentación y McMaster. Para la infección se utilizó un lote de 80 moluscos de cada una de las especies *C. (X.) cespitum arigonis* y *C. (C.) virgata*. Los caracoles se mantuvieron, en placas individuales de Petri, sin comida los 4 días previos a la infección. La dosis infectante fue de 50 huevos por caracol depositada en papel de

filtro. Los moluscos permanecieron en contacto con los huevos durante 2 días, tiempo suficiente para que se produzca la infección (González-Lanza *et al.*, 1997). Los caracoles infectados fueron mantenidos bajo condiciones controladas de laboratorio a 20°C, 50% de humedad relativa y alimentados con lechuga *ad libitum*.

Tras la infección los moluscos se sacrificaron periódicamente desde el día 1 post-infección (p.i.) hasta el final del experimento. Todos los caracoles sacrificados fueron examinados al estereomicroscopio para comprobar si se había producido la infección. El grado de desarrollo de los parásitos se observaba estudiando una muestra de los mismos al microscopio. Tras el examen helmintológico, los moluscos se congelaron en N líquido y se mantuvieron a -85°C hasta su posterior utilización.

1.2.3. Hormigas infectadas de forma natural

Se recogieron hormigas de 3 especies del género *Formica* (Tabla 2), recolectadas en el campo en fase de tetania, a primeras horas de la mañana en lugares de la provincia de León en los que se habían detectado hormigas infectadas en trabajos previos (Manga-González *et al.*, 2001). La condición en que se recogieron suponía la infección de las mismas por, al menos, una larva cerebral (“brainworm”) de *D. dendriticum*. Para comprobar la presencia de metacercarias, tanto en abdomen como en cerebro, las hormigas, previa anestesia con éter, fueron diseccionadas en solución salina (150 mM ClNa) bajo estereomicroscopio. De cada hormiga se extrajeron y contaron las metacercarias halladas en el abdomen. En unos casos se guardó en un mismo vial el abdomen y todas las metacercarias halladas en él y, separadamente, la cabeza sin abrir, que normalmente contiene una sola larva cerebral. En otros casos, las metacercarias extraídas del abdomen se guardaron separadamente en número de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 metacercarias/vial. Las muestras mencionadas y otras procedentes de hormigas no recolectadas en tetania, ni infectadas (testigos), se conservaron a -85°C, para la posterior extracción del ADN.



Fig. 5. *Formica rufibarbis* en tetania, segundo hospedador intermediario de *D. dendriticum*

Tabla 2. Especies de hormigas recolectadas en tetania en diferentes localidades de la provincia de León e infectadas de forma natural con *Dicrocoelium dendriticum*. La confirmación de la infección específica con *D. dendriticum* se efectuó, mediante la técnica de PCR.

Especies de hormigas examinadas	Localidades de procedencia
<i>Formica cunicularia</i> Latreille	Redipollos
<i>Formica pratensis</i> Retzius	Redipollos
<i>Formica rufibarbis</i> Fabricius	Grulleros Mellanzos San Millán de los Caballeros Valdelafuente Valencia de Don Juan Villa de Soto Villafalé Villaturiel

1.3. SUEROS

Los sueros positivos utilizados en este trabajo provenían de 8 corderos macho de raza Churra infectados experimentalmente con metacercarias de *D. dendriticum*: 2 animales fueron infectados con 9000, 3 con 5000, 3 con 3000 y 1 con 1000 metacercarias. Como controles negativos se utilizaron sueros de otros 4 corderos churros que se mantuvieron sin infectar, así como sueros obtenidos de los corderos

anteriormente mencionados, antes de la infección. Todas las infecciones se llevaron a cabo por el equipo de Parasitología del Instituto de Ganadería de Montaña para la realización de trabajos previos (Campo *et al.*, 2000; Revilla-Nuín *et al.*, 2005). Las muestras utilizadas se obtuvieron de cada cordero los días 0, 15, 30, 60, 90, 150 y 180 p.i.

Para evaluar la especificidad tanto de las proteínas recombinantes como del ensayo ELISA, se probaron también sueros procedentes de ovejas monoespecífica y experimentalmente infectadas con otros trematodos (*C. daubneyi*, *F. hepatica* y *S. bovis*) o nematodos (*Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*).

1.4. VECTORES DE CLONACIÓN

1.4.1. Fagos

- **Uni-ZAP XR** (Stratagene): Este vector se utilizó en la construcción de una genoteca de expresión de adultos de *D. dendriticum*. Con él se pueden clonar fragmentos de hasta 10 Kb. Este vector combina la eficiencia del fago λ -ZAP II, con la ventaja de un sistema de plásmido con selección de color blanco-azul (pBluescript SK®).

pBluescript SK(-) Vector Map

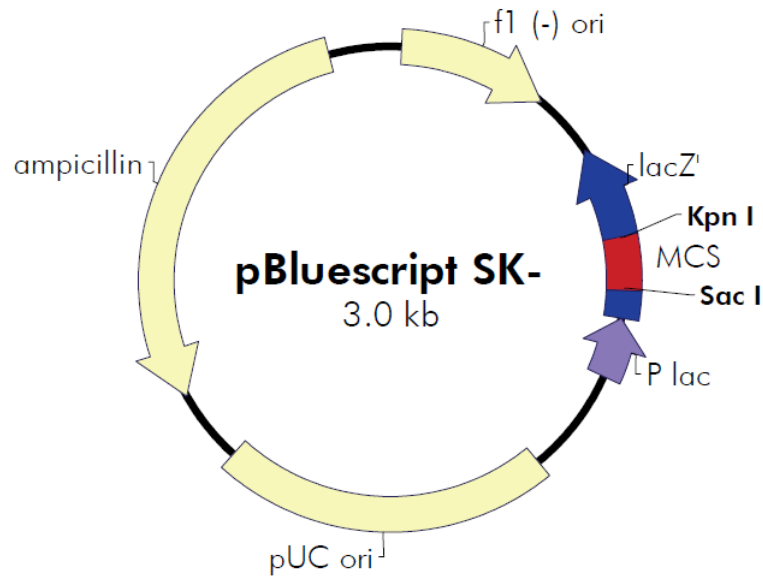


Fig. 6. Mapa del vector pBluescript SK (-) (Stratagene).

1.4.2. Plásmidos

- **pGEM®-T Easy** (Promega): Es un vector lineal de alto número de copias, diseñado para el clonaje directo de productos de PCR. Contiene los promotores T7 y SP6 ARN polimerasa que flanquean una región de policlonaje dentro de la región α -péptido que codifica la enzima β -galactosidasa. Este hecho permite la identificación de recombinantes mediante exámenes de detección azul / blanco. Presenta un peso de 3,0 Kb y tiene como marcador el gen de resistencia a la ampicilina.

pGEM[®]-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points

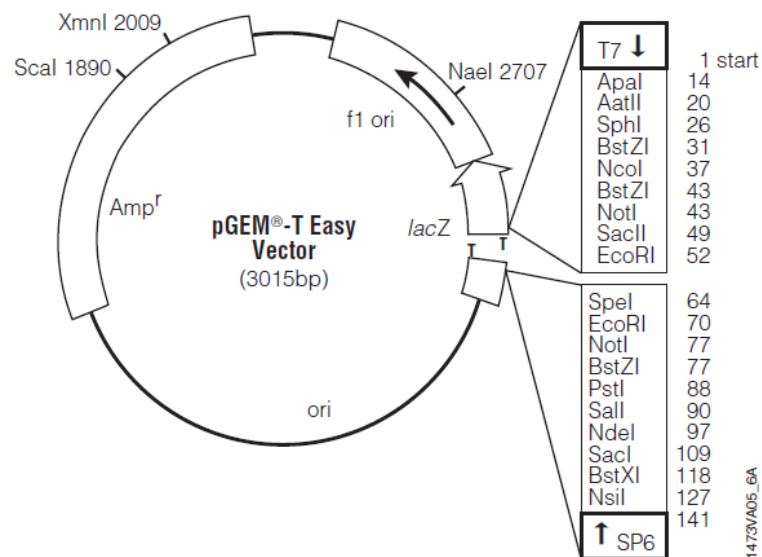


Fig. 7. Mapa del vector pGEM-T Easy (Promega).

- **pGEX-6P-2[®]** (Amersham): Este plásmido está diseñado para obtener un nivel alto de expresión de los genes de interés, inducible químicamente mediante la adición de IPTG (Isopropil tio-β-D-galactósido). Produce una proteína de fusión con la enzima glutation S-transferasa (GST) de *S. japonicum*, que posibilita su purificación por cromatografía de afinidad mediante columnas de glutation agarosa. Contiene el promotor *tac* y presenta un tamaño de 4,9 Kb. Tienen como marcador el gen de resistencia a la ampicilina.

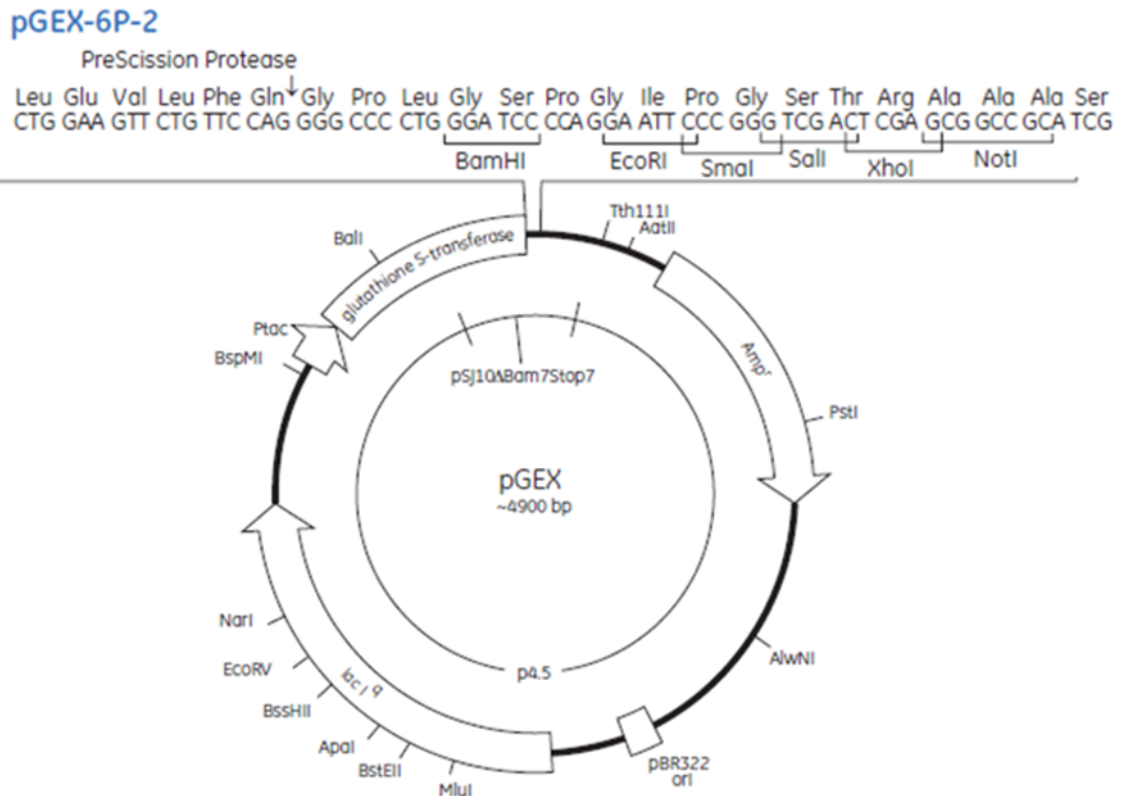


Fig. 8. Mapa del vector pGEX-6P-2 (Amersham).

- **pRSET-A®** (Invitrogen): Plásmido diseñado para la expresión de los genes de interés en *E. coli*. Este plásmido produce la proteína recombinante unida a una cola de 6 histidinas, lo que posibilita la purificación de la misma mediante el uso de columnas con resina de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA), al aprovechar la afinidad de las histidinas por la misma. Contiene el promotor T7, lo que permite altos niveles de expresión de las secuencias de ADN clonadas en el vector. Tiene un tamaño de 2,9 Kb y presenta como marcador el gen de resistencia a la ampicilina.

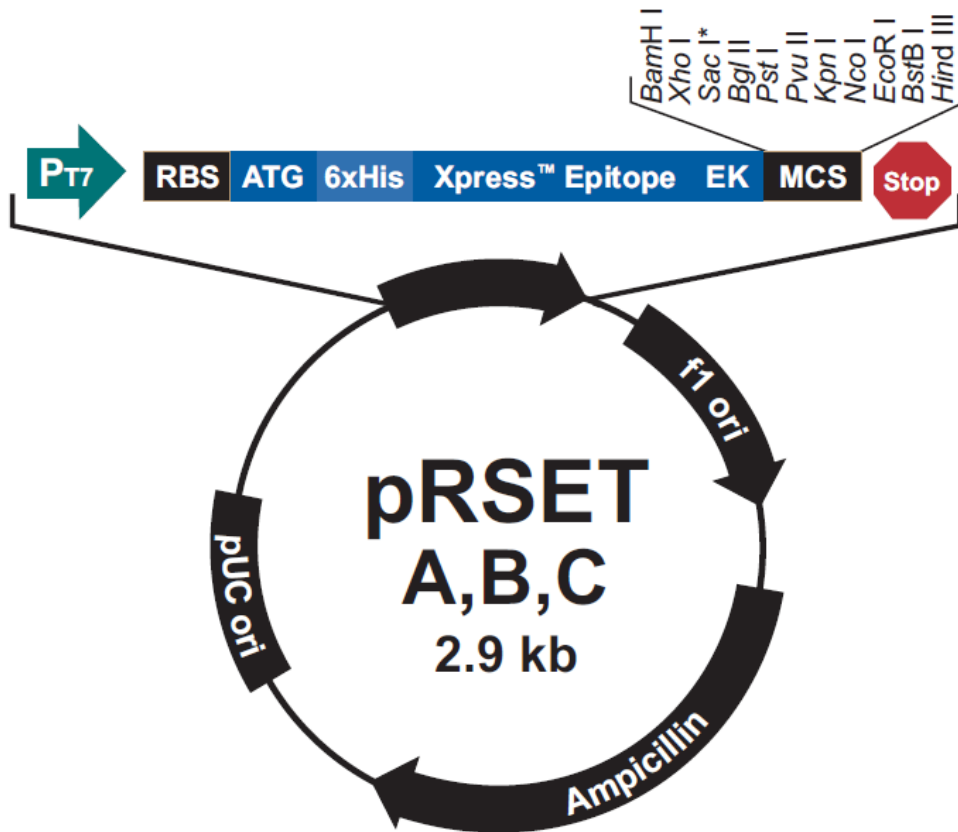


Fig. 9. Mapa del vector pRSET (Invitrogen).

1.5. CEPAS BACTERIANAS

- ***E. coli XL1-Blue MRF'*** (Stratagene; (*mcrA*) 183 Δ (*mcrCB**hsdSMR-mrr*) 173*endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [*F'* *proAB laclq Z* Δ *M15 Tn10* (Tetr)]): esta cepa se utilizó para la propagación y mantenimiento de todos los plásmidos recombinantes, en cuyo caso fueron conservados en glicerol al 50% a -80°C. Asimismo fue la cepa utilizada para propagar la genoteca de expresión.

- ***E. coli BL-21*** (Stratagene; (B F- *dcm ompT hsdS* (*r_B*- *m_B*⁻) gal [*malB*⁺]_{K-12}(λ^S)): esta cepa se empleó para la expresión de los genes clonados en el vector de expresión pGEX-6P-2.

- ***E.coli BL-21(DE3) pLysS*** (Stratagene; F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B*(*r_B*⁻ *m_B*⁻) λ (DE3) pLysS(*cm^R*): se utilizó para la expresión de los genes clonados en el vector de expresión pRSET-A.

2. MÉTODOS

2.1. DETECCIÓN DE *D. dendriticum* MEDIANTE PCR EN LOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS

2.1.1. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN total, se utilizó el kit comercial “Speedtools tissue ADN extraction kit” (Biotools). Este método, basado en la hidrólisis de los tejidos animales en una solución con proteinasa K/SDS, produce la lisis celular y mediante la posterior adición de etanol y agentes caotrópicos se crean las condiciones necesarias de unión del ADN a las partículas de sílica de la membrana de la columna. El paso de unión del ADN a la membrana de la columna es específico, además de reversible. Los contaminantes presentes en la muestra son eliminados mediante sucesivos lavados de la columna con diferentes buffers de lavado. Finalmente, el ADN es diluido específicamente en un buffer de baja fuerza iónica y pH ligeramente alcalino. Previamente a la utilización del kit, cada muestra fue homogeneizada, mediante un molino de cuchillas (Polytron PT 1600 E), en 1 ml de tampón de lisis durante 20 s, a 4°C (en baño de hielo). Se realizó la extracción de ADN de las muestras descritas anteriormente en los apartados 1.1. y 1.2.

2.1.2. Obtención y análisis de un fragmento de ADN mitocondrial de *D. dendriticum*

Se eligió, en primer lugar, el ADN mitocondrial como diana puesto que posee numerosas zonas conservadas, flanqueadas por otras hipervariables de tamaño apropiado, así como una organización definida de clúster génicos que varían de unos organismos a otros.

Ante la falta de información sobre *D. dendriticum* en las bases de datos, se procedió al alineamiento, mediante el programa CLUSTAL W, de las secuencias nucleotídicas de las mitocondrias de los veinte Platyhelminthes especificados en la Tabla 3 (siete Digenea, once Cestoda y dos Monogenea) y publicadas en bases de datos (GenBank).

Materiales y Métodos: Técnica de PCR

Tabla 3. Secuencias mitocondriales de los 20 platelmintos utilizadas en el diseño de los oligonucleótidos generales.

Nombre del verme	Tamaño mitocondrial (pb)	N° de acceso secuencia	
<i>Fasciola hepatica</i>	14462	NC_002546	Digenea
<i>Paragonimus westermani</i>	14965	NC_002354	Digenea
<i>Schistosoma japonicum</i>	14085	NC_002544	Digenea
<i>Schistosoma mekongi</i>	14072	NC_002529	Digenea
<i>Schistosoma spindale</i>	16901	NC_008067	Digenea
<i>Schistosoma mansoni</i>	14415	NC_002545	Digenea
<i>Schistosoma haematobium</i>	15003	NC_008074	Digenea
<i>Echinococcus granulosus</i>	13588	NC_008075	Cestoda
<i>Echinococcus shiquicus</i>	13807	NC_009460	Cestoda
<i>Echinococcus oligarthrus</i>	13791	NC_009461	Cestoda
<i>Echinococcus multilocularis</i>	13738	NC_000928	Cestoda
<i>Echinococcus vogeli</i>	13750	NC_009462	Cestoda
<i>Taenia solium</i>	13709	NC_004022	Cestoda
<i>Taenia asiatica</i>	13703	NC_004826	Cestoda
<i>Taenia crassiceps</i>	13503	NC_002547	Cestoda
<i>Diphyllobothrium latum</i>	13608	NC_008945	Cestoda
<i>Diphyllobothrium nihonkaiense</i>	13747	NC_009463	Cestoda
<i>Hymenolepis diminuta</i>	13900	NC_002767	Cestoda
<i>Gyrodactylus salaris</i>	14790	NC_008815	Monogenea
<i>Microcotyle sebastis</i>	14407	NC_009055	Monogenea

El alineamiento de las veinte secuencias enumeradas anteriormente ha servido para determinar las zonas más conservadas de las secuencias mitocondriales. Esto nos ha permitido diseñar un conjunto de oligonucleótidos (Tabla 4) que, por su grado de conservación entre los vermes comparados, son susceptibles de ser utilizados para la amplificación de ADN diana mitocondrial de *D. dendriticum*, así como de otros vermes filogenéticamente relacionados (*F. hepatica* y *C. daubneyi*), ya que los oligonucleótidos son de carácter generalista.

Materiales y Métodos: Técnica de PCR

Tabla 4. Oligonucleótidos generales diseñados a partir de las regiones conservadas de las secuencias mitocondriales. Código IUB para las posiciones con bases mixtas: N=G,A,T,C; V=G,A,C; B=G,T,C; H=A,T,C; D=G,A,T; K=G,T; S=G,C; W=A,T; M=A,C; Y=C,T; R=A,G.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
Cox1F	5'-TNTGTTTTTTKCKKATGCAYTA-3'
LrRNAF	5'-DYGTTGCTAAGGTAGCATAAT-3'
LrRNAR	5'-TCYYRGGGTCTTTCCGTC-3'
SrRNAR	5'-AACCGCGRMTGCTGGCAC-3'
Cox3F	5'-GTTTGGTACTGRCAITTTGTDGA-3'
CytbFa	5'-CARATGTCNTWTTGRGCTGC-3'
CytbFb	5'-ATAAAGCCNGAGTGRTAYTT-3'
CytbR	5'-RTAAAANGNCAAAAAGTAYCAYTC-3'
ND4Ra	5'-GAAAGGGMGGYARCGGGATCT-3'
ND4Rb	5'-CCYAAAYAAMCCCARCTTCAT-3'

La localización de los referidos oligonucleótidos, así como la posibilidad de amplificación del ADN diana en reacciones de PCR, de acuerdo con su combinación por pares, quedan esquematizados, con respecto al mapa mitocondrial de *F. hepatica*, en la Figura 10. La nomenclatura de los oligonucleótidos se asignó de acuerdo con el nombre del gen mitocondrial en cuya secuencia se localiza el oligonucleótido (Cox1F: Citocromo C oxidasa I; LrRNA: ARN ribosómico grande; SrRNAR: ARN ribosómico pequeño; Cox3: Citocromo C oxidasa III; Cytb: Citocromo oxidasa B; ND4R: NADH deshidrogenasa IV).

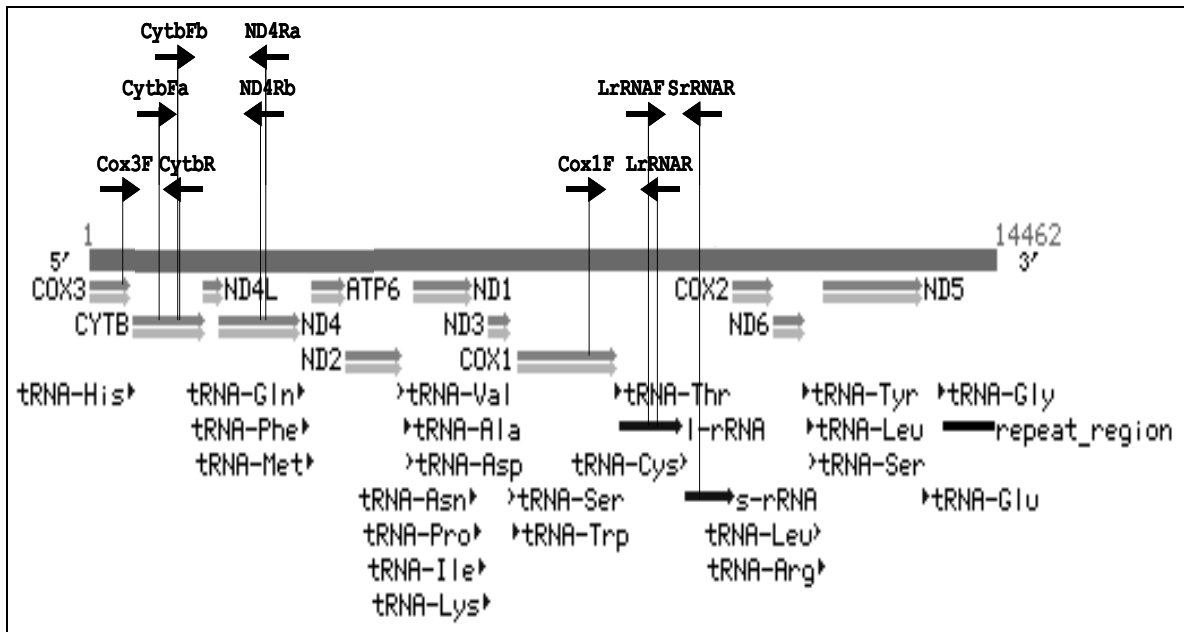


Fig. 10. Denominación y localización de los oligonucleótidos generales.

2.1.2.1. Amplificación del ADN por PCR

Una vez purificado el ADN total y sintetizados los oligonucleótidos diseñados (todos ellos poseen una temperatura de anillamiento similar, comprendida entre 53 y 58 °C), se procedió a amplificar la secuencia diana, utilizando como molde ADN total de *D. dendriticum*. La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de reacción de 20 µl, que contenía 2 µl de buffer de la Taq polimerasa 10X (Biotools); 0.4 µl de dNTP 10 mM; 0.4 U de ADN Polymerase (Biotools), y 2,5 µl de cada primer específico 10 µM. La reacción se realizó en un termociclador Applied Biosystems 2700.

Las condiciones de PCR iniciales fueron las que se indican a continuación:

- Ciclo 1:** 3 min/95° C
- Ciclo 2:** 35 repeticiones
- Ciclo 3:** 7 min/72° C
- Ciclo 4:** Continuo/ 4° C
- | | | |
|--|---|------------------|
| | } | 30 s/95° C |
| | | 30 s/52° C |
| | | 1 min 20 s/72° C |

2.1.2.2. *Electroforesis de ADN en gel de agarosa, purificación y secuenciación*

Los productos de PCR obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con “GelRed” y fotografiados usando el sistema de captura de imágenes Gel Doc XR (Bio-Rad). Se usaron como marcadores “PCR Markers” (Sigma), de alto y bajo peso molecular. El fraccionamiento se llevó a cabo en una cubeta de electroforesis horizontal con TAE 1X (Sambrook & Russell, 2001). La separación electroforética se realizó a 120 V, durante 30 min.

Se probaron por pares los diferentes oligonucleótidos generales diseñados para la amplificación por PCR del ADN molde y se escogió el par que mejor funcionó formado por:

Cox1F: 5'-TNTGTTTTTTKCKKATGCAYTA-3'

ARNLr: 5'-TCYYRGGGTCTTTCCGTC-3'

Mediante dicho par de oligonucleótidos generales se amplió un fragmento de 1034 pb. Tras la posterior separación electroforética la banda de 1034 pb se cortó del gel de agarosa y se purificó con el kit comercial “Speedtools PCR clean-up” (Biotools), según las indicaciones del fabricante.

Estos productos de PCR fueron secuenciados en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. La edición y el análisis posterior de la secuencia se llevaron a cabo con el software Lasergene (DNASnastar Inc., Madison, WI, USA). Para el análisis de la misma se realizó el alineamiento de la secuencia, con las secuencias mitocondriales de otros platelmintos obtenidas en las bases de datos, mediante el software MegAlign por el método ClustalW (ADN Star). La secuencia fue enviada a la base de datos GenBank, con el nº de acceso JF690758.

2.1.3. Detección de la infección mediante amplificación del fragmento de ADN mitocondrial

Una vez obtenida la secuencia del fragmento de ADN mitocondrial y, con el fin de detectar la infección por *D. dendriticum* en las hormigas y en los moluscos, se diseñó un par de cebadores específicos que amplificaron un fragmento de 169 pb. El par de oligonucleótidos estaba constituido por:

- **Forward:** Dd_HI_F: 5'GGT GTC CCG AAA GGT AGT GA 3'

- **Reverse:** Dd_HI_R: 5' TCA CCA ATC ACC TCA AAG CA3'

La amplificación se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas en el apartado 2.1.2.1. A cada reacción se le añadió 1 µl de ADN en el caso de los moluscos, y 5 µl de ADN en el caso de las hormigas. Los parámetros para la amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 92°C, durante 2 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización (95°C, 30 s), anillamiento (63°C, 30 s) y extensión (72°C, 1 min), con una fase final de extensión a 72°C, durante 10 min. En todos los análisis se utilizó 1 µl de ADN de un parásito adulto de *D. dendriticum* como control positivo, y agua ultrapura en lugar de ADN como control negativo. Los productos de la PCR fueron analizados tras la separación electroforética según lo descrito en el apartado 2.1.2.2.

Para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos se utilizó el ADN extraído de: 1/ adultos de *D. dendriticum*; 2/ moluscos natural o experimentalmente infectados, con esporocistos hijos de *D. dendriticum* ya visibles en el hepatopáncreas al ser examinados al estereomicroscopio; 3/ moluscos infectados con esporocistos de Brachylaimidae; 4/ metacercarias de Brachylaimidae; 5/ moluscos terrestres sin infectar (testigos); 6/ hormigas con metacercarias de *D. dendriticum* en el abdomen; 7/ hormigas no infectadas (testigos). También se probó la técnica con ADN obtenido de adultos de *F. hepatica* y *C. daubneyi*, así como de moluscos de la especie *G. truncatula* infectados con fases larvarias de *F. hepatica*, *C. daubneyi*, Plagiorchiidae y Notocotyliidae.

La sensibilidad se determinó probando el ADN extraído separadamente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 metacercarias procedentes del abdomen de hormigas parasitadas con *D. dendriticum*, así como el ADN de la cabeza de cada hormiga en tetania que suele albergar una sola larva cerebral. Por otra parte, se probó la sensibilidad de los

Materiales y Métodos: Técnica de PCR

oligonucleótidos para la detección precoz de la infección en los moluscos infectados experimentalmente mediante el análisis del ADN de cada molusco sacrificado desde el día 1 p.i.

2.1.4. Detección de la infección mediante amplificación de la región ITS-2

Debido a que no fue posible discriminar entre la infección por *D. dendriticum* y la infección por las fases larvares de Brachylaimidae mediante los oligonucleótidos mencionados en el apartado anterior, se diseñaron unos oligonucleótidos específicos a partir de fragmento ITS-2. Para el diseño de dichos oligonucleótidos se realizó un alineamiento de las secuencias ITS-2 presentes en las bases de datos de: *D. dendriticum* (DQ379986), *D. chinensis* (AB367790), *D. hospes* (EF102026) y *D. orientalis* (EF547132), mediante el programa ClustalW (ADN Star), que nos permitiera discriminar entre *D. dendriticum* y el resto de las especies citadas (Fig. 11.)

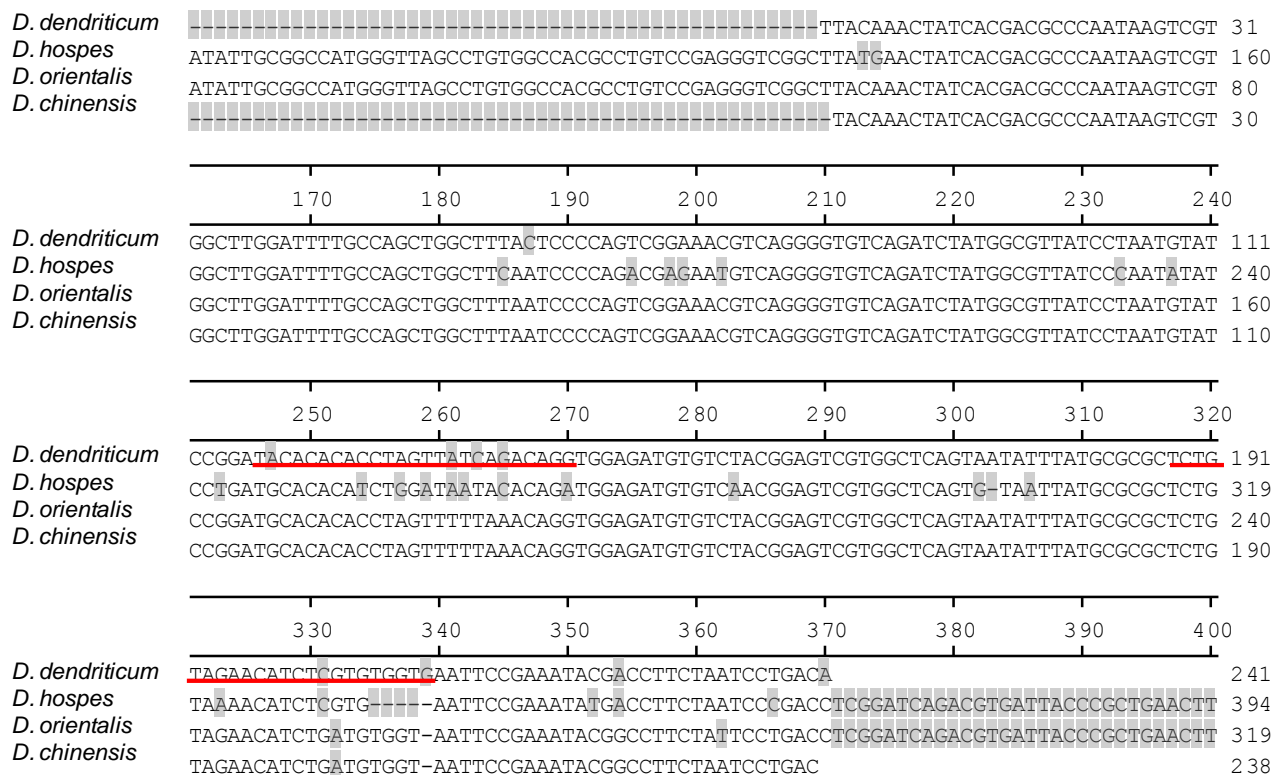


Fig. 11. Alineamiento múltiple de las secuencias ITS-2 presentes en las bases de datos de: *D. dendriticum* (DQ379986), *D. chinensis* (AB367790), *D. hospes* (EF102026) y *D. orientalis* (EF547132), mediante el programa ClustalW (ADN Star). En rojo están señalados los cebadores diseñados para la PCR.

Materiales y Métodos: Técnica de PCR

La pareja diseñada de cebadores está constituida por:

- **Forward:** Dd_ITS-2_F: 5' ACA CAC ACC TAG TTA TCA GAC AGG 3'

- **Reverse:** Dd_ITS-2_R:5' CAC CAC ACG AGA TGT TCT ACA G 3'

La amplificación de un fragmento de 93 pb se realizó mediante PCR, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (apartado 2.1.3.). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis y secuenciados para confirmar la especie. La especificidad de los cebadores diseñados se determinó utilizando el ADN de las muestras citadas para tal menester en el apartado anterior (apartado 2.1.3.), así como el ADN extraído de adultos de *D. chinensis*. Por otra parte, para determinar la sensibilidad de la técnica se probó el ADN de las mismas muestras analizadas para el mismo fin en el apartado 2.1.3.

2.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS ANTÍGENOS DE TEGUMENTO Y EXCRETOR/SECRETOR DE *D. dendriticum*

2.2.1. Extracción del antígeno de Tegumento (TG)

Los vermes vivos se sometieron a 3 lavados en TBS (Tris-buffered saline) pH 7,5 de 2-3 min cada uno en agitación. A continuación se probaron dos modificaciones del protocolo: se incubaron en TBS con Triton-X al 1%, bien durante 30 min (denominándose al producto TG1), o durante 90 min (TG2), en ambos casos la incubación fue en condiciones de agitación suave y con hielo. Una vez sedimentados los parásitos, y después de extraer el sobrenadante, se realizaron 2 lavados de los mismos añadiendo cada vez el mismo volumen de H₂O Millie-Q que el ocupado por los vermes. Los sobrenadantes de cada lavado se mezclaron, se filtraron a través de filtros Millex-HV 0.45µ (Millipore) y se les añadió la solución tampón de inhibidores de proteasas. Las muestras de antígeno así obtenido se congelaron, liofilizaron y finalmente se resuspendieron con Tris-CIH 5mM pH 8 en 1/5 del volumen de partida. . Posteriormente, las muestras fueron desaladas por cromatografía en columnas PD-10 cargadas con medio Sephadex G-25 (GE-Healthcare), estabilizadas con el mismo tampón (Tris-CIH 5 mM pH 8) y por último alicuotadas en tubos eppendorf. La medición de la concentración de proteínas se realizó según el método Bradford (1976), descrito a continuación.

2.2.2. Método de Bradford para la cuantificación de proteínas

Este método está basado en el cambio de color de un reactivo químico, en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. El método de Bradford utiliza el reactivo del mismo nombre, que al entrar en contacto con proteínas se reduce, virando su color del amarillento al azul intenso. Las muestras son leídas a 595nm y con estos datos se realiza la curva de calibración.

La curva patrón se realizó con la proteína gamma-globulina bovina (GGB) a una concentración de 1.43 µg/µl. Después de reconstituir la GGB se realizaron diluciones decimales.

El ensayo se hizo en placa de ELISA, y tanto la recta patrón como las diluciones de las muestras problemas se llevaron a cabo por triplicado. La lectura se hizo a 595 nm en un espectrofotómetro, tras 5 min de incubación.

2.2.3. Extracción del antígeno Excretor-Secretor (ES)

Se cultivaron los vermes adultos vivos, durante 24 horas a 37°C, en medio RPMI-1640 (40 adultos/ml), al que se añadieron 200 mM de N-acetil-L-alanil-L-glutamina, 4 ml/l de bicarbonato sódico al 7,5% y 40 mg/l de gentamicina. Transcurrido ese período, se retiraron los parásitos y el medio RPMI se centrifugó durante 15 min a 10.000 g, a 4°C. Posteriormente, se recogió el sobrenadante, se filtró a través de filtros Millex-HV 0.45µ (Millipore), se le añadió la solución tampón de inhibidores de proteasas y se concentró por liofilización. Tras esta última, el antígeno se reconstituyó con H₂O ó PBS y fue desalado con columnas PD-10. Para cuantificar la concentración de proteína se siguió el método Bradford (1976).

2.2.4. Separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional

La electroforesis 2D se realizó en los Institutos INBIOMIC e INBIOTEC de la Universidad de León. La electroforesis 2D es una técnica de alta resolución para la separación de mezclas complejas de proteínas. Durante la electroforesis 2D las proteínas se separan secuencialmente por dos criterios físicos, en primer lugar en función de su punto isoeléctrico y en segundo lugar según su masa molecular. Posteriormente, las proteínas separadas se procesan para su tinción e identificación por diversos métodos.

Para poner a punto la técnica se probaron distintos tratamientos de la muestra, diferentes concentraciones de proteína, distintos rangos de pH de las tiras durante la primera dimensión, y diferentes tinciones de los geles.

2.2.4.1. Tratamiento de la muestra

A) Purificación con el kit ReadyPrep™ 2D cleanup kit (BIO-RAD): Los antígenos ES y TG se purificaron con el kit comercial ReadyPrep™ 2D cleanup kit, para lo cual se transfirieron 100 µl de las muestras y se añadieron 300 µl de agente precipitante 1, se mezclaron mediante vortex y se incubaron durante 15 min en hielo.

Se añadieron 300 μ l del agente precipitante 2, se mezcló y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante para volver a centrifugar 50 s. Se añadieron 40 μ l de Buffer lavado¹. Se centrifugó a máxima velocidad 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 25 μ l de agua pura, 1 ml del buffer 2 a -20°C y 5 μ l del aditivo, se mezcló todo durante 5 min y se incubó a -20°C durante 30 min, mezclando cada 10 min. Finalmente se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se secó a T^{a} ambiente durante 5 min y se resuspendió en 500 μ l del buffer de rehidratación.

B) Tratamiento con TCA-Acetona: El reactivo para el tratamiento se preparó con una concentración final de 10% de ácido tricloroacético (TCA) y 80% de acetona. La muestra de proteínas antigénicas se incubó con el reactivo durante 1 hora a -20°C , se centrifugó a 15000-18000g durante 15 min a 4°C . Tras la eliminación del sobrenadante, el pellet se resuspendió en 8 volúmenes de acetato amónico 0.1M en metanol frío (-20°C), se incubó durante 10 min a -20°C y se volvió a centrifugar a 15000-18000g 10 min a 4°C . Tras eliminar el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 8 volúmenes de acetona fría (-20°C) para eliminar los restos de TCA. Se incubó durante 10 min a -20°C y se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores. El pellet se secó al aire para su posterior solubilización en buffer de rehidratación de electroforesis 2D.

Para ambos procedimientos, se midió la concentración proteica final por el método Bradford (1976), se alicuotaron las muestras y se conservaron a -30°C hasta su procesamiento. La reproducibilidad del procedimiento de preparación de las muestras fue verificada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

2.2.4.2. Fase de rehidratación de las tiras IPG (gradiente de pH inmovilizado)

Se utilizaron tiras de gradiente de pH inmovilizado Ready strip IPG (BIO-RAD) de 7 cm, de rangos de pH 3-10 y 5-8 lineal y pH 3-10 no lineal. Para la rehidratación se emplearon entre 110-125 μ gr de proteína diluida en buffer de rehidratación. Las muestras antigénicas y las tiras fueron colocadas en bandejas de isoelectroenfoque (IEF) en el equipo Protean IEF-cell (BIO-RAD). La rehidratación se realizó durante 12 h a 20°C y con un voltaje de 50 V.

2.2.4.3. Isoelectroenfoque (IEF, primera dimensión)

Terminada la rehidratación se colocaron las tiras IPG en la bandeja de IEF, sobre unos papeles de filtro humedecidos en agua, que se situaron encima de los electrodos para absorber el exceso de sales, se cubrieron con 1 ml de aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra y se introdujeron en el equipo Protean IEF-cell (BIO-RAD). En dicho equipo las tiras se someten a un campo eléctrico y migran para quedar enfocadas en los lugares donde el pH coincida con su punto isoeléctrico, de forma que su carga neta es nula, y allí se detienen. Para ello, se utilizaron las siguientes condiciones:

- S1 15 min 250V
- S2 Rampa rápida hasta 4000V (2h)
- S3 Mantenimiento a 4000V hasta acumular 12000Vh



Fig. 12. Equipo Protean IEF cell de Bio-Rad utilizado para realizar el isoelectroenfoque.

2.2.4.4. Fase de equilibrado de las tiras IPG

Para llevar a cabo una adecuada separación de las proteínas en función de su peso molecular (P_m), es necesario tratarlas con: 1/ Agentes desnaturizantes, como el SDS que desnatura las proteínas, se une a ellas de forma proporcional a su P_m y las dota de carga negativa; 2/ Agentes reductores, como el DTT que se encarga de reducir los puentes disulfuro; y 3/ Agentes alquilantes, como la Iodoacetamida que alquila los grupos SH reducidos anteriormente, evitando su posterior oxidación.

Por ello, tras el isoelectroenfoque, las tiras se equilibraron primero con 2,5 ml de buffer de equilibrado, al que se añadieron 0,05 gr de DTT, y se mantuvieron durante 15 min a T^a ambiente y en agitación. A continuación, al mismo tampón de equilibrado se añadieron 0,0625 gr de Iodoacetamida, sumergiendo las tiras en 2,5 ml y dejándolo actuar durante 10 min a T^a ambiente, en agitación.

2.2.4.5. SDS-PAGE (segunda dimensión)

Con el fin de que las proteínas se separen en función del P_m y queden diferenciadas en spots, que puedan ser picados posteriormente, se realizó la electroforesis en minigeles de 1 mm de espesor, utilizando de forma rutinaria una concentración de poliacrilamida del 12% y el equipo Miniprotean cell (Bio-Rad).

Para la polimerización de los geles, se preparó una disolución al 12% de poliacrilamida, a la que se le añadieron el iniciador "Tetramethylethylenediamine" (TEMED) y persulfato amónico para catalizar la polimerización de la acrilamida.

Las tiras equilibradas se colocaron sobre la superficie de los geles, en contacto con éstos y evitando la formación de burbujas. Se colocó un pequeño trozo de papel de filtro en uno de los extremos, humedecido con 3 μ l de un marcador preteñido de proteínas (Bio-Rad). El conjunto se selló con agarosa al 0,5% y se le añadió una gota de azul de bromofenol para visualizar el frente.

A continuación, los geles se colocaron en la cubeta de electroforesis, previamente cargada con tampón de electroforesis 1X, y se les sometió a una corriente eléctrica de 30 mA/gel a 15° C, hasta que el frente alcanzó el extremo inferior del gel. Tras la electroforesis los geles fueron teñidos o transferidos a membranas de nitrocelulosa para el análisis posterior de las proteínas antigénicas.



Fig. 13. Miniprotean Cell de Bio Rad.

2.2.5. Tinciones de geles

Los geles se tiñeron de forma rutinaria con Brilliant Blue G 250 Coomassie siguiendo el protocolo descrito por Candiano *et al.* (2004). Para comprobar las condiciones más reproducibles se tiñeron otros geles adicionales con Sypro® Ruby Protein Gel Satín (Sigma, Saint Louis, MO, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante o con plata compatible con espectrometría de masas.

2.2.5.1. Tinción con Coomassie coloidal (blue silver)

Con esta técnica se obtiene una elevada sensibilidad de tinción pues permite detectar hasta 1ng de proteína en el gel, en un rango similar al de las tinciones con plata. Además, tiene la ventaja de ser una técnica con alta reproducibilidad, ya que es independiente de un gran número de parámetros (temperatura, tiempos de desarrollo, calidad de los disolventes), que dificultan en gran medida las tinciones con plata.

El colorante se preparó mediante la mezcla de un 10% del volumen final de ácido fosfórico, un 10% del volumen final de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, un 0,12% del volumen final de

Coomassie G-250 y agua destilada hasta completar el 80% del volumen total. Tras ello, se añadió lentamente metanol hasta alcanzar una concentración final del 20%.

Previamente a la tinción, los geles se fijaron en una solución de 40 % v/v metanol y 10 % v/v ácido acético, durante al menos 1h. A continuación, se realizaron 3 lavados con agua bidestilada de 10 min cada uno y, finalmente, se tiñeron durante toda la noche con el colorante en agitación a T^a ambiente. Posteriormente se destiñeron mediante sucesivos lavados en agua hasta visualizar un fondo claro del gel.

2.2.5.2. Tinción del gel con Plata compatible con Espectrometría de Masas

Esta tinción presenta también gran sensibilidad ya que permite detectar hasta 1 ng de proteínas por gel, aunque no guarda un rango lineal de proporcionalidad. El protocolo de tinción con plata fue adaptado para hacerlo compatible con el análisis mediante espectrometría de masas. El tratamiento de los geles se realizó como se describe a continuación:

1. Fijación: etanol 40%, acético 10%; 30 min
2. Sensibilización: etanol 30%, tiosulfato sódico 0,2%, acetato sódico 6,8%; 30 min
3. Lavados: 3 lavados de 5 min con agua destilada
4. Tinción: nitrato de plata 0,25%; 20 min
5. Lavados: 2 lavados de 1min con agua destilada
6. Revelado: carbonato sódico 2,5%, formaldehído 0,04%; 5 min
7. Parada: EDTA 1,46%; 10 min
8. Lavado final en agua

Todo el proceso se llevó a cabo en agitación y a T^a ambiente.

2.2.6. Transferencia y Western Blot (WB)

Para identificar las proteínas antigénicas de los extractos TG y ES, se corrieron en paralelo geles que fueron posteriormente electrotransferidos a membranas de

Materiales y Métodos: Técnicas de Proteómica

nitrocelulosa (BIO-RAD), a 110V, 4°C durante 75 min en tampón de transferencia. La ulterior detección de los spots antigénicos se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo:

- 1.- Lavado de la membrana con PBS, durante 10 min
- 2.- Bloqueo en solución de bloqueo a 4°C, durante toda la noche
- 3.- Lavado en PBST, durante 10 min
- 4.- Adición de suero de ovino positivo a *D. dendriticum*, diluido en PBST 1/100 e incubación durante 1h, a 37°C. Como testigos se utilizó suero de corderos no infectados
- 5.- 4 lavados de 5 min en PBST
- 6.- Incubación con el conjugado, anti-IgG ovina marcada con peroxidasa (Sigma), diluido 1/1000 en PBST 1 hora a temperatura ambiente.
- 7.- 4 lavados de 5 min en PBST
- 8.- Revelado con el sustrato Diaminobencidina (DAB), utilizando el kit Metal Enhanced DAB Substrate Kit (Thermo Scientific 34065) según las instrucciones del fabricante
- 9.- Parada de la reacción con agua

Todo el proceso se llevó a cabo en agitación.

2.2.7. Electroforesis monodimensional, transferencia y Western Blot

Para poner a punto la técnica de Western Blot, conocer las concentraciones adecuadas de anticuerpos y la especificidad de las proteínas antigénicas, se realizaron varias pruebas de electroforesis monodimensional (SDS-PAGE) de los antígenos, seguidas de electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa, en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior.

Las electroforesis se realizaron en minigeles utilizando el equipo Mini Protean cell (BIO-RAD). La concentración de acrilamida del gel separador fue del 12% y en cada pocillo del gel se añadieron 3 µl del antígeno, 7 µl de agua y 10 µl del tampón de tratamiento de muestras. Además, en cada carrera, se utilizó como referencia un

marcador de peso molecular de proteínas preteñido, añadiendo 7 μ l del mismo en un pocillo diferente. Finalmente, los geles fueron sometidos a una corriente de 30 mA/gel durante un tiempo variable, generalmente, hasta que el frente alcanzó el extremo inferior del gel.

Posteriormente se realizó la electrotransferencia, como ya se ha descrito en el apartado anterior, tras lo cual se tiñeron las membranas con Rojo Ponceau para visualizar los carriles y poder cortar adecuadamente las correspondientes tiras de la membrana. Éstas se lavaron finalmente en PBS para eliminar los restos de colorante.

La valoración de la concentración óptima de los anticuerpos se llevó a cabo realizando un Western Blot con distintas concentraciones de sueros anti-*D. dendriticum* y con distintas concentraciones del conjugado anti-Ig G ovina. El revelado se hizo siempre con DAB, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.8. Adquisición y análisis de las imágenes 2D

La obtención de las imágenes de los geles 2D teñidos con Coomassie coloidal, fue realizada con el escáner de digitalización de geles GS-800 (Bio-Rad). El análisis de las imágenes obtenidas fue realizado posteriormente con el programa PDQuest™. Para ello se llevó a cabo la detección automática de los spots, ajustando los distintos parámetros, que luego se corrigió manualmente en cada una de las imágenes. Una vez modificadas las imágenes se procedió a la asignación de los valores de Pm a las proteínas del marcador y los valores de pH de la tira. En el caso de las proteínas antigénicas se emparejaron las imágenes de los geles 2D con las imágenes de las membranas reveladas con DAB, homólogas a dichos geles, y se comprobó la concordancia entre los spots de ambas imágenes.

2.2.9. Identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas

Los spots de interés se cortaron manualmente con puntas de pipeta y fueron depositados en tubos eppendorf, a los que se añadieron 200 μ l de agua Milli-Q. El análisis de los spots se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares de Madrid (CNIC) y en la unidad de Proteómica del “Centro de Investigación Príncipe Felipe”, (Valencia). En ambos centros se llevaron a cabo los procedimientos que se describen en los siguientes apartados.

2.2.9.1. Digestión triptica de proteínas en gel

Los spots fueron transferidos a microplacas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en V perforado (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania) cargadas con agua ultrapura. Las muestras fueron digeridas de forma automática en un robot Proteineer DP (Bruker Daltonik) bajo el control del programa dpControl 1.2. Se empleó el protocolo de digestión de Shevchenko *et al.* (2006) con ligeras variaciones: los fragmentos fueron reducidos con ditioneitol 10 mM (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) en bicarbonato amónico 50 mM (pureza: 99,5%; Sigma Chemical, St. Louis, MO, EE.UU.) y alquilados con yodoacetamida 55 mM (Sigma Chemical) en bicarbonato amónico 50 mM. Los fragmentos de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo (calidad HPLC; Merck, Darmstadt, Alemania) y fueron secados en corriente de nitrógeno. A continuación se añadió a los fragmentos tripsina porcina modificada (calidad secuenciación; Promega, Madison, WI, EE.UU.) a una concentración de 8 ng/ μ l en bicarbonato amónico 50 mM y se dejó transcurrir la digestión durante 8 h. Por último, se añadió ácido trifluoroacético (pureza: 99,5%; Sigma Chemical) al 0,5% para la extracción de los péptidos. Los digeridos resultantes se transfirieron a microplacas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en V (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany).

2.2.9.2. Espectrometría de masas

Para el análisis de masas mediante MALDI se mezclaron volúmenes iguales de digerido y de una disolución matriz compuesta por ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Bruker Daltonik) en acetonitrilo acuoso al 50% y ácido trifluoroacético al 0,25%. La mezcla se depositó en un portamuestras MALDI pretratado AnchorChip de 600 μ m (Bruker Daltonik) (Schürenberg *et al.*, 2000) y se dejó secar a temperatura ambiente. El análisis de masas de las muestras se realizó de forma automática en un espectrómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonik) (Suckau *et al.*, 2003) empleando calibración interna bajo el control del programa flexControl 2.2 (Bruker Daltonik). En una primera etapa se midieron los espectros de masas MALDI-MS en el intervalo 800-4000 Da en modo reflector positivo, a una frecuencia de láser de 50 Hz, y se acumularon 300 espectros individuales. Los espectros MALDI-MS fueron calibrados internamente empleando como referencia señales de masa de dos iones provenientes de la autólisis de la tripsina con $m/z = 842,510$ y $m/z = 2211,105$.

En una segunda etapa, se llevó a cabo el análisis de los iones fragmento en modo tándem (MS/MS) de aquellos iones precursores cuya relación señal-ruido en el espectro MALDI-MS superaba un valor umbral. Los precursores fueron acelerados a 8 kV y seleccionados mediante una compuerta iónica temporal. Los iones fragmento generados mediante descomposición inducida por láser del precursor fueron de nuevo acelerados a 19 kV en la cámara LIFT y analizados en el reflector de iones, acumulándose 1000 espectros individuales.

La calibración para las medidas MALDI-MS/MS se realizó con los espectros de los iones fragmento de las señales protonadas de una mezcla de péptidos que cubría el intervalo $m/z = 800-3200$.

El análisis automático de los datos de masas se llevó a cabo con el software flexAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik). Se realizó una revisión manual de los espectros MALDI-MS y MS/MS para su readquisición, recalibración o reetiquetado en caso necesario, empleando los programas mencionados más arriba y software ad-hoc.

2.2.9.3. Búsqueda en bases de datos

Los datos de MALDI-MS y MS/MS fueron combinados mediante el programa BioTools 3.0 (Bruker Daltonik) para realizar búsquedas en base de datos no redundantes (NCBI nr; $\sim 9,7 \times 10^6$ entradas; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EE.UU.; SwissProt; $\sim 5,0 \times 10^5$ entradas; Swiss Institute for Bioinformatics, Suiza) empleando el software Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido) según el protocolo de Perkins *et al.* (1999).

Otros parámetros de búsqueda relevantes fueron: enzima, tripsina; modificaciones fijas, carbamidometilcisteína; se permitió un corte fallido de la enzima; tolerancia en péptidos, ± 20 ppm; tolerancia en MS/MS, ± 0.5 Da.

Se consideró que una proteína estaba correctamente identificada cuando el valor MASCOT obtenido era significativo (mayor de 50). Las proteínas identificadas fueron clasificadas por su función molecular, de acuerdo a la información obtenida en la base de datos Gene Ontology (GO).

2.3. CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE *D. dendriticum*

2.3.1. Obtención del ARN total de vermes adultos de *D. dendriticum*

Para la construcción de la librería de ADNc se purificó ARN mensajero, a partir del ARN total. Debido a que el ARNm supone tan sólo un 1-5% del ARN total celular, y la mayoría de las moléculas son tARNs y rARNs, se extrajo primero el ARN total para aumentar la cantidad relativa de ARNm.

El ARN total de *D. dendriticum* fue extraído de vermes adultos conservados en nitrógeno líquido, antes de de lo cual se comprobó la viabilidad de los mismos al estereomicroscopio, y se utilizaron tan sólo aquellos que continuaban vivos tras el lavado. Para la optimización del protocolo se hicieron numerosas extracciones de ARN total, siendo la que dio mejor rendimiento la efectuada a partir de 400 parásitos adultos. La muestra de 400 vermes se homogenizó, mediante el homogeneizador POLYTRON, con 16 ml (100 parásitos/4ml) del reactivo TRI® (SIGMA), que combina fenol y tiocianato de guanidina en una solución monofase, e inhibe la actividad de las Rnasas, con el fin de lisar las células del parásito. El homogenizado resultante se separó en fases, por adición de cloroformo y por centrifugación, obteniendo el ARN disuelto en la fase acuosa superior, el ADN en la interfase y las proteínas en la fase orgánica. El ARN de la fase acuosa se precipitó con isopropanol y finalmente se lavó con etanol al 70%. El pellet obtenido se dejó secar en una campana de flujo laminar y, posteriormente, se solubilizó con 655µl de agua DEPC.

Después de cada extracción se midió la concentración del ARN total así como la calidad del mismo. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro Uv-Vis NanoDrop ND-1000, realizando la lectura a una absorbancia de 260 nm (A260). Para medir la pureza del ARN respecto a los contaminantes como las proteínas, se leyeron los ratios de absorbancia A260/A280 y A260/A230.

2.3.2. Obtención de ARNm

La obtención del ARNm se llevó a cabo mediante el kit comercial "Purification of poly A+ from total ARN" (QIAGEN). Se utilizaron 115 µl de resina Oligotex Suspension®, que es un reactivo de afinidad para la purificación, aislamiento y detección de ácidos

nucleicos. Dicha resina está constituida por partículas de latex-poliestireno de tamaño uniforme y forma esférica, a las cuales se han unido covalentemente oligonucleótidos dC10T30, permitiendo el aislamiento de ácidos nucleicos poliadenilados (como es el caso del ARNm), al cual se le añade una cola de poly-A en el núcleo después de la transcripción. Los restos de ARN que no están poliadenilados no se unirán a la matriz oligo-dT y pueden ser eliminados con facilidad, mediante lavado. El ARNm puede ser liberado de la matriz reduciendo la fuerza iónica y desestabilizando los híbridos dT: A, ya que la hibridación requiere condiciones de alta salinidad.

Con el fin de obtener el máximo rendimiento, el ARNm unido a la resina se recuperó finalmente mediante dos adiciones consecutivas de 100 µl del buffer de elución. Después de cada extracción se midió la cantidad de ARNm así como su pureza mediante el mismo procedimiento señalado para la extracción de ARN total.

2.3.3. Precipitación y concentración de la muestra de ARNm

La muestra de ARNm se concentró mediante la adición de 1/10 del volumen de Na acetato 3M pH 5,2 y de 2,5 volúmenes de etanol 100%. Ésta mezcla se incubó 1h a –80°C y, posteriormente, se centrifugó durante 10 min, a 12000g y a 4°C, para precipitar el ARNm. A continuación se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet con etanol al 70%, se dejó secar en campana de flujo laminar para finalmente resuspenderlo en 36 µl de agua DEPC y congelarlo a –80°C hasta su utilización.

2.3.4. Construcción de la Genoteca de ADNc

La genoteca se construyó a partir del ARNm extraído de adultos de *D. dendriticum*, utilizando los kit comerciales ADNc synthesis kit, ZAP-ADNc synthesis kit y ZAP-ADNc Gigapack III Gold Cloning kit (Stratagene).

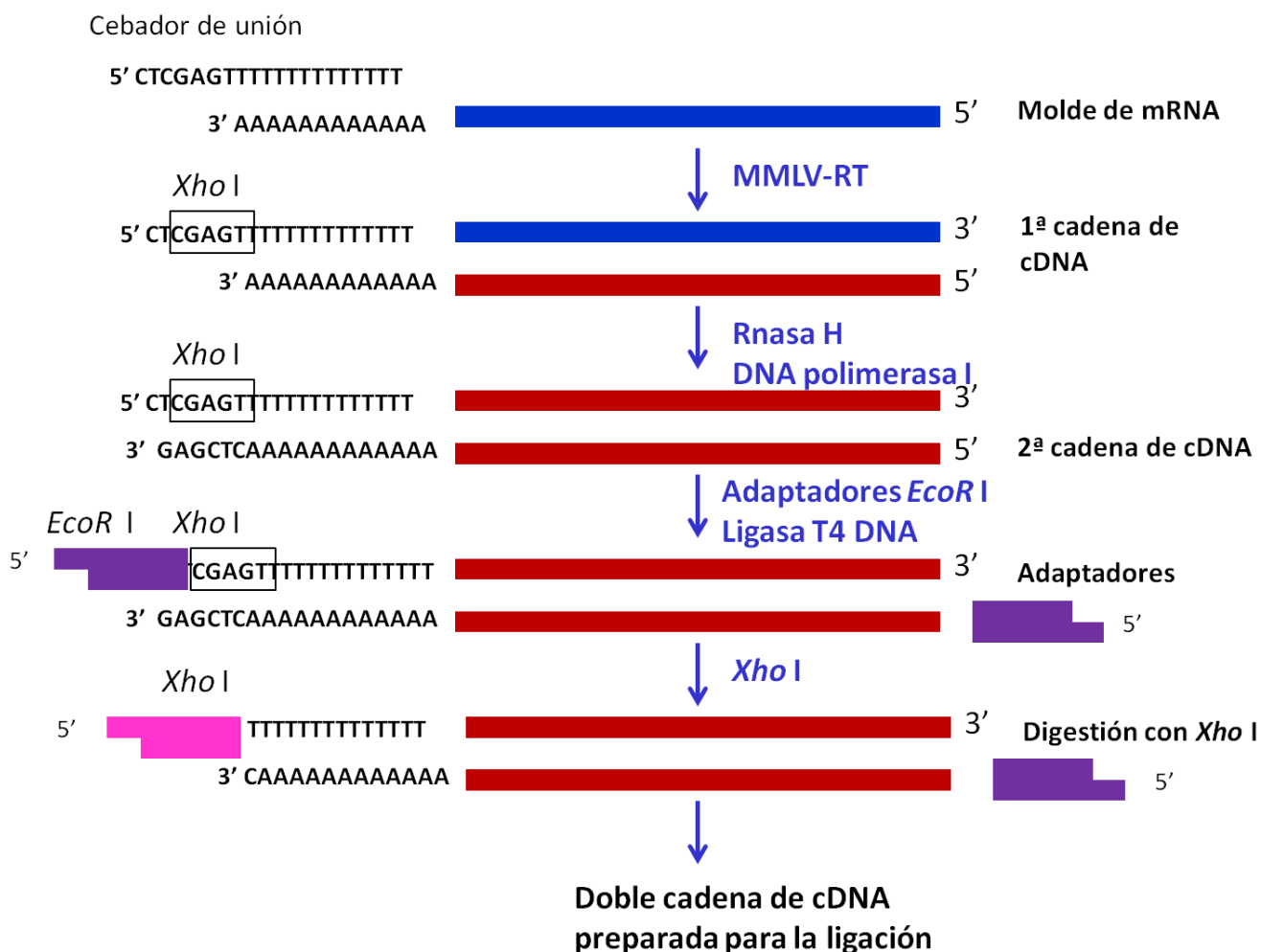


Fig. 14. Diagrama de flujo de la síntesis del ADNc.

2.3.4.1. Síntesis de la doble cadena de ADNc

La síntesis del ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm, se llevó a cabo con el kit comercial “ZAP-ADNc synthesis kit” (Stratagene). Para dicha síntesis se utilizaron: 5 µgr de ARNm; un cebador de unión oligo (dT) que contiene un sitio de restricción para la enzima *Xho* I, que permite la clonación unidireccional del ADNc en el vector; la enzima transcriptasa inversa (AccuScript RT); y nucleótidos dCTP metilados.

La síntesis de la primera cadena de ADNc comienza cuando la enzima AccuScript RT, en presencia de nucleótidos y buffer, encuentra la hebra molde de ARNm y el primer,

de manera que la región poli (dT) se una a la región poli(A) de la hebra molde del ARNm. Ésta síntesis se llevó a cabo durante 1 h a 42°C.

La segunda cadena de ADNc se sintetizó inmediatamente después, utilizando como molde la primera cadena. Para ello, se añadió RNAsa H que procedió al “mellado” del ARNm unido a la primera cadena de ADNc y a la formación de múltiples fragmentos que sirven como cebadores a la ADN polimerasa I. La muestra con las enzimas se incubó durante 2,5 h a 16°C, tras lo cual el tubo de reacción se refrigeró mediante la colocación del mismo en hielo picado.

De ambas muestras se reservaron 5 µl para efectuar un control de la síntesis. Para ello, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% durante 30 min a 120 V. La integridad de las cadenas de ADNc se evaluó por la formación de una imagen de “smear” en el gel.

2.3.4.2. Creación de los extremos cohesivos del ADNc

Una vez sintetizada la doble cadena de ADNc, los extremos romos se obtuvieron mediante la incubación con la enzima ADN polimerasa Pfu y la mezcla de dNTP durante 30 min a 72°C. Posteriormente, se extrajo el ADNc mediante la adición de fenol-cloroformo y la posterior precipitación con sodio acetato 3M y etanol 100 % durante toda la noche, a -20°C. Tras este paso se ligaron los adaptadores Eco RI con la enzima ADN ligasa T4, durante 2 días a 4°C. Después de inactivar la ligasa a 70°C, se fosforilaron los extremos Eco RI con la enzima polinucleótido kinasa T4, para permitir su posterior unión al vector de clonación. Seguidamente, tras inactivar la kinasa, se trató con la endonucleasa de restricción Xho I durante 1,5 h a 37°C, para eliminar el adaptador EcoRI y el cebador de unión residual del extremo 3' del ADNc. Por último se precipitó el ADNc con etanol al 100%, durante toda la noche a -20°C, se centrifugó durante una hora y se resuspendió el pellet en 14 µl de buffer STE 1X.

2.3.4.3. Fraccionamiento del ADNc

La presencia de una elevada concentración de los adaptadores en el ADNc puede impedir la ligación del ADNc con el vector y, adicionalmente, ocasionar una contaminación de la genoteca con clones aparentemente vacíos. Para asegurar que los clones de ADNc obtenidos son representativos del ARNm presente en la

preparación original, se procedió al fraccionamiento del ADNc por tamaño, con una columna Sephacryl S-400 Matrix Promega, tal como se describe a continuación.

Como columna de fraccionamiento se utilizó una jeringa de plástico de 1 ml, cargada con la matriz Sephacryl S-400 y en cuyo fondo se insertó previamente un pequeño algodón. Esta columna se colocó en un tubo tipo Falcon de 15 ml y se sometió a centrifugación durante 2 min a 600 g. Posteriormente, se llenaron de nuevo las $\frac{3}{4}$ partes de la columna con la matriz y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. A continuación, la columna se equilibró mediante dos adiciones consecutivas de 300 μ l de tampón STE 1X. Una vez equilibrada la columna se centrifugó a 600g, durante 2 min y se desechó el filtrado. Se colocó un tubo eppendorf en el fondo del tubo Falcon de 15 ml para recoger la muestra de ADNc. Esta se depositó en el centro de columna y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones mencionadas, recogiendo la fracción 1 del ADNc eluído. Posteriormente se añadieron 60 μ l de buffer STE 1X y se repitió el procedimiento, recogiendo hasta 7 fracciones. El ADNc mayor de 0,4 Kb, presente en las 4 primeras fracciones, se juntó y se precipitó con etanol al 100%, durante toda la noche, a -20°C. Finalmente, el sedimento resultante se lavó con 200 μ l de etanol al 80% y se resuspendió en 6 μ l de agua estéril. La concentración de ADN obtenido se midió mediante un nanodrop ND-1000, a una longitud de onda (λ) de 260 nm.

2.3.4.4. Ligación del inserto de ADNc al vector de clonación UNI-ZAP XR

La ligación se efectuó con la enzima ligasa T4 ADN, según las indicaciones del fabricante. Se añadió a la reacción de ligación 100 ng de ADNc, 1 μ g del vector UNI-ZAP XR y se incubó durante 2 días a 4°C.

2.3.4.5. Empaquetamiento de la genoteca de ADNc

Inmediatamente después de la ligación se realizó el empaquetamiento. Para ello, se añadió 1 μ l de la misma al extracto de empaquetamiento del kit y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 500 μ l de buffer SM y 20 μ l de cloroformo, se centrifugó brevemente para eliminar los restos celulares y se almacenó el sobrenadante, que contiene el fago, a 4°C hasta su posterior titulación.

2.3.4.6. Preparación de las cepas bacterianas

Se utilizó la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF'. Como primer paso se sembró la cepa en una placa con medio de cultivo LB agar con tetraciclina, y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente se seleccionó una colonia, se inoculó a 50 ml de medio líquido LB con suplementos, y se mantuvo en agitación fuerte (200 rpm) toda la noche a 30°C. Tras centrifugar, durante 10 min a 1000 x g, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 25 ml de MgSO_4 10 mM y se conservaron a 4°C.

2.3.4.7. Titulación

Se realizaron diluciones seriadas del fago obtenido en el punto 2.3.4.5. Posteriormente se añadió 1 μl de cada una de estas diluciones a 200 μl de las células diluidas en MgSO_4 10 mM (D.O.₆₀₀ de 0.5). Se llevó a cabo una incubación de las mismas durante 15 min, a 37°C, para permitir que el fago se adhiriera a las células y, a continuación, se añadieron 3 ml de LB agar cobertura (licuado y pre enfriado a 48°C). Esta mezcla fue depositada sobre placas de LB agar de 90 mm, que se incubaron boca abajo durante toda la noche, a 37°C. Al día siguiente se llevó a cabo el recuento de las placas de lisis para determinar el título en nº de unidades formadoras de placas por ml (pfu/ml).

2.3.4.8. Recuento de fagos recombinantes

Se añadieron 1 μl del fago λ y 1 μl de una dilución 1:10 a 200 μl de las bacterias diluidas en MgSO_4 10mM (apartado 2.3.4.6). Se incubó a 37°C durante 15 min. A continuación, se añadieron 2-3 ml de LB Agar cobertura, 40 μl X-gal (Sigma) (40 μl ; 20 mg/ml DMSO) y 4 μl de IPTG 1M (Sigma) y se depositó en placas de LB agar de 90 mm. Seguidamente, las placas se incubaron a 37°C toda la noche, tras lo cual se realizó el recuento de las placas de lisis recombinantes y no recombinantes, en función del color.

2.3.4.9. Amplificación de la genoteca primaria

Inmediatamente después, se realizó la amplificación de la genoteca de ADNc primaria, con el fin de conseguir una genoteca estable con un título elevado. Para ello, se añadieron a cada tubo 5×10^4 pfu de bacteriófago (apartado 2.3.4.5.) y 600 μl de

bacterias con una D.O.₆₀₀ de 0,5 (apartado 2.3.4.6.). Los tubos se incubaron a 37°C durante 15 minutos. En este caso, se utilizaron placas Petri de 150 mm, por lo que se añadieron 6,5 ml de agar de cobertura a cada tubo y el contenido total se vertió en las placas de LB agar. Las placas se incubaron durante 6-8 horas y, cuando se empezaron a visualizar las placas de lisis, se cubrieron cada una de las placas con 8-10 ml de tampón SM y se mantuvieron a 4°C, durante toda la noche en agitación lenta. Al día siguiente, se recogió el fago en suspensión de cada placa en tubos estériles, y se lavaron las placas con un volumen adicional de 2 ml de tampón SM, para recoger los posibles restos de fago. A todo ello se añadió cloroformo a concentración final del 5% y los tubos se incubaron a temperatura ambiente, durante 15 min. Posteriormente, se extrajeron los restos celulares por centrifugación a 500g durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se añadió cloroformo a una concentración final del 0,3%. La genoteca se guardó en alícuotas. Una parte se guardó a 4°C, mientras que el resto de la genoteca se conservó en DMSO al 7%, a -80°C. La genoteca amplificada se tituló de nuevo tal, y como se ha descrito anteriormente (apartado 2.3.4.7.).

2.3.5. Inmunocribado de la genoteca de expresión

2.3.5.1. Preabsorción de los sueros con lisado de *E. coli*

Los sueros policlonales contienen frecuentemente anticuerpos que reaccionan frente a las proteínas de *E. coli*. Estos anticuerpos contaminantes pueden incrementar los fondos y crean falsos positivos, así como disminuir la sensibilidad y fiabilidad del ensayo de inmunodetección. Para eliminar estos anticuerpos contaminantes se realizó el siguiente protocolo:

El lisado *E. coli* provisto en el kit “picoBlue immunoscreening” (Stratagene) fue diluido 1:10 en PBST. Se sumergieron cuatro membranas de nitrocelulosa de tamaño 5 x 10 cm en esta dilución del lisado y se incubaron durante 30 min, a T^a ambiente, con agitación. A continuación, se extrajeron las membranas y se dejaron secar sobre papel de filtro, tras lo cual se lavaron 3 veces durante 5 min en 50 ml de PBS y se incubaron en la solución de bloqueo durante 30 min, a T^a ambiente y con agitación. Posteriormente, se lavaron de nuevo las membranas y se incubaron, de una en una, con el anticuerpo primario diluido 1:5 en PBST, durante 10 min, a 37°C. Finalmente, las membranas se descartaron y el anticuerpo se recogió y se conservó a -80°C hasta su utilización.

2.3.5.2. Inmunodetección

El cribado de la genoteca se realizó con los sueros de corderos infectados experimentalmente e inmuoabsorbidos con el lisado de *E. coli* (apartado 2.3.5.1.). En cada inmunocribado se emplearon 10 placas de LB agar y, para cada una, se incubaron 600 µl de bacterias (apartado 2.3.4.6.) con 5000 pfu del fago. Posteriormente, las placas se incubaron a 42°C, durante 4 horas, con el objetivo de obtener las placas de lisis sobre las cuales realizar el cribado. A continuación, se efectuó la transferencia de los clones a membranas de nitrocelulosa (Millipore) de 0,45 µm de poro, 132 mm de diámetro y preincubadas en IPTG 10 mM, a 37°C durante 4 horas. Las membranas se marcaron con una aguja para poder orientarlas correctamente. Transcurrida la incubación, las placas se guardaron a 4°C y las membranas se lavaron con PBST y se bloquearon con la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizó la inmunodetección de los clones sobre las membranas siguiendo el protocolo descrito anteriormente (apartado 2.2.6.).

2.3.6. Cribado al azar de la genoteca de expresión del adulto de *D. dendriticum*

Con el fin de encontrar EST (Expressed Sequence Tag) característicos del trematodo que puedan servir para mejorar el conocimiento a nivel molecular del parásito, así como para el diagnóstico de la dicrocoeliosis, se realizó un cribado al azar de la genoteca de *D. dendriticum*, como se describe a continuación.

2.3.6.1. Determinación del tamaño de los ADNc clonados

A partir de las placas obtenidas con la genoteca amplificada, se aislaron 230 fagos recombinantes (placas de lisis), con la ayuda de una punta de pipeta Pasteur, se disolvieron en 100 µl de agua destilada y se hirvieron a 100°C durante 10 min para disolver el agar. Finalmente, tras una breve centrifugación se recogieron 40 µl del sobrenadante. Para determinar los tamaños de los ADNc se realizó una PCR de las muestras obtenidas utilizando los cebadores específicos del fago lambda T3 (5'ATTAACCCTCACTAAAG 3'), y T7 (5'AATACGACTCACTATAG 3'). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 100 µl, a la que se añadieron 2 µl de cada primer (10 mM); 10 µl de tampón 10X; 2 µl de dNTP 10mM (Biotools); 1 µl de enzima

Materiales y Métodos: Genoteca de Expresión

Taq polimerasa DTT (1u/μl) (Biotools); 43 μl de agua estéril y 40 μl de los distintos fagos.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Applied Biosystems 2700, empleando las siguientes condiciones de reacción:

Ciclo 1: 1min/94°C
Ciclo 2: 35 repeticiones
Ciclo 3: 7min/72°C
Ciclo 4: continuo/4°C

30 sec/94°C
2 min/54°C
3 min/72°C

Los productos obtenidos por PCR se fraccionaron en geles de agarosa al 1%, se tiñeron con Bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta en el sistema Gel Doc XR (Bio-Rad).

2.3.6.2. Purificación de los ADNc a partir de geles de agarosa

Se llevaron a cabo dos métodos de purificación dependiendo de los ADNc amplificados de los fagos recombinantes. Cuando se amplificaban varias bandas por placa de lisis procesada, se cortaban directamente del gel, utilizando el kit comercial “QIAquick gel extraction” (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Sin embargo, cuando se obtenía una única banda de amplificación ésta se purificaba con el “kit QIAquick PCR purification” (QIAGEN) directamente del producto de PCR, según las instrucciones del fabricante. Todas estas muestras se congelaron a -20°C hasta su posterior utilización.

2.3.6.3. Secuenciación de los ADNc de los fagos purificados

Todas las muestras obtenidas en el apartado anterior se secuenciaron en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León y en el Servicio de Secuenciación del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, con el sistema 373 A, modelo 377 de Applied Biosystem.

2.3.6.4. Análisis de las secuencias

Las secuencias, obtenidas de cada clon, se editaron para cortar la secuencia perteneciente al vector, con el paquete bioinformático Lasergene: Ediseq, Seqman, Mapdraw, Primerselect (DNASTAR Inc. Madison. WI. USA). Las secuencias obtenidas tras la edición de las mismas se ensamblaron en clústers con el software SeqMan (DNASnastar Inc., Madison, WI, USA). Cada una de las secuencias se tradujo en los seis posibles marcos de lectura y se comparó con las bases de datos del “National Centre for Biotechnology Information (NCBI) y Swissprot/Uniprot (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.uniprot.org/>)”, utilizando el programa “Basic Local Alignment Search Tool X (BLASTX)”, el cual permite comparar secuencias nucleotídicas traducidas con secuencias aminoacídicas. Los valores de similitud del BLAST (e-value) iguales o menores de 1×10^{-5} se consideraron suficientes para una hipotética identificación de la proteína (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002). Se utilizó la herramienta InterProscan del European Bioinformatics Institute, que forma parte del European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) para predecir los dominios conservados de los ESTs traducidos. Aquellas secuencias EST (Expressed Sequence Tag) que mostraron una similitud significativa con secuencias conocidas, fueron clasificadas de acuerdo a su función molecular, proceso biológico y componente celular en base a la información obtenida en la base de datos Gene Ontology (GO).

2.3.7. Preparación de células competentes

Los plásmidos son vectores de manipulación más sencilla que los fagos utilizados en las genotecas de expresión. Para la propagación de dichos plásmidos es necesario infectar células específicas competentes, cuya preparación se resume a continuación.

A partir de las placas de LB agar/tetraciclina (12,5 µg/ml) de *E. coli* XL1-Blue MRF⁻, se tomó una colonia y se cultivó en 10 ml de LB, a 37°C y 200 rpm toda la noche. Al día siguiente se hizo una dilución 1/50 en 50 ml de medio LB líquido y se dejó crecer hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5-1,0. Después, las células se centrifugaron 15 minutos a 2000 rpm a 4°C, y el sedimento se resuspendió en 16 ml de solución RF1, incubándose posteriormente en hielo durante 15 min. Después de una nueva centrifugación durante 15 min a 1800 rpm y 4°C, se eliminó el sobrenadante, el cultivo se resuspendió en frío en 4 ml de solución RF2 y se incubó de nuevo en hielo durante

una hora. Finalmente, se hicieron alícuotas de 250 μ l, que se congelaron rápidamente en nieve carbónica y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.3.8. Clonación en el vector pGEM®-T Easy

Los productos de PCR más interesantes, obtenidos en el cribado al azar de la genoteca de expresión, se clonaron en el vector pGEM®-T Easy (Promega). Para ello, los fragmentos de ADN amplificados por PCR y purificados se ligaron con el vector en la proporción 1:3 (vector: inserto), en un volumen final de 10 μ l, empleando 1 μ l de T4 ligasa (1u/ μ l) (Promega) y 1 μ l de tampón 10X (Promega). La reacción de ligación se llevó a cabo a 16°C durante toda la noche. Tras lo cual, las células XL1-Blue competentes se transformaron con la mezcla de ligación, como se describe a continuación.

2.3.8.1. Transformación de células competentes con plásmidos

La mezcla de ligación anterior se añadió a 100 μ l de las células competentes y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. A continuación, se sometieron a choque térmico, se mantuvieron a 42°C durante 45 segundos y en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 900 μ l de medio LB precalentado a 37°C y se incubaron 1 hora a 37°C con agitación fuerte (200 rpm). Se sembraron 200 μ l de cada tubo en placas de agar LB con ampicilina (100 μ g/ml) y X-gal (40 μ l; 20 mg/ml) e IPTG (4 μ l; 1M) y se mantuvieron a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se realizó una PCR de colonias para visualizar los plásmidos que habían incorporado el inserto.

2.3.9. PCR de colonias

Para comprobar si las colonias eran recombinantes se realizó una PCR con los cebadores universales del vector D y SP6, y en paralelo se sembró una Master Placa, con el fin de realizar un cultivo a partir de la misma y aislar el ADN plasmídico. La PCR se realizó en un volumen final de 50 μ l. Para ello, se utilizaron 5 μ l de tampón de Taq polimerasa 10X, 1 μ l de dNTP (10 mM) (Biotools), 1 μ l de enzima Taq Polimerasa DTT (1 U/ μ l), 1 μ l de cada uno de los cebadores D y SP6 (10mM) y 41 μ l de agua estéril, en la que se había disuelto una colonia que sirvió como molde de la reacción.

Materiales y Métodos: Genoteca de Expresión

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador automático, empleando las siguientes condiciones de reacción:

Ciclo 1: 5min/94°C
Ciclo 2: 35 repeticiones
Ciclo 3: 7min/72°C
Ciclo 4: continuo/4°C

30 sec/94°C
30 sec/50°C
2 min/72°C

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Al día siguiente se seleccionaron las colonias recombinantes de la Master Placa y se realizó un cultivo en LB con ampicilina (100µg/ml), incubando a 37°C y 200 rpm toda la noche.

2.3.10. Extracción de ADN plasmídico de los fragmentos clonados

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el Kit comercial “QIAprep Spin Miniprep” (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los protocolos se basan en el método de lisis alcalina de las células bacterianas, seguido de adsorción del ADN a una membrana de sílice, en presencia de altas concentraciones de sal, lo que permite obtener ADN plasmídico de buena calidad. Finalmente, el ADN obtenido se eluyó en 50 µl de agua estéril y se conservó a -20°C hasta su utilización. El ADN extraído se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa, y se secuenció con los oligonucleótidos universales D/SP6.

2.4. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *D. dendriticum*

De los clones secuenciados en el apartado anterior se seleccionaron 3 candidatos para su expresión: mioglobina [*Dicrocoelium dendriticum*] (GI: 122064715); unknown [*Clonorchis sinensis*] (7KDa) (GI: 21489590); cystatin [*Fasciola gigantica*] (AFV53480). Las clonaciones se hicieron por duplicado en los vectores de expresión: pGEX-6P-2 (Amersham Pharmacia), que genera proteínas de fusión a Glutation-S-Transferasa (GST), y pRSET-A® (Invitrogen), que genera proteínas de fusión a una cola de 6 histidinas.

2.4.1. Análisis bioinformático de las secuencias

El marco de lectura (“Open Reading Frame” (ORF)) se predijo utilizando el programa ORF finder (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

El programa del servidor de proteómica ExPASy (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) Compute pI / Mw se utilizó para el cálculo de las masas moleculares relativas teóricas y de los puntos isoeléctricos.

La búsqueda de dominios conservados se realizó con la herramienta CD-Search (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>). Se efectuó una búsqueda de las proteasas en la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>).

La predicción de la estructura secundaria se realizó con el software PredictProtein, un servicio para el análisis de secuencias y predicción de estructuras, producido por el “Columbia University Bioinformatics Center” (<http://www.predictprotein.org/>). Se realizó un BLAST frente a la base de datos “Protein Data Bank (pdb)”, y se visualizó la estructura de las proteínas homólogas con la aplicación Cn3D 4.1 (NCBI).

El modelado tridimensional se realizó por homología con proteínas de estructura conocida con el programa “Swiss-Model” (Arnold *et al.*, 2006) (<http://swissmodel.expasy.org/>) y se visualizó con la aplicación “Pymol package” (DeLano, 2002).

La presencia de un posible péptido señal hidrofóbico en el extremo N-terminal se predijo con el software SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>).

Materiales y Métodos: Genoteca de Expresión

La presencia de dominios transmembrana se predijo con el programa TMPred de EMBnet (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). Además, varios miembros de la misma familia de las proteínas expresadas se obtuvieron de la base de datos GenBank, mediante búsquedas de homología utilizando el algoritmo BLASTP y base de datos no redundante (nr), así como la base de datos pdb, para la búsqueda de proteínas homólogas con estructura conocida.

Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa ClustalW 2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

2.4.2. Clonación en vectores de expresión

Para la expresión de los antígenos recombinantes en sistemas procariontes, se realizó la subclonación de los 3 ADNc seleccionados, por duplicado en los vectores de expresión pGEX-6P-2 y pRSET-A. Dichos ADNc se amplificaron por PCR con cebadores específicos (Tabla 5), en los que se incluyeron los sitios de corte de las enzimas de restricción.

Tabla 5. Oligonucleótidos específicos empleados en la amplificación por PCR de los fragmentos seleccionados para la expresión de proteínas recombinantes.

Nombre	Secuencia
5-BamH1_cysta	GAGAGAGAGGATCCCTTCCATGCTTTACTG
3-EcoR1_cysta	TCTCTCTCGAATTCTCAAATAGGCCTACATTG
3-Sma1_cysta-pGEX	TCTCTCTCCCGGGTCAAATAGGCCTACAT
5-BamH1_cysta-pGEX	GAGAGAGAGGATCCCTTCCATGCTTTACTGGAA
3-EcoR1_myo	TCTCTCTCGAATTCTCAGAGGTGAGCAGC
5-BamH1_myo	GAGAGAGAGGATCCATGGCACC GTTG
3-Sma1_myo-pGEX	TCTCTCTCCCGGGTCAGAGGTGAGC
5-BamH1_myo-pGEX	GAGAGAGAGGATCCATGGCACC GTTGAC
5-BamH1_7KDa	GAGAGAGAGGATCCGCACCAAGTGAAGAAA
3-EcoR1_7Kda	TCTCTCTCGAATTCTACTTGGCCACATACTTCT
3-Sma1_7Kda-pGEX	TCTCTCTCCCGGGCTACTTGGCCAC

Tras la PCR, los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1% y se purificó el ADN con el kit comercial “QIAquick PCR purification” (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante.

2.4.2.1. Digestión con enzimas de restricción

Tanto los ADNc amplificados como los vectores de expresión se digirieron con enzimas de restricción adecuadas. Para ello, se utilizaron endonucleasas de restricción compatibles con la zona de clonaje múltiple de los diferentes vectores empleados. Las enzimas y tampones para llevar a cabo las diferentes digestiones fueron suministrados por la casa comercial Roche®. La cantidad de ADN utilizada para cada digestión fue de 0,2-1 µg y la cantidad de enzima empleada fue de 10 unidades. Las digestiones fueron incubadas de 2 a 3 horas, a 37°C, a excepción de las enzimas que requieren otra temperatura para su actividad, y fueron posteriormente inactivadas durante 15 min, a 65°C. Las muestras de ADN, una vez digeridas, se extrajeron mediante fenolización con dos pases sucesivos con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) y un pase final con cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1). En cada pase se añadió un volumen del reactivo igual al de la muestra, facilitando el mezclado de las dos fases con un vortex, y se centrifugó a 15.000 rpm, durante 5 min, recuperándose posteriormente la fase acuosa. Por último, se precipitó el ADN mediante incubación con etanol al 100% y acetato de sodio 3M durante toda la noche a -20°C. A continuación las muestras fueron centrifugadas durante 60 min, a 13000 rpm, tras lo cual se lavaron los pellet con etanol al 70% y se resuspendieron en agua destilada.

2.4.2.2. Desfosforilación de los vectores

Para prevenir la auto-ligación de los fragmentos del mismo vector, los extremos 5´ de los vectores fueron desfosforilados mediante un tratamiento con la enzima fosfatasa alcalina “Rapid Alkaline Phosphatase” (Roche) durante 10 min, a 37°C, seguido de un período de inactivación de 2 min, a 75°C. Para desarrollar la reacción se añadieron:

10 µl del vector digerido

2 µl de tampón de fosfatasa alcalina (10X)

1µl de enzima fosfatasa alcalina (1U/µl)

7 µl de agua de MilliQ

Finalmente todos los productos de las digestiones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

2.4.2.3. Ligación y transformación

La cantidad de ADN necesaria para la ligación se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ngr inserto} = \frac{\text{ngr vector} \times \text{tamaño del inserto (pb)} \times 3}{\text{Tamaño del vector (pb)}}$$

La ligación se realizó durante toda la noche a 16°C, añadiendo al tubo de reacción 1 µl de la enzima T4 ligasa (1u/ µl) (Promega) y 1 µl de tampón 10X (Promega). A continuación, las células *E. coli* XL1-Blue MRF' se transformaron (siguiendo lo descrito en el apartado 2.3.8.1.) con las mezclas de ligación. Al día siguiente se aislaron las colonias recombinantes que habían crecido en las placas de ampicilina y se realizó una PCR de colonias, mediante el método descrito en el apartado 2.3.9. Finalmente, se obtuvieron los ADNs plasmídicos (como se indica en el apartado 2.3.10.) y se secuenciaron para confirmar que el clonaje se había realizado en el correcto marco de lectura. Todas las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización.

2.4.3. Inducción y expresión de las proteínas de fusión

Los ADNs plasmídicos obtenidos en el apartado anterior se utilizaron para transformar las células competentes necesarias para la expresión de los antígenos recombinantes siguiendo el protocolo del apartado 2.3.8.1., con la excepción de que se utilizaron 50 µl de células competentes y 1µl de plásmido. Se emplearon las células *E. coli* BL21 para la expresión en el vector pGEX-6P-2 y las células *E.coli* BL-21(DE3) pLysS en el caso del vector pRSET-A. Las placas de cultivo LB-agar con el antibiótico apropiado se incubaron toda la noche a 37°C, en ambos casos. Al día siguiente se tomaron algunas colonias, se cultivaron en medio LB líquido con el antibiótico correspondiente y se dejaron crecer en agitación fuerte a 37°C, 200 rpm, hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,6-1,0$.

La expresión de las proteínas recombinantes se indujo probando diferentes concentraciones de IPTG, de temperatura y de tiempo de inducción en los cultivos celulares. Como control en estas pruebas se tomaron alícuotas de los cultivos no inducidos. Para determinar las mejores condiciones de expresión se probaron las siguientes: 1/ Agente inductor IPTG a 0,5 mM y 1 mM; 2/ Temperatura y tiempos de inducción, con incubaciones durante 4 horas a 37°C o, a 16°C durante toda la noche. En todos los casos los cultivos se mantuvieron en agitación fuerte (200 rpm). Nuevamente, y como control de la inducción, se tomaron alícuotas de los cultivos inducidos, mientras que el resto de las muestras se centrifugaron a 3000 rpm, durante 10 min, a 4°C. Los sedimentos se guardaron a -70°C hasta su uso. Finalmente, los alícuotas controles de los cultivos, antes y después de la inducción, se centrifugaron a 13000 rpm, durante 1 minuto. Los sedimentos celulares de cultivo bacteriano se resuspendieron en 300 µl de tampón de lisis "*B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent*" (Pierce), se centrifugaron 5 minutos, a 14000 rpm, a temperatura ambiente y se guardó el sobrenadante, obteniéndose así la fase soluble. La fase insoluble se resuspendió nuevamente en 300 µl del tampón de lisis anteriormente mencionado. Todos los sedimentos se resuspendieron en tampón de carga, se desnaturalizaron a 100°C durante 5 min y se fraccionaron en geles de poliacrilamida para comprobar la expresión y la solubilidad de las proteínas recombinantes expresadas.

2.4.4. Purificación de las proteínas de fusión

En el vector pRSET-A tan sólo fue posible la expresión del gen que codificaba una cistatina, y ésta resultó ser insoluble. Por ello, tan sólo se purificaron aquellas proteínas fusionadas a GST, expresadas en el vector pGEX-6P-2. Dichas proteínas se purificaron bajo condiciones nativas mediante cromatografía de afinidad, usando columnas de glutation sepharosa 4B (GE Healthcare) realizadas manualmente por nosotros.

Para obtener una cantidad suficiente de las proteínas recombinantes se realizó un cultivo a gran escala de las células transformadas manteniéndolas a 37°C, en agitación fuerte, durante toda la noche. Posteriormente se indujo la expresión de las proteínas con IPTG 1mM, durante 4 h, a 37°C, tras lo cual se centrifugó el cultivo a 10000 rpm, durante 30 min y se desechó el sobrenadante que contenía el detritus bacteriano. Los pellets obtenidos se incubaron en tampón de lisis "*B-PER Bacterial*

Materiales y Métodos: Genoteca de Expresión

Protein Extraction Reagent[®] (Pierce) durante 1h, a 4°C y en agitación, a continuación se sonicaron y finalmente se centrifugaron a 10000 rpm, durante 30 min, a 4°C. El sobrenadante obtenido se añadió sobre la sepharosa, previamente lavada con PBS y equilibrada con el tampón de lisis. Tras lo cual se realizó una incubación durante 30 min, a 4°C con rotación constante y, posteriormente, se centrifugó durante 15 min, a 2500 rpm. La sepharosa con la proteína unida se lavó 4 veces con PBS y finalmente se empaquetaron las columnas con la matriz. Una vez preparadas, se añadieron sobre la sepharosa 50U de enzima “Prescission Protease Cleavage” (GE Healthcare) diluida en 4 ml de tampón de escisión, para separar la proteína recombinante de la GST, y se incubó durante 8 h, a 4°C. Después de esta incubación se añadieron otros 4 ml del tampón y se recogieron los eluidos, que fueron dializados frente a PBS durante toda la noche.

Se recogieron alícuotas en diferentes momentos del proceso de purificación para ser utilizadas como controles. Estos últimos junto con los eluidos se visualizaron en geles de poliacrilamida.

2.5. EVALUACIÓN DE LOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DICROCOELIOSIS

Los antígenos recombinantes obtenidos se probaron con dos técnicas analíticas para comprobar su capacidad diagnóstica frente a la dicrocoeliosis. En primer lugar se realizó un Western Blot, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.6., en el que se ensayaron distintas concentraciones de sueros y del anticuerpo conjugado. Además, las proteínas recombinantes se enfrentaron a sueros obtenidos de animales infectados con distintos parásitos con el fin de comprobar su especificidad.

La otra técnica empleada fue la técnica inmunoenzimática ELISA indirecta, aunque debido a la falta de antigenicidad de la cistatina y de la mioglobina sólo la proteína de 8-kDa fue probada con este método.

2.5.1. Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos (ELISA)

El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Sigma). En primer lugar, las placas se tapizaron con 2,5-10 µg/pocillo de antígeno, diluido en 100 µl de tampón carbonato/bicarbonato (pH 9,6), se sellaron y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Tras descartar el sobrenadante, se bloquearon con 100 µl de tampón de bloqueo, durante 1h, a 37°C. Después del bloqueo se incubaron con 100 µl de los sueros diluidos (1/100) en PBS-BSA 1%, durante 1 h, a 37°C. Se realizaron 3 lavados, de 5 min a cada uno, con solución de lavado, tras lo cual se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario anti-IgG ovino marcada con peroxidasa (Sigma), a una dilución 1/1000, y se incubó durante 1h a 37°C. Tras la incubación, se lavaron de nuevo tres veces con PBST, y se incubaron las placas en tampón citrato-DMSO, con peroxidasa y TMB como sustrato, hasta que se produjo una reacción de color que se paró mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2M. La absorbancia se midió inmediatamente después a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas (Titertek Multiskan). Se añadieron dos controles positivos y dos negativos en cada placa, así como un blanco de reacción. Todas las muestras se analizaron por duplicado y los resultados se expresaron como la media de DO obtenida.

2.5.1.1. Determinación del punto de corte (Cut off)

Materiales y Métodos: Evaluación antígenos recombinantes

Para verificar el valor diagnóstico de la proteína recombinante y calcular el punto de corte de la técnica, se seleccionaron al azar 20 muestras positivas procedentes de corderos infectados experimentalmente con *D. dendriticum* y 32 muestras de corderos sin infectar. Se probaron distintas concentraciones de antígenos y diferentes diluciones de los sueros y del conjugado, con el fin de obtener la mayor relación de la densidad óptica entre el control positivo y negativo. Una vez determinadas las condiciones óptimas de la técnica, se calculó el valor umbral o punto de corte con la siguiente fórmula:

Valor umbral= Media D.O. (testigos)+2 SD (desviación estándar)

Las diferencias entre grupos se calcularon utilizando el test T de Student. Para comprobar si había reacciones cruzadas, se realizó un ensayo preliminar con muestras de corderos infectadas de forma experimental con otros parásitos relacionados con *D. dendriticum*.

IV. RESULTADOS

1. DETECCIÓN DE *D. dendriticum* MEDIANTE PCR EN LOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS

A continuación presentamos los resultados obtenidos en la detección e identificación de las fases larvianas de *D. dendriticum* en los moluscos y hormigas, primeros y segundos hospedadores intermediarios, mediante la técnica de PCR desarrollada, validada y puesta a punto por nosotros, utilizando tanto un fragmento de ADN mitocondrial como del gen ITS-2.

1.1. DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE ADN MITOCONDRIAL

1.1.1. Análisis de la secuencia del fragmento de ADN mitocondrial

De las diez parejas de oligonucleótidos generales diseñados a partir de las secuencias mitocondriales (ver Tabla 4), fue con el par formado por la pareja Cox1/ARNLr, con el que se obtuvieron los mejores resultados. Dicho par amplificó un fragmento de 1034 pb de las muestras de adultos de *D. dendriticum* y se envió a la base de datos GenBank con el nº de acceso JF690758. Esta región del ADN mitocondrial flanquea parcialmente las regiones Cox1 y ARNLr, incluye en el extremo 5' la secuencia parcial del gen Cox1 (285 pb), la secuencia completa del tRNA-Thr (Treonina) (72 pb) y parte de la secuencia ARNLr en el extremo 3' (667 pb). La secuencia parcial del gen Cox1 termina en el codón TAG y codifica para una proteína de 93 aminoácidos (aa), como se muestra en la Figura 15.

Resultados: Técnica de PCR

3	TGT	TTT	TTK	CCK	ATG	CAT	TAT	TTG	GGT	GTG	TGA	TGY	GTT	CCT	CGT	47
0	C	F	X	P	M	H	Y	L	G	V	W	X	V	P	R	14
48	CGT	GCA	TCT	AGT	TTT	GAT	AGT	AGT	TTT	TTT	TGG	TTG	AAC	GGG	TTT	92
15	R	A	S	S	F	D	S	S	F	F	W	L	N	G	F	29
93	TCG	TCT	TTA	GGT	GGG	GTT	CTA	TCY	TTG	GTT	AGT	GCC	TTC	TTY	TTT	137
30	S	S	L	G	G	V	L	S	L	V	S	A	F	F	F	44
138	TTT	TTT	TTG	GTT	TGG	GAG	TCA	ATG	GTG	ATA	GGT	AAT	CGT	GTA	ATA	182
45	F	F	L	V	W	E	S	M	V	M	G	N	R	V	M	59
183	GGG	TGT	TGG	GGA	TCT	GCT	AGA	GTT	CCA	TTT	AAT	ATG	TTT	ACT	GTT	227
60	G	C	W	G	S	A	S	V	P	F	N	M	F	T	V	74
228	TCT	ATT	GCT	CAT	CAT	GTT	CAT	TGG	TTT	GAG	CGG	CCT	GTT	CGT	TGG	272
75	S	I	A	H	H	V	H	W	F	E	R	P	V	R	W	89
273	TTG	TCG	TGG	TAG	TAC	TTG	GTG	TTG	GGG	AGT	GTA	GTT	TAT	TTG	TGA	317
90	L	S	W	*												
318	GAA	TGG	TGC	TTT	TGT	AAA	GCT	TTG	GTA	TTG	TTT	GTG	GTT	GCT	TCC	362
363	TGG	TTT	TGA	GAC	TAT	GTT	AGT	ATA	TGT	TTT	GTT	GGG	TGT	AGT	ACC	407
408	TTT	TGC	ATC	ATG	ATT	STC	GGG	TAG	TGT	CYA	TGG	AGT	GTG	GTG	TCC	452
453	CGA	AAG	GTA	GTG	ATT	TAT	TTT	GCC	CTT	GCT	TGG	AGC	TGA	GGT	GTG	497
498	GTT	GAG	TTG	ATC	TTT	TGA	GAG	GGT	GAA	ATA	GGG	GTG	ATA	TGC	TAT	542
543	TTY	GTA	CTA	TTT	TAT	AAC	TGG	TTG	ACG	CTG	GAT	TTT	TTA	GAG	TTA	587
588	CGC	TTT	TTG	CTT	TGA	GGT	GAT	TGG	TGA	TTT	CAG	AGA	CTT	TGT	TAT	632
633	TAG	GGT	TTG	TTA	GGG	GGT	TAG	AGG	TAC	CCT	GGT	TCA	AAT	TTT	GTG	677
678	TTA	TAA	CAT	TTA	GAG	GAT	TGT	TGT	TGT	CTT	GGT	TTA	GTT	TGG	TGT	722
723	CTA	TGT	AAC	TGT	TTA	GTG	AGT	TAT	CGG	GGG	AAT	AAG	TAG	TTT	AAG	767
768	AAT	TGC	TGT	GTT	TTT	GTC	TCG	ATT	TTT	GTT	CGT	CTG	TTT	ATT	AAA	812
813	AAC	ATT	TCT	ATC	ATT	AAG	TGT	TGA	TGG	TAG	TAC	CTG	CCC	AAT	GGC	857
858	TTA	GGG	TTT	AAT	GGC	CGC	AGG	AAT	AAA	CTG	TGT	TAA	NGG	TAG	CGT	902
903	AAT	TAG	TTG	CCT	TTT	AAT	TGA	AGG	ATT	GTT	TGA	ATG	GTT	TGA	CGA	947
948	GAT	GAA	ATT	GAA	ATG	TGC	AGT	GTG	YGG	TGA	ATT	TAG	AGT	GTC	TGT	992
993	GCA	GAT	CCA	GGT	AAT	GAT	TAG	TAA	GAC	GGA	AAG	ACC	CYR	RGA		1034

Fig. 15. Fragmento mitocondrial de ADN de *Dicrocoelium dendriticum* que incluye: la secuencia parcial del gen Cox1 (285 pb) en el extremo 5', la secuencia completa del tRNA-Thr (Threonine) (72 pb) y parte de la secuencia ARNLr en el extremo 3' (667 pb).

1.1.2. Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR basada en ADN mitocondrial

Con los cebadores específicos diseñados (Dd_HI_F/R), se amplificó un fragmento del ADN mitocondrial de 169 pb de ADN extraído de adultos de *D. dendriticum*, de hormigas de las especies *F. rufibarbis* y *F. pratensis* que contenían metacercarias de *D. dendriticum* en el abdomen, así como en las muestras de la cabeza de las mismas especies de hormigas recolectadas en tetania (Fig. 16), que se supone que estarían infectadas con una sola larva cerebral (excepcionalmente 2 ó 3) de *D. dendriticum*. No se observó amplificación en las muestras de hormigas no infectadas.

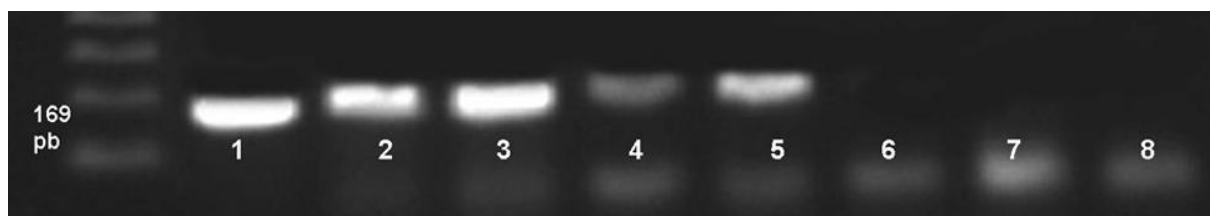


Fig. 16. Productos de amplificación de PCR de *Dicrocoelium dendriticum* en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio, utilizando los cebadores mtADN específicos. (1) Adulto de *D. dendriticum*. (2) Cuerpo completo de *Formica rufibarbis* conteniendo 52 metacercarias en el abdomen de *D. dendriticum*. (3) Abdomen de *F. rufibarbis* conteniendo 45 metacercarias. (4–5) cabezas de *F. rufibarbis* y *Formica pratensis*, respectivamente, conteniendo la “larva cerebral” de *D. dendriticum*. (6–7) Abdomen de *Formica polyctena* y *Formica cunicularia* no infectadas, respectivamente. (8) Control.

Por otra parte, la técnica diseñada también mostró una gran sensibilidad en la detección de metacercarias de *D. dendriticum* aisladas del abdomen de *F. rufibarbis*, permitiendo detectar hasta una única metacercaria (Fig. 17).

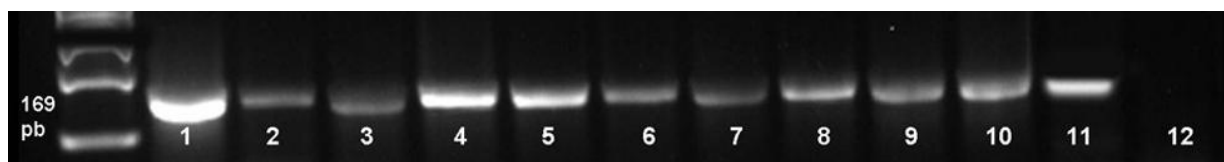


Fig. 17. Productos de amplificación de PCR de *Dicrocoelium dendriticum* en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio, utilizando los cebadores mtADN específicos. (1) Adulto de *D. dendriticum*. (2–11) Muestras que contenían 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 metacercarias, respectivamente, de *D. dendriticum* extraídas del abdomen de un ejemplar de *Formica rufibarbis*. (12) Control.

Asimismo, la técnica permitió detectar la infección en moluscos experimentalmente infectados con *D. dendriticum* y sacrificados a los 62 días p.i., en los que ya se observaban esporocistos hijos en el hepatopáncreas, al hacer la disección al estereomicroscopio. Además, los cebadores diseñados no amplificaron el ADN de adultos de *D. chinensis*, ni de ejemplares de moluscos u hormigas no infectados. Tampoco amplificaron ADN de ejemplares de moluscos dulceacuícolas de la especie *G. truncatula* infectados con fases larvianas de *F. hepatica*, *C. daubneyi*, Plagiorchiidae spp. y Notocotylidae spp. Sin embargo, si lo hicieron cuando se utilizó el ADN de metacercarias de Brachylaimidae. Por ello, dichos oligonucleótidos no son específicos para la detección de *D. dendriticum* en los moluscos, puesto que también amplifican ADN de las fases larvianas de Brachylaimidae, trematodos que comparten las mismas especies de moluscos hospedadores intermediarios.

1.2. DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE DEL GEN ITS-2

Para evitar las reacciones cruzadas con Brachylaimidae en moluscos, se diseñaron unos oligos específicos obtenidos a partir del gen ITS-2, que amplificaron un fragmento de 93 pb. Tras el análisis de dicho fragmento se obtuvo una homología del 100% con una región del gen ITS-2 de *D. dendriticum*, presente en las bases de datos (GenBank Accession no. DQ379986).

Utilizando la técnica de PCR diseñada, se detectó una banda de 93 pb en el ADN extraído de adultos de *D. dendriticum*, moluscos infectados de forma natural y experimental con esporocistos de *D. dendriticum*, hormigas infectadas en el abdomen y cabezas de hormigas recogidas en fase de tetania (Fig. 18). La técnica demostró ser específica al no amplificar ADN de *D. chinensis*, de metacercarias de Brachylaimidae, ni tampoco de hormigas y moluscos no infectados (Fig. 18). Asimismo no se encontró ningún producto de amplificación cuando se probó la técnica con adultos de *F. hepatica* y *C. daubneyi*, o con especímenes de *G. truncatula* infectados con fases larvianas de *F. hepatica*, *C. daubneyi*, Plagiorchiidae o Notocotylidae, respectivamente, de manera que podemos considerar los cebadores basados en la secuencia ITS-2 diseñados por nosotros como específicos de *D. dendriticum*.

Resultados: Técnica de PCR

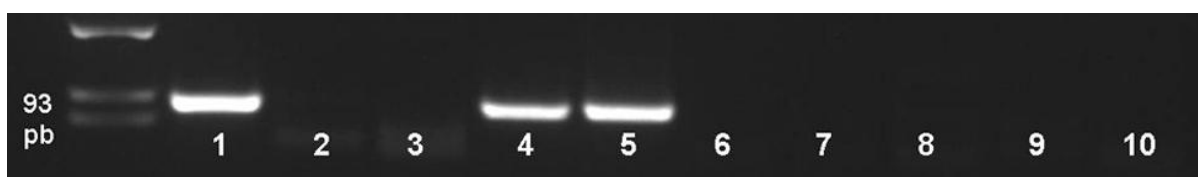


Fig. 18. Productos de amplificación de PCR de *Dicrocoelium dendriticum* en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio, utilizando los cebadores ITS-2 específicos. (1) Adulto de *D. dendriticum*. (2–3) Adultos de *D. chinensis*. (4) Espécimen de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* experimentalmente infectado y sacrificado el día 62 p.i., con esporocistos hijos de *D. dendriticum* visibles al estereomicroscopio. (5) *Helicella itala* infectada de forma natural con esporocistos hijos de *D. dendriticum* visibles al estereomicroscopio. (6–7) Ejemplares no infectados de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* y *H. itala*, respectivamente. (8–9) Metacercarias de Brachylaaimidae extraídas del riñón de moluscos de las especies *H. itala* y *Cernuella (M.) vestita*, respectivamente. (10) Control.

Mediante la técnica de PCR diseñada se pudo confirmar (Fig. 19) la infección natural por *D. dendriticum* en todos los ejemplares examinados de las 10 especies de moluscos siguientes: *C. nemoralis*; *C. (C.) virgata*; *C. (M.) vestita*; *C. (X.) cespitum arigonis*; *H. corderoi*; *H. itala*; *H. jamuzensis*; *H. madritensis*; *H. ordunensis*; y *M. (M.) cartusiana*. En el estudio previo realizado antes de la extracción del ADN se había comprobado que todos los ejemplares de dichos moluscos contenían en el hepatopáncreas esporocistos hijos (en distinto grado de desarrollo, con masas germinales o con cercarias poco o muy desarrolladas) visibles al estereomicroscopio y compatibles con *D. dendriticum*, de acuerdo con los estudios morfoanatómicos realizados al microscopio.

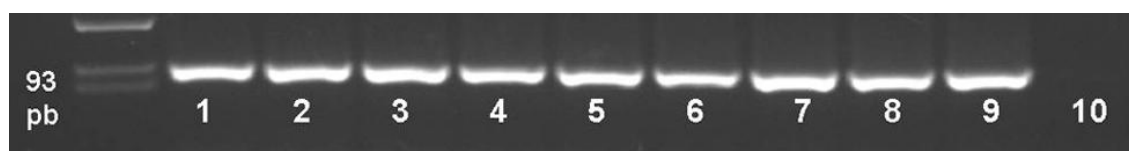


Fig. 19. Productos de amplificación de PCR de *Dicrocoelium dendriticum* en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio, utilizando los cebadores ITS-2 específicos. (1) Adulto de *D. dendriticum*. (2–9) Hepatopáncreas de las siguientes especies de moluscos infectados de forma natural con esporocistos hijos de *D. dendriticum*, visibles al estereomicroscopio: *Cepaea nemoralis*, *Cernuella (C.) virgata*, *Cernuella (M.) vestita*, *Helicella corderoi*, *Helicella jamuzensis*, *Helicella madritensis*, *Helicella ordunensis* y *Monacha (M.) cartusiana*, respectivamente. (10) Control.

Por otra parte, la técnica de PCR diseñada para la amplificación del gen ITS-2 mostró una gran sensibilidad en la detección precoz de las fases larvarias de *D. dendriticum* en los moluscos de las especies *C. (X.) cespitum arigonis* y *C. (C.) virgata* infectados

Resultados: Técnica de PCR

experimentalmente, puesto que fue posible detectar la infección desde el primer día p.i. (Fig. 20) (o quizá el segundo, ya que los moluscos permanecieron 2 días en contacto con la dosis infectante de huevos, depositada sobre el papel de filtro para su ingestión). Por tanto, esta técnica permite detectar el parásito posiblemente desde que se libera el miracidio en el intestino, o una vez que lo abandona para dividirse y formar el esporocisto primario que se localiza entre los lóbulos hepatopancreáticos, y que no es visible al estereomicroscopio. Sin embargo, mediante las técnicas microscópicas convencionales, no fue posible detectar la infección por *D. dendriticum* hasta los días 55 p.i. en *Cerneuella (X.) cespitum arigonis*, y hasta los 62 p.i. en *C. (C.) virgata*, fechas en las que se en el hepatopáncreas esporocistos hijos que contenían masas germinales escasamente desarrolladas.

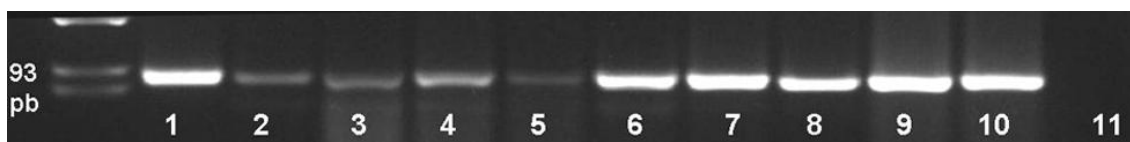


Fig. 20. Productos de amplificación de PCR de *Dicrocoelium dendriticum* en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio, utilizando los cebadores ITS-2 específicos. (1) Adulto de *D. dendriticum*. (2–10) Moluscos de *Cerneuella (X.) cespitum arigonis*, experimentalmente infectados con *D. dendriticum* y sacrificados los días 1, 3, 6, 10, 22, 27, 34, 41 y 50 p.i., respectivamente, cuando el parásito todavía no se detectaba al estereomicroscopio (11) Control.

Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del fragmento ITS-2 también demostraron una elevada sensibilidad en la detección de fases larvianas de *D. dendriticum* en hormigas. Así mediante la técnica de PCR desarrollada fue posible detectar hasta una única metacercaria del parásito extraída del abdomen de una hormiga (*F. rufibarbis*) infectada. Además se pudo detectar larva (o larvas) cerebral en la cabeza de hormigas de las especies *F. rufibarbis* y *F. pratensis* recogidas en fase de tetania (Fig. 21).

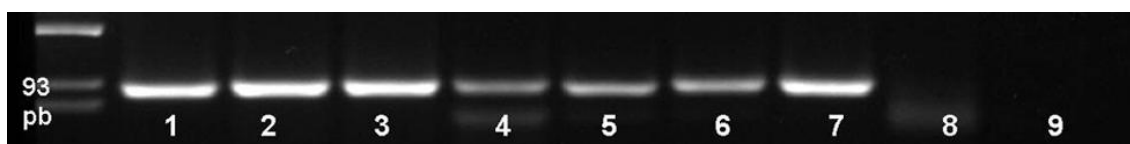


Fig. 21. Productos de amplificación de PCR de *Dicrocoelium dendriticum* en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio, utilizando los cebadores ITS-2 específicos. (1) Adulto de *D. dendriticum*. (2–3) Cuerpos completos de dos hormigas *Formica rufibarbis* recogidas en fase de tetania, que contenían en su abdomen 52 y 45 metacercarias de *D. dendriticum*, respectivamente. (4–5) Cabezas de *F. rufibarbis* y *Formica pratensis*, respectivamente, infectadas con la "larva cerebral" de *D. dendriticum*. (6–7) 1 y 2 metacercarias de *D. dendriticum*, respectivamente, extraídas del abdomen de *F. rufibarbis*. (8) Abdomen de *F. rufibarbis* no infectada. (9) Control.

2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS ANTÍGENOS DE TG Y ES DE *D. dendriticum*

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en la consecución del segundo objetivo general que nos planteamos en este trabajo de investigación, es decir, la identificación, aislamiento y caracterización de las proteínas antigénicas y mayoritarias, mediante electroforesis 2D, de los extractos de TG y ES de adultos de *D. dendriticum*.

2.1. EXTRACCIÓN DE ANTÍGENOS

La obtención de antígenos de *D. dendriticum*, tanto de TG como ES, presentó diversas dificultades. Por lo que se refiere al AgES la principal dificultad fue el escaso material antigénico que excretan los vermes adultos de *D. dendriticum* durante el periodo en que se cultivan en el laboratorio, así como la insuficiente cantidad de proteína contenida en dicho antígeno. En cuanto a la fracción de TG se obtuvo una mejor resolución y mayor número de spots cuando se incubaron los vermes adultos durante 30 min en Tritón X-100, de manera que éste fue el método utilizado de forma rutinaria en la obtención del antígeno TG. La concentración de proteína del extracto TG fue de 5-10 µg/µl, mientras que la del antígeno ES fue de 1.5 µg/µl.

2.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Con el fin de mejorar la resolución de las proteínas y eliminar pequeñas moléculas contaminantes de los extractos antigénicos, se probaron dos tratamientos de las muestras antes de su análisis: 1/ Procesado con el kit comercial "ReadyPrep™ 2D clean up" y 2/ Precipitación con TCA-Acetona (Fig. 22). En dicha Figura se observa que el primer método proporciona una mejor resolución de los spots que el segundo. Por este motivo, se optó por tratar los extractos antigénicos de forma rutinaria con el kit "ReadyPrep™ 2D clean up", antes de someterlos a la electroforesis 2D.

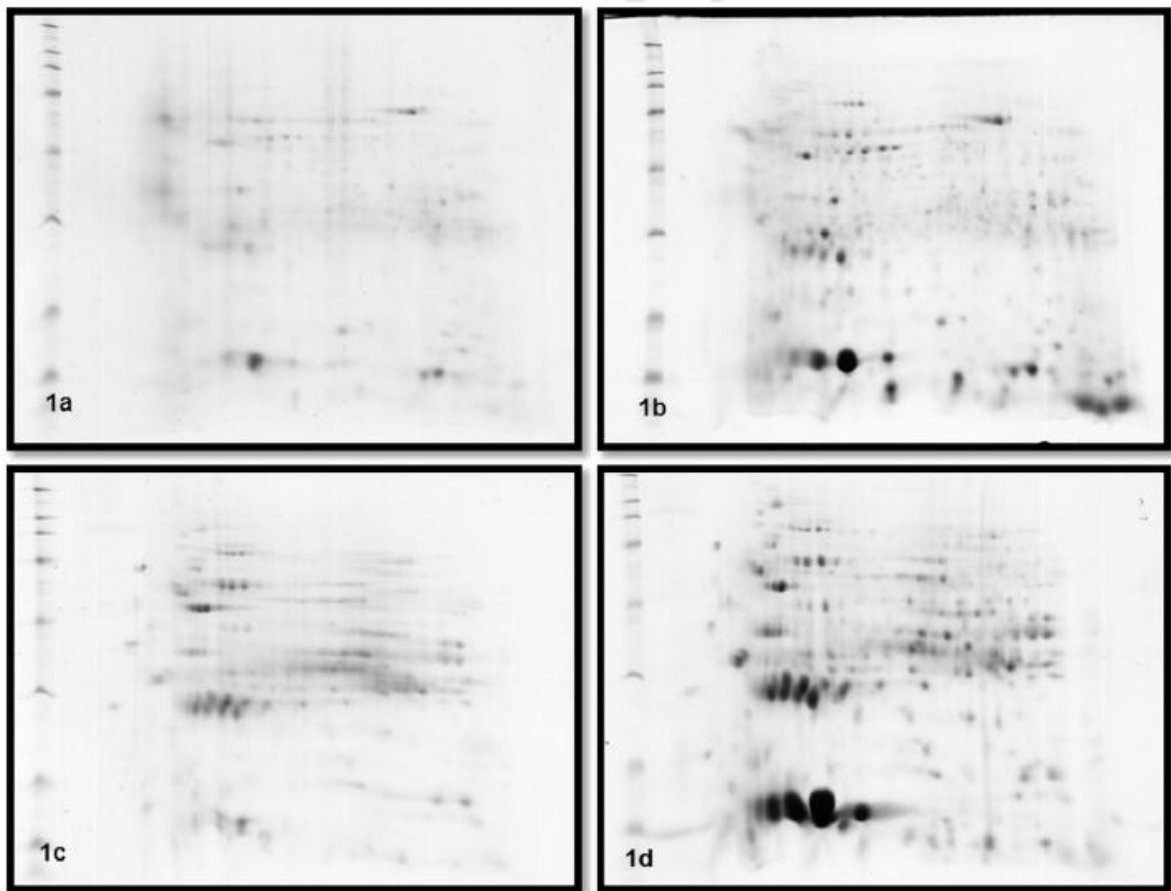


Fig. 22. Tratamiento y precipitación de los extractos TG y ES de adultos de *D. dendriticum*, previo al análisis 2D. 1a, 1b: Extracto ES tratado con TCA-Acetona y el kit 2D ReadyPrep™, respectivamente. 1c, 1d: Extracto TG tratado con TCA-Acetona y el kit 2D ReadyPrep™, respectivamente.

2.3. PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Una de las consideraciones a tener en cuenta en cualquier estudio de proteómica es afianzar la reproducibilidad de los resultados. Por este motivo, se compararon y analizaron los resultados obtenidos al teñir los geles con distintos colorantes (plata, sypro y coomassie coloidal), así como con la utilización de diferentes rangos de pH para el isoelectroenfoque de las proteínas. El menor ruido de fondo, los resultados más reproducibles y la mayor detección de manchas proteicas se obtuvo con la tinción coomassie coloidal (Fig. 23), por lo que ésta fue la tinción de elección para ser utilizada de forma rutinaria en los análisis de proteómica. Además, el rango de pH con el que se obtuvo una mejor separación de spots

fue el de pH 3-10 no lineal, como se aprecia en la Figura 23 y, por tanto, fue el usualmente empleado.

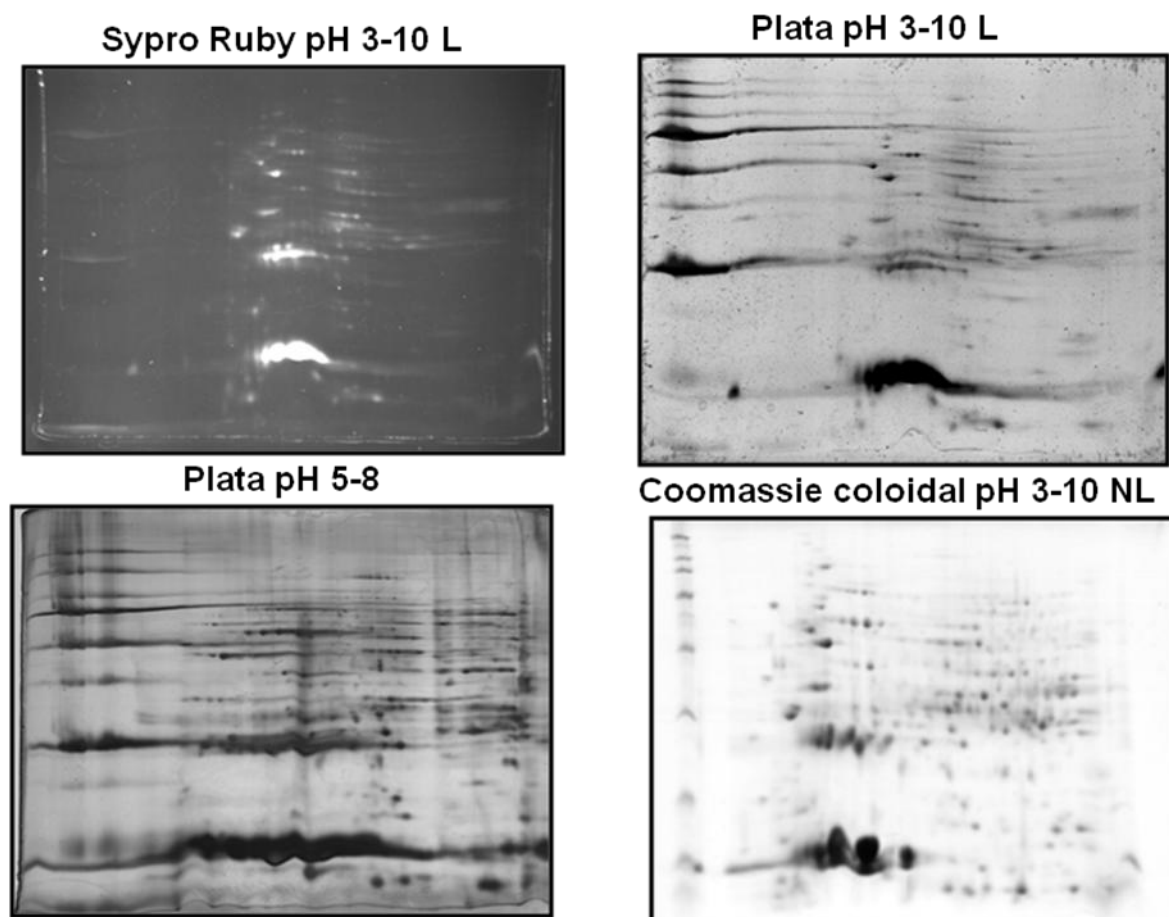


Fig. 23. Puesta a punto de las condiciones de Electroforesis 2D de los extractos TG de adultos de *D. dendriticum*.

Los patrones proteicos encontrados en los distintos geles fueron muy similares, lo que permitió confirmar la alta reproducibilidad de nuestro protocolo en la separación y detección de proteínas de los extractos ES y TG de *D. dendriticum*.

Bajo estas condiciones, se consiguió una resolución proteica suficientemente buena como para proporcionar una imagen fiable de los spots. En el extracto TG se detectaron 332 spots, la mayoría de ellos localizados en un pH entre 4 y 9, con pesos moleculares oscilando de 9 a 170 kDa. En cuanto al extracto ES, en el que se pudieron detectar 284 spots, mostró una gran similitud con el TG, tanto en el número de spots, como en su distribución en el rango de puntos isoeléctricos y de pesos moleculares.

2.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL ANTÍGENO DE TEGUMENTO

Para la identificación de los spots mayoritarios se seleccionaron los 15 spots que se teñían más intensamente en los geles teñidos con Coomassie coloidal. Dichos spots se escindieron y analizaron mediante espectrometría de masas (MS-MS/MS) y cromatografía líquida acoplada a un sistema de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). En la Figura 24a se muestra el perfil proteico del antígeno TG y las proteínas identificadas se señalan con un número. Para obtener una mayor separación de las proteínas de peso molecular más elevado, se procedió a correr geles adicionales sometidos a un tiempo de carrera más prolongado (Fig 24b). A partir de estos últimos geles se seleccionaron un total de 50 spots mayoritarios del antígeno TG que se escindieron manualmente del gel y se analizaron mediante MS-MS/MS y LC-MS/MS.

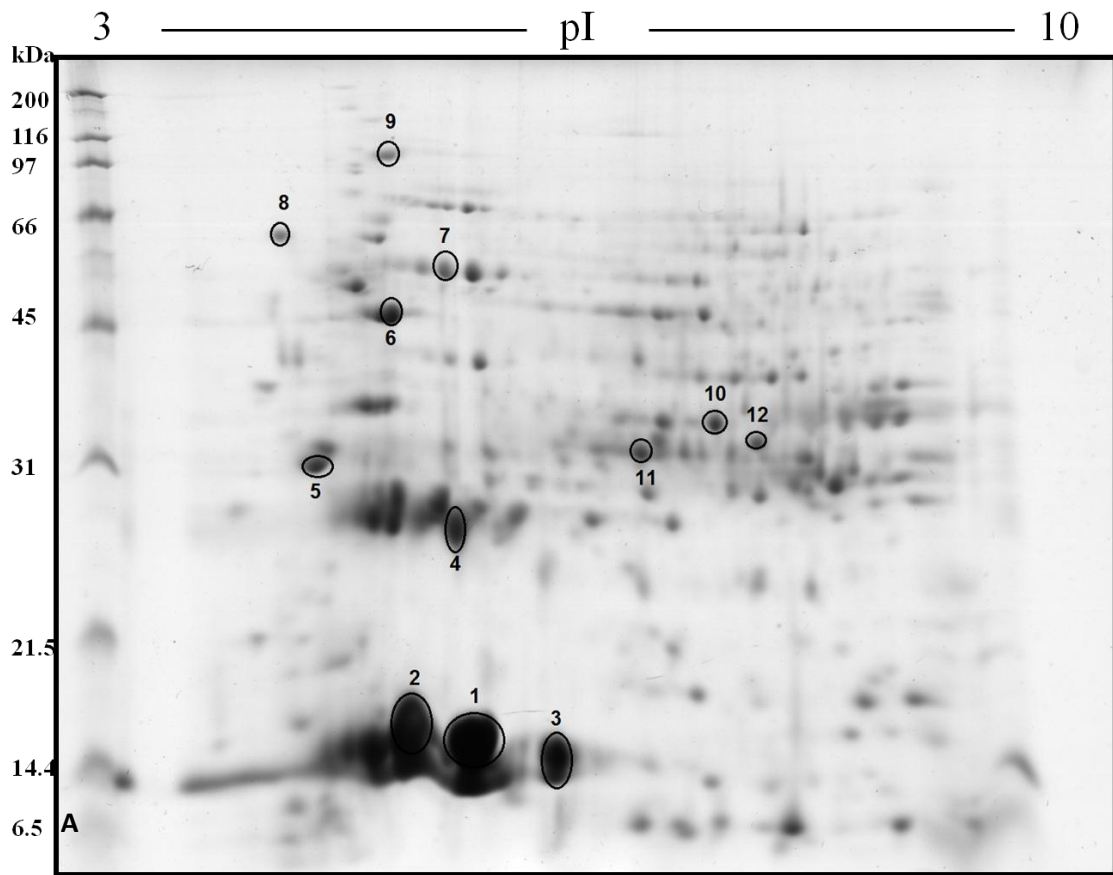


Fig. 24a Electroforesis 2D del extracto TG de *D. dendriticum* en gel de acrilamida, con pH 3-10 no lineal y 12% de acrilamida, teñido con Brilliant Blue G-250 Coomassie. Los números indican los spots no-antigénicos más abundantes, que fueron identificados mediante análisis MS.

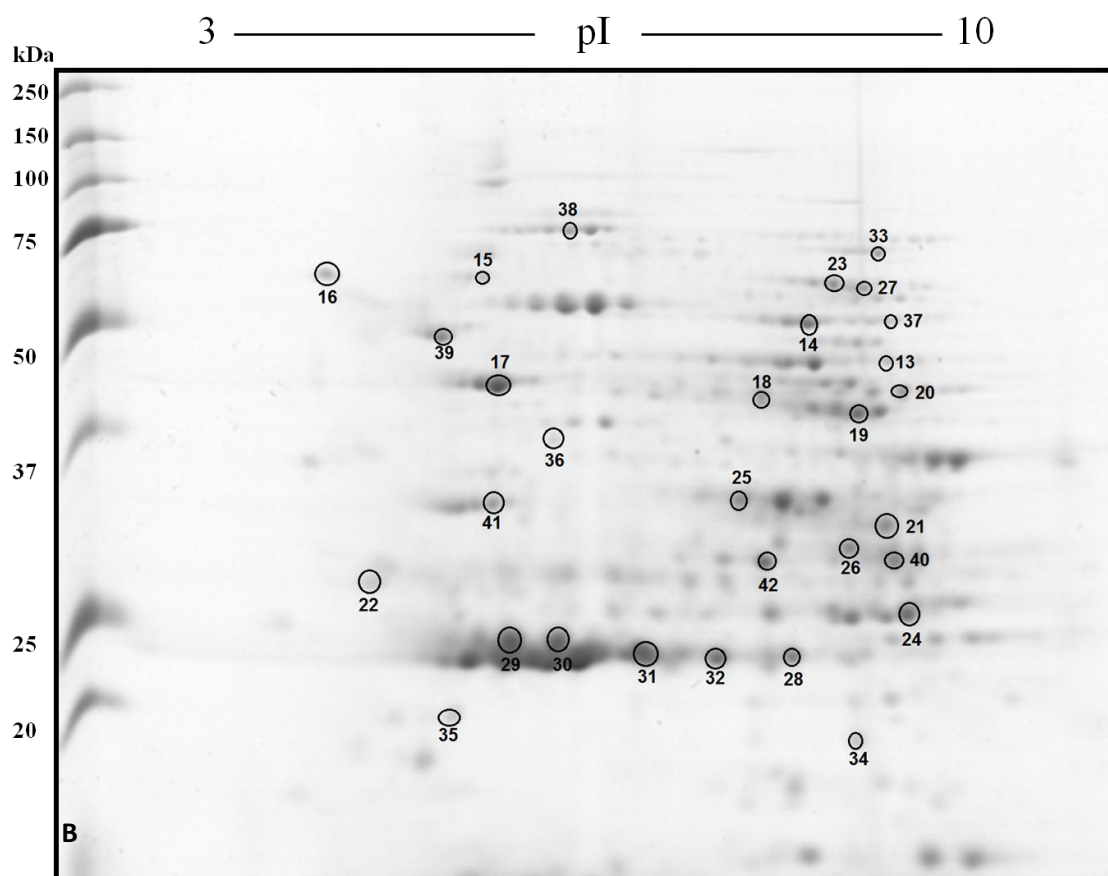


Fig. 24b Electroforesis 2D del extracto TG de *D. dendriticum* en gel de acrilamida al 12%, procesado durante un tiempo más prolongado que en la electroforesis de la Figura 24a, con pH 3-10 no lineal y teñido con Brilliant Blue G-250 Coomassie. Los números indican los spots no-antigénicos más abundantes, que fueron identificados mediante análisis MS.

La identificación de los spots se consideró que había sido correcta cuando el valor MASCOT obtenido fue significativo (mayor de 50). De acuerdo con este criterio, de los 65 spots analizados, 42 fueron identificados correctamente. Sin embargo, es preciso tener en cuenta que, debido a la falta de información en las bases de datos referentes a *D. dendriticum*, todas las proteínas se identificaron por homología con otros organismos, excepto en el caso de la mioglobina de *D. dendriticum* (Nº acceso: gi|122064715), de la cual encontramos varias isoformas en ambos extractos.

En cuanto a los 42 spots identificados por su huella peptídica, 22 de ellos se identificaron mediante MS-MS/MS y 20 por LC-MS/MS, los cuales se correspondieron con 31 proteínas diferentes (Tabla 6). De las proteínas identificadas en este extracto, 5 pertenecían

Resultados: Técnicas de Proteómica

presumiblemente al hospedador: 1) Hemoglobina subunidad beta (Beta-globina); 2) Pre-pro albúmina sérica, de la que se hallaron tres isoformas; 3) Superóxido dismutasa (Cu-Zn); 4) Catalasa, de la que se encontraron 3 isoformas; y 5) Regucalcina. Además, el spot nº 30 no pudo ser identificado en las bases de datos de proteínas, únicamente se obtuvo homología con una secuencia de expresión (EST) de *S. japonicum*. Para dos de las proteínas (actina y fructosa-bisfosfato aldolasa clase I) se encontraron 2 isoformas (spots nºs 6 y 17; spots nºs 19 y 20, respectivamente). En el caso de la carbonil reductasa se detectaron 3 isoformas (spots nºs 21, 26 y 40), mientras que los spots nºs 1, 2, 3 y 5 se correspondieron con la mioglobina de *D. dendriticum*.

Resultados: Técnicas de Proteómica

Tabla 6. Identificación de las proteínas mayoritarias del extracto TG por MS-MS/MS y LC-MS/MS.

Spot N°	Nombre Proteína	Especies	N° Acceso (NCBI)	MW Teórico (Da)	pI Teórico	Cover. %	Mascot Score	Método Análisis	Péptidos Macheados
1	Globina (Mioglobina)	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	gi 122064715	12085	8.93	49	211	MS-MS/MS	4
2	Globina (Mioglobina)	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	gi 122064715	12085	8.93	44	182	MS-MS/MS	5
3	Globina (Mioglobina)	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	gi 122064715	12085	8.93	13	104	MS-MS/MS	1
4	Hemoglobina subunidad beta (Beta-globina)	<i>Ovis aries</i>	gi 122686	16120	6.75	84	285	MS-MS/MS	9
5	Globina (Mioglobina)	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	gi 122064715	12085	8.93	44	163	MS-MS/MS	4
6	Actina	<i>Galaxea fascicularis</i>	gi 26522784	41983	5.30	31	266	MS-MS/MS	9
7	Pre-pro albúmina sérica	<i>Ovis aries</i>	gi 57164373	71139	5.80	17	177	MS-MS/MS	10
8	Superóxido dismutasa (Cu-Zn)	<i>Ovis aries</i>	gi 122064584	15856	6.14	23	171	MS-MS/MS	4
9	Pre-pro albúmina sérica	<i>Ovis aries</i>	gi 57164373	71139	5.80	29	220	MS-MS/MS	16
10	Pre-pro albúmina sérica	<i>Ovis aries</i>	gi 57164373	71139	5.80	31	600	MS-MS/MS	18
11	Catalasa	<i>Bos taurus</i>	gi 78369302	60106	6.78	41	443	MS-MS/MS	22
12	Regucalcina	<i>Bos taurus</i>	gi 27806809	33857	5.54	43	339	MS-MS/MS	12
13	Isocitrato deshidrogenasa [NADP], precursor mitocondrial	<i>Bos taurus</i>	gi 28461205	51248	8.96	27	81	MS-MS/MS	15
14	Dihidrolipoamida deshidrogenasa, parcial	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 358335125	23316	6.06	15.4	158	LC/MS/MS	4
15	Proteína mitocondrial de choque térmico 60 kDa	<i>Anemonia viridis</i>	gi 40647591	62939	5.30	23	204	MS-MS/MS	15
16	Calreticulina precursor	<i>Rhipicephalus microplus</i>	gi 22652433	47980	4.50	2.2	61	LC/MS/MS	2
17	Actina	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 256079407	41990	5.30	54	287	MS-MS/MS	19
18	Malato deshidrogenasa	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 256073057	26360	7.10	5.8	52	LC/MS/MS	2
19	Fructosa-bisfosfato aldolasa clase I	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 358332246	16817	8.50	13.2	110	LC/MS/MS	3

Resultados: Técnicas de Proteómica

20	Fructosa-bisfosfato aldolasa clase I	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 358332246	18540	8.50	12.5	85	LC/MS/MS	2
21	Carbonil reductasa	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 256077000	18969	7.70	12.2	80	LC/MS/MS	2
22	14-3-3 proteína	<i>Caenorhabditis elegans</i>	gi 482806	28259	4.70	8.1	65	LC/MS/MS	3
23	Catalasa	<i>Bos taurus</i>	gi 229299	57664	8.45	39	94	MS-MS/MS	16
24	SJCHGC07297 proteína	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 76154838	25534	8.30	9.6	86	LC/MS/MS	3
25	Proteína supuesta TyrA	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 226479962	26932	7.10	7.1	103	LC/MS/MS	2
26	Carbonil reductasa	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 256077000	18969	9.10	12.2	101	LC/MS/MS	2
27	Catalasa	<i>Bos taurus</i>	gi 229299	57664	8.45	35	135	MS-MS/MS	19
28	Transcriptasa inversa endonucleasa	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 254587308	17451	10	10.8	60	LC/MS/MS	2
29	Predicho:proteína 5B conteniendo dominios ricos en AT	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	gi 149410041	132541	8.70	1.3	68	LC/MS/MS	2
30	SJEBAH12 SJE <i>Schistosoma japonicum</i> ADNc, ARNm secuencia	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 28342638	38566	10.40	12.3	55	LC/MS/MS	3
31	Proteína SIX6OS1	<i>Mus musculus</i>	gi 21313086	67339	5.45	44	82	MS-MS/MS	24
32	SJCHGC06700 proteína	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 56752797	23017	9	6.7	48	LC/MS/MS	2
33	Transcetolasa	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 358339050	24495	7.10	13.5	128	LC/MS/MS	3
34	Peroxiredoxina 3	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 328498956	18502	8.80	14.5	85	LC/MS/MS	3
35	N-acetilglucosamina quinasa	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 358342608	22942	6.80	4.4	45	LC/MS/MS	1
36	Similar a Actina-87E isoforma 2	<i>Tribolium castaneum</i>	gi 91078488	38199	5.36	35	208	MS-MS/MS	13
37	Hipótesis proteína Smp_057060	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 353229464	21910	9.60	12.8	96	LC/MS/MS	2
38	Proteína de choque térmico 70	<i>Trichinella nativa</i>	gi 150024110	71243	5.48	15	157	MS-MS/MS	15
39	ATP sintasa subunidad beta	<i>Dendroaster excentricus</i>	gi 46909239	45827	4.95	46	184	MS-MS/MS	17
40	Carbonil reductasa	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 256077000	18969	9.10	12.2	88	LC/MS/MS	2
41	Kinesin cadena pesada 1	<i>Aplysia californica</i>	gi 325296855	110860	5.70	30	77	MS-MS/MS	30
42	Hydroxyacylglutathione hidrolasa	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 226468550	26723	6.20	11.2	104	LC/MS/MS	4

2.5. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DEL TG DE *D. dendriticum*

Los resultados de la inmunodetección en membranas de nitrocelulosa se obtuvieron mediante la incubación de las mismas con un pool de sueros obtenidos de corderos infectados experimentalmente con 5000 metacercarias, y recogidos entre los días 60 y 150 p.i. Como testigos se utilizaron los sueros de esos mismos corderos antes de la infección.

Tras realizar varias pruebas con distintas concentraciones del primer anticuerpo y del conjugado en geles monodimensionales, se estimó que las concentraciones óptimas de trabajo eran 1/100 en el caso del anticuerpo anti-*D. dendriticum* y 1/1000 en el de la inmunoglobulina anti-Ig.

En los análisis de inmunodetección, los sueros frente a *D. dendriticum* fueron capaces de reconocer 60 proteínas antigénicas, la mayoría de ellas localizadas en un rango de pH entre 5 y 8, con pesos moleculares superiores a 30 kDa. Al incubar las membranas con sueros testigos no se detectó ninguna mancha proteica.

Al comparar las imágenes obtenidas a partir de las membranas de nitrocelulosa reveladas con DAB (Fig. 25a), con las de los geles homólogos teñidos con Coomassie coloidal, se localizaron 20 spots antigénicos en el gel 2D (Fig. 25b). No obstante, en las Figuras 25a y 25b sólo aparecen rodeados por un círculo los 15 spots identificados correctamente. De éstos 8 se identificaron por MS-MS/MS y 7 por LC-MS/MS.

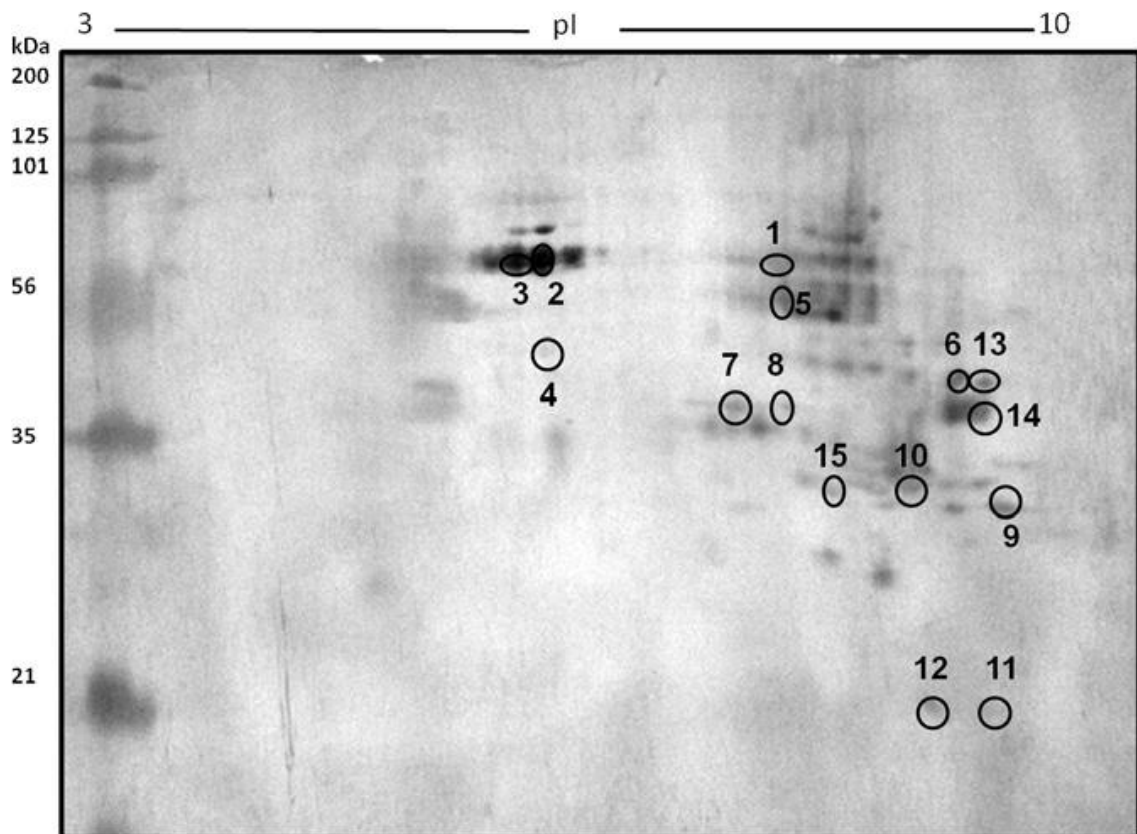


Fig. 25a. Imagen 2D de la membrana de nitrocelulosa del TG de adultos de *D. dendriticum*, en gel al 12% de acrilamida, con rangos de pH no-lineal 3-10. Los números indican los spots antigénicos revelados en los blots, utilizando suero anti-*D. dendriticum*, que fueron identificados mediante MS.

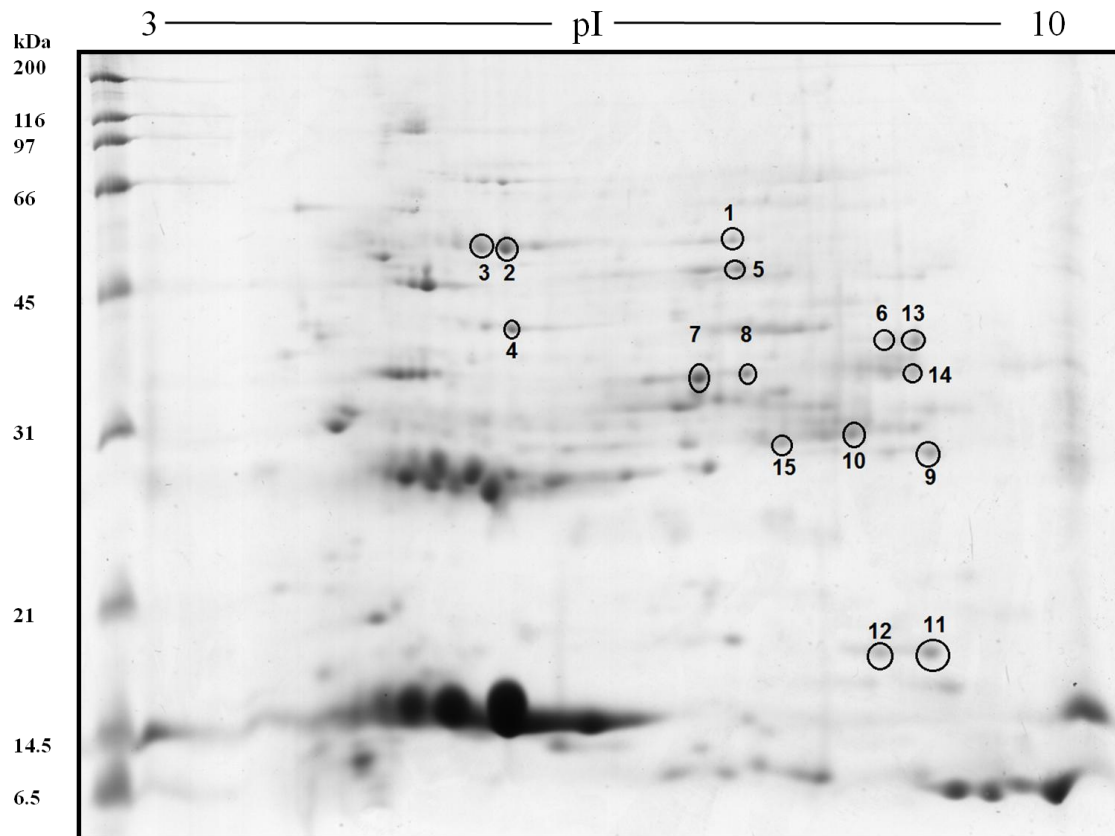


Fig. 25b. Imagen 2D del gel al 12% de poliacrilamida del TG de adultos de *D. dendriticum*, con rangos de pH no-lineal 3-10. Los números indican los spots antigénicos revelados en los blots, utilizando suero anti-*D. dendriticum*, que fueron identificados mediante MS.

De las 15 proteínas identificadas, 3 se localizaron en más de una posición en el gel (Peptidil-prolyl isomerasa cis-trans, retinal deshidrogenasa 1 y la proteína SJCHGC07012), mostrando todas ellas distinto pI, pero prácticamente los mismos pesos moleculares. Los 15 spots antigénicos identificados se correspondieron con 12 proteínas distintas (Tabla 7).

Resultados: Técnicas de Proteómica

Tabla 7. Identificación de las proteínas antigénicas del TG, mediante MS-MS/MS y LC-MS/MS.

Spot N°	Nombre Proteína	Especie	N° Acceso (NCBI)	MW Teórico (Da)	pI Teórico	Cover. %	Mascot score	Método Análisis	Péptidos Macheados
1	Dihidrolipoamida deshidrogenasa, parcial	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 358335125	23316	6.06	15.4	158	LC/MS/MS	4
2	Retinal deshidrogenasa 1	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 358342256	30304	6	14.4	135	LC/MS/MS	4
3	Retinal deshidrogenasa 1	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 358342256	20747	6	24.3	117	LC/MS/MS	7
4	Receptor de la hormona nuclear	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 256073528	16623	9.60	5.3	48	LC/MS/MS	1
5	Enolasa	<i>Echinostoma caproni</i>	gi 112950027	46568	6.50	13	277	LC/MS/MS	10
6	Precursor malato deshidrogenasa mitocondrial	<i>Osilinus lineatus</i>	gi 30313545	24212	7.78	23	97	MS-MS/MS	5
7	SJCHGC07012 proteína	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 56757127	41945	6.62	20	78	MS-MS/MS	7
8	SJCHGC07012 proteína	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 56757127	41945	6.62	20	77	MS-MS/MS	7
9	Glutation S-Transferasa	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 226477428	30020	7	6.5	63	LC/MS/MS	3
10	Triosafosfato isomerasa	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 358332321	27498	8	11.3	110	LC/MS/MS	4
11	Peptidil-prolyl isomerasa cis-trans	<i>Echinococcus granulosus</i>	gi 31077167	17571	6.41	41	80	MS-MS/MS	6
12	Peptidil-prolyl isomerasa cis-trans	<i>Echinococcus granulosus</i>	gi 31077167	17571	6.41	23	87	MS-MS/MS	6
13	Proteína similar a malato deshidrogenasa	<i>Magnaporthe grisea</i>	gi 59803007	35398	8.26	11	173	MS-MS/MS	11
14	Deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato	<i>Caenorhabditis elegans</i>	gi 205730924	36590	6.50	3	117	MS-MS/MS	3
15	Cadena corta deshidrogenasa/precursor SDR reductasa	<i>Silicibacter sp</i>	gi 99035216	26098	5.44	5	98	MS-MS/MS	5

2.6. ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL ANTÍGENO DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN

Los 15 spots que se tiñeron con mayor intensidad en geles tratados con Coomassie coloidal, se escindieron y analizaron mediante MS-MS/MS y LC-MS/MS. En la Figura 26a se observa la distribución de los spots del antígeno ES, aunque sólo los 8 identificados correctamente están marcados con un círculo. Al igual que en el caso del antígeno TG, se hicieron geles adicionales, que se dejaron correr más tiempo para obtener una mejor separación de los spots de mayor peso molecular. Después de este procedimiento se escindieron 30 spots adicionales (Fig. 26b).

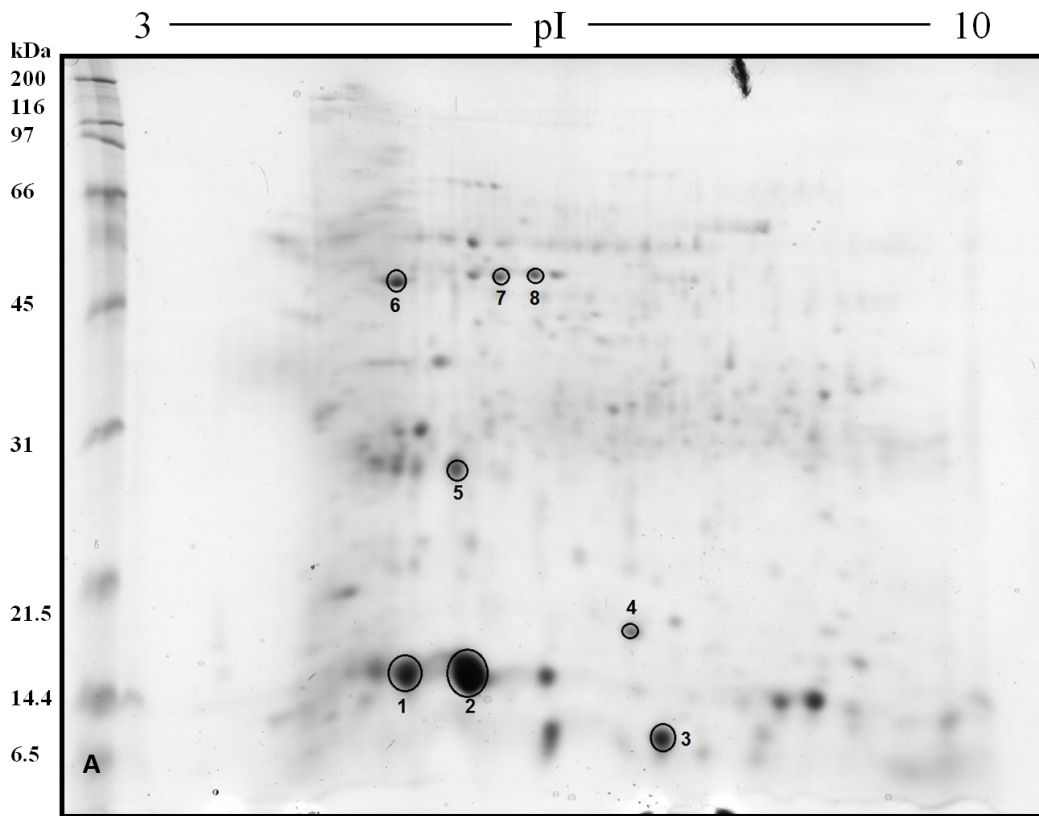


Fig. 26a. Electroforesis 2D del extracto ES de *D. dendriticum* en gel al 12% de acrilamida, con pH 3-10 no lineal, teñido con Coomassie Brilliant Blue G-250. Los números indican los spots no-antigénicos más abundantes, que fueron identificados mediante análisis MS.

Resultados: Técnicas de Proteómica

Tabla 8. Identificación de las proteínas mayoritarias del extracto ES, por MS-MS/MS y LC-MS/MS.

Spot N°	Nombre Proteína	Especie	N° Acceso (NCBI)	MW Teórico (Da)	pI Teórico	Cover. %	MASCOT score	Método Análisis	Péptidos Macheados
1	Globina (Mioglobina)	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	gi 122064715	12085	8.93	36	152	MS-MS/MS	3
2	Globina (Mioglobina)	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	gi 122064715	12085	8.93	36	147	MS-MS/MS	3
3	Globina (Mioglobina)	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	gi 122064715	12085	8.93	36	141	MS-MS/MS	3
4	Calreticulina	<i>Boophilus annulatus</i>	gi 39725975	48066	4.48	2	89	MS-MS/MS	2
5	SJCHGC09424 proteína	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 56758584	56074	5.85	23	586	MS-MS/MS	9
6	Actina-5	<i>Diphylobothrium dendriticum</i>	gi 1703122	41442	5.56	47	798	MS-MS/MS	15
7	Paramiosina	<i>Paragonimus westermani</i>	gi 66352009	99677	5.35	19	320	MS-MS/MS	21
8	Supuesta proteína TyrA	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 226479962	41945	6.62	7	102	MS-MS/MS	2
9	Actina	<i>Aedes aegypti</i>	gi 157125380	41841	5.29	50	172	MS-MS/MS	15
10	Calnexina	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 226470190	21895	9.60	3.9	52	LC-MS/MS	1
11	Cingulina	<i>Xenopus laevis</i>	gi 148237354	159634	5.61	31	92	MS-MS/MS	45
12	Cingulina	<i>Xenopus laevis</i>	gi 148237354	159634	5.61	31	99	MS-MS/MS	46
13	Fructosa-bisfosfato aldolasa clase I	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 358332246	24157	6.30	18.4	189	LC-MS/MS	5
14	LOC398577 proteína	<i>Xenopus laevis</i>	gi 29127003	109551	5.73	29	75	MS-MS/MS	32
15	Malato deshidrogenasa	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 256092918	15863	7.90	7.1	53	LC-MS/MS	1
16	Predicho: ARF GTPasa de la activación GIT1 proteína	<i>Canis lupus familiaris</i>	gi 73967277	87228	6.42	25	90	MS-MS/MS	23
17	Predicho: familia de proteínas similar a ARN polimerasa dirigida-ADN, subunidad omega	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	gi 72145970	417987	4.85	17	75	MS-MS/MS	57
18	Probable hydroxyacylglutathione hidrolasa	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 2494850	26801	6.80	5.2	56	LC-MS/MS	1
19	Similar a estomatina 2	<i>Bos taurus</i>	gi 84000113	38823	8.40	2	48	LC-MS/MS	1

Resultados: Técnicas de Proteómica

20	Tiorredoxina peroxidasa	<i>Schistosoma japonicum</i>	gij 226489432	18688	6	4.8	58	LC-MS/MS	1
21	Tiorredoxina peroxidasa	<i>Schistosoma japonicum</i>	gij 226489432	18688	6	13.1	69	LC-MS/MS	2
22	Catalasa	<i>Bos taurus</i>	gij 229299	57664	8.45	31	139	MS-MS/MS	20
23	Catalasa	<i>Bos taurus</i>	gij 229299	57664	8.45	39	84	MS-MS/MS	17

2.7. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DEL ES DE *D. dendriticum*

De acuerdo con los resultados obtenidos en las membranas reveladas con DAB, los sueros anti-*D. dendriticum* reconocieron 50 proteínas antigénicas en el extracto ES. No se detectó ningún spot en aquellas membranas enfrentadas a sueros de corderos no infectados. Al igual que en el antígeno TG, la mayoría de las proteínas antigénicas se localizaron en rangos de pH 5-8 y pesos moleculares superiores a 30 kDa. (Fig. 27a, 27b).

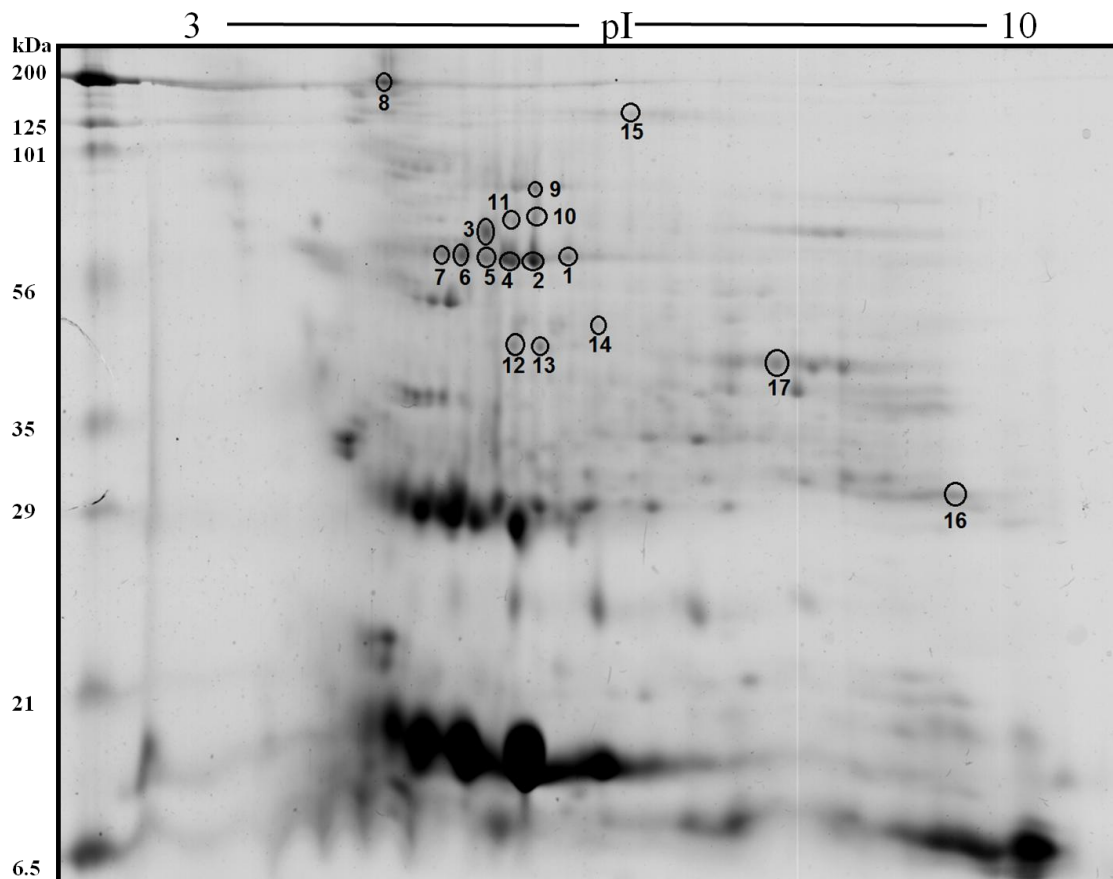


Fig. 27a. Imagen 2D del gel al 12% de acrilamida del ES de adultos de *D. dendriticum*, con rangos de pH no-lineal 3-10. Los números indican los spots antigénicos, revelados en los blots utilizando suero anti-*D. dendriticum*, que fueron identificados mediante MS.

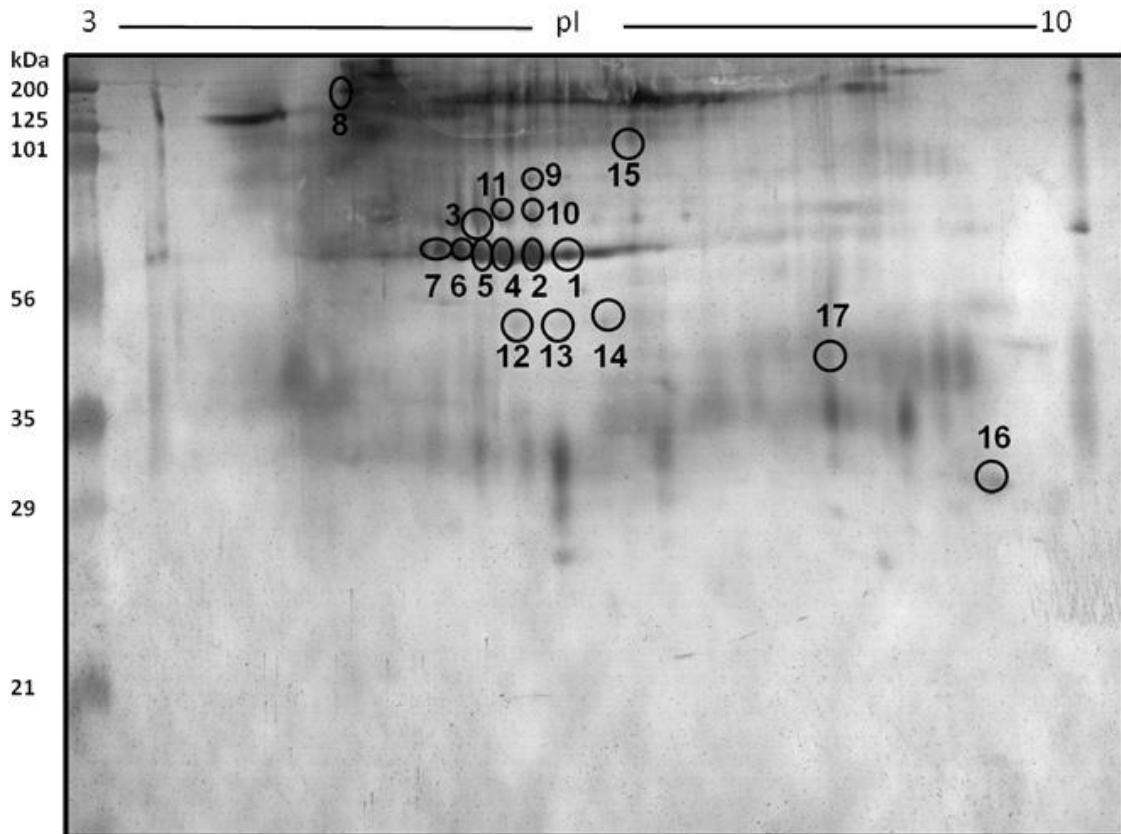


Fig. 27b. Imagen 2D de de la membrana de nitrocelulosa del ES de adultos de *D. dendriticum*, en gel al 12% de acrilamida, con rangos de pH no-lineal 3-10. Los números indican los spots antigénicos, revelados en los blots utilizando suero anti-*D. dendriticum*, que fueron identificados mediante MS.

Para identificar los spots antigénicos se compararon las membranas con sus geles homólogos. De este modo se localizaron 22 que se cortaron manualmente y se analizaron por MS-MS/MS y LC-MS/MS. De ellos, 5 se identificaron mediante MS-MS/MS, 9 por LC-MS/MS y 3 mediante análisis “de novo” en la bases de datos UniProtKB (spots nºs 8, 14 y 16). Los 17 spots identificados se corresponden con 11 proteínas distintas, que aparecen detalladas en la Tabla 9. Se identificaron dos isoformas de las proteínas: 1º retinal deshidrogenasa 1 y 2º SJAL_039_56.T7 SJL *Schistosoma japonicum* ADNc. Además, la glicoproteína de 30 kDa de *S. mansoni* fue identificada en 4 spots diferentes. Los spots nºs 9 y 11 no pudieron ser identificados en las bases de datos de proteínas y solo se obtuvo homología con una secuencia de expresión de *S. japonicum* (SJAL_039_56.T7 SJL *Schistosoma japonicum* ADNc). Las proteínas antigénicas Glutation S-Transferasa, Enolasa y Retinal deshidrogenasa I se localizaron en ambos extractos.

Resultados: Técnicas de Proteómica

Tabla 9. Identificación de las proteínas mayoritarias del extracto ES por MS-MS/MS y LC-MS/MS.

Spot N°	Nombre Proteína	Especie	N° Acceso (NCBI)	MW Teórico (Da)	pI Teórico	Cover. %	MASCOT score	Método Análisis	Péptidos Macheados
1	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> cepa R sección 2 de 4 del genoma completo	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	sptrembl Q7NB55	74831	6.81		64	De novo	
2	Glicoproteína de 30 kDa	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 632506	18273	7.81	13	78	MS-MS/MS	5
3	Aldehído dehidrogenasa	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 256080144	7382	4.87	69	84	MS-MS/MS	7
4	Glicoproteína de 30 kDa	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 632506	18273	7.81	4.8	39	LC-MS/MS	1
5	Retinal deshidrogenasa 1	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 358342256	30304	6	15.8	150	LC-MS/MS	5
6	Retinal deshidrogenasa 1	<i>Clonorchis sinensis</i>	gi 358342256	20747	5.04	18	70	LC-MS/MS	3
7	Proteína similar al factor de ribosilación de ADP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	sptrembl Q9LFJ7	21833	8.50		64	De novo	
8	Supuesta dreadlocks/dock	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 353230982	22165	9.89	51	87	MS-MS/MS	13
9	SJAL_039_56.T7 SJL ADNc	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 56050997	22910	9.65	43	85	MS-MS/MS	16
10	Glicoproteína de 30 kDa	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 632506	18273	7.81	7	73	LC-MS/MS	2
11	SJAL_039_56.T7 SJL ADNc	<i>Schistosoma japonicum</i>	gi 56050997	22910	9.65	48	86	LC-MS/MS	16
12	Supuesto miembro de la familia de aldehído deshidrogenasa	<i>Caenorhabditis elegans</i>	gi 17562198	58601	6.90	2	59	LC-MS/MS	1
13	Glicoproteína de 30 kDa	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 632506	18273	7.81	4	55	LC-MS/MS	1
14	Exocyst componente sec8	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 256075753	142755	7.20	61	79	MS-MS/MS	16
15	Proteína no caracterizada	<i>Ralstonia solanacearum</i>	sptrembl Q8XQR1	19139	8.89		66	De novo	
16	28 kDa glutatión-S-transferasa	<i>Paragonimus westermani</i>	gi 2264324	23718	6.10	6	51	LC-MS/MS	2
17	Enolasa	<i>Echinostoma caproni</i>	gi 112950027	46568	6.30	12.3	158	LC-MS/MS	6

2.8. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

Para clasificar las proteínas por su función molecular se realizó una búsqueda de información en la base de datos “Gene Ontology”, cuyos resultados se muestran en la Tabla 10. Como se puede observar en la Figura 28, la mayor parte de las proteínas tienen una función metabólica y, dentro de ésta, la mayoría están involucradas en el metabolismo de los carbohidratos. Otro importante grupo de proteínas identificadas en este trabajo se engloba dentro de las implicadas en el proceso de oxidación-reducción. Además, se han identificado también cinco proteínas estructurales, siendo la más abundante la actina que presenta varias isoformas. Otros grupos proteicos destacados fueron el grupo de las chaperonas y el de las proteínas relacionadas con la respuesta al estrés. Asimismo, se han identificado varias proteínas de las que no se ha podido determinar su función, así como otras cinco proteínas que pertenecían supuestamente al hospedador.

Tabla 10. Clasificación de las proteínas identificadas según el proceso biológico.

Categorías	Nº de spots Identificados
<i>Metabolismo de aminoácidos</i>	
Supuesta proteína TyrA	2
<i>Antioxidante/detoxificación</i>	
Glutation-S-transferasa	1
28 kDa glutacion-S-transferasa	1
Peroxiredoxina 3	1
Tiorredoxina peroxidasa	2
Hidroxiacilglutaciona hidrolasa	1
Probable hidroxiacilglutaciona hidrolasa	1
<i>Síntesis ATP</i>	
ATP sintasa subunidad beta	1
<i>Metabolismo Carbohidratos</i>	
Precursor mitocondrial isocitrato deshidrogenasa [NADP]	1
Malato deshidrogenasa	2
Similar a Malato deshidrogenasa	1
Precursor mitocondrial Malato deshidrogenasa	1
Transketolasa	1
Enolasa	2
Clase I aldolasa fructosa-bisfosfato	3

Resultados: Técnicas de Proteómica

Deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato	1
Triosafosfato isomerasa	1
<i>Homeostasis redox celular</i>	
Dihidrolipoamida deshidrogenasa, parcial	2
<i>Proceso Oxidación-Reducción</i>	
30 kDa glicoproteína	4
Aldehído deshidrogenasa	1
Carbonilo reductasa	3
Supuestos miembros de la familia aldehído deshidrogenasa	1
Deshidrogenasa Retinal 1	4
<i>Actividad Motora de los microtúbulos</i>	
Kinesin cadena pesada 1	1
<i>Metabolismo de ácidos nucleicos</i>	
14-3-3 proteína	1
Endonucleasa transcriptasa inversa	1
Receptor de la hormona nuclear	1
Predicho: familia de proteínas similar a ARN polimerasa dirigida-ADN, subunidad omega	1
Proteína SIX6OS1	1
<i>Transporte de oxígeno</i>	
Globina (Mioglobina)	7
<i>Metabolismo del fósforo</i>	
N-acetilglucosamina quinasa	1
<i>Chaperona/plegamiento proteínas</i>	
Calnexina	1
Calreticulina	1
Calreticulina precursor	1
Peptidil-prolyl isomerasa cis-trans	2
<i>Transporte de proteínas</i>	
Exocyst componente sec8	1
<i>Transducción de señales</i>	
Proteína SIX6OS1	1
Similar al factor de ribosilación ADP	1
<i>Similar a estomatina 2 (SLP-2)</i>	
Similar a estomatin 2	1
<i>Respuesta al estrés/plegamiento proteico</i>	

Resultados: Técnicas de Proteómica

Proteína de choque térmico 70	1
Proteína de choque térmico 60 kDa mitocondrial	1
<i>Proteínas estructurales/motoras</i>	
Actina	3
Actina-5	1
Cingulina	2
Paramiosina	1
Similar a actina-87E isoforma 2	1
<i>Función desconocida</i>	
Proteína hipotética Smp_057060	1
LOC398577 proteína	1
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> cepa R sección 2 de 4 del genoma completo	1
Predicho: ARF GTPasa de la activación GIT1 proteína	1
Predicho:proteína 5B conteniendo dominios ricos en AT	1
Supuesta dreadlocks/dock	1
Proteína no caracterizada	1
SJAL_039_56.T7 SJL <i>Schistosoma japonicum</i> ADNc	2
SJCHGC06700 proteína	1
SJCHGC07012 proteína	2
SJCHGC07297 proteína	1
SJCHGC09424 proteína	1
SJEBAH12 SJE <i>Schistosoma japonicum</i> ADNc, ARNm secuencia	1
<i>Proteínas del Hospedador</i>	
Catalasa	5
Hemoglobina subunidad beta	1
Pre-pro albúmina sérica	3
Regucalcina	1
Superóxido dismutasa (Cu-Zn)	1

Resultados: Técnicas de Proteómica

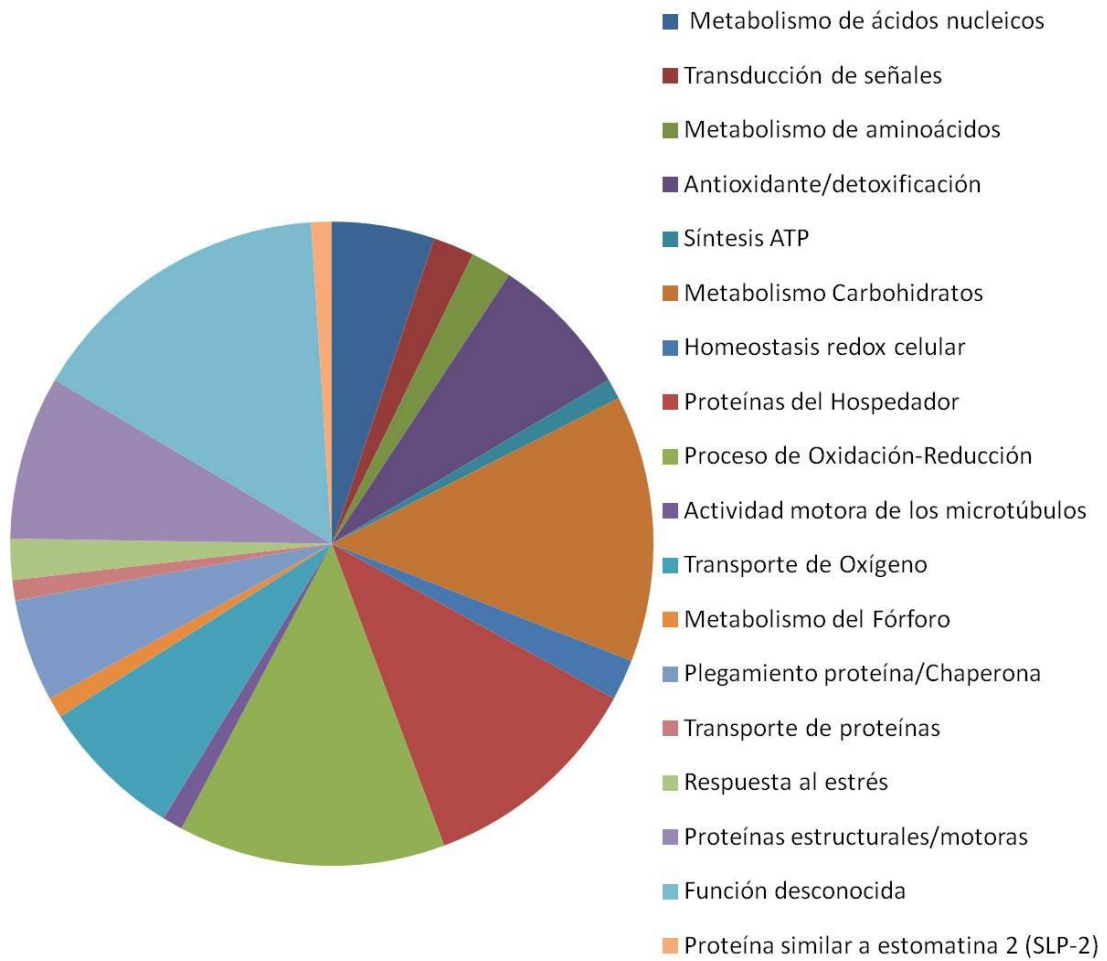


Fig. 27. Gráfico de la clasificación de las proteínas identificadas en los análisis proteómicos por su función molecular.

3. CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE ADULTOS DE *D. dendriticum*

Después de los numerosos ensayos para la obtención de un ARNm de cantidad y calidad suficiente para iniciar la construcción de la genoteca, se optó por utilizar 400 parásitos adultos vivos, congelados en N líquido. La concentración final que se obtuvo del ARNm fue 145 ng/ μl en 36 μl . En la Figura 29 se muestra el resultado de la fase de extracción de ARN total.

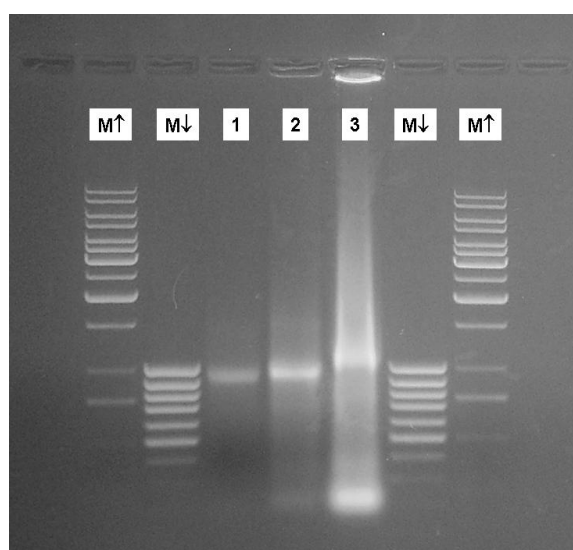


Fig. 28. Gel de agarosa al 1,2% del ARN total de *Dicrocoelium dendriticum* obtenido con TRIZOL®. 1: 1,5 μg ; 2: 5 μg ; 3: 15 μg ; M↑: marcadores de ADN de alto peso molecular, M↓: marcadores de ADN de bajo peso molecular.

Tras la construcción de la genoteca de expresión se obtuvo un título de $1,9 \times 10^6$ y una vez amplificada la genoteca, el título fue 3×10^8 . En la Figura 30 se muestra una de las placas de Petri en las que se realizó el recuento de unidades formadoras de placas de lisis, para el cálculo del título.

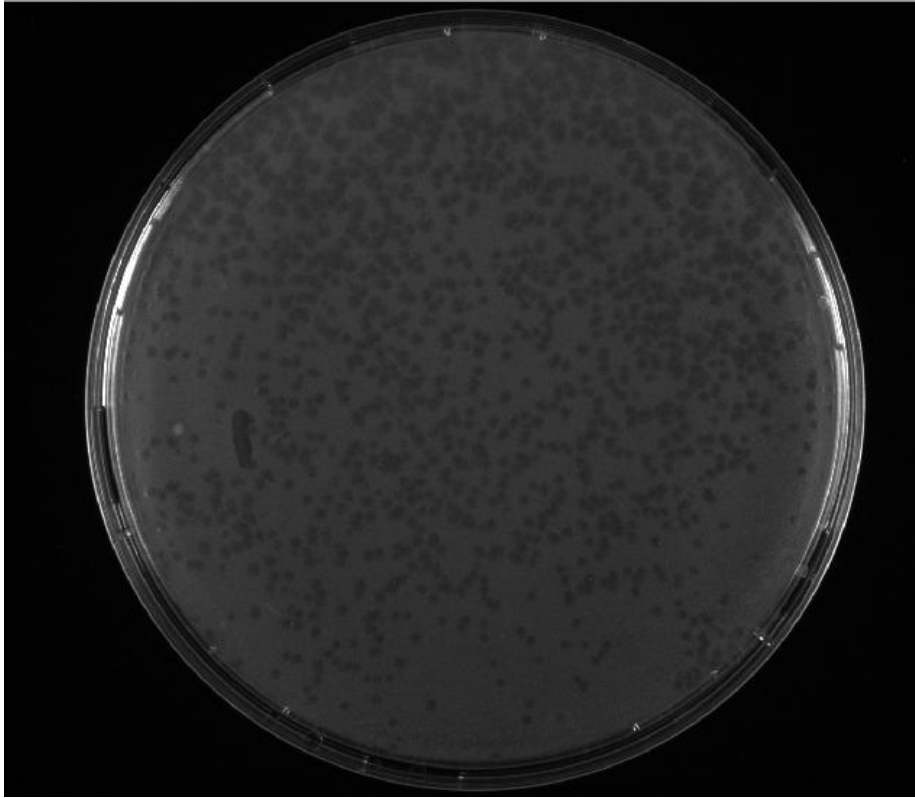


Fig. 29. Placa de Petri para el recuento de unidades formadoras de placas de lisis durante la titulación de la genoteca de expresión.

El porcentaje de recombinantes fue del 90 % y el tamaño de los insertos osciló entre 120 pb y 1300 pb, la mayoría por encima de 500 pb, con gran diferencia de pesos moleculares, como puede observarse en la foto del gel con los productos de PCR (Fig. 31).

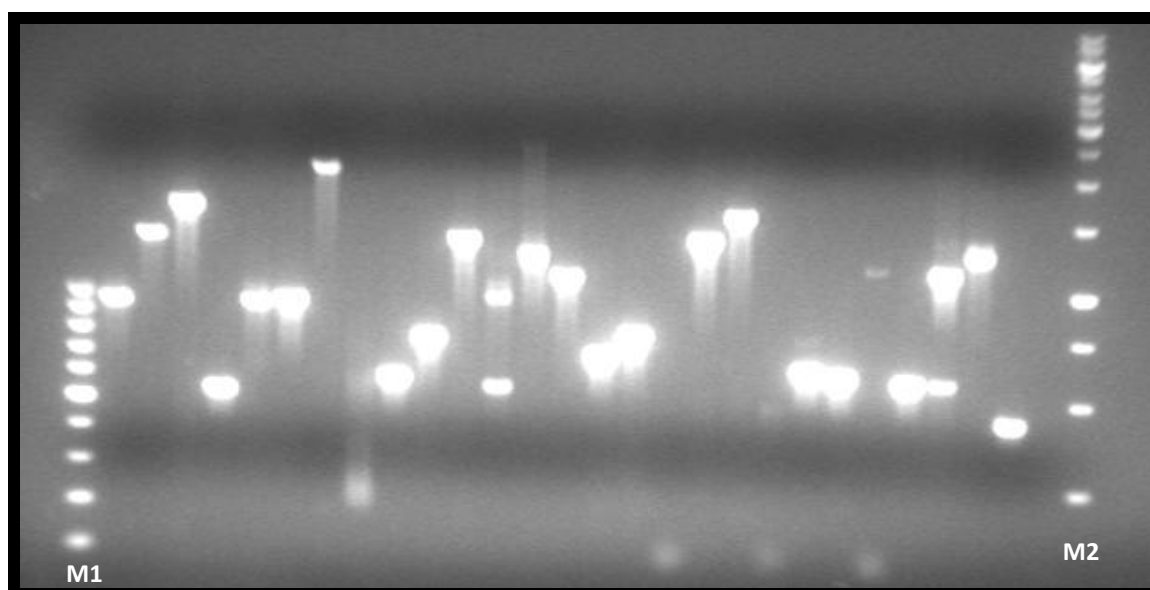


Fig. 30. Productos de PCR en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Insertos obtenidos de distintos fagos de la genoteca seleccionados al azar. (M1) marcadores de ADN de bajo peso molecular, (M2) marcadores de ADN de alto peso molecular.

3.1. INMUNOCRIBADO DE LA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE *D. dendriticum*

Se realizó el inmunocribado de 5×10^6 clones, utilizando para ello un pool de sueros de corderos positivos a la infección, así como sueros de corderos no infectados como testigos. Todos ellos se trataron previamente con el lisado de *E. coli*, para evitar las reacciones cruzadas. Sin embargo, no se obtuvo ninguna señal positiva, motivo por el cual se procedió a la realización del cribado al azar en busca de EST específicos del parásito.

3.2. CRIBADO AL AZAR DE LA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE *D. dendriticum*

Se seleccionaron 230 clones al azar de la genoteca de expresión de *D. dendriticum*. De ellos se han obtenido un total de 200 EST, después de cortar los extremos de las secuencias correspondientes al vector y a los adaptadores, descartando aquellas secuencias cuyo peso molecular era inferior a 100 pb. El promedio de longitud de las

Resultados: Genoteca de Expresión

secuencias tras ser editadas fue de 614 pb. La mayoría de los clones poseían un ORF completo. Los EST fueron ensamblados en 158 clústeres diferentes, de los cuales 150 (94%) fueron secuencias únicas, lo que demuestra la elevada representatividad de la genoteca. De los 158 clústeres, 5 estaban compuestos por 2 EST (3%), 1 por 3 EST (0,6%), otro por 10 EST (0,6%) y un último grupo por 27 EST (0,6%). Los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias se muestran en la Tabla 11. Los EST fueron registrados en la base de datos del GenBank con los N^{os} de acceso: JZ330400-JZ330572.

Resultados: Genoteca de Expresión

Tabla 11. Identificaciones significativas de EST de adultos de *D. dendriticum* con secuencias presentes en las bases de datos de ADN y proteínas.

EST ID	Identificación (BLASTX)	Nº Acceso (NCBI)	Especies	e-value	Longitud (pb)	Nº de EST	Cola Poly-A identificada	Dominios Conservados
DdA_6	Inhibidor de la serina proteasa	AAA19730	<i>Schistosoma haematobium</i>	5,00E-18	612	1	Sí	Serpina
DdA_8	Proteína ribosomal L37	CAX74486	<i>Schistosoma japonicum</i>	5,00E-52	518	1	Sí	Proteína ribosomal mitocondrial I37
DdA_10	Dihidropirimidinasa (Familia M38)	XP_002579613	<i>Schistosoma mansoni</i>	2,00E-34	586	1	Sí	No
DdA_13	Proteína hipotética	CAX70726	<i>Schistosoma japonicum</i>	5,00E-23	437	1	Sí	No
DdA_14	Omega-amidasa NIT2	GAA31017	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-70	767	1	No	Nitrilasa
DdA_22	Proteína de unión a la cromatina relacionada SWI/SNF	XP_002580821	<i>Schistosoma mansoni</i>	2,00E-81	724	1	No	Grupo de alta movilidad (HMG)-box
DdA_23	SJCHGC06944 proteína	AAW26734	<i>Schistosoma japonicum</i>	2,00E-25	584	1	No	No
DdA_24	Cisteína proteasa 5	Q2QKE1	<i>Paragonimus westermani</i>	5,00E-12	577	1	No	Inhibidor de la cathepsina propéptido
DdA_25	ATPasa, complejos F1, subunidad épsilon	CAX76443	<i>Schistosoma japonicum</i>	3,00E-17	372	1	Sí	F1-ATPasa_epsilon
DdA_27	Tiorredoxina peroxidasa	ABY85785	<i>Fasciola gigantica</i>	5,00E-12	360	1	Sí	Similar a Tiorredoxina (trx)
DdA_31	Miembro de la familia 2 promotoras de la polimerización de la tubulina	GAA32777	<i>Clonorchis sinensis</i>	6,00E-107	698	1	Sí	P25-alfa
DdA_33	GE24358	XP_002097664	<i>Drosophila yakuba</i>	1,00E-10	994	1	No	Znf_gata
DdA_34	Proteína flightless-1	GAA35205	<i>Clonorchis sinensis</i>	3,00E-66	681	1	No	No
DdA_37	Hipotética proteína CLF_108152, parcial	GAA52485	<i>Clonorchis sinensis</i>	6,00E-13	791	1	No	No
DdA_42	Proteína 2 conteniendo dominio-SUN	GAA50480	<i>Clonorchis sinensis</i>	6,00E-05	680	1	Sí	No
DdA_43	Receptor de la proteína de expresión 5	GAA47648	<i>Clonorchis sinensis</i>	5,00E-49	644	1	No	Tb2_dp1_hva22
DdA_45	Ubiquitina C, isoforma CRA_a	L81142	<i>Pisum sativum</i>	1,00E-47	593	1	No	Ubiquitina
DdA_46	Proteína 1 relacionada con patogénesis asociada a Golgi	GAA57374	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-51	718	1	No	Similar a proteína extracelular Scp
DdA_47	Proteína ribosomal L9	CAX78749	<i>Schistosoma japonicum</i>	2,00E-87	625	1	Sí	Proteína ribosomal I6
DdA_51	Hipotética proteína CLF_101548	GAA48391	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-40	416	1	No	No
DdA_52	Subunidad TOM34 del receptor de importación mitocondrial	CAX71336	<i>Schistosoma japonicum</i>	1,00E-69	858	1	No	Tetrapéptido conteniendo repeticiones

Resultados: Genoteca de Expresión

DdA_53	Predicho: similar a neutral alfa-glucosidasa AB	XP_003467969	<i>Cavia porcellus</i>	3,00E-51	906	1	No	Glicosil hidrolasas 31
DdA_54	Inhibidor Bax 1	GAA56843	<i>Clonorchis sinensis</i>	3,00E-36	721	1	No	Como Inhibidor Bax 1
DdA_55	Alfa tubulina, supuesta	XM_002579987	<i>Schistosoma mansoni</i>	3,00E-69	644	1	No	Tubulina/ftsz, dominio GTPasa
DdA_56	Proteína SJCHGC06248	AAW25497	<i>Schistosoma japonicum</i>	5,00E-25	588	1	No	Factor alfa de factor de necrosis tumoral inducida por LPS
DdA_61	Hipotética proteína CLF_110930	GAA42520	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-12	627	1	No	No
DdA_65	Proteína no caracterizada	F6WPM4	<i>Equus caballus</i>	5,00E-09	634	1	No	No
DdA_66	Hipotética proteína Smp_032120	XP_002574655	<i>Schistosoma mansoni</i>	3,00E-38	602	1	Sí	No
DdA_67	<i>Drosophila willistoni</i> GK23336	XM_002074924	<i>Drosophila willistoni</i>	7,00E-145	728	1	No	Actina
DdA_69	REST corepresor 3	CLF_101089	<i>Clonorchis sinensis</i>	5,00E-30	602	1	Sí	No
DdA_73	Transportador de fosfato 1-A Sodio-dependiente	GAA51223	<i>Clonorchis sinensis</i>	6,00E-17	403	1	Sí	Fosfato/sulfato permeasas
DdA_76	Supuesta retinol deshidrogenasa 11	CAX70989	<i>Schistosoma japonicum</i>	6,00E-47	602	1	Sí	Dominio de unión al NAD(P)
DdA_79	Factor de iniciación de traducción 4E	GAA51165	<i>Clonorchis sinensis</i>	3,00E-63	877	1	Sí	Como factor de iniciación de traducción dominio eIF-4E
DdA_81	Actinina alfa	GAA48068	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-08	545	1	Sí	Espectrina repetición-dominios
DdA_82	Ciclofilina A	ADY88065	<i>Clonorchis sinensis</i>	9,00E-91	569	1	Sí	Como ciclofilina peptidil-prolil dominio isomerasa cis-trans
DdA_86	Proteína Vitelina B	AAL23712	<i>Opisthorchis viverrini</i>	2,00E -59	868	1	Sí	síntesis de proteínas de cáscara huevo de trematodos
DdA_96	Hipotética proteína Smp_121940	CCD76526	<i>Schistosoma mansoni</i>	1,00E-15	865	1	No	Dominio terminal Ferm n
DdA_97	Hipotética proteína CLF_107885	GAA55422	<i>Clonorchis sinensis</i>	8,00E-85	664	1	No	Dominio 14-3-3
DdA_99	Serina/treonina quinasa Nek1	G7YN69	<i>Clonorchis sinensis</i>	3,00E-13	830	1	No	No
DdA_100	Hipotética proteína CLF_103526	GAA49756	<i>Clonorchis sinensis</i>	3,00E-07	559	1	Sí	No
DdA_101	Endofilina-B1	GAA56152	<i>Clonorchis sinensis</i>	3,00E-24	838	1	No	Dominio Bar_endophilin_b
DdA_103	Calponina homólogo	AAD11976	<i>Schistosoma japonicum</i>	2,00E-17	528	1	No	No
DdA_105	Hipotética proteína Osl_08308	EEC73709	<i>Oryza sativa</i>	2,00E-14	1025	1	Sí	No
DdA_106	Hipotética proteína CLF_110580	GAA53588	<i>Clonorchis sinensis</i>	2,00E-75	862	1	No	No
DdA_108	SJCHGC02351 proteína	AAW25237	<i>Schistosoma japonicum</i>	5,00E-20	693	1	No	No
DdA_109	Proteína de estrés DDR48	C7TZI4	<i>Schistosoma japonicum</i>	5,00E-07	462	1	No	No

Resultados: Genoteca de Expresión

DdA_110	Integrina-quinasa vinculada a serina / treonina fosfatasa 2C	GAA56966	<i>Clonorchis sinensis</i>	4,00E-15	454	1	No	No
DdA_113	Proteína reguladora de la biogénesis de ribosomas	XP_002577158	<i>Schistosoma mansoni</i>	3,00E-55	422	1	No	Proteína reguladora de la biogénesis de ribosomas
DdA_114	Hipotética proteína CLF_103391	GAA37716	<i>Clonorchis sinensis</i>	8,00E-07	414	1	Sí	No
DdA_117	Hipotética proteína CLF_102341	GAA48984	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-15	615	1	Sí	No
DdA_119	Mioglobina 1	AAX11352	<i>Paragonimus westermani</i>	1,00E-12	240	1	Sí	No
DdA_121	Proteína no caracterizada homóloga a c1orf194	XP_002939681	<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	2,00E-18	588	1	Sí	Proteína de función desconocida duf3695
DdA_122	Voltage-dependent anion-selective channel	XP_002580138	<i>Schistosoma mansoni</i>	3,00E-46	530	1	No	Dominio Porin3_vdac
DdA_126	SJCHGC04891 proteína	AAW26090	<i>Schistosoma japonicum</i>	6,00E-45	567	1	Sí	Nadh: ubiquinona oxidorreductasa, subunidad 5 hierro-azufre
DdA_128	Factor de splicing rico en arginina/serina	XP_002574989	<i>Schistosoma mansoni</i>	1,00E-131	805	1	No	Factor de splicing rico en arginina/serina
DdA_133	Hipotética proteína Smp_009340	XP_002572403	<i>Schistosoma mansoni</i>	4,00E-08	250	1	No	No
DdA_137	Proteína fosfatasa 2 (anteriormente 2A) subunidad reguladora B	GAA50691	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-11	259	1	No	No
DdA_138	Hipotética proteína CLF_107954	GAA55441	<i>Clonorchis sinensis</i>	2,00E-13	292	1	No	Dominio ubiquitina
DdA_139	NADH deshidrogenasa Fe-S proteína 8 (ubiquinona)	GAA52011	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-31	278	1	No	Nadh deshidrogenasa subunidad I
DdA_140	Proteína de finger Zinc YGR067C	GAA37159	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-10	129	1	No	No
DdA_141	C1lc06_schja	CAX72234	<i>Schistosoma japonicum</i>	3,00E-16	258	1	Sí	No
DdA_142	Hipotética proteína Smp_083800	XP_002579480	<i>Schistosoma mansoni</i>	4,00E-16	357	1	No	No
DdA_144	Quimotripsinógeno A	GAA32831.2	<i>Clonorchis sinensis</i>	4,00E-22	579	1	No	No
DdA_145	Proteína similar a Calcyphosin	GAA35471	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-21	239	1	No	Dominio de unión a calcio Ef-hand
DdA_146	Hipotética proteína, parcial	AEO32825	<i>Amblyomma maculatum</i>	1,00E-13	222	1	No	Dominio similar a Maoc
DdA_149	Supuesta proteína homólogo 1	C4LZ08	<i>Entamoeba histolytica</i>	7,00E-07	792	1	No	No
DdA_150	SJCHGC07111 proteína	AAW24961	<i>Schistosoma japonicum</i>	3,00E-52	580	1	Sí	Transporte de cationes de tipo p ATPasa, N-terminal
DdA_151	Inhibidor de la proteasa cisteína tipo 1- cistatina	AFV53480	<i>Fasciola gigantica</i>	3,00E-08	525	1	Sí	Inhibidor de proteinasa i25, cistatina

Resultados: Genoteca de Expresión

DdA_152	Proteína no caracterizada	AAW30622	<i>Sus scrofa</i>	1,00E-113	530	1	No	Tubulina
DdA_153	Calmodulina	GAA38883	<i>Clonorchis sinensis</i>	3,00E-57	738	1	Sí	Dominio Ef-hand
DdA_155	Proteína no caracterizada	G7YHX8	<i>Clonorchis sinensis</i>	3,00E-17	789	1	No	No
DdA_158	Hipotética proteína	XP_002573850	<i>Schistosoma mansoni</i>	2,00E-07	756	1	No	Dominio de función desconocida (duf1619)
DdA_159	Proteína F-box/LRR-repeat no caracterizado C02F5.7	GAA53242	<i>Clonorchis sinensis</i>	4,00E-42	608	1	No	Dominio similar a F-box, como ciclina
DdA_161	SJCHGC06172 proteína	AAW24880	<i>Schistosoma japonicum</i>	2,00E-109	586	1	Sí	Proteína ribosomal 60s I18a
DdA_163	Proteína 1 similar que interacciona con serina/treonina/tirosina	GAA54975	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-58	629	1	No	Fosfatasa de especificidad dual, dominio catalítico
DdA_164	Prostaglandina-H2 D-isomerasa	GAA33791	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-42	492	1	Sí	Glutation s-transferasa, como c-terminal
DdA_165	SJCHGC01141 proteína	AAW27367	<i>Schistosoma japonicum</i>	8,00E-40	567	1	No	Histone acetyltransferase
DdA_167	Supuesta tubulina, beta, 2	CAX70940	<i>Schistosoma japonicum</i>	1,00E-169	792	1	No	Tubulina
DdA_168	Mediador de RNA polimerasa II transcripción subunidad 11	GAA54870	<i>Clonorchis sinensis</i>	3,00E-49	447	1	Sí	Complejo mediador de proteínas
DdA_171	Hipotética proteína	CAX76599	<i>Schistosoma japonicum</i>	5,00E-07	406	1	Sí	No
DdA_172	SJCHGC06331 proteína	AAW27597	<i>Schistosoma japonicum</i>	4,00E-97	1013	1	No	Cadena pequeña del complejo adaptador clathrin
DdA_173	Proteína vitelina Vit36	Q5BM00	<i>Paragonimus westermani</i>	2,00E-08	323	1	Sí	No
DdA_176	Histona-lisina N-metiltransferasa trithorax	GAA57433	<i>Clonorchis sinensis</i>	6,00E-25	646	1	No	No
DdA_177	Supuesta hidrolasa	GAA54137	<i>Clonorchis sinensis</i>	8,00E-24	653	1	No	No
DdA_181	Fosfolípido / glicerol aciltransferasa	CAX73612	<i>Schistosoma japonicum</i>	4,00E-08	382	1	Sí	Dominio en espiral que contienen las proteínas 86
DdA_183	Hipotética proteína CLF_109081	GAA52913	<i>Clonorchis sinensis</i>	4,00E-23	575	1	No	No
DdA_184	Cadena ligera de dineína	CAX70486	<i>Schistosoma japonicum</i>	4,00E-48	434	1	Sí	Cadena ligera de dineína, tipo1
DdA_186	Similar a precursor de la proteína ARMET	AAW24701	<i>Schistosoma japonicum</i>	1,00E-28	721	1	Sí	Armet proteína
DdA_189	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 alfa / beta subcomplejo 1	CAX69927	<i>Schistosoma japonicum</i>	3,00E-45	462	1	Sí	Similar a proteína portadora de acilo
DdA_191	Proteína A asociada a proteínas de membrana asociadas a vesículas	GAA37982	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-23	927	1	No	Dominio similar a Papd

Resultados: Genoteca de Expresión

DdA_192	Leucina aminopeptidasa	ABL96624	<i>Paragonimus westermani</i>	7,00E-94	840	1	No	Relacionada con leucina aminopeptidasa
DdA_193	60S proteína ribosomal L31	XP_002576329	<i>Schistosoma japonicum</i>	2,00E-65	458	1	Sí	Proteína ribosomal I31e
DdA_194	Mediador de la transcripción de ARN polimerasa II subunidad 27-B	GAA47172	<i>Clonorchis sinensis</i>	1,00E-132	966	1	Sí	Subunidad 27 del complejo mediador
DdA_195	Proteína no caracterizada	C1LC06	<i>Schistosoma japonicum</i>	7,00E-13	187	1	Sí	No
DdA_197	SJCHGC05342 Proteína	AAX30589	<i>Schistosoma japonicum</i>	1,00E-38	402	1	No	Ubiquitina
DdA_198	Hipotética proteína Smp_155860	CCD79598	<i>Schistosoma mansoni</i>	1,00E-53	1054	1	Sí	No
DdA_199	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	GAA28380	<i>Clonorchis sinensis</i>	0.0	1172	1	Sí	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, NAD (P) dominio de unión
DdA_200	Smad1B	AAV80239	<i>Schistosoma mansoni</i>	1,00E-124	929	1	Sí	Similar a dominio Smad
Contig_182	Proteína no caracterizada	AAM55183	<i>Clonorchis sinensis</i>	2,00E-15	426	10	Sí	No
Contig_4	Diacilglicerol quinasa	GAA48893	<i>Clonorchis sinensis</i>	4,00E-48	1014	2	No	No
Contig_60	Catepsina B2	ABM47071	<i>Clonorchis sinensis</i>	4,00E-26	1253	2	No	Peptidasa c1
Contig_40	Proteína vitelina BII	A1E5T4	<i>Fasciola gigantica</i>	3.0×10-31	810	2	No	Síntesis de proteínas de cáscara de huevos trematodos
Contig_179	Mioglobina	P56532	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	1,00E-56	555	3	Sí	Globina

3.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

La búsqueda en las bases de datos, mediante el algoritmo BLASTX, reveló que 103 clústeres (64%) compartían identidad ($e\text{-value} \leq 10^{-5}$) con proteínas o genes previamente descritos, por lo que se anotaron como dichas proteínas. El resto de las secuencias no mostraron homología con ninguna proteína conocida, por ello se denominaron como desconocidas. Las proteínas identificadas en este trabajo se clasificaron según la función molecular, proceso biológico y componente celular, asignados en la base de datos Gene Ontology (Tablas 12, 13 y 14).

Tabla 12. Clasificación de los clusters de EST de adultos de *D. dendriticum*, según el proceso biológico.

Clasificación	Nº Clusters
Metabolismo de los carbohidratos	2
Homeostasis redox	3
Morfogénesis componente celular	4
Organización componente celular	1
Proceso celular	3
Metilación histonas	1
Metabolismo de lípidos y ácidos grasos	2
Metabolismo de nucleótidos, nucleósidos y ácidos nucleicos	1
Metabolismo del fósforo	4
Biosíntesis de prostaglandinas	1
Plegamiento proteico	1
Metabolismo proteico	8
Regulación del splicing del ARNm	1
Respuesta al estrés	3
Biogénesis de ribosomas	1
Factores de transcripción	7
Traducción	5
Transportadores y canales	9
Síntesis de cáscara de huevo de trematodos	3
Desconocidas	98
Total	158

Resultados: Genoteca de Expresión

Tabla 13. Clasificación de los clusters de EST de adultos de *D. dendriticum* según la función molecular.

Clasificación	Nº Clusters
Unión	9
Actividad catalítica	10
Unión a proteínas del citoesqueleto	4
Actividad reguladora de enzimas	5
Actividad motora	1
Receptores	1
Actividad oxidorreductasa	6
ARN splicing	1
Estructural	11
Factor de transcripción	8
Transportadores	2
Desconocidas	100
Total	158

Tabla 14. Clasificación de los clusters de EST de adultos de *D. dendriticum* según el componente celular.

Clasificación	Nº Clusters
Membrana de organela intracelular	1
Parte celular	12
Citoesqueleto	3
Región extracelular	1
Intracelular	1
Membrana	4
Nucleoplasma	2
Organela	7
Membrana organela	3
Complejo proteico	12
Ribosoma	5
Desconocidas	107
Total	158

Resultados: Genoteca de Expresión

3.4. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *D. dendriticum*

3.4.1. Análisis de la secuencia del clon de la Mioglobina

Se aisló un clon (Nº 179) de 561 pb que contenía un ORF completo en el primer marco de lectura de 450 pb. Dicho clon presenta los codones característicos de inicio (ATG) y de parada (TGA) en las posiciones 7 y 456, respectivamente, y la cola de poly-A. La secuencia nucleotídica codifica un péptido de 149 aa, que mostró una masa molecular teórica de 16,2 kDa y un pI teórico de 5,5 (Fig. 32). Esta proteína presentó una homología del 99% con la molécula incompleta de *D. dendriticum* (nº acceso P56532) descrita por Kunz (1975), correspondiente con una mioglobina.

1	AGC	AGC	ATG	GCA	CCG	TTG	ACC	GCA	GCC	GAA	GTC	AGC	AGT	CTG	TTG	45
			M	A	P	L	T	A	A	E	V	S	S	L	L	13
46	GCC	GAG	CTC	GGG	CCG	CAT	GCG	GAA	ACT	CAG	GAG	AAA	AAA	GAA	GCC	90
14	A	E	L	G	P	H	A	E	T	Q	E	K	K	E	A	28
91	CTG	GGT	GTG	TCG	GCA	TAC	AGA	GCA	TTG	TTT	GGG	GCA	AAG	CCG	GAG	135
29	L	G	V	S	A	Y	R	A	L	F	G	A	K	P	E	43
136	TAT	ATT	AAC	TTA	TTC	TCT	AAG	CTT	CAA	GGC	CTT	ACA	ATC	GAC	AAT	180
44	Y	I	N	L	F	S	K	L	Q	G	L	T	I	D	N	58
181	GTG	TTC	GAC	TCG	AGC	GGC	ATA	AAG	TAC	TAC	GGT	GGA	ACG	TTG	GTA	225
59	V	F	D	S	S	G	I	K	Y	Y	G	G	T	L	V	73
226	GAC	GAG	TTC	GTA	AAG	ATC	GTG	CAG	GCA	GCT	GCT	GAT	GAT	GCG	GCC	270
74	D	E	F	V	K	I	V	Q	A	A	A	D	D	A	A	88
271	CTG	AGT	AAA	GTT	CTC	GAG	GAT	AAT	GGC	AAG	GCT	CAT	ACA	ACC	CGA	315
89	L	S	K	V	L	E	D	N	G	K	A	H	T	T	R	103
316	AAC	GTC	AAC	AAA	GAA	CAA	TTT	CTA	AGT	GGG	GAG	CCA	ATA	TTT	GTC	360
104	N	V	N	K	E	Q	F	L	S	G	E	P	I	F	V	118
361	GAC	TTC	TTC	AAG	AAA	ACC	TTA	AGC	AAC	GCA	CAA	AAC	GTA	GAG	GCA	405
119	D	F	F	K	K	T	L	S	N	A	Q	N	V	E	A	133
406	ATG	GAG	AAA	TTG	TTG	CAC	CAT	ATT	TTT	CCA	ATT	ATT	GCT	GCT	CAC	450
134	M	E	K	L	L	H	H	I	F	P	I	I	A	A	H	148
451	CTC	TGA	TGT	GCA	TTC	CAT	CAC	GAA	TGA	TCA	CAA	CCC	GAT	TTT	ACT	495
149	L	*														
496	CTA	CTC	TGG	CTT	GCA	TGA	ATG	AGC	AAT	AAA	GTG	ATT	CTT	aaa	aAA	540
541	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA											555

Fig. 31. Secuencia nucleotídica (nt) y aminoacídica (aa) deducida de la molécula DdA_179. La parte sombreada en amarillo corresponde al ATG de inicio y al codón de parada (TGA). La secuencia nucleotídica está formada por 561 (nt), la aminoacídica por 149 (aa) y presenta cola de poly-A.

Resultados: Genoteca de Expresión

No se detectaron ni dominios transmembrana, ni péptidos señal en la molécula. En la base de datos “Conserved Domains Search” se identificaron los 11 dominios conservados que forman el sitio de unión al grupo hemo, característico de la familia de las globinas. Éstas forman una familia de proteínas globulares, que se cree que comparten un ancestro común. El programa para la predicción de la estructura secundaria indicó la presencia de 8 hélices en la molécula, plegamiento característico de las globinas (Fig. 33).

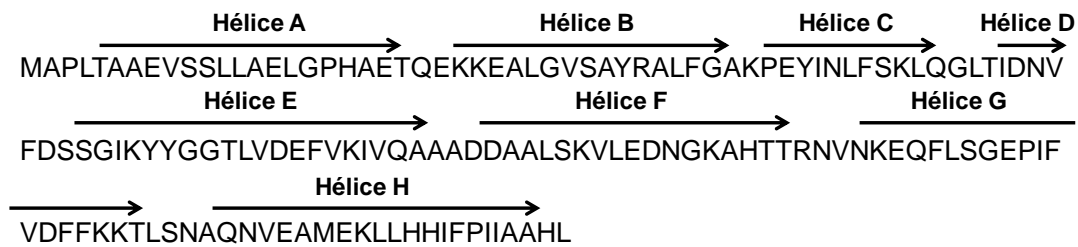


Fig. 32. Estructura secundaria helicoidal deducida por el software PredictProtein. Las flechas indican la posición de cada hélice.

El análisis de la secuencia realizado con el programa Protean (Laseregene) muestra los índices hidrofílico y antigénico, así como la probabilidad de encontrarse en la superficie de la molécula (Fig. 34).

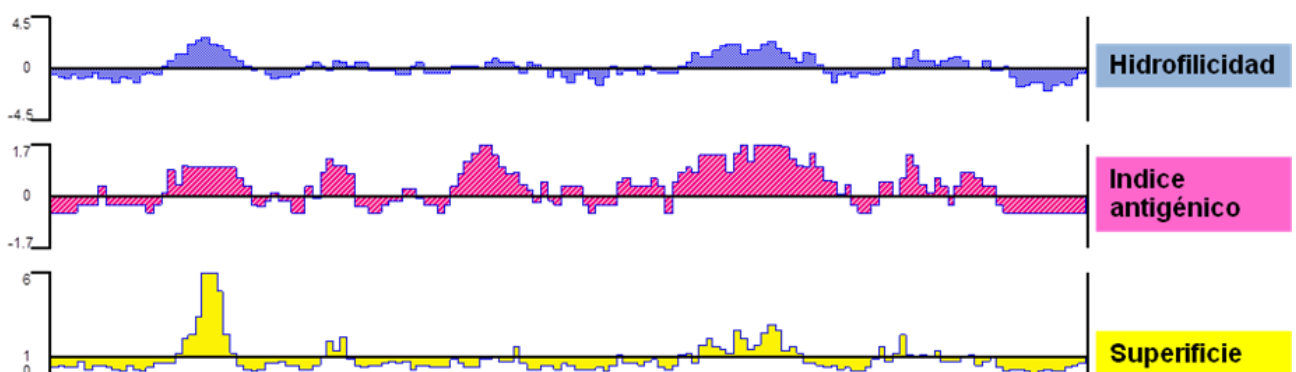


Fig. 33. Análisis realizado con el Programa Protean (Laseregene) de la mioglobina, en el que se señalan la hidrofilidad, el índice antigénico (Jameson-Wolf) y la probabilidad de estar en superficie.

Resultados: Genoteca de Expresión

Se realizó un alineamiento con las secuencias aminoacídicas de 9 mioglobinas de otros trematodos (*F. hepatica*; *P. westermani* 1; *P. westermani* 2; *C. sinensis* 1; *C. sinensis* 2; *P. eplicitum*; *S. japonicum*; *S. mansoni*; secuencia parcial de *D. dendriticum*) utilizando el programa ClustaW2. El alineamiento demostró que la secuencia deducida contenía el característico residuo de tirosina en las posiciones helicoidales B10 y E7, propias de las mioglobinas de los trematodos (Fig. 35). Estas sustituciones las diferencian de las mioglobinas de otros organismos. En dicha Figura se señalan los 11 aminoácidos que forman el sitio de unión al grupo hemo.

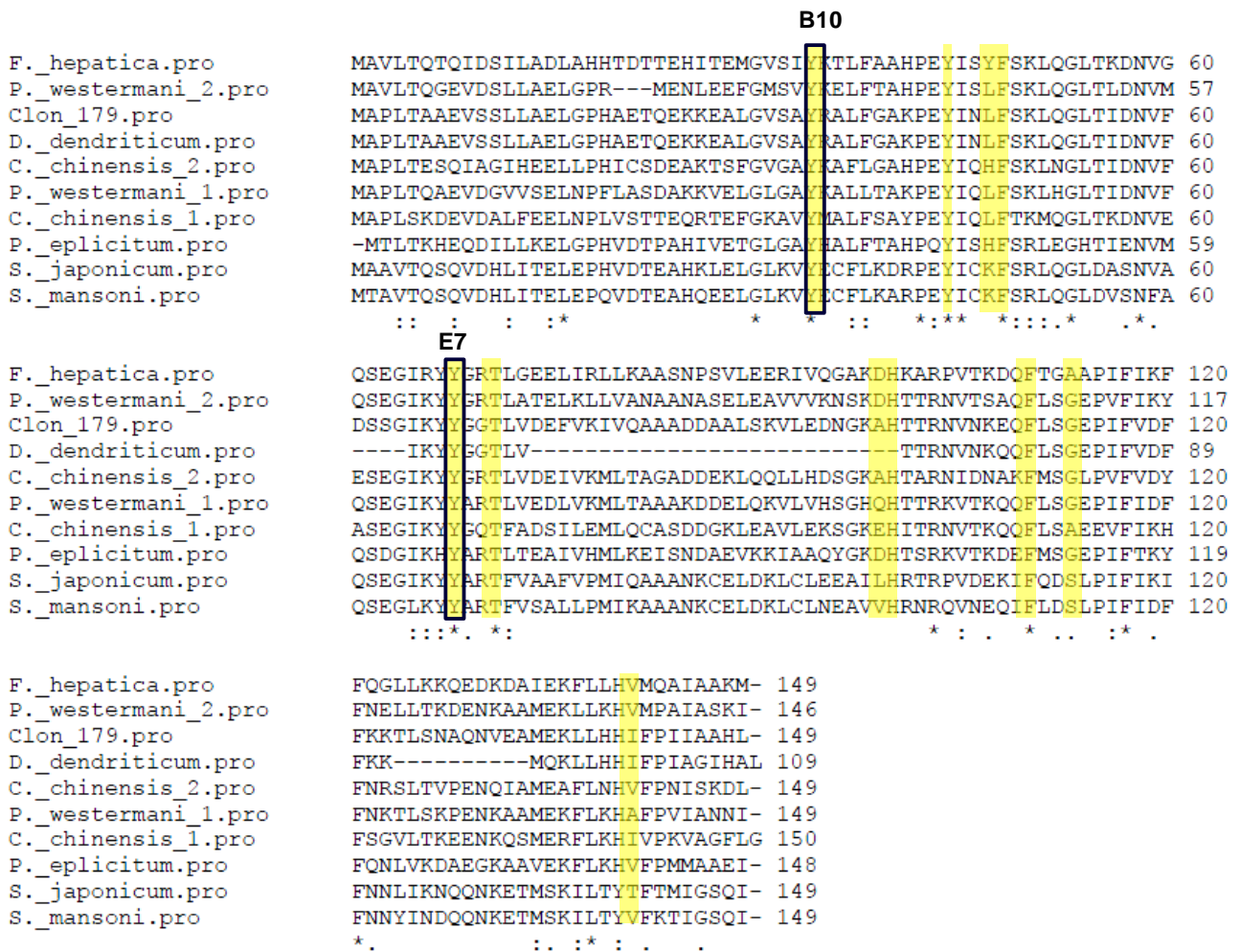


Fig. 34. Alineamiento múltiple de la mioglobina (Clon_179) con 9 globinas de otros trematodos. Los residuos conservados se indican con un asterisco (*), las sustituciones semiconservativas con dos puntos (:), y las no conservativas con un punto (.). Los 11 aminoácidos que forman el sitio de unión al grupo hemo se señalan en amarillo. Los aminoácidos de las posiciones helicoidales B10 y E7 están se indican con un recuadro.

Resultados: Genoteca de Expresión

El modelado de la estructura tridimensional se realizó por homología con la hemoglobina de *P. epiclitum* (Nº acceso: 1KFR), por ser la molécula con estructura 3D conocida con la que presenta mayor identidad (45%) (Fig. 36). Las mioglobinas de los trematodos son monómeros, que forman proteínas extremadamente compactas y globulares. En ellas, la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos se localizan en el interior, formando una cavidad donde se encuentra el grupo prostético hemo. Esta unidad no polipeptídica se encuentra unida de manera no covalente a la mioglobina y es esencial para la actividad biológica de unión al O₂ de la proteína.

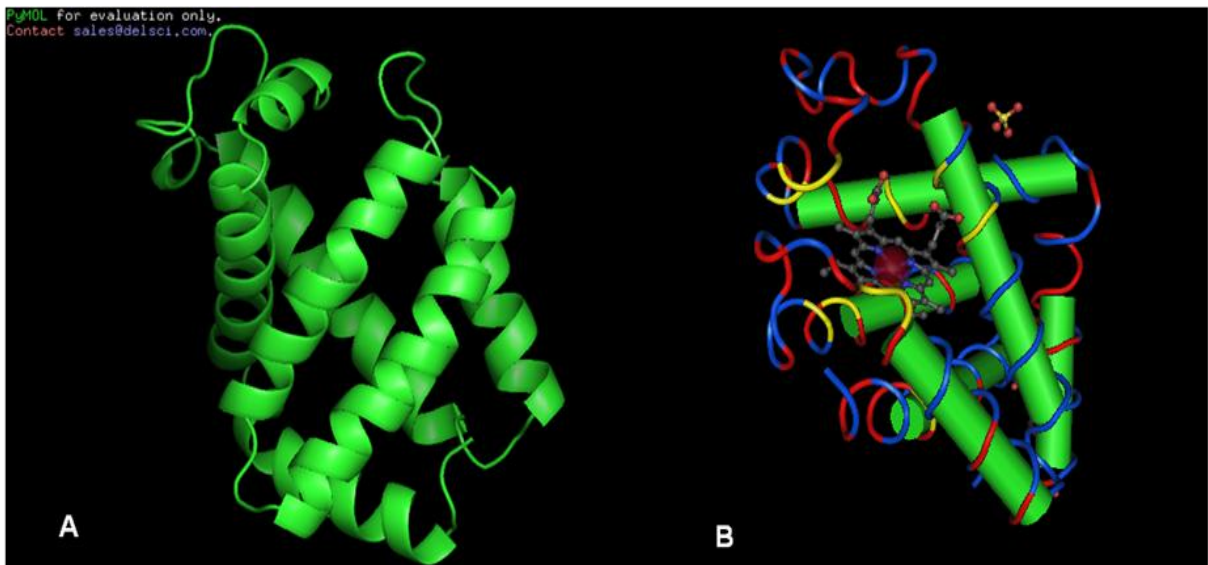


Fig. 35. A) Modelo tridimensional (3D) de la mioglobina de *D. dendriticum*. **B)** Modelo 3D de una subunidad de hemoglobina de *P. epiclitum*, en el que se ha basado la estructura 3D de la mioglobina de *D. dendriticum*. Los aminoácidos que intervienen en la unión del “grupo hemo” se representan en color amarillo, las hélices alfa con tubos verdes y los aminoácidos que están conservados en ambas especies de color rojo.

Se comprobaron los valores Qmean y Z-score para la evaluación del modelo. El valor Qmean mide los errores de modelo comparándolo con los modelos no redundantes del mismo tamaño, estimando su fiabilidad entre 0-1 (0-100%). El Z-score medio de un modelo de Rayos X de alta resolución es de 0. El valor Qmean obtenido para el modelo teórico fue de 0,66 (valores cercanos a uno significan mejor estructura) y el valor Z-score: -1,446 (valores próximos a 0 significan un modelo más apropiado).

Resultados: Genoteca de Expresión

3.4.2. Análisis de la secuencia del clon de la proteína 8-kDa

Se aisló un gen de 426 pb (Nº 182_DdA), de la genoteca de expresión, que contenía un ORF consistente completo en el tercer marco de lectura, formado por 273 pb. Presentó un posible codón de inicio (ATG) en la posición 15, uno de terminación (TAG) en la posición 287 y la cola de poliadeninas en el extremo 3'. El gen codifica una proteína de 90 aa, que contiene un péptido señal de 20 aa (Fig. 37). La proteína mostró una masa molecular teórica de 8,2 kDa y un pI de 9,1.

3	GAA	ATC	CTC	AAC	ATG	CGA	GGC	ATC	ATA	CTA	TTC	TGT	CTC	TTT	GTC	47
					M	R	G	I	I	L	F	C	L	F	V	10
48	TCC	ATA	CTT	ATG	GTT	TAT	TCC	CGT	GCT	GCA	CCA	AGT	GAA	GAA	AGC	92
11	S	I	L	M	V	Y	S	R	A	A	P	S	E	E	S	25
93	CGG	GAG	AAA	TTG	CGC	GAC	AGT	GCG	TCA	CGC	CTT	CGT	GAA	ACG	TTG	137
26	R	E	K	L	R	D	S	A	S	R	L	R	E	T	L	40
138	GAA	AAG	GTG	TTC	CAG	AAT	CTT	CGA	GAG	AAG	TTG	AAG	GAG	AAA	TTA	182
41	E	K	V	F	Q	N	L	R	E	K	L	K	E	K	L	55
183	GAA	GCG	TAT	CTG	GCT	CAG	GAT	GRT	TTG	GGT	GAG	AAG	CTG	GCA	GAS	227
56	E	A	Y	L	A	Q	D	X	L	G	E	K	L	A	X	70
228	GTG	ACC	AAA	ATA	TTT	CTC	GAG	CGT	CTM	AAT	CAA	AGG	TTG	CAG	AAG	272
71	V	T	K	I	F	L	E	R	X	N	Q	R	L	Q	K	85
273	TAT	GTG	GMC	AAG	TAG	ATG	GTT	GAT	AGT	TAA	CAT	CAA	GAG	ACK	ATT	317
86	Y	V	X	K	*											
318	CTA	CCC	TCC	TYG	RTG	TGC	ACT	AGC	AAC	AGC	TTT	GCT	AAC	CCA	TCC	362
363	ACT	GTA	CCA	ACC	ATT	TAG	CTT	CAC	TGC	AAT	ACA	GAT	TCT	GAT	GTA	407
408	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	425								

Fig. 36. Secuencia nucleotídica (nt) y aminoacídica (aa) deducida de la molécula DdA_182. La parte sombreada en amarillo corresponde al ATG de inicio y al codón de parada (TGA). La secuencia nucleotídica está formada por 426 (nt), la aminoacídica por 90 (aa) y presenta cola de poly-A.

El programa para la predicción de la estructura secundaria indicó la presencia predominante de hélices en la molécula (Fig. 38).



Fig. 37. Estructura secundaria helicoidal de la proteína 8-kDa deducida por el software PredictProtein. Las flechas indican la posición de cada hélice.

Resultados: Genoteca de Expresión

No se encontraron dominios conservados en la base de datos CDD (NCBI). Tampoco se detectó ningún dominio transmembrana. El programa Protean (Lasergene) muestra el elevado índice de hidrofiliidad y antigenicidad de la proteína. En la imagen se observa también la presencia del péptido señal en el extremo 5' (Fig. 39).

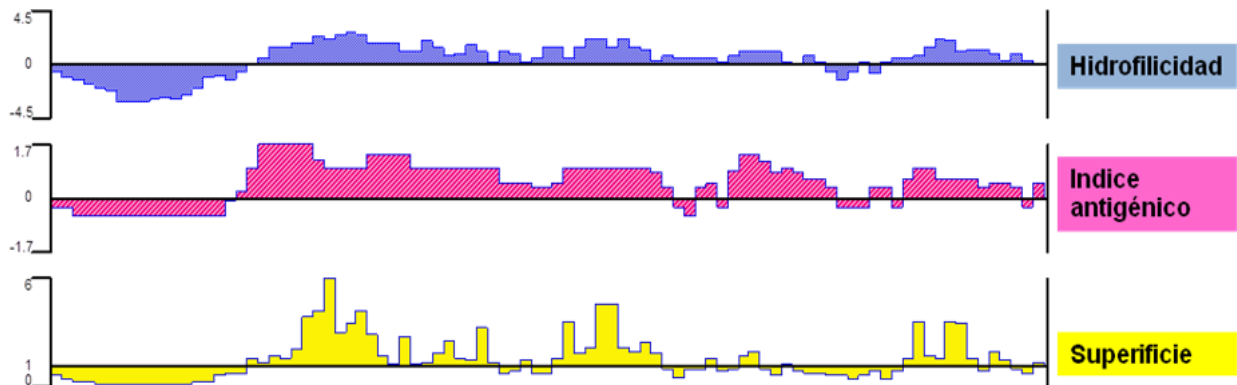


Fig. 38. Análisis realizado con el Programa Protean (Lasergene) de la proteína 8-kDa, en el que se señalan la hidrofiliidad, el índice antigénico (Jameson-Wolf) y la probabilidad de estar en superficie.

Se comparó la secuencia aminoacídica obtenida con aquellas secuencias presentes en las bases de datos, mediante el algoritmo BLASTP (NCBI). Se obtuvo un $e\text{-value}=2e-15$ de homología con una proteína de 7-kDa de *C. sinensis* (nº acceso: AAM55183). La secuencia fue asimismo comparada con la proteína de *F. hepatica* depositada en las bases de datos, con el programa ClustalW2 (Fig. 40).

```
MF6p_F._hepatica.pro      MRFIVLLCLAVLLAAYVEARPSEESREKLRESGRKMVKALRDAVTKAYEKARDRAMAYL 60
C._sinensis.pro          MRLTVFICLVFVLFVAHAEARPSEETRAKLRESGQKLWTAVVAAAARKCAERVRQRIEAYL 60
Clone_182.pro            MRGIILFCLFVSIILMVYSRAAPSEESREKLKRDASRLRETLEKVFQNLREKLKEKLEAYL 60
                          **  :::**  .  ::  .  *  *****  *  ***  *  .  ::  ::  .  :  *  :  ::  **

MF6p_F._hepatica.pro      AKDNLGEKITEVITILLNRLTDRLEKYAGN 90
C._sinensis.pro          EKDNLGEKIAEVVKILSERLTKRIETYVGE 90
Clone_182.pro            AQDDLGEKLADVTKIFLERLNQRLQKYVAK 90
                          *:*****:::*  .*  :**..*::.*..:
```

Fig. 39. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de la proteína 8-kDa de *D. dendriticum* (clon 182) y de las proteínas de *C. sinensis* (AAM55183.1) y de *F. hepatica* (CCA61804.1). La región del péptido señal está marcada con un recuadro gris. Los residuos conservados se indican con un asterisco (*), las sustituciones semiconservativas con dos puntos (:) y las no conservativas con un punto (.).

Resultados: Genoteca de Expresión

No se pudo realizar el modelado de la estructura tridimensional de la molécula de 8-kDa debido a que el porcentaje de homología entre la proteína y las plantillas de modelado estaba por debajo de lo recomendado. Dicho porcentaje debe ser superior al 30% para hacer modelos por homología *in silico*.

3.4.3. Análisis de la secuencia del clon de la proteína Cistatina

Se aisló otro clon de la genoteca de expresión de una longitud de 525 pb, que presentaba la cola de poly-A en el extremo 3'. La secuencia se tradujo en los 6 posibles marcos de lectura con la herramienta de análisis ORF finder (NCBI). Se encontró un ORF sólido en el segundo marco de lectura, de una longitud de 378 pb, con un codón de inicio (ATG) en la posición 32 y un codón de parada (TGA) en la posición 409 (Fig. 41). Dicho gen codifica un péptido de 125 aa, que presenta una masa molecular teórica de 13,7 kDa y un pI de 6,8. Se detectó la presencia de un péptido señal de 17 aa, con el software SignalP. No se detectó ningún dominio transmembrana.

1	^^G	GGT	TTT	CAC	AGC	ATA	TCG	GTT	GAA	AGC	AGC	ATG	CAT	CTT	TCA	45
												M	H	L	S	4
46	CTT	ACT	TGT	CTC	CTG	TCA	CTG	TGC	CTT	TCT	GTG	CAA	CAC	CTT	CCA	90
5	L	T	C	L	L	S	L	C	L	S	V	Q	H	L	P	19
91	TGC	TTT	ACT	GGA	ATG	CGC	ATG	CTC	GGA	GGG	TTC	ACT	GAT	CCA	TGC	135
20	C	F	T	G	M	R	M	L	G	G	F	T	D	P	C	34
136	GCA	CCA	AGC	GAG	GAA	CAA	CGG	TTA	ATT	TAC	CTG	CCC	ATA	CTT	CAA	180
35	A	P	S	E	E	Q	R	L	I	Y	L	P	I	L	Q	49
181	GCC	AAG	CTG	GCA	GCA	GAT	GGA	AGC	ACG	CAA	CTA	AAT	CCT	TCT	GAG	225
50	A	K	L	A	A	D	G	S	T	Q	L	N	P	S	E	64
226	CTA	TTA	AGC	GTC	TCT	ACA	CAA	GTC	GTC	GCC	GGA	ACA	AAT	TAC	AAG	270
65	L	L	S	V	S	T	Q	V	V	A	G	T	N	Y	K	79
271	TTT	GTG	GTC	AAA	TTC	AAT	GAA	GAC	GCT	TGC	ACG	GAA	CTC	AAA	TTC	315
80	F	V	V	K	F	N	E	D	A	C	T	E	L	K	F	94
316	TAT	CAA	GCC	CTT	GGC	GAA	CCG	CTG	CAT	ACG	ATG	CGT	TCA	ACC	GGC	360
95	Y	Q	A	L	G	E	P	L	H	T	M	R	S	T	G	109
361	AGC	AAG	ACA	GTG	CCA	TGC	ATT	CAA	CCT	CTC	TCG	CAA	TGT	AGG	CCT	405
110	S	K	T	V	P	C	I	Q	P	L	S	Q	C	R	P	124
406	ATT	TGA	CGA	TTT	TGA	CCT	AAA	CGA	TCT	TTT	ACT	TTC	CTT	TCC	TTA	450
125	I	*														
451	ATT	TCT	CAC	GTC	CGT	ATG	GCC	TAT	CCT	TCG	CAC	ATT	TTA	AAT	GCA	495
496	AGT	TCA	ATC	GGT	TAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	525				

Fig. 40. Secuencia nucleotídica (nt) y aminoacídica (aa) deducida de la molécula DdA_151. La parte sombreada en amarillo corresponde al ATG de inicio y al codón de parada (TGA). La secuencia nucleotídica está formada por 525 (nt), la aminoacídica por 125 (aa) y presenta cola de poly-A.

Resultados: Genoteca de Expresión

La predicción de la estructura secundaria con el programa PredictProtein señaló que se trata de una proteína mixta con 2 hélices alfa y 3 láminas beta (Fig. 42).

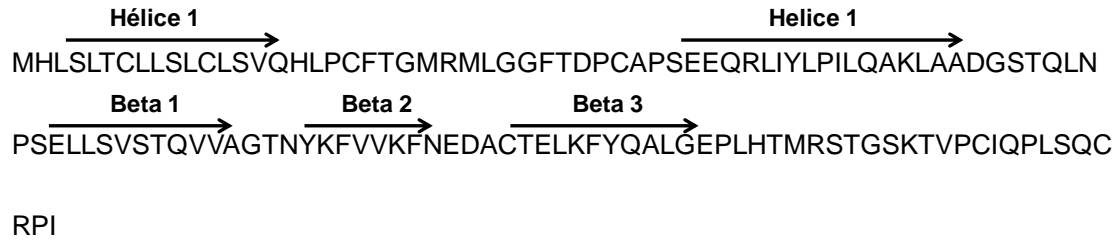


Fig. 41. Estructura secundaria de la proteína cistatina deducida por el software PredictProtein. Las flechas indican la posición de las hélices- α y las láminas- β .

El análisis de la secuencia con el programa Protean (Lasergene) se muestra en la Figura 43. Se observa la hidrofiliidad de la proteína, el elevado índice antigénico y la probabilidad de encontrarse en la superficie de la molécula. En el extremo 5' se observa también la presencia de un péptido señal.

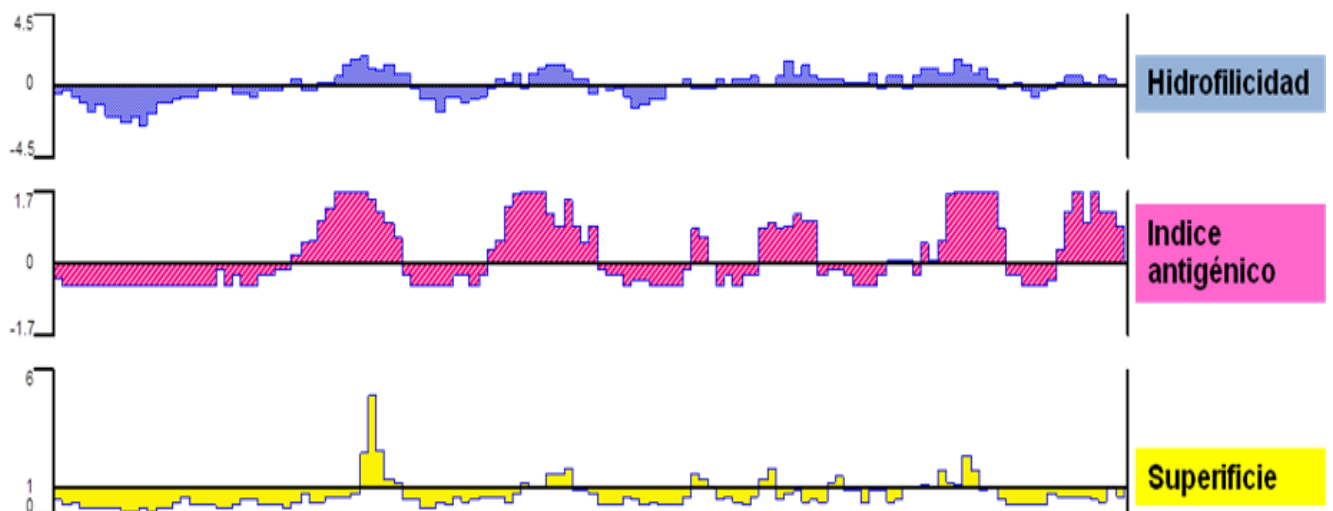


Fig. 42. Análisis de la cistatina de *D. dendriticum* realizado con el Programa Protean (Lasergene). En él que se señalan la hidrofiliidad, el índice antigénico (Jameson-Wolf) y la probabilidad de estar en superficie.

Se detectó un dominio conservado cistatina, señalado en amarillo en la Figura 44. Los resultados del BLAST en la base de datos MEROPS indicaron que pertenece a la

Resultados: Genoteca de Expresión

familia de inhibidores I25. Esta familia de proteínas inhibe principalmente a las peptidasas C1 (familia de las papaínas) y C13 (familia de las legumainas).

Al realizar una búsqueda en las bases de datos de la secuencia peptídica, se encontró una homología del 43% con una cistatina tipo I, descrita previamente en *F. gigantea* (nº acceso: AFV53480). En la Figura 44 se muestra el alineamiento con otras cistatinas presentes en las bases de datos.

```

F._gigantica.pro      -----MFRILFGICILHLMSCDVFGEMLVGGYTEPRSVTSEERSVFRPM 44
F.hepatica.pro       -----MLRILLGICILHFMSCDVFGEMLVGGYTEPRSVTPEERSVFQPM 44
C.sinensis1.pro      MTSTRLAFAWRELFVFCYLLYTSDILAERHNNHPVMPICGGISAARIPTADEKKKLEPV 60
C.sinensis2.pro      --MARLP-----CILLVHAPYLFRNLNTNCSIMPLCGGVGDARTPTPEEKKLENV 48
O.ochengi.pro       -----MESKTGENQDRPVLLGGWEDRDPKDEEILELLPSI 35
O.volvulus.pro       -----MESKTGENQDRPVLLGGWEDADPKDEEILELLPSR 35
Clon_151_pro.pro     -----MHLSLTCLLSLCLSVQHLPCFTGMRMLGGFTDPCAPSEEQRLLIYLPI 47
                        :                               : **                               :

F._gigantica.pro      ILSKFLT TGSV ESSCELELLQVSTQVVAGTNYKFKVSGGATCP--GCWEVVVFVPLYSSK 102
F.hepatica.pro       ILSKLLTAGSV ESSCELELLQVSTQVVAGIN YKFKVSGGATCP--GCWEVVVFVPLYSSK 102
C.sinensis1.pro      LLQSLY AHLGSKP-TSAEVVLVATQVVAGTNYFAKVKNNDHY--IHRVYEQLP CYGGA 117
C.sinensis2.pro      LHQSLHEHLGSKP-DSLEVQVATQIVSGTNYFAKVKLN GDKY--VHARIYEKLPCHGGT 105
O.ochengi.pro       LMKVNEQSNDEYHLMPIKLLKVS SQVVAGV KYKMDVQVAR SQCKKSSNEKVDLTKCKKLE 95
O.volvulus.pro       LMKVNEQSNDENHLMPIKLLKVS SQVVAGV KYKMDVQVAR SQCKKSSNEKVDLTMCKKLE 95
Clon_151_pro.pro     LQAKLAAD-GSTQLNPSELLSVSTQVVAGTNYKFVVKFNEDACTELKFYQALGEP LHTMR 106
                        : . . . . . : : : * : * : * : * * * .

F._gigantica.pro      AATSVGTPTRVSCT----- 116
F.hepatica.pro       SATSVGTPTRVSCT----- 116
C.sinensis1.pro      LELHSVQMNKTDTDPLDYF----- 136
C.sinensis2.pro      TELHSIQKDKTHADPLGYF----- 124
O.ochengi.pro       GHPEKVM TLEVWEK PWENFMRVEILGTKEV 125
O.volvulus.pro       GHPEKVM TLEVWEK PWENFMRVEILGTKEV 125
Clon_151_pro.pro     STGSKTVPCIQPLSQCRPI----- 125
    
```

Fig. 43. Alineamiento múltiple de la cistatina de *D. dendriticum* (clon 151) y otras especies. La región del péptido señal está marcada con un recuadro gris y el sitio conservado de inhibición de proteasas en amarillo. Los residuos conservados se indican con un asterisco (*), las sustituciones semiconservativas con dos puntos (:) y las no conservativas con un punto (.).

En las bases de datos no se encontraron moléculas con estructura conocida que presentaran una homología suficiente, para servir de plantillas en el modelado de la estructura tridimensional de la cistatina.

3.4.4. Clonación en vectores de expresión

Se realizó la clonación, por duplicado, de las tres moléculas descritas en los apartados anteriores, utilizando los vectores de expresión pRSET-A y pGEX-6P-2, con el fin de

Resultados: Genoteca de Expresión

obtener los antígenos recombinantes. Para ello, se realizó la amplificación de los fragmentos mediante PCR, con los cebadores específicos. Posteriormente fueron digeridos, junto con los vectores de expresión, utilizando las endonucleasas correspondientes. En los casos de los clones 182 y 151, que presentaban péptido señal, se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos sin dicho péptido, debido a su carácter hidrofóbico. En la Figura 45, utilizada para calcular la cantidad de inserto de la reacción posterior de ligación, se observan los insertos después de la digestión.

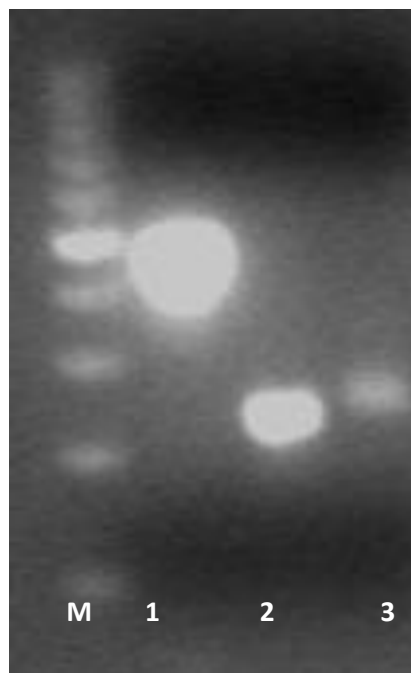


Fig. 44. Productos de amplificación de PCR de los clones 179, 182 y 151, tras ser digeridos con endonucleasas, en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio: M/ Marcador de ADN de bajo peso molecular; 1/ inserto del clon 179; 2/ inserto del clon 182; 3/ inserto del clon 151.

3.4.5. Inducción y expresión de las proteínas de fusión

Después de la ligación de los insertos en los vectores de expresión y la transformación de las células *E. coli* XL1-Blue MRF', se comprobó mediante PCR y posterior secuenciación, que se había realizado en el marco de lectura correcto. Posteriormente, se procedió a probar las condiciones de inducción de las proteínas recombinantes, para lo cual se probaron concentraciones de 1 y 0,5 mM del agente inductor IPTG, así como tiempos y temperaturas de inducción de 16°C durante toda la noche y 37°C durante 4 h.

Resultados: Genoteca de Expresión

En el caso de la expresión de proteínas en el vector pRSET-A, tan solo se produjo la síntesis de la cistatina obteniendo los mejores resultados en el cultivo a 37°C durante 4h. Los resultados fueron similares al realizar la inducción con concentraciones de 1 mM ó 0,5 mM de IPTG. Sin embargo, esta proteína resultó ser completamente insoluble (Fig. 46).

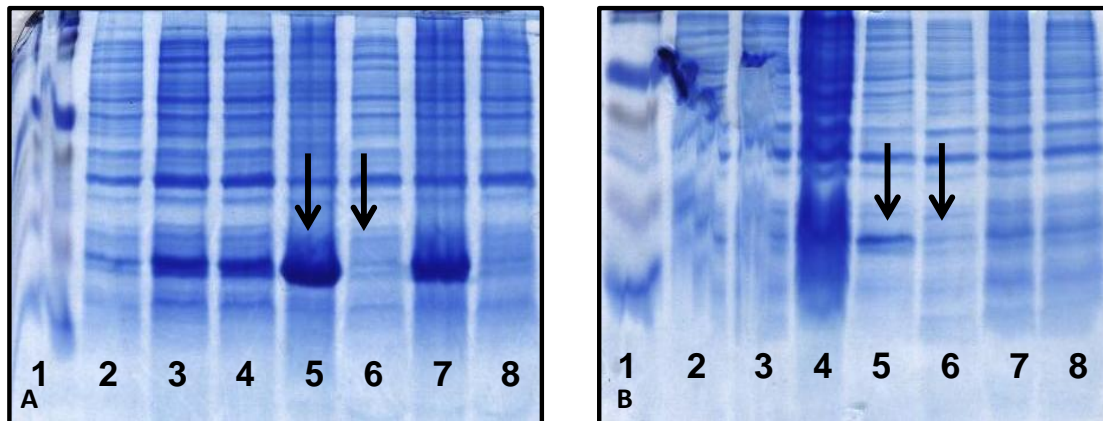


Fig. 45. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, teñidos con Coomassie coloidal. Inducción del clon 151 en el vector pRSET-A a 37°C (Fig. A) y a 16°C (Fig. B): 1/Marcador de peso molecular; 2/ extracto proteico no inducido (NI); 3/ extracto proteico con 0,5 mM IPTG; 4/ extracto proteico inducido con 1 mM IPTG; 5/ extracto proteico insoluble inducido con 1mM IPTG; 6/ extracto proteico soluble inducido con 1 mM IPTG; 7/ extracto proteico insoluble inducido con 0,5 mM IPTG; 8/ extracto proteico soluble inducido con 0,5 mM IPTG.

En el vector pGEX-6P-2 se obtuvieron los mejores resultados, en todos los casos, con las siguientes condiciones de inducción: 37°C durante 4h y concentración de 1mM de IPTG. A continuación, se muestran las imágenes de las inducciones de las proteínas recombinantes tras la separación electroforética en geles de poliacrilamida (Figs. 47, 48, 49). En todos los casos las proteínas mayoritarias de los extractos de *E. coli*, después de la inducción, se corresponden con las proteínas de fusión expresadas en el vector. Los pesos moleculares de las proteínas recombinantes fueron:

- Clon 179: 44 kDa (28 kDa GST + 16 kDa mioglobina)
- Clon 182: 36 kDa (28 kDa GST + 8 kDa prot 8-kDa)
- Clon 151: 39,8 kDa (28 kDa GST + 11,8 kDa cistatina)

Resultados: Genoteca de Expresión

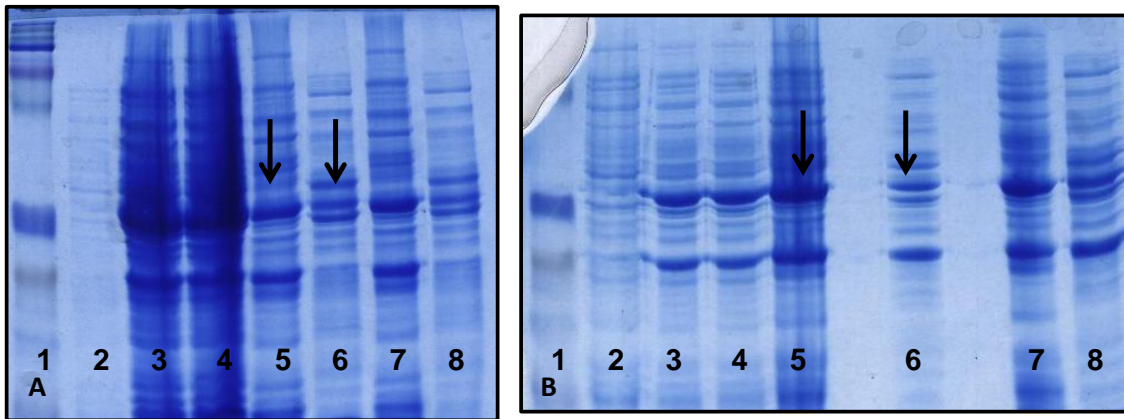


Fig. 46. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, teñidos con Coomassie coloidal. Inducción del clon 179 en el vector pGEX-6P-2 a 37°C (Fig. 47A) y a 16°C (Fig. 47B): 1/ Marcador de peso molecular; 2/ extracto proteico no inducido (NI); 3/ extracto proteico con 0,5 mM IPTG; 4/ extracto proteico inducido con 1 mM IPTG; 5/ extracto proteico insoluble inducido con 1mM IPTG; 6/ extracto proteico soluble inducido con 1 mM IPTG; 7/ extracto proteico insoluble inducido con 0,5 mM IPTG; 8/ extracto proteico soluble inducido con 0,5 mM IPTG.

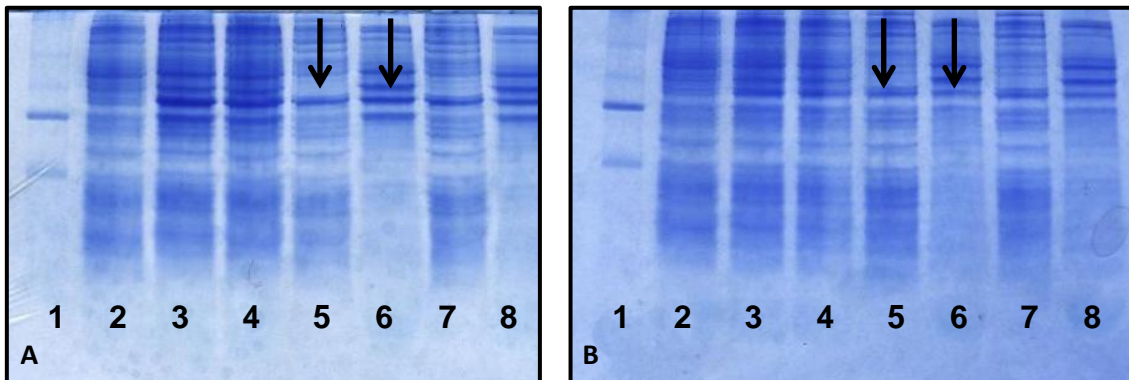


Fig. 47. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, teñidos con Coomassie coloidal. Inducción del clon 182 en el vector pGEX-6P-2 a 37°C (Fig. 48A) y a 16°C (Fig. 48B): 1/Marcador de peso molecular; 2/ extracto proteico no inducido (NI); 3/ extracto proteico con 0,5 mM IPTG; 4/ extracto proteico inducido con 1 mM IPTG; 5/ extracto proteico insoluble inducido con 1mM IPTG; 6/ extracto proteico soluble inducido con 1 mM IPTG; 7/ extracto proteico insoluble inducido con 0,5 mM IPTG; 8/ extracto proteico soluble inducido con 0,5 mM IPTG.

Resultados: Genoteca de Expresión

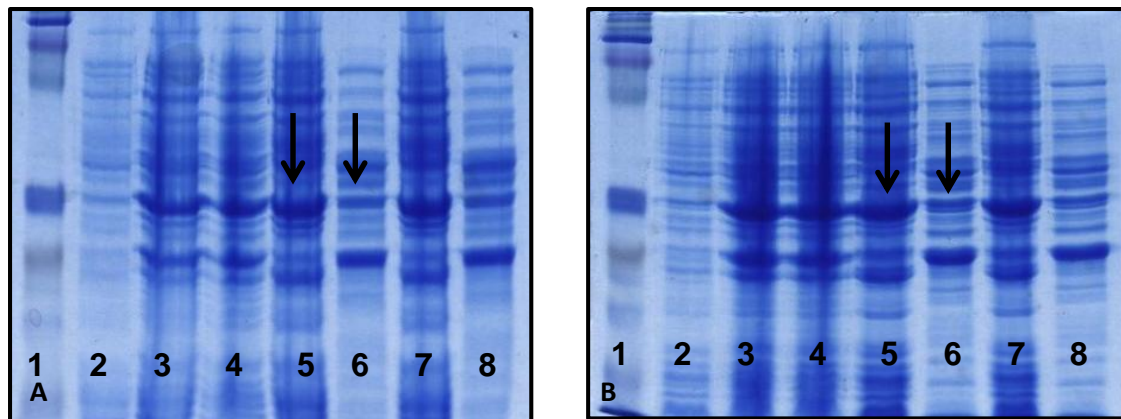


Fig. 48. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, teñidos con Coomassie coloidal. Inducción del clon 151 en el vector pGEX-6P-2 a 37°C (Fig. 49A) y a 16°C (Fig. 49B): 1/Marcador de peso molecular; 2/ extracto proteico no inducido (NI); 3/ extracto proteico con 0,5 mM IPTG; 4/ extracto proteico inducido con 1 mM IPTG; 5/ extracto proteico insoluble inducido con 1mM IPTG; 6/ extracto proteico soluble inducido con 1 mM IPTG; 7/ extracto proteico insoluble inducido con 0,5 mM IPTG; 8/ extracto proteico soluble inducido con 0,5 mM IPTG.

3.4.6. Purificación de las proteínas de fusión

Como se ha descrito en el apartado anterior, en el vector de expresión pRSET-A tan sólo fue posible inducir la expresión de la cistatina, que resultó ser totalmente insoluble, lo que dificulta en gran medida la purificación de la misma. Por este motivo, se decidió purificar las proteínas expresadas en los vectores pGEX-6P-2 fusionadas a GST. La purificación se llevó a cabo en condiciones nativas mediante cromatografía de afinidad. Durante todo el proceso se recogieron distintas fracciones como controles, que fueron después visualizadas en geles de poliacrilamida (Fig. 50). Se realizó un análisis preliminar de inmunorreactividad frente a sueros anti-*D. dendriticum* con las proteínas que estaban fusionadas a GST. Se obtuvieron señales positivas tan solo en los casos de la mioglobina y la proteína de 8-kDa, mientras que la cistatina no mostró ninguna señal. Tras este ensayo preliminar, se realizó la purificación de las dos proteínas recombinantes reactivas, escindiendo la fracción GST con la enzima Prescission Protease.

Resultados: Genoteca de Expresión

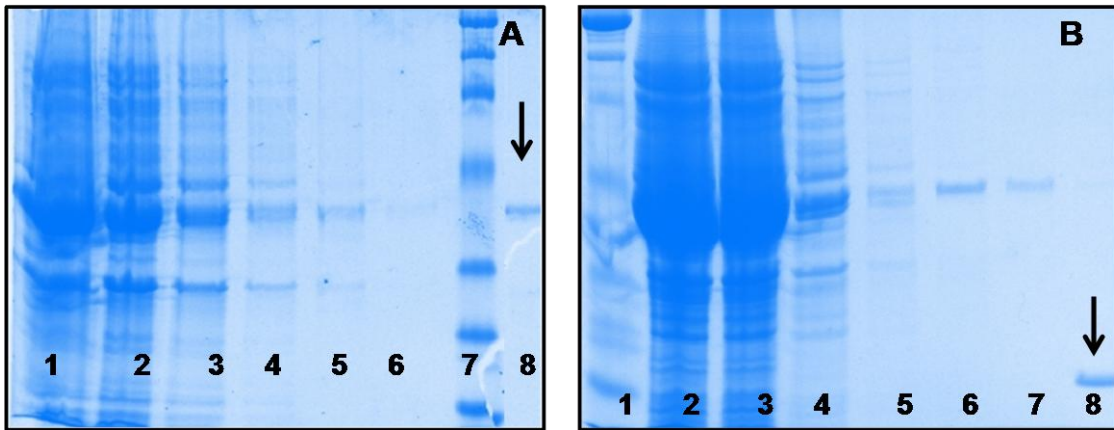


Fig. 49. Análisis de la purificación de la mioglobina en SDS-PAGE al 12%. Fig. 50a. Purificación de la proteína fusionada a GST: 1/ sobrenadante obtenido antes de su unión a la sepharosa; 2/ fracción no enlazada (NE); 3-6/ lavados de la sepharosa; 7/ marcador de peso molecular; 8/ proteína purificada. Fig. 50B. Purificación de la proteína tras su escisión con la enzima Presscision Protease: 1/ Marcador de peso molecular; 2/ sobrenadante; 3/ NE; 4-7/ lavados de la sepharosa; 8/ proteína purificada.

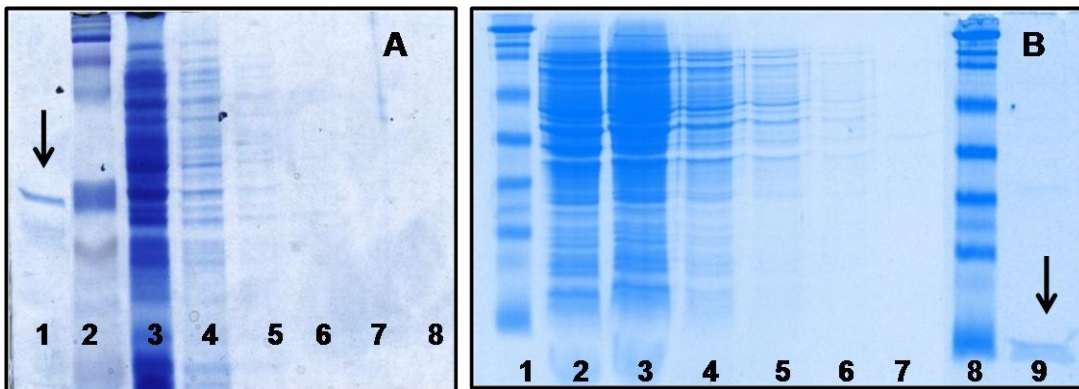


Fig. 50. Análisis de la purificación de la proteína de 8-kDa en SDS-PAGE al 12%. Fig. 51A. Purificación de la proteína fusionada a GST: 1/ proteína purificada; 2/ marcador de peso molecular; 3/ sobrenadante; 4/ NE; 5-8/ lavados de la sepharosa. Fig. 51B. Purificación de la proteína tras su escisión con la enzima Presscision Protease: 1/ Marcador de peso molecular; 2/ sobrenadante; 3/ NE; 4-7/ lavados de la sepharosa; 8/ marcador de peso molecular; 9/ proteína purificada.

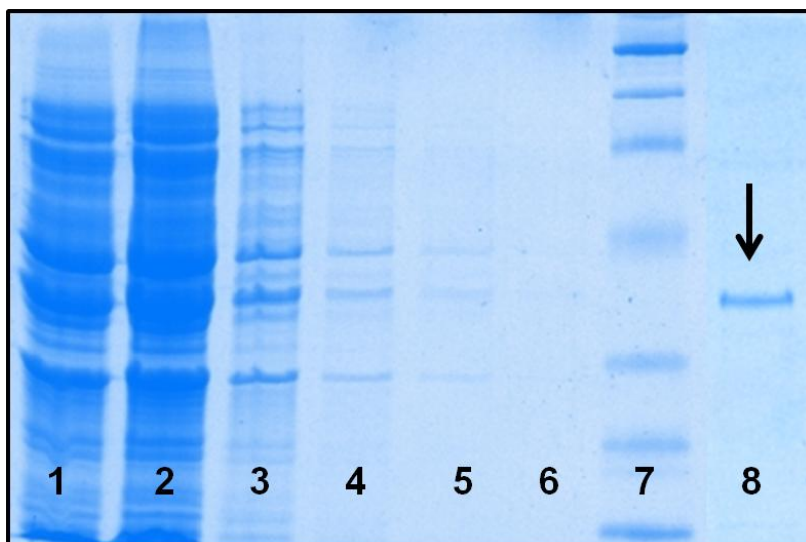


Fig. 51. Análisis de la purificación de la cistatina en SDS-PAGE al 12%: 1/ sobrenadante; 2/ fracción no enlazada (NE), 3-6/ lavados de la sepharosa; 7/ marcador de peso molecular; 8/ proteína purificada.

4. EVALUACIÓN DE LOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DICROCOELIOSIS

Para afrontar el último objetivo de este trabajo de investigación, que trata sobre la evaluación de las proteínas recombinantes para el diagnóstico de la dicrocoeliosis, las tres proteínas obtenidas, fusionadas a GST, se sometieron a un análisis preliminar mediante WB frente a sueros anti-*D. dendriticum*.

Como se mencionó en el apartado anterior, la cistatina no mostró ninguna reacción positiva, por lo que tan sólo se escindió la GST de las proteínas de 8-kDa y de la mioglobina. Una vez escindida la GST se realizó otro WB con ambas proteínas. Únicamente se obtuvieron resultados positivos con la proteína de 8-kDa, mientras que la mioglobina no presentó ninguna reacción positiva. Ante estos resultados preliminares, se procedió a evaluar la proteína de 8-kDa como antígeno potencial para el diagnóstico de la dicrocoeliosis.

Los sueros anti-*D. dendriticum* reaccionaron frente a la proteína de 8-kDa, mientras que los sueros testigos no mostraron ninguna reacción (Fig. 53). Tan solo se observaron reacciones cruzadas con los sueros de corderos infectados con *S. bovis*, mientras que los sueros procedentes de las infecciones experimentales con *F. hepatica*, *C. daubneyi*, *T. circumcincta*, *H. contortus* y *T. colubriformis* no reaccionaron frente al antígeno.

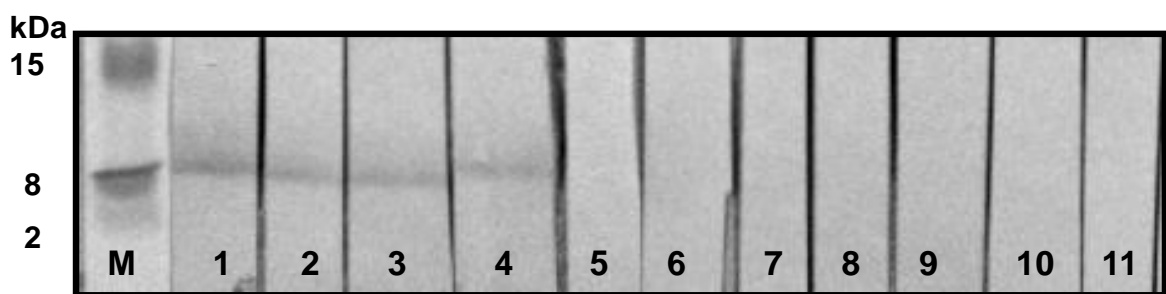


Fig. 52. Análisis de Western Blot de la proteína recombinante de 8-kDa: M/ Marcador de pesos moleculares. Proteína de 8-kDa enfrentada a: 1, 2, 3/ suero ovino anti-*D. dendriticum*; 4/ suero ovino anti-*S. bovis*; 5/ suero ovino anti-*F. hepatica*; 6/ suero ovino anti-*T. circumcincta* ; 7/ suero ovino anti- *H. contortus*; 8/ suero ovino anti- *T. colubriformis*; 9/ suero ovino anti- *C. daubneyi*; 10,11/ Sueros testigo.

4.1. EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA DE 8-kDA PARA EL DIAGNÓSTICO POR ELISA

Tras el ensayo preliminar mediante WB, se analizó por ELISA la utilidad de la proteína de 8-kDa para el diagnóstico de la dicrocoeliosis. Para establecer el valor umbral se utilizaron 20 muestras de corderos positivos a la infección por *D. dendriticum* y 32 de corderos negativos. El valor del punto de corte para diferenciar positivos y negativos fue de 0,47. Tras determinar este valor, se realizó el ensayo con muestras de 6 corderos infectados experimentalmente con *D. dendriticum*, obtenidas en los distintos días p.i. Los sueros de todos los animales fueron positivos a partir del día 30 p.i., alcanzando los máximos valores los días 60 y 180 p.i. La mayor diferencia ($P \leq 0.001$) entre la DO de los corderos infectados y la DO del grupo control se observó el día 180 p.i. Asimismo, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,01$) los días 60, 90, 120 and 150 p.i. (Fig. 54).

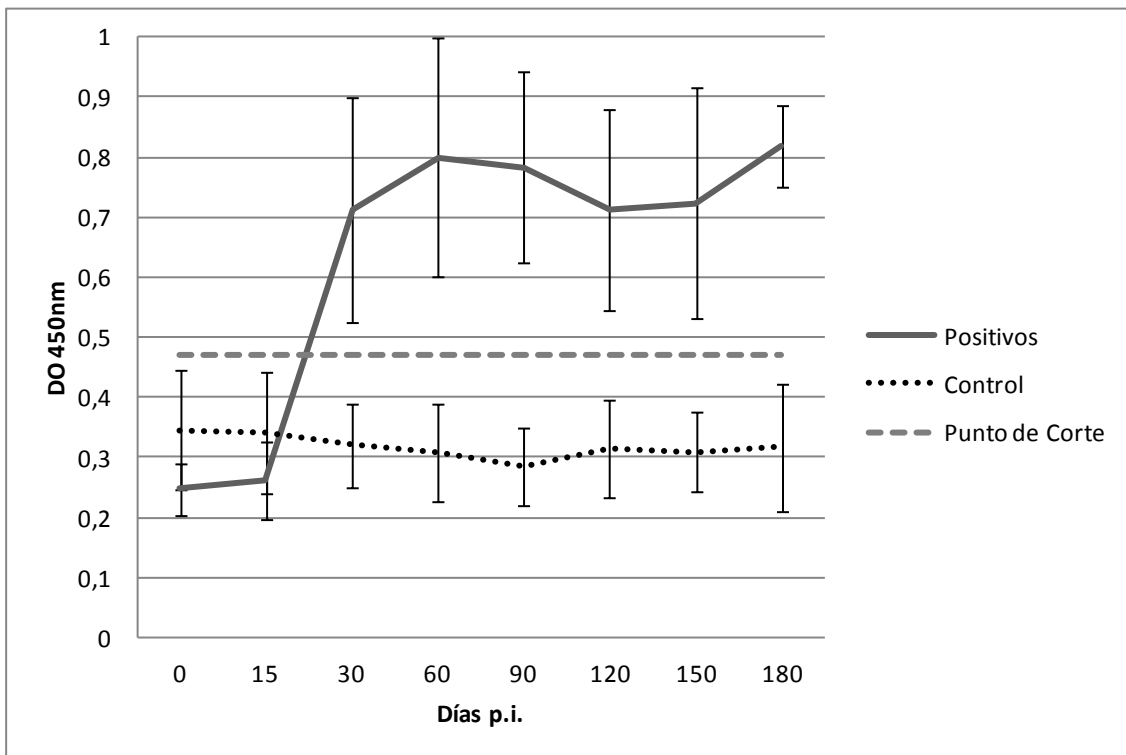


Fig. 53. Media de los valores de la Densidad Óptica (DO) obtenidos de sueros de corderos con anticuerpos anti-*D. dendriticum* enfrentados a la proteína recombinante de 8-kDa, a lo largo del período post-infección; las barras muestran la desviación estándar.

Resultados: Evaluación antígenos recombinantes

En la Tabla 15 se muestran los resultados del ensayo de especificidad del ELISA indirecto frente al antígeno de 8-kDa.

Tabla 15. Detección de IgG en suero de ovejas monoespecífica y experimentalmente infectadas con distintos helmintos, mediante ELISA indirecto, utilizando la proteína recombinante de 8-kDa.

Parásitos	Nº de muestras	Nº positivos al ELISA
<i>Fasciola hepatica</i>	10	1
<i>Schistosoma bovis</i>	10	9
<i>Calicophoron daubneyi</i>	5	0
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	5	0
<i>Haemonchus contortus</i>	2	0
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	2	0

V. DISCUSIÓN

Como se ha comentado previamente, a pesar de la importancia económica y sanitaria de la dicrocoeliosis, tanto el diagnóstico como el control de la enfermedad continúan siendo insatisfactorios. Por ello, ante la escasa información molecular que existe actualmente del parásito, nos planteamos como objetivo principal mejorar el diagnóstico de la infección por *D. dendriticum* tanto en sus hospedadores definitivos como intermediarios, desarrollando para ello diversas técnicas moleculares e inmunológicas con el fin último de poder establecer medidas profilácticas y de control más eficaces. Para conseguir este objetivo general, se han abordado objetivos parciales, cuyos resultados se discuten a continuación.

1. DETECCIÓN DE *D. dendriticum* MEDIANTE PCR EN LOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS

Como ya comentamos con anterioridad, las técnicas microscópicas utilizadas para la identificación de *D. dendriticum* en los hospedadores intermediarios resultan insuficientes y, además, no permiten una detección precoz de la infección, especialmente en los moluscos. Por ello, en este trabajo creímos conveniente abordar el desarrollo y puesta a punto de técnicas moleculares, que permitieran la detección específica y precoz de las fases larvianas de *D. dendriticum* en sus primeros y segundos hospedadores intermediarios. Los resultados positivos obtenidos por nosotros en este estudio, en el que se ha utilizado por vez primera la técnica de PCR para la detección específica y precoz de *D. dendriticum* en los moluscos y hormigas, coinciden con los obtenidos por algunos autores. Así, la técnica de PCR ha sido utilizada satisfactoriamente para la detección de otros parásitos en sus hospedadores intermediarios, tales como: *S. mansoni* en *Biomphalaria* (Hanelt *et al.*, 1997); *F. hepatica* en *G. truncatula* (Kozak & Wedrowicz, 2010); *F. hepatica* en *L. columella* (Magalhaes *et al.*, 2004); *F. hepatica* en *L. columella* y *L. viatrix* (Cucher *et al.*, 2006); *F. gigantea* en *L. natalensis* (Mostafa *et al.*, 2003); *F. gigantea* en *L. auricularia* (Velusamy *et al.*, 2004); *F. hepatica* y *C. daubneyi* en *G. truncatula* (Martínez-Ibeas *et al.*, 2013).

Con la primera PCR diseñada, basada en la utilización del ADN mitocondrial, se amplió un fragmento de 1045 pb de las muestras de *D. dendriticum*, mediante el par de oligonucleótidos generales, diseñado por nosotros a partir de las regiones

Discusión

conservadas de las secuencias mitocondriales de otros parásitos, disponibles en las bases de datos. Dicho fragmento (1045 pb) incluye las secuencias parciales de los genes mitocondriales Cox1, la secuencia completa del tRNA-Thr (Treonina) y parte de la subunidad grande del ARNr. El extremo terminal del gen Cox1 finaliza en el codón TAG, coincidiendo con lo descrito previamente por otros autores en *F. hepatica*, *S. haematobium* y *S. spindale* (Le *et al.*, 2001; Littlewood *et al.*, 2006).

A partir de esta secuencia se diseñó una segunda pareja de cebadores que, en principio, suponíamos que eran específicos de *D. dendriticum*, puesto que permitían detectar dicho parásito en las muestras de moluscos y hormigas infectados. La técnica de PCR desarrollada en este estudio permitió detectar hasta una única metacercaria de *D. dendriticum* extraída del abdomen de una hormiga, así como la infección por la larva cerebral alojada en la cabeza, demostrando así su elevada sensibilidad. Le *et al.* (2002) ya habían señalado que el elevado número de copias del genoma mitocondrial, presentes en la mayoría de las células, posibilita una detección muy sensible del parásito. Además, Vilas *et al.* (2005) expusieron que el ADN mitocondrial es preferible al ITS a la hora de explorar especies crípticas de platelmintos. En el presente estudio, la PCR diseñada utilizando ADNmt permitió discriminar entre las especies *D. chinensis* y *D. dendriticum*. Asimismo, nuestros resultados están en concordancia con lo expuesto por Cucher *et al.* (2006), quienes han diseñado una técnica similar para detectar la infección en moluscos por *F. hepatica*, utilizando como diana para la amplificación la secuencia del gen Cox1. Por otra parte, Zhao *et al.* (2009) desarrollaron una PCR anidada, basada en una secuencia parcial del Cox1 para el diagnóstico molecular de *Heterakis isolonche* y *Glaphyrostomum* sp. en el ave *Gallirallus okinawae*. Los resultados de dicho estudio demostraron que con la técnica de PCR se detectaba un mayor número de individuos infectados que mediante la observación al microscopio.

A pesar de la alta sensibilidad anteriormente mencionada, la técnica de PCR diseñada a partir del ADN mitocondrial no es específica para *D. dendriticum*, puesto que se observaron reacciones cruzadas con el ADN extraído de metacercarias de Brachylaimidae, trematodos procedentes del riñón de las mismas especies de moluscos terrestres, las cuales también actúan como sus hospedadores intermediarios (Manga-González, 1978; 1980; 1982; 1983; Manga-González *et al.*, 1979). Por ello, fue necesario diseñar una segunda pareja de oligonucleótidos específicos a partir de la

Discusión

secuencia del gen ITS-2 de *D. dendriticum*, para la detectar la infección en moluscos. Esta región del ADN nuclear ha demostrado ser un marcador genético especialmente útil en la discriminación de especies de trematodos digenea (Nolan & Cribb, 2005; Otranto *et al.*, 2007; Maurelli *et al.*, 2007; Bazsalovicsova *et al.*, 2010), así como de otros órdenes (Gasser, 2006), debido a que la variación intraespecífica dentro del ITS-2 es baja, mientras que las diferencias interespecíficas son muy elevadas. El fragmento de 167 pb, obtenido después de realizar la PCR, fue secuenciado y mostró una homología del 100% con la secuencia ITS-2 del parásito presente en las bases de datos, lo que confirma la infección por *D. dendriticum* en los moluscos.

La PCR diseñada utilizando el ITS-2 demostró su especificidad permitiendo discriminar entre *D. dendriticum*, *D. chinensis* y Brachylaimidae sp. (probablemente *Brachylaima aspersae* Segade *et al.*, 2010) y otros trematodos (*F. hepatica*, *C. daubneyi*, Plagiorchiidae y Notocotylidae). Algunos autores utilizaron también la secuencia ribosomal ITS-2 para discriminar entre parásitos adultos muy próximos filogenéticamente, tales como: *D. dendriticum*, *D. chinensis* y 20 especies de Plagiorchiidae (Otranto *et al.*, 2007); *D. dendriticum* y *D. hospes* (Maurelli *et al.*, 2007); *D. dendriticum*, *F. hepatica*, *F. magna*, y *P. cervi* (Bazsalovicsova *et al.*, 2010).

La amplificación del fragmento genético ITS-2 ha permitido confirmar la infección por *D. dendriticum* en 10 especies distintas de moluscos infectados de manera natural con esporocistos hijos de *D. dendriticum* visibles al estereomicroscopio, cuya identificación se había realizado previamente mediante técnicas microscópicas (Manga-González, 1987; Manga-González *et al.*, 2001). Por tanto, la PCR diseñada a partir de la secuencia del gen ITS-2 de *D. dendriticum* permite, por vez primera, la identificación segura de las fases larvarias de *D. dendriticum* halladas en los moluscos recogidos en la naturaleza, lo que será de gran utilidad para los investigadores que realicen estudios epidemiológicos de la dicrocoeliosis en cualquier parte del mundo.

Por otra parte, de acuerdo con nuestros resultados, parece que con dicha técnica de PCR utilizando el ITS-2 es posible detectar la infección por *D. dendriticum* en los moluscos precozmente, es decir, desde que el miracidio es liberado en el intestino, o una vez que lo abandona para dividirse y transformarse en esporocisto madre, que no tiene pared propia y se localiza entre los lóbulos del hepatopáncreas del molusco (Álvarez-Nogal *et al.*, 1992; Manga-González & Quiroz-Romero, 1999). Estos resultados tienen una gran importancia para eliminar los falsos negativos, que hasta

Discusión

ahora se producían cuando se examinaban los moluscos únicamente por disección al estereomicroscopio. Hay que tener en cuenta que en un trabajo previo, realizado también con la especie *C. (X.) cespitum arigonis* infectada experimentalmente y mantenida en el laboratorio en las mismas condiciones, se necesitaron al menos 50 días p.i. para poder observar en el hepatopáncreas, mediante el estereomicroscopio, esporocistos hijos de *D. dendriticum* aún poco desarrollados y con masas germinales indiferenciadas en su interior (González-Lanza *et al.*, 1997).

Los falsos negativos aún aumentan más cuando se examinan al estereomicroscopio moluscos recogidos en la naturaleza, para llevar a cabo estudios epidemiológicos. En investigaciones realizadas durante 4 años con moluscos de la misma especie, infectados experimentalmente con *D. dendriticum* en el laboratorio, pero mantenidos posteriormente en el exterior en condiciones naturales de campo, aunque el mínimo periodo post-infección para detectar las fases larvarias al estereomicroscopio fue de 2 meses (en los experimentos comenzados en junio y julio), sin embargo dicho periodo se prolongó hasta 9 meses en un experimento iniciado en octubre (Manga-González *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante la PCR en el presente estudio, los datos de prevalencia de la infección utilizando técnicas microscópicas (Manga-González *et al.*, 1992, 2001) deben ser inferiores a los datos reales. Así, los resultados previos sobre prevalencia de infección de las mismas especies de moluscos obtenidos por utilizando técnicas microscópicas deberían ser más elevados.

Por tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, la técnica de PCR diseñada por nosotros, basada en la utilización del ADN mitocondrial, es adecuada y sensible para la detección específica, tanto de las metacercarias de *D. dendriticum* en el abdomen de las hormigas, como de la larva cerebral en la cabeza. Además, permite discriminar entre *D. chinensis* y *D. dendriticum*, pero no entre la infección por *D. dendriticum* y por Brachylaimidae en moluscos. Sin embargo, la técnica de PCR diseñada utilizando el fragmento ITS-2 es específica, ya que sí permite la diferenciación entre *D. dendriticum*, *D. chinensis* y Brachylaimidae. Además, es muy sensible para la detección temprana de las fases larvarias de *D. dendriticum* en los moluscos, así como para la detección de metacercarias de dicho parásito en el abdomen de las hormigas y de la larva cerebral en la cabeza.

Discusión

Por tanto, ambas técnicas de PCR diseñadas en este trabajo, especialmente la segunda, serán muy importantes y servirán de gran ayuda para la identificación de los parásitos en sus hospedadores intermediarios y para la detección temprana de la infección. Esto permitirá establecer un modelo más real de la epidemiología de la dicrocoeliosis en cualquier parte del mundo, el cual será la base para el diseño y aplicación, en momentos estratégicos, de medidas eficaces de control de dicha parasitosis.

2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS ANTÍGENOS TG Y ES DE *D. dendriticum*

Este es el primer estudio de proteómica realizado en *D. dendriticum*, según nuestra información. En él se identificaron, por vez primera, 29 proteínas de los productos ES, 11 de ellas antigénicas. En el extracto TG se identificaron 43 proteínas, 12 de ellas también antigénicas

El objetivo principal de nuestro estudio era mejorar el conocimiento molecular de *D. dendriticum*, mediante la identificación de las proteínas presentes en los extractos ES y TG, que pudieran servir en un futuro como antígenos específicos para el diagnóstico inmunológico de la dicrocoeliosis, o para la elaboración de posibles vacunas frente al parásito. Se eligieron las fracciones TG y ES del parásito por ser más relevantes para el objeto de nuestra investigación y facilitar los análisis proteómicos (Wilson *et al.*, 2004), al tener una composición más sencilla que el extracto somático, además de ser altamente específicas y útiles para el inmunodiagnóstico (Salimi-Bejestani *et al.*, 2005; Pérez-Sánchez *et al.*, 2006; Arias *et al.*, 2007). Estudios previos han demostrado la importancia de los productos ES en numerosos parásitos, tales como: *O. viverrini*, *C. sinensis*, *S. japonicum*, *F. hepatica* y *Paragonimus westermani* (Jefferies *et al.*, 2001; Thuwajit *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009b; Zheng *et al.*, 2011). Sin embargo, el estudio del antígeno ES tiene la desventaja del escaso material secretado por el parásito, que ha quedado evidenciado en nuestros resultados, al obtener una escasa concentración del extracto ES.

Los mapas proteómicos de *D. dendriticum* obtenidos por nosotros no han podido ser comparados con otros de la misma especie ya que, según nuestra información, no existen datos publicados al respecto. Sin embargo, hemos podido comprobar que el nº de spots observado por nosotros en los extractos TG y ES de *D. dendriticum* es similar al obtenido para otros trematodos, tales como *F. hepatica* (Jefferies *et al.*, 2001) y *S. bovis* (Pérez-Sánchez *et al.*, 2006), entre otros.

Una de las consideraciones más importantes a tener en cuenta en cualquier estudio de proteómica es afianzar la reproducibilidad de los resultados, por ello se probaron distintos tratamientos de solubilización de las muestras, rangos de pH y tinciones. El tratamiento con el kit "ReadyPrep 2D clean-up", las tiras de rango de pH 3-10 no lineal

Discusión

y la tinción Coomassie coloidal permitieron identificar el mayor número de spots en los extractos TG y ES, además de consolidar la reproducibilidad de la técnica. Ambos mapas proteómicos revelaron una gran similitud, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Pérez-Sánchez *et al.* (2006) en *S. bovis*.

En el TG hemos podido identificar 43 proteínas, 12 de ellas antigénicas, mientras que en el ES se han identificado 29, 11 de las cuales resultaron antigénicas. El grupo mayoritario de proteínas fue el de las enzimas metabólicas, lo que concuerda con los resultados de estudios realizados en distintos parásitos por otros autores (Bernal *et al.*, 2006; Guillou *et al.*, 2007; Sotillo *et al.*, 2010). De estas proteínas, las más abundantes son las enzimas glicolíticas: enolasa, triosa fosfato isomerasa, GAPDH, fructosa-bisfosfato aldolasa, 3 retinal deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y transquetolasa, que participan en procesos energéticos necesarios para el parásito. Estos resultados no son inesperados, ya que varias de estas enzimas han sido descritas tanto en los productos ES, como en el tegumento de otros trematodos, tales como: *F. hepatica* (Bernal *et al.*, 2004), *E. caproni* (Marcilla *et al.*, 2007), *S. bovis* (Pérez-Sánchez *et al.*, 2006; Ramajo-Hernández *et al.*, 2007) o *C. sinensis* (Zheng *et al.*, 2011), entre otros. Estas proteínas desempeñan además otras importantes funciones, modulando la interacción entre parásito y hospedador, lo que las convierte en interesantes dianas vacunales o terapéuticas (Morphew *et al.*, 2007; Gan *et al.*, 2010).

Es la primera vez que se describe la presencia de la enzima fructosa-bisfosfato aldolasa en el TG y en los productos ES de *D. dendriticum*. Hecho importante si se tiene en cuenta que Zheng *et al.* (2011) expresaron y caracterizaron recientemente este antígeno de *C. sinensis*, sugiriendo que dicha enzima puede ser la causante de la fibrosis hepática durante la infección del parásito. Por ello, sería necesario profundizar en el estudio de dicha proteína, ya que el mecanismo patogénico causante de fibrosis hepática en la infección por este trematodo aún no ha sido dilucidado.

Asimismo, tienen una especial relevancia las proteínas: tioredoxina, GST, GAPDH, enolasa, triosa fosfato isomerasa, Hsp 70 o actina, descritas por primera vez en los extractos de *D. dendriticum*. Estas proteínas han sido identificadas entre los 28 antígenos comunes de *F. hepatica* y *S. mansoni*, detallados recientemente por Boukli *et al.* (2011), quienes subrayaron su importancia en la identificación de moléculas para el desarrollo de vacunas o tratamientos antihelmínticos.

Discusión

Esta es la primera vez que se describe la presencia de moléculas antioxidantes (GST, peroxirredoxina, tiorredoxina peroxidasa) entre las proteínas expresadas por *D. dendriticum*. Se ha propuesto que estas enzimas son esenciales en la supervivencia de los parásitos, ya que los protegen de las especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas por la respuesta inmune del hospedador y por el metabolismo celular. Junto con las moléculas relacionadas con el glutatión, el sistema tiorredoxina (Txr), que está principalmente compuesto de Txr, peroxirredoxina (PRx) y Trx reductasa (TR), tienen un papel fundamental en la homeostasis de organismos eucariotas, incluyendo los helmintos (Henkle-Dührsen & Tampkötter, 2001; Salinas *et al.*, 2004; Kunz *et al.*, 2007). La enzima GST, que se encontró entre las proteínas antigénicas de ambos extractos, tiene un importante papel en la detoxificación y eliminación de moléculas dañinas para el organismo. Recientemente se ha demostrado que las GSTs pueden conferir protección frente a *F. gigantica* y *S. mansoni* (Preyavichyapugdee *et al.*, 2008), así como frente a *S. japonicum* (Wu *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2012), estudios que habría que tener en cuenta para un futuro desarrollo de vacunas frente a *D. dendriticum*.

Las enzimas tiorredoxina y peroxirredoxina han sido identificadas entre las proteínas mayoritarias del ES y TG, respectivamente, y se ha sugerido que ambas tienen un importante papel en la protección del parásito frente al daño producido por la respuesta inmune del hospedador (Alger *et al.*, 2002).

Las proteínas 14-3-3, identificadas entre las mayoritarias del TG, están involucradas en numerosos procesos esenciales para la supervivencia de las células eucariotas (Siles-Lucas & Gottstein, 2003; Dougherty & Morrison, 2004; Chaithirayanon *et al.*, 2006). Estos resultados están en concordancia con lo descrito por otros autores, quienes las han identificado en extractos ES de las especies *S. japonicum* (Liu *et al.*, 2009b), *S. bovis* (Pérez-Sánchez *et al.*, 2008) o *E. caproni* (Sotillo *et al.*, 2010), entre otros, y se ha sugerido que podrían estar relacionadas con la resistencia a la respuesta local mediada por células.

Otras proteínas antigénicas identificadas en este trabajo poseen diversas funciones, así: las 2 proteínas SJCHG07012 y glicoproteína de 30 kDa tienen actividad oxidoreductora; el componente de exocitosis sec-8 está involucrado en el transporte de proteínas durante la exocitosis; el factor de ADP-ribosilación en la unión al GTP; la proteína peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa en el plegamiento de las proteínas, así

Discusión

como el receptor nuclear de hormonas en el proceso de transcripción. Por otra parte, no se ha encontrado función conocida para 4 de las proteínas antigénicas del ES.

Entre las proteínas mayoritarias no antigénicas hemos identificado 4 isoformas de la mioglobina en TG y 3 en ES, con un peso molecular aproximado de 15 kDa, excepto una isoforma del TG que tiene un peso molecular de 30 kDa. Esta molécula coincide con la mencionada previamente por Tuchschnid *et al.* (1978) en *D. dendriticum*, quienes describieron dos isoformas de la proteína. Revilla-Nuín *et al.* (2005) caracterizaron una proteína antigénica que presentaba homología con esta globina. Sin embargo, en sus estudios la molécula presentaba un peso molecular estimado de 130 kDa, resultados que se contradicen con lo observado en nuestro trabajo. Estos autores establecieron la homología únicamente por la secuencia del péptido final y no mencionan homología para los péptidos internos, por lo que dichos resultados deben ser considerados con precaución. Además, la proteína de 130 kDa descrita por Revilla-Nuín *et al.* (2005) presenta un peso molecular más elevado que las globinas descritas para otros trematodos, que tienen un peso molecular de 15-17 kDa. Las mioglobinas de los trematodos son moléculas funcionales con alta afinidad por el oxígeno, de las que se han descrito al menos 2 isoformas en numerosos trematodos (Rashid *et al.*, 1997).

Otro importante grupo de moléculas identificadas, por primera vez, en *D. dendriticum*, son las proteínas estructurales y motoras, como la actina de la que se han encontrado dos isoformas en ambos extractos, o la paramiosina identificada en ES. De acuerdo con la bibliografía, la actina ha sido identificada en la superficie de numerosos parásitos, entre ellos, en el tegumento de *S. mansoni* (Braschi *et al.*, 2006a) y en las proteínas antigénicas del extracto TG de *S. bovis* (Pérez-Sánchez *et al.*, 2006). En cuanto a la paramiosina, se trata de una proteína filamentosa identificada en gran variedad de helmintos, tales como: *S. mansoni* (Schmidt *et al.*, 1996); *S. japonicum* (Gobert & McManus, 2005); *F. hepatica* (Cancela *et al.*, 2004); *E. multilocularis* (Wang *et al.*, 2009b); *P. westermani* (Zhao *et al.*, 2007) o *E. friedi* (Bernal *et al.*, 2006), lo que coincide con nuestros hallazgos. Además, estas proteínas han sido propuestas como candidatos vacunales o dianas de los tratamientos antihelmínticos para otras especies (Roos *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2005; Sereda *et al.*, 2008). Aunque se localizan principalmente en el citoesqueleto, hay diversos trabajos que han demostrado su localización extramuscular, encontrando actina en las espinas de superficie de

Discusión

schistosomas (Jones *et al.*, 2004), así como en el tegumento que rodea la ventosa ventral de *F. hepatica* (Kumar *et al.*, 2003; Tansatit *et al.*, 2006).

La Hsp 70 y la mitocondrial 60 kDa Hsp, identificadas entre las proteínas del TG, son chaperonas altamente conservadas e identificadas en otros trematodos como *F. hepatica*, *E. caproni*, *S. bovis* y *Zygodontia alternata* (Pérez-Sánchez *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008; Sotillo *et al.*, 2010, 2011). Estas moléculas están involucradas en los mecanismos de defensa frente al stress, y se considera que juegan un papel crucial en la supervivencia del parásito (Maresca & Kobayashi, 1994). Algunos autores han sugerido que estas moléculas facilitan el establecimiento en el hospedador definitivo, ya que se secreta en mayores cantidades en las infecciones crónicas que en las agudas (Higón *et al.*, 2008; Sotillo *et al.*, 2010), mecanismo que permanece aún inexplorado en *D. dendriticum*.

La calreticulina y un precursor de calreticulina fueron identificados entre las proteínas del ES y TG, respectivamente. Se trata de una proteína ligadora de calcio, altamente conservada. Ha sido implicada en la regulación de una gran variedad de funciones celulares como chaperona, señalización y almacenamiento de calcio, regulación de la expresión génica, adhesión celular, autoantígeno, inhibición de angiogénesis y crecimiento tumoral, así como regulación de la actividad lítica de perforinas de células T y NK (Ferreira *et al.*, 2004).

Varias proteínas identificadas en este trabajo, proceden del hospedador, tales como: subunidad beta de la hemoglobina; pre-pro albúmina sérica; catalasa, SOD (Cu/Zn) y regucalcina. Todas ellas mostraron homología con proteínas de *Ovis aries*, excepto catalasa y regucalcina. No obstante, debido al hecho de que nunca se haya encontrado actividad catalasa en helmintos parásitos, y que la regucalcina tiene una función celular en el hígado, nos hace sospechar que no pertenecen al parásito, en cuyo caso su homología con la especie *Bos taurus*, puede deberse a la falta de información en las bases de datos de la secuencia de dicha proteína en el hospedador *Ovis aries*, y a que se trata de proteínas altamente conservadas en las especies de vertebrados.

El presente trabajo es la primera aproximación al conocimiento del proteoma de *D. dendriticum*. Mediante las técnicas de 2D y Espectrometría de Masas (MALDI-TOF/TOF) se identificaron 29 proteínas en los productos de excreción-secreción y 43

Discusión

en los de tegumento. Sin embargo, la ausencia de información de *D. dendriticum* en las bases de datos ha supuesto un gran inconveniente en la identificación de las proteínas halladas, lo que pone de manifiesto la necesidad de realizar más análisis en este trematodo, para profundizar en el conocimiento molecular, que nos permita comprender mejor las relaciones parásito-hospedador. Nuestro trabajo provee una visión global de los componentes ES y TG de *D. dendriticum*, aunque se necesitarán futuros estudios para caracterizar funcionalmente estas proteínas.

3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *D. dendriticum*

Para afrontar el último objetivo parcial de este trabajo de Tesis nos propusimos construir una genoteca de expresión mediante la obtención de ARNm extraído de adultos de *D. dendriticum*, a partir de la cual poder obtener antígenos recombinantes que nos permitan mejorar el diagnóstico inmunológico de la dicrocoeliosis, así como ampliar la información molecular del parásito. A pesar de la importancia de esta enfermedad, no se conoce hasta el momento ningún estudio sobre la obtención de antígenos recombinantes de *D. dendriticum*. Debido a la escasa información existente en las bases de datos sobre este trematodo, sólo hemos podido comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores en parásitos próximos filogenéticamente.

Puesto que el objetivo era la caracterización de antígenos específicos del parásito, se llevaron a cabo dos abordajes, una primera estrategia consistió en realizar un inmunocribado con sueros obtenidos de corderos infectados de manera experimental. Sin embargo, no se obtuvieron señales positivas empleando estos sueros. Una segunda estrategia fue la de realizar un cribado al azar de la genoteca, que nos permitiera identificar moléculas candidatas para el inmunodiagnóstico de la dicrocoeliosis. Hay que tener en cuenta que es la primera vez que se realiza un trabajo de este tipo con *D. dendriticum*, y que la información existente en las bases de datos es muy escasa, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo aportan una valiosa información, que puede ser empleada en futuros estudios del trematodo.

Mediante el cribado al azar de la genoteca de expresión se obtuvieron 200 clones, 103 de los cuales se identificaron por homología con EST previamente descritos en las bases de datos. De ellos, 93 presentaron homología con genes de otros trematodos, mientras que 10 se identificaron por su homología con otros organismos. El resto de los genes fueron clasificados dentro de la categoría de genes desconocidos. Teniendo en cuenta los criterios propuestos por Adams *et al.* (1995) para evaluar la calidad de una genoteca de expresión, podemos establecer que la genoteca construida en este trabajo es de gran calidad, por la elevada proporción de nuevos genes secuenciados, el bajo grado de redundancia de los mismos, así como el reducido porcentaje de

Discusión

secuencias insertibles. Asimismo, también es importante a la hora de evaluar una genoteca tener en cuenta la longitud de los insertos que, como se ha descrito en este trabajo, está compuesta por una alta proporción de insertos mayores de 500 pb y la presencia de un gran número de insertos con colas de poly-A.

Muchas de las moléculas, descritas por vez primera en este trabajo, tienen funciones importantes, que podrían servir como punto de partida para futuras investigaciones en el control de la dicrocoeliosis. Así, el grupo de proteasas e inhibidores de proteasas está involucrado en varios mecanismos fisiológicos y adaptativos del parásito, tales como penetración en los tejidos, migración de las larvas, inmunoevasión, digestión y mecanismos de desenquistamiento (McKerrow *et al.*, 2006). Han sido identificadas en un gran número de trematodos, tales como: *F. gigantica* (Siricoon *et al.*, 2012); *C. sinensis* (Lv *et al.*, 2011); *F. hepatica* (McVeigh *et al.*, 2012); *S. japonicum* (He *et al.*, 2011), entre otros. Además, estas proteínas han sido propuestas por Maggioli *et al.* (2011) como candidatos vacunales contra la fasciolosis, así como dianas terapéuticas en el tratamiento de las schistomiasis (Abdulla *et al.*, 2007). Otros grupos importantes de proteínas están relacionados con la homeostasis redox y la respuesta al estrés celular. Estas proteínas tienen un papel crucial en la protección del parásito frente a los mecanismos de defensa del hospedador (Alger *et al.*, 2002). Se requieren futuras investigaciones para conocer el papel biológico que las proteínas identificadas en este estudio desempeñan en *D. dendriticum*.

Los estudios enfocados a la obtención de antígenos específicos de *D. dendriticum* son muy escasos. Revilla-Nuín *et al.* (2005) purificaron parcialmente una proteína de 130 kDa que mostró homología con una globina y que podría ser empleada en el diagnóstico de la enfermedad. Basándonos en sus resultados, seleccionamos esta proteína para expresarla y evaluarla en el diagnóstico de la dicrocoeliosis. Como no existe información referida a la obtención de proteínas recombinantes de *D. dendriticum*, para la elección de los otros antígenos nos basamos en los ensayos realizados en otros trematodos similares, eligiendo para su clonación los clones: N° 151 (cistatina) y N° 182 (proteína 8-kDa).

El clúster más abundante, formado por 27 secuencias, fue identificado como parte de la subunidad grande de ARNr del ADN mitocondrial. El segundo clúster más abundante, formado por 10 transcritos, mostró una homología con una secuencia de *C. sinensis* correspondiente a una proteína de 7kDa, caracterizada por Lee *et al.*

Discusión

(2002) a partir de los productos de ES del trematodo. Esta molécula también mostró homología con una de defensa secretada por *F. hepatica* y descrita recientemente por Robinson *et al.* (2011) dentro de una novedosa familia de moduladores del sistema inmune, con potencial terapéutico en los tratamientos anti-sepsis y prevención de la inflamación. Chung *et al.* (2002) identificaron una proteína multicomplejo compuesta por varias subunidades de 7 y 8 kDa, y demostró que la proteína de 8 kDa estaba distribuida en las células del tegumento y subtegumento. Además, tanto con la proteína nativa como con la recombinante se han obtenido resultados prometedores como antígenos en el diagnóstico de la enfermedad hepática causada por *C. sinensis* (Kim, 1998; Lee *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004). Estos resultados, junto con la baja homología que presentó nuestra molécula con otros trematodos presentes habitualmente en la misma área, así como su bajo peso molecular y su aparente solubilidad, nos llevaron a elegir este antígeno como posible candidato en el diagnóstico de la dicrocoeliosis. El análisis bioinformático de la secuencia de la proteína de 8-kDa obtenida en este trabajo, mostró un péptido señal en las posiciones de aa 1-20, lo que coincide con la molécula descrita por Lee *et al.* (2002). La presencia de este péptido indica que podría ser secretada por el parásito, lo que sugiere que puede ser inmunógena y útil en el diagnóstico de la enfermedad.

En cuanto a la mioglobina, el análisis bioinformático de su secuencia mostró una homología del 99% con la secuencia parcial de la mioglobina de *D. dendriticum*, descrita previamente por Kunz (1975). Esta molécula presentó una masa molecular teórica de 16,2 kDa, lo que está en concordancia con lo descrito para las mioglobinas de otros trematodos (Rashid *et al.*, 1997; Chung *et al.*, 2003). Además, las mioglobinas de los trematodos, a diferencia de las de los vertebrados, son monómeros (de Guzmán, 2007), lo que también coincide con la molécula descrita en este trabajo. En el alineamiento realizado con las secuencias de otras mioglobinas se encontró el residuo de tirosina en las posiciones B10 y E7 característico de los trematodos (de Guzmán *et al.*, 2007). Estos resultados difieren mucho de la molécula que Revilla-Nuín *et al.* (2005) identificaron como globina y, como mencionamos en el apartado anterior de la discusión, dado que tan sólo obtuvieron homología para el péptido final de la secuencia, su posible identificación tendría que ser considerada con prudencia.

Los resultados del análisis “in silico” de la secuencia de la proteína descrita por nosotros demostraron que ésta presentaba los 11 dominios conservados de unión al

Discusión

grupo hemo, así como las 8 hélices características de las globinas. Se llevó a cabo el modelado tridimensional por homología de esta molécula. Esta aproximación a la modelización de proteínas sólo fue posible con la mioglobina, ya que se asume que la proteína que se quiere modelar debe presentar más de un 40% de identidad con una proteína de estructura conocida, para que ambas proteínas puedan considerarse estructuralmente semejantes (Guex *et al.*, 1999). La estructura está más conservada que la secuencia, de modo que un pequeño cambio en la secuencia de la proteína generalmente da también como resultado un pequeño cambio en su estructura 3D. Las condiciones necesarias son, por tanto, que la similitud entre la secuencia diana y la/las plantilla/s sea detectable y que se pueda construir un correcto alineamiento entre ellas, condiciones que no se cumplen en las otras dos moléculas obtenidas en este trabajo.

A pesar de los prometedores resultados que obtuvieron Revilla-Nuín *et al.* (2005) respecto a la posible utilización de una supuesta mioglobina, en el diagnóstico de la dicrocoeliosis, en nuestro estudio la proteína recombinante no mostró ninguna reacción al enfrentarla con sueros anti-*D. dendriticum*. Estos resultados coinciden con lo expuesto por otros autores para *P. westermanni* (de Guzmán *et al.*, 2007) y *C. sinensis* (Sim *et al.*, 2003). Este hecho, junto con las características de la secuencia mencionados anteriormente, nos hacen plantearnos que no se trate de la misma molécula identificada por Revilla-Nuín *et al.* (2005). Sin embargo, a pesar de no ser útil en el diagnóstico de la enfermedad, la purificación de esta proteína recombinante podría abrir las puertas a nuevos estudios sobre la función que las mioglobinas desempeñan en *D. dendriticum*, ya que se cree que podría realizar un importante papel como reservorio de oxígeno en condiciones anaerobias.

La última molécula expresada en este trabajo para su evaluación diagnóstica fue una cistatina (clon N° 151). El análisis bioinformático de la secuencia reveló una masa molecular teórica de 13,7 kDa, un péptido señal de 17 aa, y 1 dominio conservado de la familia de las cistatinas. Las cistatinas son un amplio grupo de enzimas que forman una superfamilia de inhibidores de cisteín-proteasas. Esta familia se dividía tradicionalmente en tres subfamilias: en función del peso molecular, número de puentes disulfuro, localización intracelular y características estructurales (Dayhoff *et al.*, 1983). Sin embargo, la base de datos MEROPS de peptidasas y sus inhibidores ofrece un nuevo sistema de clasificación, en el que agrupa las moléculas

Discusión

jerárquicamente en familias, basándose en la secuencia de aminoácidos y en la estructura (Klotz *et al.*, 2011). Según esta clasificación, la proteína identificada en este trabajo pertenece a la familia de inhibidores I25. Esta familia se divide a su vez en tres subfamilias (A, B y C), de las cuales la subfamilia A, estefinas, agrupa a proteínas de bajo peso molecular que no poseen puentes disulfuro, localizadas sobre todo intracelularmente, pero que también se han observado en fluidos extracelulares (Turk & Bode, 1991). La proteína identificada en este trabajo presenta las características propias de esta subfamilia, con el aminoácido glicina en la región amino terminal, el motivo QVVAG característico de este grupo, pero no presenta los puentes disulfuro típicos del segundo grupo. Sin embargo, comparte dos características con la subfamilia B: el peso molecular y la presencia de un péptido señal que no es habitual en la familia de las estefinas, aunque ambas propiedades se han descrito recientemente en una cistatina de *F. gigantea*, clasificada como estefina por Siriccoon *et al.* (2012), con la que comparte la mayor homología. Asimismo, Tarasuk *et al.* (2009) observaron que una cistatina tipo I de *F. gigantea* era secretada en gran cantidad al medio externo, aunque ésta carece del péptido señal y el modo en que es excretada sigue siendo desconocido. Se ha sugerido que esta proteína puede proteger el intestino y la superficie tegumentaria del parásito frente a la proteólisis extracelular. Además, esta misma molécula mostró reacción con los sueros de ratones infectados con *F. gigantea* en un análisis de inmunoblot (Mahmoud & Moustafa, 2003).

Al igual que ocurre con la molécula descrita por Siriccoon *et al.* (2012), la cistatina descrita en este trabajo presentó un elevado grado de conservación en su extremo N-terminal. Sin embargo, el último tercio de la secuencia fue demasiado divergente como para realizar el modelado por homología.

La presencia de un péptido señal sugiere que es excretada y, por tanto, podría ser inmunógena y útil en el diagnóstico de la dicrocoeliosis. Esta característica, junto con el bajo peso molecular y la aparente reactividad inmunológica de la proteína frente a sueros de otros parásitos, nos llevó a elegir este antígeno para su expresión y evaluación en el diagnóstico de la dicrocoeliosis. Tras su expresión en el vector pRSET-A observamos que era insoluble cuando estaba unida a una cola de histidinas, aunque sí pudo ser purificada del extracto soluble al estar fusionada a la GST. Tras su purificación se llevó a cabo una evaluación diagnóstica preliminar, en la que no mostró

Discusión

ninguna reacción contra sueros de corderos infectados experimentalmente, por lo que se descartó como posible antígeno diagnóstico.

A pesar de los resultados insatisfactorios obtenidos en el diagnóstico preliminar de la dicrocoeliosis con este antígeno, las cistatinas están involucradas en funciones que son vitales para la supervivencia del parásito dentro del hospedador. En primer lugar, por su capacidad de modular la actividad de las cisteín-proteasas, tanto endógenas como las que proceden del hospedador, que son unas moléculas esenciales en los procesos de invasión y nutrición de los parásitos. Además, se les atribuye un importante papel en otras funciones que no están relacionadas con su capacidad inhibitoria (Magister & Kos, 2013). Se ha descrito su intervención en mecanismos tan significativos como la evasión del sistema inmune, demostrada en nematodos (Tarasuk *et al.*, 2009) y sugerida en trematodos como *S. japonicum* (He *et al.*, 2011). También están implicadas en la presentación y procesamiento de antígenos, procesos de inflamación y procesamiento de protoproteínas (Wang *et al.*, 1991; Calkins & Sloane, 1995). Algunos autores han propuesto el uso de estas moléculas como dianas terapéuticas o posibles candidatos vacunales de las enfermedades parasitarias (Schwarz *et al.*, 2012). La expresión, por primera vez, de una cistatina de *D. dendriticum* abre una nueva vía de investigación sobre las interacciones parásito-hospedador, y sería muy interesante analizar en un futuro su actividad en la modulación del sistema inmune del hospedador.

4. EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA DE 8-kDa PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DICROCOELIOSIS

Tras la evaluación preliminar de los tres antígenos para el diagnóstico de la dicrocoeliosis mediante WB, observamos que la única proteína que reaccionaba frente a los sueros positivos a *D. dendriticum* tras ser escindida de la GST era la proteína de 8-kDa. Después de comprobar que era capaz de discriminar entre animales sanos y enfermos, se realizó un WB frente a sueros de otros parásitos, con los que presenta antígenos comunes. En esta prueba se observó que no reaccionaba frente a nematodos, y de los trematodos tan sólo se observaron reacciones cruzadas con *S. bovis*, por lo que se necesitarán futuras investigaciones para mejorar la especificidad del test.

En cuanto al ensayo de ELISA, los resultados demostraron que la proteína de 8-kDa era capaz de diferenciar entre animales sanos y enfermos desde el día 30 p.i., lo que coincide con los resultados obtenidos por otros autores (González-Lanza *et al.*, 2000; Broglia *et al.*, 2009). La persistencia de elevados títulos de anticuerpos a lo largo de todo el período p.i. (180 días) obtenido en este trabajo, ya había sido reportada previamente en ovejas (González-Lanza *et al.*, 2000; Broglia *et al.*, 2009) y cricetos (Bode & Geyer, 1981). Dicha persistencia de anticuerpos, incluso cuando el parásito ya no está presente después de un tratamiento, hace que se busquen antígenos específicos y en cantidad suficiente para poder desarrollar la técnica ELISA “sandwich” para la detección de antígenos ya sea en heces (coproantígenos) como en suero. Resultados positivos en este sentido indican la existencia de una parasitación activa.

Por otro lado, no se ha realizado hasta el momento ningún estudio para la obtención de proteínas recombinantes que puedan ser utilizadas en el diagnóstico de la dicrocoeliosis. Otros autores han utilizado productos ES obtenidos por técnicas de purificación convencionales (González-Lanza *et al.*, 2000; Sánchez-Andrade *et al.*, 2003; Simsek *et al.*, 2006; Broglia *et al.*, 2009). Sin embargo, el proceso de obtención de estos antígenos es muy laborioso y consume mucho tiempo por el escaso material secretado por los parásitos y la dificultad de cultivarlos en el laboratorio. La expresión y purificación de proteínas recombinantes ofrece una alternativa óptima y, mejora en gran medida la posibilidad de estandarización de las técnicas utilizadas para

Discusión

diagnosticar la dicrocoeliosis, porque nos permite obtener grandes cantidades de antígeno de una forma sencilla.

En el ensayo ELISA, llevado a cabo con la proteína de 8-kDa, se observaron también reacciones cruzadas con sueros anti-*S. bovis*. Las interacciones del sistema inmune entre parásitos y hospedadores son extremadamente complejas y se han observado a menudo reacciones cruzadas entre distintos parásitos (Li *et al.*, 2011; Lv *et al.*, 2011). Sería conveniente esclarecer en un futuro si los mecanismos subyacentes de reactividad cruzada son debidos a que los parásitos comparten determinantes antigénicos comunes, o bien a un mecanismo de reconocimiento común del sistema inmune del hospedador. Además, en este estudio se determinaron los niveles totales de IgG, sin discriminar entre las distintas subclases de inmunoglobulinas. Li *et al.* (2012) observaron que la especificidad del serodiagnóstico fue mayor cuando detectaban IgG4 que cuando se utilizaba la detección total de IgG. Así, las IgG1 e IgG2 podrían ser las responsables de reacciones inmunes no específicas y del elevado background obtenido en este trabajo, lo cual sería conveniente comprobar en futuros trabajos. Aunque Wedrychowicz *et al.* (1995) caracterizaron la respuesta inmune en la bilis de animales infectados de forma natural, se necesitan más investigaciones para identificar los cambios en el perfil de anticuerpos a lo largo del período de infección por *D. dendriticum*. El diagnóstico de la dicrocoeliosis podría ser mejorado con el uso de cócteles antigénicos de proteínas definidas molecularmente, propuesto por Kim *et al.* (2001) para aumentar la sensibilidad y la especificidad de los ensayos. La proteína de 8-kDa podría ser evaluada como componente proteico en la preparación de dicho cóctel.

En este trabajo se ha llevado a cabo el primer análisis de EST de adultos de *D. dendriticum* en el que se han obtenido 173 EST. Estos novedosos resultados son muy útiles en la investigación y caracterización de nuevos genes y moléculas que puedan ayudarnos a entender las complejas interacciones parásito-hospedador y a mejorar el control de la enfermedad. Además, se han expresado por primera vez 3 proteínas recombinantes que podrían tener importantes funciones en la fisiología del parásito, y que abren la puerta a nuevas investigaciones en este sentido. Asimismo, es la primera vez que se evalúa un antígeno recombinante en el diagnóstico de la dicrocoeliosis. Los prometedores resultados obtenidos con la proteína de 8-kDa indican que podría tratarse de un valioso candidato en el diagnóstico serológico de esta parasitosis. No

Discusión

obstante, se necesitan más investigaciones para conocer su verdadero potencial en el inmunodiagnóstico y para resolver los inconvenientes de las reacciones cruzadas con *S. bovis*.

VI. RESUMEN

Resumen

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue mejorar el diagnóstico de la dicrocoeliosis en sus hospedadores intermediarios y definitivos, mediante técnicas inmunológicas y moleculares, para lo cual se han llevado a cabo los procedimientos que se resumen a continuación. Se ha desarrollado una técnica de PCR para la detección precoz de *D. dendriticum* en moluscos y hormigas que actúan como hospedadores intermediarios. Asimismo, se han utilizado técnicas de proteómica para conocer las proteínas mayoritarias y antigénicas que se expresan en los antígenos de tegumento y de excreción/secreción del parásito adulto. Por último, mediante la construcción de una genoteca de expresión se ha abordado el estudio, por primera vez, de una colección de EST (Expressed Sequence Tag), y se han obtenido y evaluado tres proteínas recombinantes para el diagnóstico de la dicrocoeliosis en los hospedadores definitivos.

Detección de *D. dendriticum* en moluscos y hormigas

El primer objetivo de la presente Tesis fue desarrollar y validar un método analítico basado en la técnica de PCR, que permitiera identificar, con precisión y de forma precoz, *D. dendriticum* en moluscos y hormigas, primeros y segundos hospedadores intermediarios, respectivamente. En primer lugar, se recolectaron ejemplares de moluscos y hormigas de distintas especies, infectados de forma natural y sin infectar, así como parásitos adultos de *D. dendriticum* y de otras especies de trematodos para los ensayos de especificidad. Asimismo, se realizaron infecciones experimentales con huevos de *D. dendriticum*, de un lote de 80 moluscos de las especies *C. (X.) cespitum arigonis* y *C. (C.) virgata*. Ante la falta de secuencias nucleotídicas disponibles del parásito, se diseñaron y probaron cinco parejas de oligonucleótidos degenerados, mediante el alineamiento de las secuencias mitocondriales disponibles en las bases de datos de parásitos próximos filogenéticamente. Se seleccionó una pareja de cebadores que amplificó un fragmento de ADN mitocondrial de 1034 pb, que fue enviado a la base de datos GenBank con el nº de acceso JF690758. A partir de esta secuencia se diseñó una segunda pareja de cebadores específicos del parásito, que amplificó un fragmento de 169 pb. Mediante esta técnica fue posible la detección hasta de una única metacercaria de *D. dendriticum* extraída del abdomen de hormigas de las especies *F. rufibarbis* y *F. pratensis*, así como la detección de la larva cerebral en la cabeza de hormigas recogidas en fase de tetania. Fue también posible detectar la infección en moluscos infectados experimentalmente con *D. dendriticum*. No se

Resumen

observaron reacciones cruzadas con adultos de *D. chinensis*, *F. hepatica* y *C. daubneyi*, ni con fases larvarias de otros digenea hallados en el molusco acuático *G. truncatula*. Sin embargo, no fue posible discriminar entre el ADN de *D. dendriticum* y las metacercarias de Brachylaimidae sp. que se encuentran también en las mismas especies de moluscos terrestres.

Debido a esta falta de especificidad se diseñó una nueva pareja de cebadores basada en la región nuclear ITS-2, con la que se amplificó un fragmento de 93 pb. La PCR diseñada a partir de esta región demostró ser específica de *D. dendriticum*, por lo que no se observaron reacciones cruzadas con el ADN de *D. chinensis*, Brachylaimidae sp., *F. hepatica*, *C. daubneyi*, Plagiorchiidae o Notocotylidae. Además, con esta técnica fue posible detectar fases larvarias de *D. dendriticum* en moluscos infectados experimentalmente desde el primer día p.i. También se pudo confirmar, por primera vez, la infección natural por *D. dendriticum* en 10 especies de moluscos infectados naturalmente. La PCR demostró, además, tener una elevada sensibilidad, ya que permitió la detección de la larva cerebral de las hormigas que actúan como segundos hospedadores intermediarios, así como hasta una única metacercaria de *D. dendriticum* obtenida del abdomen de hormigas infectadas.

Análisis proteómico de los antígenos TG y ES

El segundo objetivo era la identificación de las proteínas mayoritarias y antigénicas de los extractos de TG y ES de adultos de *D. dendriticum*, mediante el uso de técnicas de electroforesis 2D y espectrometría de masas. Para ello se optimizaron los procesos de obtención de las fracciones antigénicas TG y ES de *D. dendriticum*, tras lo cual se establecieron las condiciones óptimas de separación mediante electroforesis 2D e inmunodetección de las proteínas antigénicas. Los mejores resultados en cuanto a resolución de spots y reproducibilidad fueron obtenidos al utilizar los siguientes parámetros: tratamiento de las muestras con el kit "ReadyPrep 2D clean-up"; tiras IPG 3-10 no lineal y tinción Coomassie coloidal. De esta manera se han obtenido, por primera vez, los mapas proteicos de los extractos TG y ES de *D. dendriticum*. Se han detectado 332 spots en el TG y 284 en el ES, con una distribución similar tanto en el número de spots como en los rangos de pesos moleculares y puntos isoeléctricos. Asimismo, se llevó a cabo la inmunodetección de las proteínas antigénicas en membranas de nitrocelulosa con sueros de corderos infectados experimentalmente. Las proteínas mayoritarias y antigénicas fueron posteriormente escindidas de los geles

Resumen

teñidos con Coomassie coloidal e identificadas mediante Espectrometría de Masas. Se han identificado, por primera vez, 43 proteínas en el TG, 12 de ellas antigénicas, mientras que en ES se han identificado 29, 11 de las cuales también resultaron antigénicas. Las proteínas identificadas en este trabajo fueron clasificadas por su función molecular en 16 categorías, algunas con funciones tan importantes como: detoxificación, chaperona, transporte, estructural o metabolismo. Además, varias de las moléculas descritas en este trabajo han sido propuestas como posibles candidatos vacunales y/o antígenos relevantes para el diagnóstico de otras parasitosis.

Construcción de una genoteca de expresión y análisis EST

El siguiente objetivo fue la construcción de una genoteca de ADNc de *D. dendriticum*, con la que poder obtener antígenos recombinantes que nos permitan mejorar el diagnóstico inmunológico de la dicrocoeliosis, así como ampliar la información molecular del mismo. Para ello, se extrajo y se purificó el ARNm de 400 parásitos adultos vivos obtenidos del hígado de ovejas infectadas de forma natural. A partir del ARNm se sintetizó la cadena de ADNc que se ligó en el vector de clonación Uni-Zap XR, con el que se infectaron las células *E. coli* XL1-Blue MRF', utilizadas para la propagación y mantenimiento de la genoteca. Tras la construcción y titulación de la misma se amplificó para conseguir una mayor estabilidad. El título de la genoteca amplificada fue de 3×10^8 , el porcentaje obtenido de recombinantes del 90%, y el tamaño de los insertos osciló entre 120-1300 pb. Esto demuestra la elevada calidad de la genoteca de expresión por la alta proporción de insertos mayores de 500 pb y la elevada proporción de nuevos genes secuenciados. Se realizó un cribado al azar de la misma y se aislaron 230 fagos que se secuenciaron y posteriormente clonaron en el vector pGEM-T easy. Tras la edición y análisis de las secuencias se obtuvieron 200 EST que se ensamblaron en 158 clústeres, de los cuales el más abundante —formado por 27 secuencias— se corresponde con ADN mitocondrial. Esta es la primera colección obtenida de EST de *D. dendriticum* que se ha depositado en la base de datos del GenBank bajo los nos. de acceso: JZ330400- JZ330572. Tras el análisis de los EST se clasificaron según su función molecular, proceso biológico y componente celular, de acuerdo a la base de datos GeneOntology. Muchas de las moléculas aquí descritas tienen importantes funciones, tales como: penetración y migración en los tejidos del hospedador, inmunoevasión, digestión, homeostasis redox o respuesta al

Resumen

estrés celular, y aportan una valiosa información para futuras investigaciones del parásito.

Obtención y evaluación de proteínas recombinantes en el diagnóstico de la dicrocoeliosis

Con el fin de identificar aquellas moléculas antigénicas de *D. dendriticum* que puedan ser empleadas en el diagnóstico serológico de la dicrocoeliosis, se seleccionaron 3 clones para ser expresados en su forma recombinante y ser evaluados en el diagnóstico de la enfermedad. Las proteínas se seleccionaron en base a la bibliografía y a los resultados de aparente solubilidad y antigenicidad, obtenidos mediante los estudios “in silico” de las secuencias. De esta manera, se seleccionaron los siguientes clones: a/ Clon N°179 mioglobina, b/ Clon N° 182 proteína de 8kDa y c/ Clon N° 151 cistatina. Se realizó el análisis bioinformático de las tres moléculas para comprobar que poseían un ORF completo, la presencia de un posible péptido señal y predecir su estructura secundaria. Se llevó a cabo la subclonación de los tres ADNc por duplicado en los vectores pGEX-6P-2 (Health Care) y pRSET-A (Life Technologies), que expresan la proteína recombinante fusionada a GST y a una cola de 6-His, respectivamente. Para ello, se amplificaron los fragmentos de interés mediante PCR, utilizando los cebadores específicos en los que se incluyeron los sitios de corte de las enzimas de restricción. Posteriormente, se clonaron en ambos vectores y se probaron las condiciones de expresión en *E. coli* mediante su inducción con IPTG. Se obtuvieron los mejores resultados con el vector pGEX-6P. En el caso del vector pRSET-A tan solo fue posible inducir la expresión de la cistatina, que se encontraba en la fracción insoluble, lo que dificulta el posterior proceso de purificación. Tras evaluar las mejores condiciones, se realizó el cultivo a gran escala de las correspondientes bacterias y se indujo la expresión de las proteínas recombinantes, que se purificaron por cromatografía de afinidad mediante columnas de glutation sepharosa.

Finalmente, se realizó una evaluación preliminar para el diagnóstico, mediante Western Blot con sueros de corderos infectados de forma experimental, de las tres proteínas recombinantes obtenidas en este trabajo. Los resultados más satisfactorios se obtuvieron con la proteína de 8-kDa, con la que se realizó un ensayo preliminar de ELISA indirecto utilizando sueros policlonales obtenidos a lo largo de todo el período post-infección (hasta los 180 días p.i.). Los resultados obtenidos mediante este ensayo demostraron el valor diagnóstico de la proteína de 8-kDa, que fue capaz de discriminar

Resumen

entre animales positivos y controles desde el día 30 p.i., obteniendo los máximos valores a partir del día 60 p.i. Asimismo se evaluó la especificidad del test, empleando sueros heterólogos de animales monoespecífica y experimentalmente infectados con otros trematodos (*C. daubneyi*, *F. hepatica* y *S. bovis*) y nematodos (*T. circumcinta*, *H. contortus* y *C. colubriformis*). Únicamente se observaron reacciones cruzadas con animales infectados con *S. bovis* y con el suero de un único animal infectado con *F. hepatica*.

VII. SUMMARY

Summary

The main goal of this PhD thesis was to improve *Dicrocoelium dendriticum* diagnosis in its definitive and intermediate hosts, using immunological and molecular techniques, for which we have carried out the following procedures. A PCR technique has been developed for the accurate identification of *D. dendriticum* in molluscs and ants, the first and second intermediate hosts, and their early detection. Also, proteomics techniques have been used to identify the major antigenic proteins in the tegument (TG) and excretory–secretory (ES) antigenic extracts of *D. dendriticum*. Finally, a random preliminary screening of a *D. dendriticum* adult cDNA library has been used for the first time to study a collection of EST (Expressed Sequence Tag), and three recombinant proteins have been obtained and assessed for the diagnosis of dicrocoeliosis in the definitive hosts.

Detection of *D. dendriticum* in molluscs and ants

The main aim of this PhD thesis was to develop, perfect and validate an analytical method based on PCR (polymerase chain reaction) techniques which would, on the one hand, allow precise identification of *D. dendriticum* in mollusc and ant intermediate hosts and, on the other, allow early detection of their infection in order to avoid false negatives. First, we collected specimens of molluscs and ants of different species, both naturally infected and uninfected, *D. dendriticum* adult parasites and other species of flukes for specificity tests. Furthermore, experimental infections of a batch of 80 mollusc species of *C. (X.) cespitum arigonis* and *C. (C.) virgata* were carried out with *D. dendriticum* eggs. Faced with the lack of *D. dendriticum* sequences, five pairs of degenerate oligonucleotide were designed and tested by aligning mitochondrial sequences of phylogenetically close parasites available in databases. A primer pair that amplified a 1034 bp of mitochondrial DNA fragment was chosen, which was submitted to the GenBank database with Accession No. JF690758. From this sequence, a second pair of specific primers was designed, which amplified a 169 bp fragment. The first primers permitted the detection even of a single *D. dendriticum* metacercaria from the *Formica rufibarbis* and *Formica pratensis* abdomen, as well as the detection of the brainworm in the head of the ants collected in tetania. Although these primers did not amplify *Dicrocoelium chinensis* DNA and permitted *D. dendriticum* to be detected in the molluscs, they did not discriminate Brachylaimidae metacercariae found in the same mollusc.

Summary

A new pair of primers was designed to amplify a 93 bp fragment of the nuclear region ITS-2. The PCR designed is *D. dendriticum* specific as it did not amplify *D. chinensis*, Brachylaimidae, *F. hepatica*, *C. daubneyi*, Plagiorchiidae or Notocotylidae. Besides, this technique is very sensitive since it permitted *D. dendriticum* to be detected in the molluscs from the first day post-infection as well as the brainworm in the head of the ants and only 1 *D. dendriticum* metacercaria from the abdomen of the ants. Natural infection by *D. dendriticum* was confirmed for the first time in 10 species of naturally infected molluscs.

Proteomic analysis of the TG and ES antigens

The second purpose was to study and identify the major antigen proteins in the adult *D. dendriticum* tegument and excretion-secretion extracts using bidimensional electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS) techniques. First the extraction process of the TG and ES antigen fractions of *D. dendriticum* was optimized, after which the best conditions of separation by 2D electrophoresis and immunodetection of antigenic proteins were determined. The best results in terms of spot resolution and reproducibility were obtained using the following parameters: treating the samples with the "ReadyPrep 2D clean-up" kit; 3-10 IPG non-linear strips, colloidal Coomassie staining. Under those conditions the maps of the protein ES and TG extracts of *D. dendriticum* were obtained. In the TG 332 spots were detected and 284 in the ES, both extracts showing a similar distribution in the number of spots as in the ranges of molecular weights and isoelectric points. Also, an immunodetection of antigenic proteins onto nitrocellulose membranes was carried out with sera from experimentally infected sheep. Majority and antigenic proteins were subsequently excised from colloidal Coomassie stained gels and identified by Mass Spectrometry. A quantity of 29 proteins in the excretion-secretion products and 43 in the teguments were identified first in *D. dendriticum*, 23 of them antigenic, involved in various processes such as: metabolism, detoxification, chaperone, transport or structural molecules. These results could help us to understand the complex parasite-host relationships, improve the diagnosis of dicrocoeliosis and help to produce possible vaccines to control it.

Construction of an expression library and EST analysis

The next objective was to construct a cDNA library of *D. dendriticum* to identify specific genes to be used as recombinant antigens in the specific immunological diagnosis of

Summary

microcoeliosis and extend molecular information about it. For this purpose, mRNA from 400 adult parasites obtained from naturally infected sheep was extracted and purified. A double-strand cDNA was synthesized from mRNA and ligated with Uni-ZAP XR vector, then *E. coli* XL1-Blue MRF' cells were transformed with the ligation mixture and used for library propagation and maintenance. After construction and titration, the cDNA library was amplified for greater stability. The amplified cDNA library had 2×10^7 plaque forming units (pfu)/ ml, the cDNA insertion rate was 90% and the length of the cDNAs ranged from 120 bp to 1300 pb. We can establish that the library was of good quality, because less than 20% useless sequences were found and 80% of the total sequenced genes were different ones. A random screening of 230 phage plaques was carried out by plaque-PCR and then cloned in the pGEM-T easy vector. After edition and analysis sequences, the trimmed ESTs were assembled into 158 clusters, the most abundant of which was identified as mitochondrial DNA. All other ESTs were registered in GenBank under accession numbers JZ330400- JZ330572. Those EST sequences that displayed significant similarities with known sequences were categorized by their Biological Process, Molecular Function and Cellular Component according to information obtained from the Gene Ontology database. Many of the molecules described in this work could carry out important functions such as: penetration and migration in host tissues, immunoevasion, digestion, redox homeostasis or cellular stress response that could serve as a starting point for further research in disease control.

Obtaining and evaluation of recombinant protein in microcoeliosis diagnosis

In order to identify those antigenic molecules of *D. dendriticum* that can be used in the serological diagnosis of microcoeliosis, 3 clones were selected to be expressed in recombinant form and evaluated in disease diagnosis. Proteins were selected based on the literature and the solubility and antigenicity results obtained through "in silico" sequence studies. Thus, the clones selected were: a / Clone No. 179 myoglobin, b / Clone No. 182 8kDa protein c / Clone No. 151 cystatin. Bioinformatic analysis of the three proteins was performed to ensure that they had a complete ORF, the presence of a possible signal peptide and to predict their secondary structure. Three cDNAs were subcloned into both the Glutathion-S-Transferase (GST) pGEX6P vector (Health Care) and the His6-tag pRSET vector (Life Technologies). A PCR assay was carried out using specific primers, including the restriction enzyme sites. Subsequently, the cDNAs

Summary

were cloned into both vectors and different IPTG expression conditions were tested in the transformed *E. coli*. The best results were obtained with pGEX-6P vector. In the case of the pRSET-A vector it was only possible to induce cystatin expression in the insoluble fraction and this hampers the subsequent purification process. After evaluating the best conditions, a large-scale purification was carried out by affinity chromatography using glutathione sepharose columns. Finally, a preliminary assessment of the three recombinant proteins was conducted to evaluate diagnosis potential by Western blotting with sera from experimentally infected lambs. The most satisfactory results were obtained with the 8-kDa protein, which was performed with a preliminary indirect ELISA test using polyclonal sera obtained throughout the post-infection period (up to 180 days pi). The results obtained from this trial demonstrated the diagnostic value of the 8-kDa protein, which was able to discriminate between positive and control animals from day 30 pi, with maximum values obtained from day 60 pi. Also, specificity of the test was evaluated using heterologous sera collected from monospecific animals and those experimentally infected with other flukes (*C. daubneyi*, *F. hepatica* and *S. bovis*) and nematodes (*T. circumcincta*, *H. contortus* and *C. colubriformis*). Cross-reactions were only observed in animals infected with *S. bovis*.

VIII. CONCLUSIONES

Conclusiones

Primera

El par de oligonucleótidos degenerados diseñado en este estudio, mediante el alineamiento de las secuencias mitocondriales de parásitos próximos filogenéticamente a *D. dendriticum*, ha permitido obtener, por primera vez, un fragmento de 1035 pb de ADN mitocondrial de *D. dendriticum*. Este fragmento (Nº JF690758) incluye la secuencia parcial del gen Cox1, la secuencia completa del tRNA-treonina y parte de la subunidad grande del ARNr.

Segunda

La técnica de PCR desarrollada en este Tesis, utilizando ADN mitocondrial, demostró ser muy sensible tanto para la detección de metacercarias de *D. dendriticum* en el abdomen de las hormigas, segundos hospedadores intermediarios, como para la detección de la larva cerebral del parásito en las hormigas recolectadas en fase de tetania. Asimismo permitió detectar la infección por *D. dendriticum* en los moluscos, pero no la discriminación entre *D. dendriticum* y las fases larvianas (metacercarias y esporocistos) de Brachylaimidae, por lo que no es adecuada para la detección de *D. dendriticum* en moluscos.

Tercera

La técnica de PCR puesta a punto, basada en el fragmento ITS-2, permite detectar la infección por *D. dendriticum* tanto en hormigas como en moluscos y natural y experimentalmente infectados. Asimismo, permite discriminar entre *D. dendriticum*, *D. chinensis* y las especies de Brachylaimidae. La sensibilidad de esta técnica es elevada, ya que con ella se puede detectar el parásito en moluscos infectados experimentalmente desde el primer día p.i. Asimismo, se puede detectar hasta una única metacercaria extraída del abdomen de hormigas infectadas naturalmente y la larva cerebral en la cabeza de hormigas recogidas en tetania.

Cuarta

Mediante la técnica de PCR diseñada a partir del fragmento ITS-2 se pudo confirmar la infección natural por *D. dendriticum* en las 10 siguientes especies de moluscos: *Cepaea nemoralis*, *Cerņuella (Cerņuella) virgata*, *Cerņuella (Microxeromagna) vestita*, *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, *Helicella corderoi*, *Helicella itala*, *Helicella*

Conclusiones

jamuzensis, *Helicella madritensis*, *Helicella ordunensis* y *Monacha (Monacha) cartusiana*.

Quinta

Las condiciones de electroforesis bidimensional establecidas en este trabajo permiten la separación óptima de las proteínas de los antígenos TG y ES de *D. dendriticum*. Los mapas proteicos de ambos antígenos muestran una gran similitud, tanto en el número de spots, como en su distribución en el rango de puntos isoeléctrico y de pesos moleculares. De esta forma, se han detectado por primera vez 332 spots en el antígeno TG y 284 en el ES.

Sexta

Las técnicas 2D y espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) han permitido identificar por vez primera 29 proteínas en los extractos de ES y 43 en el TG, 23 de ellas antigénicas, involucradas en varios procesos fundamentales como: metabolismo, detoxificación, chaperona, transporte o funciones estructurales.

Séptima

La genoteca de expresión de adultos de *D. dendriticum*, construida por vez primera, ha demostrado su utilidad en la búsqueda de nuevas moléculas, dada la baja redundancia de genes hallada durante el cribado al azar de la misma. Con esta herramienta se han identificado, por primera vez, 173 Expressed Sequence Tag (EST) registrados en la base de datos del GenBank con los nº de acceso JZ330400- JZ330572, que podrían ser útiles tanto para la inmunodetección como la inmunoprolifaxis de la dicrocoeliosis.

Octava

Se han secuenciado, caracterizado, expresado y evaluado para el diagnóstico de la dicrocoeliosis las siguientes proteínas recombinantes de *D. dendriticum*: mioglobina, cistatina y proteína de 8-kDa. De ellas, se han descartado la mioglobina y la cistatina para su uso en el diagnóstico de la dicrocoeliosis, al no ser reconocidas por sueros de animales infectados con *D. dendriticum*.

Conclusiones

Novena

Se ha demostrado el valor potencial en el diagnóstico de la dicrocoeliosis de la proteína recombinante de 8-kDa, durante los ensayos de Western Blot y ELISA. En la técnica de ELISA indirecto fue capaz de discriminar entre animales sanos e infectados desde el día 30 p.i. Además no mostró reacciones cruzadas con *F. hepatica* y *C. daubneyi* (Trematoda), ni con *T. circumcincta*, *H. contortus* y *T. colubriformis* (Nematoda). Sin embargo, sí se observaron reacciones cruzadas con el trematodo *S. bovis* y con el suero de un único animal infectado con *F. hepatica*, por lo que requieren futuras investigaciones para mejorar la especificidad del test.

IX. BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

- Abath, F.G. & Werkhauser, R.C.** (1996). The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. *Parasite Immunol.*, 18: 15-20.
- Abdel-Rahman, S., O'reily, K.L. & Malone, J.B.** (1998). Evaluation of a diagnostic monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of a 26- to 28-kd *Fasciola hepatica* coproantigen in cattle. *American J. Vet. Res.*, 59: 533–537
- Abdulla, M.H., Lim, K.C., Sajid, M., McKerrow, J.H. & Caffrey, C.R.** (2007). Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. *PLoS Med*, 4: e14.
- Adams, M.D., Kerlavage, A.R., Fleischmann, R.D., Fuldner, R.A., Bult, C.J., Lee, N.H., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Gocayne J.D. & White, O.** (1995). Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of ADNc sequence. *Nature*, 377: 3–174.
- Adema, C.M., Léonard, P.M., DeJong, R.J., Day, H.L., Edwards, D., Burgett, G., Hertel, L.A. & Loker, E.S.** (2000). Analysis of messages expressed by *Echinostoma paraensei* miracidia and sporocysts, obtained by random EST sequencing. *J. Parasitol.*, 86: 60-65.
- Aebersold, R. & Goodlett, D.R.** (2001). Mass spectrometry in proteomics. *Chem. Rev.*, 101: 269-295.
- Aebersold, R. & Mann, M.** (2003). Mass spectrometry based proteomics. *Nature*, 422: 198-207.
- Alger, H.M., Sayed, A.A., Stadecker, S.J. & Williams D.L.** (2002). Molecular and enzymatic characterisation of *Schistosoma mansoni* thioredoxin. *Int. J. Parasitol.*, 32: 1285–1292.
- Aliev, S.Y.** (1966). [Some problems on the pathogenesis of dicrocoeliasis]. *Veterinariya*, 43: 41-42.
- Alunda, J.M. & Rojo-Vázquez, F.A.** (1982) Susceptibility of some populations of *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (Schmidt, 1875) (Gastropoda, Helicidae) from the Douro basin (Iberian Peninsula) to the infection by *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). *Malacología*, 22: 39–43.

Bibliografía

- Alvarez Nogal, R., Manga-González, M.Y., Gonzalez Lanza, C. & Del Pozo Carnero, P.** (1992). Preliminary study on *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). First larval stages in experimentally infected *Ceruella (Xeromagna) cespitum arigonis* (Mollusca). *Vlth European Multicolloquium of Parasitology*, The Hague, The Netherlands. September 7-11: 163.
- Alzieu, J.P. & Ducos de Lahitte, J.** (1991). La dicrocoeliose chez les bovins. *Bull. GTV*, 6: 135-146.
- Ambrosi, M.** (1991). La diagnostica coprologica nelle elmintiasi di allevamento: caso delle distomatosi dei ruminanti. *Praxis Vet.* (Milano), 12: 17–20.
- Anuracpreeda, P., Chawengkirtikul, R., Tinikul, Y., Poljaroen, J., Chotwiwatthanakun, C. & Sobhon, P.** (2013). Diagnosis of *Fasciola gigantica* infection using a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of circulating cathepsin B3 protease. *Acta Trop.*, 127: 38-45.
- Anuracpreeda, P., Wanichanon, C., Chawengkirtikul, R., Chaithirayanon, K. & Sobhon, P.** (2009). *Fasciola gigantica*: immunodiagnosis of fasciolosis by detection of 567 circulating 28.5 kDa tegumental antigen. *Exp. Parasitol.*, 123: 334–340.
- Angeles, J.M., Goto, Y., Kirinoki, M., Leonardo, L., Tongol-Rivera, P., Villacorte, E., Inoue, N., Chigusa, Y. & Kawazu, S.I.** (2011). Human antibody response to thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins as immunodiagnostic antigen candidates for *Schistosoma japonicum* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 85: 674–679.
- Angeles, J.M., Goto, Y., Kirinoki, M., Asada, M., Leonardo, L.R., Rivera, P.T., Villacorte, E.A., Inoue, N., Chigusa, Y. & Kawazu, S.** (2012). Utilization of ELISA using thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins for diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection among water buffaloes. *PLoS Neg. Trop. Dis.*, 6(8): e1800.
- Arias, M., Morrondo, P., Hillyer, G.V., Sanchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Lomba, C., Pedreira, J., Diaz, P., Diez-Banos, P. & Paz Silva, A.** (2007). Immunodiagnosis of current fasciolosis in sheep naturally exposed to *Fasciola hepatica* by using a 2.9 kDa recombinant protein. *Vet. Parasitol.*, 137: 67–73.

Bibliografía

- Arias, M., Martínez-Carrasco, C., León-Vizcaíno, L., Paz-Silva, A., Diez-Baños, P., Morrondo, P. & Alonso, F.** (2012). Detection of antibodies in wild ruminants to evaluate exposure to liver trematodes. *J. Parasitol.*, 98: 754–759.
- Ayupov, KH.V.** (1967). [Migration, localization and life span of *Dicrocoelium dendriticum* in the final host (sheep)]. *Trudy bashkirskogo sel'skokhozyaistvennogo instituta*, 13 (2): 38-42. En: *Helminth. Abstr.* (1970), 39, nº 802.
- Baldelli, B., Piergili Fioretti, D., Ambrosi, M., Polidori, G.A., Grelloni, V. & Moretti, A.** (1981). Dicroceliosi ovina: studio degli anticorpi vers *Dicrocoelium dendriticum* in agnelli nati da pecore spontaneamente infette. *Riv. Parassitol.*, 42: 23–30.
- Barrett, J., Jefferies, J.R. & Brophy, P.M.** (2000). Parasite proteomics. *Parasitol. Today*, 16: 400–403.
- Bazsalovicsová, E., Králová-Hromadová, I., Spakulová, M., Reblánová, M. & Oberhauserová, K.** (2010). Determination of ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) interspecific markers in *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Paramphistomum cervi* (Trematoda), parasites of wild and domestic ruminants. *Helminthol.*, 47: 76-82.
- Ben Amer, K.F. & Ahmed, Z.** (1980). Studies on the prevalence of liver flukes with special reference to *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1891) Loos 1899 in sheep and cattle from Tripoli region, Libya. *Riv. Parassito.*, 141: 15-18.
- Bernal, D., Carpena, I., Espert, A.M., De la Rubia, J.E., Esteban, J.G., Toledo, R. & Marcilla, A.** (2006). Identification of proteins in excretory/secretory extracts of *Echinostoma friedi* (Trematoda) from chronic and acute infections. *Proteomics*, 6: 2835-2843.
- Bernal, D., De La Rubia, J.E., Carrasco-Abad, A.M., Toledo, R., Mas-Coma, S. & Marcilla, A.** (2004). Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Letters*, 563: 203-206.
- Berriman, M., Haas, B.J., LoVerde, P.T., Wilson, R.A., Dillon, G.P., Cerqueira, G.C., et al.** (2009). The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*, 460: 352-358.

Bibliografía

- Bjellqvist, B., Ek, K. & Righetti, P.G.** (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 6: 317-339.
- Blackstock, W.P. & Weir, M.P.** (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.*, 17: 121-127.
- Bode, L. & Geyer, E.** (1981). Experimental dicrocoeliosis: the humoral immune response of golden hamsters and rabbits to primary infection with *Dicrocoelium dendriticum*. *Z. Parasitenkd.*, 66: 167-178.
- Borchert, A.** (1981). *Parasitología veterinaria*: Ed. Acribia, Zaragoza, pp: 745.
- Boukli, N.M., Delgado, B., Ricaurte, M. & Espino, A.M.** (2011). *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*: Identification of Common Proteins by Comparative analysis. *J. Parasitol.*, 97: 852-861.
- Braschi, S., Borges, W.C. & Wilson, R.A.** (2006b). Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 205-212.
- Braschi, S., Curwen, R.S., Ashton, P.D., Verjovski-Almeida, S. & Wilson, A.** (2006a). The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics*, 6: 1471-1482.
- Braschi, S. & Wilson, R.A.** (2006). Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol. Cell. Proteomics*, 5: 347–356.
- Brogia, A., Heidrich, J., Lanfranchi, P., Nöckler, K. & Schuster, R.** (2009). Experimental ELISA for diagnosis of ovine dicrocoeliosis and application in a field survey. *Parasitol. Res.*, 104: 949-953.
- Calamel, M. & Giauffret, A.** (1976) Interprétation des résultats dans le diagnostic coproscopique de la dicrocoeliose. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 152: 99–104.
- Calkins, C.C. & Sloane, B.F.** (1995). Mammalian cysteine protease inhibitors: biochemical properties and possible roles in tumor progression. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.*, 376: 71-80.

Bibliografía

- Camara, L., Pfister, J. & Aeschlimann, A.** (1996). Analyse histopathologique de foie de bovin infesté par *Dicrocoelium dendriticum*. *Vet. Res.*, 27: 87–92.
- Campo, R., Manga-González, M.Y., González-Lanza, C., Rollinson, D. & Sandoval, H.** (1998). Characterization of adult *Dicrocoelium dendriticum* by isoelectric focusing. *J. Helminthol.*, 72: 109-116.
- Campo, R., Manga-González, M.Y. & González-Lanza, C.** (2000). Relationship between egg output and parasitic burden in lambs experimentally infected with different doses of *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Vet. Parasitol.*, 87: 139-149.
- Cancela, M., Carmona, C., Rossi, S., Frangione, B., Goni, F. & Berasain, P.** (2004). Purification, characterization, and immunolocalization of paramyosin from the adult stage of *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.*, 92: 441–448.
- Cancela, M., Ruétalo, N., Dell'Oca, N., da Silva, E., Smircich, P., Rinaldi, G., Roche, L., Carmona, C., Alvarez-Valín, C., Zaha, A. & Tort, J.F.** (2010). Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC genomics*, 11(1): 227.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. & Righetti, P.G.** (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25: 1327-1333.
- Cardoso, F.C., Macedo, G.C., Gava, E., Kitten, G.T., Mati, V.L., de Melo, A.L., Caliari, M.V., Almeida, G.T., Venancio, T.M., Verjovski-Almeida, S. & Oliveira, S.C.** (2008). *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2: e308.
- Carmena, D., Benito, A. & Eraso, E.** (2007). The immunodiagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection: an update. *Acta Trop.*, 13: 460-475.
- Carnevale, S., Rodríguez, M.I., Guarnera, E.A., Carmona, C., Tanos, T. & Angel, S.O.** (2001). Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cystein proteinase. *Diagn. Micr. Infec. Dis.*, 41: 43-49.
- Cavalcanti, M.G., Silva, L.F., Peralta, R.H., Barreto, M.G. & Peralta, J.M.** (2013). Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. *Trends in parasitol.*, 29: 75-82.

Bibliografía

- Cavani, C., Losi, G., Manfredini, M., Pavoncelli, R.M., Pietrobelli, M. & Restani, R.** (1982). Ricerche sull'influenza della dicroceliasi sulle caratteristiche quantitative e qualitative della produzione di latte in pecore. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 3: 59-63.
- Chaithirayanon, K., Grams, R., Vichasri-Grams, S., Hofmann, A., Korge, G., Viyanant, V., Upatham, E.S. & Sobhon, P.** (2006). Molecular and immunological characterization of encoding gene and 14-3-3 protein 1 in *Fasciola gigantica*. *Parasitol.*, 133: 763–775.
- Chandra, G.** (1973). First detection of *Dicrocoelium* eggs in the faeces of experimenatally infected lambs, guinea pigs and pigs. *Haryana Agricult. Univ. J. Res.*, 3: 31-34.
- Cho, P.Y., Kim, T.I., Whang, S.M. & Hong, S.J.** (2008). Gene expression profile of *Clonorchis sinensis* metacercariae. *Parasitol. Res.*, 102: 277–282.
- Chung, Y.B., Lee, M., Yang, H.J., Chung, B.S., Lee, S.Y., Choi, M. H. & Hong, S.T.** (2002). Characterization of partially purified 8 kDa antigenic protein of *Clonorchis sinensis*. *Korean J. Parasitol.*, 40: 83-88.
- Chung, Y.B., Yang, H.J., Hong, S.J., Kang, S.Y., Lee, M., Kim, T.Y., Choi, M.H., Chai, J.Y. & Hong, S.T.** (2003). Molecular cloning and immunolocalization of the 17 kDa myoglobin of *Clonorchis sinensis*. *Parasitol. Res.*, 90: 365–368.
- Cifrian, B. & Garcia-Corrales, P.** (1988). Scanning electron microscopy of adult *Dicrocoelium dendriticum*. *Parasitol Res.*, 74: 235-42.
- Colwell, D.D., & Goater, C.P.** (2010). *Dicrocoelium dendriticum* in cattle from Cypress Hills, Canada: Humoral response and preliminary evaluation of an ELISA. *Vet. Parasitol.*, 174: 162-165.
- Corba, J. & Krupicer, I.** (1992). Efficacy of intraruminal albendazole boluses against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Parasitol. Res.*, 78: 640-642.
- Cordero-del-Campillo, M., Castañón, L. & Reguera, A.** (1994). *Índice catálogo de zooparásitos ibéricos*, 2ª ed. León. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de León.
- Cordero-del-Campillo, M., Rojo-Vázquez, F.A., Díez-Baños, P. & Chaton-Schaffner, M.** (1982). Efficacy of albendazole against natural *Dicrocoelium lanceolatum* infection in sheep (in French). *Rev. Méd. Vét.*, 133: 41-49.

Bibliografía

- Cringoli, G.** (2006). Flotac, a novel apparatus for multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia*, 48: 381–384.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P. & Utzinger, J.** (2010). FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat. Protoc.*, 5: 503–515.
- Cucher, M.A., Carnevale, S., Prepelitchi, L., Labbé, J. H. & Wisnivesky-Colli, C.** (2006). PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Vet. Parasitol.*, 137: 74-82.
- Cuervo, P., De Jesus, J.B., Saboia-Vahia, L., Mendonça-Limae, L., Domontd, G.B. & Cupolillo, E.** (2009). Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *J. Proteom.*, 73: 79-92.
- Dayhoff, M.O., Barker, W.C. & Hunt, L.T.** (1983). Establishing homologies in protein sequences. *Methods Enzymol.*, 91: 524e45.
- de Guzman, J.V., Yu, H.S., Jeong, H.J., Hong, Y.C., Kim, J., Kong, H.H., & Chung, D.I.** (2007). Molecular characterization of two myoglobins of *Paragonimus westermani*. *J. Parasitol.*, 93: 97-103.
- de la Torre-Escudero, E., Manzano-Roman, R., Perez-Sanchez, R., Siles-Lucas, M. & Oleaga, A.** (2010). Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Vet. Parasitol.*, 173: 76-84.
- de la Torre Escudero, E., Manzano-Roman, R., Valero, L., Oleaga, A., Perez-Sanchez, R., Hernandez-Gonzalez, A. & Siles-Lucas, M.** (2011). Comparative proteomic analysis of *Fasciola hepatica* juveniles and *Schistosoma bovis* schistosomula. *J. Proteomics*, 74: 1534-1544.
- de la Torre-Escudero, E., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R., Barrera, I., Siles-Lucas, M., & Oleaga, A.** (2012). Molecular cloning, characterization and diagnostic performance of the *Schistosoma bovis* 22.6 antigen. *Vet. Parasitol.*, 190: 530-540.
- Del Río, J.** (1967). Epizootiología de la dicrocoeliosis en la provincia de León. *An. Fac. Vet. León*, 13: 211-253.

Bibliografía

- Dougherty, M.K. & Morrison, D.K.** (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *J. Cell Sci.*, 117: 1875–1884.
- Duchacek, L. & Lamka, J.** (2003). Dicrocoeliosis- the present state of knowledge with respect to wild life species. *Acta Vet. BRNO*, 72: 613-626.
- Duménigo, B.E., Espino, A.M. & Finlay, C.M.** (1996). Detection of *Fasciola hepatica* antigen in cattle feces by a monoclonal antibodybased sandwich immunoassay. *Res. Vet. Sci.*, 60: 278–279.
- Eckert, J. & Hertzberg, H.** (1994). Parasite control in transhumant situations. *Vet. Parasitol.*, 54: 103-125.
- Espino, A.M, & C. M. Finlay.** (1994). Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in humans with fascioliasis. *J.Clinical Microbiol.*, 32: 190–193.
- Fagbemi, B.O. & Guobadia, E.E.** (1995). Immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using a 28 kDa cysteine protease of *Fasciola gigantica* adult worms. *Vet. Parasitol.*, 57: 309-318.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. & Whitehouse, C.M.** (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246: 64-71.
- Ferre, I., Ortega-Mora, L.M. & Rojo-Vázquez, F.A.** (1994). Prevalence of *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep in León province (NW Spain). *Prev. Vet. Med.*, 21: 147-154.
- Ferreira, V., Molina, M.C., Valck, C., Rojas, A., Aguilar, L., Ramírez, G., Schwaeble, W. & Ferreira, A.** (2004). Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol. Immunol.*, 40: 1279-1291.
- Ferreras-Estrada, M.C., Campo, R., González-Lanza, C., Pérez, V., García-Marín, J.F. & Manga-González, M.Y.** (2007). Inmunohistochemical study of the local immune response in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Parasitol. Res.*, 101: 547-555.

Bibliografía

- Figueroa-Santiago, O., Delgado, B., & Espino, A. M.** (2011). *Fasciola hepatica* saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. *Diagn. Micr. Infec. Dis.*, 70: 355-361.
- Frank, W., Lucius, R. & Romig, R.** (1984). Studies on the biology, pathology, ecology and epidemiology of *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 in West Africa (Ivory Coast). In: Markl H, Bittner A (eds) *Recent German research on problems of parasitology, animal health and animal breeding in the tropics and subtropics*. Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn, pp 38–58.
- García Merino, A.** (2011). Monoclonal antibodies. Basic features. *Neurología (English Edition)*, 26: 301-306.
- Gan, W., Zhao, G., Xu, H., Wu, W., Huang, J., Yu, X. & Hu, X.** (2010). Reverse vaccinology approach identify an *Echinococcus granulosus* tegumental membrane protein enolase as vaccine candidate. *Parasitol. Res.*, 106: 873–882.
- Gasser, R.B.** (2006). Molecular tools-advances, opportunities and prospects. *Vet. Parasitol.*, 136: 69-89.
- Gaudier, J.F., Cabán-Hernández, K., Osuna, A. & Espino, A.M.** (2012). Biochemical Characterization and Differential Expression of a 16.5-Kilodalton Tegument-Associated Antigen from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 19: 325–333.
- Gobert, G.N.** (2010). Applications for profiling the schistosome transcriptome. *Trends Parasitol.*, 26: 434-439.
- Gobert, G.N. & McManus, D.P.** (2005). Update on paramyosin in parasitic worms. *Int. J. Parasitol.*, 54: 101–107.
- González-Lanza, C., Manga-González, M.Y. & Del-Pozo, P.** (1993). Coprological study of the *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) egg elimination by cattle in highland areas in León Province, Northwest Spain. *Parasitol. Res.*, 79: 488-491.
- González-Lanza, C., Manga-González, M.Y., Campo, R. & Del-Pozo, M.P.** (1997). Larval development of *Dicrocoelium dendriticum* in *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* under controlled laboratory conditions. *J. Helminthol.*, 71: 311-318.

Bibliografía

- González-Lanza, C., Manga-González, M.Y., Campo, R., Del-Pozo, M.P., Sandoval, H., Oleaga, A. & Ramajo, V.** (2000). IgG antibody response to ES or somatic antigens of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) in experimentally infected sheep. *Parasitol. Res.*, 86: 472-479.
- González-Lanza, C., Manga-González, M.Y. & Revilla-Nuín, B.** (2006). Preliminary protective capacity study of a *Dicrocoelium dendriticum* antigenic protein in hamsters. *Parasitol. Res.*, 99: 749-752.
- Gorg, A., Obermaier, C. & Boguth, G.** (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21: 1037-1053.
- Gourbal, B.E., Guillou, F., Mitta, G., Sibilleb, P., Theron, A., Pointier, J.P. & Coustau, C.** (2008). Excretory–secretory products of larval *Fasciola hepatica* investigated using a two-dimensional proteomic approach. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 161: 63–66.
- Gubler, U. & Hoffman, B.J.** (1983) A simple and very effective method for generating ADNc libraries. *Gene*, 25: 263-269.
- Guex N., Diemand A. & M.C. Peitsch.** (1999). Protein Modelling for All. *Trends Biochem. Sci.*, 24: 364-367.
- Guillou, F., Roger, E., Mone, Y., Rognon, A., Grunau, C., Theron, A., Mitta, G., Coustau, C. & Gourbal, B. E.** (2007). Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 155: 45–56.
- Gundlach, J.L. & Sadzikowski, A.** (1987). Antigenic structure of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819). *Polish Archiv Weter.*, 25: 267-274.
- Gunsser, I., Hanichen, T. & Maierl, J.** (1999). Leberegelbefall bei neuweltkameliden. Liver fluke in South American camelids. *Tierarztl. Prax.*, 27: 187–192.
- Gygi, S.P., Corthals, G.L., Zhang, Y., Rochon, Y. & Aebersold, R.** (2000). Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 9390-9395.

Bibliografía

- Hanelt, B., Adema, C.M., Mansour, M.H. & Loker E.S.** (1997). Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. *J. Parasitol.*, 83: 387-394.
- He, B., Cai, G., Ni, Y., Li, Y., Zong, H. & He, L.** (2011). Characterization and expression of a novel cystatin gene from *Schistosoma japonicum*. *Mol. Cell. Probes*, 25:186-93.
- Henkle-Dührsen, K. & Kampkötter, A.** (2001). Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 114: 129–142.
- Heussler, V., Kaufmann, H., Glaser, I., Ducommun, D., Müller, C., & Dobbelaere, D.** (1998). A DNA probe for the detection of *Dicrocoelium dendriticum* in ants of *Formica* spp. and *Lasius* spp. *Parasitol. Res.*, 84: 505-508.
- Hewitson, J.P., Harcus, Y. M., Curwen, R.S., Dowle, A.A., Atmadja, A.K., Ashton, P.D., Wilson, A. & Maizels, R.M.** (2008) The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: proteomic profile of adult excretory-secretory products. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160, 8–21
- Higón, M., Monteagudo, C., Fried, B., Esteban, J.G., Toledo, R. & Marcilla, A.** (2008). Molecular cloning and characterization of *Echinostoma caproni* heat shock protein-70 and differential expression in the parasite derived from low- and high-compatible hosts. *Parasitol.*, 135: 1469–1477.
- Himonas, C.A. & Liakos, V.** (1980). Efficacy of albendazole against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet. Rec.*, 107: 288-289.
- Höhrst, W. & Lämmler, G.** (1962). Experimentelle Dicrocoeliose-Studien. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 13: 377–397.
- Hu, M., Chilton, N.B. & Gasser, R.B.** (2004). The Mitochondrial Genomics of Parasitic Nematodes of Socio-Economic Importance: Recent Progress, and Implications for Population Genetics and Systematics. *Adv. Parasitol.*, 56: 133-212.
- Huang, S., Zhao, G., Fu, B., Xu, M., Wang, C., Wu, S., Zou, F. & Zhu, X.** (2012). Genomics and molecular genetics of *Clonorchis sinensis*: Current status and perspectives. *Parasitol. Int.*, 61: 71–76.

Bibliografia

- Huynh, T.V., Young, R.A. & Davis, R.W.** (1984). Constructing and screening ADNc libraries in λ gt10 and λ gt11. In: *DNA cloning techniques*, Vol. 1: A practical Approach (D. Glover, ed.) pp: 49-78. IRL Press, Oxford.
- Hyde, J.E.** (1990). *Molecular Parasitology*. Open University Press, pp. 302.
- Ikeda, T., Oikawa, Y. & Nishiyama, T.** (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay using cysteine proteinase antigens for immunodiagnosis of human paragonimiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55: 435–437.
- Jayaraj, R., Piedrafita, D., Dynon, K., Grams, R., Spithill, T.W. & Smooker, P.M.** (2009). Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet. Parasitol.*, 160: 230-236.
- Jefferies, J.R., Campbell, A.M., Van Rossum, A.J., Barrett, J. & Brophy, P.M.** (2001). Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics*, 1: 1128-1132.
- Jithendran, K.P. & Bhat, T.K.** (1996). Prevalence of dicrocoeliosis in sheep and goats in Himachal Pradesh, India. *Vet. Parasitol.*, 61: 265-271.
- Jithendran, K.P. & Bhat, T.K.** (1999). Epidemiology of parasitoses in dairy animals in the northwest humid himalayan region of India with particular reference to gastrointestinal nematodes. *Trop. An. Health Prod.*, 31: 205–214.
- Jithendran, K.P., Vaid, J. & Krishna, L.** (1996). Comparative evaluation of agar gel precipitation, counterimmunoelectrophoresis and passive haemagglutination tests for the diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep and goats. *Vet. Parasitol.*, 61: 151–156.
- Jin, Y., Lu, K., Zhou, W.F., Fu, Z.Q., Liu, J.M., et al.** (2010) Comparison of recombinant proteins from *Schistosoma japonicum* for schistosomiasis diagnosis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 17: 476–480.
- Jones, M.K., Gobert, G.N., Zhang, L., Sunderland, P. & Mcmanus, D.P.** (2004). The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host–parasite interactions. *Bioessays*, 26: 752–765.

Bibliografía

- Junqueira-De-Azevedo, I.L.M. & Ho, P.L.** (2002). A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene*, 299: 279-291.
- Kalkan, A.** (1971) *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 in Turkey. I. Field studies of intermediate and final hosts in the South Marmara region, 1968. *British Vet. J.*, 127: 67-75.
- Karanfilovski, G.** (1983) Economic losses caused by fascioliasis and dicrocoeliasis to livestock production in Pljevlja and surrounding area (in Serbo-Croatian). *Veterinaria Yugoslavica*, 32: 253-260.
- Karas, M. & Hillenkamp, F.** (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, 60: 2299-2301.
- Karp, G.** (2006). *Conceptos de biología celular y molecular, conceptos y experimento*. (4ª Ed.) México D.F.: McGraw-Hill Interamericana (Eds). México D.F., pp.835-837.
- Katsoulos, P.D., Christodouloupoulos, G., Karatzia, M.A., Pourliotis, K. & Minas, A.** (2011). Liver flukes promote cholelithiasis in sheep. *Vet. Parasitol.*, 179: 262-265.
- Kim, S.I.** (1998) A *Clonorchis sinensis*-specific antigen that detects active human clonorchiasis. *Korean J. Parasitol.*, 36: 37-45.
- Kim, T.Y., Kang, S.Y., Ahn, I.Y., Cho, S.Y. & Hong, S.J.** (2001). Molecular cloning and characterization of an antigenic protein with a repeating region from *Clonorchis sinensis*. *Korean J. Parasitol.*, 39: 57-66.
- Kimmel, A.R. & Berger, S.L.** (1987) Preparation of ADNc and the generation of ADNc libraries. *Methods Enzymol.*, 152: 307-316.
- Klickstein, L. B.** (1989). Production of a complete ADNc library. *Current Protocols in Molecular Biology*, 5-8.
- Klinkert, M.Q., Bommert, K., Moser, D., Felleisen, R., Link, G., Dumbo, O. & Beck, E.** (1991). Immunological analysis of cloned *Schistosoma mansoni* antigens Sm31 and Sm32 with sera of schistosomiasis patients. *Trop. Med. Parasitol.*, 42: 319-324.

Bibliografia

- Klose, J.** (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 26: 231-243.
- Klotz, C., Ziegler, T., Daniłowicz-Luebert, E., & Hartmann, S.** (2011). Cystatins of parasitic organisms. In: *Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms*. Springer US. pp. 208-221.
- Knox, D.P., Redmond, D.L., Skuce, P.J. & Newlands, G.F.J.** (2001). The contribution of molecular biology to the development of vaccines against nematode and trematode parasites of domestic ruminants. *Vet. Parasitol.*, 101: 311-335.
- Knudsen, G.M., Medzihradzky, K.F., Lim, K.C., Hansell, E., & McKerrow, J.H.** (2005) Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. *Mol. Cell. Proteomics*, 4: 1862–1875
- Kozak, M. & Wedrychowicz, H.** (2010). The performance of a PCR assay for field studies on the prevalence of *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula* intermediate host snails. *Vet. Parasitol.*, 168: 25-30.
- Krull, W.H. & Mapes, C.R.** (1952). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819 Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella Lubrica* (Müller). VII. The second intermediate host of *Dicrocoelium dendriticum*. *Cornell Veterinarian*, 42: 603-604.
- Krull, W.H. & Mapes, C.R.** (1953). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819 Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella Lubrica* (Müller). IX. Notes on the cyst, metacercaria, and infection in the ant, *Formica fusca*. *Cornell Veterinarian*, 42: 389-410.
- Kumar, D., Mcgeown, J.G., Reynoso-Ducoing, O., Ambrosio, J.R. & Fairweather, I.** (2003). Observations on the musculature and isolated muscle fibres of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol.*, 127: 457–473.
- Kunz, P.A.** (1975). Isolation, characterization and partial sequence determination of a haemeprotein from the small liver fluke *Dicrocoelium dendriticum*. Ph.D. Thesis, University of Zurich.

Bibliografía

- Kuntz, A.N., Davioud-Charvet, E., Sayed, A.A., Califf, L.L., Dessolin, J., Arnér, E.S. & Williams, D.L.** (2007). Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target. *Plos Medicine*, 4: 1071-1085.
- Lavín, S., Marco, I., Vilafranca, C., Feliu, C. & Viñas, L.** (1998). *Dicrocoelium dendriticum* infestation of mouflons (*Ovis musimon*) in Catalonia. *Vet. Record*, 143: 396.
- Le, T.H., Blair, D. & Mcmanus, D.P.** (2001). Complete DNA sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the liverfluke, *Fasciola hepatica* L. (Platyhelminthes; Trematoda). *Parasitol.*, 123: 609-621.
- Le, T.H., Blair, D. & Mcmanus, D.P.** (2002). Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends Parasitol.*, 18: 206-213.
- Lee, H., Lee, C., Kim, B., Joo, K., Lee, J., Kim, T. & Kim, H.** (2002). Purification and characterization of a 7-kda protein from *Clonorchis sinensis* adult worms. *J. Parasitol.*, 88: 499–504.
- Lee, E.G., Na, B.K., Bae, Y.A., Kim, S.H., Je, E.Y., Ju, J.W., Cho, S.H., Kim, T.S., Kang, S.Y., Cho, S.Y. & Kong, Y.** (2006). Identification of immunodominant excretory–secretory cysteine proteases of adult *Paragonimus westermani* by proteome analysis. *Proteomics*, 6: 1290–1300.
- Li, Y., Hu, X., Liu, X., Huang, Y., Xu, J., Zhao, J., Wu, Z. & Yu, X.** (2012). Serological diagnosis of clonorchiasis: using a recombinant propeptide of cathepsin L proteinase from *Clonorchis sinensis* as a candidate antigen. *Parasitol, Res.*, 110: 2197-2203.
- Li, S., Shin, J.G., Cho, P.Y., Kim, T.I., Hong, S.T. & Hong, S.J.** (2011). Multiple recombinant antigens of *Clonorchis sinensis* for serodiagnosis of human clonorchiasis. *Parasitol. Res.*, 108:1295-1302.
- Liakos, D.V.** (1985). Epidemiological survey of parasitoses of sheep and goats. *Etlen Kteniati Hellen Vet. Med.*, 28: 271-278.
- Littlewood, D.T., Lockyer, A.E., Webster, B.L., Johnston, D.A. & Le, T.H.** (2006). The complete mitochondrial genomes of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma spindale* and the evolutionary history of mitochondrial genome changes among parasitic flatworms. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 39: 452-467.

Bibliografía

- Liu, F., Cui, S.J., Hu, W., Feng, Z., Wang, Z.Q., & Han, Z.G.** (2009b). Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. *Mol. Cell. Proteomics*, 8: 1236-1251.
- Liu, F., Zhou, Y., Wang, Z.Q., Lu, G., Zheng, H., Brindley, P.J., et al.** (2009a). The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host–parasite interplay. *Nature*, 460: 345–51.
- López-Abán, J., Nogal-Ruiz J.J., Vicente, B., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Hillyer, G.V., Martínez-Fernández A.R., San Feliciano, A & Muro, A.** (2008). The addition of a new immunomodulator with the adjuvant adaptation ADAD system using fatty acid binding proteins increases the protection against *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, 153: 176–18.
- Loukas, A., Tran, M. & Pearson, M.S.** (2007). Schistosome membrane proteins as vaccines. *Int. J. Parasitol.*, 37: 257–63
- Lv, X., Chen, W., Wang, X., Li, X., Sun, J., Deng, C., Men, J., Tian, Y., Zhou, C., Lei, H., Liang, C. & Yu, X.** (2011). Molecular characterization and expression of a cysteine protease from *Clonorchis sinensis* and its application for serodiagnosis of clonorchiasis. *Parasitol. Res.*, 110: 2211–2219.
- Magalhaes, K.G., Passos, L.K. & Santos Carvalho, O.** (2004). Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 9: 421-424.
- Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basika, T., Gayo, V., Rosadilla, D., Roche, L., Tort, J. & Carmona, C.** (2011). The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine*, 29: 9057-9063.
- Magister, Š. & Kos, J.** (2013). Cystatins in Immune System. *J. Cancer*, 4: 45.
- Mahmoud, M.S. & Moustafa, M.A.** (2003). Cystatin capture-dot-enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis and assessment of cure of experimental trichinellosis in mice. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 33: 275.
- Malek, E.A.** (1980). *Snail-transmitted parasitic diseases*. Volume II. CRC Press Inc., Florida.

Bibliografía

- Manga-González, M.Y.** (1978). Distribución de tres especies del género *Cerņuella* Schlüter (Gastropoda, Helicidae) en la provincia de León. Porcentaje de infestación natural por Trematodos. *Hygia Pecoris*, 1 (9): 73-89.
- Manga-González, M.Y.** (1980). Notas sobre *Ponentina ponentina* (MORELET, 1845) y *Euomphalia (Mengoana) brigantina* (DA SILVA MENGO, 1867) (Gastropoda, Helicidae) en la provincia de León. *Comunicaciones del Primer Congreso Nacional de Malacología*, Madrid, 3-4 Noviembre: 41-45.
- Manga-González** (1982). Infestación natural por trematodos de varias especies de Helicidae (Mollusca, Stylommatophora). *Resúmenes de las comunicaciones del IV Congreso Nacional de Malacología*, Gijón, 11-13 Septiembre: 14.
- Manga-González, M.Y.** (1983). *Los Helicidae (Gastropoda, Pulmonata) de la Provincia de León*. Institución 'Fray Bernardino de Sahagún', Excma. Diputación Provincial de León, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CECEL) León, Spain.
- Manga-González, M.Y.** (1987). Some aspects of the biology and helminthofauna of *Helicella (Helicella) itala* (Linnaeus, 1758) (Mollusca). Natural infection by Dicrocoeliidae (Trematoda). *Rev. Ibér. Parasitol.*, Vol. Extraordinario: 131–148.
- Manga-González, M.Y.** (1992). Some land molluscs species involved in the life cycle of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) in the wild in the province of León (NW Spain). In: *Abstracts of the 11th International Malacological Congress, Siena* (ed. Giusti, F. & Manganelli, G), pp: 248-249. Unitas Malacological. University of Siena, Italy.
- Manga-González, M.Y.** (1999). Trematodos. En: *Parasitología Veterinaria*. Cordero del Campillo y otros. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid (España), pp: 79-104.
- Manga-González, M.Y., Alunda-Rodríguez, J.M., Morrondo-Pelayo, M.P. & Reguera-Feo, A.** (1979). Nota sobre trematodos Digenea parásitos de algunos Helicidae en la provincia de León. *Actas del 2º Congreso Nacional de Parasitología*. 1-4 Octubre, León (España). pp. 96 (1979).
- Manga-González, M.Y & Cordero-del-Campillo M.** (1979). New malacological records for the province of León (N.W. Spain) and percentages of infection by Trematoda. *Malacologia*, 18: 61-66.

Bibliografía

- Manga-González, M.Y., Ferreras, M.C., Campo, R., González-Lanza, C., Pérez, V. & García-Marín, J.F.** (2004). Hepatic marker enzymes, biochemical parameters and pathological effects in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Parasitol. Res.*, 93: 344-355.
- Manga-González, M.Y., González-Lanza, C. & Del-Pozo, P.** (1991). Dynamics of the elimination of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda, Digenea) eggs in the faeces of lambs and ewes in the Porma basin (León, NW Spain). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 66: 57-61.
- Manga-González, M.Y., González-Lanza, C., Del-Pozo, M.P. & Campo, R.** (1995) Studies on experimental infection by *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) of *Cerquaria (Xeromagana) cespitum arigonis* (Mollusca) specimens in a natural environment. *Abstracts of 12th International Malacological Congress*, Vigo (Spain), 456-458.
- Manga-González, M.Y., González-Lanza, C., Cabanas, E. & Campo, R.** (2001). Contributions to and review of dicrocoeliosis, with special reference to the intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum*. *Parasitol.*, 123: S91-S114.
- Manga-González, M.Y. & González-Lanza, C.** (2005). Field and experimental studies on *Dicrocoelium dendriticum* and dicrocoeliasis in northern Spain. *J. Helminthol.*, 79: 291-302.
- Manga-Gonzalez, M.Y., Gonzalez-Lanza, C. & Cabanas, E.** (2007). *Dicrocoelium dendriticum* primoinfection and kinetic egg elimination in marked lambs and ewes from the Leon mountains (Spain). *Rev. Ibér. Parasitol.*, 67: 15–25.
- Manga-González, M.Y. & Quiroz-Romero, H.** (1999). Dicrocoeliosis. En: *Parasitología Veterinaria*. Cordero del Campillo y otros. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid (España), pp: 272-282.
- Manga-González, M.Y., Quiroz-Romero, H., González-Lanza, C., Miñambres, B. & Ochoa, P.** (2010). Strategic control of *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) egg excretion by naturally infected sheep. *Vet. Med-Czech.*, 55: 19-29.
- Mann, M., Hendrickson, R.C. & Pandey, A.** (2001). Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.*, 70: 437-73.

Bibliografía

- Marcilla, A., Perez-Garcia, A., Espert, A., Bernal, D., Munoz-Antoli, C., Esteban, J.G. & Toledo, R.** (2007). *Echinostoma caproni*: identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. *Exp. Parasitol.*, 117: 57–64.
- Maresca, B. & Kobayashi, G.S.** (1994). Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen. *Experientia*, 50: 1067–1074.
- Martínez-Fernández, A.R., Nogal-Ruiz, J.J., López-Abán, J., Ramajo, V., Oleaga, A., Manga-González, Y., Hillyer, G.V. & Muro, A.** (2004). Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Vet. Parasitol.*, 126: 287-298.
- Martínez-Ibeas, A.M., González-Warleta, M., Martínez-Valladares, M., Castro-Hermida, J.A., González-Lanza, C., Miñambres, B., Ferreras, C., Mezo, M. & Manga-González, M.Y.** (2013). Development and validation of a mtADN multiplex PCR for identification and discrimination of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in the *Galba truncatula* snail. *Vet. Parasitol.*, 195: 57– 64.
- Martínez-Sernández, V., Muiño, L., Pereteguer, M.J., Gárate, T., Mezo, M., González-Warleta, M., Muro, A., Correia da Costa, J.M., Romarís, F. & Ubeira, F.M.** (2011). Development and Evaluation of a New Lateral Flow Immunoassay for Serodiagnosis of Human Fasciolosis. *PLoS Neglect. Trop. D.*, 5: e1376.
- Mas-Coma, S., Funatsu, I. R. & Bargues, M. D.** (2001). *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitol.*, 123: S115-S127.
- Massoud, J.** (1981). Histopathology of liver in Iranian sheep naturally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. *Ann.Trop. Med. Parasitol.*, 75: 293–298.
- Maurelli, M. P., Rinaldi, L., Capuano, F., Perugini, A. G., Veneziano, G. & Cringoli G.** (2007). Characterization of the 28S and the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Dicrocoelium dendriticum* and *Dicrocoelium hospes*. *Parasitol. Res.*, 101: 1251-1255.
- McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P. & Sajid, M.** (2006). Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol.*, 1: 497–536

Bibliografía

- McManus, D.P. & Bowles, J.** (1996). Molecular genetic approaches to parasite Identification: their value in diagnostic Parasitology and Systematics. *Int. J. Parasitol.*, 26: 687-704.
- McVeigh, P., Maule, A.G., Dalton, J.P. & Robinson, M.W.** (2012), *Fasciola hepatica* virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes Infect*, 14: 301-310
- Mezo, M., González-Warleta, M., & Ubeira, F.M.** (2004). An ultrasensitive capture elisa for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *J. Parasitol.*, 90: 845–852.
- Mezo, M., González-Warleta, M., & Ubeira, F. M.** (2007). The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fascioliasis. *J. Parasitol.*, 93: 65-72.
- Mitchell, G.B., Maris, L. & Bonniwell, M.A.** (1998). Triclabendazole resistant liver fluke in scottish sheep. *Vet. Rec.*, 143: 399.
- Mohamed, A.R.E. & Mummery, V.** (1990). Human dicrocoeliosis. Report on 208 cases from Saudi Arabia. *Trop. Geogr. Med.*, 42: 1-7.
- Monis, P.T., Andrews, R.H. & Saint, C.P.** (2002). Molecular biology techniques in parasite ecology. *Int. J. Parasitol.*, 32: 551-562.
- Morozova, E.V., Ryskov, A.P. & Semyenova, S.K.** (2002). RAPD Variation in two Trematode Species (*Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendriticum*) from a Single Cattle Population. *Russian J. Genetics*, 38: 977-983.
- Morphew, R.M., Wright, H.A., Lacourse, E.J, Woods, D.J. & Brophy, P.M.** (2007). Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during *in vitro* culture ex host. *Mol. Cell. Proteomics*, 6: 963-972.
- Mostafa, O.M.S., Taha, H.A. & Ramadan, G.** (2003). Diagnosis of *Fasciola gigantica* in snail using the polymerase chain reaction (PCR) assay. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 33: 733-742.
- Muiño, L., Perteguer, M.J., Gárate, T., Martínez-Sernández, V., Beltrán, A., Romarís, F., Mezo, M., González-Warleta, M. & Ubeira, F.M.** (2011). Molecular and immunological

Bibliografía

characterization of *Fasciola* antigens recognized by the MM3 monoclonal antibody, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 179: 80-90.

Müller N. & Felleisen R.S.J. (1995) Bacterial expression systems as tools for the production of immunodiagnostic parasite antigens. *Parasitol. Today*, 11: 476–480.

Mulvenna, J., Sripa, B., Brindley, P. J., Gorman, J., Jones, M. K., Colgrave, M. L., et al. (2010a). The secreted and surface proteomes of the adult stage of the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *Proteomics*, 10: 1063-1078.

Mulvenna, J., Moertel, L., Jones, M.K., Nawaratna, S., Lovas, E.M., Gobert, G.N., Colgrave, M., Jones, A., Loukas, A. & McManus, D.P. (2010b). Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. *Int. J. Parasitol.*, 40, 543–554.

Nagano, I., Pei, F., Wu, Z., Wu, J., Cui, H., Boonmars, T. & Takahashi, Y. (2004). Molecular expression of a cysteine proteinase of *Clonorchis sinensis* and its application to an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of clonorchiasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11: 411–416.

Nolan, J. M. & Cribb T. H. (2005). The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Adv. Parasitol.*, 60: 101-163.

Oberhauserová, K., Bazsalovicsová, E., Králová-Hromadová, I., Major, P. & Reblánová, M. (2010): Molecular discrimination of eggs of cervid trematodes using the Teflon (PTFE) technique for eggshell disruption. *Helminthologia*, 47: 147-151.

O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250: 4007-4021.

Olins, P.O. & Lee, S.C. (1993) Recent advances in heterologous gene expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4: 520-525.

Oliveira, G. (2007). The *Schistosoma mansoni* transcriptome: An update. *Exp. Parasitol.*, 117: 229–235.

Olson, P.D., Cribb, T.H., Tkach, V.V., Bray, R.A. & Littlewood, D.T.J. (2003). Phylogeny and classification of Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *Int. J. Parasitol.*, 33: 733-755.

Bibliografía

- Onar, E.** (1990). Efficacy of thiophanate and albendazole against natural infections of *Dicrocoelium dendriticum*, *Fasciola hepatica*, and gastrointestinal nematodes and cestodes in sheep, and gastrointestinal nematodes and cestodes in sheep. *Vet. Parasitol.*, 35: 139–145.
- Otranto, D. & Traversa, D.** (2002). A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Vet. Parasitol.*, 107: 317-335.
- Otranto, D. & Traversa, D.** (2003). Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. *Trends Parasitol.*, 19: 12-15.
- Otranto, D., Rehbein, S., Weigl, S., Castacessi, C., Parisi, A., Lia, R.P. & Olson, P.D.** (2007). Morphological and molecular differentiation between *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjikov, 1951) Tang and Tang, 1978 (Platyhelminthes: Digenea). *Acta trop.*, 104: 91-98.
- Overend, D.J. & Bowen, F.L.** (1995). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Austr. Vet. J.*, 72: 275-276.
- Pandey, A. & Mann, M.** (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405: 837-846.
- Paz-Silva, A., Hillyer, G.V., Sánchez-Andrade, R., Rodríguez-Medina, J.R., Arias, M., Morrondo, P. & Díez-Baños, P.** (2005). Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* ADNc encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. *Parasitol. Res.*, 95: 129–135.
- Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Hernández, A., Ramajo-Martín, V. & Oleaga, A.** (2006). Proteomic analysis of the tegument and excretory–secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics*, 6: S226–S236.
- Pérez-Sánchez, R., Valero, M.L., Ramajo-Hernández, A., Siles-Lucas, M., Ramajo-Martín, V. & Oleaga, A.** (2008). A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 161: 112–123.

Bibliografia

- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. & Cottrell, J.S.** (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20: 3551-3567.
- Piergili Fioretti, D., Baldelli, B., Ambrosi, M., Polidori, G.A. & Moretti, A.** (1980). Il metodo ELISA per la ricerca di anticorpi in ovini parassitati da *Dicrocoelium dendriticum*. *Riv. Parassitol.*, 3: 289–292.
- Preyavichyapugdee, N., Sahaphong, S., Riengrojpitak, S., Grams, R., Viyanant, V. & Sobhon, P.** (2008). *Fasciola gigantica* and *Schistosoma mansoni*: Vaccine potential of recombinant glutathione S-transferase (rFgGST26) against infections in mice. *Exp. Parasitol.*, 119: 229–237.
- Prichard, R.** (1997). Application of molecular biology in veterinary Parasitology. *Vet. Parasitol.*, 71: 155-175.
- Prunescu, C., Prunescu, P., Fromunda, V., Paraschivescu, D. & Popescu, S.** (1979). Histopathological changes of the liver in hamsters with experimental dicroceliasis (in Russian). *Arch. Vet.*, 14: 83–90.
- Rahko, T.** (1972). Studies on the pathology of dicrocoeliasis and fascioliasis in the goat. The histopathology of the liver and bile ducts. *Acta Vet. Scand.*, 13: 554–562.
- Ramajo-Hernández, A., Oleaga, A., Ramajo-Martín, V. & Pérez-Sánchez, R.** (2007). Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted glycoproteins of adult *Schistosoma bovis* worms. *Vet. Parasitol.*, 144: 45–60.
- Ramajo Martin, V., R. Pérez Sánchez, A. Ramajo Hernández & A. Oleaga.** (2007). Preliminary data about the parasitism caused by protozoa, helminths and ticks in cervids and wild bovidae from Salamanca (western Spain). *Rev. Ibér. Parasitol.-Research and Reviews in Parasitology*, 67: 69–79.
- Ranucci, S., Mughetti, L., Ambrosi, M. & Grelloni, V.** (1981). Rilievi ematochimici, anatomo-istopatologici e parassitologici in ovini infetti da dicroceliosi. *Riv. Zoot. Vet.*, 9:173–175.
- Rashid, A.K., Van Hauwaert, M.L., Haque, M., Siddiqi, A.H., Lasters, I., De Maeyer, M., Griffon, N., Marden, M.C., Dewilde, S., Clauwaert, J., Vinogradov, S.N. & Moens,**

Bibliografía

- L. (1997). Trematode myoglobins, functional molecules with a distal tyrosine. *J. Biol.Chem.*, 272: 2992–2999.
- Rehbein, S., Kokott, S. & Lindner, T.** (1999). Evaluation of techniques for the enumeration of *Dicrocoelium* eggs in sheep faeces. *J. Vet. Med.*, 46: 133–139.
- Reina, D., Navarrete, I., Hernández, S. & Habela, M.** (1987). Contribución al conocimiento de la parasitofauna de Cáceres. Primera relación. II. Helmintos. *Rev. Ibér. Parasitol.*, Vol. Extraordinario: 85-90.
- Revilla-Nuín, B., Manga-González, Y.M., Miñambres, B. & González Lanza, C.** (2005). Partial characterization and isolation of 130 Kda antigenic protein of *Dicrocoelium dendriticum* adults. *Vet. Parasitol.*, 134: 229-240.
- Rinaldi, L., Coles, G.C., Maurelli, M. P., Musella, V., & Cringoli, G.** (2011). Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Vet. Parasitol.*, 177: 345-352.
- Rivas López, L. & López López, C.** (1993). *Parasitología Molecular* .Consejo Superior de Investigaciones Científicas, pp.430.
- Robinson, M.W., Dalton, J.P., & Donnelly, S.** (2008). Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends Biochem. Sci.*, 33: 601-608.
- Robinson, M.W., Donnelly, S., Hutchinson, A.T., To, J., Taylor, N.I., Norton, R.S. & Dalton, J.P.** (2011). A family of helminth molecules that modulate innate cell responses via molecular mimicry of host antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.*, 7(5): e1002042.
- Robinson, M.W., Menon, R., Donnelly, S.M., Dalton, J.P. & Ranganathan, S.** (2009). An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol. Cell. Proteomics*, 8: 1891–1907.
- Rajo-Vázquez, F.A., Cordero-del-Campillo, M., Diez Baños, P. & Chaton-Schaffner, M.** (1981). Relation existant entre le nombre d'oeufs dans les feces et la charge parasitaire lors des infestations naturelles a *Dicrocoelium dendriticum* chez les ovins. *Rev. Méd. Vét.*, 132: 601–607.

Bibliografía

- Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Tarazona, J.M. & Duncan, J.L.** (1989). The efficacy of netobimin 15 mg/kg, against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet. Rec.*, 13: 512-513.
- Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F., Martínez-Valladares, M.** (2012). Update on trematode infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 30; 189:15-38.
- Roos, M.H., Kwa, M.S.G. & Grant, W.N.** (1995). New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitol. Today*, 11: 148–150.
- Ruosch, W.** (1966). Zur Bekämpfung der Dicrocoeliose beim Rind. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 108:125-138.
- Rutledge, R.G., Seligy, V.L., Cote, M.J., Dimock, K., Lewin, L.L. & Tenniswood, M.P.** (1988) Rapid synthesis and cloning of complementary DNA from any ARN molecule into plasmid and phage M13 vectors. *Gene*, 68: 151-158.
- Sadzikhowski, A.** (1988). Badania immunologiczne szczuro´w uodpornionych ekstraktem somatycznym *Fasciola hepatica*. *Ann. Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, D (Medicina Veterinaria)*, 39: 91-109.
- Salimi-Bejestani, M.R., Daniel, R.G., MCGarry, J.W., Felstead, S., Ortiz, P., Akca, A. & Williams, D.J.** (2005). Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Res. Vet. Sciences*, 78: 177–181.
- Salimova, M.** (1972) Experimental dicrocoeliasis of Karakul lambs (in Russian). Trudy VII Vsesoyuznoi Konferentsii po Prirodnoi Ochagovosti Boleznej i Obshchim Voprosam Parazitologii Zhivotnykh, 14–18 Oktyabrya 1969, Samarkand, 6. Tashkent, USSR: Izdatel'stvo "FAN" Uzbekskoi SSR: 155–157.
- Salinas, G., Selkirk, M.E., Chalar, C., Maizels, R.M. & Fernández, C.** (2004). Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. *Trends Parasitol.*, 20: 340–346.
- Sambrook, J. & Russell, D.W.** (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, (3^a Ed.) New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Bibliografía

- Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J., Arias, M., López, C., Morrondo, P. & Scala, A.** (2003). Serum antibodies to *Dicrocoelium dendriticum* in sheep from Sardinia (Italy). *Prev. Vet. Med.*, 57: 1-5
- Sánchez-Campos, S., Tuñón, M.J., González, P., Campo, R., Ferreras, M.C., Manga-González, M.Y. & González-Gallego, J.** (1996) Effects of experimental dicoecoeliosis on oxidative drug metabolism in hamster liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, 115: 55-60.
- Sánchez-Campos, S., González, P., Ferreras, C., García-Iglesias, M.J., González-Gallego, J. & Tuñón, M.J.** (2000). Morphologic and biochemical changes caused by experimentally induced dicoecoeliosis in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Comp. Med.*, 50: 147–152.
- Sandoval, H., Manga-González, Y., Campo, R., García, P., Castro, J. M. & Pérez-de-la-Vega, M.** (1999). Preliminary study on genetic variability of *Dicrocoelium dendriticum* determined by random amplified polymorphic DNA. *Parasitol. Int.*, 48: 21-26.
- Sandoval, H., Manga-González, M.Y. & Castro, J.M.** (2013). A tool for diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum* infection: hatching eggs and molecular identification of the miracidium. *Parasitol. Res.*, 112: 1589-1595.
- Santos, T. M., Johnston, D. A., Azevedo, V., Ridgers, I. L., Martinez, M. F., Marotta, G. B., et al.** (1999). Analysis of the gene expression profile of *Schistosoma mansoni* cercariae using the expressed sequence tag approach. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 103(1): 79-97.
- Sanz, F., Tarazona, J.M., Jurado, R., Frías, J., Tarazona, J.V. & Duncan, J.L.** (1987). An evaluation of the efficacy of netobimin against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet. Rec.*, 17: 57–58.
- Sargison, N.D., Baird, G.J., Sotiraki, S., Gilleard, J.S., & Busin, V.** (2012). Hepatogenous photosensitisation in Scottish sheep caused by *Dicrocoelium dendriticum*. *Vet. Parasitol.*, 189: 233-237.
- Savitskii, I.G. & Ponomareva, A.M.** (1984). Diagnosis of ovine dicoecoeliasis by the ELISA. *Veterinariya, Moscow, USSR*, 1: 43-44.

Bibliografía

- Savitskii, I.G. & Benediktov, I.I.** (1988). Molecular weight and immunobiological activity of the antigenic fractions of *Dicrocoelium lanceolatum*, determined by enzyme immunoassay. *Byulleten Vsesoyuznogo Instituta Gelmintologii im. K.I. Skryabina*, 49: 40-46.
- Schmidt, J., Bodor, O., Gohr, I. & Kunz, W.** (1996). Paramyosin isoforms of *Schistosoma mansoni* are phosphorylated and localized in a large variety of muscle types. *Parasitol.*, 112: 459–467.
- Schröder, L.** (1979). Untersuchungen zur Immunologie der *Dicrocoelium dendriticum*-Infektion. Ph.D. thesis. Philips – Universität, Marburg/Lahn.
- Schröder, L. & Geyer, E.** (1976). Experimentelle Dicrocoeliose; Bildung humoraler Antikörper beim Goldhamster (*Mesocricetus auratus* WATERHOUSE). *Behring Inst. Mitt.*, 60: 24–37.
- Schürenberg, M., Luebbert, C., Eickhoff, H., Kalkum, M., Lehrach, H. & Nordhoff, E.** (2000). Prestructured MALDI-MS sample supports. *Anal. Chem.*, 72: 3436-3442.
- Schuster, R. & Hiepe, TH.** (1993). Control of ovine dicrocoeliosis (in German). *Monatshefte für Veterinärmedizin*, 48: 657-661.
- Schwarz, A., Valdés, J.J. & Kotsyfakis, M.** (2012). The role of cystatins in tick physiology and blood feeding. *Ticks and Tick-borne Diseases.*, 3(3): 117-127.
- Segade, P., Crespo, C., García, N., García-Estévez, J. M., Arias, C. & Iglesias, R.** (2010). *Brachylaima aspersae* sp. (Digenea: Brachylaimidae) infecting farmed snails in NW Spain: Morphology, life cycle, pathology, and implications for heliculture. *Vet. Parasitol.*, 175: 273–286.
- Şenlik, B., Çirak, V. & Tinar, R.** (2006). Changes in faecal egg counts at different hours of the day and relationship between faecal egg count and parasite burden in sheep naturally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 30: 107-111.
- Şenlik, B., Çirak, V.Y. & Tinar, R.** (2008). Field efficacy of two netobimin oral suspensions (5% and 15%) in sheep naturally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. *Small Ruminant Res.*, 80: 104-106.

Bibliografía

- Sereda, M.J., Hartmann, S. & Lucius, R.** (2008). Helminths and allergy: the example of tropomyosin. *Trends in Parasitol.*, 24: 272–278.
- Shatzman, A.R.** (1995). Expression systems. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6: 491-493.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Vorm, O., Havlis, J., Olsen, J.V. & Mann, M.** (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1: 2856-2860.
- Siles-Lucas, M. & Gottstein, B.** (2003). The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. *Trends in Parasitol.*, 19: 575–581.
- Sim, S., Park, G.M., & Yong, T.S.** (2003). Cloning and characterization of *Clonorchis sinensis* myoglobin using immune sera against excretory–secretory antigens. *Parasitol. Res.*, 91(4): 338-343.
- Şimşek, S., Köroğlu, E. & Ütük, A.E.** (2006). Application of Western blotting and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum* in sheep using excretory secretory (E/S) antigens. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 30: 113-119.
- Siricoon, S., Grams, S.V. & Grams, R.** (2012). Efficient inhibition of cathepsin B by a secreted type 1 cystatin of *Fasciola gigantica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 186: 126-133.
- Skálová, L., Krízová, V., Cvilink, V., Szotáková, B., Storkánová, L., Velík, J. & Lamka, J.** (2007): Mouflon (*Ovis musimon*) dicrocoeliosis: effects of parasitosis on the activities of biotransformation enzymes and albendazole metabolism in liver. *Vet Parasitol.*, 146 (3-4): 254 – 262
- Smith, R.E., Spithill, T.W., Pike, R.N., Meeusen, E.N. & Piedrafita, D.** (2008). *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: cloning and characterisation of 70 kDa heatshock proteins reveals variation in HSP70 gene expression between parasite species recovered from sheep. *Exp. Parasitol.*, 118: 536–542.
- Somvanshi, R. & Kaul, G.L.** (1989). Dicrocoeliasis in pashima goats. *Ind. Vet. Med. J.*, 13: 42–43.
- Sotillo, J., Valero, M.L., Sanchez Del Pino, M.M., Fried, B., Esteban, J.G., Marcilla, A. & Toledo, R.** (2010). Excretory/secretory proteome of the adult stage of *Echinostoma caproni*. *Parasitol. Res.*, 107: 691–697.

Bibliografía

- Sotillo, J., Valero, M.L., Sánchez del Pino, M.M., Fried, B., Esteban, J.G., Marcilla, A. & Toledo, R.** (2011). *Zygocotyle lunata*: proteomic analysis of the adult stage. *Exp. Parasitol.*, 128: 133-7.
- Srivastava, G.C., Kolev, G. & Georgiev, M.** (1978). A surgical approach to trace the route of migration of *Dicrocoelium dendriticum* in relation to their size. *J. Helminthol.*, 49: 57-65.
- Steele, J.H.** (1982). *Handbook series in Zoonoses*. Section C: Parasitic Zoonoses Vol. III. Hillyer, G.V. & Hopla, C.E. (Eds). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 337 pp.
- Stratan, N.M.** (1986). Efficacy of Acemidophen against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep (in Russian). *Byulleten Vsesoyuznogo Instituta Gelmintologii im. K.I. Skryabina*, 42: 64-66.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J. & Holle, A.** (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376: 952-965.
- Tansatit, T., Sahaphong, S., Riengrojpitak, S., Viyanant, V. & Sobhon, P.** (2006). Immunolocalization of cytoskeletal components in the tegument of the 3-week-old juvenile and adult *Fasciola gigantica*. *Vet. Parasitol.*, 135: 269–278.
- Tarasuk, M., Vichasri Grams, S., Viyanant, V. & Grams, R.** (2009). Type I cystatin (stefin) is a major component of *Fasciola gigantica* excretion/secretion product. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 167(1): 60-71.
- Tarry, D.W.** (1969). *Dicrocoelium dendriticum*: the life cycle in Britain. *J. Helminthol.*, 43: 403-416.
- Theodoridis, Y., Duncan, J.L., MacLean, J.M. & Himonas, C.A.** (1991). Pathophysiological studies on *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep. *Vet. Parasitol.*, 39:61–66.
- Thuwajit, C., Thuwajit, P., Kaewkes, S., Sripa, B., Uchida, K., Miwas, M. & Wongkham, S.** (2004). Increased cell proliferation of mouse fibroblast NIH-3T3 in vitro induced by excretory/secretory product(s) from *Opisthorchis viverrini*. *Parasitol.*, 129: 455–464.
- Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, et al.** (2006). Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat. Med.*, 12: 835–840.

Bibliografía

- Tuchschnid, P.E., Kunz, P.A. & Wilson, J.** (1978). Isolation and characterization of the hemoglobin from the lanceolate fluke *Dicrocoelium dendriticum*. *Eur. J. Biochem.*, 88: 387–394.
- Turk V, & Bode W.** (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.*, 285: 213e9.
- Tyers, M. & Mann, M.** (2003). From genomics to proteomics. *Nature*, 422:193-7.
- Uriarte, J., Cabaret, J. & Tanco, J.A.** (1985). The distribution and abundance of parasitic infections in sheep grazing on irrigated or non-irrigated pastures in north-eastern Spain. *Ann. Rech. Vet.*, 16: 321-325.
- Van Balkom, B.W., Van Gestel, R.A., Brouwers, J.F., Krijgsveld, J., Tielens, A.G., Heck, A.J., & Van Hellemond, J.J.** (2005). Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. *J. Proteome Res.*, 4: 958–966.
- Varghese, A., Raina, O.K., Nagar, G., Garg, R., Banerjee, P.S., Maharana, B.R. & Kollannur, J.D.** (2013). Development of cathepsin-L cysteine proteinase based Dot-enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Fasciola gigantica* infection in buffaloes. *Vet. Parasitol.*, 183(3-4): 382-385.
- Velusamy, R., Singh, B.P. & Raina, O.K.** (2004). Detection of *Fasciola gigantica* infection in snails by polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.*, 120: 85-90.
- Vilas, R., Criscione, C.D. & Blouin, M.S.** (2005). A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitol.*, 131: 839-846.
- Wang, P.H., Do, Y.S., Macaulay, L., Shinagawa, T., Anderson, P.W., Baxter, J.D. & Hsueh, W.A.** (1991). Identification of renal cathepsin B as a human prorenin-processing enzyme. *J. Biol. Chem.*, 266: 12633-12638.
- Wang, X., Gobert, G. N., Feng, X., Fu, Z., Jin, Y., Peng, J. & Lin, J.** (2009a). Analysis of early hepatic stage schistosomula gene expression by subtractive expressed sequence tags library. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 166(1): 62-69.

Bibliografía

- Wang, Y., Cheng, Z., Lu, X. & Tang, C.** (2009b). *Echinococcus multilocularis*: Proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Exp. Parasitol.*, 123: 162-167.
- Wedrychowicz, H., Ducommun, D., Klockiewicz, M. & Pfister, K.** (1996). Surface and ES antigens of adult *Dicrocoelium dendriticum* inducing bile antibody responses in naturally infected cattle. *Acta Parasitol.*, 41: 139-144.
- Wenker, C., Hatt, J.M., Hertzberg, H., Ossent, P., Hanichen, H., Branck, A. & Isenbùgel, E.** (1998). Dikrozoliose bei neuweltkameliden. *Tieraztl. Prax.*, 26: 355–361.
- Wilson, R.A., Curwen, R.S., Braschi, S., Hall, S.L., Coulson, P.S. & Ashton, P.D.** (2004). From genomes to vaccines via the proteome. *Mem. I. Oswaldo Cruz*, 99: 45-50.
- Wilson, R.A., Wright, J.A., Castro-Borges, W., Parker-Manuel, S.J., Dowle, A.A., Ashton, P.D., Young, N.D., Gasser, R.B. & Spithill, T.W.** (2011). Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome, *Int. J. Parasitol.*, 41: 1347-1359.
- Wolff, K., Hauser, B. & Wild, P.** (1984). Dicrocoeliose des Schafes: untersuchungen zur Pathogenese und zur Regeneration des Leber nach Therapie. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 97: 378-387.
- Wu, Z., Liu, S., Zhang, S., Tong, H., Gao, Z., Liu, Y., Lin, D., Liu, Z., Wu, G., Yi, H., Song, G. & Xu, Y.** (2004). Persistence of the protective immunity to *Schistosoma japonicum* in Chinese yellow cattle induced by recombinant 26 kDa glutathione-S-transferase (reSjc26GST). *Vet. Parasitol.*, 123: 167–177.
- Wu, Z.D., Lü, Z.Y. & Yu, X.B.** (2005). Development of a vaccine against *Schistosoma japonicum* in China: a review. *Acta Trop.*, 96: 106–116.
- Yoo, W.G., Kim, D.W., Ju, J.W., Cho, P.Y., Kim, T.I., Cho, S.H., Choi, S.H., Park, H.S., Kim T.S. & Hong S.J.** (2011). Developmental Transcriptomic Features of the Carcinogenic Liver Fluke, *Clonorchis sinensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 5: e1208.
- Young, N.D., Hall, R., Jex, A., Cantacessi, C. & Gasser, R.** (2010a). Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* — A key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite. *Biotechnol. Adv.*, 28: 222–231.

Bibliografia

- Young, N.D., Campbell, B.E., Hall, R.S., Jex, A.J., Cantacessi, C., et al.** (2010b) Unlocking the transcriptomes of two carcinogenic parasites, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 4: e719.
- Young, N.D., Jex, A.R., Cantacessi, C., Hall, R.S., Campbell, B.E., Spithill, T.W. et al.** (2011). A portrait of the transcriptome of the neglected trematode, *Fasciola gigantica*—Biological and biotechnological implications. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 5(2): e1004.
- Young, R.A. & Davis, R.W.** (1983). Efficient isolation of genes using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80: 1194-1198.
- Zerlotini, A., Heiges, M., Wang, H., Moraes, R.L., Dominitini, A.J., Ruiz, J.C., Kissinger, J.C., Oliveira, G.** (2009). SchistoDB: a *Schistosoma mansoni* genome resource. *Nucleic Acids Res.*, 37: D579–582.
- Zhang, W., Li, J. & McManus, D.P.** (2003). Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16: 18–36.
- Zhang, W. & McManus, D.P.** (2006). Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunol. Med. Mic.*, 47: 24-41.
- Zhao, G.H., Li, J., Blair, D., Li, X.Y., Elsheikha, H.M., Lin, R.Q., Zhou, F.C. & Zhu, X.Q.** (2012). Biotechnological advances in the diagnosis, species differentiation and phylogenetic analysis of *Schistosoma* spp. *Biotechnol. Adv.*, 30(6): 1381-1389.
- Zhao, Q.P., Moon, S.U., Lee, H.W., Na, B.K., Cho, S.Y., Kong, Y., Jiang, M.S., Li, A.H. & Kim, T.S.** (2004). Evaluation of *Clonorchis sinensis* recombinant 7-kilodalton antigen for serodiagnosis of clonorchiasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11: 814–817.
- Zhao, Q.P., Moon, S.U., Na, B.K., Kim, S.H., Cho, S.H., Lee, H.W., Kong, Y., Sohn, W.M., Jiang, M.S. & Kim, T.S.** (2007). *Paragonimus westermani*: Biochemical and immunological characterizations of paramyosin. *Exp. Parasitol.*, 115: 9-18.
- Zhao, C., Onuma, M., Asakawa M., Nagamine, T. & Kuwana, T.** (2009). Preliminary studies on developing a nested PCR assay for molecular diagnosis and identification of nematode (*Heterakis isolonche*) and trematode (*Glaphyrostomum* sp.) in Okinawa rail (*Gallirallus okinawae*). *Vet. Parasitol.*, 163: 156-160.

Bibliografía

- Zheng, M., Hu, K., Liu, W., Hu, X., Hu, F., Huang, L., Wang, P., Hu, Y., Huang, Y., Li, W., Liang, C., Yin, X., He, Q. & Yu, X.** (2011). Proteomic analysis of excretory secretory products from *Clonorchis sinensis* adult worms: molecular characterization and serological reactivity of a excretory–secretory antigen-fructose-1,6-bisphosphatase. *Parasitol. Res.*, 109: 737–744.
- Zhu, Z., Fu, Z., Zhang, M., Han, Y., Hong, Y., Li, D., Zhao, Z., Shi, Y., Li, X. & Lin, J.** (2012). Protective efficacy evaluation induced by recombinant protein LHD-Sj23-GST of *Schistosoma japonicum* emulsified with three different adjuvants. *Parasite Immunol.*, 34(6): 341–344.

X. ANEXOS. PUBLICACIONES
