



**PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE
ANTICUERPOS ANTI-PARAMIOSINA
DE
F. hepatica EN CONEJO**

Anabella Barrios

Tesina de Grado

Licenciatura en Bioquímica

Unidad de Biología Parasitaria,
Facultad de Ciencias-Instituto de Higiene, UdelaR

Orientador: Dra. Patricia Berasain

Julio 2012



*Dedicado a mis padres,
por su amor y apoyo incondicionales.*

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi tutora Patricia Berasain por su dedicación y enseñanzas durante este proceso, en el cual comencé a comprender que era eso de investigar.

Agradezco a la Dra. Silvia Olivera por su colaboración a la hora de realizar los estudios de microscopía confocal y a la Dra. Lucía Piacenza por habernos proporcionados los anticuerpos conjugados.

Al Dr. Carlos Carmona por haberme permitido realizar el trabajo experimental en la Unidad de Biología Parasitaria, y a todos mis compañeros y amigos de la UBP, Dinorah, Federico, Gabriela, Cecilia y Natalia; por esos lindos momentos compartidos que hicieron de mi pasantía una época inolvidable.

Principalmente quiero agradecer a Tatiana y a Gualberto, quienes han sido una parte importantísima durante este proceso de formación como investigadora. Gracias por su disposición, enseñanzas, por su paciencia y su amistad.

Muy especialmente quiero agradecer a mis padres, a mis hermanos, a toda mi familia y amigos, por acompañarme y apoyarme en mi carrera, así como también durante toda mi vida.

ÍNDICE

1 Resumen.....	1
2 Introducción.....	3
2.1 Generalidades.....	3
2.2 Ciclo Biológico.....	3
2.3 Epidemiología.....	5
2.4 Tratamiento.....	6
2.4.1 Vacunación.....	7
2.4.1.1 Antígenos expuestos.....	8
2.4.1.2 Antígenos ocultos.....	9
2.5 Paramiosina.....	10
2.5.1 Pm en invertebrados.....	11
2.5.1.1 Estructura.....	11
2.5.1.2 Localización.....	11
2.5.1.3 Función.....	11
2.5.2 Pm en helmintos parásitos.....	12
2.5.2.1 Pm como antígeno protector.....	12
2.5.2.2 Pm como antígeno inmunomodulador.....	15
3. Objetivos.....	18
4. Estrategia Experimental.....	19
5. Materiales y Métodos.....	19
5.1 Obtención de parásitos.....	19
5.2 Purificación de Paramiosina de <i>F. hepatica</i>	20
5.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	23
5.4 Producción de suero hiperinmune con especificidad hacia Pm de <i>F. hepatica</i>	23
5.4.1 Animal inmunizado.....	23
5.4.2 Obtención del antígeno.....	23
5.4.3 Preparación del antígeno para la inmunización del conejo.....	24
5.4.4 Plan de inmunización.....	24
5.5 Inmunoblots.....	25
5.6 Determinación de la concentración de proteínas.....	26
5.7 Purificación de la fracción IgG del suero hiperinmune α -FhPm.....	26
5.7.1 Preparación de la muestra de suero.....	26
5.7.2 Delipidación de suero.....	26
5.7.3 Limpieza y equilibrado de la columna.....	27
5.7.4 Pasaje del suero delipidado.....	27
5.7.5 Elución.....	27
5.8 Estudios histológicos.....	28
5.8.1 Preparación de materiales para histología.....	28

5.8.1.1 Preparación de solución fijadora de paraformaldehído 4.5 % en PBS 10 mM, pH 7.3.....	28
5.8.1.2 Fijación de tejidos en paraformaldehído.....	28
5.8.1.3 Preparación de bloques de parafina con <i>F. hepatica</i>	28
5.8.1.4 Desparafinización de cortes.....	30
5.9 Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia.....	31
5.9.1 Inmunohistoquímica.....	31
5.9.2 Inmunofluorescencia indirecta.....	32
5.9.3 Toma de imágenes.....	32
6. Resultados.....	33
6.1. Purificación de Paramiosina de <i>F. hepatica</i>	33
6.1.1 Homogeneización de tejidos del parásito.....	33
6.1.2 Extracción de proteínas musculares.....	33
6.1.3 Paso extra de solubilización de proteínas musculares.....	34
6.1.4 Ciclos de solubilización-precipitación de <i>FhPm</i>	34
6.1.5 Rendimiento de la purificación.....	35
6.1.6 Comparación de rendimiento de la purificación de <i>FhPm</i> con resultados reportados por Cancela 2004.....	35
6.1.7 Formación de dímero de <i>FhPm</i>	36
6.2 Producción del suero hiperinmune α - <i>FhPm</i>	38
6.3 Purificación de la fracción IgG del suero α - <i>FhPm</i>	39
6.4 Inmunolocalización de <i>FhPm</i> en el estadio adulto de <i>F. hepatica</i> mediante microscopía óptica y confocal.....	42
6.4.1 Microscopía óptica.....	42
6.4.1.1 Reactividad del suero α - <i>FhPm</i> en el tubo digestivo.....	42
6.4.1.2 Reactividad del suero α - <i>FhPm</i> en el parénquima.....	46
6.4.1.3 Reactividad del suero α - <i>FhPm</i> en el los aparatos reproductores femenino y masculino.....	47
6.4.1.4 Reactividad del suero α - <i>FhPm</i> en los músculos de las capas subtegumentarias y en el tegumento.....	49
6.4.2 Microscopía confocal.....	50
7. Discusión.....	54
8. Perspectivas.....	63
9. Referencias.....	64

ABREVIATURAS

Solo se detallan las abreviaturas que no aparecen especificadas en el texto.

CBB R-250	Coomassie Brilliant Blue R-250
DAB	3,3'-diaminobencidina
DTT	DL-ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
E-64	Trans epoxi-succinil-leucil-amido (4-guanidinio) butano
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HEPES	Acido 2-[4-(2-Hidroxietyl)-1-Pireraciril-Etanosulfónico
HRP	Horse Radish Peroxidase (Peroxidasa de rábano)
PAGE	Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfenilo
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Tris	Tris [hidroximetil] aminometano
Tween 20	Monolaurato de sorbitan-polioxietileno

1. RESUMEN

Paramiosina (Pm), proteína componente integral del músculo de los invertebrados, presenta capacidad inmunoprotectora contra *Fasciola hepatica* en el modelo ovino, así como también contra varias helmintiasis; y propiedades inmunomoduladoras que le permitirían la evasión de la respuesta inmune del huésped. La presencia de Pm en la superficie de los parásitos podría explicar sus propiedades inmunológicas; sin embargo existen controversias en cuánto a su localización extramuscular y al rol que cumpliría este antígeno fuera del músculo. Estudios previos en *F. hepatica* realizados en nuestro laboratorio sugieren que Pm o epítopes tipo Pm estarían en estructuras asociadas al tegumento de este trematodo, lo cual podría explicar su potencial protector en ovinos. La finalidad de este trabajo fue ampliar los estudios de localización en el adulto, para demostrar su ubicación a nivel tegumentario empleando microscopía óptica y confocal, con vistas a explicar su rol protector en el modelo ovino. Para cumplir con este objetivo la proteína fue purificada del adulto y el monómero de 97 kDa utilizado para obtener un suero policlonal en conejo específico para Pm de *F. hepatica* (FhPm), necesario para los ensayos de inmunolocalización. El peso molecular aparente de la proteína purificada, determinado por SDS-PAGE en condiciones reducidas y no reducidas, fue de 97 kDa y 200 kDa, respectivamente. Estos pesos moleculares fueron consistentes con la presencia de la forma dimérica de la proteína unidas por puentes disulfuros. Se logró obtener una preparación altamente enriquecida de FhPm con un rendimiento de 6,82 mg de esta proteína y de elevada pureza. Estudios por western blots evidenciaron que el suero desarrollado contra la banda de 97 kDa de *F. hepatica* fue capaz de reconocer ambas formas, monomérica y dimérica de FhPm. Determinada la actividad α -FhPm del suero desarrollado se procedió a los estudios de inmunolocalización de Pm en el tejido del parásito adulto. Los estudios de inmunolocalización de Pm empleando microscopía óptica y confocal, evidenciaron la presencia de la proteína en la superficie tegumentaria de *F. hepatica*. El análisis confocal, permitió además, detectar Pm en regiones definidas del tegumento, como son la membrana apical, el sincitio y las espinas.

La observación de la proteína en pequeñas vesículas distribuidas en el sincitio tegumentario, alude a un posible mecanismo de secreción tegumentario de Pm, donde esta podría ser dirigida hacia la membrana apical o hacia el medio circundante. Interesantemente, se observó la presencia de Pm en la lamela y en el lumen intestinal, lo que sugiere que la proteína también podría ser sintetizada por las células intestinales, pudiendo ser secretada y/o permanecer asociada a la lamela, donde cumpliría los mismos roles que en el tegumento; aumentando la probabilidad de interacción con componentes del sistema inmune. La secreción de Pm por las células tegumentarias y/o intestinales implicaría un mecanismo de secreción no convencional o desconocido, debido a que las secuencias de Pm estudiadas no contienen péptidos señal de secreción. Por lo descrito anteriormente, la localización de Pm en el tegumento podría explicar su rol protector en el modelo ovino, ya que al estar expuesta en la interfase huésped-parásito, estaría en contacto directo con el sistema inmune del huésped, donde podría modular la acción del mismo, favoreciendo la evasión y sobrevivencia parasitaria. Más aún la presencia de Pm en la lamela intestinal y su posible secreción por las células intestinales, aumentarían la probabilidad de su interacción con componentes del sistema inmune.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria mundial causada por parásitos del género *Fasciola* spp., afecta a una gran cantidad de animales herbívoros, omnívoros, y ocasionalmente al hombre; en los cuales genera patología y sintomatología hepatobiliar.

Esta parasitosis se adquiere por la ingesta de vegetales acuáticos contaminados con metacercarias de *Fasciola hepatica* y/o *Fasciola gigantica*. *F. hepatica* tiene distribución mundial pero predomina en las regiones templadas, mientras que *F. gigantica* se encuentra principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de Asia y África (McManus 2007).

Desde el punto de vista de su clasificación taxonómica, *F. hepatica* pertenece a la familia *Fasciolidae*, al *phylum* Platelminetos, clase Trematoda y subclase Digenea.

El ciclo biológico de este trematodo (Fig. 1) es complejo ya que necesita de dos huéspedes para completarse, uno intermediario (caracol) donde ocurre la etapa de multiplicación asexual y uno definitivo (mamífero) donde alcanza el estadio adulto sexualmente activo.

2.2 Ciclo biológico

El adulto de *F. hepatica* reside en los conductos biliares del huésped definitivo. En nuestro país los huéspedes definitivos más importantes son los ovinos y bovinos (Acosta 1991).

Los miembros de la familia *Fasciolidae* son hermafroditas y en ellos puede ocurrir autofertilización, aunque es común que la reproducción sexual en el huésped definitivo ocurra por fertilización cruzada (Andrews 1999).

Luego de la fecundación los adultos de *F. hepatica* ponen huevos, se estima que cada parásito adulto puede llegar a producir desde 20000 hasta 50000 huevos operculados

no embrionados por día; estos son arrastrados por la bilis hasta el duodeno y son evacuados con la materia fecal (McManus 2007). Si se dan las condiciones de humedad y temperatura adecuadas, se desarrollará al cabo de 10-20 días la larva ciliada miracidio dentro del huevo; la luz estimula al miracidio, el cual eclosiona. A continuación el miracidio nada activamente y debe encontrar a su huésped intermediario para continuar con su desarrollo. Este es un caracol pulmonado de agua dulce del género *Lymnaea*. En Uruguay la especie de caracol de mayor importancia epidemiológica es *Lymnaea viatrix* (Acosta 1991). Una vez que se produce el encuentro, el miracidio penetra los tejidos del caracol. En este hospedero el miracidio pierde sus cilias, dando lugar al siguiente estadio de desarrollo, el esporocisto. Este evoluciona luego a redia y cercaria en 4 a 10 semanas, siendo la cercaria el estadio que abandona al caracol. Esta se caracteriza por tener una cola en forma de flagelo que le permite nadar activamente. De esta manera se localiza en hojas de plantas acuáticas, donde se enquista en la forma de metacercaria; ésta es el estadio infectivo para el huésped definitivo y surge después que la cercaria pierde su cola, adoptando una forma redondeada con una cubierta gruesa de polisacáridos. Las metacercarias se vuelven infectivas luego de 24 horas de enquistamiento y son ingeridas con el pasto, hierbas o agua contaminada por el huésped definitivo. Una vez ingeridas, se desenquistan en el intestino delgado, dando lugar a los juveniles recientemente desenquistados (JRD), que atraviesan la mucosa intestinal, y migran por la cavidad abdominal hacia el hígado. En el hígado, los juveniles migran por el parénquima, causando hemorragias y fibrosis. Durante este período los mismos crecen significativamente y alcanzan los canalículos biliares; en este entorno inmunológicamente seguro maduran sexualmente, pudiendo producir miles de huevos diarios que son liberados con las heces del hospedero.

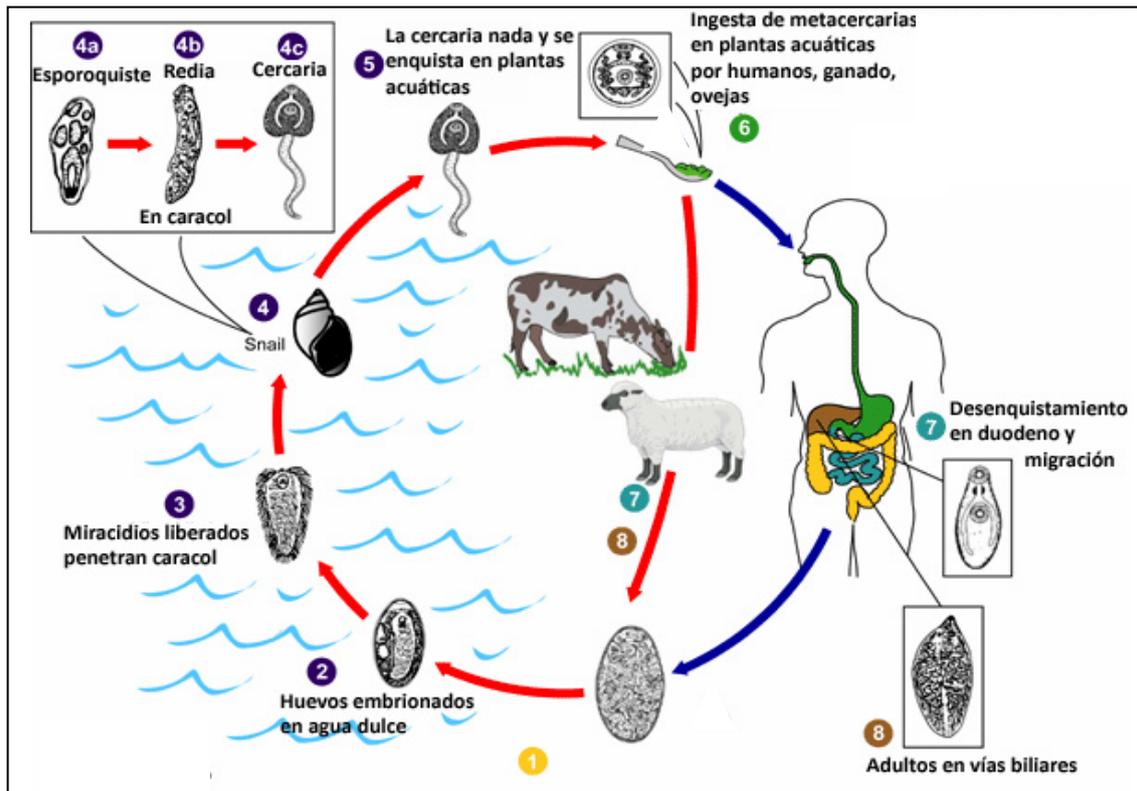


Figura 1. Esquema del Ciclo Biológico de *F. hepatica*. Los huevos inmaduros (1) son liberados a los conductos biliares, de allí al intestino, y finalmente al exterior en las heces. Se convierten en embrionados (2) en el agua, y liberan miracidios (3), que invaden al huésped intermediario, un gasterópodo del género *Lymnae* (4). En el mismo los parásitos pasan por distintas etapas de desarrollo: esporocisto (4a), redia (4b) y cercaria (4c). Las cercarias son liberadas del caracol (5) y se enquistan como metacercarias (6) en plantas acuáticas u otras superficies. Los mamíferos se infectan al ingerir vegetales que contienen las metacercarias. Luego de la ingestión las metacercarias se desenquistan (7) en el duodeno y migran a través de la pared intestinal, la cavidad peritoneal, y el parénquima hepático hacia los conductos biliares, donde se desarrollan a adultos (8). En el hombre la maduración lleva entre 3 a 4 meses. Los adultos residen en los canalículos del huésped definitivo. *F. hepatica* infecta varias especies animales, en su mayoría herbívoras. (Tomado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

2.3 Epidemiología

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria veterinaria muy importante en aquellos países cuyas economías se apoyan en las actividades agropecuarias.

Las pérdidas económicas causadas por esta parasitosis a nivel mundial han sido estimadas en 3.200 millones de dólares americanos por año, con un impacto negativo más pronunciado en las áreas rurales agrícolas-ganaderas de los países en vías de desarrollo (Piedrafita 2007). Existen aproximadamente 700 millones de animales infectados, y al menos un cuarto del ganado mundial comprometido (Hillyer 1997).

En el caso de altas parasitosis, los JRD causan extensas perforaciones y hemorragias en el hígado que pueden llevar a la muerte de los animales, principalmente en las especies susceptibles, como los ovinos. Los daños provocados por la muerte de estos son solo una fracción de las pérdidas económicas que produce el estado subclínico y crónico de la enfermedad. Estos se manifiestan en la reducción en la producción de carne, lana y leche, decomisos de hígados, infecciones secundarias causadas por bacterias, interferencias en la fertilidad y gastos derivados de tratamientos con antihelmínticos (Acosta 1991, Fairweather 2011).

La fasciolosis es un problema sanitario que aqueja a nuestro país, encontrándose distribuida en todos los departamentos. Esta parasitosis es una de las helmintiasis con mayor prevalencia en ovinos y bovinos, superando el 57%. A nivel productivo, se ha estimado que las pérdidas generadas por este motivo en Uruguay superan los 30 millones de dólares anuales (revisado por Acosta, 1994).

Respecto a la infección en humanos, esta parasitosis ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una de las trematodiasis alimentaria más importante (World Health Organization (WHO), Technical report 849), se estima que existen 17 millones de personas infectadas y que 180 millones están en riesgo de contraer la infección (Hopkins 1992). Los problemas sanitarios más importantes se encuentran en países andinos de América del Sur, norte de África, República Islámica de Irán y Europa occidental (Mas-Coma 2005, McManus 2006) donde el número más alto de personas infectadas se ha señalado en Bolivia, Ecuador, Egipto, Francia, Irán, Perú y Portugal (WHO, Technical report 849).

2.4 Tratamiento

Infecciones causadas por este trematodo son tratadas con el fasciolicida triclabendazol, el cual es la droga más efectiva debido a su alta eficacia contra las formas juvenil y adulta (Fairweather 2011).

Sin embargo el alto costo del tratamiento dificulta su amplia utilización por productores rurales de países en desarrollo y aunque sea efectiva, el ganado se

reinfecta fácilmente (Overend 1995; Moll 2000). Además existen reportes que indican el aumento de la resistencia a la misma, datos que comprometen su uso. La resistencia en ovinos se reportó por primera vez en Australia en 1995 y desde entonces su aparición ha sido confirmada en varios países europeos (Fairweather 2009). También se ha reportado resistencia al triclabendazol en bovinos en América (Olachea 2011) Sumado a los inconvenientes que presenta esta droga, existe temor con respecto a los residuos de la droga que puedan quedar presentes en las carnes (Flynn 2010).

2.4.1 Vacunación

Por lo descrito anteriormente, el desarrollo de vacunas para controlar la fasciolosis es de gran importancia. La disminución del nivel de parásitos en el ambiente disminuiría las posibilidades de transmisión de la infección a animales y al hombre, así como también la morbilidad y la mortalidad que esta provoca en ambos.

Resultados obtenidos en varios laboratorios en los últimos años han demostrado que tanto modelos animales de experimentación como animales de producción, pueden ser protegidos contra la fasciolosis mediante la vacunación con antígenos definidos de *Fasciola* (Spithill 1998). Además de reducir el número de gusanos, algunos antígenos llevan a la reducción en la producción de huevos y en el daño del tejido hepático. Estas propiedades de la vacunación la señalan como un importante mecanismo de control de la enfermedad (Valero 2002; 2005).

Desde un punto de vista teórico aquellos antígenos que se encuentren expuestos en la interfase huésped-parásito (productos de excreción-secreción, presentes en tegumento y/o en el tubo digestivo) serían los mejores candidatos vacunales, debido a que podrían ser detectados por el sistema inmune del hospedero. La inhibición de estos antígenos interferiría con importantes funciones del parásito ya que la mayoría de estos participan en la nutrición y/o en la protección mediante la evasión de las respuestas del sistema inmune del hospedero. Basados en esta hipótesis, se han ensayado numerosos antígenos contra la fasciolosis.

2.4.1.1 Antígenos expuestos

- Antígenos secretados

Los estadios juvenil y adulto de *F. hepatica* secretan un conjunto de endopeptidasas, entre ellas predominan las cisteín-proteasas catepsina B (CB) y catepsinas L1 y L2 (CL1 y CL2) (Jayaraj 2009). Estas proteasas son los componentes mayoritarios de los productos de excreción-secreción que libera el parásito. Participan en la nutrición y son consideradas importantes factores de virulencia de los mismos, interviniendo en la evasión de la respuesta inmune y en la invasión de los tejidos del huésped (Berasain 1997; 2000).

Se han llevado a cabo numerosos ensayos de vacunación con estas enzimas. La vacunación de ovejas con CL1 y CL2 indujo niveles de protección de 33 y 34%, respectivamente (Piacenza 1999). En el mismo trabajo se ensayó la combinación de CL1 y CL2, esta produjo mayores niveles de protección que el generado por las enzimas administradas individualmente, obteniéndose un nivel de protección del 60%. Un estudio de vacunación más reciente realizado en ratas con CB y CL5, obtenidas del juvenil y adulto, respectivamente, dio como resultado un importante nivel de protección del 83% (Jayaraj 2009).

Las enzimas Glutación-S-Transferasas (GST) de *F. hepatica* fueron proteínas elegidas como candidatos vacunales a ensayar contra la fasciolosis, debido a que las GSTs homólogas de los trematodos *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum*, demostraron ser protectoras en animales de laboratorio (Brophy 1994, Lacourse 2012). La vacunación de bovinos con GST de *F. hepatica* indujo niveles de protección que oscilaban entre 41 y 69%, los cuales dependían del adyuvante administrado (Morrison 1996).

Además de las proteínas mencionadas anteriormente, se han utilizado otros antígenos proteicos en ensayos de vacunación contra la fasciolosis. La proteína tipo saposina de *F. hepatica* denominada FhSAP2, se encarga de la lisis de glóbulos rojos a medida que estos entran al intestino del parásito (Espino 2008). Ensayos de vacunación en conejo realizados con la proteína recombinante, han demostrado su gran capacidad protectora

contra la infección por *F. hepatica*, con una disminución del 81.2% en el número de gusanos (McManus 2007).

Recientemente Maggioli y cols. realizaron ensayos de vacunación con la Tiorredoxina Glutación Reductasa recombinante, esta proteína interviene en las defensas antioxidantes del parásito frente a las respuestas protectoras del huésped. La inmunización de conejos, luego de la infección experimental, redujo la carga parasitaria un 97% (Maggioli 2011).

- Antígenos presentes en tegumento

Uno de los candidatos ensayado fue la proteína de unión a ácidos grasos (FABP) con un peso molecular de 12 kDa (Fh12) y que participa en el transporte de ácidos grasos de cadena larga y de ésteres de acetyl-CoA. La inmunización de conejos con Fh12, dio como resultado una reducción significativa del 40% en el número de gusanos, con respecto a un grupo control (Muro 1997). Un ensayo de vacunación con Fh12 más reciente en ovejas y empleando el sistema de vacunación "Adaptación de Adyuvante" (ADAD), dio como resultado una reducción en la carga parasitaria del 42% (López-Abán 2008).

Recientemente se ha ensayado la enzima fosfogliceratokinasa recombinante, relacionada con el metabolismo del parásito, como antígeno vacunal. La inmunización de ratas indujo niveles de protección del 69 y 55% en hembras y machos, respectivamente (Jaros 2010).

2.4.1.2 Antígenos ocultos

Se han empleado otros antígenos para la vacunación que no están precisamente expuestos en la interfase huésped-parásito, sino que se encuentran aparentemente "ocultos". El empleo de éstos en la vacunación contra la fasciolosis, ha generado elevados niveles de protección, estos antígenos son la enzima leucinaminopeptidasa (LAP) y la proteína estructural paramiosina (Pm).

La LAP es una, metaloexopeptidasa de 54 kDa, que se encuentra asociada al intestino de los parásitos. Participa en la degradación y maduración de proteínas y en procesos

regulatorios del metabolismo celular. Ensayos de vacunación de ovejas realizados con LAP, CL1 y CL2 dieron un nivel de protección del 78%, sin embargo cuando se administró LAP individualmente produjo un nivel de protección superior (89%) (Piacenza 1999). Recientemente, la vacunación de ovejas con la proteína recombinante, en presencia del adyuvante de Freund o de hidróxido de aluminio, produjo elevados niveles de protección del 84 y 87 %, respectivamente (Maggioli 2011).

Pm es una proteína que se encuentra en el sistema muscular de los invertebrados, pero está ausente en los músculos de los vertebrados.

2.5 Paramiosina

Pm ha sido aislada desde una variedad de organismos invertebrados, como pueden ser moluscos, anélidos, artrópodos, equinodermos, nemátodos y platelmintos (Akira 1979). Hasta el momento se conocen las secuencias de los organismos que se muestran en la Fig. 2, aún no se conoce la secuencia de Pm de *F. hepatica*.

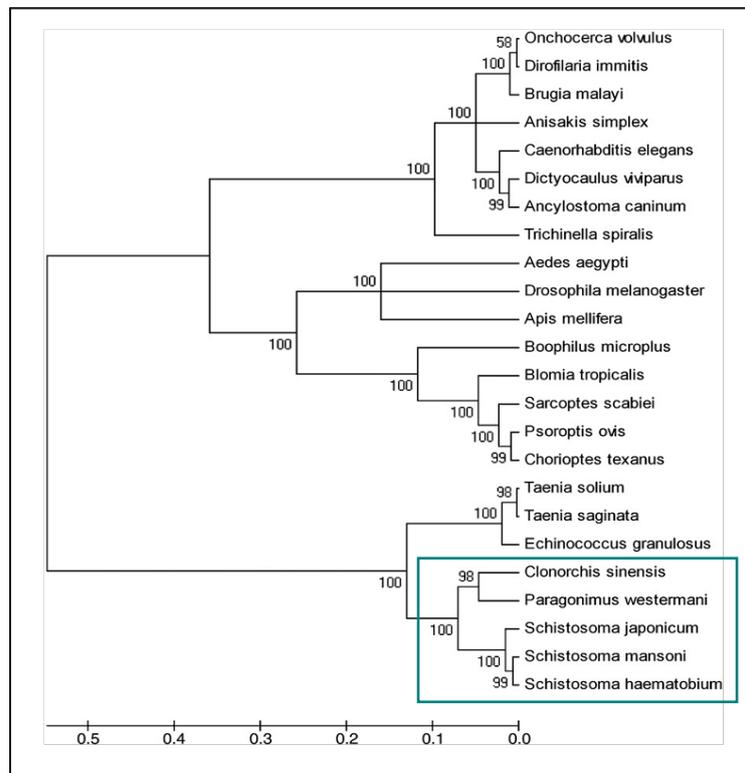


Figura 2. Relaciones evolutivas de Pm de helmintos y artrópodos. En el recuadro se encuentran las secuencias conocidas de trematodos. Tomado de Strube y Cols. 2009.

2.5.1 Pm en invertebrados:

2.5.1.1 Estructura

Las paramiosinas tienen un peso molecular aproximado de unos 100 kDa. Son proteínas fibrilares con una estructura de hélice α superenrollada..

Su secuencia aminoacídica contiene dos patrones de secuencias de siete aminoácidos repetidos, los cuales son característicos en las proteínas con estructuras terciarias de este tipo. Estos repetidos son importantes en la estabilización de dicha estructura superenrollada (Watabe 1990), además le brindan a la molécula la propiedad de unirse a otras proteínas con una elevada afinidad, como pueden ser proteínas musculares (Gobert 2005).

Se ha observado que los monómeros de Pm pueden asociarse, dando lugar a la formación de dímeros de un peso aproximado a los 200 kDa Se postula que la formación de los mismos ocurre por la interacción de parches hidrofóbicos de ambas cadenas y por la presencia de uno o más puente/s disulfuro (Woods 1969; Cancela 2004).

2.5.1.2 Localización

Mediante microscopía de fluorescencia y empleando un anticuerpo anti-Pm del cangrejo *Limulus*, se detectó la presencia de Pm en los músculos lisos y estriados de varios invertebrados analizados. En los músculos estriados se concentra en la banda A, en el interior de los filamentos gruesos; siendo el componente mayoritario de los mismos (Elfvín 1976, Schmidt 1996). En esta localización forma agregados ordenados con miosina, filageninas (Liu 1998), twitchina (Shelud'ko 2007) y otras proteínas moleculares.

2.5.1.3 Función

La función de Pm en el músculo no se ha dilucidado completamente, sin embargo, altos niveles de Pm en los músculos de moluscos ha sido asociado con un mecanismo de contracción de tipo “catch”; mediante el cual la tensión muscular se mantiene

durante más tiempo, con un costo energético mucho menor durante la contracción (Watabe 1990).

Pm es una proteína muy importante en el sistema muscular de los invertebrados. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, Pm es codificada por un solo gen, *unc-15*. Estudios realizados con mutantes de dicho gen, dieron como resultado organismos severamente paralizados cuyas paredes corporales musculares se encontraban desorganizadas (Moerman 1997). Estos resultados de ser extrapolables a los helmintos parásitos, nos indican que Pm presenta una característica adicional favorable como candidato vacunal.

2.5.2 Pm en helmintos parásitos:

En 1986 Pearce y cols. realizaron ensayos de vacunación en ratones con homogenizados de gusanos adultos de *S. mansoni*, con la finalidad de encontrar posibles candidatos vacunales contra la esquistosomiasis; parasitosis causada por trematodos de la familia *Schistosomatidae* que infectan crónicamente a más de 200 millones de personas en el mundo (Hotez 2008). Estos autores observaron una fuerte respuesta inmunológica, la cual estaba dirigida principalmente contra una proteína de 97 kDa, la cual fue luego identificada como Pm.

2.5.2.1 Pm como antígeno protector:

Desde que fue identificada como el blanco hacia el cual se dirigía principalmente la respuesta inmunológica contra *S. mansoni*, se han realizado una gran variedad de estudios de vacunación con Pm contra la esquistosomiasis, así como también contra varias helmintiasis, como se describen a continuación.

En 1993 Li y cols. inmunizaron hamsters con Pm recombinante de la filaria *Brugia malayi*, luego de realizar un desafío con 100 larvas, observaron niveles de protección del 43%.

La inmunización de ratones con Pm recombinante del nemátodo *Trichinella spiralis* (rTsPm) formulado con adyuvante de Freund dio como resultado una reducción significativa de la carga parasitaria del 34%, luego del desafío con larvas de *T. spiralis*

(Yang 2008). Estudios posteriores de vacunación con rTsPm en ratones, empleando adyuvantes de uso veterinario, produjeron niveles de protección similares a los obtenidos con el adyuvante de Freund (Yang 2010).

En 2001 Vázquez-Talavera y cols. realizaron ensayos de vacunación con Pm recombinante del cestode *Taenia solium* en ratones. Luego de realizar un desafío intraperitoneal con cisticercos de *Taenia crassieps*, observaron niveles de protección del 52%. Este ensayo reveló que los epítopes protectores de Pm se ubican predominantemente en la región aminoterminal de la molécula.

En un estudio posterior realizado por los mismos autores, la vacunación de ratones con plásmidos que contenían la región aminoterminal de Pm de *T. solium*, mostraron una reducción del 43-48% de la carga parasitaria, valores similares a los obtenidos con la proteína recombinante entera (Solís 2005).

Recientemente, la vacunación de ratas con Pm recombinante de *Clonorchis sinensis* redujo significativamente la carga parasitaria, con un nivel de protección del 54,3% y una reducción en la producción de huevos del 50,9% (Wang 2012).

Previamente, se ha demostrado que la transferencia pasiva de un anticuerpo monoclonal murino en etapas tempranas de la infección con *S. japonicum* en ratones, producía una disminución significativa del número de parásitos recuperados (58,5 %) (Kojima 1987). En 1988 Pearce y cols. observaron que la inmunización de ratones con Pm nativa contra la infección por *S. mansoni*, estimulaba la producción de IgE anti-Pm, con una reducción significativa del 72.6% en la carga parasitaria. En 1996, Ramírez y cols. utilizaron la proteína nativa de *S. japonicum* para la inmunización de ratones vía intraperitoneal y observaron niveles significativos de protección frente al desafío con las cercarias (62-86%). Un estudio de vacunación posterior demostró que la inmunización de ratones y búfalos con la proteína recombinante, condujo a una reducción significativa en la carga parasitaria y en el número de huevos liberados (McManus 2002).

La inmunización de ratones con fragmentos de Pm de *S. japonicum*, produjo una reducción significativa del 24-35 % en el número de gusanos y del 43-49% en el número de huevos liberados (Zhang 2006).

Debido a estas propiedades protectoras, Pm ha sido postulada como uno de los cuatro principales candidatos para vacunación contra la esquistosomiasis, definido así por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Kalina 1997; Fonseca 2004).

Ensayos de vacunación realizados en nuestro laboratorio con Pm nativa de *F. hepatica* en el modelo ovino, un huésped natural, han demostrado que Pm debería ser considerada como otro candidato vacunal contra la fasciolosis. Los resultados obtenidos revelaron que la inmunización del ganado con Pm efectivamente protege a los animales contra la infección; en ovejas vacunadas se observó una disminución significativa del 57% en la carga parasitaria y una reducción importante en la masa de huevos liberados (90%), por el grupo de animales inmunizados respecto al grupo control (Tesis Doctoral: Berasain 2006).

La tabla 1 resume los resultados de vacunación contra varias helmintiasis con Pm mencionados previamente.

Tabla 1. Resumen de los resultados de vacunación realizados con la proteína nativa y recombinante de distintos helmintos.

Origen de Pm	Porcentaje de protección (%)	Modelo	Referencia
<i>S. mansoni</i>	71.6	ratón	Pearce 1988
<i>B. malayi</i> (recombinante)	43	hámster	Li 1993
<i>S. japonicum</i>	62 - 86	ratón	Ramírez 1996
<i>T. solium</i> (recombinante)	52	ratón	Vázquez-Talavera 2001
<i>T. solium</i> (plásmido con región N-terminal)	43 - 48	ratón	Solís 2005
<i>S. japonicum</i> (fragmento recombinante)	24 - 35	ratón	Zhang 2006
<i>F. hepatica</i>	57	oveja	Berasain 2006
<i>T. spiralis</i> (recombinante)	34	ratón	Yang 2008
<i>T. spiralis</i> (recombinante)	34 - 37	ratón	Yang 2010
<i>C. sinensis</i> (recombinante)	54,3	rata	Wang 2012

Los ensayos de vacunación con Pm realizados en nuestro laboratorio para *F. hepatica*, y de otros investigadores para otros helmintos parásitos, han demostrado que esta proteína es un antígeno protector capaz de generar en el hospedero niveles de protección variables según el modelo parasitario analizado.

2.5.2.2 Pm como antígeno inmunomodulador

Esta proteína tiene otras funciones no asociadas a la contracción muscular descritas en otros parásitos helmintos, que realzan su importancia como candidato vacunal.

- Evidencias de la interferencia de Pm con el sistema complemento

Pm tiene la capacidad de unirse al colágeno con elevada afinidad y debido a que el componente del sistema complemento C1q tiene una región de tipo colágeno, se realizaron ensayos de unión competitiva con Pm *T. solium*. Estos ensayos confirmaron que Pm también puede unirse a C1q, inhibiendo la activación del sistema complemento por la vía clásica (Laclette 1992).

Se ha demostrado que Pm de *S. mansoni* y de *T. spiralis in vitro* puede unirse al componente C9 e inhibir la formación del complejo de ataque a la membrana, evitando la lisis de glóbulos rojos causada por el complemento (Deng 2003; Zhang 2011).

Estas propiedades de inhibición del sistema complemento *in vitro* sugieren que un mecanismo similar o igual podría ocurrir *in vivo* durante una infección parasitaria.

- Evidencia de la función de Pm como receptor en la interfase huésped-parásito (en tegumento o soluble)

En el modelo de la esquistosomiasis (Loukas 2001) y también en nuestro laboratorio para *F. hepatica* (Berasain 2006), se observó que Pm se une a las IgG mediante interacción con la región constante (Fc) de las mismas; lo cual sugiere que Pm podría actuar como un receptor en la superficie del parásito. Esta propiedad de unión a Fc fue descrita también para *Ripicephalus microplus* (Ferreira 2002), *Paragonimus westermani* (Zhao 2007) y *Dictyocaulus viviparus* (Strube 2009). Este mecanismo de camuflaje sería empleado por los parásitos para evadir la respuesta inmune ya que la adquisición de

proteínas del huésped enmascara los antígenos parasitarios, previniendo la unión de anticuerpos específicos o de células efectoras del sistema inmune.

Paralelamente, se ha postulado que Pm podría actuar como un receptor soluble, además de estar presente en el tegumento de los parásitos. Se ha localizado Pm en las glándulas postacetabulares del estadio larvario esquistosómula, lo que sugiere que Pm podría ser secretada (Gobert 2005). Por otro lado, el antígeno B de *T. solium*, que comparte una alta homología de secuencia con Pm de Esquistosoma, es secretado desde la membrana tegumentaria y puede unirse a Fc.

- Evidencia de la asociación de Pm con patologías en el hospedero

En infecciones causadas por *B. malayi*, Pm se une a componentes celulares secretados por el huésped durante la respuesta protectora; como puede ser la proteína calgranulina. La misma es liberada por neutrófilos; el complejo Pm-calgranulina contribuye a la queratitis característica producida por esta filaria (Akpek 2002).

Estas propiedades sugieren que Pm es una proteína multifuncional, actuando no solamente como un componente estructural en la fisiología muscular; sino también como una molécula inmunomoduladora. Su capacidad de interactuar con componentes del huésped, favorecería la evasión de los parásitos frente a la acción del sistema inmune, lo cual podría ser la explicación a su potencial protector.

Tanto las propiedades protectoras como las inmunomoduladoras de Pm, descritas previamente, hacen de este antígeno un blanco muy interesante para el tratamiento de varias parasitosis. Sin embargo, estos fenómenos han resultado difíciles de comprender dado que Pm es un antígeno aparentemente no expuesto al sistema inmune del hospedero, ya que se encuentra en el interior de los músculos. Frente a este panorama surge el debate de cómo un antígeno “oculto”, puede conferir resistencia frente a las infecciones helmínticas

Una posible explicación a esto, podría ser la presencia en la superficie de los parásitos de una forma análoga o similar a la descrita en el músculo.

Debido a esto, desde hace varios años se han realizado una serie de estudios de inmunolocalización de Pm en varias especies de parásitos, para determinar su distribución, con el fin de comprender el mecanismo por el cual induce protección.

Los estudios de inmunolocalización de Pm se han centrado predominantemente en Schistosomas, y han demostrado la presencia de la proteína en la superficie de la esquistosómula (Gobert 1997; Loukas 2001) y de adultos (Matsumoto 1988; Deng 2003; Thors 2006) y en las glándulas postacetabulares de las cercarias (Nara 1994; Gobert 1997). Estudios realizados en otros helmintos demostraron la localización tegumentaria de Pm en los adultos de *P. westermani* (Zhao 2007), y *C. sinensis* (Park 2009), y en las larvas de los cestodes *T. solium* (Laclette 1991), *Echinococcus granulosus* y *Echinococcus multilocularis* (Mühlschlegel 1993).

Evidencias de la localización tegumentaria de Pm en *F. hepatica* han sido obtenidas en nuestro laboratorio, en 2004 Cancela y cols. realizaron estudios de inmunolocalización mediante microscopía óptica en el estadio adulto y observaron una leve reactividad del suero α -FhPm desarrollado en ovejas, en la superficie tegumentaria del parásito. Este reporte fue la primera evidencia de la asociación de Pm al tegumento de *F. hepatica*.

Dados estos reportes y sumado a los resultados promisorios obtenidos de la vacunación de ovejas con Pm de *F. hepatica*, nos propusimos continuar y profundizar con los estudios de inmunolocalización de Pm en el estadio adulto, y buscar más evidencias de su localización en la superficie tegumentaria de este parásito.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Demostrar la ubicación extramuscular de Pm en el adulto de *F. hepatica*, a nivel de la superficie tegumentaria.

3.2 Específicos

3.2.1 Desarrollar un anticuerpo hiperinmune específico para *FhPm* nativa en conejo

3.2.2 Realizar ensayos de inmunolocalización con el anticuerpo

3.2.3 Realizar estudios comparativos de este nuevo suero con los reportados para el suero de oveja

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Con la finalidad de continuar con los estudios de localización de Pm en el estadio adulto de *F. hepatica* y demostrar su localización a nivel de la superficie tegumentaria, se procedió a la purificación de Pm desde el extracto somático del parásito aplicando un protocolo tomado de Harris 1977. A continuación se produjo un suero hiperinmune anti-Pm en conejo, cuya actividad anti-Pm fue testada mediante inmunoblot.

Una vez obtenido el suero, se realizaron estudios de inmunolocalización de Pm sobre cortes de tejidos fijados de *F. hepatica*, para lo cual se puso a punto la técnica de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia indirecta.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de parásitos

Los gusanos adultos de *F. hepatica* se extrajeron mecánicamente del conducto biliar de animales infectados naturalmente, disponibles en el frigorífico Carrasco. Estos fueron transportados al laboratorio vivos, en bilis a 37° C, una vez allí fueron lavados en 10 mM tampón fosfato de sodio (PBS) pH 7.3 a 37 ° C.

Algunos de los gusanos, luego de los lavados, fueron cultivados en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich), pH 7.3, conteniendo 2% de glucosa, 30 mM de HEPES y 25 mg/ml de gentamicina, durante cuatro horas a 37° C, para la obtención de productos de excreción-secreción (PES).

Los gusanos cultivados y los lavados fueron secados con papel, masados (peso húmedo), congelados y almacenados a -80° C hasta su utilización.

5.2 Purificación de Paramiosina de *F. hepatica* (*FhPm*)

La purificación se realizó de acuerdo al protocolo de Harris (Harris 1977), con algunas modificaciones. Este procedimiento consistió en una serie de ciclos de solubilización-precipitación de la proteína usando soluciones tamponadas de alta y baja concentración salina, respectivamente. El proceso de purificación se ilustra esquemáticamente en la Fig. 3.

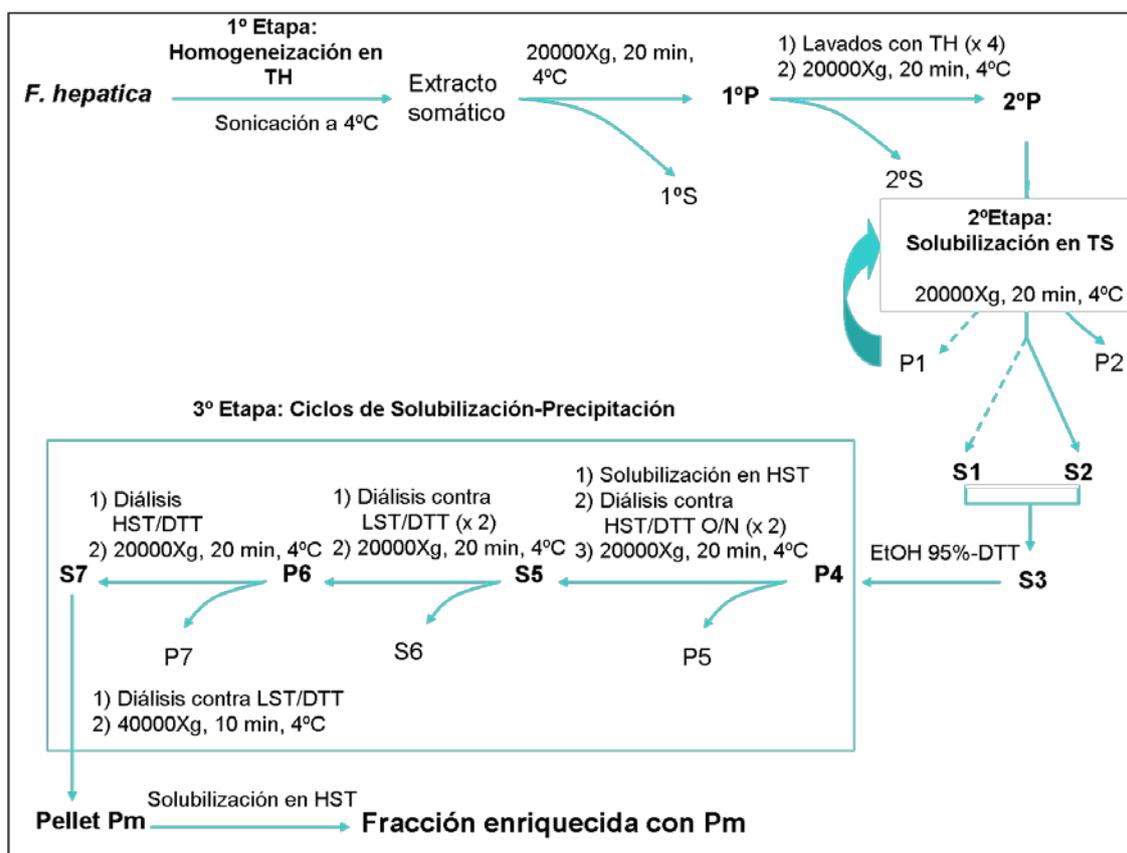


Figura 3. Esquema de la purificación de Pm de *F. hepatica* (*FhPm*). El procedimiento de purificación se dividió en tres etapas: una primera etapa de solubilización de 33.4 g de tejidos de *F. hepatica* en tampón de homogeneización fosfato de sodio 15 mM pH 7 - NaCl 50 mM - DTT 5 mM (TH), seguido por una etapa de extracción de proteínas musculares mediante la solubilización de las mismas en tampón de solubilización Tris-HCl 20 mM pH 8 - KCl 0.6 M - DTT 1 mM (TS). Finalmente se sometieron a las proteínas extraídas en el paso anterior a dos ciclos de solubilización y precipitación de Pm mediante diálisis en tampones de alta concentración salina (fosfato de potasio 10 mM pH 7.6 - KCl 0.6 M, HST) y de baja concentración salina (fosfato de potasio 10 mM pH 6 - KCl 0.1 M, LST); respectivamente.

Se partieron de 33.4 g (peso húmedo) de gusanos adultos limpios y congelados; para mejorar el proceso de homogeneización se cortó la masa de gusanos en pequeños

trozos usando un bisturí estéril; a esta masa se le agregaron dos volúmenes de tampón de homogeneización (TH) fosfato de sodio 15 mM pH 7 - NaCl 50 mM – DTT 5 mM (un volumen es equivalente al peso húmedo de partida).

A todos los tampones utilizados se les agregaron los siguientes inhibidores de enzimas proteolíticas, en una concentración efectiva final de: EDTA 1 mM, PMSF 2 mM, E64 10 μ M y bestatina 10 μ M.

Los gusanos adultos se homogeneizaron en tampón TH con homogeneizador eléctrico (Ultraturrax) manteniendo el sistema sumergido en hielo. El material homogeneizado se sonicó (Ultrasonic Homogenizer 4710 series de Cole-Parmer Instrument Co.) a 4° C por un período total de 3 minutos, aplicando pulsos de 20 % de potencia de 60 segundos seguidos de pausas de 30 segundos. Al material obtenido de este paso se le denomina Extracto Somático (ES), se tomó un alícuota de esta muestra, que se conservó a -20°C hasta su utilización.

Se centrifugó el ES a 20.000 X g a 4° C durante 30 minutos utilizando una centrífuga de alta velocidad (HANIL SUPRA 22K, Corea). El pellet (P) obtenido se lavó cuatro veces con 2 volúmenes de TH cada vez, se guardó una alícuota de P y del sobrenadante (S). Se centrifugó entre lavado y lavado a 20.000 X g a 4° C durante 30 minutos.

El pellet obtenido de los lavados, se resuspendió en un volumen de tampón de solubilización (TS) Tris-HCl 20 mM pH 8 – KCl 0.6 M – DTT 1 mM, la mezcla se agitó durante 15 minutos en agitador orbital a 4° C a baja velocidad.

Se separaron las proteínas solubilizadas en dicho tampón (S1) por centrifugación a 20.000 X g a 4° C durante 30 min. El P1 obtenido se sometió al mismo procedimiento para obtener más proteína solubilizada (S2). Se guardaron alícuotas de S1, P2, S2 y P2 a -20°C.

Se juntaron los sobrenadantes resultantes (S1 y S2) para dar S3 (se midió el volumen de S3 y se guardó un alícuota), a este último se le agregaron tres volúmenes de etanol 95 % - DTT 2 mM, se mantuvo la mezcla en agitación suave a temperatura ambiente durante dos horas. Se centrifugó a 20.000 X g a 4° C durante 20 minutos, se obtuvo un precipitado, P4, del cual se guardó una alícuota a -20°C.

Luego de la precipitación de las proteínas con etanol, comenzaron los ciclos de solubilización-precipitación de Pm en alta y baja concentración salina, respectivamente.

El precipitado P4 se trató con 17 ml de tampón de alta concentración salina (HST) fosfato de potasio 10 mM pH 7.6 – KCL 0.6 M, se homogeneizó bien la suspensión a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se dializó la suspensión resultante contra 1 litro HST - DTT 2 mM a 4° C durante toda la noche dos veces, con una membrana diálisis de celulosa de corte de 12.000-14.000 kDa (Viskase Sales Corp., Japón). Se centrifugó el dializado a 20.000 X g a 4° C durante 20 minutos.

El sobrenadante S5 obtenido de la centrifugación anterior se dializó contra 500 ml de tampón de baja concentración salina (LST) fosfato de potasio 10 mM pH 6 – KCL 0.1 M con DTT 2 mM, dos veces durante toda la noche a 4° C. Se centrifugó el dializado a 20.000 X g a 4° C durante 20 minutos, el pellet resultante (P6) se sometió a un nuevo ciclo de solubilización-precipitación. Se guardaron alícuotas de S5, P5, S6 y P6 a -20°C.

El pellet P6 se disolvió en 12 ml de HST-DTT 2 mM, la suspensión se transvasó a un tubo de diálisis (corte 12.000-14.000 kDa) y se dializó contra 500 ml de HST-DTT 2 mM a 4° C durante toda la noche.

Luego de obtener una solución límpida (Pm disuelta totalmente en HST) se centrifugó la misma a 40.000 X g a 4° C durante 20 minutos; se obtuvo un pellet P7 muy pequeño y un sobrenadante S7 que se dializó dos veces contra LST-DTT 2 mM a 4° C durante toda la noche. Se tomaron alícuotas de P7 y S7. Se centrifugó el dializado a 40.000 X g a 4° C durante 20 minutos, el precipitado en este paso corresponde a la fracción enriquecida de Pm de Harris.

Se lavó el precipitado de Pm con 10 ml de LST sin DTT, se centrifugó a 40.000 X g por 20 minutos, y finalmente se disolvió el precipitado en el mínimo volumen posible de HST sin DTT. Se centrifugó nuevamente a 40.000 X g por 10 minutos. En este paso se debe eliminar el DTT para permitir la formación de los puentes disulfuro entre los monómeros de Pm, se guardó un alícuota de esta fracción a -20°C.

Las alícuotas correspondientes a todos los pasos de purificación, fueron analizadas por SDS-PAGE al 12.5% en condiciones reducidas (en presencia de DTT) y no reducidas.

5.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

El seguimiento de la purificación de *FhPm* y de la fracción IgG del suero hiperinmune anti-Pm de *F. hepatica* (α -*FhPm*) se realizó por SDS-PAGE al 12,5 %, de acuerdo con el procedimiento descrito por Laemmli 1970.

Se realizó tinción de las proteínas con Coomassie Blue CBB R-250 al 0.05% en solución de metanol: ácido acético: agua en proporción 473: 57: 520. Luego de la tinción se procedió a la decoloración del gel por incubación del mismo en una solución decolorante de metanol: ácido acético: agua en proporción 473: 57: 520.

5.4 Producción de suero hiperinmune con especificidad hacia Pm de *F. hepatica* (α -*FhPm*)

5.4.1 Animal inmunizado

Para la producción del suero hiperinmune se utilizó un conejo macho New Zealand de la especie *Oryctolagus cuniculus*; suministrado por el Servicio Veterinario del Campo Experimental, Instituto de Higiene. Este tenía entre 60-70 días y 2 Kg.

5.4.2 Obtención del antígeno

Con el objetivo de inmunizar solamente con la proteína de 97 kDa, se separaron las proteínas del enriquecido en Pm obtenido por el método de Harris mediante SDS-PAGE al 8% en condiciones reductoras (DTT 10 mM).

Para inmunizar con 50 μ g de Pm se sembraron en el gel 40 μ l de la muestra, de concentración 1.31 mg/ml previamente hervida durante dos minutos y medio. La siembra se realizó en caliente debido a que Pm tiende a precipitarse en el pocillo del gel al enfriarse la solución.

Para identificar la banda de 97 kDa luego de la corrida, se lavó el gel con agua destilada durante cinco minutos y posteriormente se sumergió el gel en 300 ml de una solución de CuSO₄ 0.3 M de acuerdo al protocolo descrito en Harlow y Lane 1988. Se

incubó el gel en agitación hasta la aparición de una banda translúcida correspondiente a la proteína de 97 kDa contra un fondo opalescente del gel sin proteínas.

Luego de visualizar la banda de interés se cortó la misma del gel con bisturí estéril.

5.4.3 Preparación del antígeno para la inmunización del conejo.

Una vez cortada la banda que contenía el monómero de Pm en pequeños fragmentos, se suspendieron los mismos en 500 µl de PBS. A continuación se procedió a la preparación de la emulsión con 500 µl de adyuvante de Freund, mediante sucesivos pasajes de la preparación entre dos jeringas.

5.4.4 Plan de inmunización

En la Fig. 4 se ilustra el esquema de trabajo seguido para la obtención del suero.

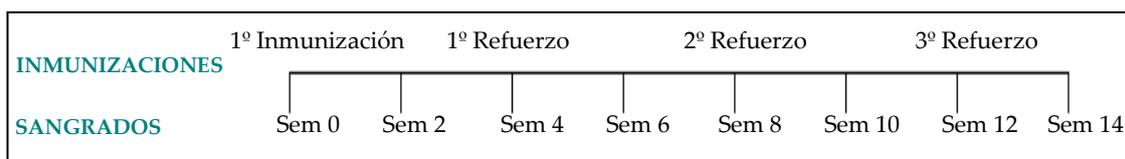


Figura 4. Esquema de inmunización empleado en la producción del suero α -FhPm en conejo.

Se realizó una primera inmunización en la semana 0 con 50 µg de Pm con adyuvante completo de Freund (Sigma). Esta fue administrada de forma subcutánea.

Posterior a la primera inmunización, se realizaron tres refuerzos en las semanas 4, 8 y 12, de 50 µg de la proteína con adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Estos últimos fueron administrados intramuscularmente.

Se extrajeron muestras de sangre de la oreja del conejo, cada dos semanas, durante todo el ensayo, alternando los sitios de extracción.

Los sueros α -FhPm obtenidos de los sangrados fueron almacenados a -80° C hasta su utilización.

5.5 Inmunoblots

La actividad de los sueros obtenidos se comprobó mediante inmunoblots buscando identificar la presencia de inmunoglobulinas específicas contra Pm de *F. hepatica*.

Se procedió a la separación de proteínas por SDS-PAGE al 10 %, luego las proteínas fueron electrotransferidas sobre una membrana de nitrocelulosa BIO-RAD Trans-Blot®, California, USA. Se realizó una transferencia semiseca (Sistema de Electrotransferencia ATTO, Modelo AE-6675, ATTO Corporation-Japón) en tampón Tris 48 mM con 39 mM glicina, 0.037 % SDS y 20 % metanol, con una intensidad de corriente de 1.2 mA/cm² durante hora y media.

Luego de transferida, se cortó la membrana en tiras de forma de que cada tira contenía la misma cantidad de Pm; a continuación se bloquearon los sitios libres de la membrana con solución de bloqueo PBS-Tween 20 (Sigma) al 1% durante toda la noche a 4° C y con agitación.

Para los lavados y las diluciones del suero α -FhPm y conjugado se utilizó PBS-Tween 20 al 0.1%. Se lavó la membrana tres veces, cada lavado fue de 10 minutos a temperatura ambiente.

Las tiritas se colocaron en recipientes separados y se incubaron con el suero de conejo preinmune (control de especificidad) y con los sueros α -FhPm de las semanas 2, 6, 10 y 14 (correspondientes a los picos en los niveles de anticuerpos luego de las inmunizaciones) durante 60 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Paralelamente se realizó un control de conjugado, incubando en primer lugar, la tirita con PBS-Tween 20 0,1% y luego con el anticuerpo conjugado. Luego se lavaron las tiritas de la membrana tres veces, siendo cada lavado de cinco minutos. Se incubaron las mismas con un conjugado a peroxidasa (HRP) anti-conejo Sigma A-0545, cuya dilución fue 1 en 1000, durante 60 minutos a temperatura ambiente.

El revelado de la actividad peroxidasa del anticuerpo secundario se realizó por incubación de las tiritas con una solución reveladora. Esta contenía tampón Trietanolamina salino (TBS), α -4-cloro-1-naftol (Sigma) y H₂O₂.

5.6 Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración proteica de las muestras en microplaca utilizando el kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific (Stoscheck 1990).

Se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) como estándar, para realizar la curva de calibración se utilizaron concentraciones de BSA que abarcaban desde los 50 hasta los 1000 µg/ml de proteína.

Se sembraron 10 µl de cada una de las muestras, alícuotas de pasos de la purificación de Pm y estándar BSA, por pocillo de la placa. Se adicionaron posteriormente 200 µl de la mezcla de reactivo (50 partes del reactivo A y una parte del reactivo B) por pocillo.

Finalmente, se incubó la placa a 37° C durante 30 minutos y se leyó la misma en el lector de placas Lab Systems Multiskan MS a 560 nm.

5.7 Purificación de la fracción IgG del suero hiperinmune

α-FhPm

La purificación de la fracción IgG se realizó mediante cromatografía de afinidad a proteína G, para lo cual se utilizó una columna HiTrap G HP de 5 ml GE Healthcare, con una capacidad de pegado de 25mg de IgG humana/ml de medio.

5.7.1 Preparación de la muestra de suero

Se partieron de 3 ml de suero de una concentración de 88 mg/ml, los cuales previo a su purificación se sometieron a un tratamiento de delipidación con sulfato de dextrano para eliminar los lípidos presentes, evitando así interferentes a la hora de purificar.

5.7.2 Delipidación de suero

A los 3 ml de suero se le agregaron 0.15 ml de una solución de sulfato de dextrano al 5% en agua. Se agitó la mezcla anterior suavemente con agitador magnético durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 0.27 ml de CaCl₂ 1M en agua, se agitó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó la preparación a 9.200 X g durante 20 minutos, se descartó el pellet.

El sobrenadante obtenido de la delipidación se dializó contra tampón de pegado Fosfato de sodio 20 mM pH 7 durante toda la noche a 4° C, con una membrana de corte de 12.000-14.000 kDa.

5.7.3 Limpieza y equilibrado de la columna

Previo a la utilización de la misma se procedió a su limpieza. Para lo cual se corrieron 50 ml (10 volúmenes) de cada una de las siguientes soluciones, en orden: ácido acético 1 M, agua desionizada, etanol 20%, etanol 50%, etanol 20%, agua desionizada, ácido acético 0.5 M con 2 M de urea, y nuevamente agua desionizada.

Una vez limpia la columna, se equilibró la misma con 100 ml de tampón de pegado Fosfato de sodio 20 mM pH 7 a una velocidad de flujo de 5 ml/min.

El pasaje de todas las soluciones a través de la columna se realizó mediante acción de la bomba peristáltica EYELA Modelo Micro Tube Pump MP3, Tokio Rikakikai Co. LTD.

5.7.4 Pasaje del suero delipidado

Previo a la siembra de la muestra en la columna, se centrifugó el suero delipidado a 9.200 X g durante 10 minutos, el sobrenadante obtenido se aplicó sobre la columna a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min.

5.7.5 Elución

Se llevó a cabo por el método de cambio de pH, se utilizaron dos tampones de elución; en primer lugar se corrieron 30 ml de tampón Glicina 0.1 M Azida 1 g/l pH 2.7 y luego 30 ml de tampón Glicina 0.1 M Azida 1 g/l pH 2.5.

Se colectaron fracciones de la elución en tubos de 1 ml que contenían 150 µl de tampón Tris 2M pH 9.

Se siguió la elución de las IgGs mediante medidas espectrofotométricas a 280 nm, aquellas fracciones que contenían los picos de elución se juntaron y se concentraron utilizando el sistema Stirred Ultrafiltration Cell MILLIPORE empleando una membrana MILLIPORE (YM3, exclusión molecular 3000Da) hasta un volumen final de 6.6 ml.

Las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE 12.5 % en condiciones reducidas (en presencia de DTT) y no reducidas.

5.8 Estudios histológicos

5.8.1 Preparación de materiales para histología

5.8.1.1 Preparación de solución fijadora de paraformaldehído 4.5 % en PBS 10 mM, pH 7.3.

Los protocolos fueron tomados de Stanley 1987 y Harlow & Lane 1988:

Brevemente, bajo una campana se disolvieron 9g de paraformaldehído (Fluka) en 100 ml de agua destilada calentando la solución a 60° C. Luego se agregaron unas gotas de NaOH 1 N para ayudar a la disolución. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 100 ml de PBS 20 mM, pH 7.3. Esta solución se utiliza fresca en el día o una vez preparada se congela inmediatamente a -20°C y se utiliza inmediatamente una vez descongelada, y se descarta lo que no se utiliza.

5.8.1.2 Fijación de tejidos en paraformaldehído

Siempre se trabajó con gusanos adultos vivos, los cuales fueron lavados en PBS termostatzado a 37°C y fijados en paraformaldehído 4.5 % en PBS durante 48 horas. La fijación se realizó en una placa de Petri de vidrio, se colocó la tapa invertida y peso suficiente sobre ésta para mantener a los parásitos extendidos y sin dañar las estructuras internas. Las placas se mantuvieron en una caja hermética, para evitar los vapores del paraformadehído.

5.8.1.3 Preparación de bloques de parafina con *F. hepatica*

Luego de la fijación, los gusanos se lavaron con agua de la canilla durante 24 horas bajo corriente de agua continua. A continuación, las piezas fueron deshidratadas por

incubación en etanoles de concentraciones crecientes, clarificadas (xilol I y xilol II) e incluidas en parafina, como se describe a continuación:

EtOH 70%.....	se dejó el tejido durante varios días
EtOH 80%.....	se dejó el tejido durante toda la noche
EtOH 85%.....	3 horas
EtOH 90%.....	2 horas 30 minutos
EtOH 95%.....	1 hora 30 minutos
EtOH 100% I.....	1 hora
EtOH 100% II.....	30 minutos
Xilol I.....	15 minutos
Xilol II.....	15 minutos
Xilol III.....	15 minutos
Parafina I.....	10 minutos
Parafina II.....	10 minutos
Parafina III.....	se preparó el bloque

Una vez en parafina se armó el bloque sobre una base, el cual se cortó con micrótopo manual (Jamato KOHKI, Japón) para obtener láminas de tejido de 5 μm de espesor. En los soportes, las piezas fijadas se colocaron de forma que la región cefálica de los gusanos se encontraba en la región superior del bloque, por lo tanto, al cortar los bloques se obtuvieron cortes transversales de los gusanos (ver Fig. 5).

Una vez obtenidos los cortes, se montaron los mismos sobre vidrios portaobjetos silanizados.

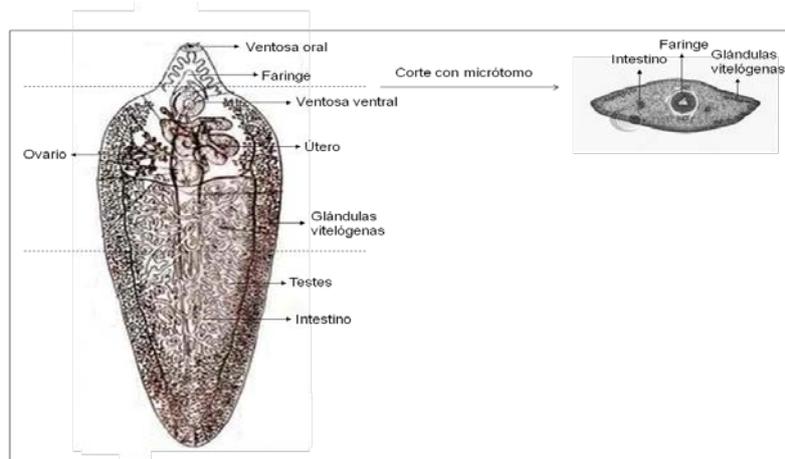


Figura 5. Esquema del cuerpo de *F. hepatica*. Se muestra su ubicación en el soporte y el corte obtenido, realizando cortes transversales de las piezas fijadas.

5.8.1.4 Desparafinización de cortes

Para ambos estudios de microscopía, los cortes de tejido fueron desparafinados mediante incubación de los mismos en xilol y etanoles de concentración decrecientes, hasta llevarlos a PBS; como se describe a continuación:

Xilol I.....	10 minutos
Xilol II.....	10 minutos
EtOH 100% I.....	10 minutos
EtOH 100% II.....	10 minutos
EtOH 95%.....	10 minutos
EtOH 90%.....	10 minutos
2 lavados H ₂ O.....	5 minutos cada uno
PBS.....	5 minutos

Una vez en PBS se los sometió a recuperación antigénica por autoclavado a 95° C en tampón Tris 50 mM pH 7.6 durante 10 minutos, para exponer los epítopes del tejido muscular según técnica desarrollada en el laboratorio (Cancela y cols. 2004).

5.9 Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia

Para la realización de los estudios de inmunolocalización de Pm en el estado adulto de *F. hepatica*, se puso a punto la técnica de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia indirecta como se describen a continuación.

5.9.1 Inmunohistoquímica

Se realizó la inactivación de la peroxidasa interna mediante incubación de los cortes con 50 μ l de una solución de metanol-H₂O₂ al 1% en cámara húmeda a temperatura ambiente durante media hora. A continuación se lavó durante 5 minutos con PBS-Tween 20 0.05%.

Previo a la incubación con anticuerpos, se bloqueó el tejido con suero de cabra al 10 % en PBS-Tween 20 0.05% por 20 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se realizaron dos lavados en PBS-Tween 20 0.05%, de 5 minutos cada uno.

En estas condiciones se incubaron los cortes con el suero α -FhPm. Se ensayaron varias diluciones del suero, 1/100, 1/50, 1/40 y 1/30; estas fueron incubadas con el tejido durante una hora a 37° C en cámara húmeda. Se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 20 0.05% de 5 minutos cada uno y se incubaron los cortes durante 45 minutos a 37° C con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, anticuerpos de chivo anti-IgG (molécula entera) de conejo, purificados por afinidad (Sigma A-0545) cuya dilución fue 1 en 500. Se lavó cuatro veces, cada lavado de 5 minutos.

El revelado se realizó por incubación de los cortes con 50 μ l de una solución de 10 ml de tampón Tris 50 mM pH 7.6, 10 μ l de H₂O₂ 30% y 6 mg de DAB (Sigma), durante 5 minutos y protegido de la luz.

Luego del revelado se realizó una contratinción con hematoxilina durante 5 minutos, posteriormente se lavó durante 20 minutos en agua corriente. En estas condiciones se deshidrataron los cortes por pasajes en soluciones de concentración creciente de etanoles, y se montaron en bálsamo de Canadá.

5.9.2 Inmunofluorescencia indirecta

En este caso también se bloqueó el tejido con suero de cabra al 10 %. Se incubaron los cortes con el suero α -FhPm, cuya dilución fue 1/30 (dilución con la que se obtuvieron mejores resultados en la inmunohistoquímica), se realizaron cuatro lavados de 5 minutos cada uno. Posteriormente se incubaron los cortes con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a un fluoróforo similar a FITC (Alexa Fluor®488) cuya dilución fue 1/100; este último se incubó protegido de la luz en cámara húmeda y a 37 ° C, durante 45 minutos.

Estos cortes fueron montados en glicerol al 60 % en PBS y mantenidos protegidos de la luz a -20° C hasta su observación al microscopio.

En ambos ensayos de microscopía se realizaron un control negativo y uno de especificidad con el suero preinmune de conejo. El control negativo o control de conjugado, consistió en la incubación del tejido solamente con el anticuerpo conjugado de dilución (1/500 para inmunohistoquímica y 1/100 para inmunofluorescencia). El control de especificidad se realizó por incubación del tejido con el suero preinmune de dilución 1/30 para la inmunohistoquímica y para la inmunofluorescencia indirecta, a continuación se incubó con el conjugado.

5.9.3 Toma de imágenes

Los resultados obtenidos de la inmunohistoquímica fueron registrados con el microscopio óptico NIKON ECPLISE 80I y los de inmunofluorescencia con el microscopio de epifluorescencia BX61 (Olimpus), disponible en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Las imágenes fueron registradas utilizando el software Fluo-view Olympus 4.3

6. RESULTADOS

6.1. Purificación de Paramiosina de *F. hepatica* (FhPm).

Con el objetivo de obtener una cantidad suficiente de FhPm de elevada pureza, para la producción posterior del suero hiperinmune α -FhPm en conejo, se procedió a la purificación de esta proteína. La misma se realizó a partir del extracto somático de gusanos adultos de *F. hepatica*, siguiendo un protocolo tomado de Harris 1977.

El método de purificación empleado consiste en tres etapas diferenciadas: homogeneización de los tejidos del parásito, extracción de proteínas musculares y ciclos de solubilización (diálisis en HST)-precipitación (diálisis en LST) de FhPm.

En la Fig. 6 se muestra el perfil electroforético de los pasos de purificación de FhPm en condiciones no reducidas (Fig. 6A) y en condiciones que favorecen la disociación de los puentes disulfuros (condiciones reducidas en presencia de 10 mM de DTT) (Fig. 6B).

6.1.1 Homogeneización de tejidos del parásito:

Las fracciones obtenidas en esta etapa, primer pellet insoluble y primer sobrenadante, se muestran en los carriles denominados 1ºP y 1ºS, respectivamente.

Se encontró FhPm en la fracción insoluble del extracto somático (debido a las propiedades bioquímicas de la molécula que la hacen insoluble), se aprecia una banda de 97 kDa en 1ºP, no observándose la misma en el 1ºS, al menos con la sensibilidad del CBB R-250.

6.1.2 Extracción de proteínas musculares:

Debido a la propiedad de las proteínas musculares de interactuar entre sí principalmente a través de fuerzas hidrofóbicas, se sometió el 1ºP a un paso de extracción de proteínas musculares, mediante la solubilización de las mismas en un tampón de alta concentración salina. La elevada fuerza iónica del mismo rompe las interacciones que mantienen unidas a las proteínas, permitiendo su solubilización.

Luego de este paso de extracción, se observó el enriquecimiento en las fracciones S1 y S2 con la banda de 97 kDa en presencia de DTT (Fig. 6B) y con la banda de 200 kDa en ausencia del mismo (Fig. 6A).

Se juntaron los sobrenadantes S1 y S2 (S3), y se precipitaron las proteínas presentes en S3 con etanol 95%-DTT 2 mM. La fracción de proteínas precipitadas se denominó P4 (no analizado por SDS-PAGE).

6.1.3 Paso extra de solubilización de proteínas musculares:

Con la finalidad de recuperar más *FhPm*, durante la purificación se realizó un tercer paso de solubilización (no previsto) en tampón TS, este material fue procesado en paralelo y no en conjunto con S3. Si bien se logró recuperar más *FhPm*, se observó la aparición de bandas proteicas de bajo peso molecular que no se visualizaron cuando se realizaron solo dos pasos de solubilización. Por este motivo, se consideró que no es conveniente realizar un paso extra de solubilización, debido a que aumenta la cantidad de contaminantes presentes en el extracto final (datos no mostrados).

6.1.4 Ciclos de solubilización-precipitación de *FhPm*:

Las paramiosinas tienen la propiedad bioquímica de solubilizarse en soluciones de elevada fuerza iónica y de precipitar reversiblemente en soluciones de baja fuerza iónica, esta propiedad deriva de las interacciones hidrofóbicas que mantienen a la molécula y que le permiten interactuar con otras proteínas musculares.

Debido a lo mencionado anteriormente, se sometió P4 a dos ciclos de diálisis contra HST y LST (tampones de alta y baja concentración salina, respectivamente). Procedimiento que favorece el enriquecimiento de *Pm*.

En los carriles correspondientes a P5 y S5 de la Fig. 6 (resultantes de la diálisis contra HST), se observa que no todas las proteínas de P4 lograron solubilizarse en HST, *FhPm* sí se solubilizó (S5). Cuando se dializó contra LST (ver carriles P6 y S6, Fig. 6), se observa que casi todas las proteínas precipitaron (P6), incluyendo *FhPm*. En este tampón, las proteínas formaron un precipitado blanco (P6), el cual se solubilizó casi completamente en una segunda diálisis contra HST (S7), se obtuvo un P7 muy

pequeño. En los carriles correspondientes a las fracciones S5, P6 y S7 obtenidas de estos ciclos, se puede apreciar el enriquecimiento de la banda de 97 kDa (y 200 kDa en ausencia de DTT), y disminución del resto de los componentes, a medida que avanza el procedimiento de la purificación.

En el último carril de ambos geles se observa el producto final obtenido de la purificación, *FhPm*. Se obtuvo una fracción altamente enriquecida en *FhPm*, aunque se pueden apreciar algunas bandas proteicas de alto peso molecular, entre los 97 y 200 kDa, en presencia de DTT, y mayor a los 200 kDa en ausencia de DTT.

6.1.5 Rendimiento de la purificación:

Se logró obtener una preparación altamente enriquecida de *FhPm* con un rendimiento de 6,82 mg de esta proteína a partir de 33,4 g de adultos de *F. hepatica*, y una recuperación de 0.2 mg *FhPm*/g de peso húmedo de parásitos; resultados que se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Rendimiento de la purificación de *FhPm* desde el extracto somático de *F. hepatica*.

Muestra	mg de proteínas totales	% de proteínas (respecto a ES)	(mg/g de parásitos)
Extracto somático (ES)	3279.89	100	98.2
Proteínas musculares solubles (S3)	101.72	3.1	3.05
Paramiosina	6.82	0.21	0.2

6.1.6 Comparación de rendimiento de la purificación de *FhPm* con resultados reportados por Cancela 2004

En el 2004 Cancela y cols. reportaron la purificación de *FhPm* utilizando cromatografía de gel filtración y de intercambio iónico, obteniendo valores de recuperación de 0.3 y 0.012 mg/g de parásitos, respectivamente. Si bien la pureza del enriquecido de *Pm* por cromatografía de intercambio iónico es mucho mayor que la obtenida por cromatografía de gel filtración, la primer metodología tiene un rendimiento muy bajo.

Dato de gran importancia a la hora de inmunizar, ya que se necesita de una gran cantidad de antígeno.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con los logrados por Cancela y col, se observa que la metodología empleada permitió obtener un enriquecido en *FhPm* de elevada pureza con un buen rendimiento de recuperación, similar al obtenido por el método de cromatografía de gel filtración. La ventaja de utilizar esta técnica es que nos permitió obtener una cantidad suficiente de proteína en menor tiempo.

6.1.7 Formación de dímero de *FhPm*:

Los análisis por SDS-PAGE revelaron un peso molecular aparente de 97 kDa de la proteína en condiciones reducidas y de 200 kDa en condiciones no reducidas.

En 1989 Watabe y cols. reportaron la visualización del dímero de Pm del molusco *Mercenaria mercenaria*, y postularon que en el estado nativo, Pm existe bajo la forma dimérica (α -Pm), donde cada subunidad pesa 105 kDa aproximadamente. Sin embargo durante el proceso de su purificación el dímero se disocia. La visualización de la forma dimérica de Pm de un peso molecular aparente de 200 kDa en condiciones no reducidas, confirma que esta se mantiene no solamente por interacciones hidrofóbicas (Verrez-Bagnis 1995), sino que además existe la formación de puente/s disulfuro intracatenarios entre los monómeros de

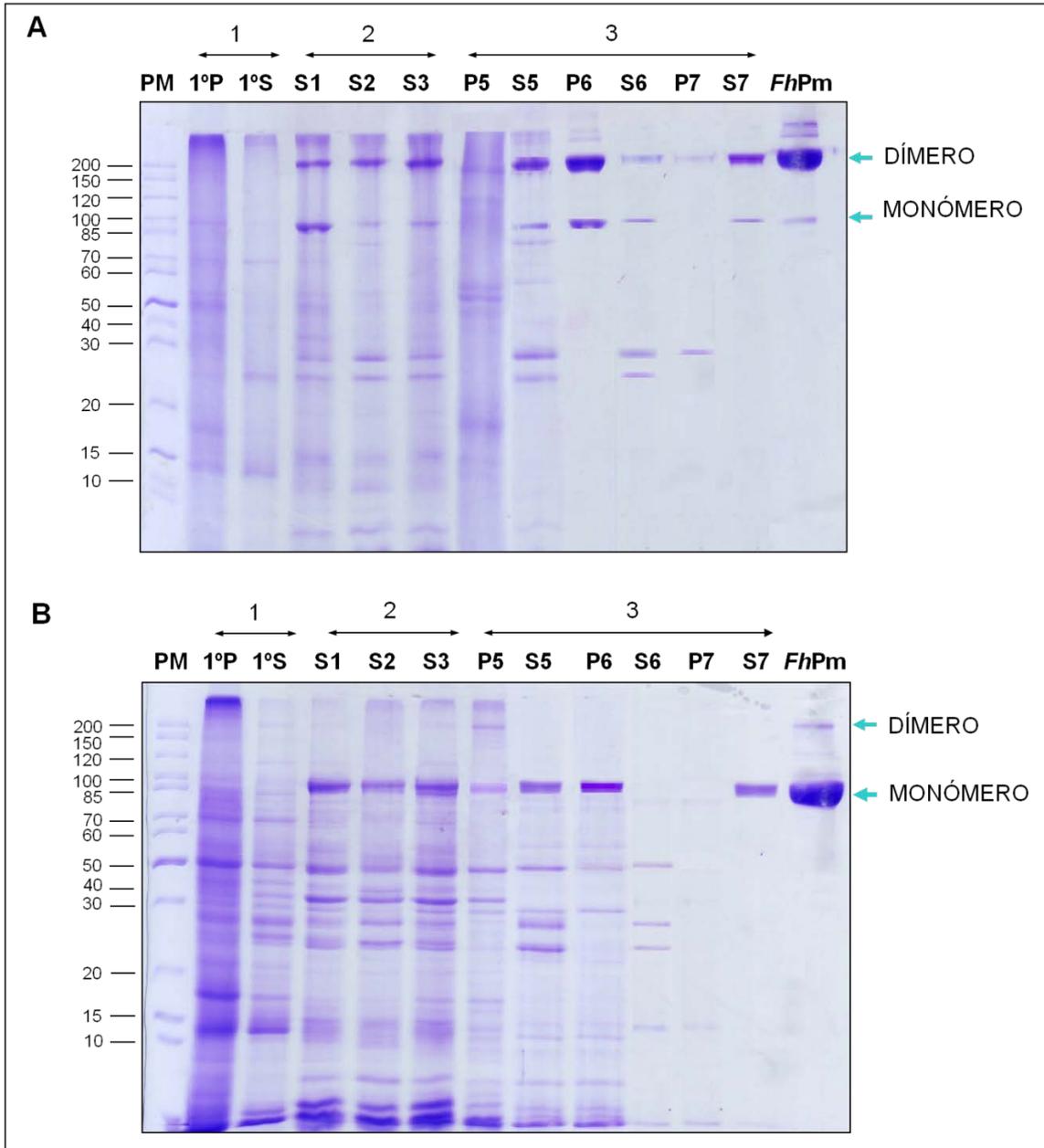


Figura 6. Purificación de paramiosina de *F. hepatica*. Análisis por SDS-PAGE al 12.5% de alícuotas de pasos de purificación con 20 µg de proteína por pocillo. Se partieron de 33.4 g de gusanos adultos procesados como se describió previamente (ver Materiales y Métodos). En A: muestras corridas en condiciones no reducidas, en B: mismas muestras corridas en presencia de DTT 10 mM. En las fracciones obtenidas post-homogeneización del tejido (Paso 1) se observa la presencia de la molécula de 97 kDa en el primer pellet (1° P) y no en el primer sobrenadante (1° S). El tampón de alta concentración salina (Tris-HCl 20 mM pH 8 KCl 0.6 M) empleado en el paso de solubilización (Paso 2) logró extraer cuantitativamente Pm. Se observa el enriquecimiento de la banda de 97 kDa y 200 kDa en las fracciones S1, S2 y S3. Se observa el enriquecimiento de la banda de 97 kDa en los ciclos solubilización (en HST) y precipitación de Pm (en LST), y la disminución de los contaminantes de bajo peso molecular en las fracciones S5, P6 y S7. Se obtuvo una fracción altamente enriquecida en Pm de *F. hepatica* (*FhPm*) y de elevada pureza. Las flechas indican la presencia de Pm, en sus formas monomérica (97kDa) y dimérica (200 kDa). Las proteínas fueron teñidas con Coomassie CBB R-250. PM, Marcador de peso molecular (en kDa).

6.2 Producción del suero hiperinmune α -FhPm

Debido a que la fracción obtenida de FhPm tenía una pequeña cantidad de contaminantes de alto peso molecular, se produjo el suero hiperinmune con el monómero de Pm de 97 kDa eluído de un gel SDS-PAGE al 8%.

Una vez obtenidos los sueros α -FhPm, se comprobó la actividad de los mismos contra FhPm purificada previamente mediante inmunoblot.

En la Fig. 7A se muestra la actividad anti-FhPm de los sueros α -FhPm de las semanas 2, 6, 10 y 14 (suero hiperinmune), correspondientes a los picos en los niveles de anticuerpos luego de las inmunizaciones. En 2B se observa que el suero hiperinmune desarrollado fue capaz de reconocer ambas formas de FhPm, monomérica (carril 1) y dimérica (carril 2); a una dilución 1/3000.

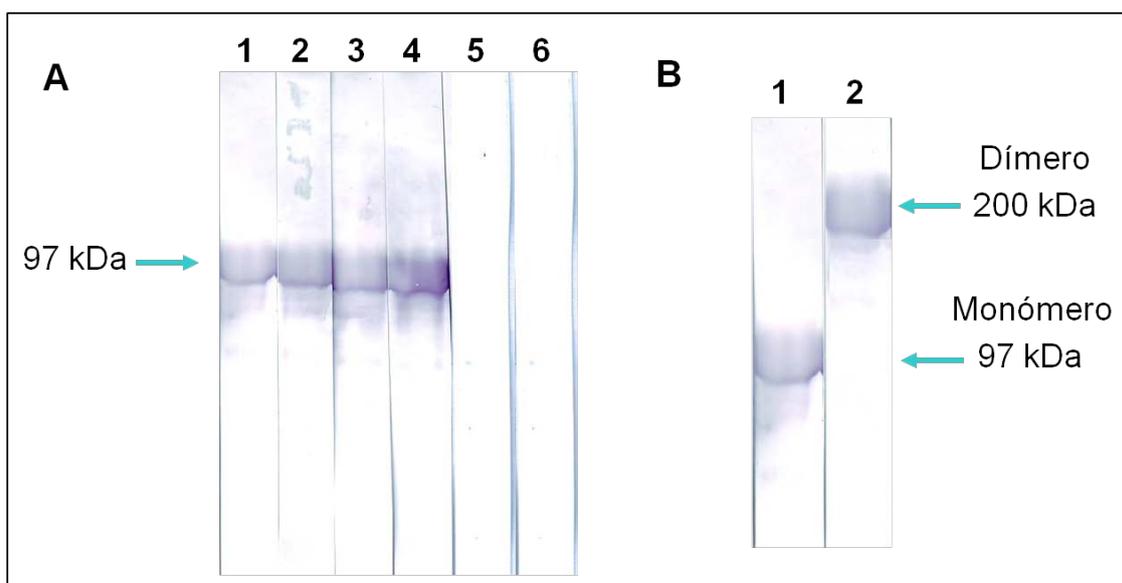


Figura 7. Actividad del suero hiperinmune α -FhPm contra FhPm purificada. A: Análisis por inmunoblot de los sueros α -FhPm de las semanas 2, 6, 10 y 14 (correspondientes a los picos en los niveles de anticuerpos luego de las inmunizaciones), que evidencia la actividad de los mismos a una dilución 1 en 100 (carril 1), 1 en 1000 (carril 2), 1 en 3000 (carril 3) y 1 en 3000 (carril 4); respectivamente. Los carriles 5 y 6 muestran los controles negativos realizados, el control de especificidad con el suero de conejo preinmune a una dilución 1 en 100 y el control de conjugado, respectivamente. B: Se observa la actividad del suero hiperinmune α -FhPm con una dilución 1 en 3000 contra el monómero (carril 1) y el dímero (carril 2) de FhPm. Se utilizó el sistema β -cloro-naftol-peroxidasa para detectar la reactividad del suero contra FhPm. Las flechas indican la presencia de FhPm.

6.3 Purificación de la fracción IgG del suero α -FhPm

Una vez obtenido el suero hiperinmune, se procedió a la purificación mediante cromatografía de afinidad a proteína G, de la fracción de inmunoglobulina de tipo G (IgG). Previo a la purificación se sometió al suero a un tratamiento de delipidación con dextrano.

En la Fig. 8 se muestra el perfil cromatográfico de la purificación de las IgG presentes en el suero α -PmFh. El primer pico corresponde a la fracción no retenida, la que no tiene afinidad por la proteína G, el segundo pico corresponde a las IgG que interaccionaron con la proteína G y que fueron eluidas con tampones Glicina 0,1 mM Azida 1g/L pH 2,5 y pH 2,7.

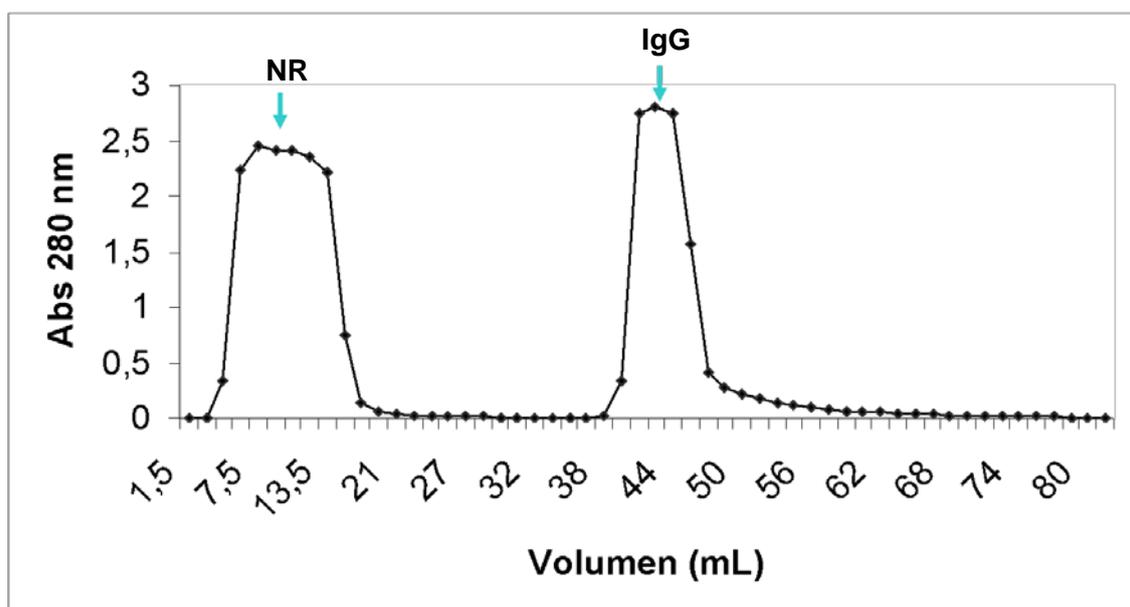


Figura 8. Cromatograma de la purificación de la fracción IgG de suero α -PmFh mediante cromatografía de afinidad a proteína G. Se aplicaron 3 ml de suero delipidado (88 mg/ml) a la columna HiTrap Protein G HP 5 mL, equilibrados en tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7. Las flechas señalan los picos de elución obtenidos, el primer pico corresponde a la fracción no retenida (NR) y el segundo pico a la fracción retenida por la columna (IgG), eluída con buffers Glicina 0.1 M Azida 1 g/L pH 2,5 y pH 2,7. La elución de las proteínas se siguió mediante la absorbancia a 280 nm.

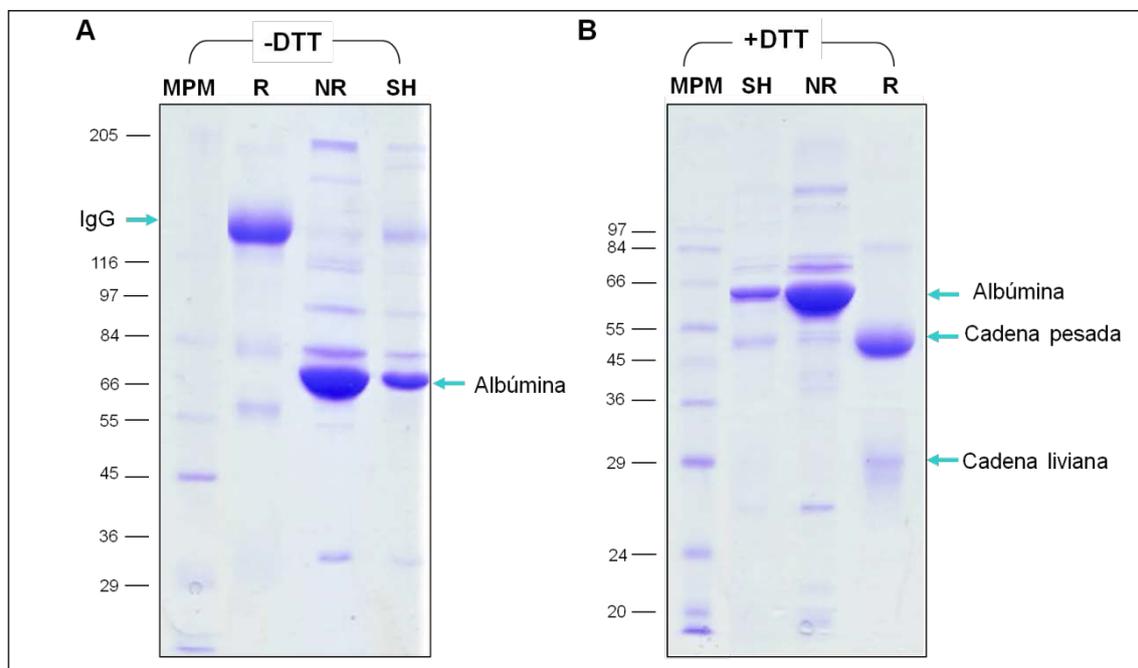
La concentración de la fracción IgG obtenida fue de 11.01 mg/mL. Se evaluó la pureza y la actividad contra FhPm de esta fracción, mediante SDS-PAGE al 12,5 % e inmunoblot, respectivamente.

En la Fig. 9 se muestra el perfil electroforético de las fracciones obtenidas de la purificación de las IgG, en condiciones no reducidas (Fig. 9A) y reducidas (Fig. 9B). En ambas se muestran: suero hiperinmune de partida (carril SH), material no retenido (carril NR) y material retenido por la columna de afinidad a proteína G (carril R).

En SH se aprecia una banda mayoritaria de 66 kDa, la cual corresponde a la albúmina sérica de conejo, esta proteína es el componente mayoritario presente en suero; la misma también se observa en el material NR, pero no se observa en el material R.

En R, en condiciones no reducidas, se aprecia una banda mayoritaria de unos 168 kDa aproximadamente, la misma corresponde a la molécula de IgG. Además se observan dos bandas proteicas de baja intensidad, de 55 y 84 kDa aproximadamente; posibles contaminantes o productos de degradación de las IgG.

En presencia de DTT, se observan en R dos bandas mayoritarias de 29 y 55 kDa, que corresponden a las cadenas liviana y pesada de la IgG, respectivamente. También se puede apreciar una tercera banda de baja intensidad de unos 84 kDa aproximadamente, posiblemente un contaminante.



Ver pie de la Fig. 9 en la siguiente página.

Figura 9. Purificación de fracción IgG del suero hiperinmune α -PmFh. Análisis por SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones obtenidas de la corrida de 3ml de suero α -PmFh delipidado en la columna. A: muestras corridas en condiciones no reducidas. B: mismas muestras que A corridas en presencia de 0.15 M DTT. Se observa que el componente mayoritario del suero (SH), la albúmina (aproximadamente de unos 66 kDa, señalada con flecha) queda en el material no retenido (NR) por la columna, no observándose la misma en el material retenido (R). En ausencia de DTT, en R, se observa una banda mayoritaria de unos 168 kDa correspondiente a la molécula de IgG (señalada con una flecha). En este carril también se aprecian dos bandas minoritarias, posibles productos de degradación de la IgG o contaminantes. En presencia de DTT, en R, se observan 3 bandas proteicas, de las cuales las de 29 y 55 kDa (señaladas por flechas) corresponden a la cadena liviana y pesada de la IgG, respectivamente. La banda de mayor peso molecular es un contaminante. Las proteínas fueron teñidas con Coomassie CBB R-250. PM, Marcador de peso molecular (en kDa).

En la Fig. 10 se muestra el inmunoblot que evidencia la actividad de la fracción IgG purificada contra *FhPm*. Esta fracción fue capaz de reconocer ambas formas de Pm, monomérica (carril 2) y dimérica (carril 3); a una dilución 1 en 500.

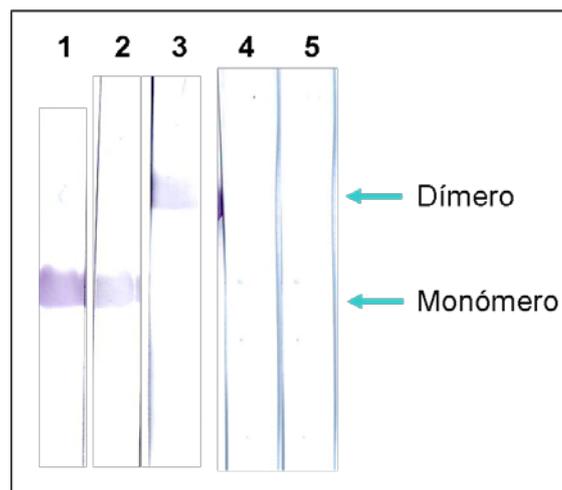


Figura 10. Actividad anti-*FhPm* de la fracción IgG purificada desde el suero hiperinmune α -PmFh. Análisis por inmunoblot que evidencia la reactividad de la fracción IgG a una dilución 1 en 500 contra la *FhPm* purificada. Se observa la actividad de las IgGs contra el monómero (carril 2) y el dímero (carril 3) de *FhPm*. En el primer carril se muestra un control positivo con el suero hiperinmune α -*FhPm* (dilución: 1 en 3000). En los carriles 4 y 5 se observan los controles negativos realizados, control de conjugado y control de especificidad con suero de conejo preinmune, respectivamente. Se utilizó el sistema β -cloro-naftol-peroxidasa para detectar la reactividad del suero contra Pm. Las flechas indican la presencia de Pm.

6.4 Inmunolocalización de *FhPm* en el estadio adulto de *F. hepatica* mediante microscopía óptica y confocal

Para los estudios de inmunolocalización de *FhPm* en el adulto mediante microscopía óptica y confocal, se empleó el suero hiperinmune α -*FhPm*.

Previo a la incubación con los anticuerpos, para ambas metodologías, se realizaron cortes de parásitos fijados en paraformaldehído, los cuales se sometieron luego a recuperación antigénica, para exponer los epítopes musculares.

A continuación se describen los resultados de inmunolocalización de *FhPm*, obtenidos por inmunohistoquímica, utilizando como sistema revelador peroxidasa-H₂O₂-DAB. La presencia de *Pm* reconocida por el suero, se observa por la formación de un precipitado marrón en dicha región.

6.4.1 Microscopía óptica

6.4.1.1 Reactividad del suero α -*FhPm* en el tubo digestivo:

Los estudios realizados revelaron una reactividad intensa del suero en los músculos asociados al tubo digestivo de *F. hepatica*. Se observó la presencia de *Pm* en los músculos asociados al intestino, faringe y ventosa ventral, como se describe a continuación.

En los cortes realizados a nivel del intestino de *F. hepatica* se pudo apreciar una intensa reactividad del suero α -*FhPm* en la capa muscular que rodea al mismo (Fig. 11 A, B y C). Interesantemente, además de localizar *Pm* en los músculos del intestino, se encontró a la proteína en una región extramuscular, como es la membrana apical de las células intestinales, denominada membrana lamelar (Fig. 11A). Sin embargo en esta región se observó una reactividad leve del suero.

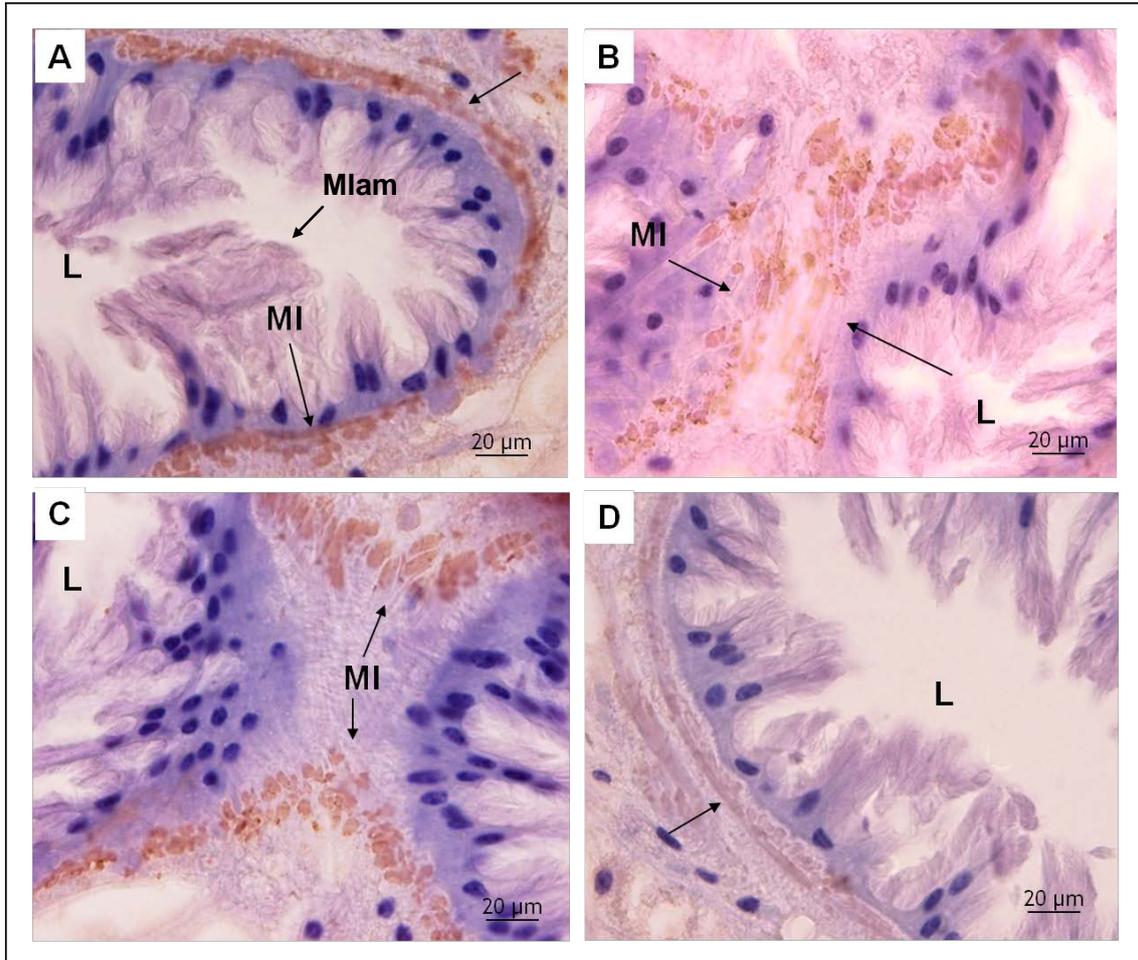


Figura 11. Inmunolocalización de Pm en el tubo digestivo del adulto de *F. hepatica*. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de ensayos de inmunolocalización por inmunohistoquímica revelados por actividad peroxidasa-DAB, realizados sobre cortes transversales de 5 μ m de espesor de *F. hepatica* sometidos a recuperación antigénica. A-C: Ensayos positivos obtenidos con el suero α -PmFh 1/30. Se observa la reactividad del suero obtenida en los músculos asociados al intestino (MI), en A se aprecia también una leve reactividad en la membrana lamelar (Mlam). D: ensayo negativo obtenido con el suero de conejo preinmune 1/30 sobre la región del intestino; no se observa reactividad del suero en la misma. L: lumen intestinal.

La faringe de los helmintos es un órgano cuya musculatura se encuentra muy desarrollada, razón por la cual en la Fig. 12 se puede apreciar una gran reactividad del suero α -PmFh en esta región, tanto en la pared del órgano así como también en su interior (Fig. 12A). Asociada a la faringe se pudo detectar una capa muscular (Fig. 12B).

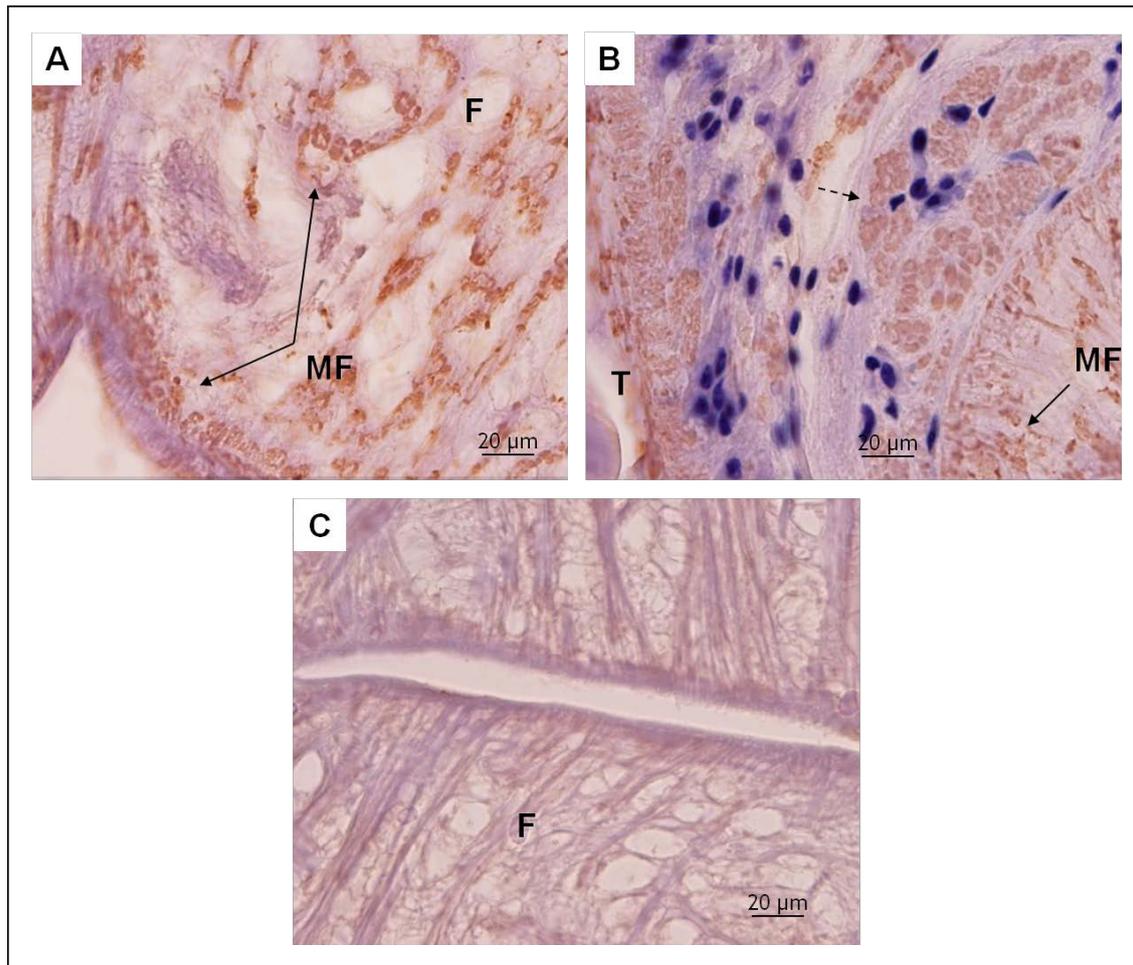


Figura 12. Inmunolocalización de Pm en la faringe del adulto de *F. hepatica*. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de ensayos de inmunolocalización por inmunohistoquímica revelados por actividad peroxidasa-DAB, realizados sobre cortes transversales de 5 μ m de espesor de *F. hepatica* sometidos a recuperación antigénica. A y B: Ensayos positivos obtenidos con el suero α -PmFh 1/30. En A se observa reactividad en los músculos presentes en la faringe (MF), mientras que en B, la flecha discontinua señala una capa muscular que rodea a la faringe. C: Ensayo negativo obtenido con el suero de conejo preinmune 1/30 sobre la faringe; no se observa reactividad del suero en la misma. T: tegumento.

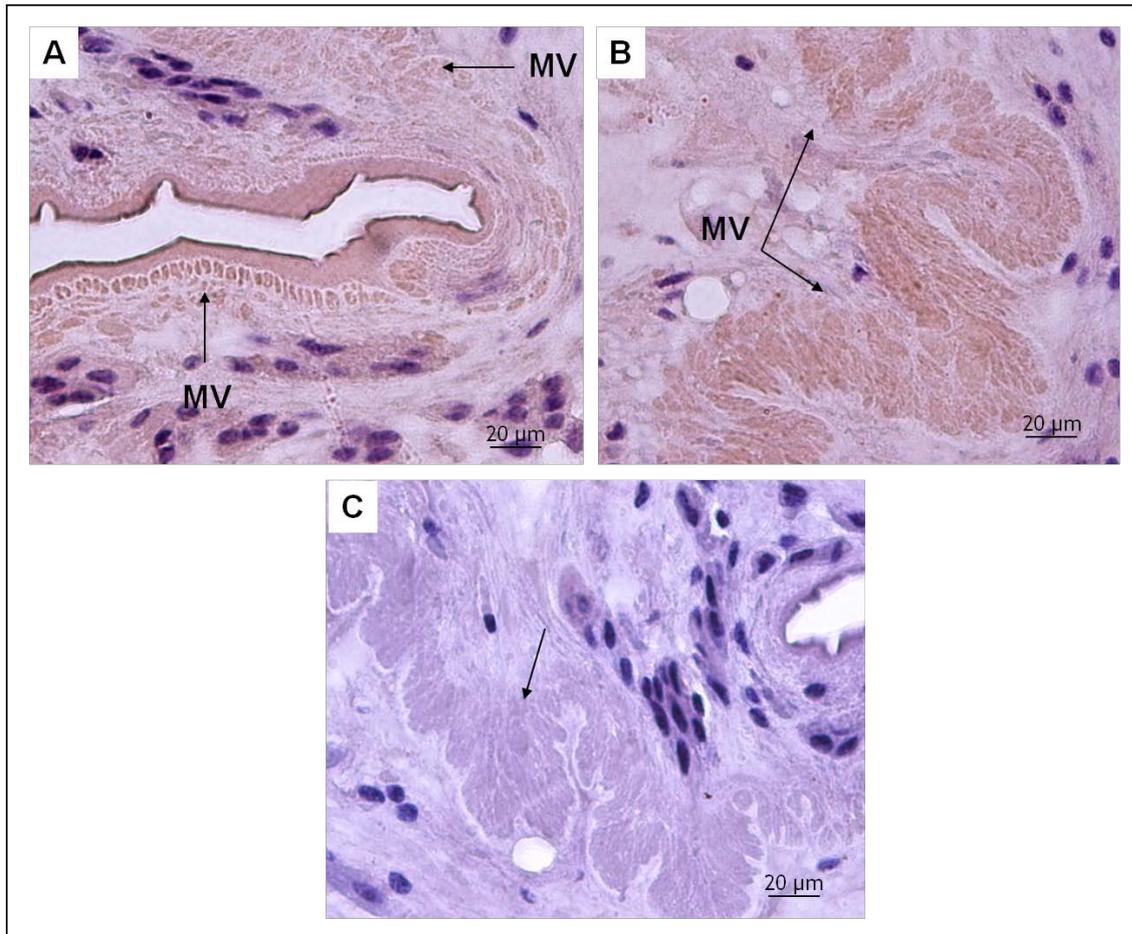


Figura 13. Inmunolocalización de Pm en la ventosa ventral del adulto de *F. hepatica*. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de ensayos de inmunolocalización. A y B: Ensayos positivos obtenidos con el suero α -FhPm 1/30. Se observa reactividad en los músculos asociados a la ventosa ventral. C: Ensayo negativo obtenido con suero de conejo preinmune 1/30.

Las ventosas son órganos que le permiten a los parásitos que las poseen fijarse a los tejidos de sus huéspedes, para así poder residir en los mismos. *F. hepatica* tiene dos ventosas, una en la región cefálica (ventosa oral) y otra ubicada más ventralmente (ventosa ventral). En el presente trabajo se observó la localización de Pm en la ventosa ventral de *F. hepatica* (Fig. 13).

6.4.1.2 Reactividad del suero α -FhPm en el parénquima:

Se ha reportado la existencia de haces musculares que atraviesan el cuerpo de *F. hepatica* dorso-ventralmente y lateralmente, estos haces mantienen la estructura aplanada del trematodo. En el presente trabajo se detectó la presencia de Pm en dicha localización, como se muestra en la Fig. 14.

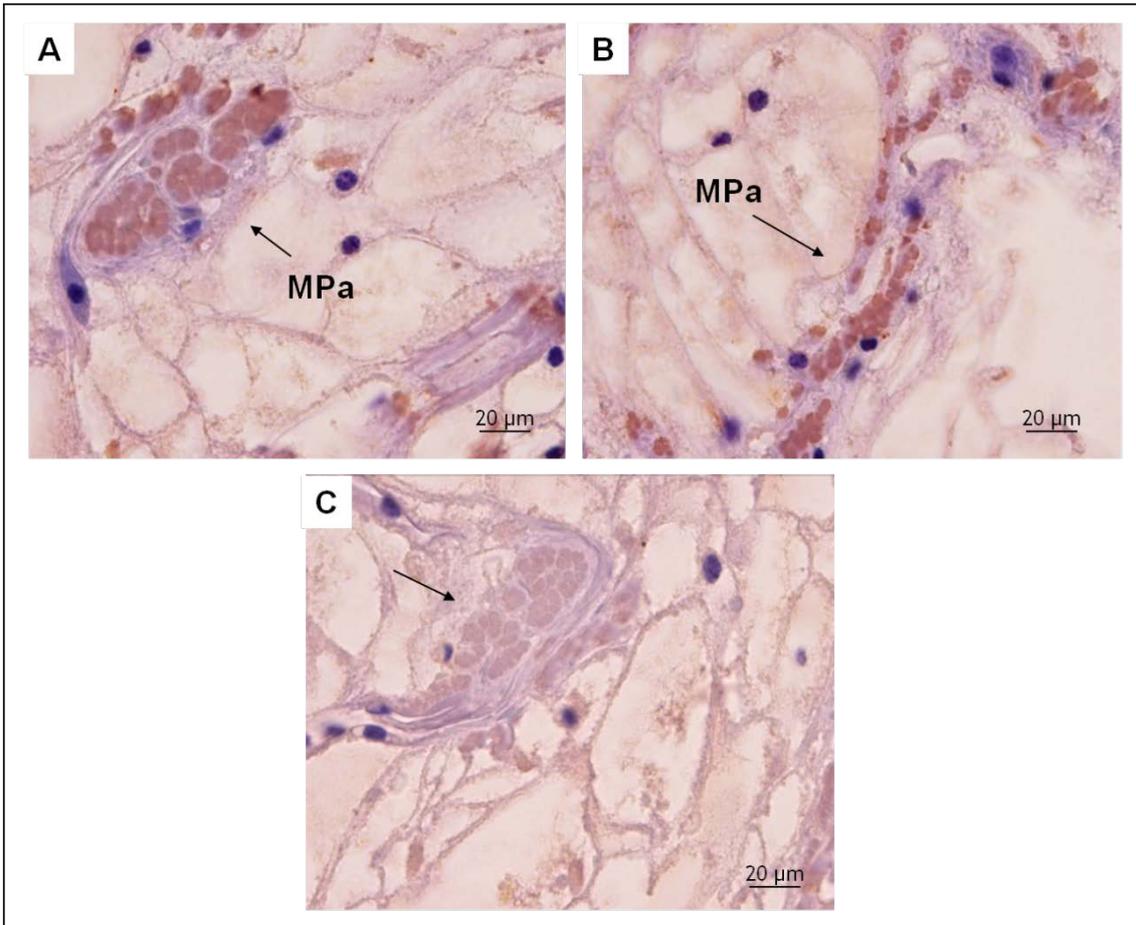


Figura 14. Inmunolocalización de Pm en el parénquima adulto de *F. hepatica*. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de ensayos de inmunolocalización. A y B: Ensayos positivos obtenidos con el suero α -FhPm 1/30. Se observa reactividad en músculos asociados a haces musculares parenquimáticos (MPa). C: Ensayo negativo obtenido con el suero preinmune, no se observa reactividad en el parénquima.

6.4.1.3 Reactividad del suero α -FhPm en el los aparatos reproductores femenino y masculino:

F. hepatica es un trematodo hermafrodita, motivo por el cual presenta ambos aparatos reproductores, femenino y masculino. En este estudio se detectó la presencia de Pm de en los órganos de ambos aparatos. Como se muestra en la Fig. 15, se localizó Pm en los músculos asociados al útero (Fig. 15A), ovario (Fig.15C) y testes (Fig.15E).

En la siguiente página se muestra la Fig. 15.

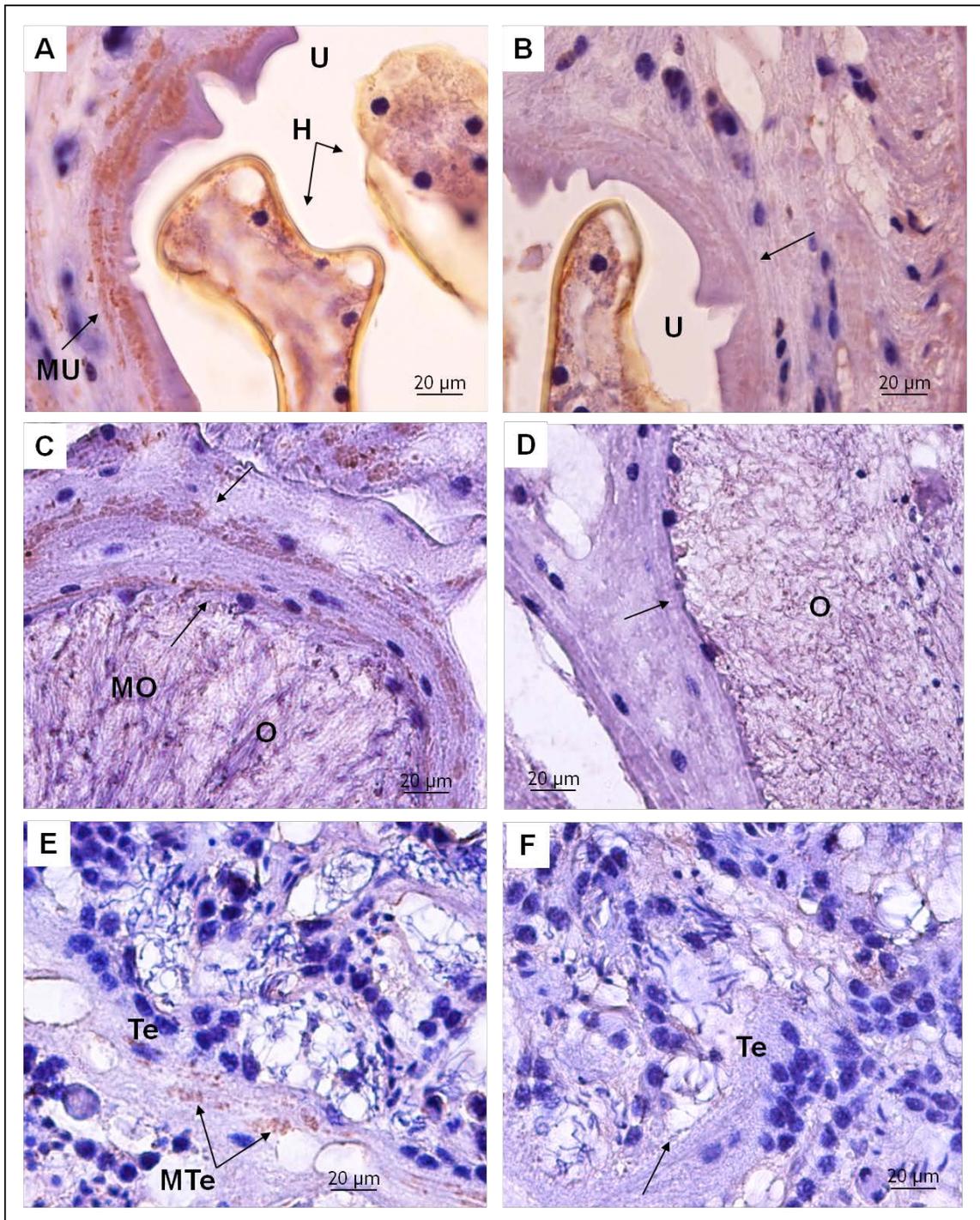


Figura 15. Inmunolocalización de Pm en aparato reproductor femenino y masculino del adulto de *F. hepatica*. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de ensayos de inmunolocalización por inmunohistoquímica realizados sobre cortes de *F. hepatica* sometidos a recuperación antigénica. A, C Y E: Ensayos positivos obtenidos con el suero α -PmFh 1/30. A y C: se observa reactividad en músculos asociados aparato reproductor femenino, en los músculos del útero (MÚ) y el ovario (MO), respectivamente; en C: reactividad en los músculos asociados al aparato reproductor masculino, en los músculos de los testes (MTe). B, D y F: Ensayos negativos obtenidos con el suero preinmune 1/30 realizados sobre cortes a nivel del útero (U), ovario (O) y testes (Te), respectivamente.

6.4.1.4 Reactividad del suero α -FhPm en los músculos de las capas subtegumentarias y en el tegumento:

Pm también se observó en las capas musculares subtegumentarias circular (en contacto con el tegumento) y longitudinal (más interna) de *F. hepatica* (Fig. 16).

Como se muestra en la Fig. 16A, el empleo de microscopía óptica permitió evidenciar la localización extramuscular de Pm a un nivel tegumentario de este trematodo; lográndose observar una intensa reactividad del suero en la membrana apical, cuando se comparó con un suero control preinmune a la misma dilución (Fig. 16B)

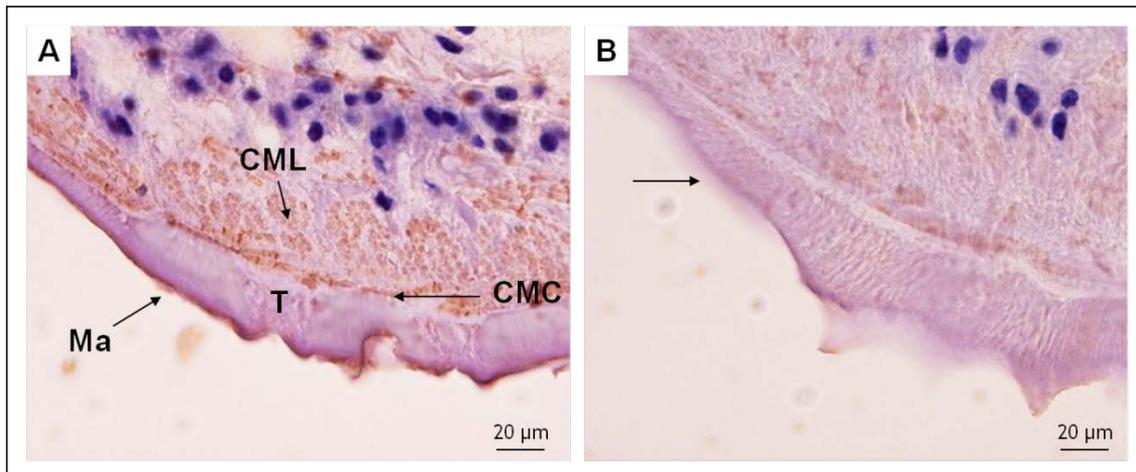


Figura 16. Inumolocalización de Pm en el tegumento de *F. hepatica*. A: Ensayos positivos obtenidos con el suero α -PmFh 1/30, se observa reactividad intensa la superficie del tegumento (T) y en las capas musculares subtegumentarias circular y longitudinal, CMC y CML, respectivamente. B: Ensayo negativo obtenido con el suero preinmune 1/30.

6.4.2 Microscopía confocal

Para profundizar los resultados obtenidos por microscopía óptica, se realizaron estudios de microscopía confocal, siendo la misma una técnica más sensible que la anterior.

El empleo de este tipo de microscopía confirmó los resultados obtenidos mencionados previamente. Se observó una reactividad intensa del suero α -PmFh, revelado por conjugado fluorescente, en los músculos asociados al intestino (Fig. 17 A, B, C y D) y reiterando el resultado obtenido por microscopía óptica, se observó una leve reactividad del suero en la membrana lamelar (Fig. 17C). Interesantemente se detectó reactividad del suero en el lumen intestinal (Fig. 17C), dato que hasta el momento junto con la detección de Pm en la lamela, corresponden a localizaciones extramusculares de Pm que no han sido reportadas para otros helmintos.

Además, se pudo verificar la localización de Pm en el parénquima (Fig. 17D), capas musculares subtegumentarias (Fig. 17D) y en testes (Fig. 17E) de *F. hepatica*.

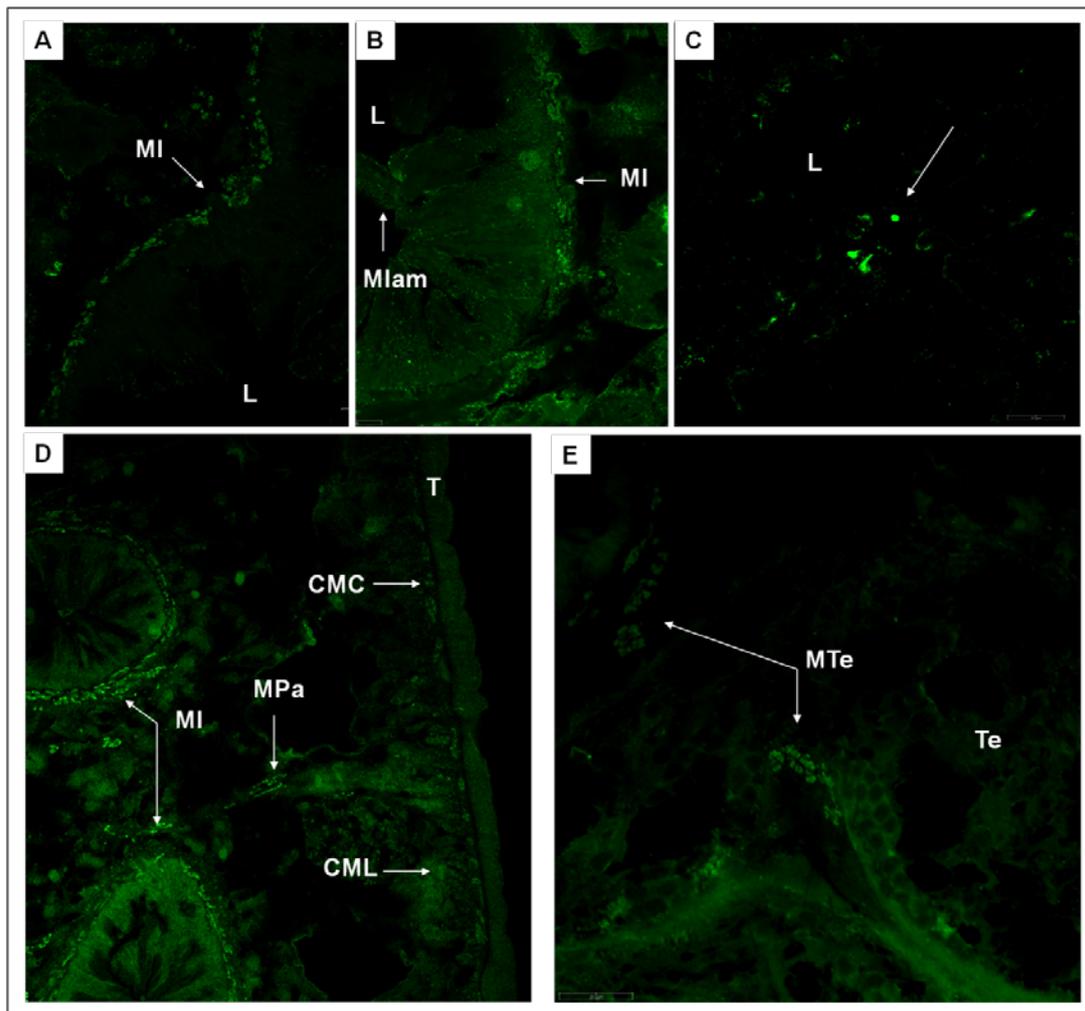


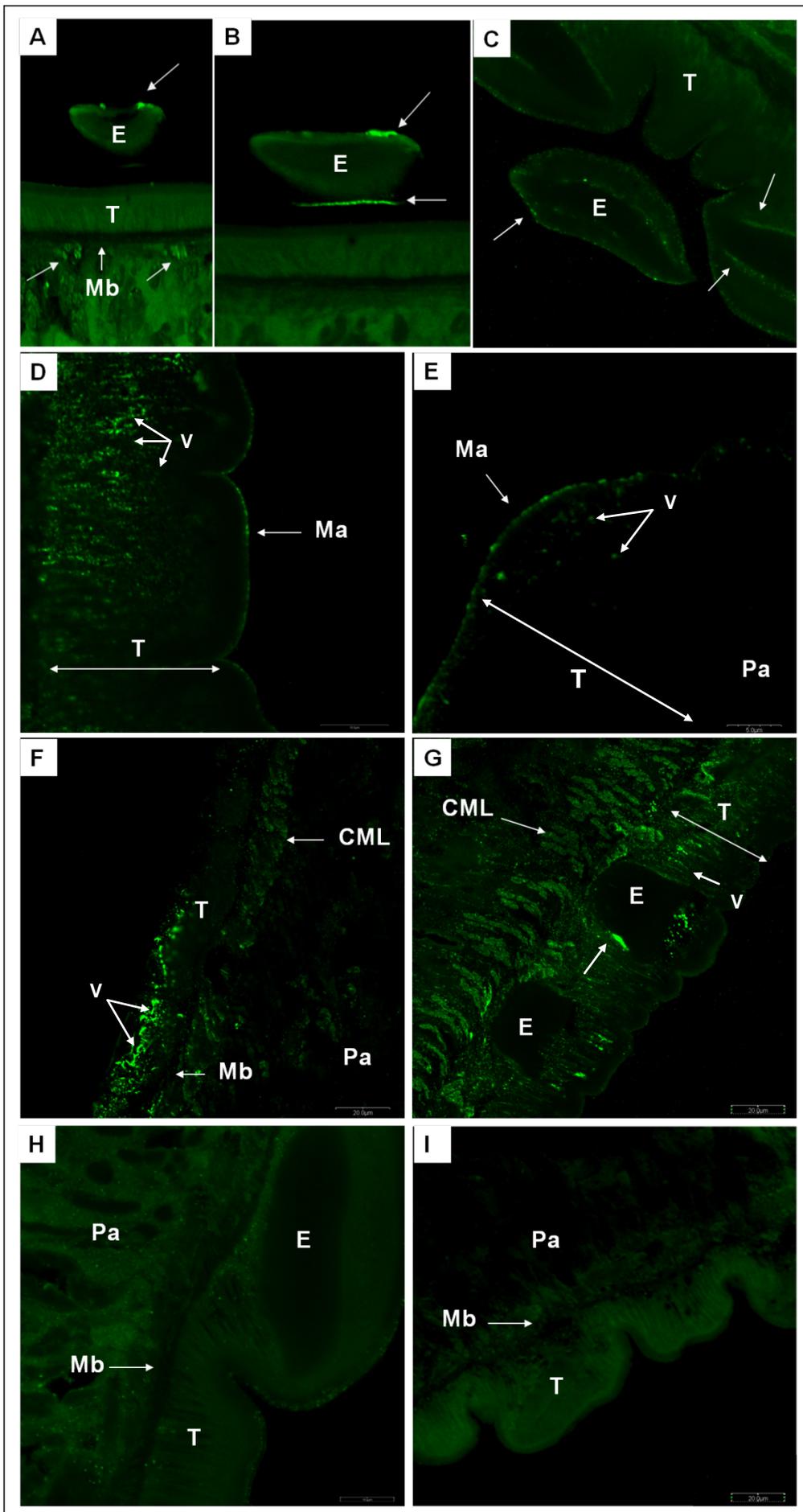
Figura 17. Inmunolocalización de FhPm en intestino, músculos subtegumentarios, parénquima y testes. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de ensayos de inmunolocalización por inmunofluorescencia indirecta, realizados sobre cortes de *F. hepatica* de 5 μ m de espesor, revelados con conjugado a FITC. Ensayos positivos obtenidos con el suero α -PmFh 1/30. A y B: Se observa reactividad en músculos asociados al intestino (MI). C: detección de Pm en el lumen intestinal. D: presencia de Pm en el parénquima (MPa), intestino y en las capas musculares subtegumentarias (CMC y CML). E: reactividad en los músculos asociados a los Testes (MTe).

El empleo de microscopía confocal confirmó la localización extra muscular de Pm a nivel tegumentario de *F. hepatica* (Fig. 18); pudiéndose observar la presencia de Pm en la membrana apical, donde la proteína se encuentra con una distribución no homogénea a lo largo de la membrana, concentrándose en regiones de la misma que están asociadas a las espinas del parásito (Fig. 18A, B, C y G).

Sumado a la detección de Pm en la membrana apical asociada a las espinas, se observó reactividad del suero en la base de la espina de la Fig. 18A y B.

Además de localizar Pm en la membrana apical del tegumento y en las espinas, se observó la presencia de la proteína, en lo que parecen ser pequeños cuerpos esféricos distribuidos por todo el sincitio tegumentario de *F. hepatica*. Estos cuerpos vesiculares aparentan tener un diámetro aproximado entre los 100 y 200 nm (Fig. 18D-G)

Figura 18. Inmunolocalización de Pm en espinas y tegumento de *F. hepatica*. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de ensayos de inmunolocalización por inmunofluorescencia indirecta, realizados sobre cortes de *F. hepatica*, revelados con conjugado a FITC. A-C: Ensayos positivos obtenidos con el suero α -PmFh 1/30. A y C: reactividad del suero en la superficie de la espina (E). B: otro plano de A. D-G: reactividad membrana apical del tegumento (Ma); en el sincitio tegumentario (T), donde se pueden apreciar pequeñas vesículas (V) de un diámetro de 100 a 200 nm aproximadamente conteniendo Pm y en la capa muscular subtegumentaria circular (CMC). H e I: Ensayos negativos obtenido con el suero preinmune 1/30.



7. DISCUSIÓN

Dadas las primeras evidencias de la localización tegumentaria de Pm en *F. hepatica* reportadas por Cancela y col. (2004) y los resultados promisorios obtenidos de la vacunación de ovejas con la proteína nativa, nos propusimos desarrollar un anticuerpo α -FhPm como nueva herramienta para continuar con los estudios de localización de Pm en el estadio adulto de este parásito. Los resultados mostrados en el presente trabajo indican que el suero policlonal producido en conejo es de alta especificidad y título hacia Pm de *F. hepatica*. Este suero fue capaz de reconocer tanto al monómero de 97 kDa como a la forma dimérica de la proteína (Fig. 1). Más aún el suero producido identifica la proteína en las estructuras de origen: las capas musculares, como lo demuestran los estudios de inmunohistoquímica realizados con el mismo (Figs. 11-18); que se discuten a continuación.

En el presente trabajo se utilizaron dos técnicas de microscopía para realizar estudios de inmunolocalización de Pm empleando el suero α -FhPm desarrollado. La microscopía óptica permitió observar la localización extramuscular de Pm en el tegumento de *F. hepatica*. El empleo de la microscopía confocal, técnica más sensible que la anterior, permitió confirmar este resultado, pudiendo detectar Pm en regiones definidas del tegumento, como son la membrana apical, el sincitio y las espinas. Interesantemente ambos estudios permitieron observar Pm en la lamela intestinal, pudiéndose además observar a la proteína en el lumen mediante microscopía confocal. Los estudios realizados, evidenciaron la localización de Pm a nivel de la interfase huésped-parásito, no solo detectándola en el tegumento, sino además en el tubo digestivo de *F. hepatica*. Su presencia en estas localizaciones sugiere que este antígeno podría interactuar con componentes del huésped, dando una posible explicación a su rol protector e inmunomodulador descritos previamente

El tegumento de los tremátodos es una estructura sincicial citoplasmática anucleada que recubre toda la superficie del parásito. Se encuentra delimitado externa e

internamente por dos membranas plasmáticas. La membrana externa (apical) está recubierta por una capa de glicocálix denso, mientras que la membrana interna o membrana basal se encuentra en contacto con los músculos subyacentes. Estos últimos están organizados en dos capas musculares, la capa muscular subtegumentaria circular (más externa) y capa muscular subtegumentaria longitudinal (más interna). Por debajo de estas capas musculares se encuentran los cuerpos celulares de las células tegumentarias, cuyos citoplasmas se proyectan a través de túbulos citoplasmáticos que atraviesan las capas musculares, constituyendo el sincitio tegumentario (ver Fig. 19A) (Braschi 2006).

En el adulto de *F. hepatica* existen dos tipos de células tegumentarias, que difieren por la naturaleza de los cuerpos secretorios que producen. Las células de Tipo 1, sintetizan vesículas esféricas electrón densas de 0,12 μm de diámetro rodeadas por membrana (cuerpos T1), mientras que las células de Tipo 2 sintetizan cuerpos discoideos bicóncavos electrón lúcidas de 0,2 μm de diámetro rodeados por membrana (cuerpos T2). Ambos tipos de cuerpos son sintetizados y dirigidos hacia el sincitio a través de los túbulos citoplasmáticos, donde posteriormente su contenido es incorporado al glicocálix (Hanna 1980).

Bennet y Threadgold (1975) a través de estudios de microscopía electrónica, describieron los cambios que ocurren en el tegumento durante el desarrollo de *F. hepatica* desde las formas juveniles recientemente desenquistadas (JRD) hasta parásitos de 6 semanas que residen en los conductos biliares; observaron que en las metacercarias y en los JRD, no hay células Tipo 1 ni Tipo 2. Las células tegumentarias son de un tipo denominado Tipo 0, las cuales producen cuerpos secretorios de Tipo 0 (T0) esféricos, electrón densos, rodeados de membrana y de 0,22 μm de diámetro. Su descarga en la membrana apical permite el recambio del glicocálix, probablemente en respuesta a la unión de anticuerpos del huésped sobre el parásito (Hanna 1980b).

Los resultados presentados por Hanna (1980) sugieren que la producción de cuerpos T0 por las formas juveniles permitirían el recambio continuo del glicocálix durante la migración por el intestino y peritoneo, asegurando la protección del parásito frente a las respuestas inmunes en estas localizaciones hostiles. Postula que posiblemente la secreción de cuerpos T1 ocurra durante la migración a través del parénquima hepático,

pero cuando *F. hepatica* entra en los conductos biliares, ambiente inmunológicamente privilegiado, ocurre un nuevo cambio en la secreción de cuerpos, donde comienzan a liberarse hacia el glicocálix los componentes de los cuerpos T2. Estos probablemente contengan productos que le permitan al parásito adaptarse a su nuevo ambiente.

El tegumento de los trematodes es una de las regiones de contacto e intercambio del parásito con el medio circundante que lo rodea y por lo tanto constituye una de las interfases huésped-parásito, siendo la otra interfase la mucosa intestinal que recubre el aparato digestivo de estos parásitos. Se encuentra involucrado en la renovación de la membrana externa y nutrición (mediante la internalización de moléculas), modulación, secreción, osmo-regulación, recepción sensorial, transducción de señales y en la evasión inmune (Wilson y col. 2011).

Dada su importancia en la nutrición y en la evasión de la respuesta inmunológica, ha sido considerado un blanco ideal para el desarrollo de drogas y vacunas. Por lo tanto demostrar la presencia de Pm en la superficie de *F. hepatica* y de otros parásitos se torna relevante a la hora de justificar su capacidad protectora.

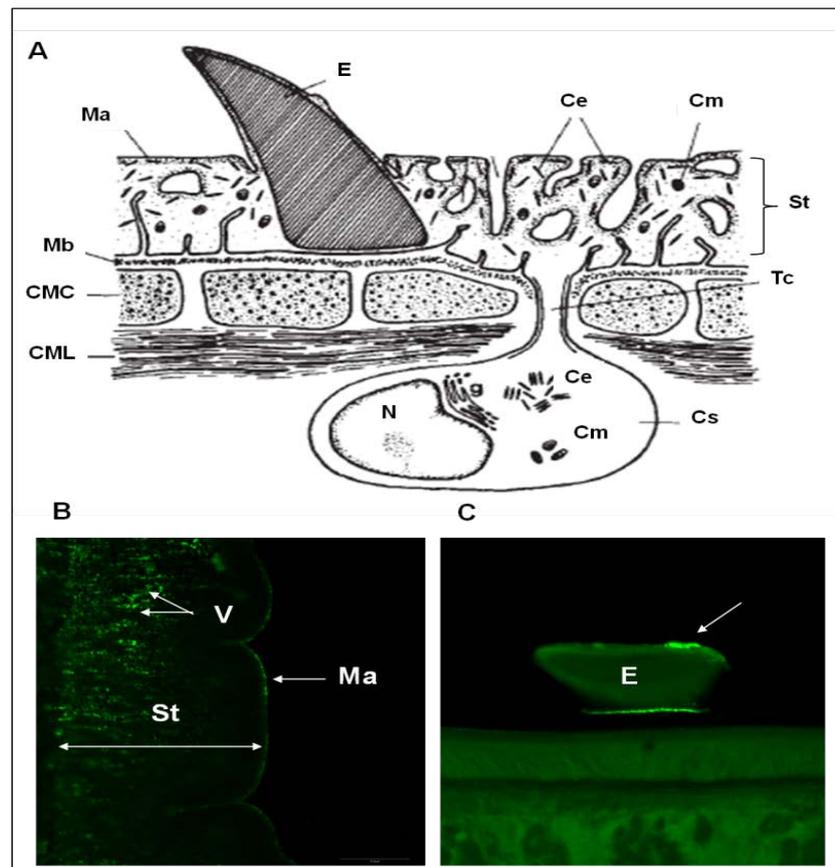


Figura 19. Localización de Pm en el tegumento de *F. hepatica*. La microscopía confocal muestra la localización de Pm en la superficie apical, espinas y en el sincitio tegumentario utilizando el antisero desarrollado en conejo contra el monómero Pm de 97 kDa. A: esquema de la estructura del tegumento del trematodo *S. mansoni*, tomado de Matsumoto y cols. 1988. Ma: membrana apical; Mb: membrana basal; E: espina; St: sincitio tegumentario; CMC: capa muscular subtegumentaria circular; CML: capa muscular subtegumentaria longitudinal; Ce: cuerpos elongados; Cm: cuerpos membranosos; Tc: tubo citoplasmático; Cs: célula subtegumentaria; N: núcleo celular. B: localización de Pm en el tegumento de *F. hepatica* en la Ma y en el St, en este último se pueden apreciar pequeñas vesículas de reactividad positiva al suero α -FhPm. C: presencia de Pm asociada a las espinas (E) del parásito.

Hasta el momento la asociación de Pm al tegumento de *F. hepatica* ha sido reportada solamente por Cancela y col. (2004). En su trabajo, empleando un suero α -FhPm desarrollado en ovejas, observaron una leve reactividad en la superficie apical del tegumento y en la membrana lamelar del tubo digestivo, y un marcado intenso en las

capas musculares asociadas al intestino, útero, testes y haces musculares subtegumentarios

Los resultados obtenidos en el presente trabajo empleando microscopía óptica, confirmaron los reportados por Cancela y col., más aún, nosotros pudimos observar una reactividad intensa del suero α -FhPm en el tegumento de *F. hepatica*, logrando además observar la presencia Pm en la ventosa ventral, faringe, ovario y en haces musculares parenquimáticos.

Con la finalidad de profundizar en el estudio de localización de Pm, se realizaron estudios preliminares de microscopía confocal, siendo esta una técnica más sensible que la microscopía óptica.

El análisis confocal confirmó la localización de Pm en la superficie de *F. hepatica*, evidenciando su presencia en la membrana apical del tegumento, logrando además detectarla dentro del sincito tegumentario. En esta región se observó Pm en lo que parecieran ser pequeñas vesículas distribuidas en la matriz tegumentaria con un diámetro entre los 100 a 200 nm, y en la superficie de las espinas (Fig. 19A y B).

Según lo reportado por Hanna (1980), estas vesículas podrían tratarse de los cuerpos secretorios presentes en el sincitio tegumentario de los adultos de *F. hepatica*, cuerpos T1 y T2, aunque la metodología empleada no nos permite hacer una discriminación fina de tamaños entre las vesículas observadas. Sin embargo, dependiendo del tiempo que residieron en los canalículos biliares los parásitos usados para los estudios histológicos, podríamos esperar observar una mayor cantidad de cuerpos T1 en los que recientemente se habían alojado en los canalículos, y una mayor cantidad de cuerpos T2 en los parásitos con un tiempo de residencia mayor en esta región.

Con respecto a la asociación de Pm con estos cuerpos secretorios, la presencia de la proteína en el sincitio ya ha sido reportada en el tremátodo *S. mansoni* mediante estudios de inmunolocalización por microscopía electrónica.

Estudios realizados por Matsumoto y col. (1988) empleando un suero α -Pm del molusco *Limulus*, evidenciaron la presencia de esta proteína en vesículas membranosas, distribuidas en la matriz tegumentaria de *S. mansoni*. Estos autores postularon que Pm se encontraría en estas vesículas en una forma no filamentosa soluble, diferente a la proteína muscular, la cual podría ser secretada, por lo que

quedaría expuesta en la superficie del parásito, dando una posible explicación a su capacidad protectora.

Por otro lado Thors y col. (2006) también detectaron Pm en el sincitio tegumentario en vesículas en el adulto de *S. mansoni*. Interesantemente estos autores relacionaron su presencia en el tegumento, donde actuaría como un receptor de Fc, con un posible mecanismo de transporte vesicular implicado en la ingesta de IgG del huésped mediante un proceso endocítico.

La localización de Pm en el sincitio tegumentario, también fue reportada en el estadio larvario del cestodo *T. solium* (cisticerco). Laclette y col. (1992) demostraron la presencia del antígeno B de *T. solium*, homólogo a Pm de *S. japonicum*, en el tegumento del cisticerco mediante inmunofluorescencia y sugirieron que la proteína sería sintetizada por células tegumentarias y liberada a través del tegumento de la larva hacia la interfase huésped-parásito.

La identificación de un posible mecanismo de secreción de Pm desde el tegumento similar entre el cestode *T. solium* y los trematodos *F. hepatica* y *S. mansoni*, implicado en los mecanismos de defensa empleados por estos helmintos, sugeriría la identificación de un proceso conservado en los platelmintos parásitos.

Sorprendentemente en este trabajo, además de la localización en regiones tegumentarias, Pm se detectó en la membrana lamelar del tubo digestivo (Fig. 11 y Fig.17) y en el lumen intestinal de *F. hepatica* (Fig. 17). Resultado que hasta el momento no ha sido reportado para otro helminto y que sugiere que esta proteína podría estar siendo sintetizada por las células del epitelio intestinal y secretada hacia al lumen, junto con los productos de excreción-secreción (PES) de *F. hepatica*.

Finalmente, el estudio por microscopía confocal permitió observar la asociación de Pm a las espinas tegumentarias de *F. hepatica*. La composición y función de las espinas asociadas al tegumento de los trematodos es muy poco conocida. Las espinas de los trematodes son estructuras cristalinas, constituidas principalmente por actina (Stitt 1992). Son estructuras electrón densas cuando se observan por microscopía electrónica y están recubiertas en su cara externa por la membrana apical y basalmente por la

membrana basal (Threadgold 1962). La distribución no homogénea del anticuerpo α -Pm en la membrana apical, concentrado en regiones cercanas a las espinas, sugiere que Pm podría tener alguna relación fisiológica con las mismas; sin embargo esta hipótesis deberá ser mejor estudiada para poder ser ratificada o rechazada.

Con la finalidad de identificar los componentes que constituyen el tegumento se han realizado numerosos estudios proteómicos, a partir de extractos tegumentarios de varios helmintos.

Con respecto a la detección de Pm en el tegumento de *F. hepatica*, recientemente Wilson y cols. (2011) realizaron un estudio del proteoma tegumentario de este parásito, y aunque no informan la detección de Pm, hacen referencia a la identificación de la proteína CD59 en la fracción asociada a membranas. Un estudio previo describió la presencia de un inhibidor del sistema complemento, SCIP-1, en la superficie de la larva y del adulto de *S. mansoni* (Parizade 1994) y demostró que SCIP-1 estaba funcional y antigénicamente relacionado a la proteína humana CD59, proteína asociada a membrana capaz de unirse a C8 y C9 e inhibir el ensamblado de MAC. Estudios posteriores demostraron que SCIP-1 es una forma de paramiosina presente en la superficie de *S. mansoni* (Deng 2003). Por lo cual el estudio de Wilson y col. indicaría que la proteína CD59 detectada en la fracción asociada a membrana del tegumento de *F. hepatica*, correspondería a Pm; resultado que valida los estudios de inmunolocalización realizados en este trabajo.

Por otro lado, la presencia de Pm ha sido evidenciada en el tegumento de los Schistosomas en numerosas ocasiones (Van Balkom 2005; Liu 2006; Braschi 2006; Mulvena 2010), validando los estudios de inmunolocalización realizados en estos parásitos.

Con respecto a la detección de Pm en los PES de *F. hepatica*, no se ha reportado la identificación de la proteína en los mismos, resultado que no concuerda con nuestros estudios de localización en la superficie de la lamela intestinal y en la luz del intestino del parásito. Sin embargo, si se ha identificado Pm en los PES de otros trematodos *Opisthorchis viverrini* (Mulvena 2010) y *S. japonicum* (Liu 2009). Debido a que los

resultados de la microscopía confocal son preliminares, para comprobar una posible secreción intestinal de Pm en *F. hepatica*, se debería profundizar tanto en los estudios de proteómica de los PES como en los de inmunolocalización.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de los estudios de inmunolocalización de Pm, sumado a la detección de CD59 en el tegumento de *F. hepatica* por estudios de proteómica, sugieren la localización extramuscular de la proteína a nivel tegumentario de *F. hepatica*. Esta localización superficial de Pm confirmaría la hipótesis de que la misma podría estar participando en eventos moleculares en la interfase huésped-parásito.

Su detección en el sincitio tegumentario de *F. hepatica*, sumadas a las evidencias reportadas previamente en otros helmintos, sugieren un posible mecanismo por el cual Pm podría ser dirigida hacia la superficie de este trematodo o hacia al medio circundante. Donde esta proteína podría ser sintetizada por células tegumentarias, transportada en vesículas a través del sincitio tegumentario y posteriormente secretada hacia medio circundante, y/o permanecer asociada a la membrana apical.

La localización tegumentaria de Pm sugiere que podría interactuar con componentes del huésped, desempeñando varios roles. Entre estos, su distribución superficial actuaría como un mecanismo de defensa del parásito frente a la acción del sistema inmune del huésped, dadas sus propiedades inmunomoduladoras, descritas previamente. Evidencias de esto fueron obtenidas en nuestro laboratorio donde se observó que Pm de *F. hepatica* interacciona con la porción constante de inmunoglobulinas (Berasain, no publicado). Este mecanismo de camuflaje sería empleado por los parásitos para evadir la respuesta inmune, debido a que la adquisición de proteínas del huésped enmascara antígenos parasitarios, previniendo la unión de anticuerpos específicos o de células efectoras del sistema inmune sobre estos.

Por otro lado, la proteína podría estar relacionada con un proceso de endocitosis, donde además de actuar como un receptor de Fc de superficie, actuaría como un receptor endocítico, una vez unida a la IgG, se internalizaría el complejo Pm-IgG en vesículas membranosas, lo que prevendría la acción de los anticuerpos sobre el helminto, como ya fuera postulada para *S. mansoni*.

Por lo descripto anteriormente, la localización superficial de Pm podría explicar su rol protector en el modelo ovino, ya que al estar expuesta en la interfase huésped-parásito, estaría en contacto directo con el sistema inmune del huésped, donde podría modular la acción del mismo, favoreciendo la evasión y sobrevida parasitaria. Más aun, la detección de la proteína en la lamela y en el lumen intestinal, sugiere que la proteína también podría ser sintetizada por las células del epitelio intestinal, pudiendo ser secretada y/o permanecer asociada a la lamela, donde cumpliría los mismos roles que en el tegumento; aumentando la probabilidad de interacción con componentes del sistema inmune.

La secreción de Pm por las células tegumentarias y/o intestinales implicaría un mecanismo de secreción no convencional o desconocido, debido a que las secuencias de Pm estudiadas no contienen péptidos señal de secreción (Laclette 1991).

8. PERSPECTIVAS

A futuro se pretende:

- ❖ Profundizar en los estudios de localización de Pm en el adulto, determinando las estructuras tegumentarias subcelulares asociadas a Pm mediante microscopía electrónica. Pudiendo además identificar cuáles son los cuerpos secretorios (T1 y/o T2) que contienen Pm.
- ❖ Conocer la distribución de Pm en otras etapas de desarrollo del parásito. Particularmente realizar estudios de inmunolocalización de Pm en metacercarias recién desenquistadas y en las larvas migrantes (estadios infectivos del huésped mamífero). La identificación de Pm en la superficie de los mismos reforzaría su importancia como candidato vacunal contra la fasciolosis, pudiendo formar parte del diseño de vacunas multivalentes, dirigidas al combate contra varios estadios de *F. hepatica* en una sola vacuna. El combate de las formas juveniles, disminuiría las patologías observadas en el hígado asociadas a la migración de las larvas
- ❖ Confirmar la presencia de Pm en el tegumento por proteómica. Realizar análisis del proteoma del tegumento de *F. hepatica* verificando que la capa muscular subyacente permanezca intacta luego de realizado el método de extracción del tegumento, control que hasta el momento no se ha realizado en los estudios de proteómica del tegumento de los parásitos (Van Balkon 2005, Liu 2006, Braschi 2006, Mulvenna 2010, Wilson 2011).

9. REFERENCIAS

- Acosta, D.** *Epidemiología y control de Fasciola hepatica en el Uruguay.* En: Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. A. Nari y C. Fiel. (Ed) 1994 Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. Pags. 233-256.
- Akira I.** and Matohito S. *Isolation and identification of paramyosin from liver fluke muscle layer.* Comp. Biochem. Physiol. 65 (1979) 537-541
- Akpek E., Liu S., Thompson R., Gottsch J.** *Identification of paramyosin as a binding protein for calgranulin C in experimental helminthic keratitis.* Invest Ophthalmol Vis Sci 43 (2002) 2677- 2684
- Andrews, S.** *The life cycle of Fasciola hepatica.* En: Fasciolosis. J.P.Dalton (Ed) 1999 CAB International, Wallingford, UK. Pags. 1-20.
- Bennett C., Threadgold L.** *Fasciola hepatica: development of tegument during migration in mouse.* Exp Parasitol. 38(1975) 38-55.
- Berasain, P., Goni, F., McGonigle, S., Dowd, A., Dalton, J. P., Frangione, B., Carmona, C..** *Proteinases secreted by Fasciola hepatica degrade extracellular matrix and basement membrane components.* J. Parasitol. 83(1997) 1-5.
- Berasain, P., Carmona, C., McGonigle, S., Dowd, A., Frangione, B., Dalton, J. P., Goñi, F.** *Interaction of Fasciola hepatica proteases with human IgG subclasses. Basis of parasite subversion of the humoral immune response.* Exp. Parasitol., 94(2000) 99-110.
- Berasain P.** *“Interacción entre proteasas de parásitos uni-, multi-, intra- y extracelulares con componentes de la respuesta inmune de los hospederos: Fasciola hepatica y Trypanosoma cruzi. Invasión y evasión de la respuesta inmune. Evolución en parásitos y Co-evolución con el Hospedero.”* Tesis de Doctorado en Química (2006)
- Braschi S., Borges W., Wilson R.** *Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes.* Mem Inst Oswaldo Cruz 101(2006) 205-212
- Brophy P. and Pritchard D.** *Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy.* Exp. Parasitol. 79 (1994) 89-96

- Cancela M.**, Carmona C., Rossi S., Frangione B., Goñi F., Berasain P. *Purification, characterization and immunolization of paramyosin from the adult stage in of Fasciola hepatica.* Parasitology Research 92 (2004) 441-448
- Deng J.**, Gold D., LoVerde P., and Fishelson Z. *Inhibition of the Complement Membrane Attack Complex by Schistosoma mansoni Paramyosin.* Infect Immun. 71(2003) 6402–6410
- Elfvin M.**, Levine R., Dewey M. *Paramyosin in invertebrate muscles. I. Identification and localization.* Journal of Cell Biology 71 (1976) 261-272
- Espino A.** and Hillyer G.. *A novel Fasciola hepatica saposin-like recombinant protein with immunoprophylactic potential.* Journal of Parasitology 90 (2004) 876–879.
- Fairweather I.** *Triclabendazole progress report, 2005-2009: an advancement of learning?* J Helminthol. 83(2009) 139-50.
- Fairweather I.** *Liver fluke isolates: a question of provenance.* Veterinary Parasitology 176(2011) 1-8
- Ferreira C.**, Barbosa M., Silveira T., Valenzuela J., Vaz Ida S Jr, Masuda A. *cDNA cloning, expression and characterization of a Boophilus microplus paramyosin.* Parasitology. 125(2002) 265-274.
- Flynn R.**, Mulcahy G., Elsheikha H. *Coordinating innate and adaptive immunity in Fasciola hepatica infection: implications for control.* Vet Parasitol. 169 (2010) 235-240
- Fonseca C.**, Cunha-Neto E., Kalil J., Jesus A, Correa-Oliveira., Carvalho E., Oliveira S. *Identification of immunodominant epitopes of Schistosoma mansoni vaccine candidate antigens using human T cells.* Mem Inst Oswaldo Cruz 99(2004) 63-66.
- Gobert G.**, McManus D. *Update on paramyosin in parasitic worms.* Parasitology International 54(2005) 101-107
- Gobert G.**, Stenzel D., Jones M., Allen D., McManus D. *Schistosoma japonicum: immunolocalization of paramyosin during development.* Parasitology 114(1997) 45-52
- Hanna R.** *Fasciola hepatica: An Immunofluorescent Study of Antigenic Changes in the Tegument during Development in the Rat and the Sheep* Experimental Parasitology 50 (1980) 155- 170
- Harlow E.**, Lane D. *Antibodies-A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. NY. (1988)

- Harris E.**, Epstein F. Myosin and paramyosin of *Caenorhabditis elegans*: biochemical and structural properties of wild-type and mutant proteins. *Cell* 10(1977) 709-719
- Hillyer G. V.**, Apt, G. Food-borne trematode infections in the Americas. *Parasitology Today*, 13(1997) 87-88.
- Hopkins D.** *Homing in on helminths*. American journal of tropical medicine and hygiene. 46(1992) 626-634.
- Hotez P.**, Bottazzi M., Franco-Paredes C., Ault S., Periago M. *The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination*. PLoS Negl Trop Dis. (2008)
- Jaros S.**, Jaros D., Wesolowska A., Zygnier W., Wedrychowicz H. Blocking *Fasciola hepatica*'s energy metabolism - a pilot study of vaccine potential of a novel gene - phosphoglycerate kinase. *Vet Parasitol.* 172(2010) 229-237
- Jayaraj R.**, Piedrafita D., Dynon K., Grams R., Spithill T., Smooker P. Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of satge-specific antigens. *Veterinary Parasitology.* 160(2009) 230-236
- Kalina B.**, McManus D. A vaccine against the Asian schistosome, *Schistosoma japonicum*: an update on paramyosin as a target of protective immunity. *International Journal for Parasitology* 10 (1997) 1213-1219
- Kojima S.**, Niimura M., Kanazawa T. Production and properties of a mouse monoclonal IgE antibody to *Schistosoma japonicum*. *J Immunol.* 139(1987) 2044-2049.
- Laemmli U.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(1970) 680-685.
- Laclette J.**, Landa A., Arcos L., Willms K., Davis A., Shoemaker C. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol.* 44(1991) 287-95.
- Laclette J.**, Shoemaker C., Richter D., Arcos L., Pante N., Cohen C., et al. Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol* 148(1992) 124-128.
- Li B.**, Chandrashekar R., Weil G. Vaccination with recombinant filarial paramyosin induces partial immunity to *Brugia malayi* infection in jirds. *J Immunol.* 150 (1993) 1881-1885

- Liu F.**, Bauer C., Ortiz I., Cook R., Schmid M., Epstein H. *β -Filagenin, a newly identified protein coassembling with myosin and paramyosin in *Caenorhabditis elegans**. J Cell Biol. 140(1998) 347-353.
- Liu F.**, Cui S., Hu W., Feng Z., Wang Z., Han Z. *Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum**. Mol Cell Proteomics 8(2009) 1236-1251
- Liu F.**, Lu J., Hu W., Wang S., Cui S, Chi M., Yan Q., Wang X., Song H., Xu X., Wang J., Zhang X., Zhang X., Wang Z., Xue C., Brindley P., McManus D., Yang P., Feng Z., Chen Z., Han Z. *New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum**. PLoS Pathog. 2(2006) 268-281
- López-Abán J.**, Nogal-Ruiz J., Vicente B., Morrondo P., Diez-Baños P., Hillyer G., Martínez-Fernández A., Feliciano A, Muro A. *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(2008) 176-81
- Loukas A.**, Jones M., King L., Brindley P., McManus D. *Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes*. Infection and Immunity. 69(2001) 3646-3651
- Maggioli G.**, Acosta D., Silveira F., Rossi S., Giacaman S., Basika T., Gayo V., Rosadilla D., Roche L., Tort J., Carmona C. *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(2011) 9057-9063
- Maggioli G.**, Silveira F., Martín-Alonso J., Salinas G., Carmona C., Parra F. *A recombinant thioredoxin-glutathione reductase from *Fasciola hepatica* induces a protective response in rabbits*. Exp Parasitol. 129(2011) 323-330
- Mas-Coma S.** *Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas*. J Helminthol. 79(2005) 207-216
- Matsumoto Y.**, Perry G., Levine R., Blanton R., Mahmoud A., Aikawa M. *Paramyosin and actin in schistosomal tegument*. Nature 333(1988) 76-78
- McManus D.**, Dalton J. *Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica**. Parasitology 133(2006) S34-S61

- McManus D.**, Wong J., Zhou J., Cai C., Zeng Q., Smyth D., Li Y., Kalinna B., Duke M., Yi X. *Recombinant paramyosin (rec-Sj-97) tested for immunogenicity and vaccine efficacy against Schistosoma japonicum in mice and water buffaloes*. *Vaccine* 20(2001) 870-878
- Moerman D.**, Fire A. *Muscle: Structure, Function, and Development*. En: Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR, editors. *C. elegans II*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory (1997). Capítulo 16
- Moll L.**, Gaasenbeek C., Vellema P. Borgsteede F. *Resistance of Fasciola hepatica against triclabendazole in cattle and sheep in The netherlands*. *Veterinary Parasitology* 91(2000) 153-158
- Morrison C.**, Colin T., Sexton J., Bowen F., Wicker J., Friedel T., Spithill T. *Protection of cattle against Fasciola hepatica infection by vaccination with glutathione S-transferase*. *Vaccine* 14(1996) 1603-1612.
- Mühlschlegel F.**, Sygulla L., Frosch P., Massetti P., Frosch M. *Paramyosin of Echinococcus granulosus: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen*. *Parasitol Res.* 79(1993) 660-666.
- Mulvenna J.**, Sripa B., Brindley P., Gorman J., Jones M., Colgrave M., Jones A., Nawaratna S., Laha T., Suttiaprapa S., Smout M., Loukas A. *The secreted and surface proteomes of the adult stage of the carcinogenic human liver fluke Opisthorchis viverrini* *Proteomics*. 10 (2010) 1063-1078
- Muro A.**, Ramajo V., López J., Simón F., Hillyer G. *Fasciola hepatica: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins*. *Vet Parasitol* 69 (1997) 219-29
- Nara T.**, Matsumoto N., Janhcharut T., Matsuda H., Yamamoto K., Irimura T., Nakamura K., Aikawa M., Oswald I., Sher A., Kita K., Kojima S. *Demonstration of the target molecule of a protective IgE antibody in secretory glands of Schistosoma japonicum larvae*. *International Immunology* 6(1994) 963-071
- Olaechea F.**, Lovera V., Larroza M., Raffo F., Cabrera R. *Resistance of Fasciola hepatica against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina)*. *Vet Parasitol.* 178 (2011) 364-366.
- Overend D.**, Bowen F. *Resistance of Fasciola hepatica to triclabendazole*. *Aust Vet J.* 72(1995) 275-276.

- Parizade M.**, Arnon R., Lachmann P., Fishelson Z. *Functional and Antigenic Similarities Between a 94-kD Protein of Schistosoma mansoni (SCIP-1) and Human CD59*. J. Exp. Med. 179(1994) 1625-1636
- Park T.**, Kang J., Na B., Sohn W. *Molecular cloning and characterization of a paramyosin from Clonorchis sinensis*. Korean J Parasitol. 47(2009)359-367
- Pearce E.**, James S., Dalton J., Barrall A., Ramos C., Strand M., Sher A. *Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a Schistosoma mansoni antigen monospecifically recognized from mice protectively immunized with a non living vaccine*. Journal of Immunology 137(1986b) 3593-3600
- Piacenza L.**, Acosta, D., Basmadjlan, I., Dalton. J. P., Carmona, C. *Vaccination with Cathepsin L Proteinases and with Leucine Aminopeptidase Induces High Levels of Protection against Fascioliasis in Sheep*. Infection and Immunity. 67(1999) 1954-1961.
- Piedrafita D.**, Spithill T., Dalton J., Brindley P., Sandeman M., Wood P., Parsons J. *Juvenile Fasciola hepatica are resistant to killing in vitro by free radicals compared with larvae of Schistosoma mansoni*. Parasite Immunology 22(2007) 287-95.
- Ramírez B.**, Kurtis J., Wiest P., Arias P., Aligui F., Acosta L., Peters P., Olds G. *Paramyosin: a candidate vaccine antigen against Schistosoma japonicum*. Parasite Immunology 18 (1996) 49-52
- Schmidt J.**, Bodor O., Ghor I., Kunz W. *Paramyosin isoforms of Schistosoma mansoni are phosphorylated and localized in a large variety of muscle types*. Parasitology 112(1996) 459-467
- Shelud'ko N.**, Matusovsky O., Permyakova T., Matusovskaya G. *"Twitchin-actin linkage hypothesis" for the catch mechanism in molluscan muscles: evidence that twitchin interacts with myosin, myosin, and paramyosin core and affects properties of actomyosin*. Arch Biochem Biophys 466(2007) 125-135
- Solís C.**, Ostoa-Saloma P., Lugo-Martínez V., Johnston S., Laclette J. *Genetic vaccination against murine cisticercosis by using a plasmid vector carrying Taenia solium paramyosin*. Infection and Immunity 73(2005) 1895-1897
- Spithill T.**, Smooker P., Copeman D. 1999. *Fasciola gigantica: epidemiology, control, immunology and molecular biology*. In: Dalton, J. (Ed.), Fasciolosis, CAB International, Oxford, (1999) 465-525.

- Stitt A.**, Fairweather I., Trudgett A., Johnston C., Anderson S. *Localization of actin in the liver fluke, Fasciola hepatica*. Parasitology Research 78(1992) 96-102
- Stoscheck C. Quantitation of Protein. Methods in Enzymology 182(1990) 50-69
- Strube C.**, Buschbaum S., Von Samson-Himmelstjerna G., Schnieder T. *Stage-dependent transcriptional changes and characterization of paramyosin of the bovine lungworm Dictyocaulus viviparous*. Parasitology International 58(2009) 334-340
- Thors C.**, Jokiranta T., Meri T., Kairemo K., Meri S., Linder E. *Immunoglobulin uptake and processing by Schistosoma mansoni*. Parasite Immunology 28(2006) 421-428
- Threadgold L.** *The ultrastructure of the "cuticle" of Fasciola hepatica*. Experimental Cell Research 30(1962) 238-242
- Valero M.**, Panova M, Comes A., Fons R., Mas-Coma S. *Patterns in size and shedding of Fasciola hepatica eggs by naturally and experimentally infected murid rodents*. J Parasitol. 88 (2002) 308-313.
- Valero M.**, Panova M., Mas-Coma S. *Phenotypic analysis of adults and eggs of Fasciola hepatica by computer image analysis system*. J Helminthol. 79(2005) 217-25
- Van Balkom B.**, Van Gestel R., Brouwers J., Krijgsveld J., Tielens A., Heck A., Van Hellemond J. *Mass spectrometric analysis of the Schistosoma mansoni tegumental sub-proteome*. J Proteome Res. 4(2005) 958-966.
- Vázquez-Talavera J.**, Solís C., Terrazas L., Lacleste J. *Characterization and protective potential of the immune response to Taenia solium paramyosin in a murine model of cysticercosis*. Infection and Immunity 69(2001) 5412-5416
- Verrez-Bagnis V.**, Jérôme M. *Physico-chemical properties and rheological behaviour of Patella caerulea paramyosin*. Z Lebensm Unters Forsch. 201(1995) 230-235.
- Wang X.**, Chen W., Lv X., Tian Y., Men J., Zhang X., Lei H., Zhou C., Lu F., Liang C., Hu X., Xu J., Wu Z., Li X., Yu X. *Identification and Characterization of Paramyosin from Cyst Wall of Metacercariae Implicated Protective Efficacy against Clonorchis sinensis Infection*. PLoS One. 7(2012)
- Watabe S.**, Tsuchiya T., Hartshorne D. *Phosphorylation of paramyosin*. Comp Biochem Physiol B. 94(1989) 813-21.
- Watabe S.**, Hartshorne D. *Paramyosin and the catch mechanism*. Comparative Biochem. Physiol. 4(1990) 639-646

Wilson R., Wright J., Castro-Borges W., Parker-Manuel S., Dowle A., Ashton P., Young N., Gasser R., Spithill T. *Exploring the Fasciola hepatica tegument proteome* [International Journal for Parasitology](#) 41(2011) 1347–1359

Woods E. *Subunit structure of oyster paramyosin*. *Biochem J.* 113(1969) 39-47

World Health Organization. *Control of Foodborne Trematode Infection*. (1995) WHO Technical Report Series. 849.

Yang J., Yang Y., Gu Y., Li Q., Wei J., Wang S., Boireau P., Zhu X. *Identification and characterization of a full-length cDNA encoding paramyosin of Trichinella spiralis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 365(2008) 528-33.

Yang J., Gu Y., Yang Y., Wei J., Wang S., Cui S., Pan J., Li Q., Zhu X. *Trichinella spiralis: immune response and protective immunity elicited by recombinant paramyosin formulated with different adjuvants*. *Exp Parasitol.* 124 (2010) 403-408.

Zhang D., Pan W. Q., Quian L., Duke M., Shen L. H., McManus D. *Investigation of recombinant Shistosoma japonicum paramyosin fragments for immunogenicity and vaccine efficacy in mice*. *Parasite Immunology* 28 (2006)77-84

Zhang Z., Yang J., Wei J., Yang Y., Chen X., Zhao X., Gu Y., Cui S., Zhu X. *Trichinella spiralis paramyosin binds to C8 and C9 and protects the tissue-dwelling nematode from being attacked by host complement*. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(2011)

Zhao Q., Moon S., Na B. Kim S., Cho S., Lee H., Kong Y., Sohn W., Jiang M., Kim T. *Paragonimus westermani: biochemical and immunological characterizations of paramyosin*. *Exp Parasitol.* 115(2007) 9-18.