



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

Universidad de la República  
Facultad de Ciencias  
Unidad de Biología Parasitaria  
Tesina de Grado

# Inmunolocalización de dos leucina aminopeptidasas (*SmLAP1* y *SmLAP2*) de *Schistosoma mansoni*

---

Inés Giaudrone

Orientadora, Dra Gabriela Maggioli  
Montevideo, Uruguay  
Julio, 2019



## Agradecimientos

Quiero agradecerle a mi tutora, Gabriela Maggioli, por guiarme y apoyarme a lo largo de este trabajo, por su paciencia y comprensión. También quiero agradecerle a Patricia, Cecilia, Federico y Carlos de la Unidad de Biología Parasitaria, por su ayuda y por hacer de mi pasaje por el laboratorio una experiencia amena.

## Índice

Abreviaturas.....	5
1. Resumen .....	6
2. Introducción .....	7
2.1. Schistosomiasis .....	7
2.1.1. Epidemiología .....	7
2.1.2. Tratamiento.....	9
2.2. Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> .....	10
2.3. Características anatómicas de <i>S. mansoni</i> .....	14
2.3.1. Anatomía del esporocisto secundario y cercaria de <i>S. mansoni</i> .....	14
2.3.2. Anatomía del estadio adulto de <i>S. mansoni</i> .....	17
2.3.4. Enzimas peptidasas.....	20
2.3.4.1. Generalidades.....	20
2.3.4.2. Peptidasas en helmintos parásitos.....	22
2.3.4.2.1. Peptidasas involucradas en el proceso de nutrición de <i>S. mansoni</i> ....	23
2.3.4.2.2. Leucina Aminopeptidasas en <i>S. mansoni</i> .....	26
3. Objetivos.....	30
4. Materiales y Métodos .....	30
4.1. Recolección de adultos de <i>S. mansoni</i> .....	30
4.2. Infección de caracoles con miracidios de <i>S. mansoni</i> .....	30
4.3. Preparación de bloques de parafina .....	31
4.4. Desparafinación y rehidratación de cortes histológicos.....	32
4.5. Purificación de IgG totales de conejo.....	32
4.6. Análisis por SDS-PAGE .....	33
4.7. Cortes histológicos de gusanos adultos de <i>S. mansoni</i> .....	33
4.8. Localización de las SmLAPs en adultos de <i>S. mansoni</i> por inmunohistoquímica .....	34
4.9. Localización de las SmLAPs en <i>S. mansoni</i> adultos por inmunofluorescencia..	35
4.10. Cortes histológicos de caracol de <i>B. glabrata</i> .....	36
4.11. Localización de las SmLAP en estadios intracaracol por inmunohistoquímica	37
4.12. Localización de las SmLAP en estadios intracaracol por inmunofluorescencia .....	37
5. Resultados.....	38
5.1. Purificación de IgG totales de conejo.....	38
5.2. Histología de adultos de <i>S. mansoni</i> .....	40
5.3. Localización de las SmLAPs en <i>S. mansoni</i> adultos por inmunohistoquímica ...	42
5.4. Localización de las SmLAPs en <i>S. mansoni</i> adultos por inmunofluorescencia..	44

5.5. Histología de hepatopáncreas de <i>B. glabrata</i> infectados y no infectados con <i>S. mansoni</i> .....	46
5.6. Localización de las SmLAPs en estadio intracaracol de <i>S mansoni</i> por inmunohistoquímica .....	47
5.7. Localización de las SmLAPs en estadio intracaracol de <i>S mansoni</i> por inmunofluorescencia.....	48
6. Discusión .....	53
7. Referencias.....	58

## Abreviaturas

**Anti-SmLAP1:** Suero policlonal de conejo inmunizado contra SmLAP1

**Anti-SmLAP2:** Suero policlonal de conejo inmunizado contra SmLAP2

**CSA:** Amplificación Catalizada de la Señal

**DAB:** 3,3'-Diaminobenzidine

**EtOH:** Etanol

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno

**HRP:** Peroxidasa de rábano, HRP por sus siglas en inglés (Horseradish peroxidase)

**IgG:** Inmunoglobulinas G

**LAP:** Leucina aminopeptidasa

**NaN<sub>3</sub>:** Azida de sodio

**1X PBS:** 0.1 M Tampón fosfato salino, pH 7.3

**pI:** Punto isoeléctrico.

**PNA:** Aglutinina de cacahuete, PNA por sus siglas en inglés (peanut agglutinin)

**PSA:** Aglutinina de *Pisum sativum*, PSA por sus siglas en inglés (*Pisum sativum* agglutinin)

**FISH:** Hibridación fluorescente *in situ*, FISH por sus siglas en inglés (Fluorescence in situ hybridization)

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**Suero pre-inmune:** Suero policlonal de conejo sin inmunizar

**Tween:** Monolaurato de polioxietilensorbitano

**Tris:** Tris(hidroximetil)aminometano

## 1. Resumen

Las leucinas aminopeptidasas (LAPs) son miembros de la familia M17 que constituyen un grupo diverso y ampliamente distribuido de Zn-metalopeptidasas. Se caracterizan por catalizar en forma preferencial la eliminación del residuo de leucina en el extremo N-terminal de proteínas y péptidos. Estas peptidasas además presentan una amplia actividad amidolítica y participan en procesamiento/maduración/activación o degradación de sustratos. Estudios realizados en parásitos helmintos señalan la importancia de las LAPs en procesos biológicos claves en el ciclo de vida de estos parásitos, y por tanto han sido blancos para el desarrollo de estrategias de control, como vacunas. El presente trabajo tiene como objetivo la inmunolocalización de dos leucinas aminopeptidasas (*SmLAP1*- Smp\_030000 y *SmLAP2*- Smp\_083870) en tejidos del trematodo parásito *Schistosoma mansoni* en los estadios adulto y esporocisto (intracaracol). Esta inmunolocalización se llevó a cabo utilizando anticuerpos de conejo específicos producidos contra *SmLAP1* y *SmLAP2* recombinantes, respectivamente. Mediante la técnica de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se logró identificarlas en el epitelio intestinal, sugiriendo funciones en el proceso digestivo del parásito. También se localizaron en células vitelinas sugiriendo un rol en la producción de huevos, y en regiones subtegumentarias del parásito adulto. El estudio y la caracterización de estas dos metalopeptidasas de *S. mansoni* nos permite avanzar en el conocimiento de la biología del parásito y así poder desarrollar nuevas estrategias de control para la schistosomiasis.

## 2. Introducción

### 2.1. Schistosomiasis

#### 2.1.1. Epidemiología

La schistosomiasis o bilharziasis es una enfermedad crónica y aguda ampliamente extendida en regiones tropicales y subtropicales de África, Asia y Sudamérica, principalmente en regiones rurales o comunidades que carecen de acceso a saneamiento y agua potable (Rozendaal, 1997).

Aunque se trata de una enfermedad con un bajo índice de letalidad es considerada una enfermedad debilitante severa, ya que sus síntomas incluyen diarrea, sangre en las heces, dolores abdominales, aumento en el tamaño del hígado y el bazo en casos avanzados, y cáncer de vejiga en infecciones con *S. haematobium* (Botelho y col., 2015; OMS, 2018). Los síntomas son consecuencia de una infección por parásitos platelmintos trematodos del género *Schistosoma*, siendo *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* y *S. mekongi* los principales causantes de la schistosomiasis intestinal (Rozendaal, 1997).

La schistosomiasis tiene una alta prevalencia en regiones tropicales y subtropicales encontrándose en África el 92% del total de individuos que requieren tratamiento. Se estima que en el año 2016 al menos 206.4 millones de personas necesitaron tratamiento preventivo contra la enfermedad, de las cuales 89.2 millones fueron tratados por schistosomiasis, según los datos obtenidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017a) (Fig. 1).

Dicha parasitosis afecta a personas que viven en comunidades pobres y rurales, donde se realizan actividades agrícolas y de pesca. También afecta a las mujeres que realizan tareas domésticas con el agua infectada y los niños que se

exponen a ella, quienes son particularmente vulnerables por falta de higiene apropiada (Rozendaal, 1997; OMS, 2017a). En América del Sur, las principales causas de la expansión de la schistosomiasis son los crecientes desplazamientos de poblaciones, procedentes de zonas endémicas, y la presencia del vector natural (moluscos del género *Biomphalaria*) (Brasil, Ministério da Saúde, 2014). En este continente la extensa red hidrográfica, que incluye la cuenca del Plata y los cursos que desembocan en ella, presentan condiciones favorables para la reproducción del vector (Gorodner y col., 2004; Simões y col., 2013). En Brasil la schistosomiasis se ha expandido hacia el sur, llegando incluso a reportarse casos autóctonos en los estados de Santa Catarina y Rio Grande do Sul (de Azevedo y da Silva, s.f.; Junior y col., 1996). El vector molusco, *Biomphalaria tenagophila*, es considerado el responsable del foco de infección en el sur de Brasil (Borda y Rea, 1997). Ciertos factores como las construcciones de represas y emprendimientos agropecuarios han llevado a cambios ambientales que han generado condiciones favorables para el establecimiento y desarrollo del molusco (Brasil, Ministério da Saúde, 2014; Gorodner y col., 2004; Martorelli y col., 2013). Aunque no se han reportado focos de schistosomiasis en Argentina y Uruguay, se han encontrado numerosos moluscos de la especie *B. tenagophila* y se ha demostrado que son susceptibles a la infección experimental por *S. mansoni* (Borda y Rea, 2007 y 2010). Estas observaciones experimentales tienen importancia epidemiológica porque la schistosomiasis se extiende lenta pero inexorablemente al sur del Brasil y, hacia



la región de influencia de poblaciones ubicadas en la cuenca del río de la Plata.



**Figura 1: Status de schistosomiasis en 2017.** (Modificado de OMS, Global Health Observation, 2017b)

### 2.1.2. Tratamiento

La quimioterapia preventiva es el tratamiento empleado para reducir la morbilidad y prevenir la transmisión de la schistosomiasis, siendo la estrategia recomendada por la OMS. Consiste en la identificación de los grupos afectados y según el caso se administra medicina a las poblaciones en general o a los individuos más vulnerables, como niños y mujeres en edad reproductiva (OMS, 2017c).

El sistema implementado ha permitido una disminución de los individuos que requirieron tratamiento preventivo, pasando de 258.8 millones de individuos en 2014, a 218.8 millones en 2015 y llegando a 206.4 millones en 2016 (OMS, 2017a).

El tratamiento se realiza empleando praziquantel de forma periódica y focalizado en aquellos grupos afectados (OMS, 2017a). El praziquantel actúa a nivel del tegumento de los gusanos, induciendo a su vacuolización y a un cambio en su permeabilidad (Xiao y col., 2009). Estos cambios conducen a un aumento en el flujo de iones de calcio, induciendo la contracción muscular y la parálisis del parásito (Pax y col., 1978). El daño generado en el tegumento expone antígenos que inducen la respuesta del sistema inmune, lo que lleva a la eliminación del parásito (Xiao y col., 2009; da Silva y col., 2017).

Su administración masiva resulta efectiva contra los gusanos adultos, pero las formas juveniles presentan poca susceptibilidad (Xiao y col., 1985 y 2009). Tampoco es capaz de evitar la reinfección y se han identificado casos en los que la susceptibilidad de los parásitos al praziquantel se ha visto disminuida por su uso (Crellen y col., 2016; Vale y col., 2017). Es por esta razón que se plantea la necesidad de avanzar hacia otras medidas de control, estudiando diversas moléculas que puedan actuar como blancos en el diseño de nuevos fármacos o vacunas (Doenhoff y col., 2002; Vale y col., 2017). Hasta la fecha no existe ninguna vacuna efectiva para humanos, aunque existen varios candidatos que se encuentran en fase de experimentación (Mo y col., 2014). En este sentido, son de especial interés aquellas enzimas relacionadas con el desarrollo y nutrición del parásito, como lo son algunas de sus peptidasas gastrointestinales.

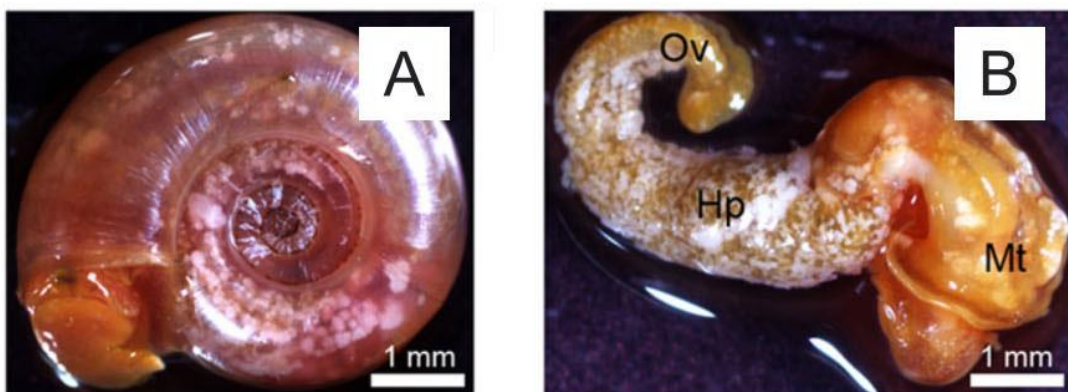
## [2.2. Ciclo de vida de \*S. mansoni\*](#)

*S. mansoni* es un trematodo parásito que tiene como huésped intermediario caracoles de la familia *Planorbidae* del género *Biomphalaria* y como huésped definitivo al hombre.

Los individuos infectados liberan huevos en las heces, estos terminan en cursos de agua donde habitan huéspedes intermediarios (caracoles) (Fig. 2).

Varias horas después de haber entrado en contacto con el agua, los huevos eclosionan dando lugar a miracidios, larvas ciliadas que pueden moverse libremente e infectar a su huésped intermediario. Estos miracidios de *S mansoni* infectan caracoles, penetrando a través del tegumento del manto, el pie y las antenas de los mismos (dos Santos Carvalho y col., 2008, Mohammed y col., 2011).

Posteriormente los miracidios sufren transformaciones y alcanzan su estado de esporocisto primario (o madre) (Wang y col., 2013). El proceso se da con rapidez lo que le permite al parásito adaptarse a las nuevas condiciones dentro del hospedero (dos Santos Carvalho y col., 2008). En el caso de estudios *in vitro* la transformación ocurre dentro de las primeras 24 horas post-infección (Basch y Diconza, 1974; Wang y col., 2013). Dentro de cada esporocisto primario existen múltiples células germinales, dispuestas individualmente o en conjunto, ubicadas en la región media del cuerpo o adyacentes a la pared, que se dividen para dar lugar a los embriones de los esporocistos secundarios (o hijos) (Meuleman y col.,



**Figura 2: Caracoles de *Biomphalaria glabrata*.** (A y B) Ejemplares de *B. glabrata*, se representa la ubicación del manto (Mt), el hepatopáncreas (Hp) y ovotestis (Ov) (Duval y col. y col., 2015).

1980; Wang y col., 2018). Entre la primera y segunda semana post-infección, los nuevos esporocistos se transportan por la sangre o abriéndose paso a través de los tejidos hasta la glándula digestiva o hepatopáncreas, que se encuentra en la región posterior del caracol (Basch y Diconza, 1974; dos Santos Carvalho y col., 2008; Jamieson, 2016) (Fig. 2B).

En este punto las células germinales en el interior de los mismos comienzan a dividirse para dar lugar a los primeros embriones de cercarias (Wang y col., 2018). Terminan de desarrollarse alrededor de la tercera o cuarta semana después de la infección, entonces se abren paso a través del tegumento del caracol y son liberadas al agua donde pueden entrar en contacto con la piel de los humanos (dos Santos Carvalho y col., 2008, Wang y col., 2013).

La cercaria penetra la piel vaciando el contenido de sus glándulas y perdiendo la cola en el proceso. Una vez en el interior del huésped, la cercaria se transforma en esquistosómula y migra hacia los pulmones a través del sistema venoso periférico. Unos días después, el parásito circula por la sangre hasta el sistema porta del hígado, donde alcanza el estadio adulto, y desde aquí migran hacia las venas mesentéricas del intestino grueso donde liberan sus huevos (Cregg, 1965). Los huevos que no son expulsados quedan en los tejidos formando granulomas, dando lugar a los síntomas de la fase crónica de la enfermedad (Schwartz y Fallon, 2018).

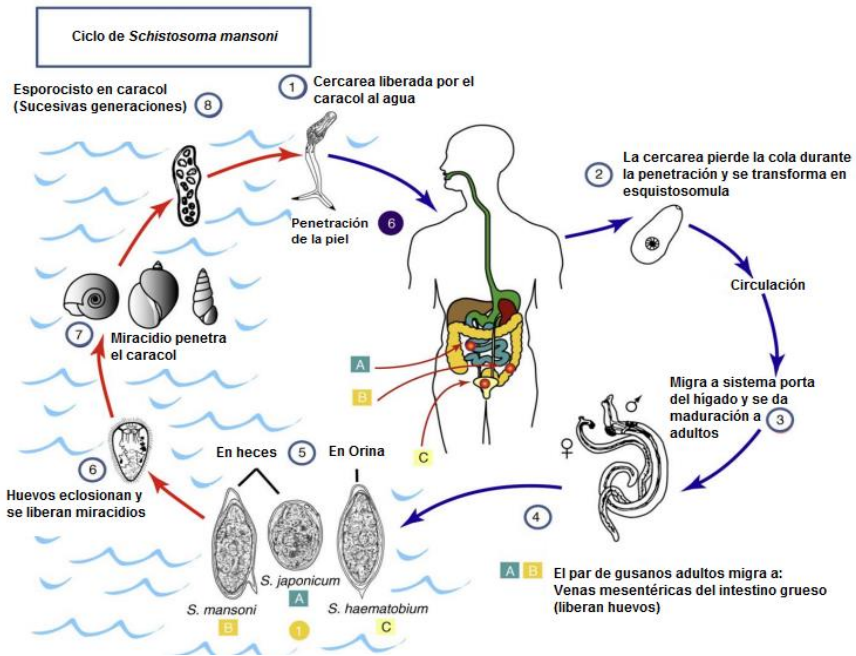
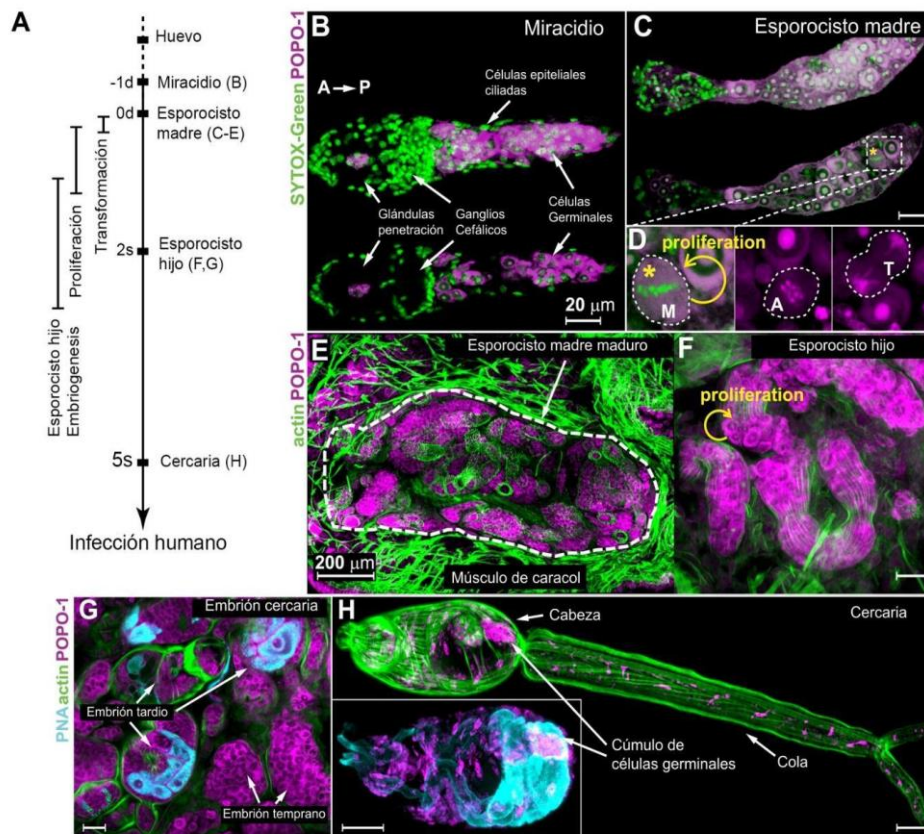


Figura 3: Esquema del Ciclo de vida de *S mansoni*. (Modificado de Rose y col., 2014)

## 2.3. Características anatómicas de *S. mansoni*

### 2.3.1. Anatomía del esporocisto secundario y cercaria de *S. mansoni*

Durante el proceso de maduración, los esporocistos secundarios sufren modificaciones anatómicas que llevan a la sectorización del cuerpo en tres áreas definidas: la región anterior que presenta el poro de nacimiento, las zonas

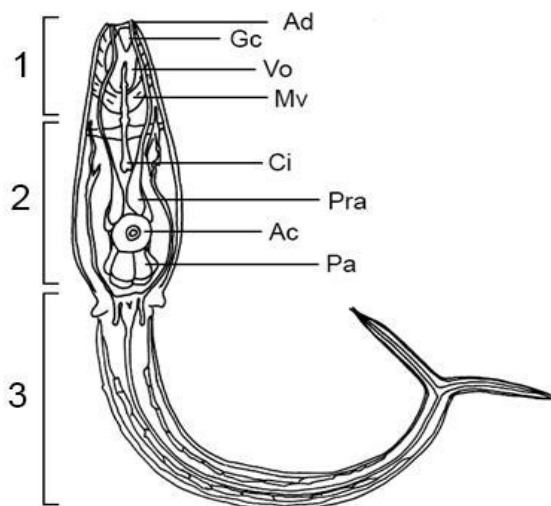


**Figura 2: Fase asexual del ciclo de vida *S. mansoni*.** (A) Esquema de la línea del tiempo del parásito. (B-C) Microscopías confocales de varias capas (arriba) y una capa (abajo) de miracidio (B) y esporocisto madre (C) 24hrs luego de una transformación *in vitro*, teñidos con POPO-1 y SYTOX-Green. (D) Imágenes representativas de metafase (M), anafase (A) y telofase (T) en esporocisto 24hrs después de transformación. (E-G) Criosección de tentáculo de *B. glabrata* mostrando un esporocisto madre (con perímetro delimitado por línea punteada) y esporocistos hijos en su interior 3 semanas post-infección (E); esporocisto hijo que migró a glándulas digestivas de *B. glabrata* 6 semanas post-infección (F); embriones de cercaría dentro de esporocisto hijo en glándulas digestivas de *B. glabrata* 6 semanas post-infección (G). La actina se tiñó con faloidina. Se visualizan glándulas y ductos acetabulares marcados con Peanut agglutinin (PNA). (H) Una cercaría adulta. Se muestra una imagen ampliada de la cabeza teñida (cuerpo) con POPO-1 y PNA. Las barras de son de 20µm, excepto en el caso de (E) donde es de 200µm. (Modificado de Wang y col., 2013).

dilatadas con embriones de cercarias; y las zonas contraídas sin embriones (Fournier y Théron, 1985).

Las cercarias presentan forma alargada y cilíndrica, con una longitud aproximada de 500  $\mu\text{m}$ , con una cola bifurcada de 230 x 50  $\mu\text{m}$  y un cuerpo (sin incluir la cola) de 190 x 70  $\mu\text{m}$ , aunque estas dimensiones pueden variar por su capacidad para extenderse y contraerse (Dorsey y col., 2002; dos Santos Carvalho y col., 2008) (Fig. 3).

El cuerpo de la cercaria se divide en una región anterior (órgano anterior), que presenta la ventosa oral y cumple la función de fijación e invasión; y la región posterior (cuerpo), que se caracteriza principalmente por la presencia de glándulas acetabulares y una ventosa ventral (acetábulo) (Dorsey y col., 2002).



**Figura 3: Esquema de la cercaria de *S. mansoni*.** Se indican las distintas regiones que componen a la cercaria: la región anterior (1), la región posterior (2) y la cola (3). Se esquematizan las estructuras del cuerpo cercariano. La apertura de los ductos (Ad) de las glándulas acetabulares, la región anterior, la glándula cefálica (Gc), la ventosa oral (Vo) y su musculatura (Mv), el ciego (Ci), el acetábulo (Ac) y las glándulas pre (Pra) y post-acetabulares (Pa) (Modificado de Dorsey y col., 2002).

Al tratarse de organismos acelomados, las cercarias presentan una cantidad considerable de parénquima compuesta por una matriz fibrosa y distintos tipos celulares que contribuyen en roles de transporte y soporte estructural (Dorsey y col., 2002). En su trabajo de 1970, Reissig describe el parénquima de *S. mansoni* como “un conglomerado de células con forma de estrella, fibras musculares y

axones nerviosos en el cual quedan embebidos el sistema digestivo, el sistema osmorregulador y el aparato reproductivo” (revisado por Dorsey y Stirewalt, 1971). La composición del parénquima es similar para la forma adulta (Dorsey y Stirewalt, 1971).

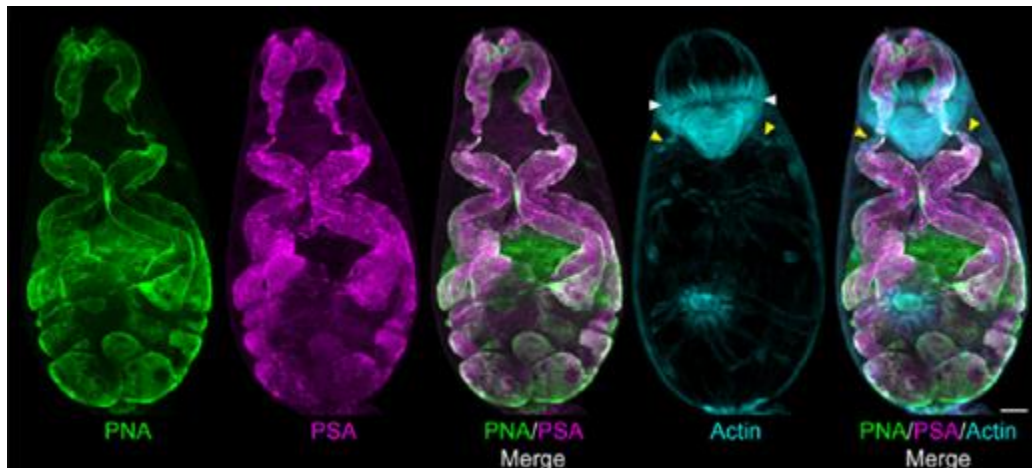
Es posible encontrar distintas etapas de la diferenciación en cortes histológicos de caracoles infectados. Según Pan y col. (1965), el comienzo de la diferenciación se da con una mórula, un conjunto de células germinales con una gran célula basófila en su interior. Dicha célula es la precursora de las futuras glándulas de penetración o acetabulares (revisado por dos Santos Carvalho y col., 2008).

Las glándulas acetabulares reciben su nombre por su ubicación respecto a la ventosa ventral, a su vez se distinguen en pre-acetabulares o circumacetabulares (dos pares) y post acetabulares (tres pares) (Fig. 3 y 4). Son unicelulares, compuestas por un área amplia llamada fundus y un proceso citoplasmático o ducto que se abren en el tegumento de la parte anterior de la cercaria (Dorsey y col., 1971 y 2002). Estas glándulas contienen cuerpos secretores generados durante su desarrollo en el interior del esporocisto. También pueden encontrarse cuerpos secretores en los ductos (Dorsey y col., 2002).

Las glándulas pre-acetabulares, localizadas anteriores a la ventosa ventral, se caracterizan por ser acidófilas y eosinófilas debido a la presencia de enzimas proteolíticas y de iones de calcio, necesario para la actividad proteolítica de las mismas. Estas enzimas estarían vinculadas al proceso de penetración e invasión. Las glándulas post-acetabulares se caracterizan por contener una sustancia de naturaleza mucosa que se cree contribuye en la adhesión de la



cercaria a la superficie de la piel del huésped. Estas glándulas se caracterizan por ser basófilas (Stirewalt y Kruidenier, 1961).



**Figura 4: Glándulas acetabulares de cercaria.** Proyección confocal de la totalidad del sistema de glándulas pre- y post-acetabulares marcados con lectinas PNA y PSA. Las flechas amarillas señalan la musculatura que rodea los ductos anteriores de las glándulas acetabulares y las flechas blancas indican el cono muscular. (Modificado de Collins y col., 2011).

Otro tipo celular que puede encontrarse son las células germinativas, ubicadas en la región posterior del cuerpo por debajo de las glándulas post-acetabulares, que en la forma adulta contribuyen al crecimiento de la parte posterior del soma y dan origen a los órganos sexuales (Dorsey y col., 2002; Wang y col., 2013 y 2018) (Fig. 2H)

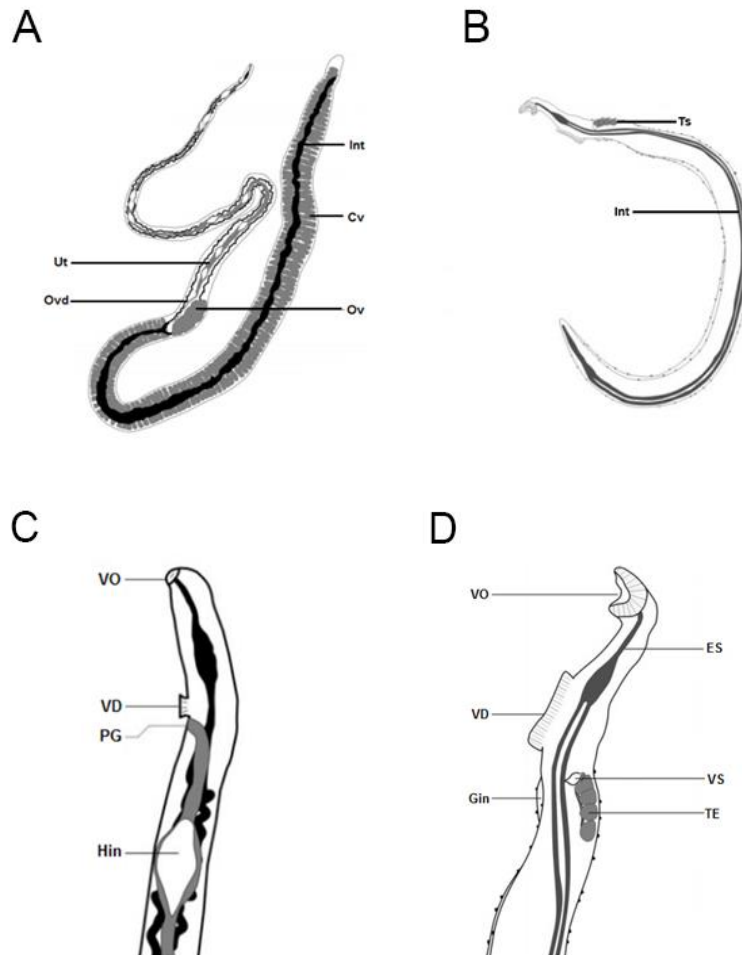
### [2.3.2. Anatomía del estadio adulto de \*S. mansoni\*](#)

Los gusanos adultos de *S. mansoni* presentan dimorfismo sexual. Los machos se distinguen de las hembras por ser más anchos y un poco más cortos, presentando protuberancias o tubérculos en su superficie dorsal como característica distintiva. Su longitud es de 6.65 a 12 mm. En su parte anterior, donde se encuentran las ventosas oral y ventral (acetábulo), presentan forma aproximadamente cilíndrica y un ancho de 0.21 a 0.39 mm; por debajo de

acetábulo y a la altura del canal ginecóforo adquiere forma más ancha y aplanada, que miden entre 0.4 y 0.55 mm (Kastner y col., 1975).

Las hembras son delgadas y alargadas, miden entre 6.4 a 12.24 mm de largo y entre 0.14 y 0.25 mm de ancho (Kastner y col., 1975) (Fig. 5).

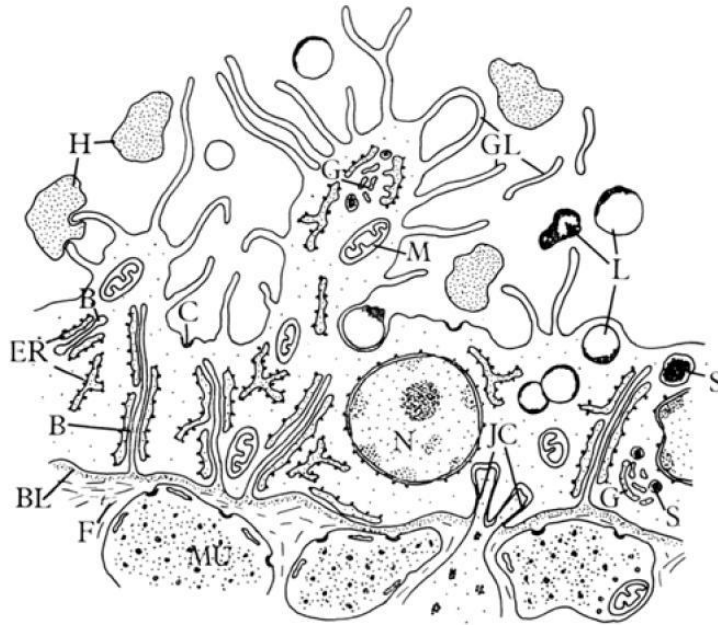
El aparato digestivo se compone por la ventosa oral, el esófago, las glándulas esofágicas ubicadas en su parte posterior; y el intestino ciego (Bogitsh, 1975; Li y col, 2013; Skelly y col., 2014). La boca se encuentra ubicada sub apicalmente y se abre a través de la ventosa en la parte anterior del gusano (Mair, 2000). Los gusanos no presentan faringe, por lo cual la boca se continúa con el esófago, que presenta un revestimiento de fibras musculares circulares y longitudinales que mueven la sangre por peristalsis; y dos fibras circulares fuertes que actúan como esfínteres y controlan el ingreso de la sangre al lumen (Li, 2013; Mair, 2000). El tegumento en la superficie del esófago consiste en un epitelio sincitial que se encuentra altamente especializado y junto con las enzimas secretadas por las glándulas contribuyen en el procesamiento de la sangre que pasa a continuación al intestino (Li, 2013; Morris y Threadgold, 1968)



**Figura 5: Estadío adulto de *Schistosoma*.** A y B) El diagrama representa las características anatómicas de *S. kisuensis*, similares a las descritas para *S. mansoni*. Se representan las principales estructuras en la hembra (A) comenzando con el útero (Ut) en la parte anterior, el oviducto (Ovd), los ovarios (Ov), el intestino (Int) y las células vitelinas (Cv). En el macho (B) se marcan el intestino y los testículos (Ts). (Modificado de Hanelt y col., 2009). C y D) Región anterior del aparato digestivo. El diagrama representa las características de la región anterior del aparato digestivo de *S. kisuensis*, similares a las de *S. mansoni*. En C se representa el aparato digestivo de una hembra y en D el del macho. Se distingue la ventosa oral (VO) y ventosa dorsal (VD), el esfago (ES) que conecta con el intestino que se bifurca a la altura del útero en la hembra y los testículos (TE) en el macho. También se indican el poro genital (PG) en la hembra y un huevo intrauterino (Hin), y en el macho se indica además el canal ginecóforo (Gin). (Modificado de Hanelt y col., 2009).

El intestino se bifurca posteriormente a la ventosa ventral y corre a los lados de los órganos reproductivos, y sólo vuelve a unirse en el extremo posterior del gusano. La superficie intestinal está formada por el gastrodermis (Fig. 6), un epitelio sincitial, con células que presentan numerosas mitocondrias, maquinaria

biosintética, numerosas vesículas, un aparato de Golgi activo y un retículo endoplasmático muy desarrollado (Bogitsh, 1975; Mair y col. 2000; Morris, 1968; Skelly, 2014).



**Figura 6: Ilustración de estructura del gastrodermis de *S. mansoni*.** Se representan las invaginaciones basales (B), lamina basal (BL), caveolas micropinocíticas (C), retículo endoplasmático (ER), capa fibrosa (F), aparato de Golgi (G), lamela intestinal (GL), hemoglobina (H), complejo de unión (JC), gota como cuerpo lipídico (L), mitocondria (M), músculo (MU), núcleo (N) y cuerpos secretores (S) (Morris y col. 1968).

En ocasiones, al observarse cortes del tracto digestivo pueden distinguirse la presencia de un pigmento refractil de color marronado y restos celulares en el lumen, presentándose con mayor frecuencia en las hembras que en los machos (Kastner y col., 1975).

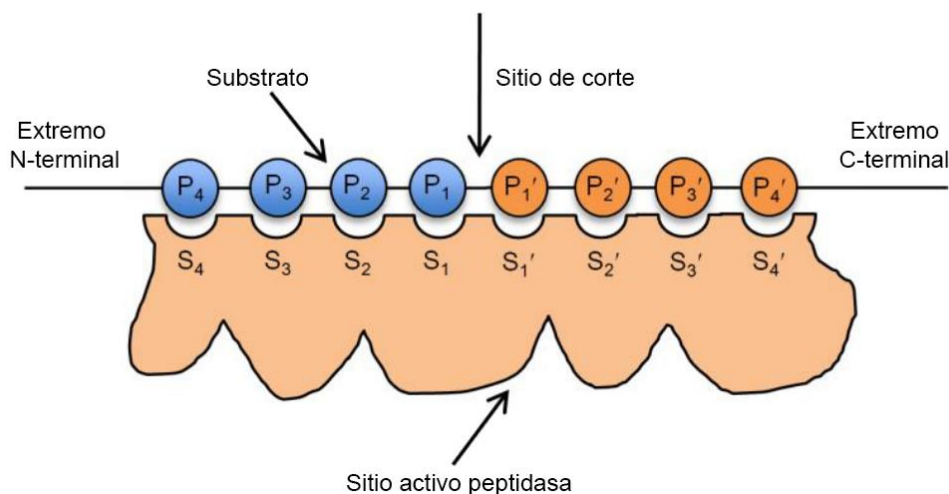
### [2.3.4. Enzimas peptidasas](#)

#### [2.3.4.1. Generalidades](#)

Las peptidasas o proteasas, son un conjunto de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos. Se encuentran ampliamente distribuidas en la

naturaleza y su presencia ubicua en las células es reflejo de su rol fundamental en las funciones biológicas de los organismos (Yang y col., 2015).

Su especificidad por los distintos sustratos varía según el conjunto de aminoácidos que rodean el enlace y su disposición, lo que vuelve difícil su clasificación empleando este criterio. La nomenclatura propuesta en estos casos considera que el sitio activo se encuentra dividido en subsitios y que cada residuo aminoacídico ocupa uno de estos subsitios. Se designan a los residuos entre el sitio de corte como P1 para el extremo N-terminal y P1' para el C-terminal. Desde esta posición la numeración de los residuos aumenta a medida que se aleja del sitio de corte, nombrando P2, P3, P4, etc. hacia el extremo N-terminal y P2', P3', P4', etc. hacia el extremo C-terminal. Los correspondientes subsitios se denominan S1, S2, S3, etc. y S1', S2', S3', etc. siguiendo el mismo criterio (Schechter y Berger, 1967; Barrett y col., 2013) (Fig. 7).



**Figura 7: Nomenclatura propuesta por Schechter y Berger para las peptidasas y sustratos específicos.** Considera la presencia de subsitios en el sitio activo de la enzima que son ocupados por los residuos del sustrato. El sitio de corte se encuentra entre P1 y P1', desde aquí la numeración de los sitios aumenta hacia los extremos N-terminal como P2, P3, P4, etc. Y hacia el extremo C-terminal como P2', P3', P4', etc. (Modificado de Song y col., 2011).

Otras nomenclaturas consideran la actividad catalítica (exopeptidasas y endopeptidasas) o la presencia de ciertos grupos químicos en su sitio activo. Las enzimas con actividad endopeptidasa son aquellas que cortan enlaces en el interior de la cadena peptídica, mientras que las exopeptidasas cortan los enlaces ubicados en los extremos. Las exopeptidasas se dividen a su vez en aminopeptidasas, para las que cortan desde el extremo N-terminal, y carboxipeptidasas, para las que lo hacen en el extremo C-terminal (Basika Cabrera, 2012; Barret y col., 2013).

También pueden caracterizarse por los aminoácidos en su sitio activo, como es el caso de las peptidasas del tipo serina, de cisteína, de treonina, de ácido glutámico y ácido aspártico, cuyos residuos tienen actividad catalítica (Basika Cabrera, 2012; Barret y col., 2013). También pueden presentar iones metálicos divalentes en su sitio activo, como ocurre en el caso de las metalopeptidasas (Cerdà-Costa y Xavier Gomis-Rüth, 2014).

En la actualidad es más frecuente la clasificación por clanes, para aquellas enzimas con ancestros comunes; y por familias, para aquellas que presentan homología en la secuencia aminoacídica de su sitio activo (Rawling y Barret, 1993; Barrett y col., 2013).

#### [2.3.4.2. Peptidasas en helmintos parásitos](#)

Las peptidasas son uno de los grupos enzimáticos más relevantes producidos por los parásitos que actúan como mediadores moleculares en la interfase con el huésped. La naturaleza de estas enzimas es variada (Silva y col., 2011) y se encuentran presentes a lo largo del ciclo de vida de los helmintos (Doenhoff y col., 1990; Parker-Manuel y col., 2011; Dvorak y col., 2016; Wang y col., 2016).

Estas juegan un papel activo en el proceso de invasión del parásito (Fernandez-Delgado y col., 2017; Fishelson y col. 1992), obtención de nutrientes (Delcroix y col., 2006) y evasión de la respuesta inmune del hospedero (Aslam y col., 2008; Hewitson, 2009).

Por este motivo, han sido objetivo farmacológico y blanco prometedores para el desarrollo de vacunas contra las parasitosis (Silva y col., 2011; Wang y col., 2016).

#### [2.3.4.2.1. Peptidasas involucradas en el proceso de nutrición de \*S. mansoni\*](#)

Las peptidasas secretadas y otras presentes en el gastrodermis son esenciales para los parásitos hematófagos ya que son las responsables de la proteólisis ilimitada de proteínas mediante la acción de endo y exopeptidasas, pertenecientes a los grupos de peptidasas asparticas, de cisteína y metalopeptidasas (Caffrey y col., 2004; Basika Cabrera, 2012).

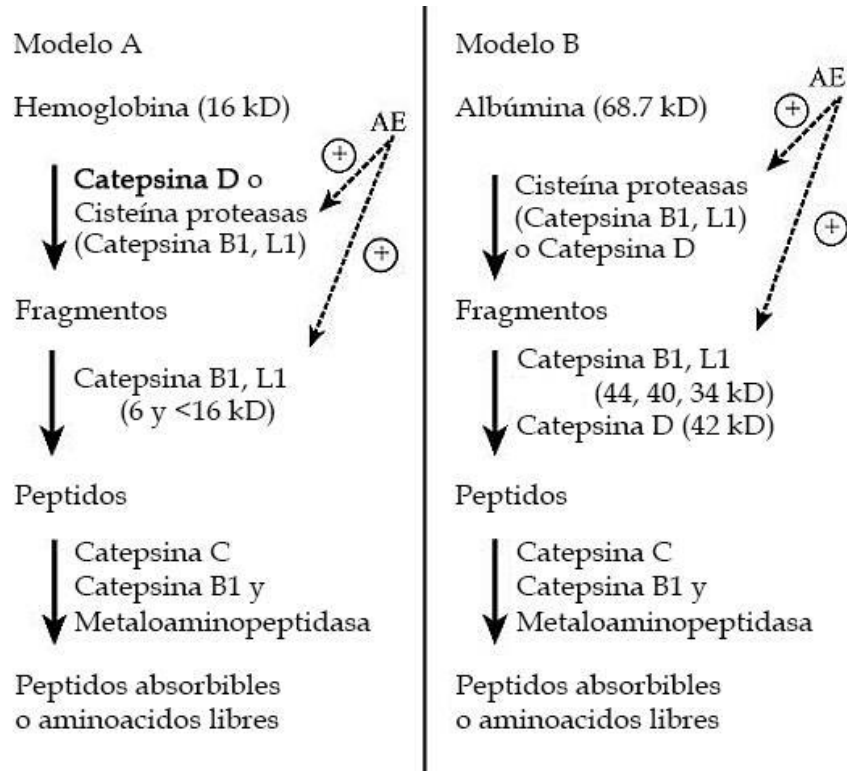
Existen varias teorías de cómo el parásito de *S. mansoni* incorpora nutrientes, que difieren según la etapa del ciclo. Se ha propuesto que las etapas tempranas como schistosómula y pre-adulto ingieren moléculas por variaciones de presión osmótica, mientras que la forma adulta lo hace por succión empleando los músculos de la ventosa oral y el esófago (Bennett y Caulfield, 1991; Holtfreter y col., 2010).

En adultos la digestión comienza con la secreción de enzimas que lisan los eritrocitos en el esófago y los restos son trasladados por movimientos peristálticos hacia el intestino, donde los productos resultantes son absorbidos (Li y col., 2013; Morris y col., 1968; Skelly y col., 2014). Estudios enfocados en el procesamiento de proteínas de la sangre, principal fuente de nutrientes para

*S. mansoni*, revelaron la presencia de peptidasas de distintos tipos en la gastrodermis de los gusanos (Bogitsh y col, 2001; Becker y col., 1995; Delcroix y col, 2006; Morales y col., 2008).

Delcroix y col. (2006) describen dos posibles rutas de degradación de hemoglobina y albúmina sérica, en las que participan de forma concertada la catepsina D, catepsina B1, catepsina L1, una cisteina peptidasa, una asparginil endopeptidasa (legumain) y una leucina aminopeptidasa (*SmLAP1*) (Maggioli y col., 2018; Rinaldi y col., 2009) (Fig. 8). En particular, la catepsina B1 o *SmCB1* es la más abundante en gastrodermis de entre todas las cisteina peptidasas mencionadas (Sajid y col., 2003). Estas enzimas se han encontrado también en otros parásitos platelmintos (Goupil y col., 2016) y se encuentran conservadas en otros organismos filogenicamente distintos como *Plasmodium falciparum* (Semenov y col., 1998), en nematodos como *Ancylostoma caninum* y *Necator americanus* (Williamson y col., 2004) y en artrópodos como *Ixodes ricinus*, entre otros (Sojka y col., 2007 y 2008).





**Figura 8: Dos rutas proteolíticas paralelas para la degradación de proteínas del huésped por el parásito *S. mansoni*.** AE corresponde a la asparaginil endopeptidasa. (Modificado de Delcroix y col., 2006).

En muchos casos se determinó la importancia y efectos en el metabolismo de estas enzimas mediante el uso de inhibidores. Wasilewski y col. (1996) trabajaron con adultos y esquistosomas de *S. mansoni* y determinaron que la inhibición de la *SmCB1* lograba interrumpir la digestión de hemoglobina en esquistosomas. Como consecuencia se vio una disminución en el número de esquistosomas y en los gusanos maduros que morían por inanición.

El experimento de Wasilewski y col. es un ejemplo del potencial de las peptidasas como posibles blancos para futuras estrategias de control. Además, los resultados muestran que una misma peptidasa puede encontrarse en distintas etapas del desarrollo del parásito, cumpliendo roles vitales para su supervivencia. De emplearse estas enzimas como blanco, podrían controlarse el

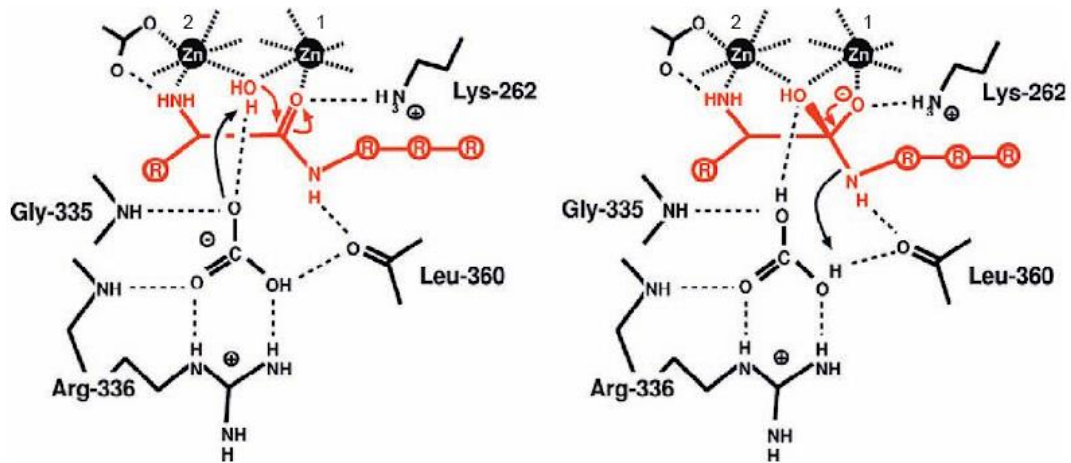
estadio juvenil del parásito, lo que es una mejora respecto al praziquantel y su acción limitada a los gusanos adultos (Xiao y col., 1985 y 2009).

#### 2.3.4.2.2. Leucina Aminopeptidasas en *S. mansoni*

Las leucinas aminopeptidasas (LAPs) son metalopeptidasas de zinc que hidrolizan los residuos de leucina de los extremos N-terminales de péptidos y proteínas. Se encuentran involucradas en el procesamiento de péptidos bioactivos (Fowler y col., 2009; Cappiello y col., 2004; Tsujimoto y col., 1992), en la presentación antigénica de MHC I, aunque no es esencial en este rol (Beninga, Rock y Goldberg, 1998; Towne y col., 2005); y en el tráfico de vesículas hacia la membrana (Keller, 2004), entre otras funciones.

Pertencientes a las familias de peptidasas M1 o M17, estas enzimas son dependientes de cofactores metálicos que cumplen con los roles de procesamiento, maduración, activación o degradación del sustrato. La presencia de agentes quelantes (como EDTA) inhibe su acción, pero también hay otros inhibidores muy eficientes como la bestatina o la amastatina (Matsui y col., 2006; Sträter y Lipscomb, 2013).

Las aminopeptidasas de M17 difieren de la familia M1 en varios aspectos estructurales. Las LAPs de M17 presentan una estructura hexamérica, formados por protómeros bilobulares con actividad catalítica en sus extremos C-terminal y N-terminal. Su sitio activo se encuentra orientado hacia el interior del dominio hexamérico. Cada subunidad tiene dos sitios no equivalentes de unión para metales, Zn1 y Zn2 (Matsui y col., 2006; Sträter y Lipscomb, 2013).



**Figura 9: Mecanismo de acción de LAP.** Sträter y Lipscomb (1995) propusieron que el extremo N-terminal reacciona con el Zn2 mientras que el extremo C-terminal reacciona con el Zn1. La molécula de agua que se encuentra enlazada a los iones Zn es un excelente sitio para ataques nucleofílicos del enlace peptídico. El ion bicarbonato asociado a Arg336 desprotona el nucleófilo formado y transfiere un protón al grupo saliente. El intermediario diol geminal formado es estabilizado por los iones Zn y por Lys262 (Modificado de Sträter y Lipscomb, 2013).

Aunque las LAPs tienen preferencia por aquellos compuestos con residuos de leucina en su extremo N-terminal, su actividad no se encuentra limitada exclusivamente a este tipo de sustratos. En general, la enzima es capaz de hidrolizar todo sustrato que presente un L-aminoácido en su extremo N-terminal, siempre y cuando este extremo no se encuentre bloqueado (Xu y col., 1990; Sträter y Lipscomb, 2013) (Fig. 9).

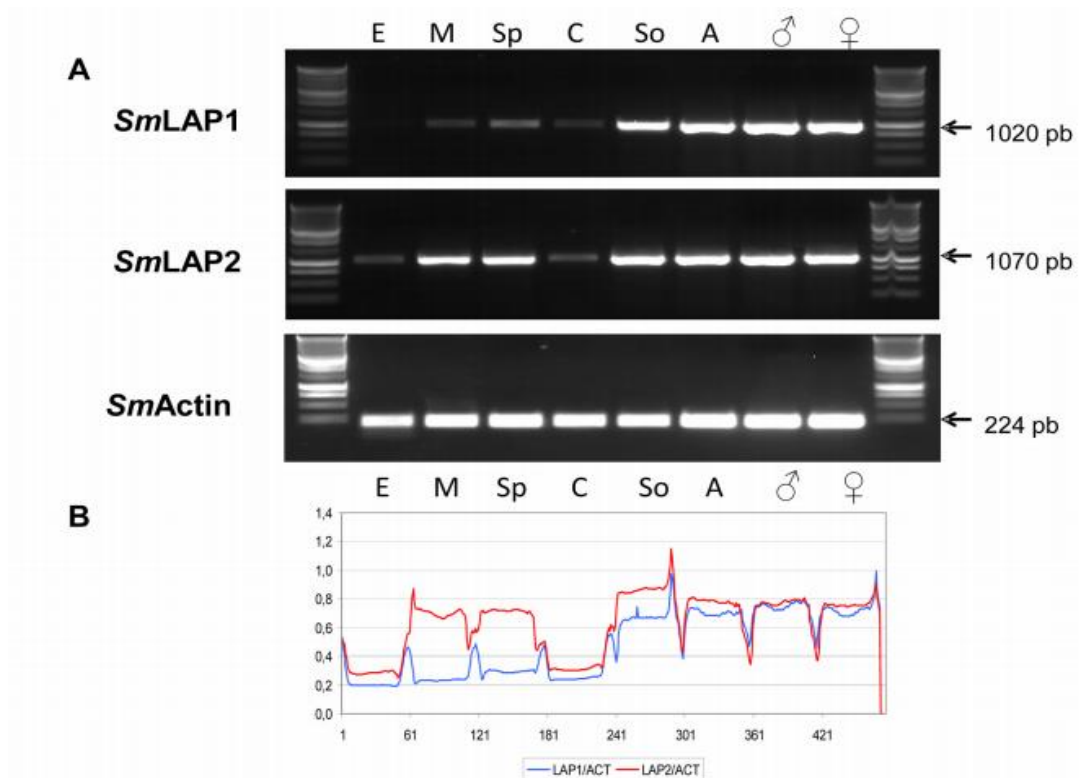
Las LAPs están presentes a lo largo del ciclo vital de *S. mansoni*, variando sus niveles de expresión a nivel de ARN mensajero según el estadio de desarrollo (Rinaldi y col., 2009).

Entre las que corresponden a leucinas aminopeptidasas se encontraron dos enzimas altamente conservadas en *S. mansoni*: SmLAP1 (Smp\_030000) y SmLAP2 (Smp\_083870), siendo estos los nombres que usamos para referirnos a las mismas. Estas dos enzimas fueron clonadas, expresadas en *E. coli* y

caracterizadas. Ambas pertenecen al clan MF y a la familia M17, y además comparten propiedades biológicas, perfil de inhibición y pH óptimo. La SmLAP1 recombinante es una enzima de 523 aminoácidos, un peso molecular de 56.7 kDa y presenta un punto isoeléctrico de 7.58. Por su parte, la SmLAP2 recombinante es una proteína de 544 aminoácidos con un peso molecular de 59.7 kDa y un punto isoeléctrico de 6.30 (Maggioli y col., 2018).

Los estadios en los que se detectaron mayor presencia de estas *SmLAPs* fueron en huevos y la forma de miracidio (Xu y Dresden, 1986), encontrándose estrechamente relacionadas con el proceso de eclosión. La disminución de expresión de sus genes por knockdown conduce a la inhibición de la eclosión de los huevos en más del 80% de los casos (Rinaldi y col., 2009). En adultos de *S. mansoni* y *S. japonicum* la enzima SmLAP1 fue localizada principalmente en intestino, tegumento y huevos, vinculándola con los procesos de nutrición, así como el de evasión de la respuesta inmune del hospedero (McCarthy y col., 2004).

SmLAP1 y SmLAP2 presentan patrones de expresión de ARNm diferentes, aunque son similares en las etapas de gusano adulto y schistosómula, la expresión de SmLAP2 es mayor en esporocisto y miracidios (Rinaldi y col., 2009). Por otro lado, el estadio de cercaria y huevo son los que presentaron menor expresión a nivel de ARNm para estas *SmLAPs*, posiblemente porque la síntesis de las mismas se da durante las etapas previas a estos estadios (Parker-Manuel y col., 2011) (Fig. 10).



**Figura 10: Expresión de LAPs en los distintos estadios de desarrollo en *S. mansoni*.** (A) cADN de huevo (E), miracidia (M), esporocistos (Sp), cercaria (C), esquistosomula (So), mezcla de adultos de ambos sexos (A), machos (♂) y hembras (♀) se usaron como moldes para PCR usando primers específicos de los genes de *SmLAP1*, *SmLAP2* y para actina de *S. mansoni*. (B) Medidas densitométricas (unidades arbitrarias) a lo largo de las distintas bandas y los niveles relativos de *SmLAP1* (azul) y *SmLAP2* (rojo) comparado con los niveles de actina en el panel A. (Rinaldi y col., 2009)

En el presente trabajo se describe la inmunolocalización de dos leucinas aminopeptidasas (*SmLAP1* y *SmLAP2*) en tejidos de esporocistos y parásito adulto de *S. mansoni*. El estudio y la caracterización de estas dos metalopeptidasas de *S. mansoni* nos permite profundizar nuestro conocimiento sobre la biología del parásito y así continuar avanzando en el desarrollo de nuevas estrategias de control para la schistosomiasis.

### **3. Objetivos**

1- Inmunolocalización de *SmLAP1* y *SmLAP2* en cortes histológicos de parásitos adultos de *S mansoni*.

2- Inmunolocalización de *SmLAP1* y *SmLAP2* en estadios intracaracol de *S. mansoni* utilizando cortes histológicos de caracoles infectados.

### **4. Materiales y Métodos**

#### **4.1. Recolección de adultos de *S. mansoni***

Los parásitos adultos fueron cedidos por el Dr Gabriel Rinaldi (Department of Microbiology, Immunology & Tropical Medicine, George Washington University dirigido por el Dr Paul Brindley). Para la obtención de los parásitos adultos se siguió con el protocolo descrito por Mann y col. (2010). Se recolectaron los gusanos de ratones infectados mediante perfusión portal y se fijaron en paraformaldehído 4% en 1X PBS, durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se lavaron exhaustivamente con 1X PBS y se almacenaron en 70 % EtOH a temperatura ambiente.

#### **4.2. Infección de caracoles con miracidios de *S. mansoni***

Para llevar a cabo el estudio de inmunolocalización en esporocistos de *S. mansoni* se utilizaron caracoles infectados con dicho parásito. Estos caracoles infectados fueron cedidos por el Dr Rafael Pimenta (Centro de Pesquisas René Rachou - A Fiocruz em Minas Gerais- Brasil). Brevemente, se infectaron caracoles del género *B. glabrata*, (recolectados en Barreiro de Cima, Belo Horizonte, Brasil), de entre 8 a 10 mm de tamaño, empleando entre 10 y 12

miracidios. La infección se realizó colocando tres tubos con tres caracoles cada uno siguiendo el siguiente esquema de infección:

Caracol 1.....	Control, sin infectar
Caracol 2.....	Infectados durante 3 semanas y 5 días
Caracol 3.....	Infectados durante 4 semanas y 2 días

Una vez transcurridos los tiempos de infección mencionados, los caracoles se fijaron en paraformaldehído 4%. Luego se lavaron en 1X PBS y fueron almacenados en 70% EtOH.

#### 4.3. Preparación de bloques de parafina

Parásitos adultos de *S. mansoni* y los caracoles infectados de *B. glabrata*, previamente fijados en paraformaldehído y conservados en 70% EtOH se prepararon para su inclusión en parafina.

Las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de EtOH y posteriormente se incubaron en xilol. Luego se pasaron por dos baños de parafina antes de armar el bloque siguiendo el siguiente protocolo:

EtOH 80%.....	Se deja toda la noche
EtOH 85%.....	3 h
EtOH 90%.....	1 h 30 min
EtOH 95%.....	30 min
EtOH 100%.....	30 min
Xilol I.....	10 min
Xilol II.....	10 min
Xilol III.....	10 min
Parafina I (estufa 60°C).....	10 min
Parafina II (estufa 60°C).....	10 min
Parafina III.....	Preparación del bloque

Luego se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor, empleando un micrótopo manual (Jamato KOHKI).

Los cortes se extendieron empleando un baño de agua a 60°C y se trasladaron a portaobjetos silanizados (Citoglas).

#### **4.4. Desparafinación y rehidratación de cortes histológicos**

La desparafinación se llevó a cabo incubando los cortes en xilol y luego se rehidrataron con concentraciones decrecientes de EtOH. Los tiempos de incubación fueron:

Xilol I.....	12 min
Xilol II.....	12 min
EtOH 100% I.....	10 min
EtOH 100% II.....	10 min
EtOH 95%.....	10 min
EtOH 90%.....	10 min
EtOH 80%.....	10 min
EtOH 70%.....	10 min

#### **4.5. Purificación de IgG totales de conejo**

Los sueros específicos contra *SmLAP1* y *SmLAP2* fueron producidos en nuestro laboratorio (Maggioli y col., 2018).

Para llevar a cabo las inmunolocalizaciones se purificaron las IgG totales presentes en los distintos sueros de conejo por cromatografía de afinidad. Para esto se utilizó una columna de proteína A-Sefarosa (BioRad) que tiene afinidad por la inmunoglobulina G de conejo.

En primer lugar, la columna fue equilibrada con 5 ml de tampón de pegado (BP) 0.1 M Tris-HCl pH 8, conteniendo 0.02% NaN<sub>3</sub>. Luego se aplicó cada suero (suero pre-inmune, suero anti-*SmLAP1* y suero anti-*SmLAP2*), equilibrado en el BP por separado. La elución de las IgG totales se realizó con tampón de elución



(BE), 0.1 M Glicina pH 3; conteniendo 0.02% NaN<sub>3</sub>. Se recolectaron fracciones de 1 mL en microtubos de 1.5 mL conteniendo 250 µL de 1 M Tris-HCl pH 8.

Una vez obtenidas las fracciones se procedió a lavar la columna con BP y se guardó en 1X PBS pH 7 conteniendo 0.02% NaN<sub>3</sub>.

#### **4.6. Análisis por SDS-PAGE**

El análisis de la purificación de IgG totales presentes en el suero pre-inmune, anti-SmLAP1 y anti-SmLAP2 se llevó a cabo realizando geles de poliacrilamida de 10% conteniendo dodecilsulfato de sodio, (SDS-PAGE), siguiendo el protocolo de Laemmil (1970). Las muestras se incubaron en condiciones reductoras durante 5 min a 100 °C en un tampón de disociación, conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 1.6 % SDS, 7 % glicerol, 0.5 % 2-mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol. A continuación, se realizó la separación durante aproximadamente 1 h a voltaje máximo y amperaje constante a 25 mA en una cuba para electroforesis ATTO, Japón.

Las proteínas se tiñeron con Coomassie Brillante Blue CBB R-250 al 0.05% en solución de metanol: ácido acético: agua en las proporciones 473: 57: 520. La decoloración del gel se llevó a cabo en una solución decolorante de metanol: ácido acético: agua en proporciones 473: 57: 520.

El marcador de peso molecular para proteínas utilizado fue Maestrogen AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder.

#### **4.7. Cortes histológicos de gusanos adultos de *S. mansoni***

Se llevó a cabo la desparafinación y rehidratación de los cortes histológicos siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.4. seguido por tres lavados con agua corriente. Después de los lavados los cortes se incubaron con hematoxilina

por 10 min y se lavaron con agua corriente por 20 min. Luego se incubaron con eosina por 5 min y se lavaron 5 veces con agua corriente. Finalmente, se procedió a deshidratar los cortes con concentraciones ascendentes de EtOH, las mismas que en el proceso de rehidratación (sección 4.4) y fueron colocados en medio de montaje (Entellan® Merck).

#### 4.8. Localización de las SmLAPs en adultos de *S. mansoni* por inmunohistoquímica

Para el procedimiento de inmunolocalización de las SmLAPs se llevó a cabo la desparafinación y rehidratación de los cortes histológicos como se describe en la sección 4.4. Posteriormente, se realizó la inactivación de enzimas peroxidasa endógenas de los tejidos con un tratamiento con Metanol absoluto-5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 45 min. Luego se hicieron dos lavados con 1X PBS conteniendo 0.05% Tween 20 (PBST) durante 5 min cada uno y se procedió con el tratamiento de recuperación antigénica con 10 mM Tampón citrato pH 6 durante 20 min a 95°C. Al final de esta etapa se realizaron 3 lavados con PBST.

Para eliminar las uniones inespecíficas al tejido, los cortes se incubaron en PBST conteniendo 10% suero de cabra (solución bloqueo) por 30 min. Se realizaron 3 lavados con PBST. Luego se incubaron los tejidos con las distintas inmunoglobulinas IgG purificadas (pre-inmune, anti-SmLAP1 y anti-SmLAP2) a una dilución de 1/20 en PBST conteniendo 5% suero de cabra, durante toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente se realizaron 4 lavados con PBST y se procedió a incubar los cortes con los anticuerpos producidos en cabra anti-IgG total de conejo conjugados a HRP (SIGMA-Aldrich: A6154) durante 1 h a temperatura ambiente.

Se usó una dilución de 1/3000 en PBST-5% suero de cabra. Al finalizar se realizaron 4 lavados con PBST y se revelaron las muestras usando una solución de 50 mM Tampón Tris-HCl pH 7.6 conteniendo 10  $\mu$ L de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 6 mg DAB. El revelado se hizo en cámara húmeda por 2 min y protegido de la luz.

Posteriormente se realizaron 2 lavados, el primero con agua destilada para interrumpir la reacción con DAB y luego con PBST. La contra tinción se realizó en hematoxilina por 20 min y luego se lavó con agua durante 20 min.

Finalmente, el montaje de las muestras se realizó con una deshidratación con concentraciones ascendentes de EtOH, las mismas que en el proceso de rehidratación (sección 4.4), 3 min cada vez. Luego se lo dejó en Xilol I por unos segundos y en Xilol II hasta su montaje con resina (Entellan<sup>®</sup> Merck). Los cortes se observaron empelando un microscopio Nikon Eclipse 80i, cámaras Nikon DS-Ri1 y software NIS-Elements Viewer.

#### [4.9. Localización de las SmLAPs en \*S. mansoni\* adultos por inmunofluorescencia](#)

Para realizar los estudios de localización de las SmLAPs por inmunofluorescencia, se llevó a cabo la desparafinación y rehidratación de los cortes histológicos como se describe en la sección 4.4. Luego se realizó una recuperación antigénica con 10 mM Tampón citrato pH 6 por 20 minutos a 95°C. Se lavó con PBST por 5 min y se hizo una permeabilización con 0.1% Tritón x100 en 1X PBS por 20 min.

Se hicieron 3 lavados con PBST de 5 min cada uno y las uniones inespecíficas se bloquearon con una solución de PBST-10% de suero de cabra por 30 minutos.

Luego se lavó con PBST 3 veces más. Luego las muestras se incubaron con las IgG purificadas de cada suero específico (pre-inmune, anti-*SmLAP1* y anti-*SmLAP2*). Las diluciones de suero utilizadas fueron 1/20 y 1/50 en PBST-5% suero de cabra. Se incubaron toda la noche a temperatura ambiente y luego se lavaron 4 veces con PBST antes de incubarlos con los anticuerpos anti-IgG total de conejo conjugados a FITC (KPL, Gaithersburg, MD; # 02-15-06) en una dilución de 1/100 en PBST-5% suero de cabra. Se incubó por 1 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda y protegido de la luz.

Se lavaron las muestras 4 veces con PBST y se procedió a montarlas en PBS-60% glicerina.

Los cortes se observaron empelando un microscopio Nikon Eclipse 80i, cámaras Nikon DS-Ri1 y software NIS-Elements Viewer.

#### **4.10. Cortes histológicos de caracol de *B. glabrata***

Estos cortes fueron tratados siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección 4.7.

#### 4.11. Localización de las SmLAP en estadios intracaracol por inmunohistoquímica

Para el estudio de los esporocistos y los embriones de cercaria se empleó el mismo método descrito en la sección 4.8, repitiendo las mismas condiciones y empelando concentraciones de suero de 1/20 y de conjugando de 1/3000.

#### 4.12. Localización de las SmLAP en estadios intracaracol por inmunofluorescencia

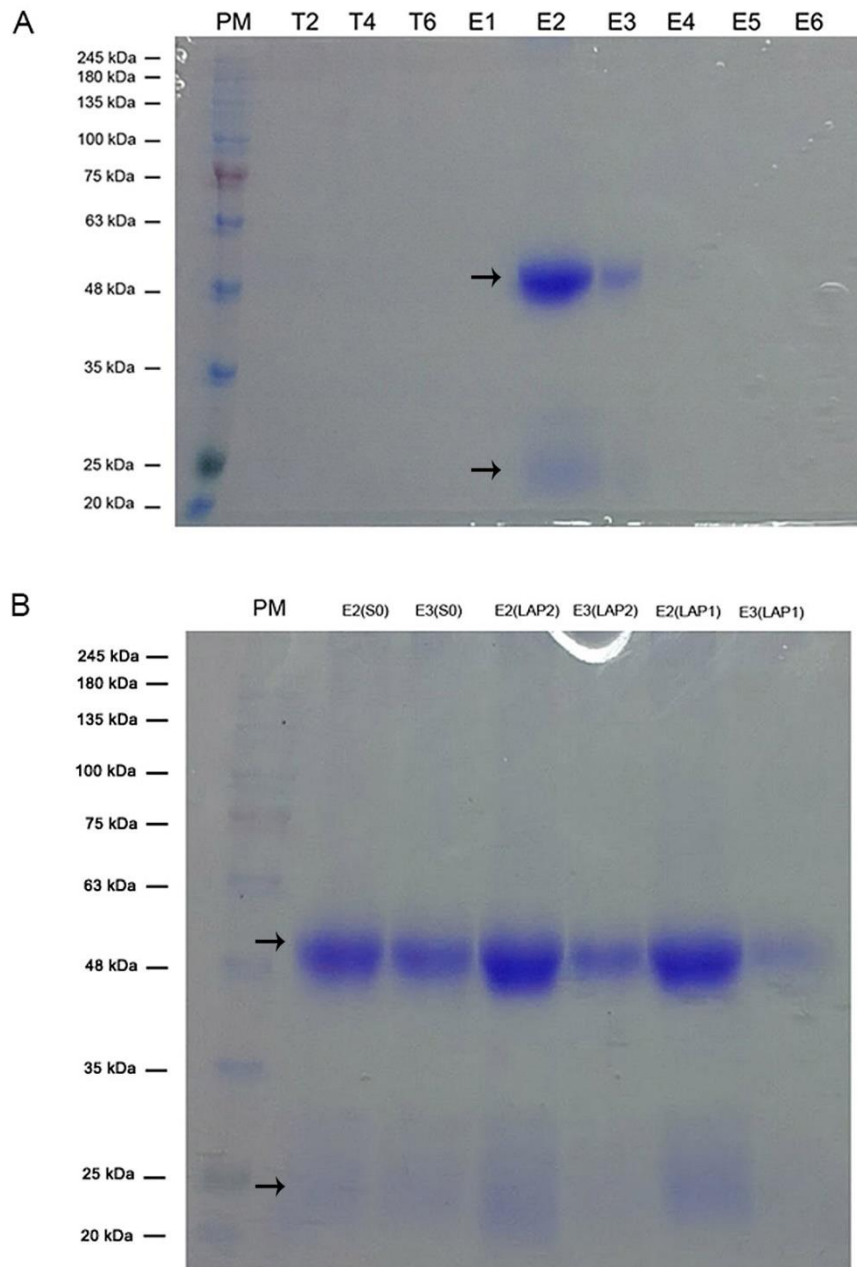
Del mismo modo que con los estudios inmunohistoquímicos, se empleó el mismo protocolo utilizado en gusanos adultos, descrito en la sección 4.9, repitiendo las mismas condiciones y empelando concentraciones de suero de 1/20 y de conjugando de 1/100.

## 5. Resultados

### 5.1. Purificación de IgG totales de conejo

Para realizar los estudios de localización mediante la técnica de histología, decidimos trabajar con muestras de IgG total de conejo purificadas. El suero sanguíneo es una muestra heterogénea que contienen una gran variedad de biomoléculas, por lo que se trató de disminuir al máximo las interacciones inespecíficas. La IgG total se purificó mediante la aplicación de cada suero a una matriz de proteína A-sefarosa y tanto los lavados como los eluidos se analizaron por SDS-PAGE. En la Figura 11A se muestra la purificación de IgG a partir de suero pre-inmune. Se puede observar la presencia de bandas proteicas con peso molecular que corresponden con los pesos esperados para las cadenas livianas (25 kDa) y pesadas (50 kDa) de las inmunoglobulinas desnaturalizadas. Se puede asumir entonces que las muestras contienen IgG purificadas.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para purificar la IgG total presentes en los sueros anti-*SmLAP1* y anti-*SmLAP2*. En la Figura 11B se muestran los eluidos de la columna de afinidad obtenidos en cada purificación.



**Figura 11: Análisis de IgG purificadas a partir de suero de conejo mediante 10% SDS-PAGE:** (A) Los carriles T2, T4 y T6 contienen muestras de las fracciones de lavados, material no retenido en la columna. Los carriles E1-E6, fracciones de eluidos, material retenido en la columna. En los carriles E2 y E3 se puede observar las bandas proteicas correspondientes a las cadenas pesadas y livianas de las IgG (Flechas). (B) Se sembraron en orden las muestras de las fracciones eluido 2 y 3 (E2 y E3 respectivamente) de las eluciones de los distintos sueros. Se indican las muestras de suero pre-inmune (S0), anti-*Sm*LAP2 (LAP2) y anti-*Sm*LAP1 (LAP1). Se distinguen las bandas correspondientes a las cadenas pesadas y livianas de las IgG (Flechas). El primer carril presenta el marcador de peso molecular (PM). Las proteínas se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue.

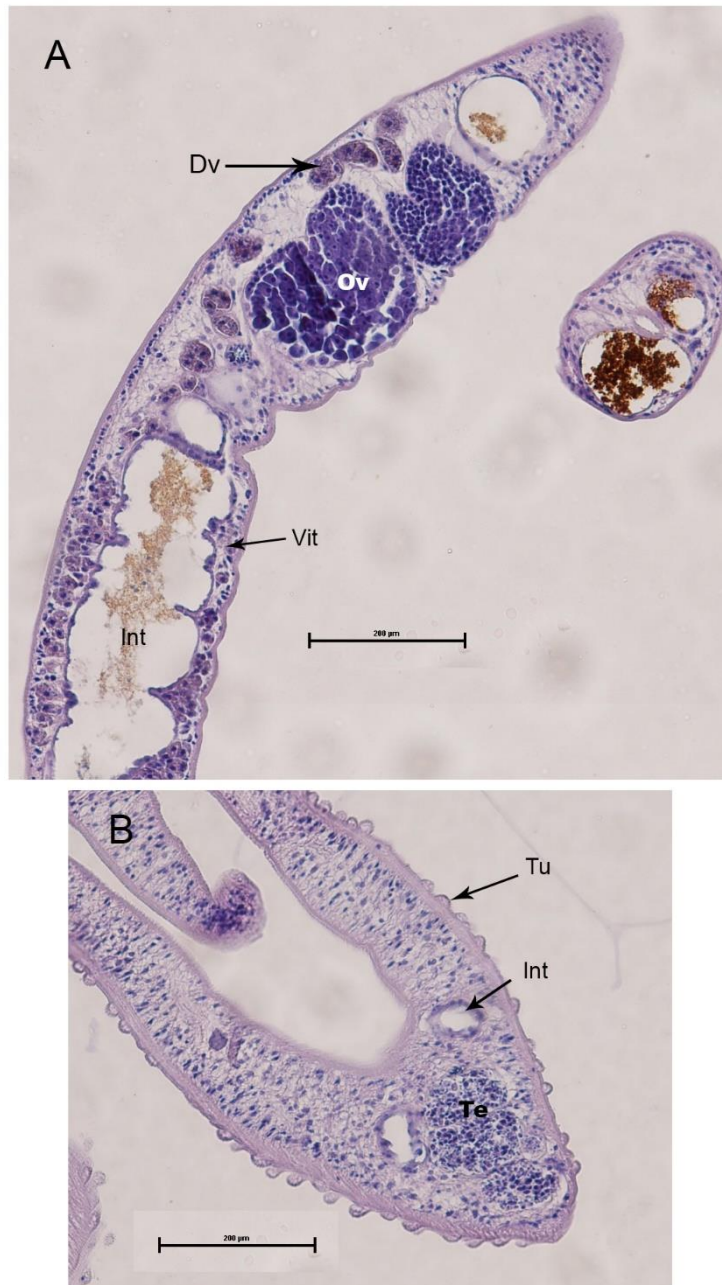
## 5.2. Histología de adultos de *S. mansoni*

Se realizaron cortes de gusanos adultos tanto machos como hembras y se tiñeron con hematoxilina y eosina con el objetivo de observar las estructuras de los órganos sexuales y el sistema digestivo. Se obtuvo un corte longitudinal (Fig. 12A) en el que pueden observarse el aparato reproductivo y parte del sistema digestivo. Puede verse los ovarios con sus ovocitos en estado inmaduro (células pequeñas en el extremo anterior del ovario) y en estado maduro (células de mayor tamaño en el extremo inferior del ovario) (Hahnel y col., 2014). También pueden distinguirse células vitelinas que son transportadas a través del ducto vitelino (Collins y col., 2011).

Por debajo de los órganos reproductivos, se observa parte del intestino que corresponde a la región posterior del aparato digestivo, rodeado de tejido vitelino, y conteniendo material de color marrón en el lumen que puede corresponder a restos celulares, presentándose con mayor frecuencia en las hembras que en los machos (Kastner y col., 1975).

En el corte de parásitos machos (Fig. 12B) puede verse parte de los testículos y alrededor de estos se ve parte del intestino bifurcado. También pueden observarse en su superficie externa tubérculos, estructuras características del tegumento de los machos.

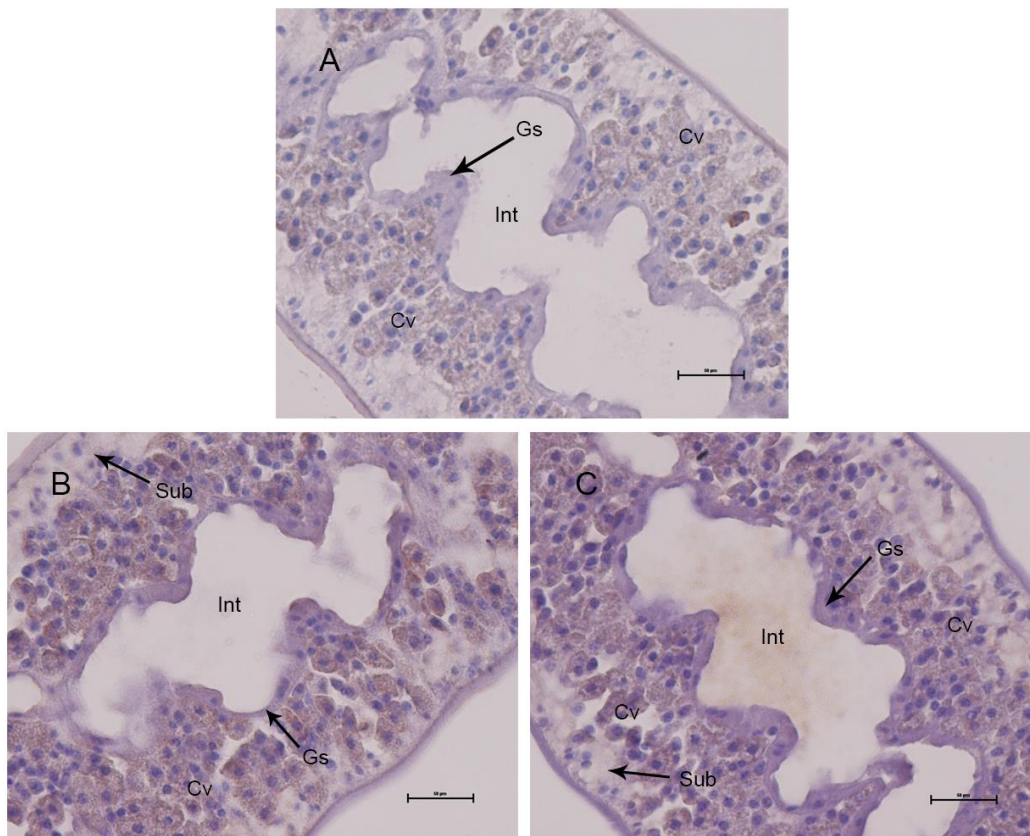




**Figura 12: Corte histológico de adultos de *S. mansoni*.** (A) Parásito adulto hembra y (B) Parásito adulto macho, ambos teñidos con hematoxilina-eosina. (A) Se encuentran señalizados los ovarios (Ov), el ducto vitelino (Dv) con células vitelinas (Vit) en su interior y las que se encuentran a los lados del intestino (Int). (B) En el macho están señalizados el intestino y los testículos (Te). Pueden verse las diferencias mencionadas previamente como la presencia de tubérculos (Tu) en el tegumento del macho y restos celulares en el lumen del intestino de la hembra. Las barras miden 200 µm.

### 5.3. Localización de las SmLAPs en *S mansoni* adultos por inmunohistoquímica

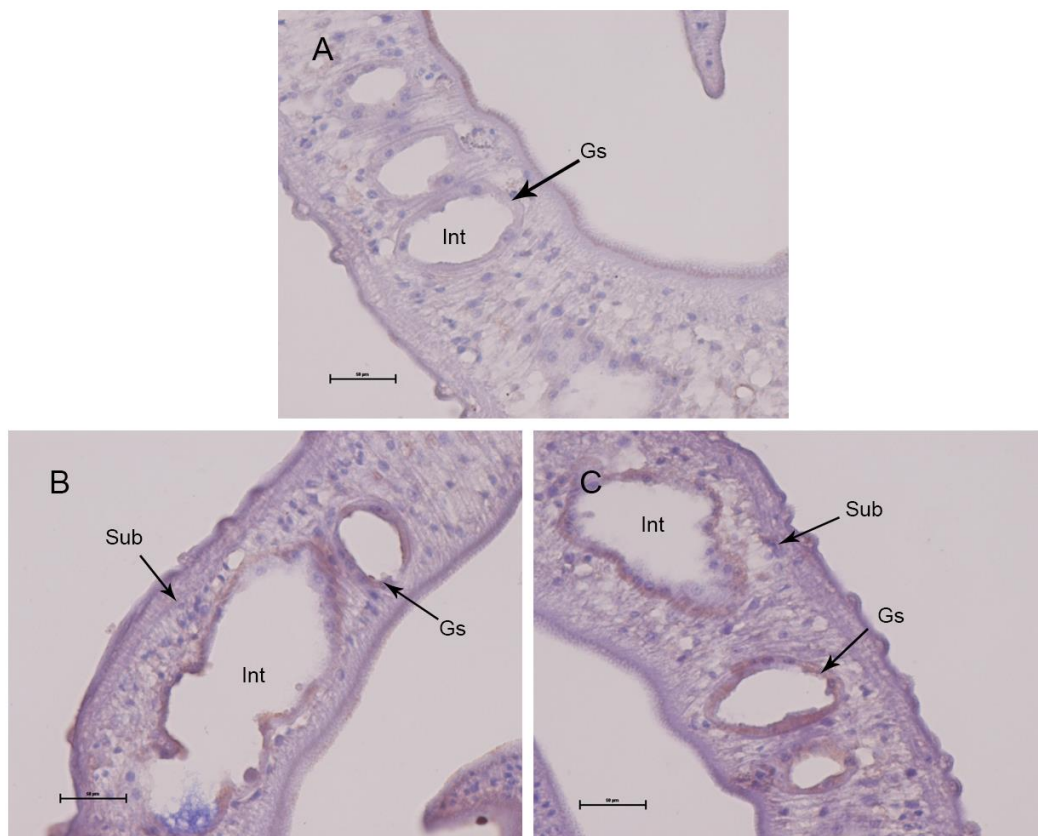
El estudio inmunohistoquímico se empleó con la intención de determinar la presencia y la localización de las enzimas SmLAP1 y SmLAP2 en los gusanos adultos. El estudio reveló reacción positiva para ambas SmLAPs en machos y reacción positiva, muy sutil, en hembras (Fig. 13 y 14).



**Figura 13: Inmunolocalización de las SmLAPs en parásitos adultos hembras.** Imágenes de la sección posterior del gusano en las que pueden distinguirse la reacción en el gastrodermis del intestino (Int), para (A) suero pre-inmune, (B) anti-SmLAP1 y (C) anti-SmLAP2. También se observa reacción en las células vitelinas (Cv) y debajo del tegumento (Sub). Los cortes fueron revelados con DAB, y se empleó hematoxilina como contraindicación. Las barras miden 50  $\mu$ m.

Como fue descrito previamente (McCarthy y col., 2004), se detectó reactividad para SmLAP1 por debajo del tegumento del gusano y en el gastrodermis del

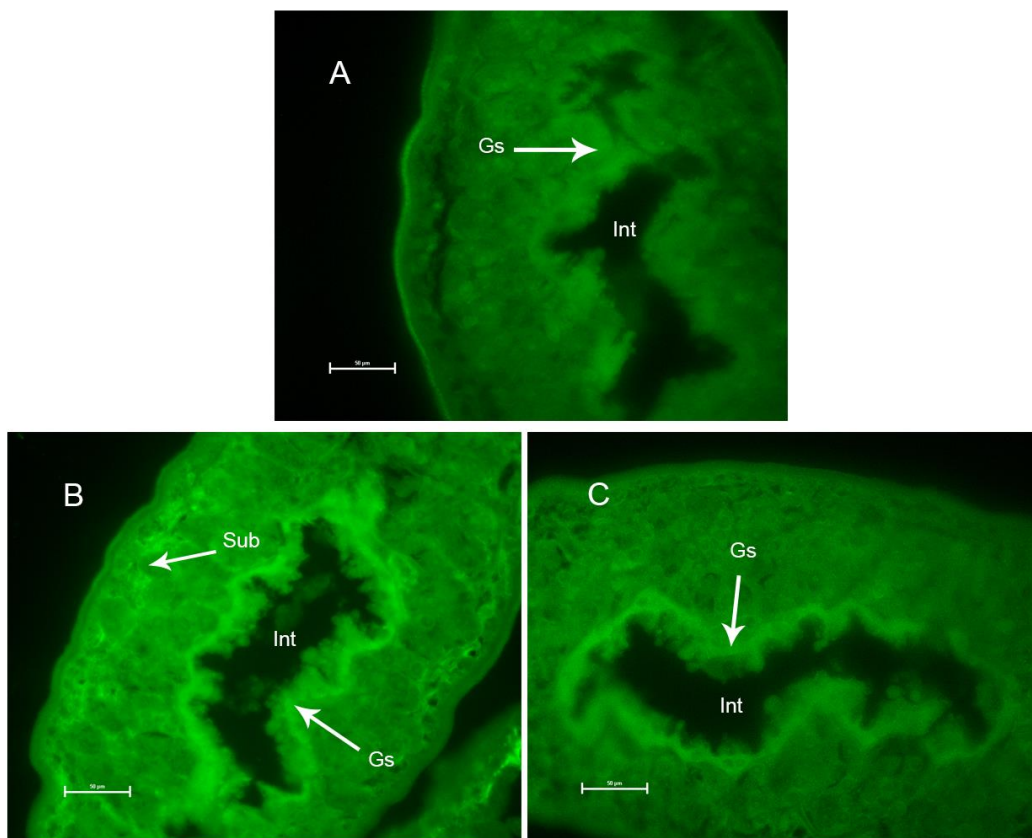
intestino. También pudo detectarse una reacción para *SmLAP2*, aunque la tinción por debajo del tegumento parece más tenue en este caso. En el caso de las hembras además parece haber reacción en las células vitelinas en la parte posterior del cuerpo, pero la señal es muy tenue y en comparación con el control no se distinguen diferencias (Fig. 13B y C). Se cree que estas células pueden estar vinculadas con la formación de la cáscara del huevo y la nutrición del embrión (Jurberg y col. 2009).



**Figura 14: Inmunolocalización de las *SmLAPs* en parásitos adultos machos.** Imágenes de la sección posterior del gusano en las que pueden distinguirse la reacción en el gastrodermis (Gs) del intestino (Int), para (A) suero pre-inmune, (B) anti-*SmLAP1* y (C) anti-*SmLAP2*. Se distingue una reacción subtegumental tenue (Sub). Los cortes fueron revelados con DAB y se empleó hematoxilina como contratinción. Las barras miden 50 µm.

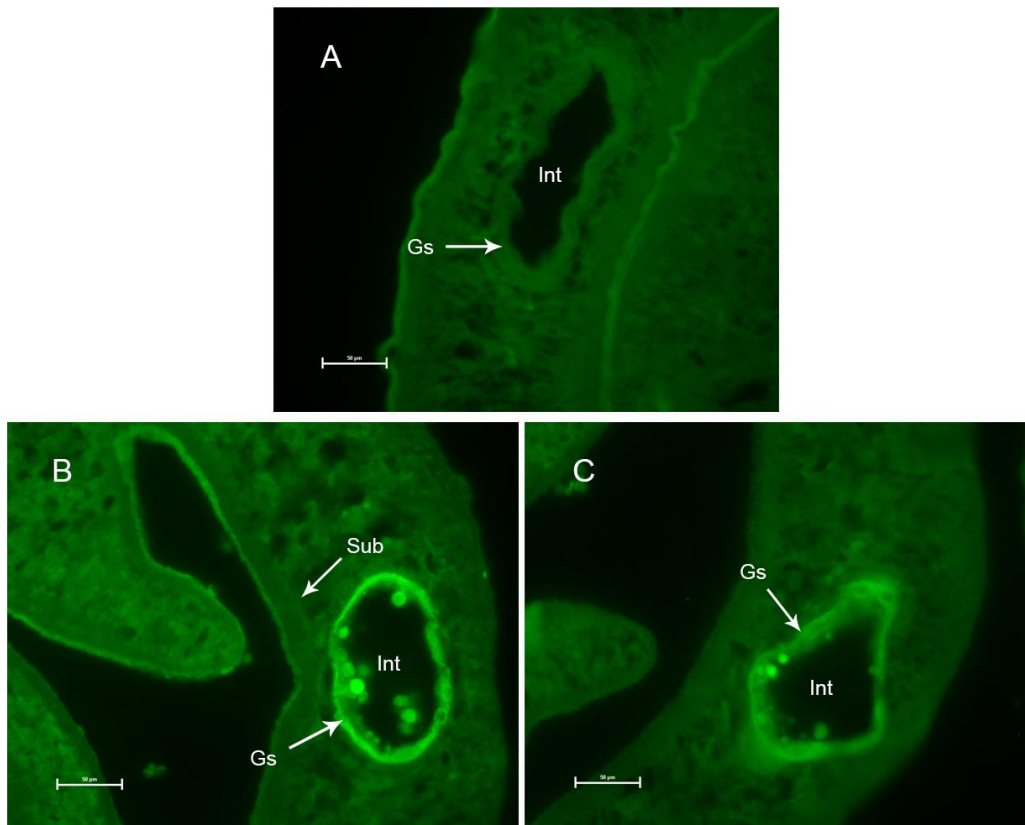
#### 5.4. Localización de las SmLAPs en *S mansoni* adultos por inmunofluorescencia

El estudio por inmunofluorescencia se empleó como método secundario para verificar los resultados obtenidos por el método inmunohistoquímico. En conformidad con los resultados de la sección 5.3, los cortes tratados por inmunofluorescencia mostraron reacción positiva para *SmLAP1* y *SmLAP2*, encontrando reacción por debajo del tegumento y en el gastrodermis para *SmLAP1* y en el gastrodermis para *SmLAP2* (Fig. 15 y 16).



**Figura 15: Inmunolocalización de las SmLAPs en parásitos adultos hembras.** Imágenes de la sección posterior del gusano en las que pueden distinguirse la reacción en el gastrodermis del intestino (Int), para (A) suero pre-inmune, (B) anti-*SmLAP1* y (C) anti-*SmLAP2*. Adicionalmente puede verse reacción debajo del tegumento (Sub) para *SmLAP1*. Para el marcado se empleó anti-IgG total de conejo conjugados a FITC. Las barras miden 50 µm.

También se detectó reacción para ambas *SmLAPs* en las células vitelinas de las hembras (Fig. 15B y C). Esto puede distinguirse con mayor claridad en el estudio inmunohistoquímico, ya que las células vitelinas presentan autofluorescencia (datos no mostrados) (Collins y col, 2011; Galanti y col., 2012)

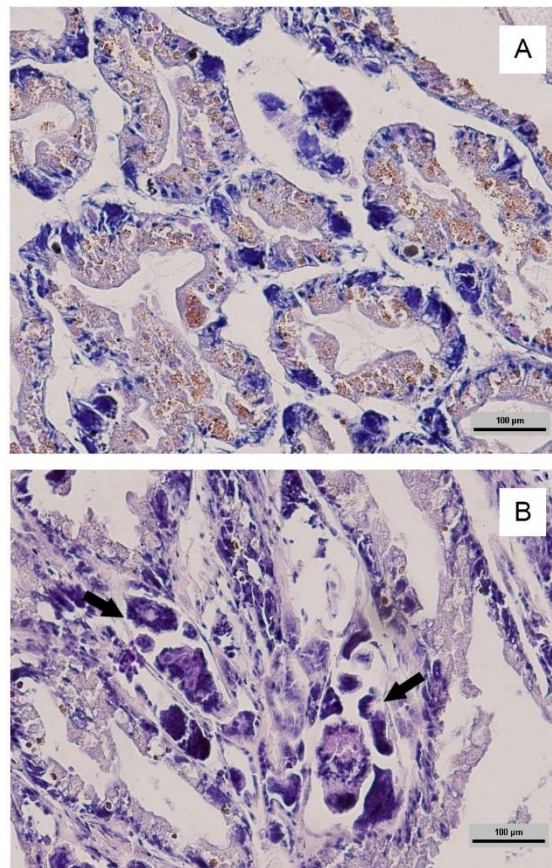


**Figura 16: Reacción de inmunofluorescencia en macho.** Imágenes de la sección posterior del gusano en las que pueden distinguirse la reacción en el gastrodermis del intestino (Int), para (A) suero pre-inmune, (B) anti-*SmLAP1* y (C) anti-*SmLAP2*. Adicionalmente puede verse reacción debajo del tegumento (Sub) para *SmLAP1*. Para el marcado se empleó anti-IgG total de conejo conjugados a FITC. Las barras miden 50 µm.

### 5.5. Histología de hepatopáncreas de *B. glabrata* infectados y no infectados con *S. mansoni*

Se realizaron cortes de hepatopáncreas de *B. glabrata* y se tiñeron con hematoxilina y eosina para localizar las estructuras y poder distinguir la presencia del parásito intracaracol, comparando entre el tejido sano y el infectado.

Los cortes de hepatopáncreas de *B. glabrata* (Fig. 17A y B) mostraron un estado avanzado de infección, reflejado en las alteraciones del tejido y el abundante número de esporocistos secundarios. Los esporocistos presentan embriones de cercaría en distintos estados de desarrollo, desde embriones tempranos a embriones tardíos (Fig. 17B).



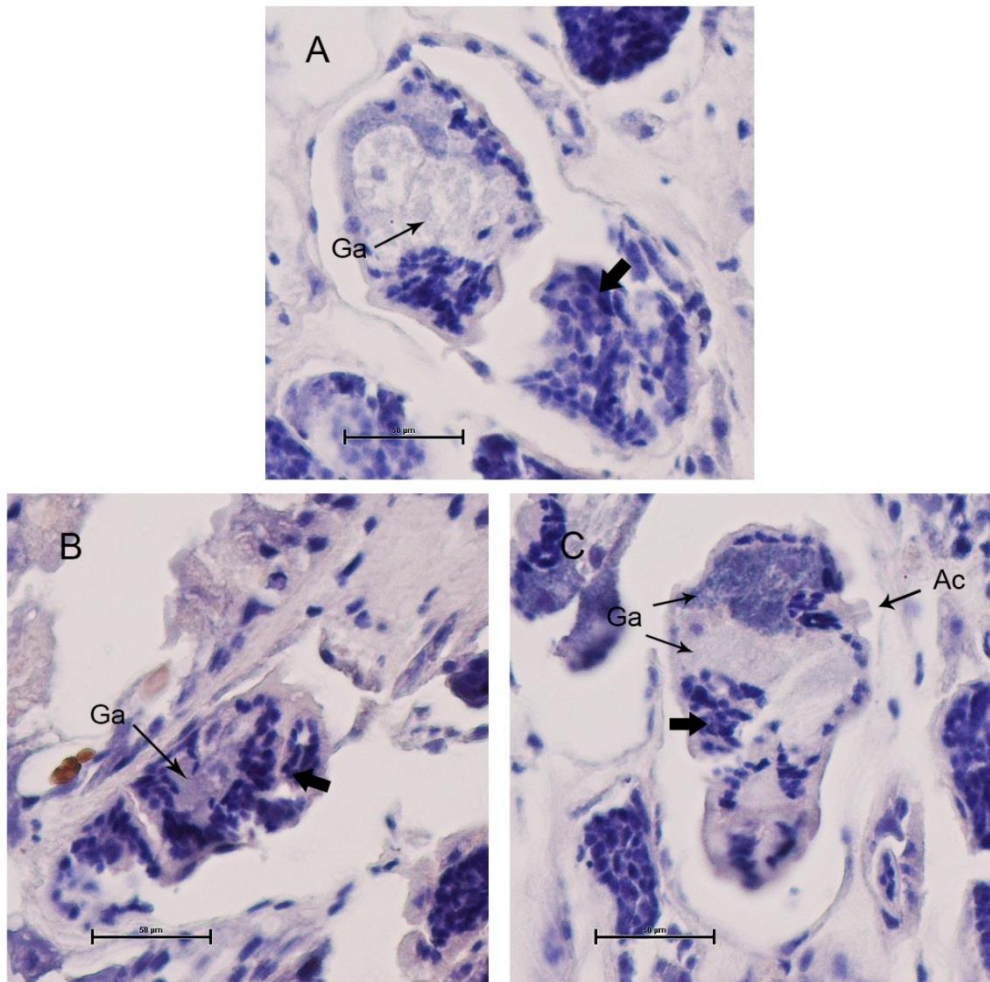
**Figura 17: Cortes de hepatopáncreas de caracol *B. glabrata* teñido con hematoxilina-eosina. (A) Caracol no infectado y (B) caracol con 4 semanas de infección y esporocistos con embriones de cercaria (flechas). Las barras miden 100 µm.**

## 5.6. Localización de las SmLAPs en estadio intracaracol de *S mansoni* por inmunohistoquímica

Siguiendo el mismo procedimiento empleado en los cortes de gusanos adultos de la sección 5.3, se usó la técnica de inmunohistoquímica revelando con DAB y hematoxilina como contratinción para determinar la localización de las SmLAPs en esporocistos y cercarias (Fig. 18). A diferencia de los gusanos adultos, la reacción inmunohistoquímica para esporocistos no resultó en una respuesta intensa.

Los esporocistos tratados con suero anti-SmLAP2 parecen presentar una tenue tinción comparados con anti-SmLAP1 y suero pre-inmune. Aun así, la técnica no brinda resultados claros.

La contratinción con hematoxilina tiñó algunas de las glándulas acetabulares. Es probable que se trate de las glándulas post-acetabulares debido a la naturaleza basofílica de su contenido y su ubicación respecto al acetábulo (Fig. 18C). El otro conjunto de glándulas que puede observarse no fue teñido por la hematoxilina, así que es posible que se trate de las glándulas pre-acetabulares, que presentan un contenido principalmente acidófilo (Dorsey, 1974) (Fig. 18A y C). También se tiñeron los núcleos de múltiples células, posiblemente pertenecientes al parénquima, distribuidas a lo largo del cuerpo cercariano y ubicadas por debajo del tegumento y rodeando las glándulas.

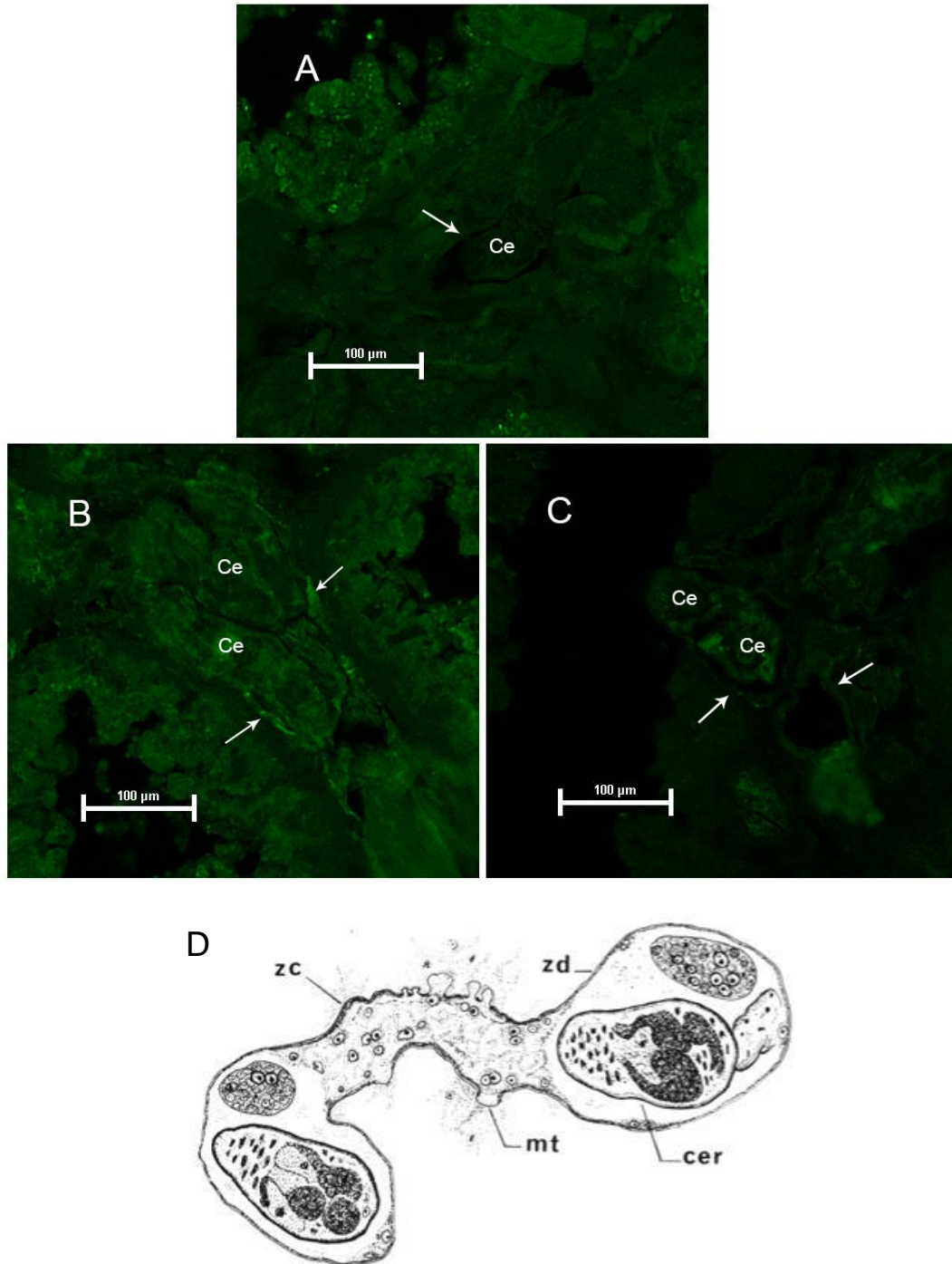


**Figura 18: Inmunolocalización de las SmLAPs en embriones de cercaria.** Corte tratado con (A) suero pre-inmune, suero anti-SmLAP2 (B) y suero anti-SmLAP1 (C). Se señalan los núcleos de lo que podrían ser células parenquimales (flechas gruesas), las glándulas acetabulares (Ga) y el acetábulo (Ac). Los cortes fueron revelados con DAB y se empleó hematoxilina como contratinción. Las barras miden 50  $\mu$ m.

### 5.7. Localización de las SmLAPs en estadio intracaracol de *S mansoni* por inmunofluorescencia.

A diferencia de la reacción de inmunohistoquímica, el estudio con inmunofluorescencia permitió detectar una posible reacción positiva en lo que parece ser el tegumento de los esporocisto (Fournier y Théron, 1985) (Fig. 19). SmLAP1 parece ser la enzima que presentó una respuesta más intensa en el tegumento (Fig. 19B). En comparación, la SmLAP2 presenta una respuesta muy tenue, prácticamente nula (Fig. 19C).





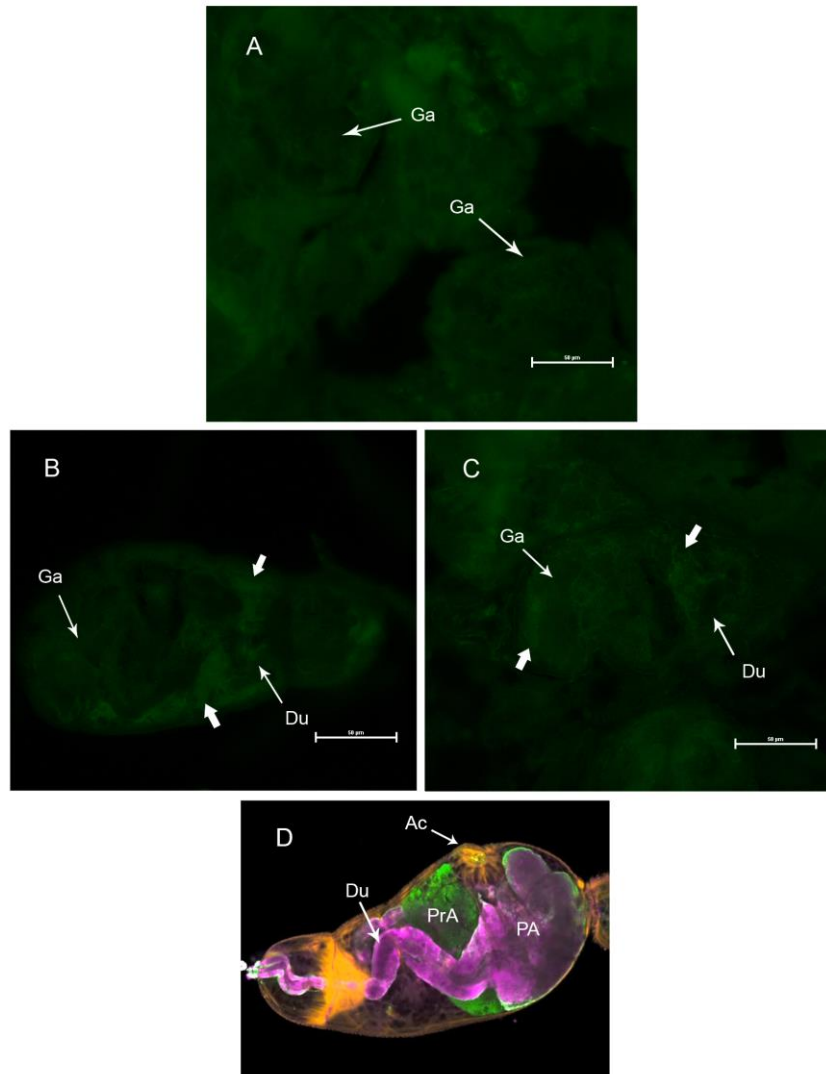
**Figura 19: Inmunolocalización de las *SmLAPs* en esporocistos y embriones de cercaria en caracol con 3 semanas de infección.** (A) Cortes tratados con suero pre-inmune, se distinguen embriones en desarrollo de cercarias (Ce). (B) Cortes tratados con anti-*SmLAP1* y (C) Cortes tratados con anti-*SmLAP2*, el tegumento de los esporocistos (flechas), que rodea la cavidad donde se alojan los embriones de cercaria, parecen presentar reacción. En el caso de anti-*SmLAP1*, la reacción es muy tenue. Para el marcado se empleó anti-IgG total de conejo conjugados a FITC. Las barras miden 100 µm. (D) Como referencia se muestra una ilustración de una parte de un esporocisto donde quedan marcadas las zonas contraídas (zc) y distendidas (zd) del tegumento, microlesiones tegumentarias (mt) y las cercarias (cer) en su interior (Fournier y Théron, 1985).

Se pueden emplear otros métodos para confirmar que efectivamente son los esporocistos los que reaccionaron en estos casos. Por ejemplo, podría emplearse el marcador KI-67, una molécula presente en células de mamíferos durante el proceso de división, que ha mostrado tener la capacidad de reconocer también los tejidos de estos parásitos (Silva y col., 2007). Se pueden emplear contratinciones como DAPI, que marcan ADN, para complementar los estudios morfológicos en los experimentos con fluorescencia. Experimentos realizados en caracoles de *B. glabrata* infectado con *S. mansoni* mostraron que tanto el tegumento del esporocisto como los embriones de cercaria en su interior reaccionan cuando se emplea KI-67 como marcador (Silva y col., 2007). El tejido del caracol no presentaba reacción positiva para este marcador (Silva y col., 2007).

También pueden usarse como marcadores ciertos patrones de carbohidratos presentes en los esporocistos (Lehr y col., 2008). Estudios con anticuerpos monoclonales que reconocen epítopes de los carbohidratos LDN-F (GalNAc( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc( $\beta$ 1-)) y LDN-DF (GalNAc( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-2)Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc( $\beta$ 1-)) revelaron que solo los esporocistos reaccionaban frente a los mismos, mientras que el tejido del caracol no era marcado (Lehr y col., 2008).

Por debajo del tegumento se distingue la cavidad en la que quedan contenidas las cercarias en desarrollo (Fournier y Théron, 1985). Los embriones de cercaria presentaron reactividad para SmLAPs en distintas regiones del cuerpo. Por su localización podría corresponder a elementos del parénquima. Como las cercarias son organismos acelomados, requiere de la presencia de un tejido parenquimatoso para brindar soporte a sus órganos (Dorsey y Stirewalt, 1971). El tejido parenquimal se caracteriza por presentar células con un soma y

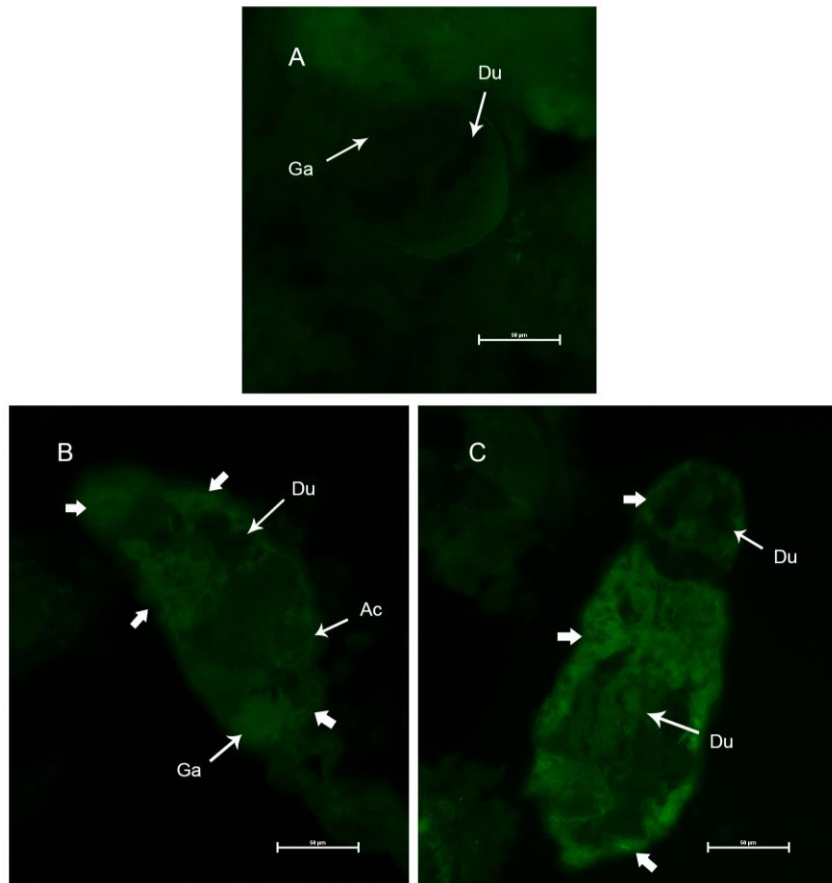
procesos citoplasmáticos extensos, que forman una estructura como de red, y que se encuentran embebidas en una matriz extracelular fibrosa (Dorsey y col., 1971 y 2002). En los cortes se distinguen en forma muy sutil estructuras delgadas distribuidas por debajo del tegumento, a la altura del ganglio central y en el órgano anterior, que podrían corresponder a los procesos citoplasmáticos de dichas células (Fig. 20 y 21).



**Figura 20: Inmunolocalización de las *SmLAPs* en embriones de cercaria en caracol con 4 semanas de infección.** (A) Corte tratado con suero pre-inmune, en que queda indicada la ubicación general de las glándulas (Ga). Cortes tratados con suero (B) anti-*Sm\_LAP2* y (C) anti-*Sm\_LAP1*, se señalan las células que reaccionaron (flechas gruesas) y parte de los ductos de las glándulas (Du). Para el marcado se empleó anti-IgG total de conejo conjugados a FITC. Las barras miden 50  $\mu\text{m}$ . (D) Como referencia se muestra una imagen por apilamiento de enfoque (z-stacks) a través de la cabeza de una cercaria marcadas con lectinas PNA (verde) y PSA (magenta). Se muestra junto con la superposición de la tinción por faloidina (naranja). También se empleó la microscopía DIC y la tinción con DAPI. En este caso se pueden observar la ubicación de las glándulas pre-acetabulares (PrA) y post-acetabulares (PA) (Modificado de video S2 de Collins y col., 2011).

Respecto a las glándulas acetabulares, en la mayoría de los casos no se encontró reacción aparente en las mismas, aunque en unos pocos casos pudo detectarse lo que parece ser reactividad en ductos y en el fondo de una de las glándulas para *SmLAP2* (Fig. 21). No se encontraron ejemplos similares para

*SmLAP1*. El contenido de las glándulas se sintetiza durante el desarrollo de la cercaria y es empleado en el proceso de penetración (Dorsey y Stirewalt, 1971).



**Figura 21: Inmunolocalización de *SmLAP2* en embriones de cercaria.** En los cortes se detectó reactividad en distintas regiones de la cercaria (flechas gruesas), desde el órgano anterior hasta la parte posterior del cuerpo. (A) Corte de cercaria (4 semanas de infección) tratado con suero pre-inmune. (B) Corte de cercaria (4 semanas de infección) presentando reacción positiva para *SmLAP2* en el fondo de una de sus glándulas (Ga). (C) Corte de cercaria (3 semanas de infección) que presenta reactividad en lo que podrían ser ductos de glándulas (Du). Las barras miden 50 µm.

## 6. Discusión

Debido a su presencia ubicua en los organismos y su rol fundamental en los procesos biológicos, no es sorprendente que las peptidasas sean de gran interés como blanco para la fabricación de vacunas antiparasitarias.

En la actualidad el tratamiento de la enfermedad schistosomiasis, causadas por parásitos del género *Schistosoma*, involucra tratamientos preventivos de quimioterapia en grupos focalizados empleando praziquantel. La efectividad de este medicamento es limitada ya que solo funciona contra las formas adultas y no afecta las formas juveniles (Xiao y col., 1985 y 2009). Además, no es capaz de evitar la reinfección y se han documentado casos de parásitos resistentes contra el mismo (Crellen y col., 2016). Es por este motivo que se buscan tratamientos alternativos para combatir a los parásitos.

*S. mansoni*, principal causante de la esquistosomiasis intestinal, ha sido objeto de diversos estudios, muchos de ellos enfocados en la actividad proteolítica presente en las distintas etapas de su ciclo de vida. Estos estudios permitieron determinar la presencia de una gran diversidad de peptidasas y sus funciones. Se ha reportado que las mismas participan en la nutrición y en la degradación de proteínas de la sangre del huésped (Delcroix y col., 2006), en la evasión de la respuesta inmune (Auriault y col., 1982; Hewitson, 2009; Aslam y col., 2008) y en la penetración a través de los tejidos, entre otras funciones (Salter y col., 2002; Ligasová y col. 2011; Fernandez-Delgado y col., 2017; Fishelson y col. 1992).

En este trabajo pudimos detectar lo que es posiblemente la presencia de dos leucinas aminopeptidasas, *SmLAP1* y *SmLAP2*, tanto en el estadio de esporocisto como en embriones de cercaria y gusanos adultos.

Las técnicas de inmunohistoquímica y de inmunofluorescencia empleadas revelaron resultados similares en los gusanos adultos. Se encontró reacción positiva por debajo del tegumento, pero no en su superficie; y en la superficie del gastrodermis, lo que es acorde con lo reportado por McCarthy y col. (2004).

Como ambas superficies se asocian directamente con la absorción de nutrientes (Skelly y col., 2014) y considerando los antecedentes de la leucina aminopeptidasa (*SmLAP1*) en el proceso de degradación de hemoglobina (Delcroix y col., 2006), encontrar las *SmLAPs* en estos tejidos refuerza la idea establecida de que cumplen un rol en el proceso de nutrición del parásito. También se detectó la presencia de estas *SmLAPs* en las células vitelinas de parásitos adultos. La función de estas células está asociada con la formación de la cáscara del huevo y la nutrición del embrión (Jurberg y col., 2009). También se cree que las enzimas cumplen un rol en la eclosión de los huevos, ya que la inhibición de la *SmLAP1* lleva a la inhibición del proceso (Xu y Dresden, 1986; Rinaldi y col., 2009).

En los cortes de *B glabrata*, los esporocistos secundarios y los embriones de cercarias encontrados presentaron reacción positiva, muy sutil, para ambas *SmLAPs*. Esto puede deberse a una baja concentración de ARNm en estos estadios, como indican los estudios de Rinaldi y col. (2009). En el esporocisto la reacción se detectó en el tegumento, siendo mucho más intensa la respuesta para *SmLAP1* respecto a la de *SmLAP2*. En el caso de los embriones de cercaria hubo reactividad en un conjunto de estructuras distribuidas a lo largo del cuerpo de la cercaria, por debajo del tegumento, y principalmente a la altura de los ganglios cefálicos. Considerando estas características puede que se trate de células pertenecientes al parénquima, ya que la estructura básica de sus distintos tipos celulares coincide con esta descripción: un soma con uno o más procesos citoplasmáticos extensos, entrelazados en una red, rodeados de una matriz extracelular fibrosa (Dorsey y col., 1971 y 2002).

El parénquima está compuesto por varios tipos celulares. Dependiendo de la especie, sus funciones pueden estar asociadas con brindar soporte estructural, almacenamiento de nutrientes, movilidad, reserva de células regenerativas, transporte de material, interacciones estructurales con otros tejidos, tejidos modificables por morfogénesis, almacenamiento de oxígeno, etc (Conn, 1993).

Respecto al aparato digestivo y glándulas acetabulares fue muy difícil encontrar reacción positiva, solo algunos cortes mostraron reactividad en lo que parece ser el fondo de una de las glándulas y en ductos. El contenido de las glándulas acetabulares es crucial en el proceso de invasión del tejido del huésped (Parker-Manuel y col., 2011).

Los estudios de inmunolocalización en las etapas asexuales (intracaracol) y en gusanos adultos son preliminares. Aunque los resultados obtenidos podrían llevar a pensar que ambas enzimas se encuentran presentes, existe la posibilidad de una reacción cruzada como muestran los westerns blot realizados en Maggioli y col. (2018), donde los anticuerpos anti-*SmLAP1* dieron una señal tenue tanto para *SmLAP1* como para *SmLAP2*. Esto podría deberse a las similitudes estructurales entre ambas *SmLAPs*. Para distinguir entre ambas enzimas y verificar su presencia, podrían usarse técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) empleando sondas de ARNc específicas para cada ARNm marcadas con fluoróforo (Querido y col., 2017) o emplear sondas de ADNc específicas con complejos avidin-biotin-peroxidasa y Niquel-DAB (Trabandt y col., 1995). Adicionalmente, a esta última técnica se le puede realizar una amplificación empleando plata, para obtener una respuesta más intensa (Trabandt y col., 1995). En el estudio intracaracol pueden emplearse marcadores específicos para la identificación de esporocistos y cercarias, como KI-67 (Silva



y col., 2007) o patrones de carbohidratos como LDN-F y LDN-DF (Lehr y col., 2008), para comprobar que efectivamente la reacción ocurre en el parásito.

En conclusión, se pudo detectar la presencia de las leucinas aminopeptidasas, *SmLAP1* y *SmLAP2*, en distintos estadios del ciclo de vida de *S. mansoni*. Esto brinda información sobre su importancia en los procesos biológicos, su localización y una posible redundancia en la función de ambas enzimas. Esta evidencia resulta alentadora para la creación de futuras vacunas que tengan como blanco estas enzimas, ya que no se limitan simplemente a un estadio de desarrollo y participan de diversos procesos que son vitales para la supervivencia y propagación del parásito.

## 7. Referencias

- Aslam, A., Quinn, P., McIntosh, R. S., Shi, J., Ghumra, A., McKerrow, J.H., Bunting, K.A., Dunne, D.W., Doenhoff, M.J., Morrison, S.L., Zhang, K. & Pleass, R.J. (2008). Proteases from *Schistosoma mansoni* cercariae cleave IgE at solvent exposed interdomain regions. *Molecular immunology*, 45(2), 567-574.
- Auriault, C., Pierce, R., Cesari, I.M. & Caproni, A. (1982). Neutral protease activities at different development stages of *S. mansoni* in mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 72B, 377-384.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Salvesen, G. & Woesner, J.F. (2013). Introduction. Rawlings N.D. y Salvesen G (ed.). *Handbook of proteolytic enzymes, 3<sup>rd</sup> edition* (li-iv). Academic Press.
- Basch, P. F. & DiConza, J. J. (1974). The miracidium-sporocyst transition in *Schistosoma mansoni*: surface changes in vitro with ultrastructural correlation. *The Journal of parasitology*, 935-941.
- Basika Cabrera, T. (2012). Contribución a la dilucidación de los mecanismos proteolíticos que operan en la digestión intestinal del trematodo parásito *Fasciola hepatica*. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.
- Becker, M.M., Harrop, S.A., Dalton, J.P., Kalinna, B.H., McManus, D.P. & Brindley, P.J. (1995). Cloning and characterization of the *Schistosoma japonicum* aspartic proteinase involved in hemoglobin degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(41), 24496-24501.
- Beninga, J., Rock, K. L. & Goldberg, A. L. (1998). Interferon- $\gamma$  can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(30), 18734-18742.
- Bennett, M. W., & Caulfield, J. P. (1991). *Schistosoma mansoni*: ingestion of dextrans, serum albumin, and IgG by schistosomula. *Experimental parasitology*, 73(1), 52-61.
- Bogitsh, B.J. (1975). Cytochemical observations on the gastrodermis of digenetic trematodes. *Transactions of the American Microscopical Society*, 524-528.
- Bogitsh, B.J., Dalton, J.P., Brady, C.P. & Brindley, P. J. (2001). Gut-associated immunolocalization of the *Schistosoma mansoni* cysteine proteases, SmCL1 and SmCL2. *Journal of Parasitology*, 87(2), 237-242.
- Borda, C.E. & Rea, M.J.F. (2007). *Biomphalaria tenagophila* potencial vector of *Schistosoma mansoni* in the Paraná River basin (Argentina and Paraguay). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(2), 191-195.
- Borda, C.E. & Rea, M.J.F. (2010). Susceptibility and compatibility of *Biomphalaria tenagophila* from the Río de la Plata basin with *Schistosoma mansoni* from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(4), 496-498.

- Botelho, M.C., Alves, H., Barros, A., Rinaldi, G., Brindley, P.J., & Sousa, M. (2015). The role of estrogens and estrogen receptor signaling pathways in cancer and infertility: the case of schistosomes. *Trends in parasitology*, 31(6), 246-250.
- Brasil, Ministério da Saúde. (2014). Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas.
- Caffrey, C.R., McKerrow, J.H., Salter, J.P. & Sajid, M. (2004). Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends in parasitology*, 20(5), 241-248.
- Capiello, M., Lazzarotti, A., Buono, F., Scaloni, A., D'ambrosio, C., Amodeo, P., Mendez, B.L., Pelosi, P., Del Corso, A. & Mura, U. (2004). New role for leucyl aminopeptidase in glutathione turnover. *Biochemical Journal*, 378(1), 35-44.
- Cerdà-Costa, N. & Xavier Gomis-Rüth, F. (2014). Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Science*, 23(2), 123-144.
- Collins, J.J., King, R.S., Cogswell, A., Williams, D.L. & Newmark, P.A. (2011) An Atlas of *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(3), e1009. doi:10.1371/journal.pntd.0001009.
- Conn, D.B. (1993). The biology of flatworms (Platyhelminthes): Parenchyma cells and extracellular matrices. *Transactions of the American Microscopical Society*, 241-261.
- Cregg, J.A. (1965). In vitro cultivation of *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology*, 16(2), 133-147.
- Crellen, T., Walker, M., Lamberton, P.H., Kabatereine, N.B., Tukahebwa, E.M., Cotton, J.A. & Webster, J.P. (2016). Reduced efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is associated with multiple rounds of mass drug administration. *Clinical Infectious Diseases*, 63(9), 1151-1159.
- Da Silva, V.B.R., Campos, B.R.K.L., de Olivera, J.F., Decout, J.L. & do Carmo Alvesde Lima, M. (2017). Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25, 3259-3277.
- De Azevedo, C.M.O. & da Silva, A.M.A. (s.f.) Ocorrência de esquistossomose no estado de Santa Catarina no período de 1990 a 2008. Aspectos Epidemiológicos. Recuperado 10 de agosto de 2019 de: [http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/tcc/A\\_ocorrencia\\_de\\_esquistossomos\\_e\\_no\\_estado\\_de\\_Santa\\_Catarina.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/tcc/A_ocorrencia_de_esquistossomos_e_no_estado_de_Santa_Catarina.pdf)
- Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C.R., Lime, K.C., Dvorak, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C. & McKerrow, J.H. (2006). A Multienzyme Network Functions in Intestinal Protein Digestion by a Platyhelminth Parasite. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(51), 39316-39329.
- Doenhoff, M.J., Curtis, R.H., Ngaiza, J. & Modha, J. (1990). Proteases in the schistosome life cycle: a paradigm for tumour metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 9(4), 381-392.

- Doenhoff, M.J., Kusel, J.R., Coles, G.C. & Cioli, D. (2002). Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5), 465-469.
- Dorsey, C.H. & Stirewalt, M.A. (1971). *Schistosoma mansoni*: Fine structure of cercarial acetabular glands. *Experimental Parasitology*, 33(2), 199-214.
- Dorsey, C.H. (1974). *Schistosoma mansoni*: Ultrastructure of cercarial escape glands. *Experimental Parasitology*, 36(3), 386-396.
- Dorsey, C.H., Cousin, C.E., Lewis, F.A. & Stirewalt, M.A. (2002). Ultrastructure of *Schistosoma mansoni* cercaria. *Micron*, 33(3), 279-323.
- Dos Santos Carvalho, O.S., Zech Coelho, P.M. & Lenzi, E.L. (2008). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. *Fiocruz*, Rio de Janeiro.
- Duval, D., Galinier, R., Mouahid, G., Toulza, E., Allienne, J. F., Portela, J., Calvairac, C., Rognon, A., Arancibia, N., Guillaume, M., Théron, A. & Gourbal, B. (2015). A novel bacterial pathogen of *Biomphalaria glabrata*: a potential weapon for schistosomiasis control? *PLoS neglected tropical diseases*, 9(2), e0003489.
- Dvořák, J., Fajtová, P., Ulrychová, L., Leontovyč, A., Rojo-Arreola, L., Suzuki, B.M., Horn, M., Mares, M., Craik, C.S., Caffrey, C.R. & O'Donoghue, A.J. (2016). Excretion/secretion products from *Schistosoma mansoni* adults, eggs and schistosomula have unique peptidase specificity profiles. *Biochimie*, 122, 99-109.
- Fernández-Delgado, M., Cortez, J., Sulbarán, G., Matos, C., Incani, R.N., Ballén, D.E. & Cesari, I.M. (2017). Differential distribution and biochemical characteristics of hydrolases among developmental stages of *Schistosoma mansoni* may offer new anti-parasite targets. *Parasitology international*, 66(1), 816-820.
- Fishelson, Z., Amiri, P., Friend, D.S, Marikovsky, M., Pettitt, M., Newport, G. & McKerrow, J.H. (1992). *Schistosoma mansoni*: Cell-Specific expression and secretion of a serine protease during development of cercariae. *Experimental Parasitology*. 75, 87-98.
- Fournier, A. & Théron, A. (1985). Sectorisation morpho-anatomique et fonctionnelle du sporocyste-fils de *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 71(3), 325-336.
- Fowler, J.H., Narváez-Vásquez, J., Aromdee, D.N., Pautot, V., Holzer, F.M. & Walling, L.L. (2009). Leucine aminopeptidase regulates defense and wound signaling in tomato downstream of jasmonic acid. *The Plant Cell*, 21(4), 1239-1251.
- Galanti, S.E., Huang, S.C.C. & Pearce, E.J. (2012). Cell Death and Reproductive Regression in Female *Schistosoma mansoni*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(2): e1509. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001509>
- Gorodner, J., Alonso, J.M., Zibelman, O., Galván, M., Merino, D., Balbachan, S.E. & Miranda, O. (2004). Impacto ambiental de modificaciones ecológicas realizadas em uma área subtropical. *Rev Soc Bras Med Trop*, 37(2), 154-157.
- Goupil, L.S., Ivry, S.L., Hsieh, I., Suzuki, B.M., Craik, C.S., O'Donoghue, A.J. & McKerrow, J.H. (2016). Cysteine and aspartyl proteases contribute to protein digestion in the gut of freshwater planaria. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(8), e0004893.

- Hahnel, S., Quack, T., Parker-Manuel, S.J., Lu, Z., Vanderstraete, M., Morel, M., Dissous, C., Cailliau, K. & Grevelding, C. G. (2014). Gonad RNA-specific qRT-PCR analyses identify genes with potential functions in schistosome reproduction such as SmFz1 and SmFGFRs. *Frontiers in genetics*, 5, 170.
- Hanelt, B., Brant, S.V., Steinauer, M.L., Maina, G.M., Kinuthia, J.M., Agola, L.E., Mwangi, I.N., Mutuku, M.W., Mkoji, G.M. & Loker, E.S. (2009). *Schistosoma kisumuensis* sp. (Digenea: Schistosomatidae) from murid rodents in the Lake Victoria Basin, Kenya and its phylogenetic position within the *S. Haematobium* species group. *Parasitology*. 136, 987-1001.
- Hewitson, J.P., Grainger, J.R. & Maizels, R.M. (2009). Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and biochemical parasitology*, 167(1), 1-11.
- Holtfreter, M.C., Loebermann, M., Frei, E., Riebold, D., Wolff, D., Hartung, G., Kinzelbach, R. & Reisinger, E.C. (2010). Schistosomula, pre-adults and adults of *Schistosoma mansoni* ingest fluorescence-labelled albumin in vitro and in vivo: implication for a drug-targeting model. *Parasitology*, 137(11), 1645-1652.
- Jamieson, B.G.M. (2016). *Schistosoma: Biology, pathology and control*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Junior, S., Bruno, R., Ferreira Neto, J. A., Thiago, P. D. T. S., Bressan, C. & Amarante, A. R.D. (1996). Distribuição geográfica de planorbídeos em Santa Catarina, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29(5), 411-418.
- Jurberg, A.D., Gonçalves, T., Costa, T.A., de Mattos, A.C. A., Pascarelli, B.M., de Manso, P. P. A., Riveiro-Alves, M, Pelajo-Machado, M., Peralta, J.M., Coelho, P.M.Z. & Lenzi, H. L. (2009). The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. *Development genes and evolution*, 219(5), 219.
- Kastner, M.R.Q., Kohn, A., Teixeira, E.D. & Pitanga, L.C. (1975). Estudo morfológico do *Schistosoma mansoni* sambon, 1907 encontrado na especie humana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 11(5), 247-261.
- Keller, S. R. (2004). Role of the insulin-regulated aminopeptidase IRAP in insulin action and diabetes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(6), 761-764.
- Leammli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680–685.
- Lehr, T., Beuerlein, K., Doenhoff, M.J., Grevelding, C.G. & Geyer, R. (2008). Localization of carbohydrate determinants common to *Biomphalaria glabrata* as well as to sporocysts and miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 135(8), 931-942.
- Li, X.H., de Castro-Borges, W., Parker-Manuel, S., Vance, G.M., DeMarco, R., Neves, L.X., Evans, G.J.O. & Wilson, R.A. (2013). The schistosome oesophageal gland: initiator of blood processing. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(7), e2337.
- Ligasová, A., Bulantová, J., Ševesta, O., Kašný, M., Koverna, K. & Mikeš, L. (2011). Secretory glands in cercaria of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*

- ultrastructural characterization, 3-D modelling, volume and pH estimations. *Parasites and Vectors*, 4,162. doi: 10.1186/1756-3305-4-162
- Maggioli, G., Rinaldi, G., Giandrone, I., Berasain, P., Tort, J.F., Brindley, P.J. & Carmona, C. (2018). Expression, purification and characterization of two leucine aminopeptidases of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 219, 17-23.
  - Mair, G.R., Maule, A.G., Day, T.A. & Halton, D.W. (2000). A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 121(2), 163-170.
  - Mann, V.H., Morales, M.E., Rinaldi, G. & Brindley, P.J. (2010). Culture for genetic manipulation of developmental stages of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 137, 451–462. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182009991211>
  - Martorelli, S.R., Alda, P., Marcotegui, P., La Sala, L.F. & Montes, M.M. (2013). Larval digeneans in Biomphalaria snails from the Salto Grande Dam area in the Uruguay River. *Publicación del Laboratorio de Helmintos y Parásitos de Crustáceos del CEPAVE*, 1-13.
  - Matsui, M., Fowler, J.H. & Walling, L.L. (2006). Leucine Aminopeptidase: diversity in structure and function. *Biological Chemistry*, 387(12), 1535-1544.
  - McCarthy, E., Stack, C., Donnelly, S.M., Doyle, S., Mann, V.H., Brindley, J., Stewart, M., Day, T.A., Maule, A.G. & Dalton, J.P. (2004). Leucine aminopeptidase of the human blood flukes: *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *International Journal for Parasitology*, 34, 703-714.
  - Meuleman, E.A., Holzmann, P.J. & Peet, R.C. (1980). The development of daughter sporocysts inside the mother sporocyst of *Schistosoma mansoni* with special reference to the ultrastructure of the body wall. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 61(3), 201-212.
  - Mo, A.X., Agosti, J.M., Walson, J.L., Hall, B.F. & Gordon, L. (2014). Schistosomiasis elimination strategies and potential role of a vaccine in achieving global health goals. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 90(1), 54-60.
  - Mohammed, A.H., El-Din, A.T.S., Mohamed, A.M. & Habib, M.R. (2011). Tissue responses exhibited by Biomphalaria alexandrina snails from different Egyptian localities following *Schistosoma mansoni* exposure. *Experimental parasitology*, 127(4), 789-794.
  - Morales, M.E., Rinaldi, G., Gobert, G.N., Kines, K.J., Tort, J.F. & Brindley, P.J. (2008). RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 157(2), 160-168.
  - Morris, G.P. (1968). Fine structure of the gut epithelium of *Schistosoma mansoni*. *Experientia*, 24(5), 480-482.
  - Morris, G.P. & Threadgold, L.T. (1968). Ultrastructure of the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *The Journal of parasitology*, 15-27.
  - OMS. (2017a, diciembre). *Weekly epidemiological record*. (Publication n°49, 749-760). Ginebra: Organización Mundial de la Salud.

- OMS. (2017b). Global Health Observation. Recuperado de: [http://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/sch/sch.html](http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html)
- OMS. (2017c). Crossing the billion. Lymphatic filariasis, onchocerciasis, schistosomiasis, soil-transmitted helminthiasis and trachoma: preventive chemotherapy for neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization.
- Parker-Manuel, S.J., Ivens, A.C., Dillon, G.P. & Wilson, R.A. (2011) Gene expression patterns in larval *Schistosoma mansoni* associated with infection of the mammalian host. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(8), e1274. doi:10.1371/journal.pntd.0001274
- Pax, R., Bennett, J.L. & Fetterer, R. (1978). A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 304(3), 309-315.
- Querido, E., Dekakra-Bellili, L. & Chartrand, P. (2017). RNA fluorescence *in situ* hybridization for high-content screening. *Methods*, 126, 149-155.
- Rawlings, N.D. & Barrett, A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290(1), 205-218.
- Rinaldi, G., Morales, M.E., Alrefaei, Y.N., Cancela, M., Castillo, E., Dalton, J.P., Tort, J.F. & Brindley P.J. (2009). RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Molecular and biochemical parasitology*, 167(2), 118-126.
- Rose, M. F., Zimmerman, E. E., Hsu, L., Golby, A. J., Saleh, E., Folkert, R. D., Santagat, S.S., Milner, Jr. D.A. & Ramkissoon, S. H. (2014). Atypical presentation of cerebral schistosomiasis four years after exposure to *Schistosoma mansoni*. *Epilepsy & behavior case reports*, 2, 80-85.
- Rozendaal, J.A. & Organización Mundial de la Salud. (1997). Vector control: methods for use by individuals and communities/ prepared by Jan A. Rozendaal. <http://www.who.int/iris/handle/10665/41968>
- Sajid, M., McKerrow, J.H., Hansell, E., Mathieu, M.A., Lucas, K.D., Hsieh, I., Greenbaum, D., Bogoyo, M., Salter, J.P., Lim, K.C., Franklin, C., Kim, J.H. & Caffrey, C.R. (2003). Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Molecular and biochemical parasitology*, 131(1), 65-75.
- Salter, J.P., Choe, Y., Albrecht, H., Franklin, C., Lim, K.C., Craik, C.S. & McKerrow, J.H. (2002). *The Journal of Biological Chemistry*. 277(27), 24618-24.
- Schechter, I. & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 27(2), 157-162.
- Schwartz, C. & Fallon, P.G. (2018). *Schistosoma* “eggs-iting” the host: granuloma formation and egg excretion. *Frontiers in immunology*, 9.
- Semenov, A., Olson, J. E. & Rosenthal, P. J. (1998). Antimalarial synergy of cysteine and aspartic protease inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(9), 2254-2258.

- Silva, T.M., Dos Santos Souza, S., Fontoura de Almeida, T. & Andrade, Z.A. (2007). Ki-67 is expressed in multiplying forms of *Schistosoma mansoni*, but not in snail host tissues *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 102(5), 651-653.
- Silva, L.L., Marcet-Houben, M., Zerlotini, A., Gabaldón, T., Oliveira, G. & Alves Nahum, L. (2011). Evolutionary histories of expanded peptidase families in *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 106(7), 864-877.
- Simões, L.F., Camargo, E.A., Bastos, L.D., Neves, M., Dos Santos Carvalho, J.F., Magalhães, L.A. & Zanotti-Magalhães, E.M. (2013). Susceptibility of Argentinean *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* to infection by *Schistosoma mansoni* and the possibility of geographic expansion of mansoni schistosomiasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 46(5), 611-616.
- Skelly, P.J., Da'dara, A.A., Li, X.H., Castro-Borges, W. & Wilson, R.A. (2014). Schistosome feeding and regurgitation. *PLoS pathogens*, 10(8), e1004246.
- Sojka, D., Hajdušek, O., Dvořák, J., Sajid, M., Franta, Z., Schneider, E. L., Craik, C.S., Vancova, M. Buresova, V., Bogyo, M., Sexton, K.B., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R. & Kopacek, P. (2007). IrAE—An asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. *International journal for parasitology*, 37(7), 713-724.
- Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdušek, O., Caffrey, C. R., Mareš, M. & Kopáček, P. (2008). Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasites & vectors*, 1(1), 7.
- Song, J., Tan, H., Boyd, S.E., Shen, H., Mahmood, K., Webb, G.I., Akutsu, T., Whisstock, J.C. & Pike, R.N. (2011). Bioinformatic approaches for predicting substrates of proteases. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*. 9(1), 149-178.
- Stirewalt, M.A. & Kruidenier, F.J. (1961). Activity of the acetabular secretory apparatus of cercariae of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions. *Experimental Parasitology*. 11(2-3), 191-211.
- Sträter, N. & Lipscomb, W.N. (1995). Two-metal ion mechanism of bovine lens leucine aminopeptidase: active site solvent structure and binding mode of L-leucinal, a gem-diolate transition state analog, by X-ray crystallography. *Biochemistry*, 34(45), 14792-14800.
- Sträter, N. & Lipscomb, W.N. (2013). Chapter 329 - Leucyl Aminopeptidase (Animal). Rawling, N.D. y Salvesen, G. (ed.), *Handbook of proteolytic enzymes, 3<sup>rd</sup> edition* (1465-1470). Academic Press.
- Towne, C.F., York, I.A., Neijssen, J., Karow, M.L., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Neefjes J. & Rock, K.L. (2005). Leucine aminopeptidase is not essential for trimming peptides in the cytosol or generating epitopes for MHC class I antigen presentation. *The Journal of Immunology*, 175(10), 6605-6614.



- Trabandt, A., Gay, R.E., Sukhatme, V.P. & Gay, S. (1995). Enzymatic detection systems for non-isotopic *in situ* hybridization using biotinylated cDNA probes. *The Histochemical Journal*, 27(4), 280-290.
- Tsujimoto, M., Mizutani, S., Adachi, H., Kimura, M., Nakazato, H. & Tomoda, Y. (1992). Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 292(2), 388-392.
- Vale, N., Gouveia, M.J., Rinaldi, G., Brindley, P.J., Gärtner, F. & da Costa J.M.C. (2017). Praziquantel for schistosomiasis: single-drug metabolism revisited, mode of action, and resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(5), e02582-16.
- Wang, B., Collins, J.J. & Newmark, P.A. (2013). Functional genomic characterization of neoblast-like stem cells in larval *Schistosoma mansoni*. *eLife*. 2: e00768.
- Wang, T., Zhao, M., Rotgans, B.A., Strong, A., Liang, D., Ni, G., Limpanont & Cummins, S.F. (2016). Proteomic analysis of the *Schistosoma mansoni* miracidium. *PLoS one*, 11(1), e0147247.
- Wang, B., Lee, J., Li, P., Saberi, A., Yang, H., Liu, C., Zhao, M. & Newmark, P. A. (2018). Stem cell heterogeneity drives the parasitic life cycle of *Schistosoma mansoni*. *Elife*, 7, e35449.
- Wasilewski, M.M., Lim, K.C., Phillips, J. & McKerrow, J. H. (1996). Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease worm burden and egg production in vivo. *Molecular and biochemical parasitology*, 81(2), 179-189.
- Williamson, A.L., Lecchi, P., Turk, B.E., Choe, Y., Hotez, P.J., McKerrow, J.H., Cantley, L.C., Sajid, M., Craik, S.C. & Loukas, A. (2004). A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35950-35957.
- Xiao, S.H., Catto, B.A. & Webster, Jr. L.T. (1985). Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. *Journal of Infectious Diseases*, 151(6), 1130-1137.
- Xiao, S. H., Mei, J. Y. & Jiao, P. Y. (2009). The in vitro effect of mefloquine and praziquantel against juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. *Parasitology research*, 106(1), 237-246.
- Xu, Y.Z. & Dresden, M.H. (1986). Leucine Aminopeptidase and hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *The Journal of Parasitology*. 72(4), 507-511.
- Xu, Y.Z., Shawar, S.M. & Dresden, M.H. (1990). *Schistosoma mansoni*: Purification and characterization of a membrane-associated leucine aminopeptidase. *Experimental Parasitology*. 70(2), 124-133.
- Yang, Y., Jun Wen, Y., Cai, Y.N., Vallée, I., Boireau, P., Liu, M.Y. & Cheng, S.P. (2015). Serine proteases of parasitic helminths. *The Korean journal of parasitology*, 53(1), 1.