



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis molecular de vías de comunicación entre especies en un modelo de parasitismo: *N. brasiliensis* y *M. musculus*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Eric Pérez Rivera

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Paula Licona Limón  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Julio César Carrero Sánchez  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dr. Fidel Alejandro Sánchez Flores  
[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. Agosto, 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos académicos

El presente proyecto de investigación se desarrolló en el laboratorio de la Dra. Paula Licona Limón, del departamento de Biología Celular y del Desarrollo, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Para la realización del presente, se contó con el apoyo institucional de la Universidad Autónoma de México, especialmente de la Coordinación General de Estudios de Posgrado, la Coordinación del Posgrado en Ciencias Bioquímicas y del Instituto de Fisiología Celular.

Agradezco:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado al proyecto número 303027 y por la beca otorgada a la alumna con número de becario 1247203.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por el apoyo otorgado para mi participación al XXV Congreso Nacional de Inmunología.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM por el apoyo al proyecto con clave IN209919 -PAPIIT.

A la Dra. Paula Licona Limón, tutora principal.

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto De Fisiología Celular, UNAM.

A los miembros del comité tutor:

Dr. Julio César Carrero Sánchez

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dr. Fidel Alejandro Sánchez Flores

Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática, Instituto de Biotecnología, UNAM

A los miembros del jurado:

Dra. Agnès Odile Fleury

Dr. Raúl José Bobes Ruiz  
Dr. Abraham Landa Piedra  
Dr. Leticia Moreno Fierro  
Dra. Florencia Rossetti Sciutto

A la Dra. Alicia Sampieri García, por su contribución en la producción de la proteína recombinante en células de insectos, en el diseño de experimentos y análisis de datos.

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Al Biól. José Luis Ramos Balderas por el apoyo técnico.

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto De Fisiología Celular, UNAM.

Al Dr. Augusto César Poot Hernández y M. en C. Carlos Alberto Peralta Alvarez, por su contribución en el análisis de los datos transcriptómicos.

Unidad de Bioinformática y Manejo de la Información, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A la Dra. Blanca Estela Ruiz Medina, por su contribución en el análisis de datos y diseño de experimentos.

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A la Dra. Maria Guadalupe García Patiño, por su contribución en el análisis de datos y diseño de experimentos.

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A la Dra. Ma. Cleofas Marcial Medina, por su contribución en el análisis de datos y diseño de experimentos.

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A la Dra. Nallely Cano Dominguez, por su contribución en la generación de la proteína recombinante.

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo, por el apoyo técnico,  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Al Dr. Profirio Nava Dominguez,  
Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV

## Agradecimientos personales:

A la doctora Paula Licona Limón por todo el apoyo y la orientación que me ha brindado durante este tiempo. Su dedicación, paciencia y sabiduría han sido fundamentales en mi desarrollo académico y personal. Gracias a sus enseñanzas y consejos, he podido superar desafíos y alcanzar metas que antes me parecían inalcanzables. Una vez más, gracias por todo lo que has hecho por mí. Espero poder seguir contando con tu valiosa guía en el futuro.

A la doctora Alicia Sampieri Gracia, por su ayuda tanto en el plano profesional como personal. Por motivarme cada día a dar lo mejor de mí en el laboratorio y ser un ejemplo seguir. Usted fue una persona muy importante en la realización de este proyecto. Siempre voy a estar agradecido con usted.

A Eugenio Contreras Castillo por enseñarme la excelencia en la investigación. Por apoyarme en todo momento tanto en la realización de este proyecto como en mi crecimiento personal. Por brindarme los momentos más felices en los últimos años. Por compartir conmigo lágrimas y risas, por permitirme conocer un nuevo Eric y por mostrarme que quien no se atreve no cruza el mar.

A los integrantes del laboratorio 125 NTE: ustedes han sido no solo mis compañeros de laboratorios, se han convertido en mi familia en México y me han dado un gran apoyo en todos los momentos difíciles que he tenido. A ustedes les debo los momentos más felices que he tenido en México.

A mi familia, que a pesar de estar lejos físicamente, me apoyan y me motivan día a día a dar lo mejor de mí. Ellos son mi motor y mis fuerzas para conseguir todo en esta vida. Los amo.

# Contenido

I.	Resumen.....	8
II.	Introducción.....	9
1.	Taxonomía de los helmintos.....	9
2.	Epidemiología de Anquilostomiasis.....	11
3.	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i> : modelo de parásito gastrointestinal .....	12
4.	Respuesta inmune contra helmintos: panorámica general.....	14
4.1.	Respuesta inmune antihelmíntica específica en la piel.....	17
5.	Papel de los productos de secreción-excreción de helmintos durante la etapa parasitaria.....	21
5.1.	Proteínas en los productos de excreción- secreción y su funciones inmunomoduladoras .....	24
5.2.	Familia de proteínas Sperm-coating protein/ Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7 (SCP-TAPS) en helmintos.....	29
6.	Estrategias para enfrentar la infección de anquilostomas .....	31
III.	Antecedentes .....	34
	Hipótesis:.....	36
	Objetivo general:.....	36
	Objetivos específicos: .....	36
IV.	Materiales y Métodos.....	37
1.	Ciclo de vida de <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> .....	37
2.	Infección de ratones y recuperación de gusanos .....	37
3.	Obtención de los productos de excreción-secreción de <i>N. brasiliensis</i> en diferentes estadios.....	37
4.	Técnicas moleculares .....	38
4.1.	Determinación de la concentración de proteína .....	38
4.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....	38
4.3.	Tinción de Plata .....	39
4.4.	Western Blot.....	39
4.5.	Extracción de ARN de <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> .....	40
4.6.	Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa (RT-PCR).....	40
4.7.	Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	41
5.	Expresión y purificación de proteína recombinante en sistema de expresión de Baculovirus.....	42
5.1.	Clonación.....	42
5.2.	Obtención del cósmido de Baculovirus y transfección de las células de insectos Sf9.....	42

5.3.	Expresión de la proteína recombinante en células de insectos .....	43
5.4.	Purificación de la proteína recombinante .....	43
6.	Ensayo de inflamación Bolsa de Aire (Air Pouch) .....	44
7.	Inmunización de ratones con la proteína recombinante y reto con <i>N. brasiliensis</i> .....	45
8.	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) indirecto.....	45
9.	Bioinformática .....	46
10.	Estadística .....	46
V.	Resultados.....	47
1.	Identificación de un candidato a partir de los datos transcriptómicos.....	47
2.	Verificación de la presencia del transcrito de Nb-SCP-2 en diferentes estadios.....	51
3.	Clonación del gen de la Nb-SCP-2.....	52
4.	Inserción del gen de interés en el genoma del Baculovirus.....	53
5.	Expresión y purificación de la proteína Nb-SCP-2 .....	55
6.	Evaluación <i>in vivo</i> de la capacidad de Nb-SCP-2 como proteína pro- inflamatoria.....	58
7.	Evaluación de la capacidad protectora de Nb-SCP-2 contra la infección de <i>N. brasiliensis</i> .....	60
VI.	Discusión .....	62
VII.	Conclusiones .....	70
VIII.	Perspectivas .....	71
IX.	Referencias bibliográficas .....	72
X.	Anexos.....	91

# I. Resumen

La anquilostomiasis es una infección causada por parásitos helmínticos que residen en el intestino de diferentes organismos, entre ellos los humanos. Esta infección es de relevancia a nivel mundial, principalmente afectando a los niños de los países en vías de desarrollo. En el laboratorio se utiliza al geohelminto murino *Nippostrongylus brasiliensis* como modelo de anquilostoma por su ciclo de vida parecido al de los parásitos que afectan a los humanos. Estos parásitos han evolucionado para adaptarse a sus hospederos, ya sea modulando su respuesta inmunológica o utilizando al hospedero en su beneficio. Ha sido ampliamente reportado que la interacción parásito-hospedero ocurre principalmente mediante los productos de secreción-excreción (ESP), los cuales son diferentes entre especies y estadios del desarrollo del gusano. Entre los efectos que se encontró de los ESP de *N. brasiliensis* en el estadio L3 se conoce que tienen la capacidad para atraer neutrófilos. El objetivo de este trabajo es identificar y caracterizar un candidato que sea el responsable de este fenómeno. Para ello se analizaron datos transcriptómicos del gusano en todos sus estadios larvarios. De estos datos se identificó un candidato (nombrada Nb-SCP-2) que es similar en secuencia aminoacídica y estructura a Na-ASP-2, una proteína secretada por *Necator americanus*, anquilostoma que afecta a humanos, y que se conoce que es capaz de reclutar neutrófilos y monocitos. Se obtuvo la proteína recombinante del candidato seleccionado en células de insectos. Se demostró a través del modelo de inflamación de Bolsa de Aire que esta proteína recombinante es capaz de reclutar neutrófilos, lo cual está en correspondencia con otro estudio donde se observó que la ausencia de estas células afectaba la migración de las larvas infectivas de la piel al pulmón. Sin embargo, al inmunizar ratones con ella, aunque se observó un aumento en el título de anticuerpos anti-Nb-SCP-2, no se logró protegerlos de la infección con *N. brasiliensis*.

## II. Introducción

### 1. Taxonomía de los helmintos

El concepto de helminto se utiliza para abarcar de manera tradicional tres grupos de gusanos que comparten características superficiales similares: los trematodos y los cestodos (ambos englobados en el filo *Platyhelminthes*) y los gusanos redondos (pertenecientes al filo *Nematoda*) (Hodda y col., 2022a). Este término no tiene un valor clasificatorio preciso; más bien, se trata de un concepto en el que las características de los helmintos no pueden generalizarse más allá de lo que es común a todos los gusanos: su forma alargada y suavidad, sin un esqueleto que dé estructura a sus cuerpos. Hay especies tanto hermafroditas como dioicas. Antiguamente, la clasificación se basaba en la morfología externa e interna de los huevos, larvas y etapas adultas (Parkinson y col., 2004). Sin embargo con las tecnologías de secuenciación se han podido clasificar de manera más certera las distintas especies de helmintos (Parkinson y col., 2004).

Las duelas (trematodos) adultas son gusanos planos con forma de hoja. Estos organismos presentan ventosas oral y ventral prominentes que ayudan a mantener su posición *in situ*. Las duelas son hermafroditas excepto las duelas sanguíneas, que son dioicas. El ciclo de vida incluye un hospedero intermediario: moluscos (Poulin y col., 2019). Por otra parte, las tenias (cestodos) adultas son gusanos planos, segmentados y hermafroditas que habitan el lumen intestinal. Las larvas están invaginadas dentro de una pared rodeada de líquido y habitan tejidos extraintestinales (Kozioł., 2017). Por último, los gusanos redondos (nematodos) adultos y larvas son gusanos cilíndricos y dioicos. Habitan sitios intestinales y extraintestinales (Hodda y col., 2022a).

Los nematodos constituyen un grupo de organismos muy diverso, que aunque no presentan una gran variedad morfológica, lo compensan con una gran abundancia: a la fecha se han descrito más de 26000 especies y se siguen

describiendo cerca de 400 nuevas especies por año (Hodda, 2022b). Ocupan una amplia gama de nichos; se han identificado nematodos terrestres y marinos de vida libre que se alimentan de microorganismos, así como nematodos parasitarios que pueden infectar plantas, hongos, animales. En entornos terrestres, abundan hasta representar el 80 % de los animales pluricelulares, y este porcentaje se eleva a más del 90 % en el relieve oceánico (Hodda, 2022b).

Existen diversas metodologías para clasificar a los nematodos (morfología, bioquímica, biología molecular) (Seesao y col., 2017), pero la clasificación más comúnmente aceptada es la basada en la similitud de secuencia del RNA de la subunidad pequeña del ribosoma (Figura 1) (Blaxter y col., 1998): Dorylaimia (clado I), Enoplia (clado II) y Chromadoria (que engloba a Rhabditida, también conocido como Secernentea). Dentro de Rhabditida, se pueden identificar subdivisiones adicionales, como Spirulina (clado III), Tylenchina (clado IV) y Rhabditina (clado V). Bajo este sistema de clasificación, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* se ubican en el clado V, siendo las dos últimas especies las que infectan a humanos y que mayor prevalencia tienen a nivel global (Blaxter y col., 1998).

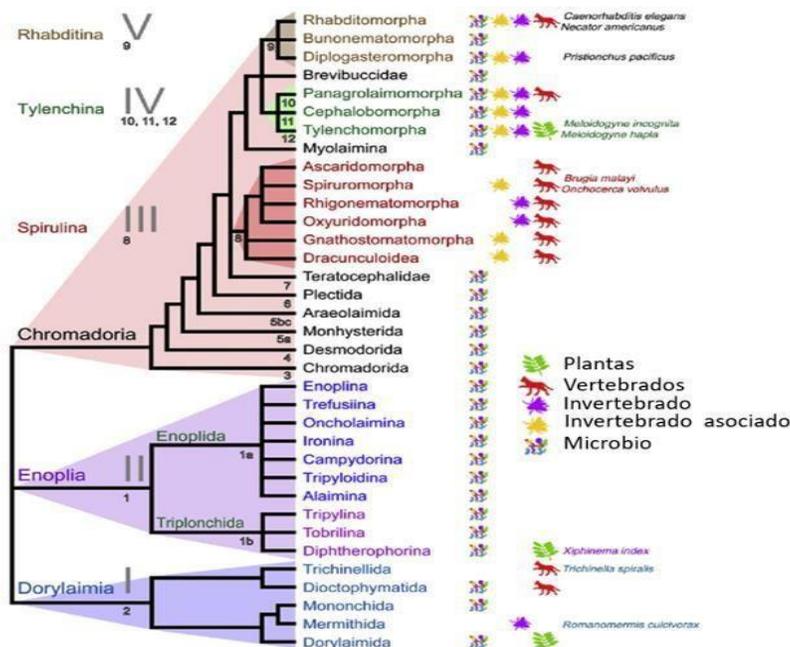


Figura 1. Taxonomía de los nemátodos basada en la secuencia del RNA de la subunidad pequeña del ribosoma (Tomado de Iqbal y Jones, 2016)

## 2. Epidemiología de Anquilostomiasis

La anquilostomiasis (un tipo de helmintiasis) es una enfermedad parasitaria en el intestino delgado provocada por nematodos del grupo de los geohelminetos, específicamente los anquilostomas (nematodos que se transmiten por contacto con el suelo que pertenecen a las especies *Ancylostoma* y *Necator*) (Liang y col., 2023). Es una de las parasitosis más prevalentes a nivel mundial, afectando a aproximadamente 1500 millones de personas, lo que equivale al 24% de la población global. Estas infecciones afectan principalmente a las comunidades más empobrecidas y desfavorecidas en áreas tropicales y subtropicales donde el acceso a servicios básicos de agua limpia, saneamiento e higiene es limitado. Se ha observado una mayor prevalencia en regiones como el África subsahariana, China, América del Sur y Asia (Figura 2) (Loukas y col., 2017). La transmisión de las anquilostomiasis ocurre a través de los huevos de los parásitos que son expulsados en las heces fecales de las personas infectadas, contaminando así el suelo en áreas con deficiente saneamiento. Se estima que más de 260 millones de niños en edad preescolar, 654 millones de niños en edad escolar, 108 millones de niñas adolescentes y 138.8 millones de mujeres embarazadas y madres lactantes residen en zonas donde la transmisión de estos parásitos es intensa, lo que subraya la necesidad de tratamientos e intervenciones preventivas (Sorobetea y col., 2018). Los síntomas que presentan van desde dolor abdominal y ligera anemia hasta diarrea, afectación en el crecimiento y daños en el desarrollo cognitivo (Sorobetea y col., 2018).

En Latinoamérica, las helmintiasis transmitidas por contacto con el suelo están presentes en toda la región y se estima que una de cada tres personas está infectada. Cerca de 46 millones de niños entre 1 y 14 años están en riesgo de infectarse por estos parásitos. Los países donde hay mayor presencia de helmintiasis son: Brasil, Colombia, México, Bolivia, Guatemala, Haití, Honduras, Nicaragua, Perú y República Dominicana (Calvopiña y col., 2017).

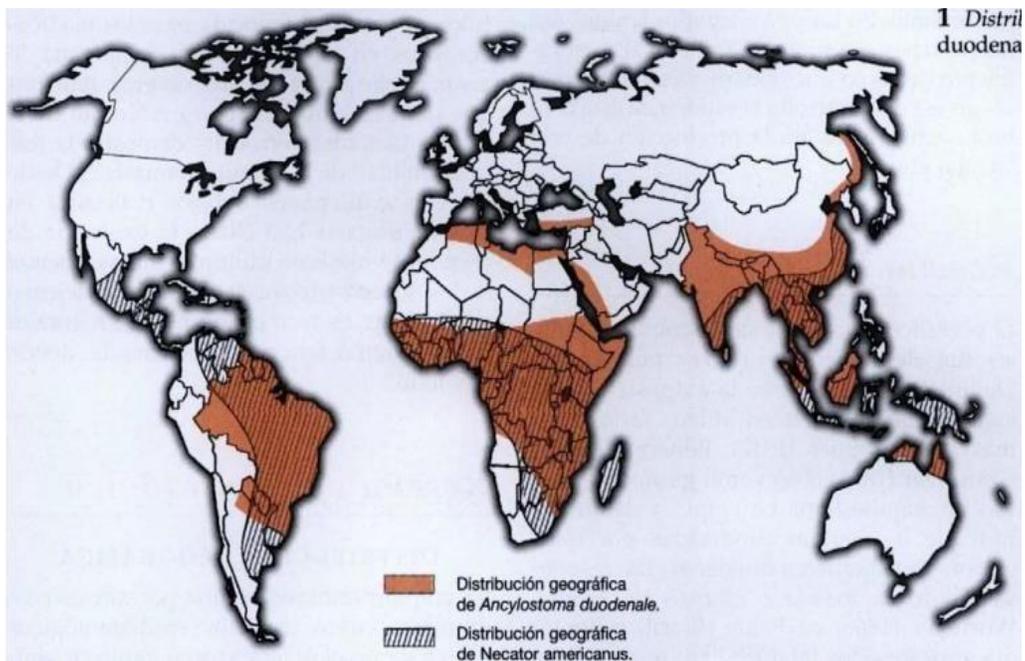


Figura 2. Distribución geográfica de *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale* (Tomado de Chevalier y col., 2002)

### 3. *Nippostrongylus brasiliensis*: modelo de parásito gastrointestinal

Durante el ciclo de vida de *N. brasiliensis*, el parásito transita por diferentes órganos del hospedero: piel, pulmón e intestino (Figura 3) (Allen y Sutherland, 2014). En ratones, las larvas en etapa 3 (L3) infectan al hospedero penetrando la piel causando prurito y sarpullido local, además de una infiltración local de neutrófilos y eosinófilos del hospedero. Las L3s una vez dentro del hospedero comienzan a liberar moléculas que facilitarán su penetración, observándose en esta etapa una gran secreción de proteasas que causarán daño tisular para lograr alcanzar el torrente sanguíneo aproximadamente 6 horas después de la infección. A través de la sangre llegan al lado derecho del corazón y de ahí a los capilares pulmonares, donde acceden al alvéolo (aproximadamente en las primeras 11 horas post-infección), donde, en el parénquima, las L3s maduran a la etapa larvaria 4 (L4) (entre las 19-50 horas post-infección) (Serrano-Pinto y Licona-Limón, 2017). El daño causado por la migración de la larva y la inflamación neutrofílica conduce a hemorragias y lesiones pulmonares agudas. Después las larvas atraviesan las vías respiratorias, son expulsadas mediante la

tos, se tragan y entran en el intestino, donde los parásitos maduran y producen huevos (90-108 horas post-infección). Los adultos o etapa larvaria 5 (L5s) residen en el intestino causan daño tisular local e inflamación antes de ser expulsados de manera altamente dependiente de la respuesta tipo 2 (Allen y Sutherland, 2014; Loukas y col., 2016; Bouchery y col., 2017).

En el laboratorio, *N. brasiliensis* se estudia como helminto modelo que tiene un ciclo de vida similar al de *N. americanus*: el ciclo de vida de este último también pasa por tres tejidos (piel, pulmón e intestino) (Bouchery y col., 2017). No obstante posee algunas diferencias con respecto a *N. brasiliensis*. Primero los tiempos de la infección son diferentes: *N. americanus* puede tardar de una a tres semanas para migrar de la piel al pulmón, luego de este órgano al intestino a las 4-6 semanas post-infección, mientras en *N. brasiliensis* estas travesías ocurren más rápidas (Allen y Sutherland., 2014; Loukas y col., 2016). Otro aspecto a tener en cuenta es que mientras *N. brasiliensis* realiza un cambio larvario en el pulmón de L3 a L4 y luego en el intestino de L4 a L5, en el caso de *N. americanus* ocurre un cambio doble en el intestino donde del estadio L3 cambia a L4 y seguidamente a L5 (Loukas y col., 2016). Otra diferencia es el tiempo de permanencia en el intestino durante la vida adulta, pues mientras que *N. brasiliensis* a los 7 días ya está siendo expulsado en las heces, *N. americanus* puede permanecer por años (hasta 40 años) en el intestino realizando una infección crónica (Loukas y col., 2016).

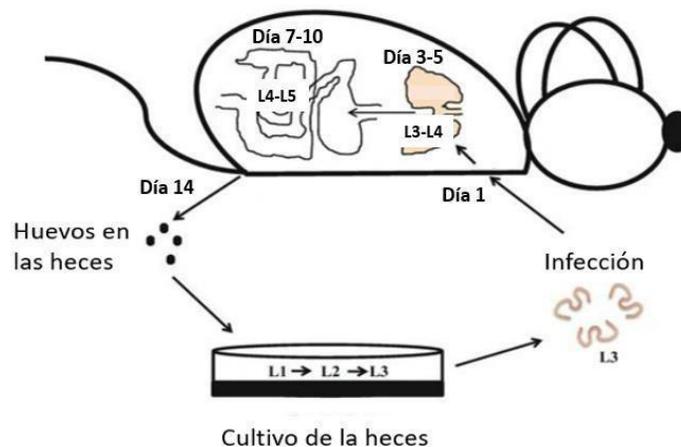


Figura 3. Ciclo de vida de *Nippostrongylus brasiliensis* (Tomado de Serrano-Pinto y Licona-Limón, 2017)

A pesar de las diferencias expuestas arriba, este parásito (*N. brasiliensis*) se utiliza ampliamente como modelo de parásito gastrointestinal en el estudio de la infección e inmunidad de nematodos por su fácil manipulación y porque su mantenimiento en el laboratorio es económico. Su hospedero específico y natural es la rata, aunque puede infectar otros roedores, como ejemplos (mencionados en orden de susceptibilidad): ratones, hámster, ardilla terrestre, jerbo y chinchilla (*Kassai, 1982*).

#### **4. Respuesta inmune contra helmintos: panorámica general**

El mecanismo de defensa del sistema inmunológico contra las infecciones de helmintos está típicamente asociado a la respuesta de tipo 2, donde están involucrados diferentes tipos celulares, tanto innatos (eosinófilos, basófilos, mastocitos, células linfoides innatas tipo 2 (ILC2), macrófagos activados alternativamente, neutrófilos) como adaptativos (linfocitos T cooperadores tipo 2 (TH2 siglas en inglés: T Helper 2), TH9, linfocitos B); y citocinas efectoras (interleucina (IL)-3, IL-4, IL 5, IL-9, IL-13 y anticuerpos IgE) (*Vacca y Le Gross, 2022*). La respuesta de tipo 2 implica varios procesos biológicos que sirven para la eliminación del parásito (ejemplo: fortaleciendo la barrera física) y evitando un daño perjudicial del tejido del hospedero (promoviendo la reparación y devolviendo el tejido dañado a su función fisiológica normal) (*Baska y Norbury, 2022*).

Dentro del mecanismo de la respuesta inmune contra los helmintos, desde una panorámica general, se ha visto que conlleva la liberación de las llamadas citocinas alarminas: IL-25, IL-33 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP, siglas en inglés: thymic stromal lymphopoietin) por los tejidos dañados, las cuales son importantes para la generación temprana de la respuesta tipo 2 (*Fallon y col., 2006; Humphreys y col., 2008; Taylor y col., 2009*). Estas citocinas actúan principalmente sobre las ILC2, induciendo la secreción de otras citocinas: IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, las cuales a su vez ejercen diferentes funciones en diversos tipos celulares, como se mencionará más adelante (*Maizels y col., 2009; von*

*Moltke y col., 2016; Sorobetea y col., 2018).*

La citocina IL-25, a veces referida como IL-17E, es miembro de la familia de IL-17. En los pulmones e intestinos de los ratones, las principales fuentes de producción de esta citocina son las células en penacho (o células Tuft), un tipo raro de células epiteliales quimiosensoras (*von Moltke y col., 2016*). Se sabe que la expresión de IL-25 en estas células es inducida por succinato o por los productos de excreción- secreción (ESP, siglas del inglés: excretory-secretory products) de los helmintos (*von Moltke y col., 2016*). En ratones que carecían de IL-25 se observó que la expulsión de los *N. brasiliensis* fue menos eficiente, mientras que en ratones silvestres o Rag1<sup>-/-</sup>, la administración de una alta concentración de esta citocina, resultó en una reducción del número de gusanos (*Fallon y col., 2006*). A diferencia de IL-25, que es secretada principalmente por las células en penacho, la IL-33 puede ser liberada por diferentes tipos de células epiteliales (*von Moltke y col., 2016; Chen y col., 2022*). La alarmina IL-33 pertenece a la familia de la citocina IL-1 y se expresa constitutivamente en el núcleo principalmente de las células epiteliales y endoteliales. Puede ser liberada por las células muertas junto con ATP (el ATP activa a los mastocitos para que a su vez liberen más IL-33) (*Shimokawa y col., 2017*). Esta alarmina aumenta la activación de ILC2, lo cual a su vez incrementa la producción de IL-13. Una deficiencia de IL-33 en células epiteliales intestinales resultó en un retardo en la reducción del número de gusanos, así como una disminución de ILC2 en el intestino delgado cuando este fue retado a una infección de *N. brasiliensis* (*Hung y col., 2020*). Otra función de la IL-33 es inducir la expresión de TSLP en el epitelio (*Humphreys y col., 2008*). A diferencia de IL-25 e IL-33, TSLP no parece estar involucrada en la expulsión de *N. brasiliensis*, aunque sí en la resolución de la infección por *Trichuris muris*. Massacand y col. (2009) demostraron que este fenómeno se debía a que la principal función de TSLP en la respuesta antihelmíntica contra *T. muris* era la supresión de IL-12p40, pero como *N. brasiliensis* realizaba ya esta acción directamente, pues resultaba redundante la contribución de TSLP (*Massacand y col., 2009; Taylor y col., 2009*).

Aunque las ILC2 parecen ser la diana principal de estas alarminas, se ha visto que dichas citocinas pueden activar también células T de memoria tanto murinas como humanas sin necesidad del reconocimiento de epítomos por el receptor de la célula T. En este sentido, se demostró que la IL-25 puede diferenciar las células T CD4+ en células TH2 (Wang y col., 2007; Leyva- Castillo y col., 2013; Wang y col., 2015; Van Dyken 2016; Sorobetea y col., 2018).

Una vez las ILC2 y TH2 fueron estimuladas por las alarminas, comienzan a liberar IL-4, IL-5 e IL-13, las cuales se consideran clave para las respuestas de tipo 2 inducidas por helmintos (Herbert y col., 2019).

La citocina IL-13 es requerida para la protección contra la mayoría de los nematodos. Aunque la IL-13 tiene funciones diferentes a la IL-4, existe cierta redundancia entre ellas: esto es probablemente debido a que ambas moléculas comparten el uso de la subunidad IL-4R $\alpha$ . IL-13 induce la hiperplasia de las células caliciformes y la producción de moco (Vacca y Le Gros., 2022). También actúa sobre las células progenitoras de las células intestinales promoviendo el desarrollo de las células en penachos y caliciformes. Junto con la IL-4 estimulan la producción de la molécula tipo resistina (RELM, siglas en inglés: resistin-like molecules)- $\beta$ , que tiene un efecto protector contra la infección de *N. brasiliensis* (Baska y Norbury, 2022). Por otro lado, al igual que la IL-13, la IL-5 es secretada principalmente por ILC2, pero funciona predominantemente como reclutador de eosinófilos (Dent y col., 1999; Gazzinelli-Guimaraes y Nutman, 2018). Una característica de las infecciones parasitarias es la eosinofilia en sangre, especialmente para los parásitos que migran a través de múltiples tejidos (Huang y col., 2015). Ratones que sobreexpresan IL-5 tienen eosinofilia sistémica masiva y son menos susceptibles a *N. brasiliensis*, mientras que los ratones deficientes en eosinófilos no presentan alteraciones en su capacidad para expulsar, lo que ilustra que la IL-5 tiene funciones desconocidas adicionales más allá de las asociadas con eosinófilos (Dent y col., 1999; Kroot y col., 2007). En estos ratones transgénicos, con presencia de eosinofilia a lo largo de su vida, aunque se observó un menor número de *N. brasiliensis* en el intestino y los

parásitos eran menos fecundos (producían menos huevos), la infección intestinal se eliminó al mismo tiempo que en los ratones de tipo silvestre (*Dent y col., 1999*). El papel de IL-9 en *N. brasiliensis* se pensó, inicialmente, que era marginal dado el leve fenotipo observado en mastocitos y células caliciformes en ratones deficientes de IL-9 (*Townsend y col., 2000*). Datos más recientes demostraron claramente la inducción de IL-9 por Th9 e ILC2 en ratones infectados con *N. brasiliensis* y constituyó la primera evidencia convincente sobre la importancia de IL-9 en este contexto. En este sentido, y en adición a su efecto sobre los mastocitos y la hiperplasia de las células caliciformes, IL-9 mostró ser importante para la basofilia y la inducción *in vivo* de IL-5 e IL-13, protegiendo al hospedero de la infección (*Licona-Limón y col., 2013; Licona-Limón y col., 2017*).

#### **4.1. Respuesta inmune antihelmíntica específica en la piel**

Si bien la respuesta inmunológica, desde un punto de vista general, contra helmintos es llevada a cabo por una respuesta de tipo 2, hay que recordar que estos parásitos transitan por diferentes tejidos y en cada uno de ellos esta respuesta tiene sus particularidades. Para los fines de este trabajo, en este acápite nos enfocaremos en la respuesta que se desencadena en la piel.

*N. brasiliensis* y *N. americanus* comienzan su etapa infecciosas en la piel. Para ello estos gusanos deben atravesar esta barrera física y una vez dentro sufren varias modificaciones: en el caso de *N. brasiliensis* pierde su cutícula y comienza a liberar ESP, principalmente proteasas (*Abuzeid y col., 2020*). Todo esto conlleva al daño tisular, lo cual induce la liberación de IL-33 por las células muertas y TSLP principalmente por las células epiteliales. Si bien IL-33 juega un papel esencial en la iniciación de la respuesta de tipo 2 en pulmón e intestino, TSLP parece ser más importante en la activación de las ILC2 en la piel (*Kim y col., 2013*). Si bien se conoce el rol que juegan las ILC2s en el pulmón e intestino durante la infección por helmintos, su nivel de participación en las respuestas inmunitarias de la piel, no se comprende hasta el momento. En el trabajo de Obata-Ninomiya y col., (2013) no se observó que las ILC2s se expandieran en

la piel en respuesta a una infección por *N. brasiliensis*. Este hallazgo difiere de los informes sobre la expansión de ILC2s en otros sitios de infección por helmintos y es sorprendente dado que la IL-33, un inductor clave de la expansión de ILC2s, se expresa tanto en condiciones basales como durante la inflamación en la piel (Obata y col., 2013). No está claro si las ILC2s de la piel se expanden en respuesta a otros gusanos penetrantes de la piel, o si su función se altera durante la penetración en la piel. Sin embargo, es posible que la disparidad en la expansión de ILC2s entre la piel y otros sitios de infección se deba a diferencias funcionales entre las ILC2s residentes en la piel y las de otros tejidos. La transcriptómica de célula única de las ILC2s revela que estas células se agrupan de manera distinta según su tejido de origen, y que las ILC2s de la piel están programadas de manera única para responder a la IL-18 en lugar de a las señales canónicas de tipo 2 como IL-25 e IL-33 (Ricardo-Gonzalez y col., 2018). Esta diferencia podría explicar por qué no se observó la expansión de ILC2s en la piel poco después de la penetración de *N. brasiliensis*.

Una característica en varios anquilostomas que infectan roedores y humanos es la basofilia inducida, la cual se utiliza como una característica distintiva de las infecciones por helmintos (Inclan-Rico y Syracuse, 2018). Los precursores de los basófilos residen en la médula ósea y responden a IL-3 y TSLP durante la infección por helmintos (Inclan-Rico y Syracuse, 2018). La eliminación de parásitos se ve afectada en ausencia de basófilos, tanto en infecciones por *N. brasiliensis* debido a la falta de IL-4 e IL-13 derivadas de basófilos y la reducción de la expansión de células TH2 (Schwartz y col., 2014). Los basófilos se identificaron durante la infección primaria de *N. brasiliensis* como una fuente de IL-4, lo cual indicaba su función potencialmente importante en la iniciación de las respuestas inmunitarias de tipo 2, en comparación con las células T cooperadoras que son las principales productoras de IL-4 durante la reinfección (van Panhuys y col., 2011; Peng y Syracuse, 2021). Al mismo tiempo, se demostró que para inducir protección durante la infección secundaria de *N. brasiliensis* los basófilos son requeridos, donde se observó su implicación en la retención de las larvas en la piel, esto orquestado por basófilos activados por

IgE y macrófagos polarizados a M2 (Obata-Ninomiya y col., 2013). No obstante, en un modelo de *S. venezuelensis*, que migra a través de la piel de manera similar a *N. brasiliensis*, los basófilos tenían un papel principal en la retención de larvas en la piel durante la infección primaria, pero no tenían efecto durante la infección secundaria (Mukai y col., 2017). Sin embargo, estudios con *S. rattii* indicaron que la ausencia de basófilos puede ser compensada por otras células inmunitarias, como los mastocitos. Los autores no observaron diferencias en las respuestas TH2 en ratones sin basófilos (Reitz y col., 2018). Estos resultados de los estudios con diferentes especies de parásitos indican que el papel de los basófilos depende del modelo y debe ser evaluado individualmente.

Otro tipo de célula del sistema inmunológico que se ha visto que juega un papel importante en la respuesta contra helmintos en la piel son los eosinófilos (Nutman, 2007). Estas células se derivan de la médula ósea y son reclutadas al sitio de infección por la eotaxina y la citocina IL-5, esta última secretada por las TH2 que fueron activadas (Weller y Spencer, 2017; Radonjic-Hoesli y col., 2021). Se ha observado que luego de la inyección de *N. brasiliensis* en la piel, hay un aumento en la infiltración de eosinófilos en este tejido, los cuales están asociados con las larvas que quedan atrapadas en la piel, teniendo un papel claro en la reducción del número de larvas que llegan a los pulmones (Daly y col., 1999). En un estudio, de infección primaria con *N. brasiliensis*, donde se compararon ratones que sobreexpresaban IL-5 con otros que eran deficientes de esta citocina o que eran tipo silvestre, se observó que los primeros lograban una mayor retención de larvas L3 en la piel (Dent y col., 1999). Sin embargo, no se observó ninguna diferencia entre silvestre y deficientes de IL-5 (Dent y col., 1999). Posteriormente, en una reinfección, al comparar los grupos deficientes de IL-5 y tipo silvestre, se observó que llegan más larvas al pulmón en el grupo deficiente de la citocina (Knott y col., 2007). Estos resultados indican que los eosinófilos son importante células en la respuesta antihelmíntica en la piel o al menos en la respuesta previa al pulmón. En modelos de infección por *T. spiralis*, que involucran la infección y supervivencia a largo plazo de los parásitos en los tejidos musculares del hospedero, el agotamiento de eosinófilos no afectó la

carga parasitaria intestinal, pero sí llevó a un mayor número de larvas viables detectadas en el tejido muscular (Huang y col., 2015). Es interesante que los eosinófilos en el tejido muscular alrededor del parásito produjeran IL-10 en la etapa temprana de la infección, lo que tenía el efecto de proteger a las larvas intracelulares encapsuladas y apoyar la infección crónica (Huang y col., 2014). En conjunto, estos estudios identificaron un papel importante para los eosinófilos en la inmunidad antihelmíntica dependiendo del parásito y la etapa del tejido infectado.

Más recientemente, se ha observado que los neutrófilos juegan también un papel importante en la respuesta contra los helmintos en la piel (Ajendra, 2021). Estas células poseen una amplia variedad de herramientas para defender al organismo de los agentes infecciosos, como la secreción de citocinas y factores que activan al sistema inmune innato y adaptativo, y ayudan a orquestar una respuesta efectiva (Burn y col., 2021). Otro mecanismo que utiliza para la defensa es la liberación de su cromatina, la cual tiene unida proteasas y peptidasas, lo cual permite atrapar y matar bacterias, virus y hongos (Omar y Abdelal, 2023). Este mecanismo se conoce como trampas extracelular de neutrófilos (NETs, siglas del inglés: neutrophils extracellular traps) y es una manera eficiente de atacar patógenos que no pueden ser fagocitados por los neutrófilos, como son los helmintos. En una infección primaria, se demostró que estas células rodean a las larvas L3 de *N. brasiliensis* en la piel al cabo de las 6 horas post- infección, ya sea una infección natural o una inyección intradérmica (Bouchery y col., 2020). En paralelo, se realizó un estudio *in vitro* donde se corroboró que las larvas eran rodeadas por los neutrófilos, y que además eran atacadas por estas células de una manera parcialmente dependiente del complemento. Se demostró que los neutrófilos mediante la liberación de NETs dañaban a *N. brasiliensis*, controlando la infección en la piel (Bouchery y col., 2020). No obstante, no se describen los mecanismos por los cuales se lleva a cabo esta defensa, lo cual queda por investigar. Otro aspecto interesante es que en la piel la presencia de los neutrófilos ralentiza la pérdida de la cutícula de las larvas, lo cual puede ser un mecanismo de protección por parte de *N. brasiliensis*

(Bouchery y col., 2020).

## **5. Papel de los productos de secreción-excreción de helmintos durante la etapa parasitaria**

Los helmintos han evolucionado para lograr habitar cada uno de los órganos por los que deben transitar para completar su ciclo de vida, de tal manera que es en esos nichos y no en otros donde llevan a cabo su desarrollo. Para ello han desarrollado estrategias para evadir al sistema inmunológico y al mismo tiempo utilizar al hospedero para su desarrollo (Bobardt y col., 2020). En este sentido, los ESP juegan un papel importante, ya que es mediante estos mediadores solubles que estos parásitos interactúan con el hospedero. Entiéndase por ESP a aquellas moléculas que se excretan como "residuos" o se secretan activamente por el parásito en el sitio de la infección, y aunque muchos estudios se han enfocado principalmente en las proteínas, es también conocido que metabolitos de diferente naturaleza son importantes en la modulación de la respuesta inmune, así como vesículas extracelulares (Wangchuk y col., 2019). Pero para los objetivos de este trabajo, estaremos solo enfocándonos en las proteínas.

Diferentes estudios con los ESP de los helmintos han demostrado la capacidad inmunomoduladora que poseen. Los ratones inmunizados con todos los productos de *N. brasiliensis* adultos mostraron características de respuesta tipo 2 de una infección sin la necesidad de ninguna exposición a parásitos vivos, un efecto que pudo ser abolido por calor o tratamiento con proteasa a las preparaciones de parásitos, lo que sugiere que es probable que estos efectos sean causados por proteínas (Holland y col., 2000). De igual manera, otro estudio demostró que los ESP de *N. brasiliensis* de la larva en el estadio L3 indujeron una respuesta anti-inflamatoria en el pulmón, suprimiendo el reclutamiento de neutrófilos en el contexto de inflamación inducida por LPS, ya que inhibía la transcripción de genes asociados a la inflamación (Zhao y col., 2009). Drurey y col. demostraron recientemente que los ESP de *H. polygyrus* adulto (otro parásito intestinal), pueden modificar el ambiente intestinal. En este

estudio observaron que los ESP pudieron bloquear los efectos de las IL-4/IL-13 en la expresión y expansión de las células en penacho y de células caliciforme. Los autores demostraron que la infección por *H. polygyrus* regulaba negativamente varios genes implicados en la diferenciación celular de células caliciforme, células de Paneth, y células endocrinas, lo que sugiere que el parásito moduló varias células implicadas en la defensa contra helmintos (*Drurey y col., 2021*).

Varias investigaciones enfocadas en la “teoría de la higiene”, la cual se basa en que países con alta prevalencia de infecciones de estos parásitos se correlacionan negativamente con la incidencia de enfermedades alérgicas y autoinmunes, han demostrado que los ESP de varios nematodos tienen la capacidad de contrarrestar alergias. Un ejemplo es los ESP de *H. polygyrus*, que probaron ser eficientes suprimiendo la inflamación alérgica en las vías aéreas del pulmón (*McSorley y col. 2012*). Este mismo efecto se observó con los ESP de *Trichinallis spinalis* (*Aranzamendi y col., 2012*), de los huevos *Schistosoma japonicum* (*Li y col., 2023*) y *Trichuris suis* (*Ebner y col., 2014*). En otro estudio, demostraron que los ESP de *Trichinallis spinalis* suprimieron la muerte celular programada de los neutrófilos que conllevaba a la liberación de NETs (NETosis) inducida por PMA, disminuyendo la producción de ROS, al mismo tiempo que aumento la fagocitosis de bacteria y la liberación de citocinas proinflamatorias (*Wang y col., 2023*).

Si bien estos trabajos se han enfocado en observar el efecto global de todos los ESP de los gusanos sobre la respuesta inmunológica, se requiere una caracterización de sus componentes para profundizar en los mecanismos que subyacen bajo los fenómenos observados. En este sentido, estudios iniciales mostraron que en los ESP habían proteínas con actividades enzimáticas, como la actividad proteolítica, y propiedades inmunomoduladoras, como interferencia con el sistema del complemento (*Harnett, 2014*). Aunque estos tipos de proteínas que han sido identificadas podrían ser encontradas ubicuamente, la relativa abundancia y presencia de estas difieren entre las especies de

parásitos y las etapas del ciclo de vida (Hewitson y col., 2009).

La llegada del análisis de las ciencias ómicas hizo posible investigar un mayor número de productos (Joshi y Mishra, 2021). Estudios genómicos y posteriormente proteómicos, agruparon a las proteínas de los ESP de los nematodos en diferentes grupos que contienen: proteasas, inhibidores de proteasa, homólogos al alérgeno de veneno, enzimas glicolíticas y lectinas, por mencionar algunos (Joshi y Mishra, 2021). Estos grupos de proteínas presentan diferentes abundancias según la especie de nematodo y el estadio larvario en el que se encuentre, como ya se mencionó anteriormente. Sin embargo, resulta interesante que al comparar el proteoma de los ESP de *H.polygyrus* (Moreno y col., 2011), *N. americanus* (Logan y col., 2020), *N. brasiliensis* (Sotillo y col., 2014) y *A. caninum* (Morante y col., 2017) presenten similitud entre sus familias de proteínas más abundantes. De manera general la familia Sperm-coating protein/ Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7 (SCP-TAPS) y las metaloproteasas resultaron ser las de mayor presencia (Figura 4). Resulta lógico esperar altas cantidades de proteasas debido a la propia naturaleza del parasitismo de estos organismos, que deben migrar por diferentes tejidos y estas enzimas podrían actuar facilitando su movimiento. En el caso de la familia SCP-TAPS, no se sabe qué función pueden estar jugando en el parasitismo, aunque se piensa que están relacionadas con la regulación del sistema inmunológico, ya que se ha demostrado que algunas proteínas de esta familia pueden ejercer funciones como la inhibición de la activación receptor de los linfocitos B (Tribolet y col., 2014), inhibición de los neutrófilos (Barnard y col., 1995) y plaquetas (Del Valle y col., 2003; Huang y col., 2020). En el acápite 5.2 se profundizará más sobre esta familia de proteínas.

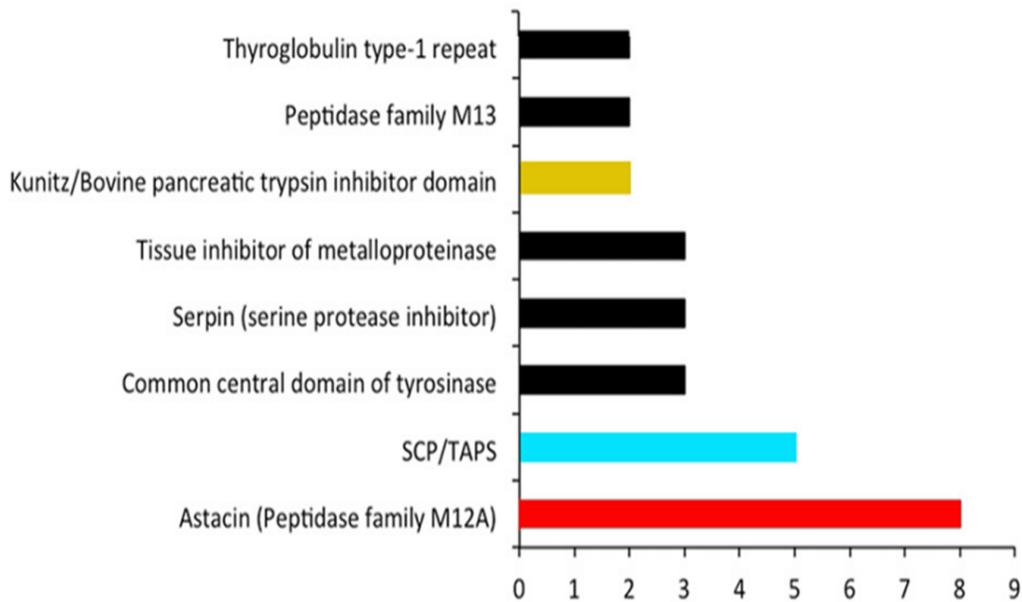


Figura 4. Gráfico de barras que muestra las familias de proteínas (Pfam) más representadas en los productos de excreción/secretión de *N. brasiliensis* en el estadio L3 (Tomado de Sotillo y col., 2014)

### 5.1. Proteínas en los productos de excreción- secreción y su funciones inmunomoduladoras

Como se mencionaba anteriormente, la llegada del análisis de las ciencias ómicas permitió identificar los componentes de los ESP de los nematodos, lo cual abre una ventana de posibilidades para profundizar en los mecanismos que se desencadenan a nivel molecular. En este acápite se intentará ejemplificar de una manera general, cómo los componentes proteicos de los ESP de los helmintos han evolucionado para modular la respuesta inmune del hospedero en cada uno de los siguientes pasos: 1-el inicio de la respuesta inmune, 2-procesamiento y presentación de antígeno, 3-respuesta adaptativa y 4-respuesta efectora.

Hasta este punto es lógico esperar que las moléculas parasitarias, ya sean secretadas o expresadas en la superficie de los gusanos, sean quienes median la interacción con el hospedero. Debido a que el objetivo del parásito es evadir las defensas del hospedero, una modulación del sistema de mayor rango sería

más beneficioso, y es por ello que es de esperar que sean las proteínas secretadas por los gusanos quienes tengan un papel importante en la inmunomodulación. Muchos son los trabajos que se han enfocado en tratar de descubrir los roles de dichas proteínas, las cuales se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellos que son homólogos/químicamente similares al hospedero y los que no presentan ni secuencia ni homología funcional (*Maizels y col., 2018; Abuzeid y col., 2020*).

Como ya se había comentado en el acápite 4, la respuesta inmunológica contra helmintos se caracteriza por una fuerte respuesta de tipo 2 que comienza con la liberación de alarminas por parte, principalmente, de las células epiteliales activadas. La IL-33 es probablemente la más importante, pues constituye una señal de que el tejido ha sido dañado y se sabe que es una fuerte inductora de la respuesta tipo 2. El nematodo intestinal *Heligmosomoides polygyrus* suprime la respuesta de IL-33 secretando dos proteínas: HpARI (del inglés, *H. polygyrus* alarmin release inhibitor) (*Osborn y col., 2017*) y HpBARI (del inglés, *H. polygyrus* Binds Alarmin Receptor and Inhibits) (*Vacca y col., 2020*). HpARI es una proteína que tiene un modo de acción selectivo, uniéndose al ADN a través de su primer dominio, mientras que el segundo y tercer dominios se unen a IL-33 reducida (activa) pero no a IL-33 oxidada (inactiva). La unión obstruye la interacción del complejo con el receptor de IL-33, ST2, mientras que la interacción con el ADN ancla a IL-33 dentro del núcleo de las células necróticas, evitando la liberación de IL-33 (*Osborn y col., 2017*). En el caso de HpBARI, consiste en dos dominios de Proteínas de Control del Complemento atípicos. HpBARI se une y bloquea ST2, inhibiendo las respuestas de IL-33 en un modelo murino de asma (*Vacca y col., 2020*). Por otro lado, la producción de IL-33 en células epiteliales y mastocitos puede ser incrementada por señales de estrés o muerte celular, como es la liberación de ATP (*Cecik y Linden, 2016*). Se han identificados en algunos helmintos la presencia de apirasa, una enzima que es capaz de hidrolizar al ATP en AMP, reduciendo las señales inflamatorias (*Gounaris y col., 2004; D´ara y col., 2014*).

Simultáneamente con la activación del sistema inmune por las alarminas, otro proceso que tiene lugar es el procesamiento y presentación de los antígenos de estos parásitos. Para que este fenómeno tenga lugar, se requiere primero la activación de las células presentadoras de antígenos, lo que conlleva al reconocimiento de DAMPs y PAMPs por los receptores de reconocimientos de patrones (PRRs), como los receptores de tipo Toll (TLRs). Los helmintos han evolucionado para suprimir la señalización de estos receptores. *Acanthocheilonema viteae* es un nematodo que secreta la glicoproteína ES-62, la cual se ha demostrado que secuestra la proteína de señalización Myd88, lo cual suprime la respuesta de TLRs (excepto TLR3) y del receptor de IL-33 (Pineda y col., 2014; Ball y col., 2018). El principio inmunomodulador de ES-62 se basa en el grupo lateral de fosforilcolina (PC) que están presentes en N-glicanos (Goodridge y col., 2007). Además, se ha demostrado que las variantes sintéticas de PC pueden replicar numerosos efectos antiinflamatorios de la molécula original (Al-Riyami y col., 2013). También se ha visto que cisteín proteasas secretadas por los trematodos *Fasciola hepatica* (FhCL1) y *Schistosoma mansoni* (SmCB1) suprimen directamente la señalización de TLR en células mieloides interfiriendo con la inflamación impulsada por TLR *in vivo*, lo que resulta en la degradación intracelular de TLR3 y TLR4 (Donnelly y coll., 2010). En *F. hepatica* también se ha encontrado una proteína inmunomoduladora, Fh12 (y su forma recombinante Fh15), que se unen al receptor CD14 del TLR4, reduciendo su expresión. Incluso, estas proteínas pueden suprimir la respuesta de células deficientes de CD14, lo que sugiere funciones inhibitorias adicionales (Martin y col., 2015).

Ya una vez han sido activadas las células presentadoras de antígenos y los antígenos han sido fagocitados, comienza el procesamiento proteolítico por las cisteín proteasas (catepsinas lisosomales y la asparaginil endopeptidasa) para su posterior presentación en la superficie. Este proceso es regulado de manera natural por cistatinas (inhibidores de las cisteín proteasas), sin embargo, los helmintos secretan también cistatinas que muestran la capacidad de modificar la respuesta del hospedero (Khatrı y col., 2020). Las cistatinas filariales, incluida la

CPI-2 de *B. malayi*, también inhiben específicamente la asparaginil endopeptidasa, lo que permite bloquear el procesamiento de antígenos en células humanas (Manoury y col., 2001), mientras que la LsCistatina (de *Litomosoides sigmodontis*) reduce las respuestas proliferativas específicas de antígenos y óxido nítrico (Pfaff y col., 2002). En modelos de ratón, la AvCistatina (de *A. viteae*) induce la expresión de IL-10 en macrófagos, atenuando tanto la alergia respiratoria como la colitis (Danilowicz-Luebert y col., 2013). Además, la AvCistatina induce poblaciones de macrófagos reguladores PD-L1+ y PD-L2+, que en la transferencia adoptiva protegen contra la alergia respiratoria y la inflamación intestinal (Ziegler y col., 2015) y reducen las respuestas específicas al polen en PBMC de pacientes alérgicos (Danilowicz-Luebert y col., 2013). Otras cistatinas de helmintos con amplias propiedades inmunomoduladoras mejoran la colitis *in vivo* (Jang y col., 2011; Coronado y col., 2017), mientras que la Nippocistatina de *N. brasiliensis* bloquea las respuestas a la ovoalbúmina (Dainichi y col., 2001).

Cuando las células presentadoras de antígenos ya fueron activadas y lograron presentar los antígenos parasitarios en su superficie, se comienza la inducción de la respuesta adaptativa del sistema inmune. En este paso, se liberan citocinas que van a dar paso a la generación de linfocitos B, TH2, TH9 o T reguladores. En los ESP de los helmintos se han encontrado proteínas que son agonistas del receptor del factor del crecimiento transformante- $\beta$  (TGF $\beta$ R) (Maizels y col., 2018). Aquí se da un fenómeno evolutivo interesante. Si bien algunos helmintos presentan homólogos del TGF $\beta$  con un alto grado de conservación (Gómez-Escobar y col., 2000; Sulaiman y col., 2016), en *H. polygyrus* se encontró una proteína que mimetiza al TGF $\beta$  que no está relacionada estructuralmente y es tres veces el tamaño de dicha citocina (Johnston y col., 2017). Se observó que esta proteína se puede unir tanto al TGF $\beta$ RI y II, en comparación con el TGF $\beta$  mamífero que solo se une a TGF $\beta$ RII (Johnston y col., 2017). La inducción de Tregs *in vivo* también se observa con PAS-1, una proteína nativa de 200 kDa purificada de *Ascaris suum*, la cual induce y expande las poblaciones de células Treg CD25+, que pueden suprimir las respuestas alérgicas mediante

transferencia adoptiva (de Araujo y col., 2010). Por otro lado se ha reportado una proteína que pueden modular negativamente a las células B, la Na-Asp-2 (del inglés, *Necator americanus* Ancylostoma-secreted protein-2) (Tribolet y col., 2014). Se demostró que esta proteína se unía a CD79A, un componente del receptor de los linfocitos B, regulando negativamente la expresión de RNA mensajeros relacionado con la señalización y la migración transendotelial (Tribolet y col., 2014).

Las células de la inmunidad adaptativa activadas y diferenciadas, comienzan a secretar factores que potencian y dirigen mejor la respuesta de defensa del hospedero. Entre sus mecanismos está el reclutar a granulocitos para que ejecuten sus acciones efectoras contra los parásitos. Por lo que la supervivencia de los gusanos depende de proteínas que puedan bloquear tanto el reclutamiento como la función de las células efectoras. En los ESP de *A. caninum* se ha reportado una proteína llamada factor inhibitorio de neutrófilos (NIF, siglas del inglés: neutrophils inhibitory factor) que posee la capacidad de inhibir el reclutamiento de neutrófilos (Moyle y col., 1994). Se conoce que esta proteína se une a la integrina CD11b/CD18 junto con fibrinógeno e impide la unión de los neutrófilos al endotelio vascular (Moyle y col., 1994). *Schistosoma mansoni* secreta una proteína de unión a quimiocinas (SmCKBP) que se une y bloquea IL-8, CCL2, CCL3, CCL5 y CX3CL1, inhibiendo la migración de neutrófilos (pero no de eosinófilos) y tiene actividad supresora en el modelo de hipersensibilidad de contacto DNFB. El bloqueo de SmCKBP *in vivo* resulta en un aumento de la neutrofilia en granulomas inducidos por huevos de *S. mansoni* (Smith y col., 2005). En contraparte, se ha observado que *B. malayi* secreta una Asparaginil-tRNA sintetasa, cuya estructura es similar a la quimiocina IL-8, y se une con los receptores de IL-8 CXCR1 y CXCR2, reclutando neutrófilos y eosinófilos (Kron y col., 2013). Este fenómeno pro-inflamatorio, también se observó en *N. americanus*, el cual secreta la proteína Na-Asp-2 que tiene la habilidad de reclutar a los neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (Bower y col., 2008). Por otra parte, los anquilostomas humanos suprimen las respuestas de quimiocinas a través de la producción de metaloproteinasas que degradan la eotaxina-1

(CCL11), pero no IL-8 ni eotaxina-2 (CCL24), inhibiendo específicamente el reclutamiento de eosinófilos mediado por eotaxina (*Culley y col., 2000*).

El conjunto de todas las funciones de las proteínas mencionadas en este acápite, demuestran cómo los helmintos se han adaptado a sus hospederos y han generado una amplia gama de mecanismos para evadir y manipular al sistema inmunológico.

## **5.2. Familia de proteínas Sperm-coating protein/ Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7 (SCP-TAPS) en helmintos**

Varios estudios proteómicos de los ESP de varios helmintos muestran que una de las familias de proteínas más representativas en las secreciones de estos gusanos es la SCP-TAPS (Sperm-coating protein/ Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7; Pfam no. PF00188) (*Moreno y col., 2011; Sotillo y col., 2014; Morante y col., 2017; Logan y col., 2020*). Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP), caracterizada por la presencia de un "dominio extracelular similar a SCP" o CAP simple o doble (InterPro: IPR014044). Estructuralmente, el dominio SCP o CAP consiste en un sándwich  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  en el cual la hoja  $\beta$  antiparalela de tres cadenas está flanqueada por tres hélices en un lado y una cuarta hélice en el otro. Estas tres capas apiladas están mantenidas juntas en las interfaces por un núcleo hidrofóbico, y con la excepción de GAPR-1 (*Gibbs y col., 2008*), el plegamiento del dominio central incluye tres enlaces disulfuro conservados (*Osman y col., 2012*). La familia SCP/TAPS incluye glicoproteínas que recubren el esperma de mamíferos, también proteínas asociadas a la patogenicidad del glioma, al veneno de lagarto bloqueador de los receptores de rianodina, al veneno de himenópteros familia de antígenos 5/3, a proteínas relacionadas con la patogenicidad vegetal y proteínas fúngicas de hifas (*Cantacessi y col., 2009*). En la literatura también se pueden encontrar con diferentes nomenclatura: ASP (del inglés, *Ancylostoma-secreted protein*), VAL (del inglés, *Venom Allergen-like*), VAH (del inglés, *Venom Allergen-Homologue*).

Aunque en varios artículos, donde analizan el genoma o el proteoma de estos

nematodos, se especula que esta familia juega un papel importante en la interacción parásito-hospedero, se sabe bien poco de su rol fisiológico (Cantacessi y col., 2009). Varias funciones han sido relacionadas con estas proteínas: inmunomodulación durante la invasión del helminto en el hospedero, la migración a través de los tejidos, fijación a la pared intestinal y alimentación de sangre (Cantacessi y col., 2012).

La primera proteína de esta familia que fue aislada de nematodos fue NIF, la cual es secretada por el *Ancylostoma caninum* en el estadio L3 (Moyle y col., 1994). Se demostró que NIF juega un rol inmunomodulatorio bloqueando la adhesión de los neutrófilos activados a las células del endotelio vascular y la subsecuente liberación de peróxido de hidrógeno desde los neutrófilos activados (Moyle y col., 1994). Un estudio enfocado a profundizar en este fenómeno demostró que NIF tiene la capacidad de unirse selectivamente al dominio A de la integrina  $\beta 2$  CR3 (Riue y col., 1994), propiedad que se exploró en la migración transendotelial de eosinófilos, observándose la inhibición *in vitro*, lo cual además se correspondió con la supresión de la respuesta inflamatoria alérgica inducida por OVA en el pulmón (Schnyder-Candrian y col., 2012).

Otro miembro de esta superfamilia es el inhibidor de plaquetas de anquilostoma (Ac-HPI, siglas del inglés). Esta proteína también es secretada por el *A. caninum* y se identificó como un inhibidor de activación plaquetaria que actúa a través del bloqueo de la integrina receptora de fibrinógeno  $\alpha IIb\beta 3$  y la integrina receptora de colágeno  $\alpha 2\beta 1$  (Chadderdon y Cappello, 1999; Del Valle y col., 2003). Huang y col., (2020), identificaron un homólogo en el *A. ceylanicum*, Ace-HPI, el cual presentó un 91% de homología con Ac-HPI. La proteína recombinante fue expresada en *E. coli* y mostró buena reactividad con el suero positivo de perros infectados con *A. ceylanicum*. La inmunolocalización indicó que Ace-HPI se encontraba en el esófago y las glándulas cefálicas del adulto. Además, la Ace-HPI recombinante inhibió la agregación plaquetaria *in vitro* (Huang y col., 2020). Otra proteína estudiada dentro de esta familia es la Sm-Val-9, la cual es expresada por *S. mansoni*. Se demostró que la Sm-Val-9 recombinante participa

en la reorganización de tejidos y la remodelación de la matriz extracelular, lo cual afecta la expresión de productos génicos de metaloproteinasa de matriz remodeladora (MMP) y los inhibidores tisulares de metaloproteinasa (TIMP) en cultivos *in vitro* (Yoshino y col., 2014).

La Na-Asp-2 es una proteína perteneciente a esta familia expresada por *N. americanus* en el estadio larvario L3, cuya estructura tridimensional se asemeja a las quimiocinas CC (Asojo y col., 2005). Se ha reportado que esta proteína induce migración y acumulación de neutrófilos y monocitos en tejidos, una actividad potencialmente pro-inflamatoria que podría ayudar a la migración de la larva a través del incremento de la permeabilidad del tejido (Bower y col., 2008). Esta proteína, como ya se había mencionado en el acápite anterior, también se une a las células B humanas vía CD79A, regulando negativamente lyn, PI3K y la señalización del receptor de las células B (Tribolet y col., 2014).

Por otro lado, recientemente ha aumentado el estudio de proteínas de esta familia como proteínas de unión a lípidos (Wilbers y col., 2018). En este sentido, se ha observado que en el dominio CAP hay bolsillos que unen a lípidos, tales como leucotrienos, esteroides y fosfolípidos cargados negativamente. Las proteínas de levaduras (relacionada con patógenos de levadura [Pry1] y Pry2) se unen a esteroides y ácidos grasos en dos sitios distintos de unión a lípidos (Choudhary y col., 2012; Darwiche y col., 2017). Estos dos bolsillos de unión a lípidos bien definidos son un bucle flexible que se une a esteroides (llamado bucle del motivo de unión a caveolina [CBM]) y un canal hidrofóbico, que está formado por dos hélices alfas paralelas, la llamada cavidad de unión a palmitato. Además, se demostró que la cavidad de unión a palmitato de tablysin-15 de la saliva de la mosca de los caballos *Tabanus yao* se une a leucotrienos y, de ese modo, inhibe sus efectos proinflamatorios (Xu y col., 2012).

## **6. Estrategias para enfrentar la infección de anquilostomas**

Con el fin de disminuir estas infecciones helmínticas por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), varias han sido las estrategias que se han seguido.

Una primera medida fue la Campaña de Calzado (Footwear Campaign), cuya intención era establecer una barrera física que previniera la penetración de las larvas de estos gusanos (Hotez, 2013). Lamentablemente, la infección de estos anquilostomas puede ocurrir a través de cualquier superficie expuesta de la piel, y por otra parte, el *A. duodenale* puede infectar también por vía oral (Hotez, 2013). Una segunda medida fue el programa WASH (del inglés, Water, Sanitation and Hygiene program), el cual pretendía controlar las infecciones con un mejor saneamiento de las áreas (Hurlimann y col., 2018). Las principales limitaciones de este programa es que es caro de implementar y requiere de un tiempo prolongado para poder observar su efecto. Una tercera medida fue el uso de quimioterapéuticos preventivos, es decir, la administración de un fármaco que eliminara los gusanos (Hotez, 2013). Los cuatro medicamentos usados por la OMS son el albendazol, mebendazol, levamisol o pamoato de pirantel. Las dificultades enfrentadas en el uso de estos fármacos es que mostraban una eficiencia variable en regímenes de una sola dosis, además, no se lograba prevenir una segunda reinfección e induce resistencia de estos gusanos a los fármacos (Hotez, 2013). Una manera de optimizar estas medidas fue integrándolas: al realizar saneamiento de las áreas y administrar de manera masiva los fármacos mencionados se observó un control más efectivo de la infección por anquilostomas, no obstante, esta estrategia ha sido relativamente poco estudiada (Haldeman y col., 2020).

Una cuarta medida ha sido el desarrollo de vacunas contra los helmintos. Actualmente no existe una vacuna antihelmíntica para humanos, y esto se debe a varios factores: 1- al complejo ciclo de vida que presentan estos parásitos; 2- en las zonas de mayor prevalencia de estas infecciones, los individuos desarrollan altos títulos de IgE contra antígenos específicos de estos gusanos, lo cual pone en riesgo la seguridad de las vacunas; y 3- al poco conocimiento que se tiene sobre las funciones llevadas a cabo por las moléculas derivadas de estos organismos (Wong y col., 2022).

Varios han sido los esfuerzos por desarrollar una vacuna contra los

anquilostomas. Un candidato inicial fue la proteína Na-Asp-2 la cual se secreta durante el estadio larvario infectivo de *N. americanus*. La inmunización con esta proteína demostró ser inmunogénica, pero en un estudio con individuos provenientes de una región de Brasil que presenta alta incidencia de este tipo de infección, se encontró que esta molécula inducía la una respuesta mediada por IgE en aquellas personas que habían estado expuestas previamente al gusano, lo que generó efectos adversos, siendo la urticaria el más notorio de ellos (*Diemert y col., 2012*). Un segundo acercamiento al desarrollo de una vacuna fueron dos enzimas recombinantes involucradas con la alimentación por sangre y la desintoxicación: la proteasa aspártica que degrada la hemoglobina, Na-APR-1 (siglas del inglés) y la glutatión-S-transferasa hemodetoxicante, Na-GST-1 (siglas del inglés). Ambas vacunas se han probado de manera independiente en ensayos de seguridad de fase 1a ([\[https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01717950\]](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01717950)[\]\(https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01717950\)\)](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01717950) (*Diemert y col., 2017*), y más recientemente en una región endémica de *N. americanus* en Gabón, como una combinación de vacunas coadministradas con alhydrogel como adyuvante (*Adegnika y col., 2021*). Se demostró que ambas vacunas son inmunogénicas y seguras, y ahora esperan pruebas de eficacia utilizando el modelo de infección controlada por anquilostomas. Tanto Na-APR-1 como Na-GST-1 se expresan en el intestino del parásito en su etapa adulta. Además, estos antígenos de anquilostomas adultos parecen evitar los problemas anteriores relacionados con la inducción de respuestas alérgicas. En general, los enfoques de selección de antígenos para vacunas contra helmintos y otros parásitos intestinales transmitidos por el suelo (STH) ahora tienen criterios rigurosos para descartar proteínas que provocan respuestas de IgE en individuos infectados (*Diemert y col., 2018*).

Tabla 1 Resumen de los candidatos vacunales que se encuentran en fase clínica (Tomado de Puchner y col., 2023)

Candidato	Sistema de expresión	Desarrollador	Fase de desarrollo	Ruta de administración
rNa-GST-1 con Alhydrogel, GLA o CpG	<i>Pichia pastoris</i>	Texas Children's Center for Vaccine Development with Aeras and Walter Reed Army Institute of Research	Fase 1-2	i.m. 3 dosis
rNa-APR-1 con Alhydrogel, GLA o CpG	Tabaco	Texas Children's Center for Vaccine Development with Fraunhofer	Fase 1	i.m. 3 dosis
rNa-Asp-2	<i>Pichia pastoris</i>	Previously Walter Reed Army Institute of Research and Instituto Butantan	Se discontinuó luego de fase 1 (producía urticaria)	i.m. 3 dosis
Combinación de rNa-GST-1 y rNa-APR-1 con Alhydrogel, GLA o CpG	Ambos sistemas	Texas Children's Center for Vaccine Development	Fase 1	i.m. 3 dosis

Otras propuestas de vacunas se basan en la inmunización con gusanos atenuados. En este sentido Chapman y col., (2022), en un reciente ensayo clínico de fase 1, vacunaron voluntarios sanos con larvas de *N. americanus* tratadas con UV y demostró ser segura y bien tolerada, al tiempo que indujo respuestas inmunitarias humorales y celulares sustanciales. El reto con larvas vivas resultó en un número significativamente menor de larvas en los participantes vacunados en comparación con los no vacunados (Chapman y col., 2022).

### III. Antecedentes

El trabajo de Bouchery y col., (2020), se enfocó en desentrañar la interacción neutrófilos-*N. brasiliensis* en la piel: concluyendo que los primeros atacaban a los gusanos liberando NETs, mientras estos últimos, en modo de defensa, secretaban una DNasa para cortar al ADN de la trampa extracelular. En este estudio, se demostró que alrededor de 6 horas post-infección, había una infiltración de neutrófilos en la piel que rodeaban a los gusanos. Adicionalmente, observaron que los ESP de la larva infectiva (L3) era capaz por si sola de atraer

a los neutrófilos por quimiotaxis (Bouchery y col., 2020), indicando que uno o varios de sus componentes tenían la capacidad de comportarse como quimiocina.

Por otro lado, Bower y col., (2008) reportaron que la proteína Na-Asp-2, una SCP-TAPS secretada por *N. americanus* en el estadio L3, era capaz de reclutar neutrófilos y monocitos *in vivo*. Además, mostraron *in vitro* que este reclutamiento se debía a que esta proteína se comportaba como una quimiocina, y no como una proteína pro-inflamatoria, lo cual era respaldado con su estructura determinada por cristalografía de rayos-X, donde se observó que era similar a las quimiocinas CC (Asojo y col., 2005; Bower y col., 2008).

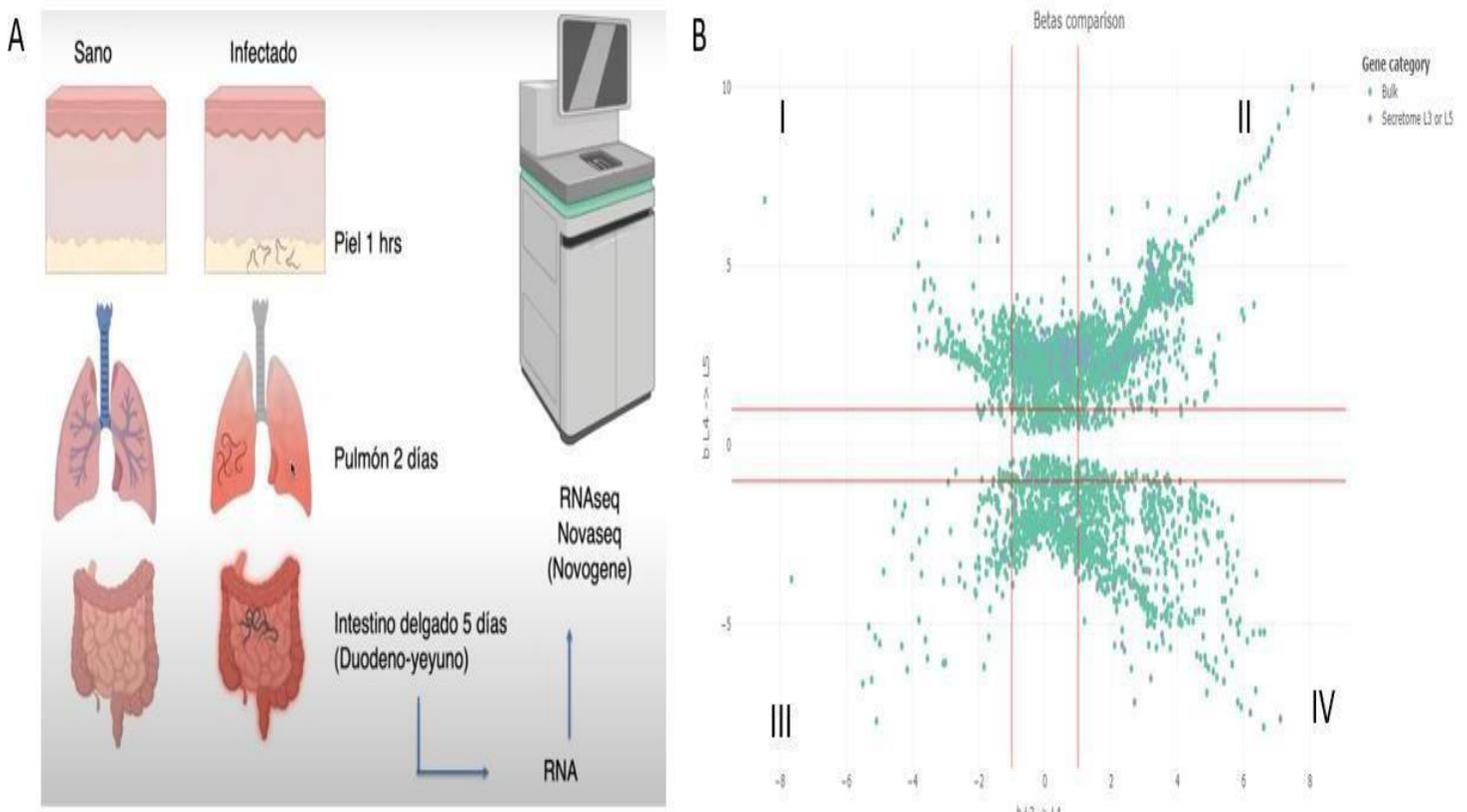


Figura 5. Análisis de los datos transcriptómicos. A. Estrategia experimental seguida para obtener las muestras de RNA en cada uno de los estadios de *N. brasiliensis*. B. Expresión diferencial de genes al comparar los datos transcriptómicos entre estadios. II: Cuadrante correspondiente a los genes más expresados en los estadios L3 y L5 con respecto a L4; III: Los genes más expresados en L5; IV: los genes más expresados en L3 y I: los genes más expresados en L4.

En nuestro grupo, con el objetivo de estudiar las rutas moleculares de interacción entre *N. brasiliensis* y *Mus musculus*, se realizó la secuenciación de RNA

(mediante RNA-seq, Illumina) del gusano en cada uno de sus estadios, a partir de muestras de tejidos infectados. Para ello se infectaron ratones con 600 gusanos cada uno y se tomaron muestra de la piel al cabo de una hora (para asegurar la toma de gusanos en estadio L3 en dicho tejido), del pulmón al cabo de dos días (para asegurar la toma de gusanos en estadio L4 en dicho tejido) y del duodeno-yeyuno a los 5 días (para asegurar la toma de gusanos en estadio L5 en dicho tejido). Con los datos transcriptómicos obtenidos se realizó un estudio de los genes diferencialmente expresados y se tomaron los veinte transcritos más expresados en cada estadio de *N. brasiliensis* (Figura 5). A partir de estos datos de la secuenciación del RNA del gusano y teniendo en cuenta los dos trabajos mencionados, nos preguntamos:

¿Habrá en los ESP de *N. brasiliensis* una proteína de la familia SCP-TAPS similar a Na-Asp-2 encargada del reclutamiento de granulocitos y/o monocitos?

#### **Hipótesis:**

Una proteína de la familia SCP-TAPS presente en los productos de secreción-excreción en la etapa infectiva de *Nippostrongylus brasiliensis* recluta granulocitos y/o monocitos en *Mus Musculus*

#### **Objetivo general:**

Identificar un candidato a partir de los datos transcriptómicos y determinar si es capaz de reclutar granulocitos y/o monocitos y evaluar su capacidad protectora.

#### **Objetivos específicos:**

- Identificar un candidato mediante herramientas bioinformáticas
- Obtener la proteína seleccionada mediante el sistema de expresión de Baculovirus
- Evaluar si es capaz de reclutar granulocitos y/o monocitos *in vivo*
- Evaluar si es capaz de inducir una respuesta protectora contra *N. brasiliensis*

# IV. Materiales y Métodos

## 1. Ciclo de vida de *Nippostrongylus brasiliensis*

Las larvas infectivas de estadio L3 de *N. brasiliensis* se recuperaron de heces mediante filtración en un aparato de Baermann con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 37°C a través de papel de filtro durante 90-120 minutos. Se inyectaron subcutáneamente 3000 larvas infectivas en PBS en ratas macho Wistar de 200g. Las ratas fueron sacrificadas por asfixia con isofluorano (Fluriso™, VETONE®) 7 días después de la infección y se extrajeron sus intestinos delgados y ciegos. Las heces, que contenían los huevos del parásito, fueron recolectadas, se convirtieron en una pasta y se mezclaron con carbón activado (MARILAND®). Esta mezcla se colocó en placas de Petri y se dejaron incubando a 28°C durante al menos 5 días, cuando ya eran visibles las larvas eclosionadas, y se podía comenzar el ciclo.

## 2. Infección de ratones y recuperación de gusanos

Para obtener los gusanos en el estadio adulto (L5), se inyectaron por vía subcutánea ratones C57BL/6 con 600 larvas en estadio infectivo (L3) de *N. brasiliensis*. A los 7 días post-infección, se extrajo el intestino delgado, al cual se le realizó un corte longitudinal y se incubó en PBS a 37°C por más de 2 horas en coladeras para que separara los gusanos. Luego estos gusanos fueron aislados de los restos de intestino y heces, con ayuda de un microscopio óptico.

## 3. Obtención de los productos de excreción-secreción de *N. brasiliensis* en diferentes estadios

Para obtener los ESP de los gusanos en el estadio L3, se aislaron los gusanos del carbón activado mediante aparato de Baermann y se lavaron 5 veces con 15-20 ml de solución de lavado 1 (NES Wash 1: PBS con Gentamicina (0.2mg/mL) (SON'S) y Penicilina-Estreptomicina (GIBCO)) y luego 3 veces con

15-20 ml de una solución de lavado 2 (NES Wash 2: RPMI 1640 (Sciencell) con Gentamicina (0.2mg/mL)(GIBCO) y Penicilina- Estreptomina). Se contaron los gusanos con ayuda de un microscopio óptico y se cultivaron a 37°C en una solución de cultivo (NES culturing solution: RPMI con gentamicina (0.1mg/mL), penicilina-streptomina, glutamina y glucosa 1% (SIGMA)) a una concentración de 10000 gusanos L3/mL.

Para obtener los ESP de los gusanos en el estadio adulto (L5), una vez aislados como se mencionó en el acápite 2, se lavaron siguiendo los mismos pasos que para el estadio L3, pero se cultivaron a una concentración de 100 gusanos L5/mL.

En ambos caso se tomó el sobrenadante cada 2 días durante una semana y luego se conservó a -20°C hasta su uso. Se midió la concentración por el método colorimétrico de Lowry.

#### **4. Técnicas moleculares**

##### **4.1. Determinación de la concentración de proteína**

Para determinar la concentración proteica se utilizó el ensayo colorimétrico de Lowry, siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad). Para preparar la curva de calibración se utilizó un rango de concentración de 0.0125mg/mL a 2mg/mL de Seroalbumina bovina (BSA) y la absorbancia fue leída a 750nm.

##### **4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE bajo condiciones estándar de la siguiente manera: SDS-PAGE al 12% - Gel de resolución: mezcla de acrilamida al 12% (p/v), 0.4 M de Tris base, pH 8.8, 0.1% de persulfato de amonio, 0.1% (v/v) de N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina (TEMED) y 0.1% (p/v) de SDS. Gel de concentración: mezcla de acrilamida al 5% (p/v), Tris pH 6.8, 0.1% de persulfato de amonio, 0.04% (v/v) de TEMED y 0.1% (p/v) de SDS. Las muestras de proteínas se hirvieron durante 5 minutos en

un tampón de carga SDS (0.1 M de sacarosa, 3% (p/v) de SDS, 62.5 mM de Tris base, pH 6.9, 2 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 0.05% (v/v) de β-mercaptoetanol, 0.0025% (v/v) de azul de bromofenol) y se cargaron en el gel. Las muestras se separaron en un tampón de corrida SDS-PAGE (MES) a una voltaje constante de 100 V y temperatura ambiente utilizando una cámara de electroforesis mini- PROTEAN Tetra (Bio-Rad), hasta que el frente del tinte alcanzó la parte inferior del gel. Después de la electroforesis, las proteínas se visualizaron ya sea tiñendo con plata o transfiriéndolas a membranas de nitrocelulosa.

#### **4.3. Tinción de Plata**

Se incubó el gel con la solución de fijación (50% metanol, 12% ácido acético, 0.02% de formaldehído) en agitación suave durante al menos 60 minutos. Se lavó el gel con etanol al 50% varias veces durante unos 10 minutos. Posteriormente, se incubó un minuto con tiosulfato de sodio (0.2 mg/mL) y se lavó con abundante agua destilada. Luego se equilibró el gel con nitrato de plata (2mg/mL, 0.03% de Formaldehído) durante 45-60min. Se lavó el gel con agua destilada varias veces durante unos minutos y se agregó la solución reveladora (carbonato de sodio 60 mg/mL, tiosulfato de sodio 0,0004 mg/mL) y agitó suavemente hasta que aparecieron las bandas. Para detener la reacción se añadió la solución de paro (Ácido acético 50%).

#### **4.4. Western Blot**

Las muestras de proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE al 10% (Bio-Rad), según se describió anteriormente (acápite 5), y luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando una celda de transferencia electroforética (Bio-Rad). Antes de la transferencia, las membranas, los geles de poliacrilamida y otros componentes de transferencia fueron equilibrados en un tampón de transferencia (25 mM de Tris base, 192 mM de glicina y 20% (v/v) de metanol). La transferencia electroforética de proteínas se llevó a cabo durante 90 minutos a una corriente constante de 400 mA en un tampón de transferencia en hielo. Después de la transferencia, las membranas fueron incubadas en un tampón de

bloqueo (TBS con 2.5% de leche descremada) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario (anti-polyHistidina, Invitrogen, PA1.983B) en TBS con 2.5% de leche en polvo y 0.1% de Tween 20 durante la noche a 4°C. Se utilizó el anticuerpo de conejo anti-HisTag a una dilución de 1:1000. Después de tres lavados de 10 minutos con 0.1% de Tween 20 en TBS a temperatura ambiente, las membranas fueron incubadas posteriormente con un anticuerpo secundario anti-conejo (anti-rabbit, ThermoFisher, dilución 1:10000) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos con 0.1% de Tween 20 en TBS. Los anticuerpos fueron visualizados mediante Western Blot Chemiluminescence HRP Substrate (Takara).

#### **4.5. Extracción de ARN de *Nippostrongylus brasiliensis***

Se homogenizaron entre 18000-20000 larvas L3 de *N. brasiliensis* en 200 µl de TRIzol (Ambion). Después de centrifugar a 12.000 g durante 2 min para eliminar los residuos, se añadieron 100 µl de cloroformo (IBI SCIENTIFIC) al sobrenadante. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 15 min, las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4°C. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo que contenía 2 µl de glicógeno (Invitrogen). Se añadieron 250µl de isopropanol (SIGMA-ALDRICH). Se dejó precipitar a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 g por 10 min. Se lavó el pellet con 500µl de etanol/DEPC al 75%. Se centrifugó a 12 000 g durante 10 min y se dejó secar el pellet durante 10 min. El pellet se resuspendió en 20 µl de agua MilliQ. Luego se determinó la concentración por Nanodrop.

#### **4.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa (RT-PCR)**

Para obtener los ADN complementarios (cDNA) se realizó la reacción de transcripción inversa siguiendo las instrucciones del kit de la SuperScript™ II RT (Invitrogen). Brevemente, 1 µg de ARN total se mezcló con 1 µl de cebador oligo-

dT (500µg/mL), 1 µl de dNTP MIX (10mM cada dNTP) y se enrasó hasta 13 µl con agua destilada. La mezcla se calentó a 65°C durante 5 minutos y luego se enfrió rápidamente en hielo. Se añadieron a continuación los siguientes componentes: 4 µl de tampón de reacción (5x First Strand Tampón), 2 µl de ditiotreitól (0.1M). Esta mezcla se incubó 2 min a 42°C. Posteriormente, se añadió la SuperScript II RT (0.2 µl, 50 unidades). La muestra se incubó durante 1 hora a 42°C y se inactivó a 70°C por 15 minutos.

#### **4.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Las PCR, se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl que contenía 2.5 U de la Taq polimerasa de ADN (Invitrogen), 1x tampón PCR, 0.25 mM de cada dATP, dTTP, dCTP y dGTP, y 10 µmoles de cada cebador, así como la cantidad indicada de ADN molde. Las reacciones de amplificación se realizaron de la siguiente manera:

Para la amplificación del cDNA de SCP-2, checar su clonación e inserción al b́acmido (genoma del Baculovirus):

- (1) 95°C durante 3 minutos
- (2) 95°C durante 30 segundos
- (3) 58°C durante 1 minuto
- (4) 72°C durante 1 minuto. Repetir los pasos (2) al (4) durante 35 ciclos
- (5) 72°C durante 5 minutos

Para linearizar el vector pFastBac Dual:

- (1) 95°C durante 3 minutos
- (2) 95°C durante 30 segundos
- (3) 60°C durante 7 minutos
- (4) 72°C durante 1 minuto. Repetir los pasos (2) al (4) durante 35 ciclos

(5) 72°C durante 5 minutos

## **5. Expresión y purificación de proteína recombinante en sistema de expresión de Baculovirus**

### **5.1. Clonación**

El gen de interés se insertó en el vector pFastBacDual mediante la tecnología de In-Fusion. Brevemente, se amplificó el gen de interés a partir de cDNA obtenido de *N. brasiliensis* en el estadio L3 y se linearizó mediante PCR el vector pFastBacDual (acápite 10). Los cebadores utilizados se diseñaron de manera que los extremos de los amplicones del gen de interés y del vector fueran complementarios. Se purificaron los amplicones obtenidos a partir del gel de agarosa y fueron incubados con una exonucleasa 3`-5` para generar extremos cohesivos y luego se transformaron *E. coli* DH5α con este plásmido. A las colonias seleccionadas se les realizó una PCR con cebador específico por el gen de interés (Nb-SCP-2 forward) y otro por el vector (SV40 reverse) para checar la inserción del gen. También para comprobar esta inserción se realizó una incubación con enzimas de restricción (HindIII y BamHI) cuyos sitios de restricción flanqueaban el gen insertado. El plásmido fue purificado mediante MiniPrep.

### **5.2. Obtención del cósmido de Baculovirus y transfección de las células de insectos Sf9**

A partir del plásmido clonado, se transformó la cepa de *E. coli* DH10Bac, las cuales esta modificadas genéticamente para que inserten el gen de interés en el genoma del Baculovirus (bácmido). A las colonias seleccionadas se les comprobó la inserción del gen de interés en el cósmido mediante PCR, utilizando un cebador específico del inserto (Nb-SCP-2 forward) y otro del cósmido (M13 reverse).

A partir del cósmido purificado, se lipotransfectaron células de insecto SF9. Brevemente, se diluyó el cósmido en un volumen de medio de cultivo sin suero según las recomendaciones del fabricante del agente de transfección lipídica

(Cellfectin). Se mezcló el ADN diluido con el agente de transfección lipídica en un tubo de microcentrífuga y se incubó durante 15-30 minutos a temperatura ambiente para formar el complejo lipofectante. Las células SF9 se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo sin suero para obtener una densidad celular de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/mL. El complejo lipofectante se añadió a las células y se mezcló suavemente. Se incubaron a 27°C durante 4-6 horas para permitir la transfección. Después del período de incubación, se agregó suero fetal bovino para alcanzar una concentración final del 10% y continuó incubando durante un período adicional de 48 a 72 horas, hasta que algunas células fluorescieran ya que el cósmido poseía el gen de la proteína verde fluorescente (GFP, singlas del inglés).

### **5.3. Expresión de la proteína recombinante en células de insectos**

A partir del sobrenadante de las células transfectadas, donde se encuentran los nuevos Baculovirus formados, se infectaron nuevas células Sf9 o Hi-5 en una relación de 10-12  $\mu$ L de Baculovirus por cada 100 mL de células SF9 o Hi-5. Se dejó este cultivo 72 horas a 28°C en agitación y luego se centrifugó 3000g, 10 min, para coleccionar las células. El pellet se conservó a -70°C hasta su uso.

### **5.4. Purificación de la proteína recombinante**

Partiendo del pellet de células Sf9 o Hi-5, se lisaron dichas células con tampón de lisis (50mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300mM NaCl, 10mM Imidazol, 1% de NP-40, pH=8) en una relación 4mL por cada  $20 \times 10^6$  células, en una incubación de 10 minutos en hielo. Se centrifugó 3000g, 10 minutos y se conservó el sobrenadante. Posteriormente, 10 mL del sobrenadante se dejó fluir a gravedad por 5ml de una columna de Ni-NTA (Qiagen). Se lavó la columna con 20 mL de la solución de lavado (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH=8) y se eluyó en 5 volúmenes de 5mL con la solución de elución (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 120 mM Imidazol, pH=8). Luego se cambió el tampón donde se encontraba la elución mediante diálisis (membrana de 6-8 kDa) a tampón de fosfato (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH=7). Luego toda la solución dializada

se dejó fluir a gravedad en una columna de 1.5mL Carboximetil celulosa (Protein-Pak™ CM 15HR). Se lavó con 5 volúmenes de columna con el tampón de lavado (tampón de fosfato pero con 350mM de NaCl) y se eluyó con 5 volúmenes de columnas con tampón de elución (tampón de fosfato pero con 420 mM de NaCl)

## **6. Ensayo de inflamación Bolsa de Aire (Air Pouch)**

Para evaluar *in vivo* si la proteína Nb-SCP-2 poseía la capacidad de reclutar leucocitos se utilizó el ensayo de Bolsa de Aire (Lu y col., 2020). Brevemente, en el día 0 se anestesian completamente los ratones con 30% de isoflurano (diluido en propilenglicol). Mantener anestesiado al ratón durante el procedimiento, introduciendo la cabeza en un Tubo Falcon de 50 mL conteniendo algodón con la solución de isoflurano 30%. Usando un filtro de 0.22 µm conectado a una jeringa de 5 mL se obtiene un volumen de 3 mL de aire esterilizado y se administra subcutáneamente el aire esterilizado utilizando una aguja de 27 G x 13mm. En el día 4, se inyecta 3 mL adicionales de aire esterilizado en el bolsillo de aire previamente establecido para mantener la bolsa de aire como se describió. En el día 7 se inyecta diferentes tratamientos (100 µg de Nb-SCP-2 y 300 µg de lisado de células insecto Hi-5) en la bolsa de aire: se inyecta 1 mL de PBS al grupo control negativo y 1 mL de LPS a 1 µg/mL al grupo control positivo para inducir la inflamación local. Después de 6 horas post-tratamiento, se anestesian completamente los ratones con 30% de isoflurano. Para cada bolsa de aire, se lava con 1 mL de tampón de lavado (PBS) y se recoge el exudado inflamatorio en un tubo de centrifugación de 15 mL. Se vuelve a lavar la bolsa de aire con 2 mL de tampón de lavado (PBS) 2 veces y se recupera el exudado inflamatorio en el mismo tubo de centrifugación. Se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y resuspenden las células en 0.5 mL de tampón de lavado (PBS). A partir de esta suspensión, se realiza el conteo celular y se analizaron diferentes poblaciones celulares por citometría de flujo, usando los anticuerpos de la Tabla 1: Zombie, CD11b, CD45, Siglec-F, F4/80, Ly6G, CD3, CD4, CD8.

Tabla 2 Lista de anticuerpos usados en citometría de flujo

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon
Zombie Aqua	-	-
Anti-CD11b	PB	M1/70
Anti-CD45.2	PE-Dazzle	104
Anti-Siglec-F	PE	E50-2440
Anti-F4/80	PE-Cy7	BM8
Anti-Ly6G	APC	1A8
Anti-CD3	FITC	UCHT1
Anti-CD4	PE-Cy5	GK1.5

### 7. Inmunización de ratones con la proteína recombinante y reto con *N. brasiliensis*

Para evaluar si la proteína Nb-SCP-2 podía generar una respuesta inmune de memoria contra *N. brasiliensis*, se inmunizaron ratones Balb/C hembras de 6-8 semanas con 25 µg de Nb-SCP-2 y adyuvante Alúmina en una relación 1:1, por vía subcutánea. Se inmunizaron 3 veces cada dos semanas y se les extrajo sangre: preinmune y después de cada inmunización. A los 14 días después de la tercera inmunización se retaron los ratones con 600 *N. brasiliensis* y a los 7 días se contaron los gusanos en el intestino delgado.

### 8. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) indirecto

Para determinar los anticuerpos IgG específicos a NB-SCP-2, los sueros fueron evaluados por ELISA indirecta. Microplacas de 96 pozos fueron tapizadas con 50 µL de Nb-SCP-2 a una concentración de 1 µg mL<sup>-1</sup> en 0.1 M de solución amortiguadora de bicarbonato de sodio (pH 9.2) a 4 °C durante toda la noche. Las microplacas se lavaron 5 veces con 200 µL de PBS con 0.2% Tritón X-100, se bloquearon posteriormente con 300 µL por pozo de PBS-Tritón + 5% de leche sin grasa por 1 h a 37 °C. Se repitieron los lavados y se colocó en cada pozo 50 µL de cada uno de los sueros de ratón diluidos 1:25 en solución de bloqueo, se incubaron las placas 1 h a 37 °C. Nuevamente se realizaron 5 lavados y fueron

agregados 50  $\mu$ L de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Sigma-Aldrich, USA) a una dilución 1:2000 conjugado con HRP. Colocado el anticuerpo secundario se incubaron 1 h a 37 °C. 5 lavados más se realizaron y se agregó 50  $\mu$ L a cada pozo del sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) y se incubaron a temperatura ambiente por 20 min. Para detener la reacción se agregaron 50  $\mu$ L de una solución 0.16 M de ácido sulfúrico. Finalmente, para hacer la lectura de las placas se utilizó el equipo multiskan FC 3.1 (Thermo Fisher, USA) con un filtro de 450 nm.

## **9. Bioinformática**

Los alineamientos múltiples se realizaron mediante ESPript 3.0 o ENDscript 2.0 (*Gouet y col., 2003; Robert y Gouet, 2014*). Las comparaciones entre secuencias se realizó usando BLAST. Las estructuras tridimensionales fueron predichas usando AlphaFold 2.0. Colab. Las visualizaciones se realizaron mediante Pymol™ 1.7.x.

## **10. Estadística**

Los datos fueron analizados y graficados utilizando ANOVA de una vía o T de Student, según se indique, en GraphPad Prism 8.0.1.

NOTA: En la figura 26 (Anexo), se muestra un esquema de las diferentes fases del trabajo experimental.

# V. Resultados

## 1. Identificación de un candidato a partir de los datos transcriptómicos

Los anquilostomas son parásitos que migran por diferentes tejidos y en cada uno de ellos establecen una interacción con el hospedero, donde solo en esos nichos y no en otro lugar llevan a cabo su desarrollo (Loukas y col., 2016; Hodda y col., 2022b). En el caso de *N. brasiliensis*, los tejidos por los que migra son la piel (donde es L3), el pulmón (donde se convierte en larva L4) y el intestino delgado (donde termina su desarrollo como larva L5 o adulto) (Serrano-Pinto y Licona-Limón., 2017); y en cada uno de estos tejidos el gusano debe adaptarse para poder realizar la infección. Esto conlleva a que en cada uno de estos contextos modifiquen sus ESP, modificando su transcriptoma dependiendo del estadio larvario (Logan y col., 2020). Bouchery y col, demostraron que los ESP del estadio L3 tienen la capacidad de reclutar neutrófilos de una manera quimiotáctica (Bouchery y col., 2020). Con el objetivo de identificar un candidato capaz de reclutar granulocitos y/o monocitos, nos propusimos a partir de datos obtenidos de secuenciación de RNA del gusano en cada uno de sus estadios de desarrollo (las condiciones para obtener estos datos se muestran en la Figura 4), analizar los 20 genes más expresados por cada estadio. En las Tablas 3, 4 y 5 se muestran estos genes y sus respectivas proteínas (usando la base de datos WormBase ParaSite) para los estadios L3 (piel), L4 (pulmón) y L5 (intestino), respectivamente.

En la Tabla 3 se pueden observar los 20 genes más expresados en el estadio infectivo L3. De estos, 9 no se pudieron relacionar con ningún tipo de proteína, y aunque se muestra entre paréntesis posibles tipos proteicos inferidos por alineamiento contra todos los genomas usando BLAST, los valores de significancia son muy altos como para considerarlos. No obstante, 4 de estos genes resultaron ser enzimáticos: hidrolasa  $\alpha/\beta$ , lipasa, fosfolipasa A1 y astacina; mientras 2 pertenecían a la familia SCP-TAPS. Los otros 5 genes están relacionados con proteínas con función desconocida como la K02F3.9; con funciones de adhesión como la hemaglutinina filamentosa; o con proteínas que su localización es

intracelular o en la membrana celular: actina, FbxL15 y la proteína que contiene el dominio 2 del receptor asociado a proteína G F1.

*Tabla 3. Los 20 transcritos más expresados en el estadio L3 de N. brasiliensis. Estos transcritos fueron obtenidos de la piel al cabo de 1 hora post-infección.*

Transcritos (L3)	Proteína
NBR_0002142001-mRNA-1	n-a (Chitin-binding type-2 domain-containing protein, C. brenneri, e value 0,55)
NBR_0001204001-mRNA-1	SCP domain-containing protein
NBR_0001764201-mRNA-1	n-a (Fibrocystin-L, Paragonimus westermani, e value 0,59)
NBR_0001472001-mRNA-1	Alpha/Beta Hidrolasa
NBR_0000895901-mRNA-1	Lipase_3 domain-containing protein
NBR_0001568001-mRNA-1	SCP domain-containing protein
NBR_0001082701-mRNA-1	n-a (POU domain, class 6, transcription factor 2, Strongylus vulgaris, e value 0,013)
NBR_0000189801-mRNA-1	Filamentous hemagglutinin
NBR_0000083401-mRNA-1	F-box/LRR-repeat protein 15
NBR_0000914301-mRNA-1	Phospholipase B1, membrane-associated (inferred by orthology to a human protein)
NBR_0001076501-mRNA-1	n-a (Transcription initiation factor IIB, Mesocestoides corti, e value 0,2)
NBR_0000693401-mRNA-1	Actin
NBR_0001126701-mRNA-1	Astacin domain-containing protein (Parálogo)
NBR_0001401001-mRNA-1	n-a (Phosphotransferase, Nippostrongylus brasiliensis, e value 3.1)
NBR_0000300101-mRNA-1	K02F3.9 (proteína con dominio con función desconocida)
NBR_0000707201-mRNA-1	n-a (G_PROTEIN_RECEP_F1_2 domain-containing protein, Enterobius vermicularis, e value 6.3)
NBR_0000361301-mRNA-1	n-a( Neuropeptide-like protein, Haemonchus contortus, e value 0,00079)
NBR_0000902901-mRNA-1	G_PROTEIN_RECEP_F1_2 domain-containing protein
NBR_0001039601-mRNA-1	n-a(Heat shock protein 60, Hymenolepis nana, 0.0023)
NBR_0000599901-mRNA-1	n-a (FLYWCH-type domain-containing protein, Ascaris lumbricoides, 0,43)

En el caso del transcriptoma del gusano en su estadio L4, en el pulmón, podemos apreciar en la Tabla 4 que 3 genes no pudieron ser identificados con ningún producto proteico, aunque usando BLAST se pudo inferir que 2 de ellos están relacionado con el colágeno de la cutícula y el otro con la actividad enzimática pectinesterasa. Además, se encontraron 3 proteínas que pertenecen a la familia SCP-TAPS, un inhibidor de canales de potasio, 3 proteínas relacionadas con el colágeno de la cutícula, 2 enzimas: lisozima y legumaina, y una globina, siendo esta la tercera más altamente expresada. Por otro lado, hay transcritos muy abundantes que están relacionados con proteínas intracelulares o de membrana: 2

relacionadas con proteínas nucleares, un receptor de glutamato, una proteína de unión a actina, una paramiosina, una relacionada con el desarrollo, y una mioglobina, siendo esta las más expresada.

*Tabla 4 Los 20 transcritos más expresados en el estadio L4 de N. brasiliensis. Estos transcritos fueron obtenidos del pulmón al cabo de 2 días post-infección.*

Transcritos (L4)	Proteína
NBR_0000844701-mRNA-1	Myoglobin
NBR_0000837101-mRNA-1	n-a (Pre-mRNA splicing factor, Nippostrongylus brasiliensis, e value 3.2)
NBR_0001151101-mRNA-1	Globin-like protein (inferred by orthology to a C. elegans protein)
NBR_0001655501-mRNA-1	Nuclear receptor domain-containing protein
NBR_0001247501-mRNA-1	Col_cuticle_N domain-containing protein
NBR_0002241801-mRNA-1	Nuclear pore complex protein
NBR_0001368601-mRNA-1	SCP domain-containing protein
NBR_0001156601-mRNA-1	Col_cuticle_N domain-containing protein
NBR_0001986501-mRNA-1	Paramyosin (inferred by orthology to a C. elegans protein)
NBR_0001030501-mRNA-1	Glycine rich superfamily member
NBR_0001373101-mRNA-1	SCP domain-containing protein
NBR_0000810401-mRNA-1	ketn-1 (KETtIN (Drosophila actin-binding) homolog)
NBR_0001310801-mRNA-1	n-a (PMEI domain-containing protein, Nippostrongylus brasiliensis, e value 3.1e-29)
NBR_0000542101-mRNA-1	n-a (Col_cuticle_N domain-containing protein, H. polygyrus, e value 5.9e-95)
NBR_0001883801-mRNA-1	ShKT domain-containing protein
NBR_0001355801-mRNA-1	CELF35-1 (inferred by orthology to a C. elegans protein)
NBR_0001942601-mRNA-1	Col_cuticle_N domain-containing protein
NBR_0000861301-mRNA-1	Legumain (inferred by orthology to a human protein)
NBR_0000932801-mRNA-1	Lysosyme (Inferred by ortology C. elegans)
NBR_0001368701-mRNA-1	SCP domain-containing protein

Al analizar los transcritos del gusano adulto (en el intestino delgado), observamos en la Tabla 5 que 6 de los 20 genes no pudieron ser identificados con ninguna proteína, aunque nuevamente usando BLAST inferimos la posible función de 4 de ellos: uno está relacionado con la transcripción (factor de transcripción), uno es un inhibidor de canales de potasio, otro está asociado con el colágeno de la cutícula y por último, uno tiene función de unión de lípidos. En este estadio, solo encontramos una proteína perteneciente a la familia SCP-TAPS, lo cual fue llamativo debido a que en el estudio proteómico realizado por Sotillo y col., (2014), se observó que esta familia estaba altamente representada en los ESP del gusano adulto (Sotillo y col., 2014). El transcrito más abundante resultó ser una globina, resultado similar al observado en el estadio L4. También se observó una enzima con actividad

peptidasa (Peptidasa A1). Un hecho interesante se apreció con los transcritos relacionados con el colágeno de la cutícula: se observó que en el gusano adulto hay 7 genes entre los 20 más expresados y en la larva L4 encontramos 4, lo que posiciona a estos transcritos los más abundantes entre los de mayor expresión, según nuestros datos. Los 5 genes restantes estaban relacionados con funciones como el desarrollo, ubiquitinación, respuesta a estrés, señalización y tráfico celular.

*Tabla 5. Los 20 transcritos más expresados en el estadio L5 de N. brasiliensis. Estos transcritos fueron obtenidos del intestino delgado al cabo de 5 días post-infección*

Transcritos (L5)	Proteína
NBR_0001151201-mRNA-1	Globin-like protein (inferred by orthology to a C. elegans protein)
NBR_0001253001-mRNA-1	n-a (TWiK family of potassium channels protein 7, Haemonchus contortus, e value 3.2)
NBR_0001556901-mRNA-1	Col_cuticle_N domain-containing protein
NBR_0000947601-mRNA-1	n-a (Factor de transcripción)
NBR_0000933301-mRNA-1	SCP domain-containing protein
NBR_0001654501-mRNA-1	RING-type domain-containing protein
NBR_0001354701-mRNA-1	DUF148 domain-containing protein
NBR_0001392901-mRNA-1	Col_cuticle_N domain-containing protein
NBR_0001722001-mRNA-1	n-a
NBR_0001264601-mRNA-1	Cuticle collagen dpy-5 (inferred by orthology to a C. elegans protein)
NBR_0001156501-mRNA-1	Col_cuticle_N domain-containing protein
NBR_0000611101-mRNA-1	DAZ-associated protein 2
NBR_0001770701-mRNA-1	n-a (Col_cuticle_N domain-containing protein)
NBR_0001293101-mRNA-1	n-a (ShKT domain-containing protein, Nippostrongylus brasiliensis, e value 1.3e-48)
NBR_0001600801-mRNA-1	DUF4440 domain-containing protein
NBR_0000773401-mRNA-1	Col_cuticle_N domain-containing protein
NBR_0000875901-mRNA-1	Peptidase A1 domain-containing protein
NBR_0001642601-mRNA-1	n-a (Lipocalina salivary, Nippostrongylus, proteína similar 90%)
NBR_0001493401-mRNA-1	Cuticle collagen dpy-13 (inferred by orthology to a C. elegans protein)
NBR_0000533901-mRNA-1	SHSP domain-containing protein

De manera general, en los datos transcriptómicos apreciamos que hay una alta expresión de genes relacionados con actividades enzimáticas de degradación de moléculas (7 transcritos) y pertenecientes a la familia SCP-TAPS (6 transcritos).

Estos resultados se corresponden con lo que se encontró en la literatura, donde las proteínas SCP-TAPS son de las de mayor abundancia en las secreciones de los helmintos parasitarios, seguido por varios tipos de enzimas hidrolíticas (Logan, y col., 2020). Teniendo en cuenta que el objetivo de este trabajo es investigar si existe una proteína similar a la Na-Asp-2 en los ESP de *N. brasiliensis*, tomamos los 6 transcritos de SCP-TAPS encontrados en nuestros datos (2 pertenecientes al estadio L3, 3 al L4 y 1 al adulto) para realizar nuestro estudio. Para facilitar la comprensión del trabajo nombramos las proteínas como se muestra en la Tabla 6.

*Tabla 6 Nomenclatura propuesta para los 6 transcritos de SCP-TAPS identificados en nuestros datos transcriptómicos*

Transcritos	Estadio larvario	Nombre
NBR_0001204001-mRNA-1	L3	Nb-SCP-1
NBR_0001568001-mRNA-1	L3	Nb-SCP-2
NBR_0001368601-mRNA-1	L4	Nb-SCP-3
NBR_0001373101-mRNA-1	L4	Nb-SCP-4
NBR_0001368701-mRNA-1	L4	Nb-SCP-5
NBR_0000933301-mRNA-1	L5	Nb-SCP-6

Como una primera aproximación para caracterizar los 6 transcritos de SCP-TAPS se realizó un alineamiento múltiple usando ESPript 3.0 (Figura 6A). Se observó muy poca similitud entre las secuencias, aunque los 6 residuos de cisteínas importantes en la estabilización del dominio SCP si se conservaron en todas ellas.

Posteriormente, se procedió a comparar la secuencia de aminoácidos de cada uno de los transcritos, con la secuencia de la proteína Na-Asp-2 con el objetivo de encontrar cuál podría ser similar a ella. Al realizar dicha comparación se tuvieron en cuenta dos criterios para considerar que la proteína podría ser similar: 1) que la cobertura no fuera menor al 70% y 2) que la identidad de secuencia fuera mayor al 40%. En la Figura 6B se puede observar que con el primer criterio cumplen todas

(considerando que la Nb-SCP-6 presenta una cobertura de aproximadamente 70%). Sin embargo, solo dos de estas proteínas tienen una identidad de secuencia con respecto a Na-Asp-2 mayor a 40%: Nb-SCP-2 y Nb-SCP-6, del estadio L3 y L5, respectivamente. Un aspecto a tener en cuenta es el tamaño de las proteínas. La Na-Asp-2 es una proteína de 193 aminoácidos, mientras Nb-SCP-6 tiene aproximadamente el doble de tamaño (307 aminoácidos). Esto pudiera indicarnos que probablemente sea una proteína que posee dos dominios SCP donde al menos uno de ellos es parecido en secuencia a la Na-Asp-2 o que posee un dominio SCP unido covalentemente a otro tipo de dominio. Por otro lado, la Nb-SCP-2 es de 233 aminoácidos (208 aminoácidos si se elimina el péptido señal), una longitud similar a la de Na-Asp-2, lo que nos puede llevar a pensar que esta es la proteína semejante a la de *N. americanus*.

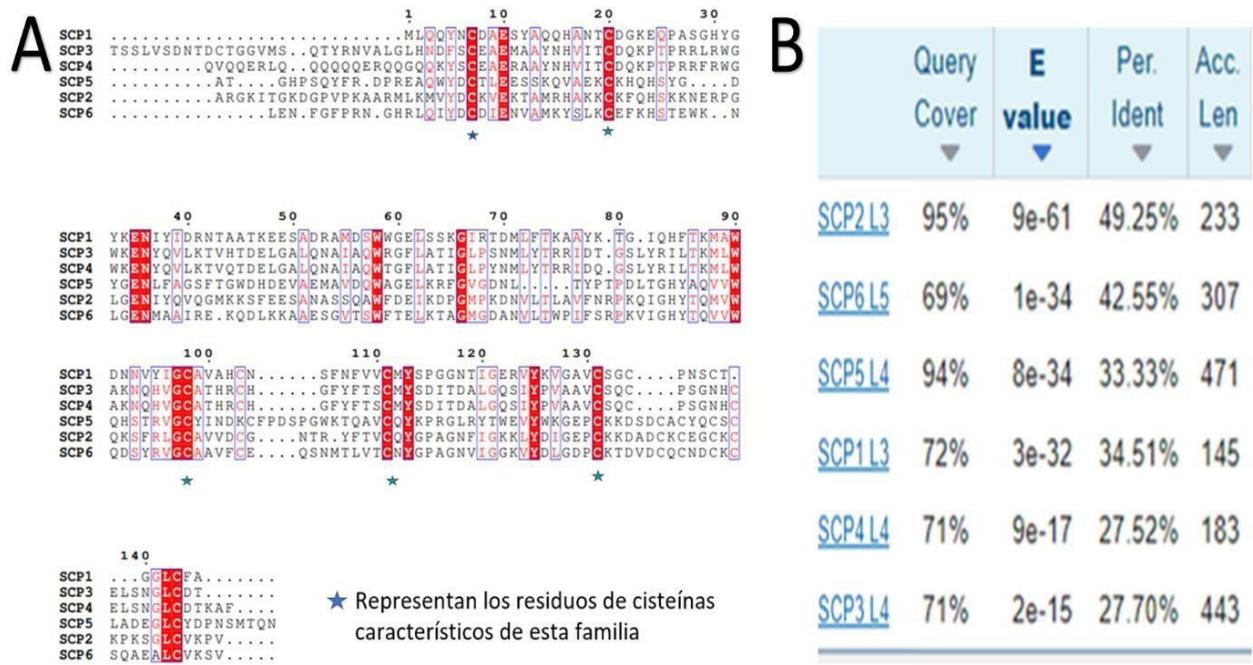


Figura 6. Comparación de secuencias aminoacídicas. A. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas entre las 6 SCP-TAPS seleccionadas de los datos transcriptómicos con ESPrpt 3.0 y B. Comparación de la secuencia de aminoácidos de los 6 transcritos SCP-TAPS con la secuencia de Na-Asp-2 mediante BLAST.

No obstante, se conoce que desde el punto de vista evolutivo se tiende a conservar la estructura de la proteína por encima de la secuencia (*Jarayaman y col., 2022*). Además, dos proteínas que presentan una identidad de secuencia por encima del 20% pueden tener iguales estructuras (*Gan y col., 2002*). Considerando lo mencionado y también las longitudes, podemos pensar que Nb- SCP-1 y 4 pudieran ser similares a Na-Asp-2, y cumplir las mismas funciones. Para solucionar esta cuestión, el próximo paso fue la predicción de las estructuras utilizando AlphaFold2 Colab de todos los candidatos (Figura 7).

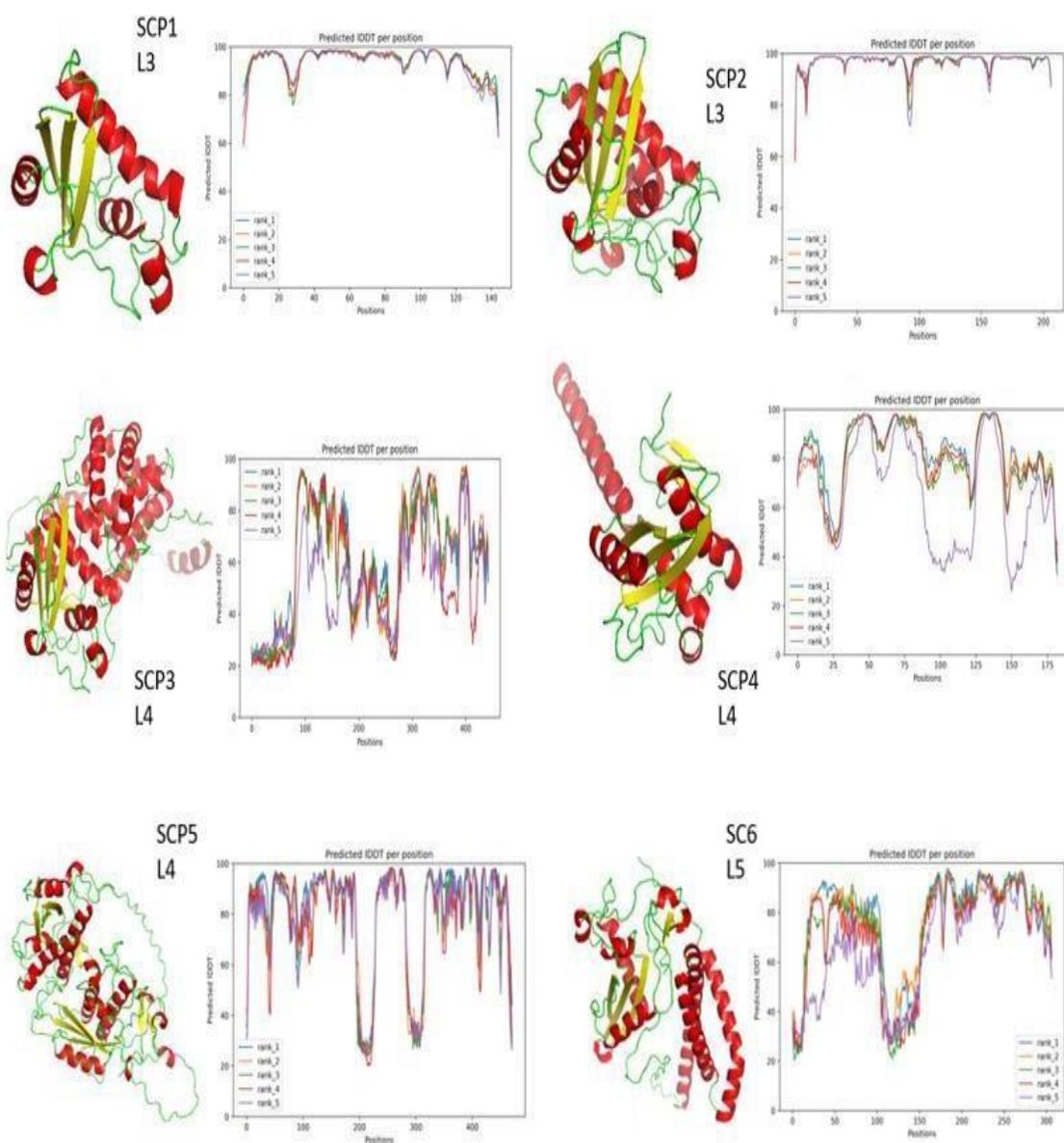
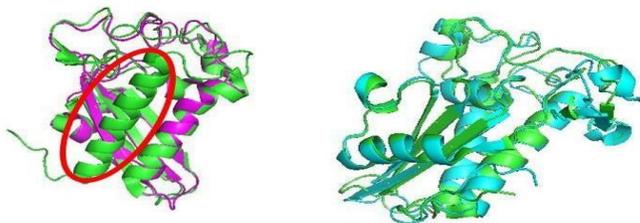


Figura 7. Predicción de las estructuras de las seis SCP-TAPS identificadas en los datos transcriptómicos por AlphaFold2 Colab con sus respectivos valores de IDDT.

En todos los casos, la estructura del dominio SCP se predijo con una alta confiabilidad, lo cual era esperado. Solo dos (Nb-SCP-1 y 2), de las seis estructuras predichas, son confiables para seguir el estudio. Sin embargo, podemos observar algunos detalles interesantes en las estructuras predichas. Primero, la proteína Nb-SCP-6, la cual mostró una alta identidad de secuencia con Na-Asp-2, posee solo un dominio SCP unido covalentemente a otro dominio conformado por tres hélices alfa (predichas con alta confiabilidad), pero el resto de la estructura no es confiable. Segundo, solo la proteína Nb-SCP-5 está conformada por dos dominios SCP. Tercero, al igual que Nb-SCP6, la proteína Nb-SCP-3 posee un dominio SCP (aunque en este caso la identidad de secuencia con Na-Asp-2 fue menor al 30%) unido covalentemente a otro dominio también conformado por hélices alfa, pero cuya predicción es poco confiable. Por último, la Nb-SCP-4 posee un solo dominio SCP unido a una prolongada hélice alfa. A pesar de la baja confiabilidad de las predicciones para estas cuatro proteínas, sus dominios SCP poseían sus características estructurales: tres hojas betas flanqueadas por hélices alfas a ambos lados.

Las dos estructuras predichas con alta confiabilidad pertenecen al estadio L3 y ambas son prácticamente el dominio SCP. Ambas presentan una cobertura por encima al 70% y una identidad de secuencia por encima al 30%. Para lograr determinar cuál de estos dos candidatos presenta mayor similitud con la Na-Asp-2, proseguimos a realizar la superposición de las estructuras predichas por AlphaFold2 Colab y la estructura cristalográfica de Na-Asp-2 (PDB: 1U53) (Figura 8)



*Figura 8. Superposición de las estructuras predichas por AlphaFold2 Colab para Nb-SCP-1 (morado) y Nb-SCP-2 (azul), con la estructura cristalográfica de Na-Asp-2 (1U53, verde). El círculo rojo indica la hélice alfa presente en Na-Asp-2 que está ausente en Nb-SCP-1. Se visualizó con Pymol™1.7.X.*

Como se puede apreciar en la Figura 8, ambos candidatos presentan una alta semejanza estructural con Na-Asp-2, conservándose casi todas las estructuras secundarias y coincidiendo en el espacio. Los valores de la raíz de la desviación media cuadrática (RMSD, del inglés Root Mean Square Deviation) para las superposiciones fue de 0,921 Å para Nb-SCP-1 y 0,448 Å para Nb-SCP-2, ambos por debajo de 1 Å. Sin embargo, un análisis más detallado de las superposiciones nos revela una hélice alfa ausente en la proteína Nb-SCP-1, que sí está presente en el caso de la Nb-SCP-2. Esta hélice alfa, junto con la hélice alfa a su lado, se ha observado que es importante para la unión de ácidos grasos, pues ambas crean una cavidad donde se ha postulado que se une palmitato. Esto no solo se ha observado para la proteína Na-Asp-2, también se encuentra presente en otras SCP-TAPS (Bm-Val-1, Hp-Val-4, Sm-Val-4) que se ha observado este fenómeno de unión de lípidos y que se les ha determinado su estructura cristalográfica (Wilbers y col., 2018).

Este análisis mediante herramientas bioinformáticas sugiere que la proteína Nb-SCP-2, al tener una estructura y una secuencia muy parecida a la Na-Asp-2, es el candidato más probable que pueda actuar como quimioatrayente de neutrófilos y monocitos. Además, su sobreexpresión se detectó en el estadio L3, mismo estadio donde se secreta la Na-Asp-2 en *N. americanus* y, por otro lado, se había demostrado que la secreción del estadio L3 de *N. brasiliensis* tiene la capacidad por sí sola de atraer neutrófilos.

## **2. Verificación de la presencia del transcrito de Nb-SCP-2 en diferentes estadios**

Una vez seleccionado el candidato, se checó mediante PCR la presencia del transcrito en diferentes estadios de *N. brasiliensis* (Figura 9). Se corroboró la presencia del transcrito en el estadio L3, mientras no se logró amplificar en el estadio adulto (L5). Curiosamente, no se logró amplificar cuando los gusanos L3 fueron incubados toda una noche a 37°C (L3a).

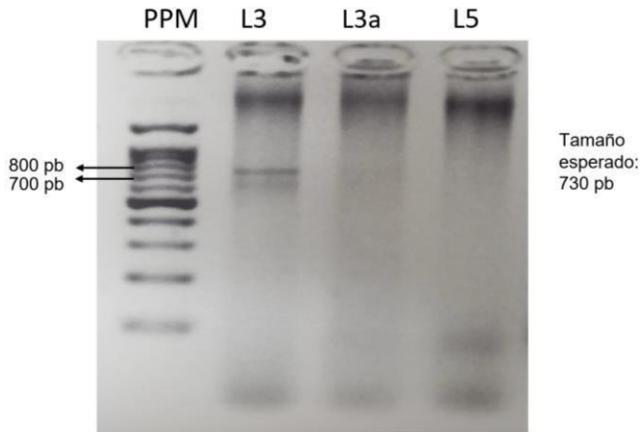


Figura 9. Amplificación mediante PCR del cDNA de Nb-SCP-2 en diferentes estadios de *N. brasiliensis*. L3: larva infectiva, L3a: larva infectiva incubada a 37°C durante toda la noche y L5: gusano adulto aislado del intestino 7 días post-infección

### 3. Clonación del gen de la Nb-SCP-2

Con el objetivo de obtener la proteína recombinante de la Nb-SCP-2, se utilizó la tecnología de In-Fusion para generar un plásmido con el gen de interés insertado. Primero se aisló por PCR el cDNA de la Nb-SCP-2 de interés (702pb) y se linearizó, también por PCR, el vector pFastBacDual (6112 pb). En la Figura 10 se muestra los resultados de la purificación de estos amplicones.

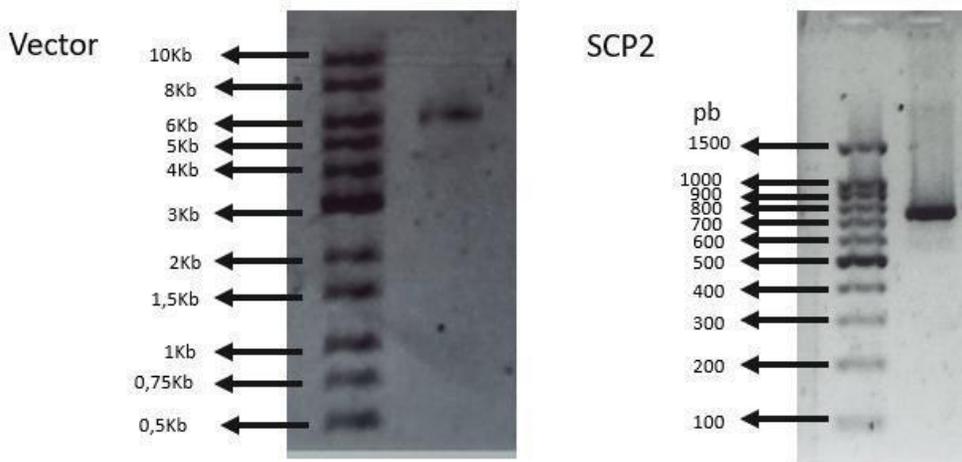


Figura 10. Purificación del amplicón del vector linearizado pFastBacDual (tamaño 6112pb) y del cDNA de Nb-SCP-2 (702pb).

Luego se insertó el gen de interés en el vector con la tecnología In-fusion y se transformaron bacterias *E. coli* (cepa DH5 $\alpha$ ). Se seleccionaron 17 colonias para comprobar por PCR la inserción correcta del gen de interés en el plásmido. Para ello se utilizó un cebador específico para el gen de la SCP2 (SCP2 forward utilizado para amplificar el cDNA de SCP2 con In-Fusion) y otro para el vector (SV40 reverse, específico de pFastBacDual), donde el tamaño esperado del amplicón era de 1300pb. (Figura 11A). Aquellas colonias que resultaron positivas (1, 3, 8, 12 y 15), se les aisló el plásmido mediante MiniPrep y para comprobar si realmente eran positivas, fueron incubadas con las enzimas de restricción HindIII y BamHI, cuyos sitios de restricción flanqueaban al inserto, esperando un tamaño del amplicón de 850pb aproximadamente (Figura 11B). Todas las colonias, excepto la 8, resultaron positivas.

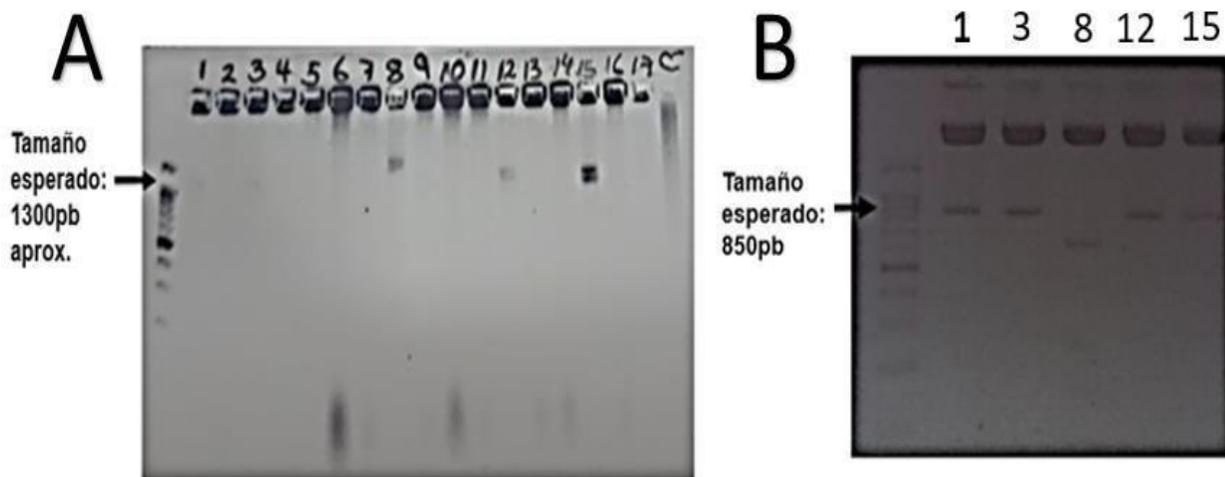
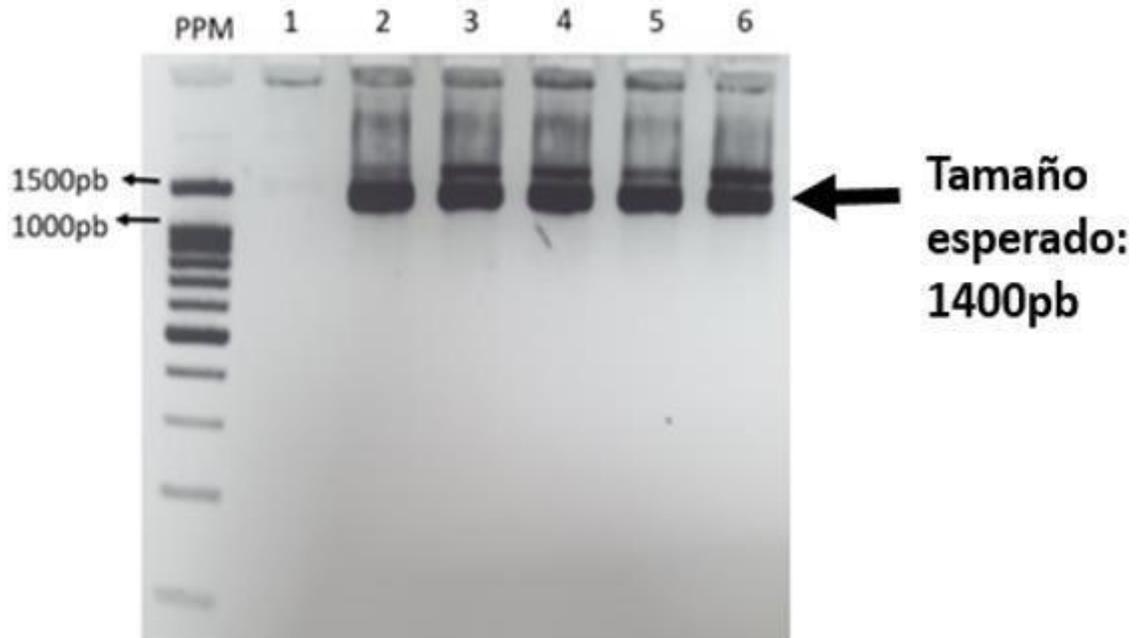


Figura 11. Verificación de la inserción del gen de interés en el vector pFastBacDual por PCR (A) y por enzimas de restricción (B).

#### 4. Inserción del gen de interés en el genoma del Baculovirus

Una vez purificado y comprobado que el plásmido pFastBacDual tenía insertado el cDNA de Nb-SCP-2, se procedió a transferir el gen insertado al bácmido del Baculovirus utilizando las bacterias DH10Bac. Para ello, se transformaron estas bacterias con el plásmido pFastBacDual y se dejó crecer en medio con Tetraciclina, Ampicillina y Kanamycina, ya que solo aquellas bacterias que

crecen en este medio son las que pueden haber realizado correctamente la transposición del gen de Nb-SCP-2 en el b́acmido (un pĺasmido muy grande que contiene el genoma del baculovirus modificado para portar un gen lacZ y un sitio de acoplamiento attTn7 insertado en la regi3n codificante lacZ). Posteriormente, se tomaron 6 colonias y se verific3 por PCR si hab́a ocurrido la inserci3n utilizando un cebador espećfico por la Nb- SCP-2 (SCP-2 forward) y otro espećfico por el b́acmido (M13 reverse), esperando un tama1o del producto de 1400pb aproximadamente (Figura 12). Adeḿs, se secuenci3 y se verific3 que no hubiese ocurrido ning3n cambio en el marco de lectura o cualquier otro tipo de mutaci3n.



*Figure 12. Comprobaci3n de inserci3n del cDNA de Nb-SCP-2 en el b́acmido mediante PCR. Cada carril representa una colonia que creci3 en el medio con ampicilina, tetraciclina y kanamicina a 37°C durante toda la noche.*

## 5. Expresión y purificación de la proteína Nb-SCP-2

Después de comprobar la correcta inserción del cDNA de Nb-SCP-2 en el báculo, se purificó mediante MiniPrep y se lipotransfectaron las células de insectos SF9, las cuales se dejaron crecer a 28°C por 72 horas. Cuando se observó que las células fluorescían (ya que el báculo contiene la proteína GFP como marcador), se centrifugó el cultivo y se utilizó el sobrenadante para realizar futuras infecciones. El sedimento fue lisado utilizando el detergente NP-40. Se centrifugó y el sobrenadante se pasó por una columna de níquel, ya que la proteína poseía una cola de histidina en el extremo C-terminal. Se conservó la solución que atravesó la columna sin pegarse (Fracción no fijada), los lavados requeridos y las eluciones. Se realizó una electroforesis desnaturalizante y Western Blot en paralelo (usando un anticuerpo específico por la cola de histidina) con las soluciones conservadas (Figura 13A y B, respectivamente).

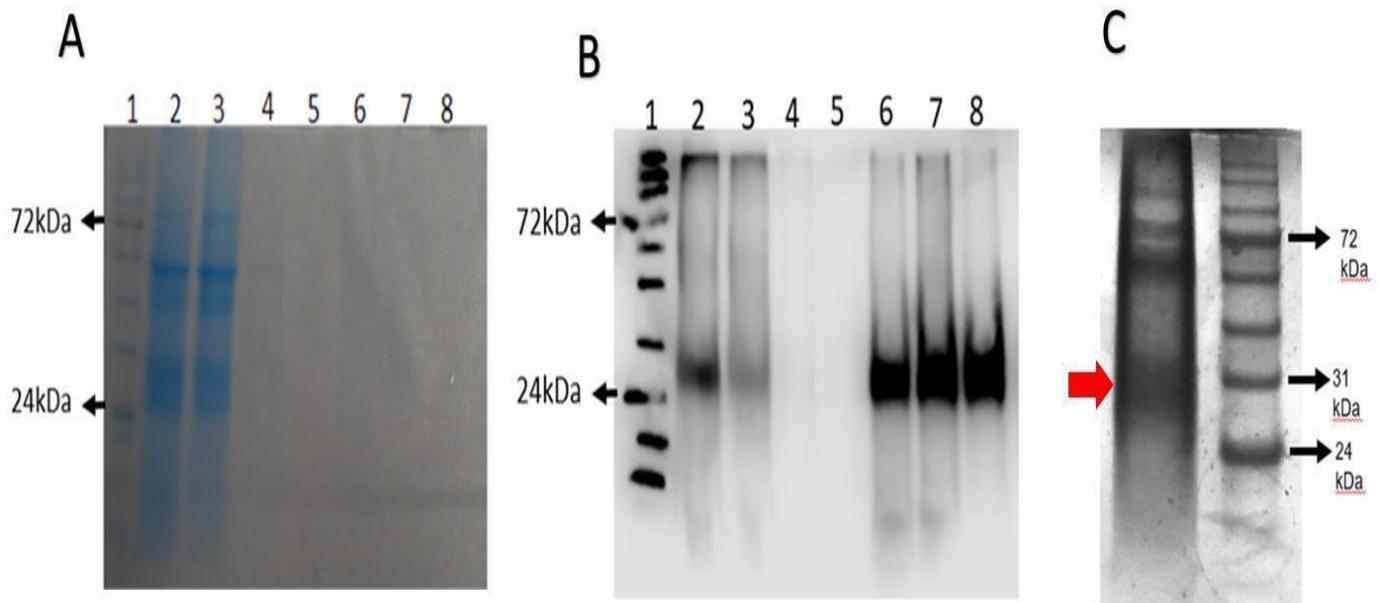
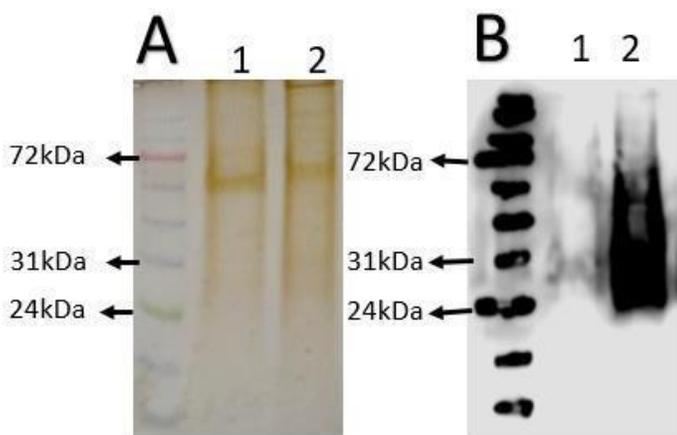


Figura 13. Verificación de la purificación mediante la cromatografía de afinidad. A. SDS-PAGE de purificación de Nb-SCP-2 de células de insecto Sf9 revelada con tinción de Coomassie. B. Western Blot de la purificación de Nb-SCP-2 a partir de células de insectos Sf9. 1: Patrón de peso 2: Extracto crudo, 3: Fracción no fijada, 4 y 5: Lavados, 6,7 y 8: Eluciones. C. SDS-PAGE de purificación de Nb-SCP-2 de células de insecto Hi-5 revelada con tinción de Plata.

En la Figura 13A se puede observar que en el extracto crudo y en la fracción no fijada aparece una banda relativamente intensa cerca de 24 kDa, pudiendo ser esta banda la correspondiente a la proteína de interés, cuyo peso se estimó de 26 kDa aproximadamente incluyendo la cola de histidina. Sin embargo, en los carriles correspondientes a los lavados y las eluciones no se puede apreciar ninguna banda a la altura esperada. Esta purificación se realizó a partir de 100 mL de cultivo de células de insecto Sf9 una concentración aproximada de  $2 \times 10^6$  células/mL. Cuando observamos la Figura 13B, podemos apreciar que la sensibilidad que nos aporta el Western Blot nos permite detectar la proteína en las eluciones. Pero, aunque observamos la presencia de nuestra proteína de interés, la cantidad obtenida es baja, de tal manera que no fue observable utilizando la tinción de azul de coomasie. Por esta razón, se decidió cambiar de las células Sf9 a Hi-5, pues estas últimas poseen una tasa de crecimiento superior a las Sf9, así como una mayor sensibilidad a la infección del Baculovirus, características que se reflejan en un rendimiento mayor en la expresión de proteínas recombinantes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que también las glicosilaciones son más complejas, lo cual pudiera modificar la estructura de Nb-SCP-2. Además, se aumentó el volumen del cultivo hasta los 500 mL a la misma concentración de célula que se había utilizado ( $2 \times 10^6$  células/mL). En la figura 13C se muestra el resultado de purificar por la columna de níquel, concentrar la elución 5 veces y utilizar la tinción de plata para visualizar la corrida electroforética. Como se puede apreciar, aparece una banda intensa entre 24 y 31kDa, lo cual coincide con el peso estimado. No obstante, la banda es un poco más alta con respecto a la observada en el Western Blot (Figura 13B), lo que nos indica que la proteína que se obtiene al usar las células de insecto Hi-5 es un poco más grande, lo cual puede deberse a la glicosilación más compleja de estas células. Por otro lado, al utilizar ImageJ, estimamos que la pureza de la proteína se encuentra entre 30-40%, lo cual es una pureza baja. En el carril se aprecian otras bandas por encima de la banda de interés, por lo que la proteína eluye junto con otros contaminantes.

Esta cromatografía de afinidad se basa en la interacción del níquel con dos anillos de imidazol (cadena lateral de la Histidina), por lo que si una proteína presenta dos Histidinas en su superficie puede también interactuar con la columna y eluir junto a la proteína de interés. En este caso, en el extracto crudo deben haber proteínas con esta característica, por lo que es necesario agregar otro paso de purificación que se base en otra propiedad. Para lograr este objetivo se añadió un paso de purificación por cromatografía de intercambio iónico que, además de permitir purificar teniendo en cuenta el punto isoeléctrico de la proteína, ofrece la capacidad de concentrar la proteína. Además, se incrementó el cultivo de las células Hi-5 hasta 850 mL (aproximadamente a  $2 \times 10^6$  células/mL).



*Figura 14. Verificación de la purificación de Nb-SCP-2 al añadir un paso de cromatografía de intercambio iónico. A. SDS-PAGE revelado con tinción de plata y B. Western Blot revelado con anti-poliHist. 1: Purificación después de columna de níquel, 2: después de columna de intercambio catiónico.*

El resultado de la purificación al añadir la cromatografía de intercambio catiónico (matriz de carboximetil celulosa) se muestra en la Figura 14, donde se observa que todavía hay contaminante (carril 2, Figura 14A). Esto indica que la proteína contaminante, que se observa cerca de 50 kDa no solo tiene la capacidad de interactuar con el níquel, sino que también es una proteína catiónica con un punto isoeléctrico similar a la Nb-SCP-2, ya que eluye a la misma concentración de sales de NaCl. En este resultado se refuerza además que la

producción de la proteína es muy baja, ya que aunque se puede detectar mediante Western Blot, no se logra visualizar por tinción de Plata.

Para los estudios que se van a mostrar a continuación, se utilizó la proteína purificada solo por columna de níquel (Figura 13C).

## **6. Evaluación *in vivo* de la capacidad de Nb-SCP-2 como proteína pro-inflamatoria**

El objetivo más importante de este trabajo es identificar un producto de la secreción de *N. brasiliensis* que sea el responsable, o que al menos contribuya, al reclutamiento de neutrófilos promovido por la secreción total de la larva L3 (*Bouchery y col., 2020*). Hasta este punto hemos identificado con herramientas bioinformáticas un posible candidato a partir de datos transcriptómicos generados en nuestro laboratorio y, además, se produjo y purificó parcialmente una proteína recombinante de este candidato. Por lo tanto, el próximo paso fue evaluar *in vivo* si esta proteína recombinante era capaz de reclutar neutrófilos.

Para cumplir con este objetivo se utilizó el modelo de inflamación Bolsa de Aire (o Air Pouch en inglés), el cual consiste en crear una cavidad subcutánea con aire estéril, donde posteriormente se inyectan los diferentes tratamientos a evaluar, lo que conlleva a que se recluten, a dicha cavidad, diferentes tipos celulares, lo cuales pueden ser colectados lavando con PBS para ser analizado por citometría de flujo. Este modelo es sencillo, rápido y no requiere del tratamiento agresivo necesario para procesar las muestras de piel, por lo que se mejora la viabilidad celular. También facilita el análisis de la citometría al evitar la contaminación con otras células de la piel que presentan una alta autofluorescencia. En la Figura 15A se representa el esquema que se tomó para realizar este experimento.

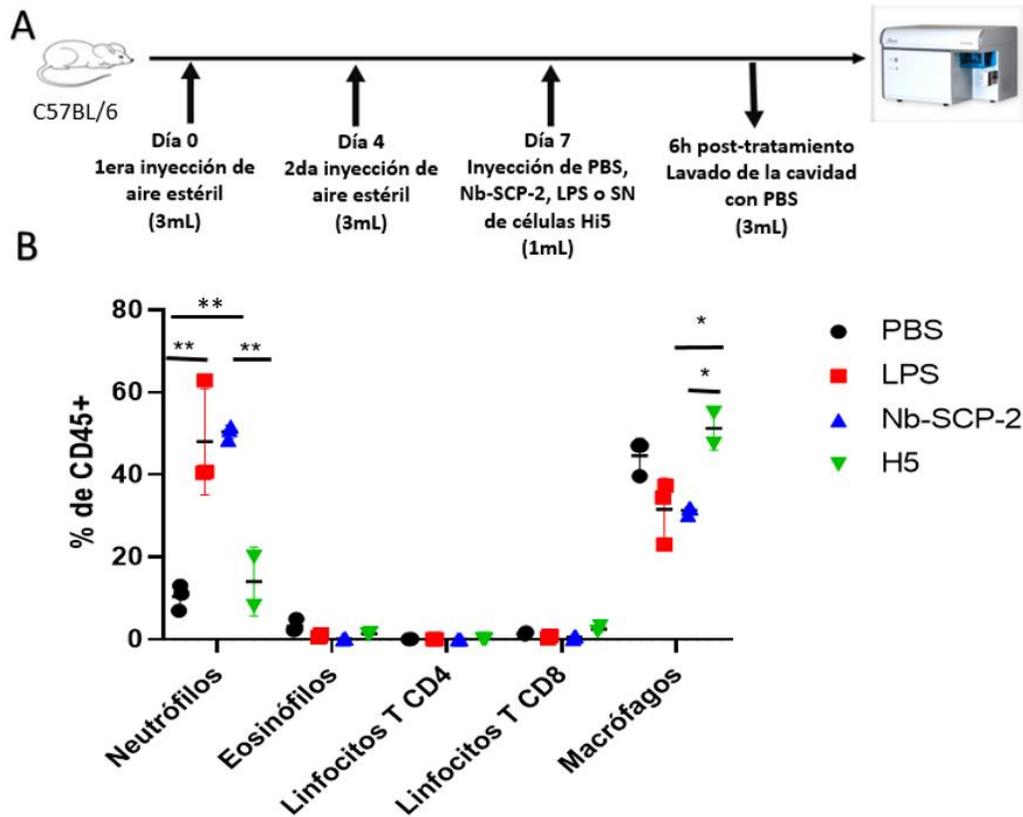


Figura 15. Evaluación de la capacidad de reclutamiento celular *in vivo* de Nb-SCP-2. A. Esquema seguido para evaluar la inflamación inducida por Nb-SCP-2 en el modelo de Bolsa de Aire B. Frecuencia de varios tipos celulares reclutados en la cavidad. Tratamientos: 1-LPS: 1 $\mu$ g/bolsa de aire, 2-Nb-SCP-2: 100 $\mu$ g/bolsa de aire y 3- H5 (lisado de células de insecto Hi-5 infectadas con un Baculovirus que no expresa Nb-SCP-2): 300 $\mu$ g/bolsa de aire. Se usó PBS de control negativo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  Test usado: One-way ANOVA.  $n = 2-3$  por tratamiento.

En la Figura 15B, se muestra la frecuencia de los diferentes tipos de células analizados, con respecto a la CD45 positivas. La estrategia de análisis usada se muestra en Figura 20 (Anexos). Como se puede apreciar, al inyectar 300  $\mu$ g de Nb-SCP-2 (la cantidad real de proteína, teniendo en cuenta que está pura en un 30%, es 100  $\mu$ g) en la cavidad generada, se observa un reclutamiento de neutrófilos de una manera similar al grupo tratado con LPS (control positivo). Para descartar que este efecto estaba siendo realizado por los contaminantes y no por Nb-SCP-2, se utilizó como control un lisado de células de insecto Hi-5 que fueron infectadas con un Baculovirus que expresaba otra proteína, diferente a Nb-SCP-2, que se sabe que no tiene acción inflamatoria (la proteína P10 de Baculovirus). Al inyectar 300  $\mu$ g de este lisado en la cavidad no observamos

reclutamiento de neutrófilos, incluso la frecuencia es similar al tratamiento con PBS (Control negativo). Este resultado indica que nuestra proteína podría ser la responsable del reclutamiento de neutrófilos, como se había predicho. Por otra parte, al analizar las poblaciones de linfocitos T CD4, linfocitos T CD8 y eosinófilos en el lavado de la cavidad, no se observa ninguna diferencia entre los diferentes tratamientos y el grupo PBS (Control negativo). En el caso de los valores de porcentaje de macrófagos detectados en el lavado de la cavidad, fueron significativamente menores en los grupos tratados con LPS y Nb-SCP-2 con respecto al grupo que se le inyectó el lisado de la célula Hi-5 y PBS. Adicionalmente, no se observó una diferencia significativa entre estos dos último grupos. En conjunto estos resultados sugieren que el reclutamiento que promueve Nb-SCP-2 es específico por los neutrófilos.

## **7. Evaluación de la capacidad protectora de Nb-SCP-2 contra la infección de *N. brasiliensis***

Uno de los problemas que enfrenta la humanidad contra las infecciones de los anquilostomas es la ausencia de vacunas en el mercado. Varios son los grupos que están intentando desarrollar una vacuna que induzca una potente respuesta antihelmíntica (*Hadelman y col., 2020*). Con el objetivo de probar si Nb-SCP-2 es capaz de generar una respuesta protectora contra la infección de *N. brasiliensis* se analizó la respuesta humoral inducida por la inmunización con dicha proteína. En la Figura 16A, se representa el esquema de inmunización que se siguió para este estudio. En la Figura 16B se muestra el resultado de la respuesta humoral inducida por la inmunización con Nb-SCP-2. Se puede observar que se requirieron tres inyecciones para obtener altos títulos de anticuerpos contra Nb-SCP-2. En la primera inmunización no se observó diferencia significativa con respecto al grupo que se le administró PBS. Luego de la tercera inmunización, se infectaron los ratones con 400 gusanos cada uno, y se contó el número de gusanos en el intestino a los 7 días (Figura 16C). No se observó diferencia estadística significativa entre los grupos, por lo que la inmunización con esta proteína no fue capaz de levantar una respuesta

antihelmíntica que proteja al hospedero de la infección. En otro experimento independiente (Figura 25, Anexo), tampoco se observó diferencias entre los grupos en el conteo de gusanos en el intestino ni en el número de huevos por gramo de heces. Estos resultados sugieren que la inmunización con Nb-SCP-2 no es capaz de inducir una respuesta protectora contra la infección de *N. brasiliensis*, aunque se requieren otros experimentos para realmente confirmar esta idea.

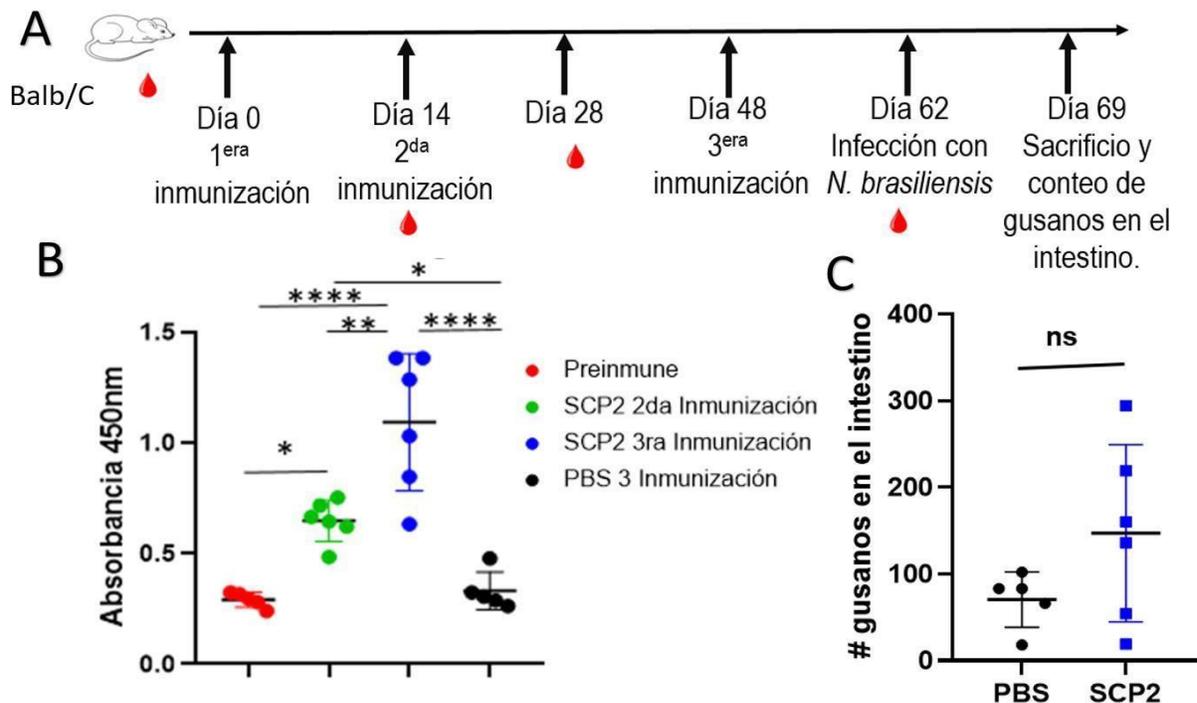


Figura 16. Evaluación de la respuesta humoral inducida por la inmunización con Nb-SCP-2. A. Esquema de inmunización. Las gotas de sangre indican los días donde se les extrajo a los ratones sangre para evaluarla. La vía de administración usada fue la vía s.c. Tratamientos: PBS (200 $\mu$ L): control negativo, SCP2 (200 $\mu$ L): grupo inmunizado con Nb-SCP-2 (conc=0,15mg/mL). B. ELISA indirecto para cuantificar anticuerpos específicos contra Nb-SCP-2. C. Conteo de gusanos en el intestino al día 7 post-infección. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0,0001, ns: sin diferencia significativa. Test usado: One-way ANOVA

## VI. Discusión

Las infecciones por parásitos helmínticos en humanos son un problema de repercusión mundial, principalmente afectando a los niños de los países en vías de desarrollo, presentando síntomas como la anemia y el deterioro del desarrollo (Loukas y col., 2016). Por otro lado, estos parásitos también son causa de grandes estragos en la ganadería y la agricultura, con la consecuente afectación en la economía. Además, se añade el hecho de que varias infecciones por helmintos pueden transmitirse de los animales al ser humano (zoonosis). Con respecto a su rango de hospederos, algunas especies de helmintos no discriminan entre humanos y animales en absoluto, mientras que otras tienen ciclos de vida complejos que requieren al ser humano como hospedero final o intermedio para completar su ciclo de vida (Loukas y col., 2016). De manera curiosa, también se ha observado una correlación inversa entre la incidencia de estos parásitos y el desarrollo de enfermedades alérgicas, fenómeno que se resume en la “Hipótesis del viejo amigo”. Esta teoría propone que en tiempos donde no existían los altos estándares de sanidad de la actualidad, era frecuente este tipo de infección a edades tempranas, por lo que los humanos co-evolucionamos con los anquilostomas de tal manera que nuestro sistema inmune podría utilizar a estos parásitos para regular la respuesta inmunológica y evitar responder de manera exacerbada (lo que da lugar a las alergias) (Rook, 2023). Esto abre una gama de posibilidades para generar tratamientos para este tipo de enfermedades. Sin embargo, apenas en las últimas décadas es que se ha comenzado a profundizar en los mecanismos que intervienen en la interacción parásito-hospedero, por lo que se hace imperante investigar en esta dirección.

Este trabajo parte de la premisa que los helmintos requieren del hospedero para completar todo su ciclo de vida, lo cual implica que la interacción entre parásito-hospedero es única, de tal manera, que es ese contexto y no en otro donde este patógeno sobrevive. Esto a su vez conlleva a que, como producto de la co-evolución, los helmintos han desarrollado herramientas para modular al sistema inmunológico y, simultáneamente, utilizar al hospedero en su beneficio. Ya ha sido

ampliamente reportado en la literatura que las vías de comunicación entre el parásito y el hospedero tiene lugar a través de los ESP de los primeros (*Maizels y col., 2018*). Con la llegada de las ciencias ómicas, muchos grupos de investigación comenzaron a caracterizar la composición de las secreciones de los gusanos. De manera general, estos estudios han reportado que los ESP varían entre especies y estadio larvario (*Logan y col., 2020*).

Nuestro laboratorio cuenta con un estudio transcriptómico de cada uno de los estadios larvarios de *N. brasiliensis* (Figura 4). Se escogió este helminto por su ciclo de vida tan parecido al del *N. americanus* y *A. duodenales*, los dos anquilostomas que más afectan a los humanos. Al analizar los transcritos más abundantes en cada uno de los estadios del *N. brasiliensis* observamos que, tal como se reporta en la literatura, la composición es diferente entre ellos. Esto es lógico de esperar, pues el ciclo de vida de este parásito requiere migrar por tres tejidos diferentes, donde cada uno de ellos tiene sus características particulares y el gusano para poder adaptarse a cada una de ellas, modificando la expresión de sus genes.

Sotillo y col., (2014), publicaron un estudio proteómico de la composición de los ESP de *N. brasiliensis* en dos de sus estadios: L3 y adulto. Con el objetivo de seleccionar solo aquellos transcritos que fuesen secretados, se evaluó si nuestros datos transcriptómicos coincidían con los proteómicos de dicho estudio. Para nuestra sorpresa, casi ninguna proteína coincidía con el estadio L3 y sí con los estadios L4 y L5 (a pesar que no se contaba con el proteoma de la secreción del estadio L4). También ocurrió que proteínas detectadas en el estadio L3, coincidía con transcritos del estadio adulto. Estas contradicciones pudiesen ser un artefacto debido a que la secreción L3 estudiada en dicha publicación, se obtuvo de incubar larvas aisladas directamente de las heces, sin tener contacto con el hospedero, por lo que no recibieron todas las señales necesarias para que ocurriera una modificación en la expresión de sus genes, como si debe haber ocurrido con nuestros datos, donde los transcritos del estadio L3 se obtuvieron de la piel infectada por el gusano (*Sotillo y col., 2014*). Por estas razones mencionadas, los estudios que se realizaron en este trabajo, solo fueron con los transcritos, obviando los datos proteómicos.

Al analizar los genes más expresados durante la migración por la piel, encontramos que entre los 20 transcritos más abundantes hay varias enzimas con actividad hidrolítica: hidrolasa  $\alpha/\beta$ , lipasa, fosfolipasa B1 y astacina. Excepto la fosfolipasa B1 que está asociada a la membrana, las restantes son de naturaleza soluble y no es de extrañar encontrar estas enzimas en abundancias, ya que también se han observado en el proteoma de las secreciones de varios anquilostomas (*Logan y col., 2020*). Por ejemplo, las astacinas son unas metaloproteasas que pueden estar implicadas en la migración de la larva al hidrolizar la matriz extracelular del tejido, facilitando su movimiento. Las lipasas, relacionada con la degradación de lípidos, pudiera servir para obtener ácidos grasos del medio, pues es conocido que *N. brasiliensis* es un helminto que carece de enzimas para sintetizar *de novo* varios lípidos. En el caso de la hidrolasa  $\alpha/\beta$ , se ha reportado en *H. contortus* que esta proteína puede suprimir la respuesta de la células T (*Lu y col., 2020*). Todas pueden jugar un papel en la adaptación del estadio L3 a la piel.

En el caso de los transcritos más abundantes en el pulmón (L4) y el intestino (adulto), encontramos que uno de ellos se corresponde a las globinas. Se ha reportado que las globinas de *N. brasiliensis* tienen afinidades por el oxígeno 100 veces mayores que las hemoglobinas del hospedero roedor, lo que les permite obtener suficiente oxígeno para sus necesidades metabólicas, lo cual les permite colonizar entornos anóxico, como el tracto intestinal (*Blaxter y col., 1994*). También hay presente enzimas hidrolíticas, como la legumaína y la peptidasa A1 que pueden estar implicadas en actividades como la nutrición del helminto (*Dalton y col., 2009; Kang y col., 2019*). En estos dos estadios también se encontraron transcritos de inhibidores de canales de potasio (ShKT): se sabe que los canales de potasio en las células T son cruciales para la activación y proliferación de estas, por lo que *N. brasiliensis* puede estar sobreexpresando estos inhibidores para suprimir la respuesta inmune adaptativa (*Maizels y col., 2018*). Todos estos datos nos sugieren que *N. brasiliensis* modifica su expresión génica con el objetivo de adaptarse a cada tejido.

Muchos trabajos proteómicos con los ESP de varios anquilostomas ubican a la

familia de proteína SCP-TAPS como la más abundante (*Logan y col., 2020*). En nuestros datos transcriptómicos también encontramos que esta familia es una de las más expresadas: entre todos los estadios se identificaron 6 proteínas pertenecientes a esta familia. El alineamiento múltiple entre ellos nos sugiere que, a pesar de presentar las cisteínas características del dominio SCP, estas proteínas son diferentes y probablemente con funciones distintas. Incluso, al comparar las estructuras predichas por AlphaFold2 Colab de cada una de ellas, podemos observar que mientras algunas consisten prácticamente solo del dominio SCP (Nb-SCP-1, 2 y 4), otras parecen haber adquirido nuevos dominios (Nb-SCP-3 y 6) o haber duplicado el dominio SCP (Nb-SCP-5). Esto es un indicativo de que la evolución ha presionado a estas proteínas para que diversificaran sus funciones, por lo que pudiésemos hipotetizar que son proteínas moonlight. En la literatura hay poca información disponible sobre las funciones que pudieran estar realizando estas proteínas en el parasitismo de los helmintos. Se ha visto que pueden regular negativamente a los linfocitos B o inhibir la agregación de las plaquetas (*del Valle y col., 2003; Tribolet y col., 2015*). También se han reportado funciones que resultan antagónicas: el NIF, secretado por el *A. caninum*, se une a CR3 para evitar el reclutamiento de estas células al sitio de infección, mientras se ha reportado que la proteína Na-Asp-2 secretada por *N. americanus* tiene la capacidad de reclutar los neutrófilos y monocitos (*Riue y col., 1994; Bower y col., 2008*).

Nuestro interés era encontrar un candidato que fuera capaz de reclutar neutrófilos en el estadio L3, por lo que tomamos a Na-Asp-2 como molde y la comparamos con nuestros 6 candidatos SCP-TAPS. A partir de los resultados mostrados de las Figura 1B y 3, se seleccionó a Nb-SCP-2 por presentar la mayor similitud en secuencia aminoacídica y estructura con Na-Asp-2, además de coincidir su expresión en la piel. Una comparación de esta proteína con varias SCP-TAPS de otros organismos arrojó que las estructuras secundarias del dominio se conservaban, aunque la secuencia aminoacídica se conservaba mejor en la región de la cadena que se correspondía con el núcleo del dominio SCP (Figura 20, Anexos). Interesantemente, una propiedad que se ha observado en varias proteínas SCP-TAPS es la capacidad de unir lípidos. Se han descrito tres sitios

independientes que pueden unir colesterol, ácidos grasos y leucotrienos (*Wilbers y col., 2018*). En la Figura 22 (Anexos) se puede observar como Nb-SCP-2, al superponerse con las estructuras cristalográficas de otras SCP-TAPS que han sido reportadas como proteínas de unión a lípidos, la proteína presenta las dos hélices alfa que crean la cavidad de unión de ácidos grasos y el sitio de unión de colesterol. Esto refuerza nuestra hipótesis de que probablemente estas proteínas sean moonlight.

Para la obtención de la proteína recombinante se escogió al Baculovirus como sistema de expresión, puesto que Nb-SCP-2 es una glicoproteína que contiene puentes disulfuros en el dominio SCP. Para facilitar su posterior purificación se le añadió una cola de polihistidina (6 Hist) en el extremo C-terminal y se verificó si pudiera afectar la estructura de Nb-SCP-2, mediante predicción con AlphaFold3 (Figura 24, Anexo). Aunque no se observó ningún cambio en la estructura, no podemos descartar que tal vez la cola de histidinas pudiese desestabilizar la estructura, para lo cual se pudiera realizar una simulación por dinámica molecular. Por otro lado, como se explicó en el acápite de resultados, para la purificación de la proteína se añadió un paso de cromatografía de intercambio iónico posterior a la cromatografía de afinidad con la columna de níquel, pero no se logró incrementar la pureza. El principal inconveniente que se observó fue la presencia de unas bandas por encima de la de interés, principalmente una banda intensa que aparece entre 50-60kDa (Figura 13C y 14A). Esta banda no solo eluyó en las mismas condiciones de imidazol, también de NaCl, lo que indica que debe poseer grupos de histidina expuesto en la superficie y un punto isoeléctrico similar al de Nb-SCP-2. Una estrategia para solucionar esta problemática es realizar una cromatografía de exclusión molecular, ya que una propiedad que las diferencia es su peso molecular.

El rendimiento de obtención de la proteína en el sistema de Baculovirus se estimó de 1.23 mg/L de cultivo de células de insecto Hi-5. Regularmente el rendimiento de proteínas con el sistema de expresión de Baculovirus es entre 1-100 mg/L de cultivo, por lo que nuestra proteína se expresa dentro de los valores reportados, aunque en

el extremo inferior, siendo una posible causa el hecho de que no se optimizaron los codones del gen para hacer más eficiente el sistema. Debido a la baja expresión de la proteína en Baculovirus, consideramos que lo más indicado es utilizar otro sistema que logre aumentar los niveles de rendimientos. En este sentido, expresar la proteína en la levadura *Pichia pastoris* resulta llamativo, pues además de ser mucho más sencillo y económico de trabajar, los rendimientos reportados en este sistema son de 0.1-5 g/L de cultivo, unas 50 veces por encima del rendimiento con Baculovirus.

Una vez obtenida la proteína recombinante se procedió a evaluar su capacidad de reclutar neutrófilos y como se puede apreciar en la Figura 15B, los resultados indican que la proteína recluta neutrófilos y no otros tipos celulares *in vivo*. Si este reclutamiento es debido a que Nb-SCP-2 es pro-inflamatoria o si actúa como quimiocina, no queda resuelto con solo este experimento, lo cual pudiese ser determinado mediante un ensayo de quimiotaxis en una cámara de Boyden. A pesar de ello, se pudiera inferir que este reclutamiento pudiese ser debido a que se comporta como una quimiocina, puesto que es estructuralmente similar a Na- Asp-2, la cual ya se reportó ser quimioatrayente de neutrófilos. Por otro lado, ya que la proteína presenta un 30% de pureza, no se puede descartar la posibilidad de que tal vez este efecto sea el resultado de la proteína junto con los contaminantes, y no por ella sola. Por lo que se considera que este ensayo hay que repetirlo con una proteína más pura.

Este resultado nos lleva a razonar, qué relevancia biológica pudiese tener para el helminto el reclutamiento de neutrófilos, cuando Bouchery y col., (2020) mostraron que los neutrófilos tienen la capacidad de atacar a *N. brasiliensis* mediante la liberación de NETs (Bouchery y col., 2020). Lo primero que se pudiera inferir es que el hospedero fue el que por la presión evolutiva se adaptó para reconocer esta proteína como una señal de presencia del patógeno y usarlo como guía para rodearlo y poder combatirlo. Pero, contradictoriamente, este mismo grupo demostró que al depletar los neutrófilos en los ratones, la migración de la piel al pulmón de los gusanos se retrasó significativamente, cuando se esperaría lo contrario. Esto indica que de alguna manera desconocida, *N. brasiliensis* requiere de los neutrófilos

en la piel para realizar una rápida migración al pulmón. En este trabajo se propone una posible explicación para este fenómeno:

En el mismo trabajo donde se observó que los neutrófilos atacan a *N. brasiliensis* con las NETs y se demostró que estos gusanos liberan una enzima (DNAsa) que es capaz de escindir las trampas extracelulares y protegerlos del ataque de los neutrófilos. Adicionalmente, observaron *in vitro* que los gusanos en presencia de neutrófilos permanecían más tiempo con sus cutículas, probablemente para protegerse del daño provocado por estas células. Sin embargo, estos neutrófilos generan inflamación en el sitio de infección y liberan proteasas que pudieran tener un efecto positivo en la migración de la larva, ya que facilitarían el paso a través del tejido para alcanzar los vasos sanguíneos. Además, hay varios reportes donde se ha observado que los neutrófilos juegan un rol inmunosupresor. Por ejemplo, los neutrófilos tienen un papel negativo en la respuesta de las células B y T CD4 contra tres antígenos: ovoalbúmina, lisozima y listeriolisina O. Se observó que luego de la inmunización con estos antígenos, los neutrófilos se dirigieron a los linfonodos con las proteínas y establecieron un breve contacto con las células dendríticas y macrófagos, con el subsecuente debilitamiento de la interacción de estas células con los linfocitos T. Al depletar los neutrófilos se observa una potenciación de la polarización de los linfocitos T CD4 hacia TH1 o TH2 (Yang y col., 2010). En otro trabajo se observó que en la infección con la bacteria intracelular *Brucella abortus*, estas eran eliminadas con mayor eficiencia en la ausencia de células polimorfonucleares, lo que coincide con un reclutamiento de monocitos y células dendríticas. Además, se observa una activación significativa de células B y T (Barquero-Calvo y col., 2013). En el caso de la infección con *N. brasiliensis* pudiera estar dándose un fenómeno similar, al menos en el contexto de la piel, por lo que el resultado neto sería que el reclutamiento de los neutrófilos por Nb-SCP-2 estaría favoreciendo la migración de las larvas infectivas hacia el pulmón. En la figura 17

se representa esta hipótesis.

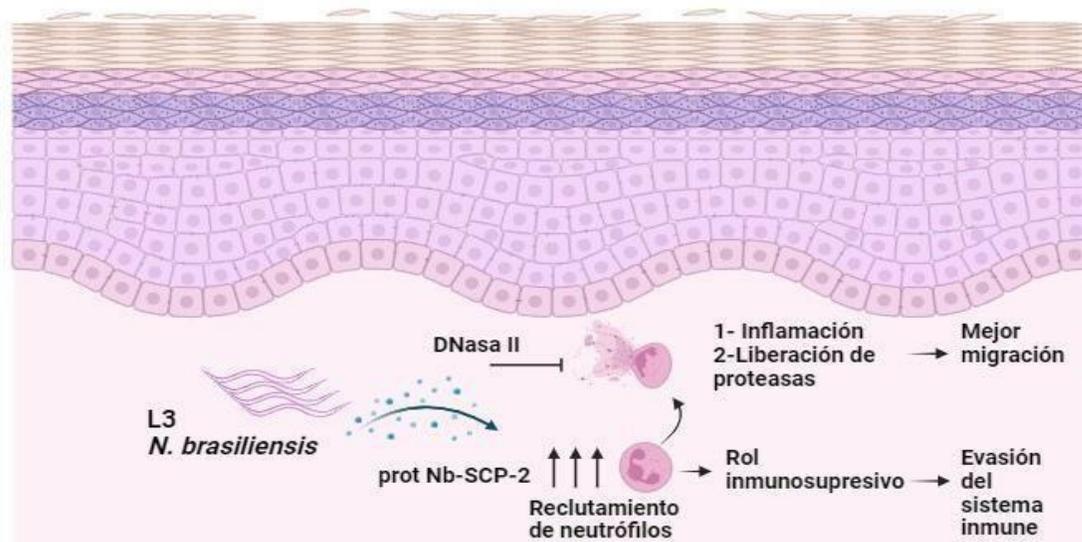


Figura 17. Representación gráfica sobre la posible implicación de Nb-SCP-2 en el parasitismo durante la infección de *N. brasiliensis* en la piel.

Para probar si Nb-SCP-2 podría funcionar como vacuna antihelmíntica, se inmunizaron ratones Balb/C por vía subcutánea, usando Alumina como adyuvante (Figura 16). Como se mencionó en los resultados, aunque se observó un aumento en el título de anticuerpos, nuestros resultados sugieren que no hay un efecto protector ante la infección. Esto pudiese ser debido a que la acción de esta proteína no es vital para completar el ciclo de vida del gusano o que los anticuerpos inducidos no son neutralizantes. También, hay que tener en cuenta que la proteína usada para inmunizar no presentaba un alto grado de pureza, y pudiese haber ocurrido que el o los contaminantes son lo suficientemente inmunogénicos como para dirigir la inducción de una respuesta adaptativa específica a estos contaminantes, por lo que tal vez inmunizando con una proteína más pura si podría lograrse un efecto protector. No obstante, para determinar realmente si la inmunización no logra inducir una respuesta inmunológica se requiere de un análisis más exhaustivo: realizar un estudio de la cinética de la migración de los gusanos en cada uno de los tejidos en los que reside, así como de poblaciones de células del sistema inmunológico reclutadas en dichos tejidos.

## VII. Conclusiones

- Los transcritos pertenecientes a la familia de proteína SCP-TAPS se encuentran entre los más abundantes en todas las etapas larvarias de *N. brasiliensis*
- La proteína Nb-SCP-2, identificada en nuestros datos transcriptómicos, es expresada en la etapa infectiva L3 y presenta una alta similitud en secuencia y estructura con la proteína Na-Asp-2 de *N. americanus*, lo cual nos indicó que podría cumplir las mismas funciones que ella
- Se logró obtener una proteína recombinante parcialmente pura (30% de pureza aproximadamente), utilizando el sistema de expresión de Baculovirus, con un rendimiento de aproximadamente 1.29 mg/L de cultivo
- Se demostró mediante el modelo de inflamación de Bolsa de Aire, que Nb-SCP-2 es capaz de reclutar neutrófilos *in vivo*, aunque este fenómeno pudiera deberse tanto a que la proteína es pro-inflamatoria o una molécula quimioatrayente.
- Se logró inducir con tres inmunizaciones subcutáneas, en un esquema profiláctico, anticuerpos anti-Nb-SCP-2, aunque la cuantificación de gusanos en el intestino a los 7 días post-infección sugieren que no tienen un papel protector ante la infección de *N. brasiliensis*

## VIII. Perspectivas

- Cambiar el sistema de expresión de Baculovirus por el sistema de expresión en *Pichia pastoris*
- Determinar la presencia de Nb-SCP-2 en los ESP en los diferentes estadios mediante anticuerpos anti-Nb-SCP-2 generados en conejo
- Evaluar si la proteína es capaz de reclutar neutrófilos de manera quimiotáctica mediante estudio *in vitro*, usando la Cámara de Boyden
- Evaluar si Nb-SCP-2 podría funcionar como vacuna, utilizando para las inmunizaciones una proteína más pura
- Realizar una caracterización más completa y detallada del efecto de la inmunización con Nb-SCP-2 en el modelo de infección con *N.brasiliensis*

## IX. Referencias bibliográficas

- Abuzeid AMI, Zhou X, Huang Y, Li G. Twenty-five-year research progress in hookworm excretory/secretory products. *Parasit Vectors*. 2020 Mar 14;13(1):136. doi: 10.1186/s13071-020-04010-8. PMID: 32171305; PMCID: PMC7071665.
- Adegnika AA, de Vries SG, Zinsou FJ, Honkepehedji YJ, Dejon Agobé JC, Vodouou KG, Bikangui R, Bouyoukou Hounkpatin A, Bache EB, Massinga Loembe M, van Leeuwen R, Molemans M, Kreamsner PG, Yazdanbakhsh M, Hotez PJ, Bottazzi ME, Li G, Bethony JM, Diemert DJ, Grobusch MP; HookVac Consortium. Safety and immunogenicity of co-administered hookworm vaccine candidates Na-GST-1 and Na-APR-1 in Gabonese adults: a randomised, controlled, double-blind, phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Infect Dis*. 2021 Feb;21(2):275-285. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30288-7. Epub 2020 Sep 11. PMID: 32926834.
- Ajendra J, Allen JE. Neutrophils: Friend or foe in Filariasis? *Parasite Immunol*. 2022 Jun;44(6):e12918. doi: 10.1111/pim.12918. Epub 2022 May 25. PMID: 35373850.
- Allen JE, Sutherland TE. Host protective roles of type 2 immunity: parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. *Semin Immunol*. 2014 Aug;26(4):329-40. doi: 10.1016/j.smim.2014.06.003. Epub 2014 Jul 11. PMID: 25028340; PMCID: PMC4179909.
- Al-Riyami L, Pineda MA, Rzepecka J, Huggan JK, Khalaf AI, Suckling CJ, Scott FJ, Rodgers DT, Harnett MM, Harnett W. Designing anti-inflammatory drugs from parasitic worms: a synthetic small molecule analogue of the *Acanthocheilonema viteae* product ES-62 prevents development of collagen-induced arthritis. *J Med Chem*. 2013 Dec 27;56(24):9982-10002. doi: 10.1021/jm401251p. Epub 2013 Nov 25. PMID: 24228757; PMCID: PMC4125414.
- Araújo CA, Perini A, Martins MA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. PAS-1, a protein from *Ascaris suum*, modulates allergic inflammation via IL-10 and IFN-gamma, but not IL-12. *Cytokine*. 2008 Dec;44(3):335-41. doi: 10.1016/j.cyto.2008.09.005. Epub 2008 Nov 12. PMID: 19008120.

- Asojo OA, Goud G, Dhar K, Loukas A, Zhan B, Deumic V, Liu S, Borgstahl GE, Hotez PJ. X-ray structure of Na-ASP-2, a pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, *Necator americanus*, and a vaccine antigen for human hookworm infection. *J Mol Biol.* 2005 Feb 25;346(3):801-14. doi: 10.1016/j.jmb.2004.12.023. Epub 2005 Jan 12. PMID: 15713464.
- Ball DH, Al-Riyami L, Harnett W, Harnett MM. IL-33/ST2 signalling and crosstalk with FcεRI and TLR4 is targeted by the parasitic worm product, ES-62. *Sci Rep.* 2018 Mar 14;8(1):4497. doi: 10.1038/s41598-018-22716-9. PMID: 29540770; PMCID: PMC5852134.
- Barnard JW, Biro MG, Lo SK, Ohno S, Carozza MA, Moyle M, Soule HR, Malik AB. Neutrophil inhibitory factor prevents neutrophil-dependent lung injury. *J Immunol.* 1995 Nov 15;155(10):4876-81. PMID: 7594491.
- Barquero-Calvo E, Martirosyan A, Ordoñez-Rueda D, Arce-Gorvel V, Alfaro-Alarcón A, Lepidi H, Malissen B, Malissen M, Gorvel JP, Moreno E. Neutrophils exert a suppressive effect on Th1 responses to intracellular pathogen *Brucella abortus*. *PLoS Pathog.* 2013 Feb;9(2):e1003167. doi: 10.1371/journal.ppat.1003167. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23458832; PMCID: PMC3573106.
- Başka P, Norbury LJ. The Role of the Intestinal Epithelium in the "Weep and Sweep" Response during Gastro-Intestinal Helminth Infections. *Animals (Basel).* 2022 Jan 12;12(2):175. doi: 10.3390/ani12020175. PMID: 35049796; PMCID: PMC8772803.
- Benoît Chevalier, Mariana Ka-Cisse, Mamadou L. Diouf, Francis Klotz. Anquilostoma y anquilostomiasis humana. *Pediatría.* Volume 37, Issue 2, 2002, Pages 1-10, ISSN 1245-1789, [https://doi.org/10.1016/S1245-1789\(02\)72034](https://doi.org/10.1016/S1245-1789(02)72034)
- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature.* 1998 Mar 5;392(6671):71-5. doi: 10.1038/32160. PMID: 9510248.
- Blaxter ML, Ingram L, Tweedie S. Sequence, expression and evolution of the globins of the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994

Nov;68(1):1-14. doi: 10.1016/0166-6851(94)00127-

8. PMID: 7891734.

- Bobardt SD, Dillman AR, Nair MG. The Two Faces of Nematode Infection: Virulence and Immunomodulatory Molecules From Nematode Parasites of Mammals, Insects and Plants. *Front Microbiol.* 2020 Dec 2;11:577846. doi: 10.3389/fmicb.2020.577846. PMID: 33343521; PMCID: PMC7738434.
- Bouchery T, Moyat M, Sotillo J, Silverstein S, Volpe B, Coakley G, Tsourouktsoglou TD, Becker L, Shah K, Kulagin M, Guet R, Camberis M, Schmidt A, Seitz A, Giacomini P, Le Gros G, Papayannopoulos V, Loukas A, Harris NL. Hookworms Evade Host Immunity by Secreting a Deoxyribonuclease to Degrade Neutrophil Extracellular Traps. *Cell Host Microbe.* 2020 Feb 12;27(2):277-289.e6. doi: 10.1016/j.chom.2020.01.011. PMID: 32053791.
- Bouchery T, Volpe B, Shah K, Lebon L, Filbey K, LeGros G, Harris N. The Study of Host Immune Responses Elicited by the Model Murine Hookworms *Nippostrongylus brasiliensis* and *Heligmosomoides polygyrus*. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2017 Dec 20;7(4):236-286. doi: 10.1002/cpmo.34. PMID: 29261231.
- Bower MA, Constant SL, Mendez S. *Necator americanus*: the Na-ASP-2 protein secreted by the infective larvae induces neutrophil recruitment in vivo and in vitro. *Exp Parasitol.* 2008 Apr;118(4):569-75. doi: 10.1016/j.exppara.2007.11.014. Epub 2007 Dec 4. PMID: 18199436; PMCID: PMC2359483.
- Burn GL, Foti A, Marsman G, Patel DF, Zychlinsky A. The Neutrophil. *Immunity.* 2021 Jul 13;54(7):1377-1391. doi: 10.1016/j.immuni.2021.06.006. PMID: 34260886.
- Calvopiña, Manuel, Flores, Jessica, Guaman, Isabel, Lara, Gabriela, & Abarca, Jeyson. (2017). Anemia crónica grave por *Ancylostoma duodenale* en Ecuador. Diagnóstico por duodenoscopia. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 499-501. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500499>
- Cantacessi C, Campbell BE, Visser A, Geldhof P, Nolan MJ, Nisbet AJ, Matthews JB, Loukas A, Hofmann A, Otranto D, Sternberg PW, Gasser RB. A portrait of the

- "SCP/TAPS" proteins of eukaryotes--developing a framework for fundamental research and biotechnological outcomes. *Biotechnol Adv.* 2009 Jul-Aug;27(4):376-88. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.02.005. Epub 2009 Feb 21. PMID: 19239923.
- Cantacessi C, Gasser RB. SCP/TAPS proteins in helminths--where to from now? *Mol Cell Probes.*
  - Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2016 Mar;16(3):177-92. doi: 10.1038/nri.2016.4. PMID: 26922909.
  - Chadderdon RC, Cappello M. The hookworm platelet inhibitor: functional blockade of integrins GPIIb/IIIa (alphaIIb beta3) and GPIa/IIa (alpha2beta1) inhibits platelet aggregation and adhesion in vitro. *J Infect Dis.* 1999 May;179(5):1235-41. doi: 10.1086/314724. PMID: 10191228.
  - Chapman PR, Llewellyn S, Jennings H, Becker L, Giacomini P, McDougall R, Robson J, Loukas A, McCarthy J. The production of *Necator americanus* larvae for use in experimental human infection. *Parasit Vectors.* 2022 Jul 8;15(1):242. doi: 10.1186/s13071-022-05371-y. PMID: 35804460; PMCID: PMC9264692.
  - Chen J, Wang Y, Shen L, Xiu Y, Wang B. Could IL-25 be a potential therapeutic target for intestinal inflammatory diseases? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2023 Feb;69:43-50. doi: 10.1016/j.cytogfr.2022.07.001. Epub 2022 Jul 6. PMID: 35840510.
  - Choudhary V, Schneider R. Pathogen-Related Yeast (PRY) proteins and members of the CAP superfamily are secreted sterol-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Oct 16;109(42):16882-7. doi: 10.1073/pnas.1209086109. Epub 2012 Oct 1. PMID: 23027975; PMCID: PMC3479496.
  - Coronado S, Barrios L, Zakzuk J, Regino R, Ahumada V, Franco L, Ocampo Y, Caraballo L. A recombinant cystatin from *Ascaris lumbricoides* attenuates inflammation of DSS-induced colitis. *Parasite Immunol.* 2017 Apr;39(4). doi: 10.1111/pim.12425. Epub 2017 Apr 6. PMID: 28295446.
  - Culley FJ, Brown A, Conroy DM, Sabroe I, Pritchard DI, Williams TJ. Eotaxin is specifically cleaved by hookworm metalloproteases preventing its action in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2000 Dec 1;165(11):6447-53. doi: 10.4049/jimmunol.165.11.6447. PMID: 11086084.

- Da'dara AA, Bhardwaj R, Ali YB, Skelly PJ. Schistosome tegumental ecto- apyrase (SmATPDase1) degrades exogenous pro-inflammatory and pro- thrombotic nucleotides. PeerJ. 2014 Mar 18;2:e316. doi: 10.7717/peerj.316. PMID: 24711968; PMCID: PMC3970803.
- Dalton JP, Brindley PJ, Donnelly S, Robinson MW. The enigmatic asparaginyl endopeptidase of helminth parasites. Trends Parasitol. 2009 Feb;25(2):59-61. doi: 10.1016/j.pt.2008.11.002. Epub 2008 Dec 26. PMID: 19101207.
- Daly CM, Mayrhofer G, Dent LA. Trapping and immobilization of *Nippostrongylus brasiliensis* larvae at the site of inoculation in primary infections of interleukin-5 transgenic mice. Infect Immun. 1999 Oct;67(10):5315-23. doi: 10.1128/IAI.67.10.5315-5323.1999. PMID: 10496911; PMCID: PMC96886.
- Daniłowicz-Luebert E, Steinfelder S, Kühn AA, Drozdenko G, Lucius R, Worm M, Hamelmann E, Hartmann S. A nematode immunomodulator suppresses grass pollen-specific allergic responses by controlling excessive TH2 inflammation. Int J Parasitol. 2013 Mar;43(3-4):201-10. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.10.014. Epub 2012 Nov 19. PMID: 23174104.
- Darwiche R, Mène-Saffrané L, Gfeller D, Asojo OA, Schneiter R. The pathogen-related yeast protein Pry1, a member of the CAP protein superfamily, is a fatty acid-binding protein. J Biol Chem. 2017 May 19;292(20):8304-8314. doi: 10.1074/jbc.M117.781880. Epub 2017 Apr 1. PMID: 28365570; PMCID: PMC5437237.
- Del Valle A, Jones BF, Harrison LM, Chadderdon RC, Cappello M. Isolation and molecular cloning of a secreted hookworm platelet inhibitor from adult *Ancylostoma caninum*. Mol Biochem Parasitol. 2003 Jul;129(2):167-77. doi: 10.1016/s0166-6851(03)00121-x. PMID: 12850261.
- Dent LA, Daly CM, Mayrhofer G, Zimmerman T, Hallett A, Bignold LP, Creaney J, Parsons JC. Interleukin-5 transgenic mice show enhanced resistance to primary infections with *Nippostrongylus brasiliensis* but not primary infections with *Toxocara canis*. Infect Immun. 1999 Feb;67(2):989-93. doi: 10.1128/IAI.67.2.989-993.1999. PMID: 9916122; PMCID: PMC96418.
- Diemert D, Campbell D, Brelsford J, Leasure C, Li G, Peng J, Zumer M, Younes N,

- Bottazzi ME, Mejia R, Pritchard DI, Hawdon JM, Bethony JM. Controlled Human Hookworm Infection: Accelerating Human Hookworm Vaccine Development. *Open Forum Infect Dis*. 2018 Apr 19;5(5):ofy083. doi: 10.1093/ofid/ofy083. PMID: 29780848; PMCID: PMC5952933.
- Diemert DJ, Freire J, Valente V, Fraga CG, Talles F, Grahek S, Campbell D, Jariwala A, Periago MV, Enk M, Gazzinelli MF, Bottazzi ME, Hamilton R, Brelsford J, Yakovleva A, Li G, Peng J, Correa-Oliveira R, Hotez P, Bethony J. Safety and immunogenicity of the Na-GST-1 hookworm vaccine in Brazilian and American adults. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 May 2;11(5):e0005574. doi: 10.1371/journal.pntd.0005574. Erratum in: *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Aug 17;14(8):e0008670. PMID: 28464026; PMCID: PMC5441635.
  - Diemert DJ, Pinto AG, Freire J, Jariwala A, Santiago H, Hamilton RG, Periago MV, Loukas A, Tribolet L, Mulvenna J, Correa-Oliveira R, Hotez PJ, Bethony JM. Generalized urticaria induced by the Na-ASP-2 hookworm vaccine: implications for the development of vaccines against helminths. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jul;130(1):169-76.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2012.04.027. Epub 2012 May 26. PMID: 22633322.
  - Donnelly S, O'Neill SM, Stack CM, Robinson MW, Turnbull L, Whitchurch C, Dalton JP. Helminth cysteine proteases inhibit TRIF-dependent activation of macrophages via degradation of TLR3. *J Biol Chem*. 2010 Jan 29;285(5):3383-92. doi: 10.1074/jbc.M109.060368. Epub 2009 Nov 18. PMID: 19923225; PMCID: PMC2823461.
  - Drurey C, Lindholm HT, Coakley G, Poveda MC, Löser S, Doolan R, Gerbe F, Jay P, Harris N, Oudhoff MJ, Maizels RM. Intestinal epithelial tuft cell induction is negated by a murine helminth and its secreted products. *J Exp Med*. 2022 Jan 3;219(1):e20211140. doi: 10.1084/jem.20211140. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34779829; PMCID: PMC8597987.
  - Ebner F, Hepworth MR, Rausch S, Janek K, Niewianda A, Kühl A, Henklein P, Lucius R, Hamelmann E, Hartmann S. Therapeutic potential of larval excretory/secretory proteins of the pig whipworm *Trichuris suis* in allergic disease. *Allergy*. 2014 Nov;69(11):1489-97. doi: 10.1111/all.12496. Epub 2014 Sep 6. PMID: 25069662.

- Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, Barlow JL, Dasvarma A, Hewett DR, McIlgorm A, Jolin HE, McKenzie AN. Identification of an interleukin (IL)-25- dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med.* 2006 Apr 17;203(4):1105-16. doi: 10.1084/jem.20051615. Epub 2006 Apr 10. PMID: 16606668; PMCID: PMC2118283.
- Forbes EE, Groschwitz K, Abonia JP, Brandt EB, Cohen E, Blanchard C, Ahrens R, Seidu L, McKenzie A, Strait R, Finkelman FD. IL-9–and mast cell–mediated intestinal permeability predisposes to oral antigen hypersensitivity. *The Journal of experimental medicine.* 14;205(4):897-913. (2008)
- Gan HH, Perlow RA, Roy S, Ko J, Wu M, Huang J, Yan S, Nicoletta A, Vafai J, Sun D, Wang L, Noah JE, Pasquali S, Schlick T. Analysis of protein sequence/structure similarity relationships. *Biophys J.* 2002 Nov;83(5):2781-91. doi: 10.1016/s0006-3495(02)75287-9. PMID: 12414710; PMCID: PMC1302362.
- Gazzinelli-Guimaraes PH, Nutman TB. Helminth parasites and immune regulation. *F1000Res.* 2018 Oct 23;7:F1000 Faculty Rev-1685. doi: 10.12688/f1000research.15596.1. PMID: 30416709; PMCID: PMC6206608.
- Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev.* 2008 Dec;29(7):865-97. doi: 10.1210/er.2008-0032. Epub 2008 Sep 29. PMID: 18824526.
- Gomez-Escobar N, Gregory WF, Maizels RM. Identification of tgh-2, a filarial nematode homolog of *Caenorhabditis elegans* daf-7 and human transforming growth factor beta, expressed in microfilarial and adult stages of *Brugia malayi*. *Infect Immun.* 2000 Nov;68(11):6402-10. doi: 10.1128/IAI.68.11.6402-6410.2000. PMID: 11035752; PMCID: PMC97726.
- Goodridge HS, McGuinness S, Houston KM, Egan CA, Al-Riyami L, Alcocer MJ, Harnett MM, Harnett W. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. *Parasite Immunol.* 2007 Mar;29(3):127- 37. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00926.x. PMID: 17266740.
- Gounaris K, Selkirk ME, Sadeghi SJ. A nucleotidase with unique catalytic properties is

- secreted by *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Aug;136(2):257-64. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.04.008. PMID: 15478804.
- Haldeman MS, Nolan MS, Ng'habi KRN. Human hookworm infection: Is effective control possible? A review of hookworm control efforts and future directions. *Acta Trop*. 2020 Jan;201:105214. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105214. Epub 2019 Oct 7. PMID: 31600519.
  - Harnett W. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. *Molecular and biochemical parasitology*. 1;195(2):130-6. (2014)
  - Herbert DB, Douglas B, Zullo K. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2): type 2 immunity and helminth immunity. *International journal of molecular sciences*. 2019 May 8;20(9):2276.
  - Hewitson, J. P. P., Grainger, J. R. R. and Maizels, R. M. M. (2009) 'Molecular & Biochemical Parasitology Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity', *Continued cytoadherence of Plasmodium falciparum infected red blood cells after antimalarial treatment*. Elsevier B.V., 167(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.04.008.
  - Hodda M. Phylum Nematoda: a classification, catalogue and index of valid genera, with a census of valid species. *Zootaxa*. 2022 Mar 10;5114(1):1-289. doi: 10.11646/zootaxa.5114.1.1. PMID: 35391386. (b)
  - Hodda M. Phylum Nematoda: trends in species descriptions, the documentation of diversity, systematics, and the species concept. *Zootaxa*. 2022 Mar 10;5114(1):290-317. doi: 10.11646/zootaxa.5114.1.2. PMID: 35391385. (a)
  - Holland MJ, Harcus YM, Riches PL, Maizels RM. Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. *Eur J Immunol*. 2000 Jul;30(7):1977-87. doi: 10.1002/1521-4141(200007)30:7<1977::AID-IMMU1977>3.0.CO;2-3. PMID: 10940887.
  - Hotez PJ, Diemert D, Bacon KM, Beaumier C, Bethony JM, Bottazzi ME, Brooker S, Couto AR, Freire Mda S, Homma A, Lee BY, Loukas A, Loblack M, Morel CM, Oliveira RC, Russell PK. The Human Hookworm Vaccine. *Vaccine*. 2013 Apr 18;31 Suppl 2(Suppl 2):B227-32. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.034. PMID: 23598487; PMCID:

PMC3988917.

- Huang L, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Ruyechan MC, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA. Eosinophil-derived IL-10 supports chronic nematode infection. *J Immunol*. 2014 Oct 15;193(8):4178-87. doi: 10.4049/jimmunol.1400852. Epub 2014 Sep 10. PMID: 25210122; PMCID: PMC4241261.
- Huang SC, Chan DT, Smyth DJ, Ball G, Gounaris K, Selkirk ME. Activation of *Nippostrongylus brasiliensis* infective larvae is regulated by a pathway distinct from the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Int J Parasitol*. 2010 Dec;40(14):1619-28. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.06.004. Epub 2010 Jul 21. PMID: 20654619.
- Huang Y, Abuzeid AMI, Liu Y, He L, Zhao Q, Yan X, Hang J, Ran R, Sun Y, Li X, Liu J, Li G. Identification and localization of hookworm platelet inhibitor in *Ancylostoma ceylanicum*. *Infect Genet Evol*. 2020 Jan;77:104102. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104102. Epub 2019 Nov 2. PMID: 31689543.
- Huang L, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Ruyechan MC, Lubber KL, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA. Eosinophils mediate protective immunity against secondary nematode infection. *J Immunol*. 2015 Jan 1;194(1):283-90. doi: 10.4049/jimmunol.1402219. Epub 2014 Nov 26. PMID: 25429065; PMCID: PMC4272919.
- Humphreys, N.E., Xu, D., Hepworth, M.R., Liew, F.Y. & Grencis, R.K. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J. Immunol*. 180, 2443–2449 (2008).
- Hürlimann E, Silué KD, Zouzou F, Ouattara M, Schmidlin T, Yapi RB, Hounbedji CA, Dongo K, Kouadio BA, Koné S, Bonfoh B, N'Goran EK, Utzinger J, Acka-Douabélé CA, Raso G. Effect of an integrated intervention package of preventive chemotherapy, community-led total sanitation and health education on the prevalence of helminth and intestinal protozoa infections in Côte d'Ivoire. *Parasit Vectors*. 2018 Feb 27;11(1):115. doi: 10.1186/s13071-018-2642-x. PMID: 29486790; PMCID: PMC6389068.
- Inclan-Rico JM, Siracusa MC. First Responders: Innate Immunity to Helminths. *Trends Parasitol*. 2018 Oct;34(10):861-880. doi: 10.1016/j.pt.2018.08.007. Epub 2018 Aug 31. PMID: 30177466; PMCID: PMC6168350.
- Iqbal, Sadia & Jones, Michael. (2016). *Nematodes*. 10.1016/B978-0-12-394807-

6.00061-7.

- Jang SW, Cho MK, Park MK, Kang SA, Na BK, Ahn SC, Kim DH, Yu HS. Parasitic helminth cystatin inhibits DSS-induced intestinal inflammation via IL-10(+)/F4/80(+) macrophage recruitment. *Korean J Parasitol.* 2011 Sep;49(3):245-54. doi: 10.3347/kjp.2011.49.3.245. Epub 2011 Sep 30. PMID: 22072824; PMCID: PMC3210841.
- Jayaraman V, Toledo-Patiño S, Noda-García L, Laurino P. Mechanisms of protein evolution. *Protein Sci.* 2022 Jul;31(7):e4362. doi: 10.1002/pro.4362. PMID: 35762715; PMCID: PMC9214755.
- Johnston CJC, Smyth DJ, Kodali RB, White MPJ, Harcus Y, Filbey KJ, Hewitson JP, Hinck CS, Ivens A, Kemter AM, Kildemoes AO, Le Bihan T, Soares DC, Anderton SM, Brenn T, Wigmore SJ, Woodcock HV, Chambers RC, Hinck AP, McSorley HJ, Maizels RM. A structurally distinct TGF- $\beta$  mimic from an intestinal helminth parasite potently induces regulatory T cells. *Nat Commun.* 2017 Nov 23;8(1):1741. doi: 10.1038/s41467-017-01886-6. PMID: 29170498; PMCID: PMC5701006.
- Joshi, P., Mishra, P.K.K. Functional Diversity of the Excretory/Secretory Proteins of Nematode Parasites. *Acta Parasit.* 67, 619–627 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11686-022-00523-7>
- Kang JM, Yoo WG, Lê HG, Thái TL, Hong SJ, Sohn WM, Na BK. Partial Characterization of Two Cathepsin D Family Aspartic Peptidases of *Clonorchis sinensis*. *Korean J Parasitol.* 2019 Dec;57(6):671-680. doi: 10.3347/kjp.2019.57.6.671. Epub 2019 Dec 31. PMID: 31914521; PMCID: PMC6960241.
- Kassai, T. Handbook of *Nippostrongylus brasiliensis* (Commonwealth agricultural bureaux) (1982).
- Khatri V, Chauhan N, Kalyanasundaram R. Parasite Cystatin: Immunomodulatory Molecule with Therapeutic Activity against Immune Mediated Disorders. *Pathogens.* 2020 May 30;9(6):431. doi: 10.3390/pathogens9060431. PMID: 32486220; PMCID: PMC7350340.
- Kim HK, Lund S, Baum R, Rosenthal P, Khorram N, Doherty TA. Innate type 2 response to *Alternaria* extract enhances ryegrass-induced lung inflammation. *Int Arch*

- Allergy Immunol. 2014;163(2):92-105. doi: 10.1159/000356341. Epub 2013 Nov 30. PMID: 24296722; PMCID: PMC3946274.
- Knott ML, Matthaei KI, Giacomini PR, Wang H, Foster PS, Dent LA. Impaired resistance in early secondary *Nippostrongylus brasiliensis* infections in mice with defective eosinophilopoiesis. *Int J Parasitol.* 2007 Oct;37(12):1367-78. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.006. Epub 2007 May 4. PMID: 17555758.
  - Koziol U. Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes. *Exp Parasitol.* 2017 Sep;180:84-100. doi: 10.1016/j.exppara.2016.12.004. Epub 2016 Dec 7. PMID: 27939766.
  - Kron MA, Metwali A, Vodanovic-Jankovic S, Elliott D. Nematode asparaginyl-tRNA synthetase resolves intestinal inflammation in mice with T-cell transfer colitis. *Clin Vaccine Immunol.* 2013 Feb;20(2):276-81. doi: 10.1128/CVI.00594-12. Epub 2012 Dec 19. PMID: 23254300; PMCID: PMC3571265.
  - Leyva-Castillo JM, Hener P, Michea P, Karasuyama H, Chan S, Soumelis V, Li M. Skin thymic stromal lymphopoietin initiates Th2 responses through an orchestrated immune cascade. *Nat Commun.*;4:2847 (2013)
  - Li Z, Wang X, Zhang W, Yang W, Xu B, Hu W. Excretory/Secretory Products from *Schistosoma japonicum* Eggs Alleviate Ovalbumin-Induced Allergic Airway Inflammation. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023 Oct 3;17(10):e0011625. doi: 10.1371/journal.pntd.0011625. PMID: 37788409; PMCID: PMC10547495.
  - Liang Jia-rui; Xu Bin; Hu Wei; Zheng Bin. - Research progress of hookworm detection technology - *China Tropical Medicine*;(12): 413-2023.
  - Licona-Limon P, Arias-Rojas A, Olgún-Martínez E. IL-9 and Th9 in parasite immunity. *In Seminars in Immunopathology* (Vol. 39, No. 1, pp. 29-38). Springer Berlin Heidelberg. (2017)
  - Licona-Limón P, Henao-Mejía J, Temann AU, Gagliani N, Licona-Limón I, Ishigame H, Hao L, De'Broski RH, Flavell RA. Th9 cells drive host immunity against gastrointestinal worm infection. *Immunity.*17;39(4):744-57. (2013)
  - Logan J, Pearson MS, Manda SS, Choi YJ, Field M, Eichenberger RM, Mulvanna J, Nagaraj SH, Fujiwara RT, Gazzinelli-Guimaraes P, Bueno L, Mati V, Bethony JM,

- Mitreva M, Sotillo J, Loukas A. Comprehensive analysis of the secreted proteome of adult *Necator americanus* hookworms. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 May 26;14(5):e0008237. doi: 10.1371/journal.pntd.0008237. PMID: 32453752; PMCID: PMC7274458.
- Loukas A, Hotez PJ, Diemert D, Yazdanbakhsh M, McCarthy JS, Correa- Oliveira R, Croese J, Bethony JM. Hookworm infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Dec 8;2:16088. doi: 10.1038/nrdp.2016.88. PMID: 27929101.
  - Lu M, Tian X, Tian AL, Li C, Yan R, Xu L, Song X, Li X. A Novel  $\alpha/\beta$  Hydrolase Domain Protein Derived From *Haemonchus contortus* Acts at the Parasite-Host Interface. *Front Immunol*. 2020 Jun 30;11:1388. doi: 10.3389/fimmu.2020.01388. PMID: 32695121; PMCID: PMC7338770.
  - Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, Yazdanbakhsh M, Wynn TA. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *Journal of Experimental Medicine*. 2009 Sep 28;206(10):2059-66.
  - Maizels RM, Smits HH, McSorley HJ. Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules. *Immunity*. 2018 Nov 20;49(5):801-818. doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.016. PMID: 30462997; PMCID: PMC6269126.
  - Makou E, Herbert AP, Barlow PN. Creating functional sophistication from simple protein building blocks, exemplified by factor H and the regulators of complement activation. *Biochem Soc Trans*. 2015 Oct;43(5):812-8. doi: 10.1042/BST20150074. PMID: 26517887.
  - Martin I, Cabán-Hernández K, Figueroa-Santiago O, Espino AM. *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein inhibits TLR4 activation and suppresses the inflammatory cytokines induced by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2015 Apr 15;194(8):3924-36. doi: 10.4049/jimmunol.1401182. Epub 2015 Mar 16. PMID: 25780044; PMCID: PMC4390499.
  - Massacand JC, Stettler RC, Meier R, Humphreys NE, Grecis RK, Marsland BJ, Harris NL. Helminth products bypass the need for TSLP in Th2 immune responses by directly modulating dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug

- 18;106(33):13968-73. doi: 10.1073/pnas.0906367106. Epub 2009 Aug 4. PMID: 19666528; PMCID: PMC2729004.
- McSorley HJ, Maizels RM. Helminth infections and host immune regulation. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Oct;25(4):585-608. doi: 10.1128/CMR.05040-11. PMID: 23034321; PMCID: PMC3485755.
  - Morante T, Shepherd C, Constantinoiu C, Loukas A, Sotillo J. Revisiting the *Ancylostoma Caninum* Secretome Provides New Information on Hookworm- Host Interactions. *Proteomics.* 2017 Dec;17(23-24). doi: 10.1002/pmic.201700186. PMID: 29052354.
  - Moreno Y, Gros PP, Tam M, Segura M, Valanparambil R, Geary TG, Stevenson MM. Proteomic analysis of excretory-secretory products of *Heligmosomoides polygyrus* assessed with next-generation sequencing transcriptomic information. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Oct;5(10):e1370. doi: 10.1371/journal.pntd.0001370. Epub 2011 Oct 25. PMID: 22039562; PMCID: PMC3201918.
  - Moyle M, Foster DL, McGrath DE, Brown SM, Laroche Y, De Meutter J, Stanssens P, Bogowitz CA, Fried VA, Ely JA, et al. A hookworm glycoprotein that inhibits neutrophil function is a ligand of the integrin CD11b/CD18. *J Biol Chem.* 1994 Apr 1;269(13):10008-15. PMID: 7908286.
  - Mukai K, Karasuyama H, Kabashima K, Kubo M, Galli SJ. Differences in the Importance of Mast Cells, Basophils, IgE, and IgG versus That of CD4<sup>+</sup> T Cells and ILC2 Cells in Primary and Secondary Immunity to *Strongyloides venezuelensis*. *Infect Immun.* 2017 Apr 21;85(5):e00053-17. doi: 10.1128/IAI.00053-17. PMID: 28264908; PMCID: PMC5400847.
  - Nutman TB. Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths. *Parasite Immunol.* 2015 Jun;37(6):304-13. doi: 10.1111/pim.12194. PMID: 25869527; PMCID: PMC4425638.
  - Obata-Ninomiya K, Ishiwata K, Tsutsui H, Nei Y, Yoshikawa S, Kawano Y, Minegishi Y, Ohta N, Watanabe N, Kanuka H, Karasuyama H. The skin is an important bulwark of acquired immunity against intestinal helminths. *J Exp Med.* 2013 Nov 18;210(12):2583-95. doi: 10.1084/jem.20130761. Epub 2013 Oct 28. PMID:

24166714; PMCID: PMC3832932.

- Omar M, Abdelal H. NETosis in Parasitic Infections: A Puzzle That Remains Unsolved. *Int J Mol Sci.* 2023 May 19;24(10):8975. doi: 10.3390/ijms24108975. PMID: 37240321; PMCID: PMC10218887.
- Osbourn M, Soares DC, Vacca F, Cohen ES, Scott IC, Gregory WF, Smyth DJ, Toivakka M, Kemter AM, le Bihan T, Wear M, Hoving D, Filbey KJ, Hewitson JP, Henderson H, González-Ciscar A, Errington C, Vermeren S, Astier AL, Wallace WA, Schwarze J, Ivens AC, Maizels RM, McSorley HJ. HpARI Protein Secreted by a Helminth Parasite Suppresses Interleukin-33. *Immunity.* 2017 Oct 17;47(4):739-751.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2017.09.015. PMID: 29045903; PMCID: PMC5655542.
- Osman A, Wang CK, Winter A, Loukas A, Tribolet L, Gasser RB, Hofmann Hookworm SCP/TAPS protein structure--A key to understanding host-parasite interactions and developing new interventions. *Biotechnol Adv.* 2012 May-Jun;30(3):652-7. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.11.002. Epub 2011 Nov 15. PMID: 22120067.
- Parkinson J, Mitreva M, Whitton C, Thomson M, Daub J, Martin J, Schmid R, Hall N, Barrell B, Waterston RH, McCarter JP, Blaxter ML. A transcriptomic analysis of the phylum Nematoda. *Nat Genet.* 2004 Dec;36(12):1259-67. doi: 10.1038/ng1472. Epub 2004 Nov 14. Erratum in: *Nat Genet.* 2020 Jul;52(7):750. PMID: 15543149.
- Peng J, Siracusa MC. Basophils in antihelminth immunity. *Semin Immunol.* 2021 Mar;53:101529. doi: 10.1016/j.smim.2021.101529. Epub 2021 Nov 21. PMID: 34815162; PMCID: PMC8715908.
- Pfaff AW, Schulz-Key H, Soboslay PT, Taylor DW, MacLennan K, Hoffmann WH. *Litomosoides sigmodontis* cystatin acts as an immunomodulator during experimental filariasis. *Int J Parasitol.* 2002 Feb;32(2):171-8. doi: 10.1016/s0020-7519(01)00350-2. PMID: 11812494.
- Pineda MA, Lumb F, Harnett MM, Harnett W. ES-62, a therapeutic anti-inflammatory agent evolved by the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*. *Mol Biochem Parasitol.* 2014 Mar-Apr;194(1-2):1-8. doi: 10.1016/j.molbiopara.2014.03.003. Epub 2014 Mar 23. PMID: 24671112.

- Pinelli E, Aranzamendi C. Toxocara infection and its association with allergic manifestations. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012 Mar;12(1):33-44. doi: 10.2174/187153012799278956. PMID: 22214330.
- Poulin R, Kamiya T, Lagrue C. Evolution, phylogenetic distribution and functional ecology of division of labour in trematodes. *Parasit Vectors*. 2019 Jan 4;12(1):5. doi: 10.1186/s13071-018-3241-6. PMID: 30609937; PMCID: PMC6320615.
- Puchner KP, Bottazzi ME, Periago V, Grobusch M, Maizels R, McCarthy J, Lee B, Gaspari E, Diemert D, Hotez P. Vaccine value profile for Hookworm. *Vaccine*. 2023 Oct 18:S0264-410X(23)00540-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2023.05.013. Epub ahead of print. PMID: 37863671.
- Radonjic-Hoesli S, Brügggen MC, Feldmeyer L, Simon HU, Simon D. Eosinophils in skin diseases. *Semin Immunopathol*. 2021 Jun;43(3):393-409. doi: 10.1007/s00281-021-00868-7. Epub 2021 Jun 7. PMID: 34097126; PMCID: PMC8241748.
- Reitz M, Brunn ML, Voehringer D, Breloer M. Basophils are dispensable for the establishment of protective adaptive immunity against primary and challenge infection with the intestinal helminth parasite *Strongyloides ratti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Nov 29;12(11):e0006992. doi: 10.1371/journal.pntd.0006992. PMID: 30496188; PMCID: PMC6289456.
- Ricardo-Gonzalez RR, Van Dyken SJ, Schneider C, Lee J, Nussbaum JC, Liang HE, Vaka D, Eckalbar WL, Molofsky AB, Erle DJ, Locksley RM. Tissue signals imprint ILC2 identity with anticipatory function. *Nat Immunol*. 2018 Oct;19(10):1093-1099. doi: 10.1038/s41590-018-0201-4. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30201992; PMCID: PMC6202223.
- Rieu P, Ueda T, Haruta I, Sharma CP, Arnaout MA. The A-domain of beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is a receptor for the hookworm-derived neutrophil adhesion inhibitor NIF. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127(6 Pt 2):2081-91. doi: 10.1083/jcb.127.6.2081. PMID: 7528750; PMCID: PMC2120307.
- Rook GAW. The old friends hypothesis: evolution, immunoregulation and essential microbial inputs. *Front Allergy*. 2023 Sep 12;4:1220481. doi: 10.3389/falgy.2023.1220481. PMID: 37772259; PMCID: PMC10524266.

- Schnyder-Candrian S, Maillet I, Le Bert M, Brault L, Jacobs M, Ryffel B, Schnyder B, Moser R. Neutrophil Inhibitory Factor Selectively Inhibits the Endothelium-Driven Transmigration of Eosinophils In Vitro and Airway Eosinophilia in OVA-Induced Allergic Lung Inflammation. *J Allergy (Cairo)*. 2012; 2012:245909. doi: 10.1155/2012/245909. Epub 2012 Dec 4. PMID: 23304174; PMCID: PMC3523160.
- Schwartz C, Turqueti-Neves A, Hartmann S, Yu P, Nimmerjahn F, Voehringer D. Basophil-mediated protection against gastrointestinal helminths requires IgE-induced cytokine secretion. *Proc Natl Acad Sci US* 2014 Dec 2;111(48): E5169-77. doi: 10.1073/pnas.1412663111. Epub 2014 Nov 17. PMID: 25404305
- Seesao Y, Gay M, Merlin S, Viscogliosi E, Aliouat-Denis CM, Audebert C. A review of methods for nematode identification. *J Microbiol Methods*. 2017 Jul;138:37-49. doi: 10.1016/j.mimet.2016.05.030. Epub 2016 Jun 2. PMID: 27262374.
- Shimokawa C, Kanaya T, Hachisuka M, Ishiwata K, Hisaeda H, Kurashima Y, Kiyono H, Yoshimoto T, Kaisho T, Ohno H. Mast Cells Are Crucial for Induction of Group 2 Innate Lymphoid Cells and Clearance of Helminth Infections. *Immunity*. 2017 May 16;46(5):863-874.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.017. PMID: 28514691.
- Smith P, Fallon RE, Mangan NE, Walsh CM, Saraiva M, Sayers JR, McKenzie AN, Alcami A, Fallon PG. *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. *J Exp Med*. 2005 Nov 21;202(10):1319-25. doi: 10.1084/jem.20050955. PMID: 16301741; PMCID: PMC2212990.
- Sorobetea D, Svensson-Frej M, Grecis R. Immunity to gastrointestinal nematode infections. *Mucosal Immunol*. 2018 Mar;11(2):304-315. doi: 10.1038/mi.2017.113. Epub 2018 Jan 3. PMID: 29297502.
- Sotillo J, Sanchez-Flores A, Cantacessi C, Harcus Y, Pickering D, Bouchery T, Camberis M, Tang SC, Giacomini P, Mulvenna J, Mitreva M, Berriman M, LeGros G, Maizels RM, Loukas A. Secreted proteomes of different developmental stages of the gastrointestinal nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Oct;13(10):2736-51. doi: 10.1074/mcp.M114.038950. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24994561; PMCID: PMC4188999.
- Sulaiman AA, Zolnierczyk K, Japa O, Owen JP, Maddison BC, Emes RD, Hodgkinson

- JE, Gough KC, Flynn RJ. A Trematode Parasite Derived Growth Factor Binds and Exerts Influences on Host Immune Functions via Host Cytokine Receptor Complexes. *PLoS Pathog.* 2016 Nov 2;12(11):e1005991. doi: 10.1371/journal.ppat.1005991. PMID: 27806135; PMCID: PMC5091765.
- Taylor BC, Zaph C, Troy AE, Du Y, Guild KJ, Comeau MR, Artis D. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J Exp Med.* 2009 Mar 16;206(3):655-67. doi: 10.1084/jem.20081499. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19273626; PMCID: PMC2699121.
  - Temann UA, Geba GP, Rankin JA, Flavell RA. Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med.* 5;188(7):1307-20. (1998)
  - Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Smith P, Jolin HE, McKenzie AN. IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. *Immunity.* 1;13(4):573-83. (2000)
  - Tribolet L, Cantacessi C, Pickering DA, Navarro S, Doolan DL, Trieu A, Fei H, Chao Y, Hofmann A, Gasser RB, Giacomini PR, Loukas A. Probing of a human proteome microarray with a recombinant pathogen protein reveals a novel mechanism by which hookworms suppress B-cell receptor signaling. *J Infect Dis.* 2015 Feb 1;211(3):416-25. doi: 10.1093/infdis/jiu451. Epub 2014 Aug 19. PMID: 25139017.
  - Vacca F, Chauché C, Jamwal A, Hinchey EC, Heieis G, Webster H, Ogunkanbi A, Sekne Z, Gregory WF, Wear M, Perona-Wright G, Higgins MK, Nys JA, Cohen ES, McSorley HJ. A helminth-derived suppressor of ST2 blocks allergic responses. *Elife.* 2020 May 18;9:e54017. doi: 10.7554/eLife.54017. PMID: 32420871; PMCID: PMC7234810.
  - Vacca F, Le Gros G. Tissue-specific immunity in helminth infections. *Mucosal Immunol.* 2022 Jun;15(6):1212-1223. doi: 10.1038/s41385-022-00531-w. Epub 2022 Jun 9. PMID: 35680972; PMCID: PMC9178325.
  - Van Dyken SJ, Nussbaum JC, Lee J, Molofsky AB, Liang HE, Pollack JL, Gate RE, Haliburton GE, Ye CJ, Marson A, Erle DJ, Locksley RM. A tissue checkpoint regulates type 2 immunity. *Nat Immunol.* 2016 Dec;17(12):1381-1387. doi: 10.1038/ni.3582. Epub 2016 Oct 17. PMID: 27749840; PMCID: PMC5275767

- van Panhuys N, Prout M, Forbes E, Min B, Paul WE, Le Gros G. Basophils are the major producers of IL-4 during primary helminth infection. *J Immunol.* 2011 Mar 1;186(5):2719-28. doi: 10.4049/jimmunol.1000940. Epub 2011 Jan 26. PMID: 21270410; PMCID: PMC3488853.
- von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E. & Locksley, R.M. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal response circuit. *Nature* 529, 221–225 (2016).
- Wang J, Tang B, You X, Cai X, Jia W, Liu X, Liu M, Jin X, Ding J. *Trichinella spiralis* excretory/secretory products from adult worms inhibit NETosis and regulate the production of cytokines from neutrophils. *Parasit Vectors.* 2023 Oct 20;16(1):374. doi: 10.1186/s13071-023-05979-8. PMID: 37864246; PMCID: PMC10588246
- Wang, Q., Du, J., Zhu, J., Yang, X. & Zhou, B. Thymic stromal lymphopoietin signaling in CD4  $\beta$  T cells is required for TH2 memory. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 781–791 (2015).
- Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S, Hippe A, Corrigan CJ, Dong C, Homey B, Yao Z, Ying S, Huston DP, Liu YJ. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1837-47. doi: 10.1084/jem.20070406. Epub 2007 Jul 16. PMID: 17635955; PMCID: PMC2118667.
- Wangchuk P, Kouremenos K, Eichenberger RM, Pearson M, Susianto A, Wishart DS, McConville MJ, Loukas A. Metabolomic profiling of the excretory-secretory products of hookworm and whipworm. *Metabolomics.* 2019 Jun 28;15(7):101. doi: 10.1007/s11306-019-1561-y. PMID: 31254203.
- Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol.* 2017 Dec;17(12):746-760. doi: 10.1038/nri.2017.95. Epub 2017 Sep 11. PMID: 28891557; PMCID: PMC5783317.
- Wilbers RHP, Schneiter R, Holterman MHM, Drurey C, Smant G, Asojo OA, Maizels RM, Lozano-Torres JL. Secreted venom allergen-like proteins of helminths: Conserved modulators of host responses in animals and plants. *PLoS Pathog.* 2018 Oct 18;14(10):e1007300. doi: 10.1371/journal.ppat.1007300. PMID: 30335852; PMCID:

PMC6193718.

- Wong MTJ, Anuar NS, Noordin R, Tye GJ. Soil-transmitted helminthic vaccines: Where are we now? *Acta Trop.* 2023 Mar;239:106796. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106796. Epub 2022 Dec 29. PMID: 36586174.
- Xu X, Francischetti IM, Lai R, Ribeiro JM, Andersen JF. Structure of protein having inhibitory disintegrin and leukotriene scavenging functions contained in single domain. *J Biol Chem.* 2012 Mar 30;287(14):10967-76. doi: 10.1074/jbc.M112.340471. Epub 2012 Feb 6. PMID: 22311975; PMCID: PMC3322842.
- Yang CW, Strong BS, Miller MJ, Unanue ER. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J Immunol.* 2010 Sep 1;185(5):2927-34. doi: 10.4049/jimmunol.1001289. Epub 2010 Aug 2. PMID: 20679530; PMCID: PMC3509756.
- Yoshino TP, Brown M, Wu XJ, Jackson CJ, Ocadiz-Ruiz R, Chalmers IW, Kolb M, Hokke CH, Hoffmann KF. Excreted/secreted *Schistosoma mansoni* venom allergen-like 9 (SmVAL9) modulates host extracellular matrix remodelling gene expression. *Int J Parasitol.* 2014 Jul;44(8):551-63. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.04.002. Epub 2014 May 21. PMID: 24859313; PMCID: PMC4079936.
- Zhao M, Brown DM, Maccallum J, Proudfoot L. Effect of *Nippostrongylus brasiliensis* L3 ES on inflammatory mediator gene transcription in lipopolysaccharide lung inflammation. *Parasite Immunol.* 2009 Jan;31(1):50-6. doi: 10.1111/j.1365-3024.2008.01073.x. PMID: 19121083.
- Ziegler T, Rausch S, Steinfeldt S, Klotz C, Hepworth MR, Kühl AA, Burda PC, Lucius R, Hartmann S. A novel regulatory macrophage induced by a helminth molecule instructs IL-10 in CD4+ T cells and protects against mucosal inflammation. *J Immunol.* 2015 Feb 15;194(4):1555-64. doi: 10.4049/jimmunol.1401217. Epub 2015 Jan 14. PMID: 25589067.

# X. Anexos

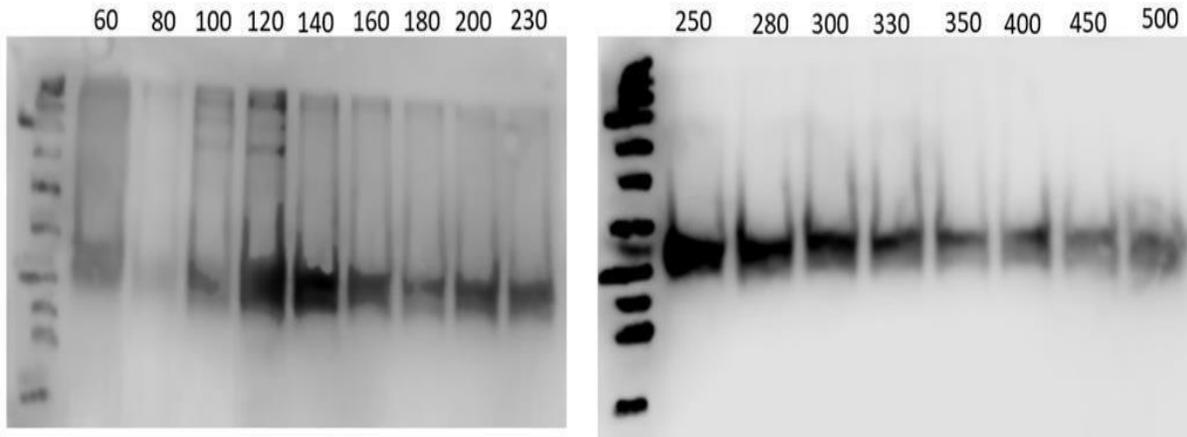


Figura 18. Estandarización de la purificación mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel. Se muestra Western Blot ((anti-poli-histidina) de los eluyentes a cada una de los concentración de imidazol (mM).

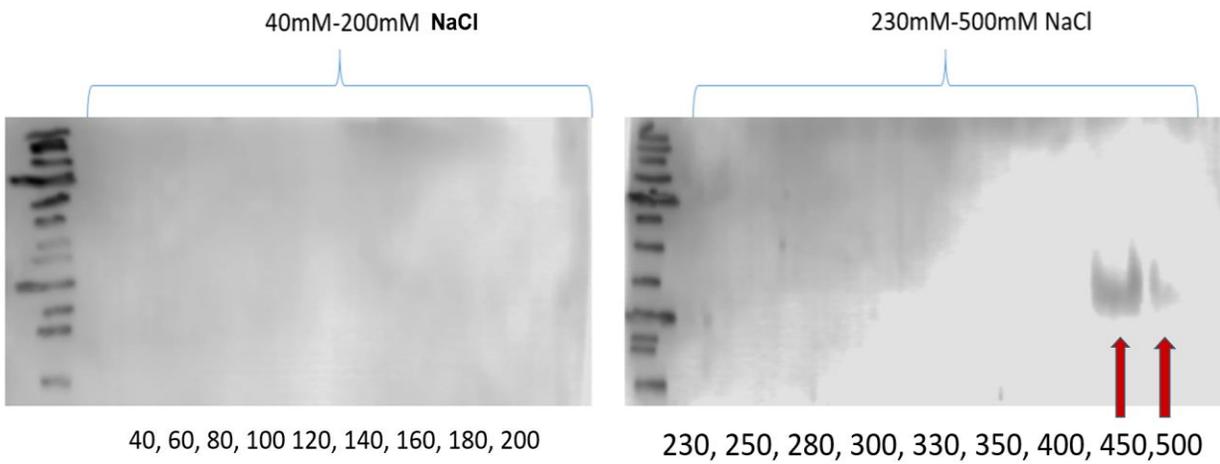


Figura 19. Estandarización de la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico usando una columna de carboximetil celulosa. Se muestra Western Blot ((anti-poli-histidina) de los eluyentes a cada una de los concentración de NaCl (mM).

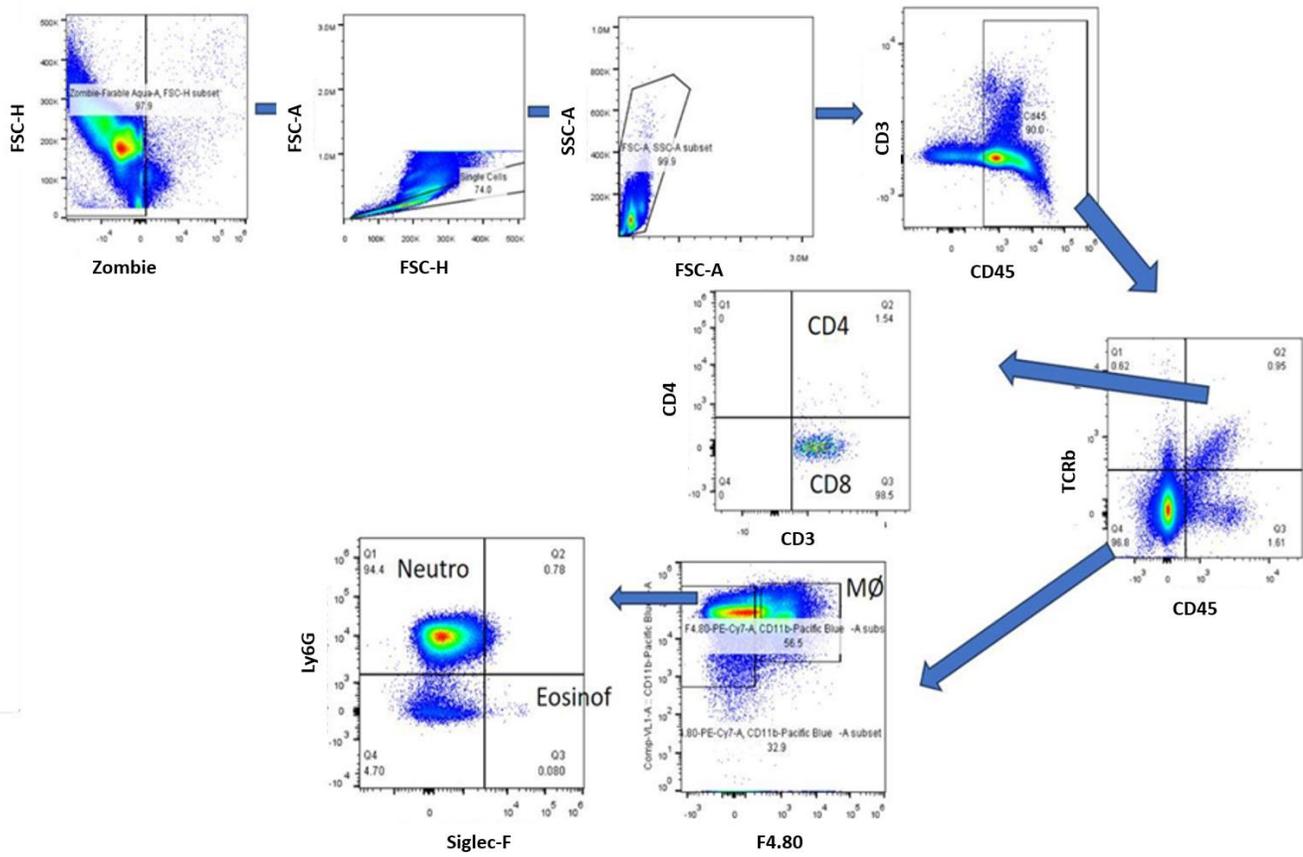
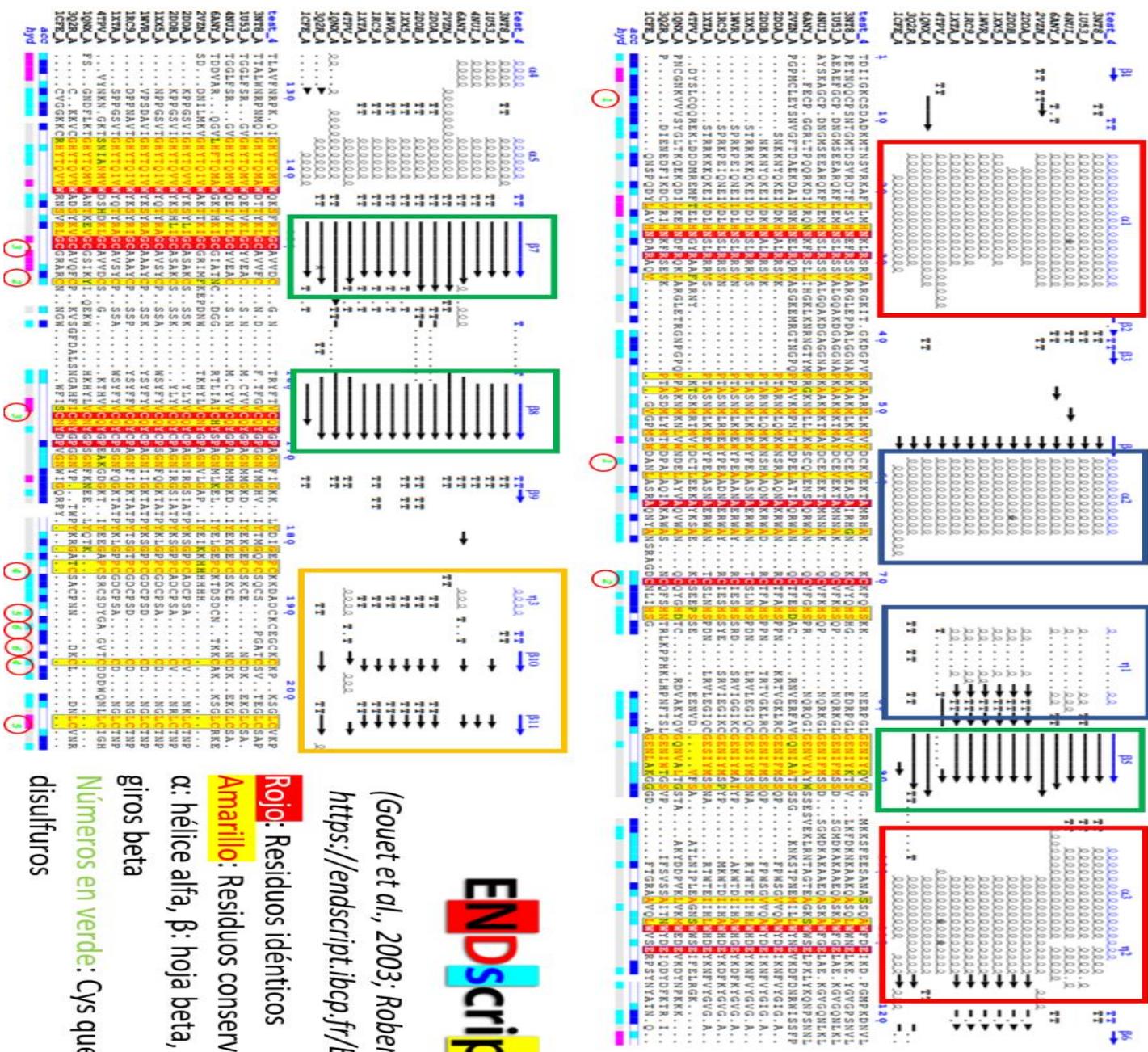


Figura 20. Estrategia seguida para analizar los datos de citometría de flujo en el ensayo de inflamación



(Gouet et al., 2003, Robert and Gouet, 2014)  
<https://endscript.ibcp.fr/EScript/ENDscript/>

# ENDscript 2.0

- Rojo:** Residuos idénticos
- Amarillo:** Residuos conservados
- $\alpha$ : hélice alfa,  $\beta$ : hoja beta,  $\eta$ : hélice  $3_{10}$ ,  $\pi$   $\pi$ : giros beta
- Números en verde: Cys que hacen puentes disulfuros

Figura 21. Conservación de las estructuras secundarias de Nb-SCP-2 al compararla con otros miembros de familia SCP-TAPS. Se realizó este análisis mediante ENDscrip 2.0

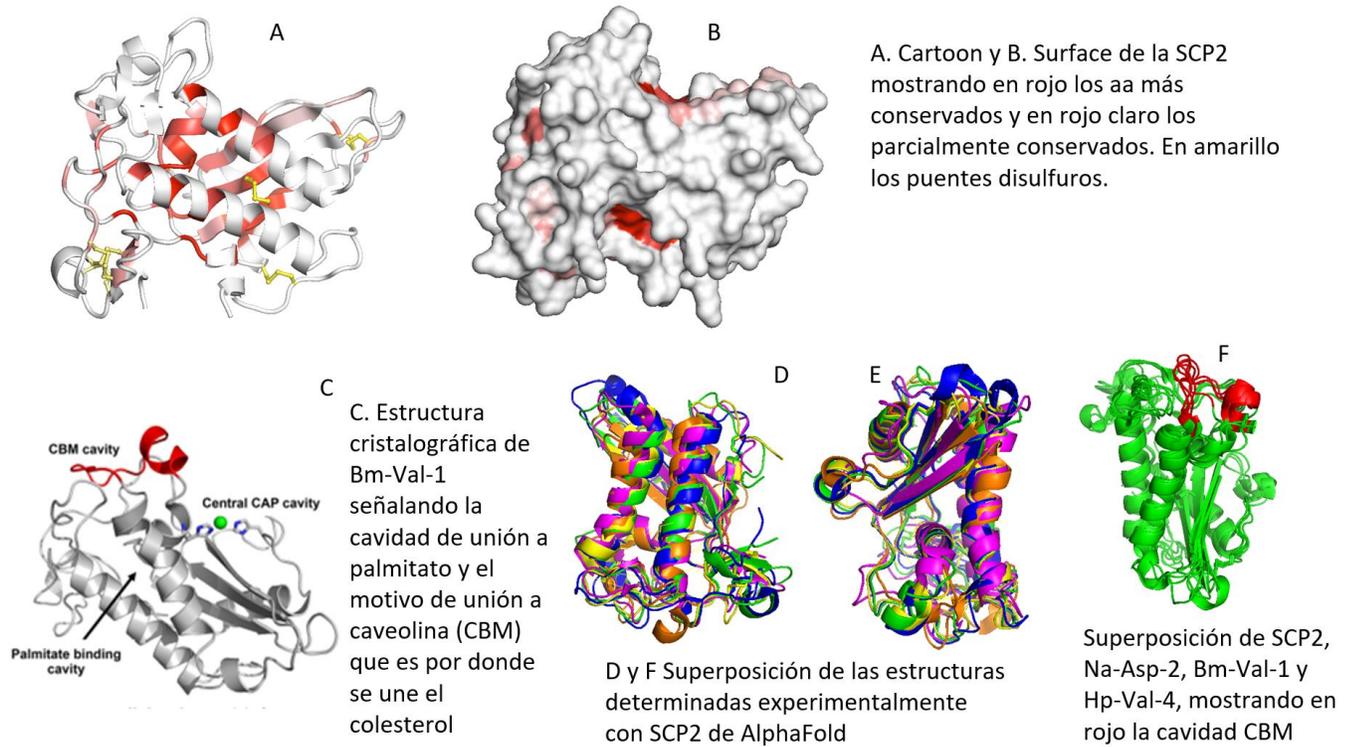


Figura 22. Nb-SCP-2 podría ser una proteína con capacidad de unir lípidos

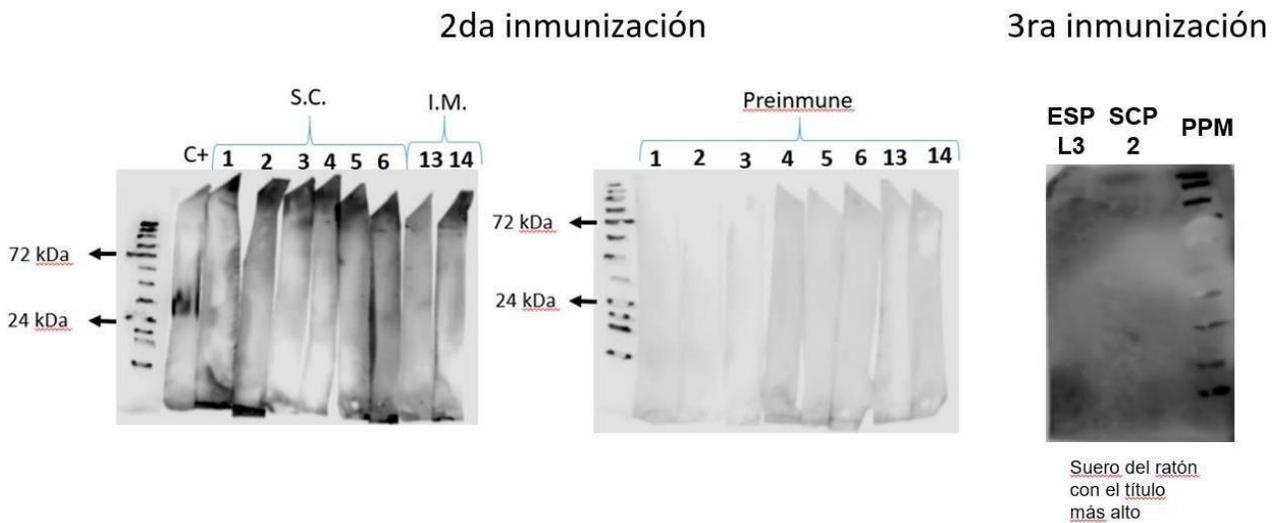


Figura 23. Western Blot con los sueros de los animales inmunizados con Nb-SCP-2. Como control positivo se utilizó el anticuerpo anti-polihistidina.

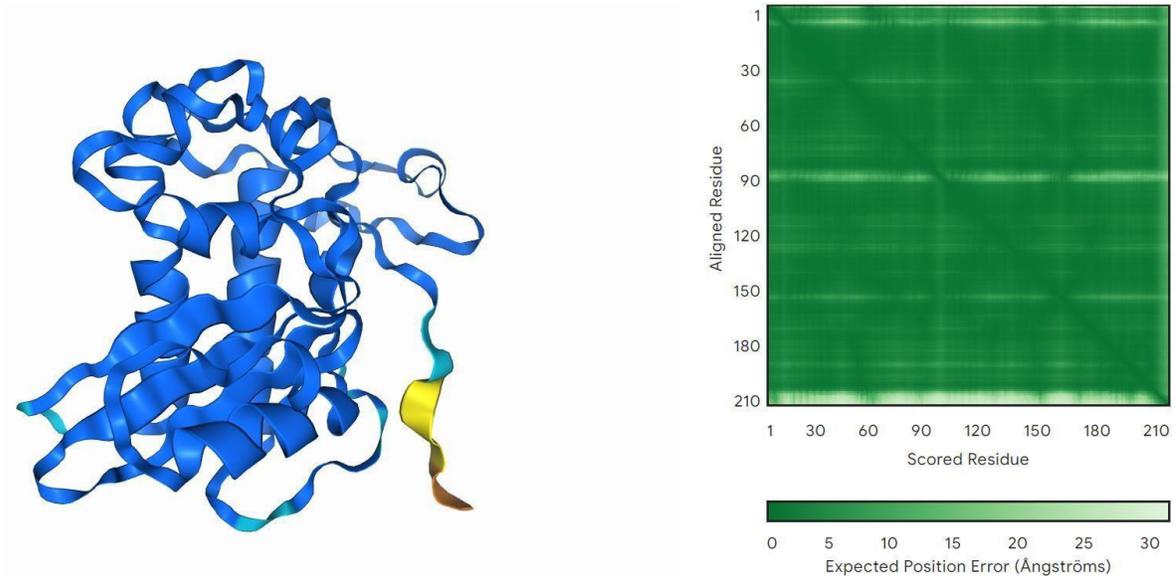


Figura 24. Predicción de la estructura de Nb-SCP-2 con la cola de polihistidina mediante AlphaFold3

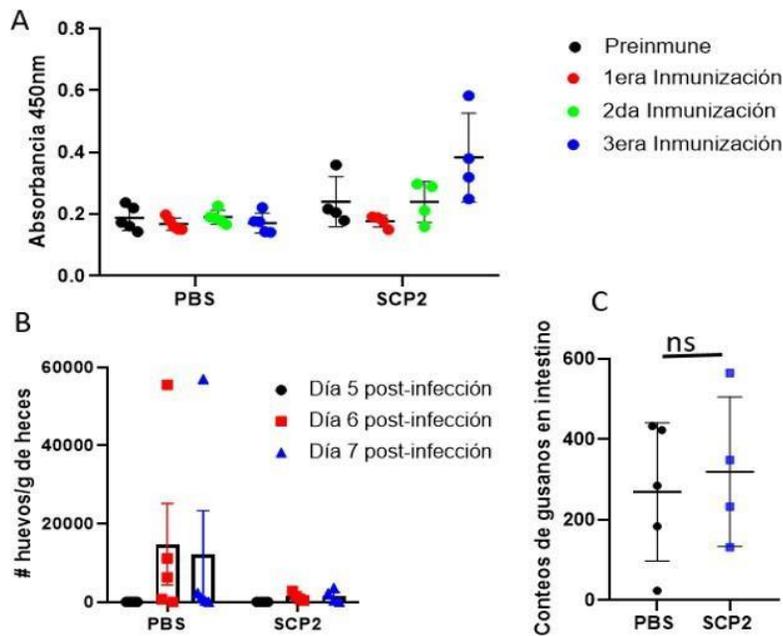
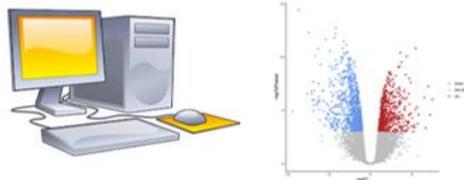


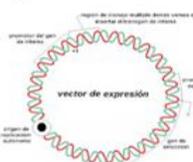
Figura 25. Evaluación de la respuesta humoral inducida por la inmunización con Nb-SCP-2. La vía de administración usada fue s.c. Tratamientos: PBS (200µL): control negativo, SCP2 (200µL): grupo inmunizado con Nb-SCP-2 (conc=0,37 mg/mL). A. ELISA indirecto para cuantificar anticuerpos específicos contra Nb-SCP-2. B. Conteo de huevos en las heces en los días 5, 6 y 7 post-infección y C. Conteo de gusanos en el intestino al día 7 post-infección.

ns: sin diferencia significativa. Test usado: One-way ANOVA

## 1-Selección de un candidato



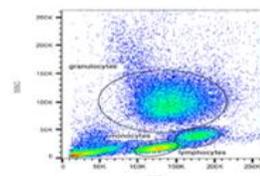
## 2-Producción de proteína recombinante



Células de insectos



## 3-Evaluación de reclutamiento de neutrófilos



## 4-Evaluación de la capacidad protectora contra la infección de *N. brasiliensis*



Figura 26. Esquema resumen de las diferentes fases del trabajo experimental