



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA**

**FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

Identificación De Glicoproteínas en
Diferentes Estadios del Ciclo de Vida de
Schistosoma mansoni.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central
de Venezuela, por la bachiller *Elianny Madeline
López Pacheco* como requisito parcial para optar
al título de Licenciado en Biología

Tutor: Dra. María Lorena Márquez

CARACAS, VENEZUELA

OCTUBRE - 2013

ACTA

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Elianny Madeline López Pacheco, C.I. 17.775.536, titulado “Identificación de glicoproteínas en diferentes estadios del ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*”, para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 24 días del mes de Octubre de 2013. Dejando constar que la Dra. M^a Lorena Márquez actuó como coordinador del jurado examinador.

Dra. Valentina Salas

Jurado

Dr. Gilberto Payares

Jurado

Dra. M^a Lorena Márquez

Tutora.

Dedicatoria.

**A mis padres, por brindarme su apoyo
de manera incondicional
y estar allí en los momentos más importantes.**

.

**A mi hijo, la alegría de mi vida
Quien me da la fuerza necesaria para continuar
y ser más cada día, con su inocencia
me inspira a continuar luchando por lo que quiero.**

A mi compañero, complemento de mí ser.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios en primer lugar, por bendecir mi vida de tantas maneras.

A mis padres (Mariela y Elio) por todo el amor y sacrificio que han realizado para que alcanzara este preciado logro y por depositar su entera confianza en cada reto que se me ha presentado en la vida, sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. ¡¡¡Este logro es de y para ustedes!!!

A mi hermano por su apoyo incondicional y sus ganas de ser mejor, espero que cumplas todos los retos que te propongas.

A mi hijo que gracias a su sonrisa, amor y compañía me llena de energías para continuar con los retos de la vida.

A mi vida Kendall por darme su amor y compartir conmigo todos los días, por querer que nos superemos cada día más como personas y como familia. Para ti va dedicado este logro que se que compartiremos juntos toda la vida.

A mis suegros por ser mis otros padres, por estar allí incondicionalmente y por brindarme todo su apoyo cuando lo necesitaba y a mis cuñados por brindarme su apoyo.

A mis “brujas”, que me acompañaron durante mi carrera y en los momentos más felices, difíciles, tristes y que con sus locuras y reuniones me alegran la vida.

A todos mis compañeros de clases, de laboratorios, de juegos de voleibol ya que ellos aprendí muchas cosas.

A los profesores que acompañaba para almorzar en el laboratorio, con sus cuentos y chistes he aprendido y reído bastante.

A mis compañeros del laboratorio de Cultivo vegetal por acompañarme durante este proceso.

A mi bella Lourdes Suárez y al profesor José “Cheo” Hernández Rosas por ser mis consejeros en la carrera. Gracias por brindarme su ayuda.

Finalmente y no menos importante a mis tutores: a mi tutora legal, la profe Lorena por confiar en mí y brindarme su apoyo y enseñarme muchas cosas más allá de lo académico. A mi considerado “tutor” el Prof. Gilberto Payares por enseñarme tantas cosas, tenerme paciencia y explicarme detalladamente un pedacito de todo lo que sabe. Muchísimas gracias profesores sin su apoyo este logro hubiera sido imposible. ¡¡Los quiero mucho!!

A la ilustre Universidad Central de Venezuela, por brindarme una educación de excelencia tanto en lo académico como en lo humano, por ser parte de mi vida y llenarme de momentos inolvidables.

Resumen

La esquistosomosis o bilharziosis, es una enfermedad parasitaria crónica que en el ser humano es provocada por siete especies de trematodos del género *Schistosoma*. Se estima que aproximadamente 300 millones de personas en el mundo están infectadas y 650 millones están en riesgo de infección. La esquistosomosis en Venezuela presenta una distribución focal de aproximadamente 15.000 km², que abarca los estados Aragua, Carabobo, Guárico, Miranda y Vargas, con una prevalencia del 25 % aproximadamente, y la especie que se encuentra en el país es *S. mansoni*. (Alarcón de Noya y col, 2002; Alarcón de Noya y col, 2006).

El ciclo de vida de *S. mansoni* es muy complejo, presenta formas larvarias, formas intermedias y adultos que tienen distinta morfología, y viven en diferentes ambientes. Esas diferencias de estadio durante su ciclo de vida están directamente relacionadas con la composición bioquímica de cada estadio (Ruppel y Cioli, 1977). Así, en cada estadio los carbohidratos de superficie o secretados, al parecer juegan un papel muy importante en la interacción parásito-hospedador, además, se sabe que estos componentes son muy inmunogénicos, por lo que se pueden usar para diagnóstico o como blancos para eliminar el parásito (Dunne 1990). En base a esto y debido a que no se ha evaluado en todos los estadios, el objetivo de esta investigación fue identificar las glicoproteínas presentes en los extractos solubles de los diferentes estadios del ciclo de vida de *S. mansoni*, estos son: huevo, miracidio, esporoquiste de cultivo, cercaria, esquistosómulos de cultivo y vermes adultos. Para ello se emplearon tres técnicas, las coloraciones PAS y azul Alcian las cuales identifican carbohidratos en general y carbohidratos tipo glicosaminoglicanos respectivamente. Así mismo, se identificaron los residuos de carbohidratos presentes mediante el uso de lectinas. Los resultados de este trabajo indican que los extractos solubles de huevo y adulto son los que presentan mayor número de proteínas, en ellos se pueden identificar entre ocho y diez

polipéptidos respectivamente de peso molecular entre 15 y 140 kDa. En relación a los extractos de los otros estadios son pocos los polipéptidos que se observan siendo el de 34 kDa uno de los más evidentes en todos los estadios. Al evaluar con PAS, solo se evidencian glicoproteínas en el extracto soluble de huevo los cuales tienen pesos moleculares entre 56 y 80 kDa, en los otros estadios no se observó ninguna glicoproteína. Así mismo con el azul Alcian evidenciamos dos glicoproteína una en huevo y otra en adulto, ambas con pesos moleculares mayores a 200 kDa típicos de las mucinas. Mediante el uso de lectinas se determinó la presencia de glicoproteínas con residuos de α -D-manosa y/o α -metilpiranosido en el extracto soluble de huevos con pesos moleculares 130 y 94 kDa y en el extracto soluble de adulto cinco polipéptidos con pesos moleculares entre 84 y 140 kDa. Así mismo se evidenció la presencia de residuos de N-acetilgalactosamina en una glicoproteína de 140 kDa de estos extractos. No obstante en los extractos solubles de los otros estadios no se demostró la presencia de glicoproteínas, aunque esto puede deberse a la baja presencia de polipéptidos observada en los mismos y la posibilidad de que la mayoría de las glicoproteínas se encuentran en el extracto insoluble lo cual queda por evaluarse.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.	iv
RESUMEN	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	x
ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Epidemiología	2
1.2 Biología y ciclo evolutivo del parásito.....	6
1.1 Patología y sintomatología en la esquistosomosis.....	8
1.2 Diagnóstico	11
1.3 Tratamiento	12
1.4 Glicoproteínas	12
1.5 Antecedentes	17
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo General	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIALES Y METODOS.....	30
3.1 Material biológico	30
3.2 Mantenimiento del ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	30
3.2.1 Infección de caracoles	30
3.2.2 Infección de hámsters y/o ratones	31
3.3 Obtención de los diferentes estadios del parásito.....	31
3.3.1 Huevos.....	31
3.3.2 Miracidios.....	31
3.3.3 Obtención de cercarias	32

3.3.4 Gusanos adultos	32
3.3.5 Esquistosómulos mecánicos.....	32
3.3.6 Esporocistos “ <i>in vitro</i> ”	33
3.4 Obtención de los extractos solubles de los distintos estadios del parásito. .	34
3.5 Determinación de la concentración de proteínas	34
3.6 Análisis electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	35
3.6.1 Identificación de proteínas	35
3.6.2 Identificación de glicoproteínas.....	35
3.6.2.1 Coloración con Ácido periódico de Schiff (PAS)	35
3.6.2.2 Coloración con Azul Alcian	36
3.6.3 Identificación de glicoproteínas en los extractos solubles mediante el uso de lectinas.....	36
3.6.3.1 Transferencia electroforética	37
3.6.3.2 Reconocimiento de glicoproteínas por lectinas.....	37
4. RESULTADOS	38
4.1 Obtención de esquistosómulos <i>in vitro</i>	38
4.2 Obtención de esporocistos <i>in vitro</i>	39
4.3 Identificación de proteínas de los extractos solubles de los diferentes estadios de <i>Schistosoma mansoni</i>	41
4.4 Identificación de glicoproteínas.....	42
4.3.1 Identificación de glicoproteínas mediante el uso de lectinas	44
5. DISCUSIÓN.....	47
6. CONCLUSIONES	60
7. RECOMENDACIONES.....	61
8. BIBLIOGRAFIA.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial de la esquistosomosis.....	5
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Schistosoma mansoni</i>	10
Figura 3. microfotografías donde se pueden observar del proceso de separación de colas y cuerpos de las cercarias y de la transformación de un esquistosómulo	40
Figura 4. Transformación <i>in vitro</i> del miracidio a esporocisto.....	40
Figura 5. Electroforesis de los extractos solubles de <i>S. mansoni</i> poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie	42
Figura 6. Electroforesis de los extractos solubles de <i>S. mansoni</i> . Gel de acrilamida al 10% teñido con Reactivo de Schiff (PAS).	43
Figura 7. Blot con Con-A de los polipéptidos separados en SDS-PAGE con los extractos solubles <i>S. mansoni</i>	45
Figura 9. Blot con DBA de los polipéptidos separados en SDS-PAGE con los extractos solubles de <i>S. mansoni</i>	46

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Clasificación Taxonómica de Schistosoma.</i>	3
<i>Tabla 2. Especies de parásitos y distribución geográfica de la esquistosomosis....</i>	4
Tabla 3. Lectinas empleadas para identificar carbohidratos en <i>S. mansoni</i>	16
Tabla 4. Concentración de proteínas en los extractos solubles de los distintos estadios de <i>S. mansoni</i>	38
Tabla 5. Posibles proteínas observadas en el gel de azul de Coomassie.....	58
Tabla 6. Posibles glicoproteínas observadas mediante la técnica con PAS.	59

ABREVIATURAS

A: Extracto soluble de adultos

C: Extracto soluble de cercarias

CAA: antígeno circula anódico

CCA: antígeno circulante catódico

Con A: *Canavalia ensiformes*

DBA: *Dolichos biflorus*

EDTA: etilen diamino tetra acetato de sodio

Em: Extracto soluble de esquistosómulo

Ep: Extracto soluble de esporocistos

Fuc: Fucosa

GADPH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

Gal: Galactosa

GalNac: N-acetilgalactosamina

GlcNac: N-acetilglucosamina

Glu: Glucosa

H: Extracto soluble de huevos

LPA: *Limulus polyphemus*

LFA: *Limax flavus*

M: Extracto soluble de miracidios

Nac: N-acetil

OMS: Organización Mundial de la Salud

PHA-E: *Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin

PNA: *Arachis hypogaea*

PM: Peso molecular

PMSF: P-metil sulfonil fluoruro

PSA: *Pisum sativum*

SEA: Por sus siglas en ingles Antigen Soluble of Eggs, antígeno soluble de huevo

Ser: Serina

STA: *Solanum tuberosum*

TBS: Tampón Tris salino

Thr: Treonina

Tris: Hidrocloruro de hidroximetil amino metano

RCA: *Ricinus communis*

UEA-1: *Ulex europaeus*

WGA: *Triticum vulgaris*

1. INTRODUCCION

La esquistosomosis o bilharziosis, es una enfermedad parasitaria crónica que en el ser humano es provocada por siete especies de trematodos del género *Schistosoma* (Tabla I). Generalmente la infección afecta al hígado, intestino o vías urinarias dependiendo de la especie. Los esquistosomas son parásitos que habitan en el torrente sanguíneo de los vertebrados y se caracterizan por ser gusanos planos, dioicos y digenéticos.

Se estima que aproximadamente 300 millones de personas están infectadas y 650 millones están en riesgo de infección ya que viven en áreas endémicas. De las personas infectadas más de 230 millones necesitan tratamiento cada año y según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) el número de personas tratadas contra la esquistosomosis aumentó de 12,4 millones en 2006 a 33,5 millones en 2010, por lo que todavía sigue siendo una causa significativa de morbilidad y mortalidad. La OMS considera a la esquistosomosis como la segunda enfermedad en importancia socio-económica en todo el mundo y la tercera enfermedad parasitaria de importancia en salud pública. (WHO, 2012; Martínez, E. y Bastidas, G. , 2012). Actualmente se producen cientos de miles de muertes anuales, aproximadamente 150.000 muertes/año por fallo renal atribuibles a *S. haematobium* y unas 130.000 muertes anuales debidas a hipertensión portal por *S. mansoni*. (A.M.S.E., 2013)

En Venezuela las áreas endémicas se distribuyen en aquellas zonas donde se encuentran los embalses, ríos y otras cuencas de agua dulce, y es donde se encuentra el hospedador intermediario del *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, un caracol planorbideo el cual es necesario para cumplir parte del ciclo de vida del parásito hasta alcanzar el estadio infectante para los humanos. Este hospedador no es el único pero sí el más importante y el que se encuentra en el territorio nacional. (González, A., y col, 2010).

1.1 Epidemiología

La esquistosomosis es prevalente en las regiones tropicales y subtropicales, especialmente en las comunidades pobres sin acceso a agua potable ni saneamiento adecuado. Se estima que al menos un 90% de las personas que necesitan tratamiento contra la esquistosomosis viven en África.

La esquistosomosis afecta especialmente a las poblaciones agrícolas y piscatorias. También están en riesgo las mujeres que realizan sus tareas domésticas, como el lavado de la ropa en aguas infestadas. La falta de higiene y las actividades lúdicas hacen que los niños sean especialmente vulnerables a la infección. (A.M.S.E., 2013). Hay dos formas principales de la esquistosomosis (intestinal y urogenital), causada por cinco de las siete especies de gusanos. (Tabla 2).

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *Schistosoma*.

Phylum	Platyhelminthes
Clase	Trematoda (Rudolphi, 1808)
Subcla	Digenea (Carus, 1863)
Orden	Strigeatida (Larue, 1926)
Familia	Schistosomatidae (Poche, 1907)
Género	<i>Schistosoma</i> (Weinland, 1858)
Especie	<i>S. haematobium</i> , <i>S. mansoni</i> , <i>S.japonicum</i> , <i>S. mekongi</i> , <i>S. malayensis</i> , <i>S. matthei</i> y <i>S. intercalatum</i>

Tomado de ITIS Report Page: *Schistosoma mansoni* , 2012

La enfermedad es endémica en 77 países, de los cuales en 52 existe mayor riesgo. De las personas infectadas mundialmente, el 85% pertenece a África subsahariana. (Figura 1). Hay cinco especies de *Schistosoma* con una tendencia a presentarse en patrones geográficos restringidos. *S. mansoni* es más frecuente en ciertas zonas tropicales y subtropicales de África subsahariana, Medio Oriente, América del Sur y el Caribe. En África del Norte, África Subsahariana, Medio Oriente y la India se distribuye *S. haematobium*. Mientras que *S. japonicum* se encuentra sólo en Asia. *S. intercalatum* está presente en África central y occidental, mientras que *S. mekongi* se limita a Laos y Camboya. El mayor número de casos de esquistosomosis ocurre en Egipto, Yemen y Argelia. (Tamer y Gamal, 2013).

Tabla 2. Especies de parásitos y distribución geográfica de la esquistosomosis

	Especies	Distribución geográfica
Esquistosomosis intestinal	<i>Schistosoma mansoni</i>	África, Medio Oriente, el Caribe, Brasil, Suriname, Venezuela.
	<i>Schistosoma japonicum</i>	China, Filipinas, Indonesia
	<i>Schistosoma mekongi</i>	Varios distritos de Cambodia y la República Democrática Popular Lao
	<i>Schistosoma intercalatum</i>	Zonas de pluvisilva de África central
Esquistosomosis urogenital	<i>Schistosoma haematobium</i>	África, Medio Oriente

Tomado de WHO, 2012.

Venezuela por estar ubicada en una zona tropical presenta todas las características climáticas, socioeconómicas y culturales para el desarrollo de las parasitosis. Siendo principalmente las zonas costeras, cuyo clima favorece las condiciones ecológicas para el desarrollo de los agentes etiológicos como la esquistosomosis; por lo que en Venezuela la esquistosomosis presenta una distribución focal de aproximadamente 15.000 km², que abarca los estados Aragua, Carabobo, Guárico, Miranda y Vargas, con una prevalencia

aproximadamente del 25 % siendo la especie que se encuentra en el país *S. mansoni*. (Alarcón de Noya y col, 2002; 2006).



Tomado de A.M.S.E., 2013

Figura 1. Distribución mundial de la esquistosomosis

En Venezuela la aplicación de molusquicidas y el suministro de praziquantel (antihelmintico) a personas infectadas han disminuido la intensidad de la infección por *S. mansoni*, por lo que el área endémica del país pasó a ser un área de baja transmisión. Esta condición ha convertido a la esquistosomosis en una parasitosis desatendida por los programas de control, lo que ha traído como consecuencia el repoblamiento de cuerpos de agua por parte de su hospedador intermediario *Biomphalaria glabrata* (Alarcón de Noya, 2007) y a la adaptación de éste a zonas situadas fuera del área endémica tradicional en estados como Monagas (Caripe),

Cojedes (Tinaquillo), Lara (Valle Anzoátegui) y Portuguesa. (Alarcón de Noya, y col. 1999).

Es una enfermedad en aumento progresivo por múltiples factores muy relacionados con la pobreza y la falta de sistemas de saneamiento y de agua potable. Cabe destacar que, en muchos casos, el aumento en la incidencia de la enfermedad se asocia a proyectos de desarrollo de recursos hídricos, como presas y proyectos de irrigación, ya que éstos aumentan la exposición de individuos susceptibles a aguas contaminadas. Así mismo, los movimientos poblacionales, con aumento de población en entornos periurbanos y la necesidad de acceso al agua y la energía, producen cambios ambientales que incrementan las zonas con riesgo de exposición. Por el contrario, en Sudamérica y el Caribe la prevalencia y la morbilidad de la esquistosomosis en los países tradicionalmente endémicos están disminuyendo, precisamente por la mejora en las condiciones sanitarias y la calidad del agua en muchas regiones. (A.M.S.E., 2013)

1.2 Biología y ciclo evolutivo del parásito

El ciclo de vida del parásito es un ciclo indirecto el cual requiere de dos hospedadores, un vertebrado y un invertebrado (molusco). Como se mencionó anteriormente, en las diferentes especies de *Schistosoma* que infectan al hombre el ciclo de vida es muy parecido, difiriendo en sus hospedadores intermediarios y en la ubicación final de los gusanos adultos en el sistema circulatorio del vertebrado. Debido a que en Venezuela la única especie que infecta al hombre es *S. mansoni* y su hospedador intermediario es *Biomphalaria glabrata*,

describiremos en detalle su ciclo de vida. En los hospedadores el parásito se desarrolla y presentan diferentes morfologías. (Figuera, 1997).

Los vermes adultos, son gusanos de color blanco o grisáceo, de 7-20 mm de largo, aplanados dorsoventralmente, caracterizados, por un marcado dimorfismo sexual. Cuenta con dos ventosas (oral y ventral), un tegumento complejo, un tracto digestivo ciego y órganos reproductores. El cuerpo del macho presenta un canal ginecóforo donde se aloja la hembra más larga y delgada para su copulación.

Una vez que el macho y la hembra se aparean en el sistema portal intrahepático del hospedador definitivo (mamífero), la hembra apareada es transportada por el macho hasta los vasos capilares de las venas mesentéricas en donde producen aproximadamente 300 **huevos** diarios los cuales miden de 114-175 μm de longitud por 45-73 μm de ancho, son alargados de forma ovoidal y presenta un espolón lateral característico de la especie. Estos huevos pueden ser llevados con la corriente sanguínea hacia el hígado o quedarse en el intestino y ser liberados con las heces. Los huevos liberados que entran en contacto con el agua y bajo condiciones ambientales de luz, temperatura y salinidad, eclosionan, liberando una larva ciliada llamada **miracidio** de 180 μm de longitud por 62 μm de ancho y de forma ovalada. El miracidio una vez que encuentra al hospedador intermediario (caracol) penetra rápidamente los tejidos blandos transformándose en **esporocisto** madre o primario, estadio de forma sacular que contiene en su interior células germinativas capaces de originar 200-400 esporocistos hijos, los cuales abandonan el esporocisto primario y se dirigen hacia el hepatopáncreas del caracol. Mediante multiplicación asexual, estos esporocistos originan numerosas

larvas de cola bifurcada denominadas **cercarias**, entre 4 y 6 semanas después de la infección del caracol, y al estar éste bajo estímulos favorables de luz y temperatura lo abandonan. Posteriormente las cercarias nadan hasta encontrar el hospedador definitivo (mamífero), penetran la piel y se transforma en **esquistosómulo**, los cuales migran a través de la sangre hacia los pulmones, corazón, e hígado y maduran sexualmente en la vena porta, convirtiéndose en **adultos** machos y hembras para comenzar el ciclo nuevamente. El ciclo en el hospedador definitivo puede durar entre 5-7 semanas. (Cesari y Alarcón de Noya, 1987; Gryseels y col, 2006).

1.1 Patología y sintomatología en la esquistosomosis

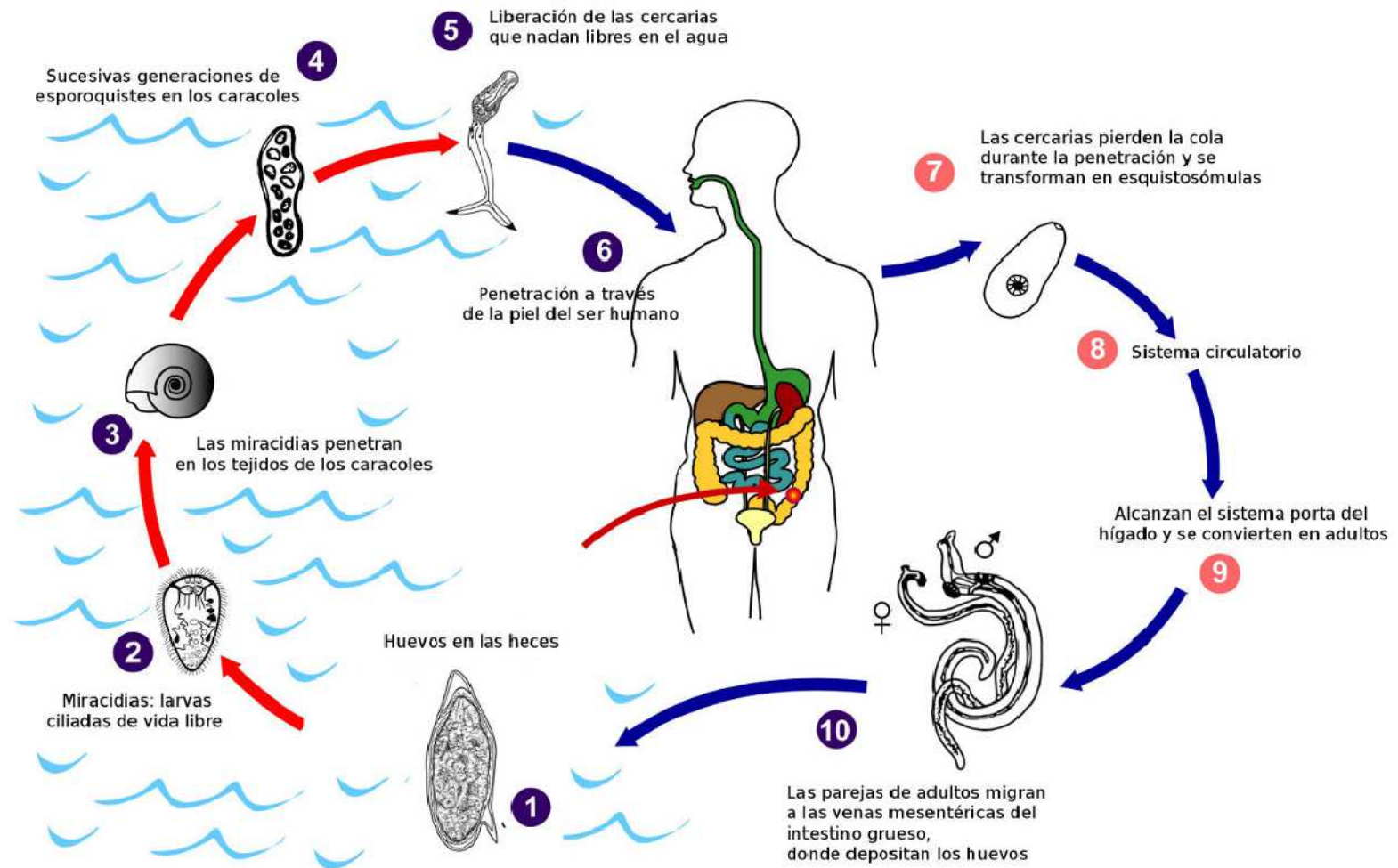
El parasitismo por *Schistosoma mansoni* produce en el hombre la esquistosomosis mansoni, esquistosomosis intestinal de Manson o Bilharziosis. La patología de ésta va a depender principalmente de la etapa de desarrollo en que se encuentren los parásitos en el organismo. (Pereira y Pérez, 2004).

La patogenia de la esquistosomosis por *S. mansoni* pueden deberse a tres estadios del parásito. La cercaria a su paso por la piel del hospedador puede originar procesos inflamatorios de alergia local a causa de la hipersensibilidad que pueden producir dermatitis cercariana o exantema papuliforme, pruriginoso, llamado “la comezón del nadador”. Aunque esta dermatitis es más frecuente tras la infección por esquistosomas de aves. (Rojas-Marcos y col, 2009; Marcial-Rojas, 1971).

Los vermes adultos dentro de los vasos del sistema porta en el intestino o dentro del hígado, cuando mueren son arrastrados hasta los vasos intrahepáticos produciendo obstrucción o reacciones inflamatorias en sus paredes y sus productos de excreción causan sensibilización y lesiones inflamatorias difusas en órganos como: intestino, hígado, bazo, pulmón y otros. Los huevos constituyen el agente patogénico más importante, inducen a su alrededor una reacción inflamatoria llamada “granuloma” (inmunidad mediada por células dependientes de linfocitos) que luego es sustituida por tejido fibroso cicatricial. Esta respuesta inmunológica protege a los hepatocitos contra la acción de los productos del miracidio, a medida que aumenta la fibrosis el flujo sanguíneo disminuye en el sitio de obstrucción (espacio periportal) conduciendo a la hipertensión portal con su clásica patología de hepatoesplenomegalia, ascitis y red venosa colateral. (Marcial-Rojas, 1971; Elbaz, T y Esmat, G., 2013)

Todos estos procesos patogénicos están influenciados por la intensidad de la infección o carga parasitaria, las reinfestaciones y el estado inmunológico del hospedador.

En general se distinguen varias formas patológicas como la aguda o toxémica, crónica leve, crónica grave y cardiopulmonar, donde la más frecuente es la forma crónica leve y grave.



Tomado de <http://herramientas.educa.madrid.org/animalandia/ficha.php?id=4145>

Figura 2. Ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*

La forma crónica leve es caracterizada por granulomas con células epitelioides y gigantocitos, infiltrado con células linfoides con tendencia a fibrosis o cicatrices, que ocurren fundamentalmente en el hígado. Mientras que la forma crónica grave ocurre en la forma hepatoesplénica, además de las lesiones de fibrosis hepáticas se agrega la esplenomegalia, várices esofágicas e hiperplasia en el bazo. (Marcial-Rojas, 1971; Elbaz, T y Esmat, G., 2013)

En relación a la sintomatología se distinguen varios períodos clínicos en correlación con las formas anatomopatológicas. En las zonas endémicas de Venezuela, la mayoría de los pacientes permanecen en los periodos asintomáticos, intestinal o hepato-intestinal. El período intestinal (asintomático) se caracteriza por diarrea con o sin disenteria, dolor abdominal, dolor a la palpación cecal, hígado y bazo no palpables, leucocitos normales o ligeramente aumentados, eosinofilia y reacción intradérmica positiva. En el período hepato-intestinal se presentan manifestaciones cutáneas tipo urticaria, fiebre, fenómenos pulmonares (tos seca y persistente) y alergias, puede haber diarrea e hipotensión, esplenomegalia moderada, ausencia de huevos en heces, eosinofilia y leucocitosis acentuada. (Marcial-Rojas, 1971; Elbaz, T y Esmat, G., 2013)

1.2 Diagnóstico

Los esquistosomas no presentan, por lo general, síntomas característicos que sirvan para diferenciarlas de otros procesos infecciosos o parasitarios. Por lo tanto, la valoración del cuadro clínico no pasa de tener un valor orientativo. El diagnóstico de la esquistosomosis se realiza habitualmente mediante técnicas

coprológicas, identificando los huevos del parásito en muestras de heces. El recuento de los huevos es indicativo del nivel de infección. (Ramajo, 2008)

Las técnicas serológicas han sido ampliamente utilizadas para el diagnóstico de la esquistosomosis humana, habiéndose desarrollado diferentes pruebas para la detección tanto de anticuerpos como de antígenos circulantes. Para la detección de anticuerpos frente a la infección se han utilizado diversos métodos, como la inmunofluorescencia, la hemaglutinación indirecta, la fijación del complemento y el ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), la reacción circumoval (PPCO) y la cercario reacción de Vogel, éstos con buenos resultados en general, aunque la sensibilidad depende en cada caso del antígeno utilizado. (Ramajo, 2008)

1.3 Tratamiento

El control y tratamiento en Venezuela se basa en la quimioterapia selectiva o individual con praziquantel (Alarcón de Noya y col, 2006), una droga que es efectiva contra todas las especies de *Schistosoma*. (Aguilar y col, 1999). Sin embargo frente algunas resistencias contra este fármaco se han realizado ensayos con oxidiazol y Furoxan, que demuestra una elevada efectividad esquistosomicida frente a varias especies. (Ramajo, 2008)

1.4 Glicoproteínas

Las proteínas están formadas por cadenas muy largas de aminoácidos, que adquieren una forma determinada en el espacio, lo cual determina su función. Los carbohidratos son una de las cuatro clases principales de biomoléculas junto con

proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Son aldehídos y cetonas con múltiples grupos hidroxilos. Los carbohidratos pueden ser monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos dependiendo del número de sacáridos que los forman y pueden estar enlazados a muchas proteínas y lípidos, donde ejercen funciones clave en las interacciones entre las células y otros elementos del entorno celular.

Las glicoproteínas son un gran número de proteínas que contienen cadenas de azúcares ligadas a ellas, que aumentan su estabilidad, determinan su forma en el espacio, facilitan su interacción con otras proteínas y también la diferenciación y desarrollo de las células. Estas cadenas de azúcares se llaman glicanos (Ramajo, 2008). Muchas glicoproteínas son componentes de las membranas celulares, donde ejercen una serie de funciones en procesos tales como la adhesión celular. Otras se forman por la unión del carbohidrato a proteínas solubles, además las glicoproteínas contienen múltiples y variados residuos unidos por diferentes tipos de enlaces glicosídicos. Las diversas estructuras de los carbohidratos expuestas en las superficies celulares resultan muy adecuadas como puntos de interacción entre las células y su entorno. (Mark y col, 2008). Algunas glicoproteínas juegan un papel muy importante en los procesos de regulación del crecimiento celular y de la apoptosis. (Gabiús H. , 2001)

En las células, las glicoproteínas y los glicolípidos están generalmente asociados a membranas pero también los hay citoplasmáticos. Pueden ser solubles y estar libres en los fluidos tisulares. Así mismo se encuentran glicosaminoglicanos, los

cuales son polisacáridos lineales formados por disacáridos que se repiten, tienen una gran capacidad de retener agua de modo que semejan a la mucina en solución (moco), de ahí que forman parte importante de la estructura de la matriz extracelular. (Brooks y col, 1997)

Los glicanos se pueden unir a las proteínas por enlaces N- (al grupo amida del aminoácido asparagina) o por enlaces O- (al grupo hidroxilo de serina o treonina). Esto es, que un glicano con enlace N- se unen, generalmente a través de la N-acetilglucosamina, o a veces a través de la N-acetilgalactosamina, al grupo amino de la cadena lateral de un residuo de asparagina. Los glicanos con enlace O- suelen unirse mediante un enlace glucosídico O- entre la N-acetilgalactosamina y el grupo hidroxilo de un residuo de treonina o serina. (Mathews y col, 2006)

Algunos residuos de carbohidratos actúan como señales de reconocimiento, mediante proteínas que se unen a ellos de manera específica. Una clase de proteínas de este tipo son las inmunoglobulinas, otro grupo muy distinto de proteínas que se unen a sacáridos son las lectinas.

Las lectinas se identificaron por primera vez en los tejidos vegetales, donde desempeñan funciones defensivas y de adhesión. Por definición, las lectinas son glicoproteínas naturales que se enlazan selectiva y reversiblemente a residuos de carbohidratos. (Díaz y col, 1999; Brooks y col, 1997). Sin embargo la definición que hoy se acepta del término lectina es la propuesta por Goldstein y col, (1960) citado por Brooks y col (1997), en la cual establece que: “una lectina es una proteína de origen no-inmunológico, que enlaza carbohidratos aglutinando células

y/o precipitando glicoconjugados". Esta característica se ha utilizado por muchos años como armas valiosas, en el campo de la genética, la biomedicina y la inmunología, ya que su utilidad está basada en la propiedad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares y fluidos corporales.(Díaz y col, 1999)

Las lectinas se nombran de acuerdo a la fuente originaria, sea con su nombre vulgar o común, es decir, por las abreviaturas simples del nombre latino de la especie originaria, sea planta o animal. (Ver tabla 3).

La especificidad nominal de una lectina está generalmente expresada en términos del azúcar que mejor inhibe o bloquea su efecto de aglutinación o precipitación. El sitio combinante de una lectina es generalmente más complejo que la unión a un monosacárido. Se piensa que generalmente se incluyen al menos tres monosacáridos terminales y subterminales en una cadena oligosacárida en una particular organización espacial y a veces el sitio de reconocimiento de la lectina involucra la parte del lípido o de la proteína al que el oligosacárido está unido covalentemente. Además también participan en el enlace con el carbohidrato interacciones hidrofóbicas y electroestáticas que si bien no están en el enlace con el carbohidrato juega un papel importante en el enlazamiento de la lectina a las estructuras tisulares. (Brooks y col, 1997)

Tabla 3. Lectinas empleadas para identificar carbohidratos en *S. mansoni*

LECTINA	ABREV.	PRINCIPALES ESPECIFICIDADES DE CARBOHIDRATOS (A PARTIR DEL CATALOGO)
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	α -metil manopiranosido y α -D-Manosa
<i>Triticum vulgare</i>	Suc- WGA	Manosa β (1,4)glucosamina β (1,4)glucosamina; N-acetilglucosamina
<i>Artocarpus integrifolia</i>	AIA	α -D-Galactosa;
<i>Glycine max</i>	SBA	N-acetilgalactosamina
<i>Solanum tuberosum</i>	STA	Oligosacáridos que contienen glucosamina unida en sitios β (1,4)
<i>Limax flavus</i>	LFA	Ácido N-acetilneuramínico
<i>Sambucus nigra</i>	SNA	Galactosamina; Galactosa y Lactosa;
<i>Phytolacca americana</i>	PWA	Oligómeros de glucosamina unidos en β (1,4); N-acetilglucosamina
<i>Maaackia amurensis</i>	MAL-II	Oligosacáridos con residuos terminales de ácido siálico
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LEA	Oligómeros de glucosamina
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	Lactosa; β -D-Galactosa;
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	α -L-Fucosa
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-II	Oligómeros de glucosamina unida en β (1,4)
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSI-B4	α -Galactosa
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSII	N-acetilglucosamina
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	N-acetilgalactosamina
<i>Pisum sativum</i>	PSA	Metyl D- manopiranosido y D- Manosa
<i>Helix pomatia</i>	IIPA	α - Galactosamina
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PIIA-E	Galactosa β (1,4)glucosamina α (1,2) manosa
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PIIA-L	Galactosa β (1,4)glucosamina α (1,2) manosa
<i>Datura stramonium</i>	DSA	Chitobiosa u oligómeros β (1,4) de N-acetilglucosamina
<i>Sophora japonica</i>	SJA	Galactosamina y galactosa.

Tomado de Márquez, 2004.

El uso de las lectinas ha permitido el desarrollo de técnicas como la cromatografía de afinidad para la purificación de glicoproteínas. Ejemplo de ellas es la purificación de IgG utilizando una columna de Con A-sepharosa, de igual manera se han purificado enzimas glicosiladas y hasta las propias lectinas. Las interacciones de estas proteínas en las células pueden ser inhibidas en muchos casos por azúcares, lo que ha provisto a los científicos de útiles marcadores en técnicas histoquímicas y en la microscopía electrónica para estudiar la estructura y función de la membrana plasmática. Generalmente se utilizan lectinas conjugadas con marcadores como la biotina o la peroxidasa. Además se han utilizado las lectinas para estudiar cambios estructurales en los glicoconjugados presentes en

las superficies celulares y en ocasiones de esta forma detectar cambios morfológicos ocurridos para analizar la distribución subcelular de los epítopes y terminales glicoproteicos así como también las alteraciones en la expresión de moléculas presentes en la superficie celular. (Díaz y col, 1999).

1.5 Antecedentes

La glicobiología aplicada a los esquistosomas aborda el estudio de la estructura, patrones de expresión y funciones de los glicanos de estos organismos. (Ramajo, 2008)

Los esquistosomas, a pesar de estar ubicados en el torrente sanguíneo y estar expuestos a un amplio rango de respuestas inmunológicas sobreviven durante largo tiempo. Éstos no sólo han evolucionado para prosperar en un ambiente hostil, sino que también han “negociado” ambientes muy diferentes durante sus estadios de vida libre y vida parasitaria. (Dunne, 1990)

Como se mencionó anteriormente el ciclo de vida de *S. mansoni* consiste en un número de diferentes larvas, formas intermedias y adultas que tienen distintas morfologías, que viven en diferentes ambientes y expresan diferentes funciones. Tal diversidad se puede relacionar a tener un equivalente en la composición bioquímica de las diversas formas. (Ruppel y Cioli, 1977).

Se han utilizado técnicas inmunológicas, bioquímicas y el uso de lectinas para comparar la composición de las diferentes etapas de desarrollo de *S. mansoni*. (Iskratsch y col, 2009). Los cambios producidos en el parásito al pasar de un

estadio de vida libre a vida parasitaria involucran tanto la morfología y topografía de la superficie del parásito, como la expresión y distribución de sus carbohidratos (McLaren, 1980). En cada estadio del ciclo de vida de este parásito los carbohidratos de superficie o los secretados, parecen jugar un papel muy importante en la interacción parásito-hospedador. (Dunne 1990). De acuerdo a esto, se han realizado investigaciones tanto de las proteínas como de las glicoproteínas de los distintos estadios de *S. mansoni*, con el fin de entender la biología del parásito, su adaptación a diferentes ambientes así como su relación con la respuesta del sistema inmunológico del hospedador.

Se han aislado y caracterizado glicoproteínas presentes en la superficie del adulto (Pujol y Cesari, 1993). Por ejemplo, Bennett y Seed (1977) y Hayunga y col. (1983) lograron aislar dos glicoproteínas de alto peso molecular del tegumento (150 y 50 kDa), mediante cromatografía de afinidad con Concanavalina-A acoplada a una columna de sepharosa, Payares y col. (1984) purificaron la fosfatasa alcalina presente en la membrana tegumental de los adultos de *S. mansoni*, dicha enzima consiste en un polipéptido glicosilado de Mr 65000 en condiciones reductoras y en condiciones nativas presenta un Mr 130000, encontrándose esta enzima en los diferentes estadios de su ciclo de vida.

Uno de los cambios de mayor trascendencia en el ciclo de vida del parásito lo sufre la cercaria al penetrar al hospedador vertebrado. En efecto, la cercaria de vida libre, pasa a una forma de vida parasitaria, el esquistosómulo. Durante esta transición el parásito sufre cambios adaptativos asociados a la expresión génica

diferencial (Márquez, 2004), estos cambios incluyen alteraciones topográficas, morfológicas, bioquímicas y antigénicas. (McLaren, 1980; Payares y col. 1985), e involucra un complejo grupo de cambios metabólicos y fisiológicos, que incluye un cambio a una respiración anaeróbica, la pérdida del glicocáliz de la cercaria y la reconstrucción completa de la membrana tegumental. (Márquez, 2004)

En un estudio comparativo, Murrell y col, (1978) analizaron los azúcares presentes en la membrana superficial del tegumento de cercarias, esquistosómulo de pulmón y de hígado, observando la presencia de algunos residuos en todos los estadios evaluados, y algunas entre ellos. Igualmente Simpson y col (1983) mediante el uso de lectinas encontraron residuos de glucosa/manosa (Con-A), N-ac-glucosamina (WGA) y galactosa (RCA, PNA) en la superficie de esquistosómulos recién transformados, en esquistosómulos de pulmón y vermes adultos; residuos de fucosa (FBP) en la superficie de esquistosómulos recién transformados y ácido siálico (SBA, PNA) en la superficie de esquistosómulos de pulmón y vermes adultos. También demostraron que en el esquistosómulo, la cantidad de carbohidratos expuestos sobre su superficie y detectados disminuye entre las dos horas y los cinco días siguientes a la penetración por la piel.

Linder y Hultdt (1982), estudiaron la distribución de los carbohidratos usando varias lectinas, sobre varias secciones del adulto, tales como el tegumento, el intestino, la superficie externa y los huevos, encontrando residuos de D-manosa (Con-A), D-galactosa (RCA/ PNA) y N-acetil-D-glucosamina (WGA) en la superficie externa y el tegumento del verme; residuos de N-acetil-D-glucosamina y D-galactosa en el

intestino y residuos de D-galactosa, N-acetil-D-glucosamina en huevos, asimismo encontraron ausencia de residuos de fucosa en todas las secciones estudiadas. Por otro lado Márquez, (2004) realizó un estudio en cortes de parafina de gusanos adultos y juveniles, en el cual igualmente observó reacción a Con-A en diferentes zonas del tegumento del parásito juvenil (gusano de 21 días) y del adulto, además encontró residuos de N-ac-galactosamina, glucosamina $\beta(1,4)$ L-fucosa y galactosa $\beta(1,4)$ glucosamina $\alpha(1,2)$ manosa, en la membrana externa del adulto; residuos de α -metilmanopiranosido, α -manosa tanto en adultos como en juveniles y abundantes residuos de ácido siálico en el verme juvenil.

Simpson y Mc Laren (1982) demostraron una desventaja del uso de las lectinas, éstas no sólo se unen a oligosacáridos expuestos en la membrana tegumental del parásito sino que también pueden inducir diferentes grados de daño en el tegumento que sólo son detectables a nivel de microscopía electrónica y pueden conducir a una falsa interpretación de los datos, estos autores indicaron las diferencias fundamentales de la membrana externa del tegumento entre el adulto y el esquistosómulo, en términos de estructura, función y susceptibilidad al daño inducido por ligandos a lectinas.

Como ya hemos mencionado los carbohidratos pueden unirse a las glicoproteínas por enlaces O-glicosídicos ó N-glúcidos. En ese aspecto Nyame y col. (2000) realizaron el primer estudio sistemático de las estructuras N- y O- enlazados de oligosacáridos derivados de glicoproteínas del verme adulto y del esquistosómulo, mostrando que oligosacáridos tipo alta manosa y complejos tienen estructuras

similares a los oligoacáridos encontrados en células mamíferos, también encontraron ausencia de ácido siálico, presencia de β -galactosa y altas cantidades de fucosa. De igual manera Jang-Lee y col. (2007) analizaron las estructuras de los N- y O-glicanos de las secreciones de huevos y cercarias, observando diferencias en la estructura de la región central (núcleo) del glicano, mostrando núcleos xilosilados y difucosilados respectivamente. Adicionalmente demostraron que las estructuras básicas de los N-glicanos en secreciones de cercarias consistían predominantemente en una secuencia Gal β 1 $\rightarrow$ 3 (Gal β 1 $\rightarrow$ 6) GalNAc, mientras que en secreciones de los huevos, predominaban en mucina tipo 1 (Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc) y tipo 2 (Gal β 1 $\rightarrow$ 3(GluNAc β $\rightarrow$ 6)GalNAc).

Hooke y Deelder, (2001) demostraron la presencia de N-glicanos en esquistosómulos de 48 horas similares a los de los gusanos adultos, e indicaron la presencia de glicoproteínas tipo oligomanosa en huevos de *S. mansoni* y de *S. japonicum*, similares a los encontrados en los vermes adultos.

Con relación a otros estadios del parásito se ha encontrado que la Con-A reacciona en huevos y miracidios (Márquez, 2004) y se ha demostrado que los residuos de galactosa, glucosa, manosa, N-ac-galactosamina y N-ac-glucosamina están presentes en una posición terminal en los miracidios y en las cercarias. (Yoshino y col, 1977; Linder, 1985).

En *S. mansoni* ocurren cambios en la composición de lípidos, oligosacáridos, proteínas y glicoproteínas, durante la transformación de un estadio de vida a otro, así como también en el mismo estadio (Simpson y Smither, 1980). Payares y

Simpson (1985) señalaron que a las 48 horas se produjo un cambio en el patrón de expresión glicoproteica entre la cercaria y el esquistosómulo y también se producen cambios durante la maduración del esquistosómulo. Simpson y col, (1983) sugieren que los cambios en la composición de oligosacáridos expuestos en el esquistosoma, pueden reflejar alteraciones en la antigenicidad, así como del desarrollo de la capacidad de resistencia al ataque inmunológico. En este sentido, Payares y Simpson (1985) sugieren que sólo algunas glicoproteínas pueden ser antigénicas.

La superficie del esquistosómulo y del adulto, esta cubierta por numerosas proteínas, la mayoría de las cuales juega un papel importante en la sobrevivencia del parásito en el hospedador. Payares y col. (1985) identificaron las glicoproteínas de 32-38 kDa en la superficie de esquistosómulos, éstas fueron reemplazadas progresivamente por una glicoproteína antigénica de 32 kDa en los vermes adultos, estos cambios moleculares en las glicoproteínas de 38-32 kDa sugieren que son componentes del glicocálix que envuelve a la cercaria y se ha demostrado que la presencia del glicocálix va disminuyendo a medida que se transforma en esquistosómulos. (Kusel, 1970; Snary y col. 1980), sin embargo la composición proteica y síntesis de proteínas en la superficie de la membrana de la cercaria no es muy diferente a la de los esquistosómulos *in vitro* (Kusel, 1972).

En cuanto a la cercaria esta puede ser altamente antigénica (Caulfield y col, 1988), su glicocálix esta compuesto por alrededor de un 87% de glicoproteínas (Dunne, 1990; Caulfield y col, 1988). Pero muchas de estas proteínas pueden

estar relacionadas a polipéptidos producidos activamente por los embriones antes de abandonar a su hospedador y no están presentes durante todo el ciclo de vida, como demostró Atkinson y Atkinson (1981) donde muchos polipéptidos sintetizados por la cercaria difieren de los sintetizados por adultos, tanto machos como hembras, y los sintetizados por la cercaria justo antes de salir del caracol son considerablemente diferentes a los sintetizados 3 días antes como las de 35, 53 y 58 kDa. Se han estudiado muchas glicoproteínas inmunogénicas presentes en el glicocáliz de la cercaria (Dalton y col, 1987), como las encontradas por Solórzano, (2011) cuyos pesos moleculares son 65, 97y 108 kDa.

En general, el estudio de los componentes moleculares en los diferentes estadios del ciclo de vida de *S. mansoni* ha tenido una orientación inmunológica, buscando caracterizarlos antigénicamente y conocer su importancia diagnóstica, inmunoproláctica y patológica. Durante la evolución del parásito ocurren cambios en los componentes estructurales, ya mencionados anteriormente, ejemplo de ello son proteínas de excreción-secreción que inducen en el hospedador una respuesta inmunológica, entre ellas la inmunidad concomitante. (Simpson y Smither, 1980).

Durante la infección muchos huevos liberados son atrapados en el tejido. Algunos estudios demuestran que los huevos de *S. mansoni* contienen muchas proteínas y glicoproteínas antigénicas que son secretados (Lustigman y col, 1985; Dunne y col, 1986), dichas glicoproteínas son los llamados antígenos solubles de huevos (SEA) y son los que inducen a una respuesta inmunológica como la hipersensibilidad, producción de anticuerpos y formación de granulomas.

Hamburger y col (1982) purificarón una glicoproteína de 70 kDa mediante cromatografía de afinidad en lectinas, para utilizarla con fines diagnóstico, de igual manera Boctor y col. (1982) obtuvieron cuatro antígenos similares al glucógeno aislados de extractos crudos de huevos de *S. mansoni*.

Meevissen y col, (2012) encontraron que la respuesta del sistema inmunológico es mediada entre los glicanos presentes en las glicoproteínas de los huevos de *S. mansoni* y los receptores tipo C de las células dendríticas y otras células del sistema inmunológico, en un estudio reciente se evidenció que dos glicoproteínas altamente inmunogénicas, Kappa-5 e IPSE/α1 las cuales interactúan con las células dendríticas principalmente a través de receptores de manosa y glicanos fucosilados.

Otras glicoproteínas antigénicas son las presentes en el intestino del adulto, Cummings y Nyame (1996) identificaron las glicoproteínas más representativas e importantes que juegan un papel inmunogénico, estas fueron las denominadas proteínas circulantes derivados del intestino del adulto, ahora conocidos como antígeno circulante anódico (CAA) y antígeno circulante catódico (CCA). Estas fueron estudiadas anteriormente por Nash (1978) sugiriendo que eran polisacáridos de alto peso molecular compuesto principalmente por residuos de N-acetilgalactosamina y ácido D-glucurónico, y posteriormente por Planchart e Incani (2007) evidenciando que el “vómito” del adulto es un potencial antígeno, observando la presencia de dos dobletes altamente inmunogénicos, de 31/32 y 38/40 kDa. Norden y Strand (1985) estudiaron las glicoproteínas antigénicas que

se presentan durante el curso de la infección en ratones y humanos encontrando glicoproteínas antigenicas de 55, 52 y 35 kDa y glicoproteinas presentes durante la infeccion entre 12 y 400 kDa. .

La caracterización de moléculas presentes en la superficie del adulto y las reacciones que participan en su metabolismo es un paso esencial en la comprensión de la relación hospedador-parásito y los propios mecanismos de control homeostático del gusano. Para ello se han estudiado enzimas implicadas en el metabolismo y en la biosíntesis de glicoproteínas del tegumento del adulto. (Rumjanek y Smithers, 1978; Simpson y col, 1981). Además se han encontrado una serie de proteínas integrales de membrana en la superficie del parásito que han sido consideradas como candidatos a vacunas, entre ellas tenemos las proteínas denominas Sm22, Sm23, Sm24, Sm25, Sm74, y enzimas que pueden inhibir la captación de glucosa como la SmTPH y SmSL (Dunne y col 1997; Wright y col, 1990; Zhou y col, 1990; Ali y col, 1991, Pearce y col, 1991; Karcz y col 1988, Suri y col 1997; Attallah y col, 1999; El-Ansary, 2003; Loukas y col 2007; Nyame y col, 2000; Rao y col, 2003). Sin embargo por la característica del parásito de presentar mimetismo molecular, ha sido muy difícil conseguir una vacuna eficaz.

Poco se ha estudiado la relación del parásito con el hospedador intermediario, no obstante es muy importante, porque en esta parte de su ciclo de vida, se podría impedir el desarrollo del parásito. Las glicoproteínas en estos estadios pueden ser importantes en la regulación de la interacción del parásito con el molusco. Se han

identificado glicoproteínas y epítopes de carbohidratos sobre el tegumento de los esporocistos los cuales se han descrito como constituyentes extremadamente inmunogénicos, (Dunne, 1990). En este sentido Zelck y Becker (1990) mediante el uso de lectinas, evaluaron receptores en esporocistos madre y esporocistos hijos observando diferencias en las reacciones con distintas lectinas (Con-A, LCA, PSA, DBA, SBA, HPA, PNA) evidenciando diferencias en la expresión de glicoconjugados. Uchikawa, y Loker (1991) caracterizaron la transformación *in vitro* de esporocistos de *Schistosoma mansoni* y de *Echistosoma paraensei*, donde de once lectinas usadas ocho fueron reconocida en *S. mansoni*. Se ha demostrado que el parásito utiliza glicoproteínas de la hemolinfa del molusco para evadir las posibles respuestas inmunológicas, por lo que hay una relación entre los glicoconjugados del parásito y del molusco, dependiendo de la composición de glicoproteínas de ambos, el caracol puede ser susceptible o resistente. (Martins-souza y col, 2011; Yoshino y col, 2012; Yoshino y col, 2013; Lehr, 2010)

Es bien sabido que los glicanos presentes en los esquistosomas desempeñan funciones importantes en la biología del parásito así como en la interacción parásito-hospedador, especialmente en la inducción y modulación de la respuesta inmunitaria y en la inmunopatología de la esquistosomosis, es por esto que la glicobiología de los esquistosomas se ha convertido en un área de creciente interés, y en los últimos años han proliferado los estudios acerca de los glicanos y glicoconjugados de estos patógenos. Los glicanos de especies como *S. mansoni* y *S. japonicum* han sido objeto de numerosos estudios como ya hemos visto y actualmente se dispone de abundante información acerca de su composición y

estructura. Las funciones biológicas y la estructura de otros glicanos son, sin embargo, mucho menos conocidas. El conocimiento de dichas moléculas son importantes no sólo para comprender la biología de la relación parásito-hospedador, sino también porque puede facilitar la identificación de antígenos parasitarios para vacunas, así como la identificación de antígenos de interés diagnóstico o de nuevas dianas para fármacos, dichas moléculas son las expresadas en la superficie de su tegumento y las excretadas y/o secretadas durante sus procesos vitales. (Hokke y col, 2007a, 2007b ; Hokke y Yazdanbakhsh, 2005; Jang-Lee y col, 2007; Wilson y col, 2004)

Hasta la fecha, la mayor parte de las investigaciones sobre la glicobiología de *S. mansoni* se han llevado a cabo con extractos completos (tegumento) de distintas fases evolutivas del parásito, ocasionalmente con secreciones de adultos, cercarias y huevos. En conjunto, dichas investigaciones se han centrado principalmente en averiguar la composición y estructura de los glicanos, así como sus patrones de expresión en función del sexo, fase evolutiva y tejidos del parásito, utilizando para estos propósitos, la espectrometría de masas y los métodos histoquímicos basados en el uso de lectinas y anticuerpos monoclonales anti-carbohidratos como sondas específicas. (Hokke y Deelder, 2001; Hokke y col, 2007a)

Aunque estos estudios han proporcionado abundante información en relación con la composición y estructura de sus glicanos, el conocimiento del glicoma y del glicoproteoma de *S. mansoni* aún dista mucho de estar completo. En este sentido

conviene señalar que: la información es escasa o falta por completo para algunas fases evolutivas, salvo excepciones, se desconoce la identidad de los glicanos presentes en las glicoproteínas, y para la mayoría de los glicanos se desconoce su función concreta, porque a diferencia de lo que ocurre con las proteínas, actualmente el simple conocimiento de su secuencia no ofrece ninguna pista acerca de su función o papel biológico. (Hokke y col, 2007a)

La comprensión de la glicobiología de los esquistosomas requiere conocer no sólo la estructura de los glicanos, sino también el momento y el lugar en que son expresados, es decir, en qué glicoproteínas o glicolípidos, en qué tejido, si son de superficie o de secreción o si son expresados por una única fase evolutiva o por varias de ellas, además de que en la literatura se reporta principalmente la composición de los denominados antígenos solubles en huevos y en adultos se propone identificar aquellas glicoproteínas que se encuentran en los extractos solubles de todas las fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (miracidio, esporoquiste, cercaria, esquistosómulo, huevos y adultos), con el fin de comprender la glicobiología de *S. mansoni* y observar las diferencias entre los distintos estadios, estas glicoproteínas podrían ser utilizadas tanto para uso diagnóstico o como blanco para nuevos fármacos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Identificar las glicoproteínas en diferentes estadios del ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*.

2.2 Objetivos específicos

1. Mantener el ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*
2. Obtener los distintos estadios del ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*
3. Obtener extractos solubles de los distintos estadios del ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*
4. Identificar el patrón de glicoproteínas de los distintos estadios del ciclo de vida del parásito.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Material biológico

En este trabajo se utilizó el parásito *Schistosoma mansoni* de la cepa Puerto Rico (PR), la cual fue mantenida rutinariamente en el laboratorio de Inmunología y Quimioterapia del Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, U.C.V.

Para el mantenimiento del ciclo biológico del parásito se utilizaron caracoles albinos de la cepa Puerto Rico (*Biomphalaria glabrata*), Hámsters (*Mesocricetus auratus*) y ratones (*Mus musculus*), los cuales fueron gentilmente suministrados por el Dr. Gilberto Payares, jefe del Bioterio del Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, U.C.V.

3.2 Mantenimiento del ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*

3.2.1 Infección de caracoles (*hospedador invertebrado*)

Caracoles sanos con un tamaño aproximado de 0.5-1 cm de diámetro, fueron infectados individualmente con aproximadamente 5 miracidios c/u. Caracoles y miracidios fueron dejados en contacto durante al menos seis horas, luego de lo cual los caracoles se traspasaron a un recipiente con agua declorada y se mantuvieron en la oscuridad a 28° C por 30 días. (Cesari y Alarcón de Noya, 1987)

3.2.2 Infección de hámsters y/o ratones (hospedador definitivo) por Método del anillo

Hámsters jóvenes previamente anestesiados por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (inyección 1mL/ 100 gr del peso del animal) se infectaron con aproximadamente 800-1000 cercarias, mediante la técnica del anillo descrita por Smithers y Terry (1965).

3.3 Obtención de los diferentes estadios del parásito

3.3.1 Huevos

Hámsters infectados con aproximadamente 800-1000 cercarias, fueron sacrificados 45-60 días post-infección. El hígado fue extraído, cortado y licuado por 30 segundos en solución salina hipertónica (NaCl al 1,7%). El homogeneizado fue pasado por varios tamices de porosidad decreciente (420, 177, 144 y 44 µm de diámetro) y fue lavado exhaustivamente con la misma solución. Seguidamente la suspensión de huevos se recogió del tamiz de menor poro y fueron utilizados para obtener miracidios o lavados y almacenados en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 a -20 °C hasta su posterior uso. (Cesari y Alarcón de Noya, 1987)

3.3.2 Miracidios

Los huevos obtenidos (sección 3.3.1) fueron lavados con agua declorada y colocados bajo una lámpara de 100 W por 30-45 minutos para inducir la eclosión de los huevos y la salida de los miracidios, los cuales fueron concentrados

empleando una membrana millipore de 8 μ m y almacenados en PBS a -20 °C hasta su posterior uso. (Cesari y Alarcón de Noya, 1987)

3.3.3 Obtención de cercarias

Caracoles con al menos 30 días de infección se colocaron en agua declorada y fueron estimulados con luz solar o luz artificial (100W), durante una hora para inducir la salida de las cercarias, estas fueron colectadas y utilizadas para infectar hámster o ratones ó empleadas para la obtención de esquistosómulos mecánicos ó concentradas por centrifugación a 2446 g en frío y luego almacenadas en PBS a -20°C para su posterior uso. (Cesari y Alarcón de Noya, 1987)

3.3.4 Gusanos adultos

Hámster y/o ratones con 45 días post-infección fueron sacrificados con una sobredosis de solución anestésica. Los gusanos fueron obtenidos mediante la técnica de perfusión descrita por Smithers y Terry (1965). Estos gusanos fueron lavados en PBS y almacenados a -20 °C para su posterior uso.

3.3.5 Esquistosómulos mecánicos

Para la obtención de los esquistosómulos mecánicos se utilizó la técnica descrita por Ramalho-Pinto y col. (1974) con ciertas modificaciones. Las cercarias (apartado 3.3.3) fueron lavadas por centrifugación en frío (869 g/10 min) con agua declorada estéril suplementada con penicilina y estreptomicina (100UI/ml y 100 μ g/ml respectivamente). El sedimento fue resuspendido en 1 ml de agua

decolorada estéril con antibióticos/antimicóticos y sometidas a 50 pases sucesivos a través de una aguja de 21x 1 ½ " en frío. La separación de los cuerpos de las colas fue verificada por observación en un microscopio estereoscópico. Una vez separados los cuerpos de las colas se le agregó 2 ml de medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y una mezcla de antibióticos/antimicóticos, dejados en reposo por 4 minutos en frío para la sedimentación de los cuerpos, posteriormente se eliminó parte del sobrenadante donde se ubicaban las colas. Una vez obtenido los cuerpos libres de colas, éstas fueron centrifugadas a 435 g/5 min., se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los cuerpos en 2 ml de DMEM suplementado y fueron incubados a 37 °C durante toda la noche. Una vez transformados los esquistosómulo fueron lavados y concentrados en PBS y almacenados a -20 °C para su posterior uso.

3.3.6 Esporocistos “*in vitro*”

Para la obtención de esporocistos, los huevos (ver apartado 3.3.1) fueron lavados con agua decolorada estéril suplementada con antibióticos/antimicóticos, y colocados bajo luz artificial en campana de flujo laminar para estimular la salida de miracidios. Estos fueron concentrados utilizando una membrana de filtro Millipore de 8 µm, lavados e incubados con medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 20% SFB y penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 25 µg/ml por 30 minutos. Se retiró el medio y los miracidios fueron mantenidos en medio de Chernin (Chernin, 1963) suplementado con SFB al 20% y una solución de antibiótico/antimicótico a 28 °C y 5% CO₂ durante tres días según la metodología descrita por Barrios y col. (2001).

Una vez obtenido los esporoquistes transformados fueron lavados y concentrados en PBS y almacenados a -20 °C para su posterior uso.

3.4 Obtención de los extractos solubles de los distintos estadios del parásito.

Los diferentes estadios del parásito que fueron previamente almacenados en PBS pH 7,4 a -20°C, fueron descongelados y homogenizados en PBS pH 7,4 más 5 mM EDTA y 2 mM PMSF. La homogeneización se llevo a cabo en frio y dependiendo del estadio del parásito se realizaron entre 100 y 400 pases con un homogeneizador de teflón. El homogenato fue centrifugado a 15000 g a 4°C por diez minutos. El sobrenadante considerado como extracto soluble, fue almacenado a -20°C para su posterior uso.

3.5 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas presentes en los extractos solubles de cada estadio, fue determinada mediante el método de Lowry y col, (1951) utilizando una curva de calibración realizada con seroalbumina de bovino (SBA).

Las proteínas muy diluidas fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA), para ello, se les agregó TCA al 20%, se incubaron en frio por 30 minutos, se centrifugó a 15000 g a 4 °C/15 minutos, el sobrenadante fue eliminado y se le añadió 300 µl de acetona fria, se centrifugó por 5 minutos a 15000 g, el sobrenadante fue descartado y el sedimento resuspendido en PBS más EDTA (5 mM) y PMSF (2 mM).

3.6 Análisis electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se resuspendieron entre 20-40 µg de muestra en tampón de la muestra, luego hervidas durante tres minutos y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% p/v según la técnica descrita por Laemmli, (1970). El tiempo de corrida fue de 1 hora y media a voltaje constante (160 V).

3.6.1 Identificación de proteínas

Una vez terminada la corrida electroforética, el gel fue coloreado con azul de Coomassie y luego decolorado con una solución de metanol 50% y ácido acético al 10% para observar el patrón de proteínas. El gel fue escaneado en un Scanner marca HP.

3.6.2 Identificación de glicoproteínas

3.6.2.1 Coloración con Ácido periódico de Schiff (PAS)

Finalizada la corrida electroforética los geles fueron teñidos con ácido periódico de Schiff, según la técnica descrita por Packer y col. (2002). Para esto los geles fueron fijados en etanol 50% por 30 minutos, luego lavados con agua destilada por 10 minutos e incubados en una solución ácido periódico al 1% en ácido acético al 3% durante 30 minutos, lavados con agua destilada 6 veces por 5 minutos cada lavado. Incubados en una solución Metabisulfito de sodio al 0,1% en 10 mM de HCl por 10 minutos dos veces, se incubó en el Reactivo de Schiff durante una hora en oscuridad, posteriormente en solución de Metabisulfito de

sodio al 0,1% en 10 mM de HCl por una hora en oscuridad, luego lavados con una solución metanol al 0,5% en 10 mM de HCl hasta el día siguiente y finalmente fue decolorado con ácido acético al 7,5% y fotografiado.

3.6.2.2 Coloración con Azul Alcian

Los geles fueron fijados en TCA al 12,5% durante treinta minutos, lavados con agua destilada e incubados en solución de ácido periódico al 1 % en ácido acético al 3% por 1 hora, lavados con agua destilada (cuatro veces) e incubados durante treinta minutos en solución de Metabisulfito de sodio al 1%, lavados con agua destilada toda la noche y posteriormente incubados durante cuatro horas en una solución de Azul Alcian al 0,5% preparado en ácido acético al 3%. Finalmente se decoloraron con ácido acético al 7,5% y se tomaron los registros correspondientes. (Agraves, 2009)

3.6.3 Identificación de glicoproteínas en los extractos solubles mediante el uso de lectinas.

Las lectinas que se emplearon para la localización de carbohidratos en los extractos solubles de *Schistosoma mansoni* fueron: **Con A** (*Canavalia ensiformes*) específico para α -metilmanopiranosido y α -D-Manosa; **PHA-E** (*Phaseolus vulgaris*) específica para Galactosa β (1,4)Glucosamina α (1,2)Manosa; **DBA** (*Dolichos biflorus*) específico para N-acetilgalactosamina y **UEA-I** (*Ulex europaeus*) específica para fucosa, todas conjugadas a peroxidasa.

3.6.3.1 Transferencia electroforética

Para identificar las glicoproteínas presentes en los extractos solubles de los distintos estadios del parásito. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida (sección 3.6.1) y luego las proteínas transferidas a papel de nitrocelulosa siguiendo la técnica descrita por Towbin y col. (1979). El tiempo de transferencia fue de 1 hora y a voltaje constante (100V).

3.6.3.2 Reconocimiento de glicoproteínas por lectinas

Para el reconocimiento de glicoproteínas por lectinas se siguió el procedimiento descrito por Márquez, (2004) con ciertas modificaciones. El papel de nitrocelulosa con las proteínas ya transferidas fue incubado durante una hora en una solución de bloqueo (TBS pH 7,6 – cationes - Tween 20 al 0,1% en leche descremada 5%) para bloquear los sitios reactivos libres. Lavados con (TBS + cationes) tres veces e incubadas con cada una de las lectinas. Se empleo una concentración de 5 µg/ml para todas las lectinas excepto UEA-I que fue diluida (1/100). Éstas fueron diluidas en TBS+ cationes. Posteriormente fueron lavados con solución de lavado y finalmente revelados con diaminobencidina (0,5 mg/ml) lavados con PBS y fotografiados.

4. RESULTADOS

En la realización de este trabajo de investigación se emplearon los extractos solubles de distintos estadios del ciclo de vida de *S. mansoni* (ver tabla 4) de los cuales dos estadios fueron obtenidos *in vitro*, estos son los esquistosómulos y los esporoquistes.

Tabla 4. Concentración de proteínas en los extractos solubles de los distintos estadios de *S. mansoni*.

ESTADIO DEL PARÁSITO	N° DE PARÁSITOS OBTENIDOS	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS EXTRACTOS SOLUBLES
HUEVO	≈60.000	1179,9 µg/ml.
MIRACIDIO	≈15.000	228,6 µg/ml.
ESPOROQUISTE	---	486,7 µg/ml.
CERCARIA	≈200.000	523,6 µg/ml.
ESQUISTOSÓMULO	≈ 63.000	464,6 µg/ml.
ADULTOS (MACHO Y HEMBRA)	≈640	3008,9 µg/ml.

4.1 Obtención de esquistosómulos *in vitro*

Para la obtención de esquistosómulos mecánicos se procedió a separar los cuerpos de las colas de las cercarias, lo cual se observa en la figura 3 A. Una vez

separados los cuerpos, fueron cultivados durante toda la noche observándose cambios morfológicos en el proceso de transformación (Figura 3.B), como organismos vermiformes con un tegumento grueso similares a los obtenidos por Ramalho-Pinto y col, (1974) y Milligan y Jolly (2011). Se determinó la viabilidad por el método de exclusión de azul tripano, lo cual nos indicó que el medio DMEM suplementado con SFB al 10% fue apropiado para el cultivo.

4.2 Obtención de esporocistos in vitro

Para la obtención de los esporocistos se emplearon miracidios recién obtenidos, los cuales fueron cultivados por un período de dos días. Observamos en la figura 4.A, un miracidio recién obtenido en el cual se observan las características de este estadio (presencia de cilios y movimientos rápidos), durante la transformación se observó que los miracidios al ser incubados en medio RPMI 1640 disminuyen su movilidad y luego al ser incubados en el medio Chernin se observó la pérdida de los cilios los cuales quedan resuspendidos en el medio formando las placas ciliares (Figura 4.B flechas), en el esporocisto de dos días de cultivo (Figura 4. B) se pueden además ver las células embrionarias y una membrana gruesa (m).

Es importante mencionar que estos cultivos se mantuvieron viables por 20 días, no obstante para este trabajo se emplearon esporocistos primarios, con dos días de cultivo según lo reportado por Barrios y col. (2001). La viabilidad se detectó mediante la continua observación, en estos se observó movimiento de las células flamíferas así como movimientos vermiformes de los esporocistos.

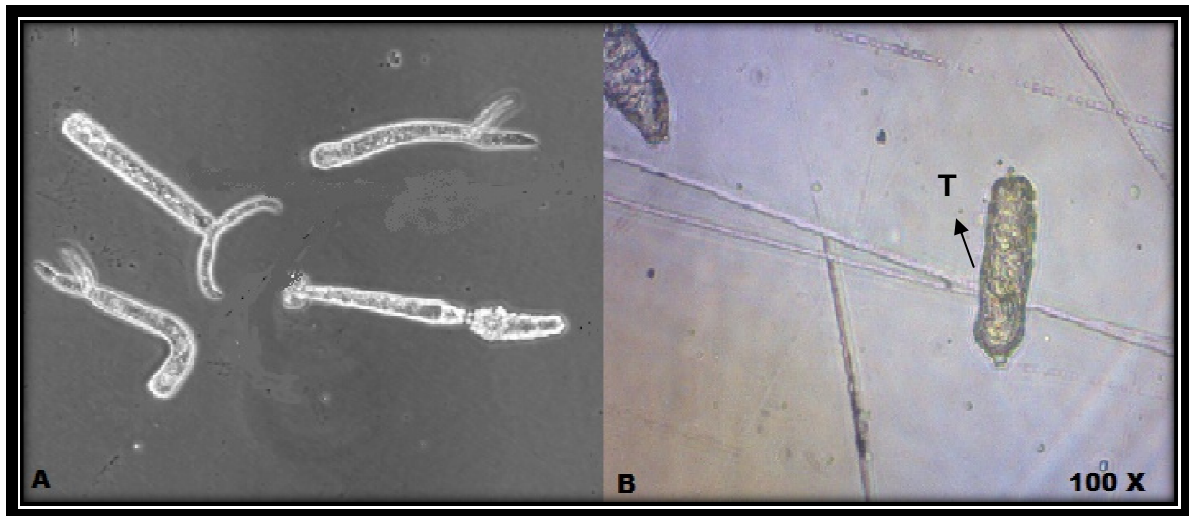


Figura 3. Se muestran microfotografías donde se pueden observar del proceso de separación de colas y cuerpos de las cercarias y de la transformación de un esquistosómulo. A: colas separadas y una cercaria completa. B: Esquistosómulo mecánico de 20 h de cultivo con morfología similar a un verme y un tegumento grueso (T). Aumento 100X.

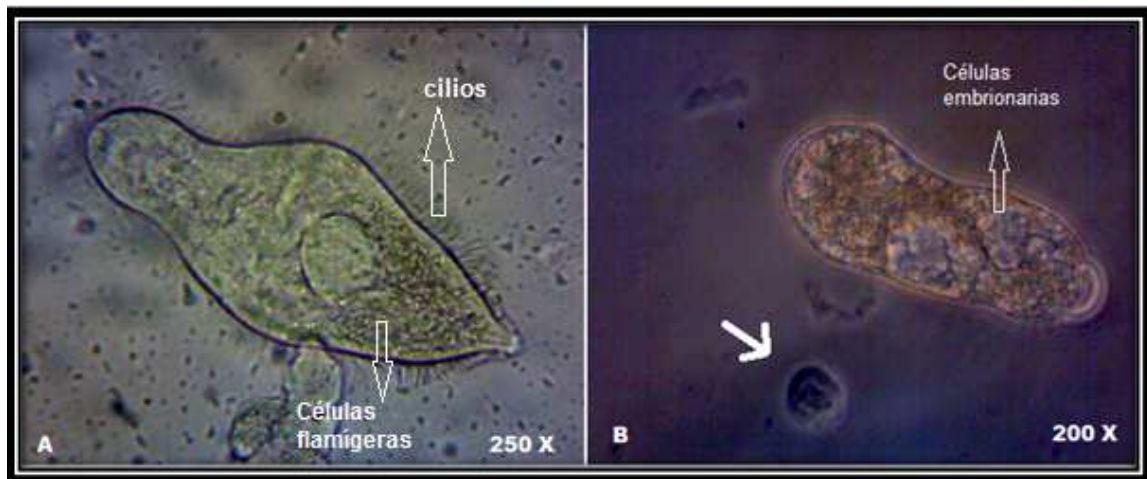


Figura 4. Transformación *in vitro* del miracidio a esporocisto. A. Miracidio recién obtenido y B. esporocisto con 2 días de cultivo en medio Chernin donde se observa las células embrionaria y placas epidérmicas (flecha).

El uso de esporocistos *in vitro* en esta investigación nos permitirá revelar los cambios morfológicos y bioquímicos del parásito, y así estudiar todas las fases de su ciclo de vida. La participación de una gran comunidad de investigadores se han visto interesados en el mantenimiento de esta fase *in vitro* debido a la ausencia del hospedador invertebrado, sin embargo el ciclo de vida de los esquistosomas es muy complejo y no se pueden mantener del todo en cultivos *in vitro*. (Mann y col, 2010; Ivanchenko y col, 1999). Según Peterson y col, (2009) después de 24 horas de cultivo, la mayoría de los miracidios se transformaron a esporocistos primarios liberando sus placas epidérmicas (Fig. 4. B Flecha blanca) y formando un tegumento sincitial.

4.3 Identificación de proteínas de los extractos solubles de los diferentes estadios de *Schistosoma mansoni*.

En la figura 5, se muestra el patrón polipeptídico de cada uno de los extractos solubles coloreados con azul de Coomassie, se puede ver que en huevo (H) se evidencian nueve bandas polipeptídicas con pesos moleculares entre 19 y 140 kDa. Mientras que en miracidios sólo se evidenció una banda de aproximadamente 34 kDa, en esporocistos se observaron cuatro bandas con pesos moleculares entre 15 y 45 kDa, mientras que en cercarias solo se evidenciaron dos bandas de bajo peso molecular (17 y 15 kDa), en esquistosómulos se observaron cuatro bandas de pesos moleculares entre 15 y 65 kDa, finalmente en adultos se observó once bandas polipeptídicas de pesos moleculares entre 15 y 65 kDa. Nótese que la banda polipeptídica con peso

molecular 34 kDa está presente en todos los estadios del ciclo de vida excepto en cercarias, en esporocistes este polipéptido es más intensa.

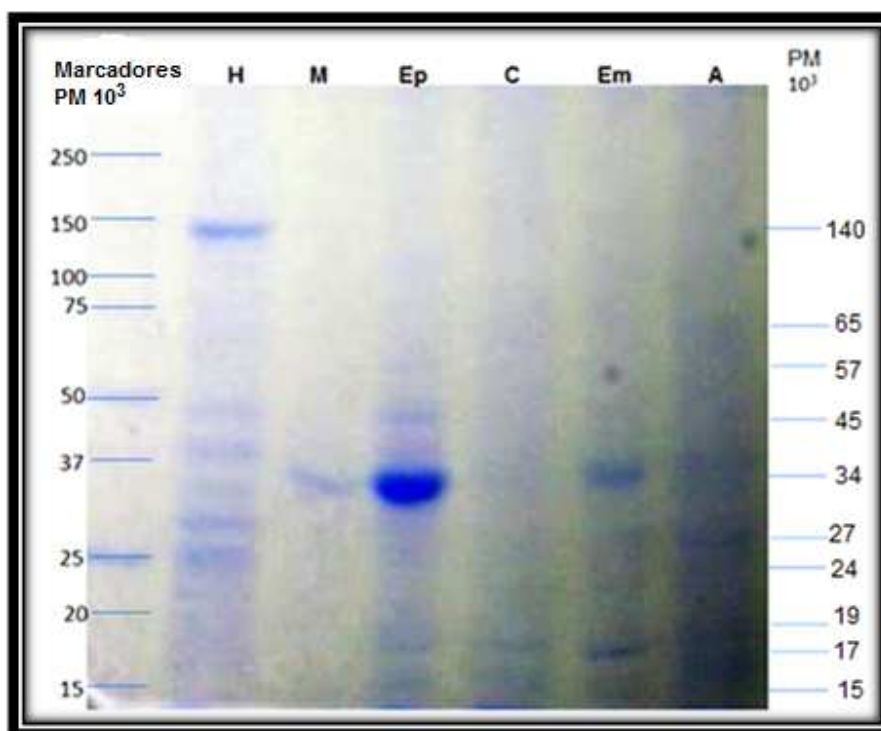


Figura 5. Electroforesis con 20 µg de proteínas/pozo de los extractos solubles de *S. mansoni* en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. Huevos (H), Miracidios (M), Esporocistos (Ep), Cercarias (c), esquistosómulos (Em) y adultos (A). Se utilizó un marcador de peso molecular no teñido de BIO-RAD.

4.4 Identificación de glicoproteínas

Para la identificación de glicoproteínas se utilizaron tres metodologías, la coloración con PAS que evidencian carbohidratos en general, la coloración azul

Alcian pH 2,5 que muestran los glicosaminoglicanos carboxilados y las lectinas que evidencian residuos de carbohidratos particulares.

En la figura 6, se muestra el patrón de glicoproteínas evidenciado con la coloración PAS de los diferentes estadios del parásito. No obstante solo se demostraron cuatro glicoproteínas en el extracto soluble de huevo (H), estas presentaron un peso molecular de 80, 70, 61, 56 kDa, siendo las dos últimas las más evidentes.

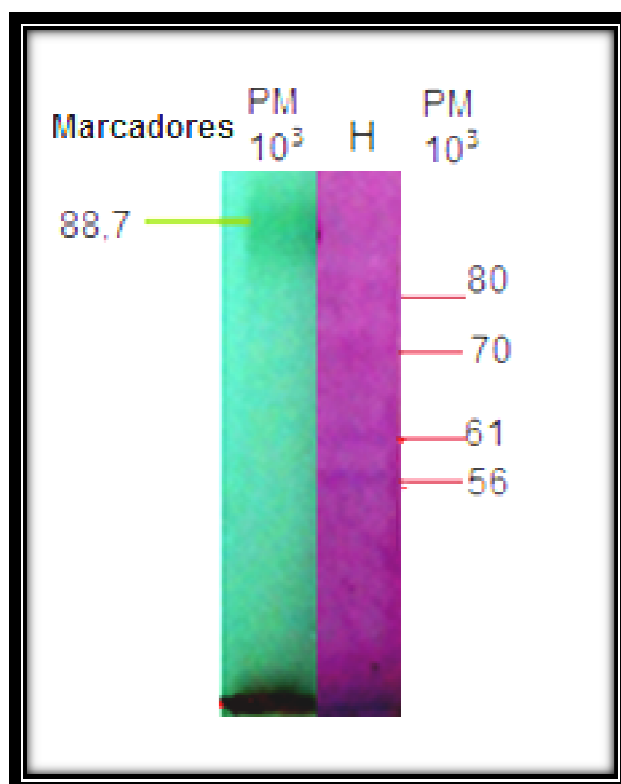


Figura 6. Electroforesis con 40 µg de proteína del extracto solubles de huevo *S. mansoni*. Gel de acrilamida al 10% teñido con Reactivo de Schiff (PAS). Huevos (H). Se utilizaron marcadores de peso molecular estándar pre-teñidos de BIO-RAD que incluyeron miosina (198,3 kDa), β-galactosidasa (125,2 kDa), albúmina sérica bovina (88,7 kDa), anhidrasa carbónica (37,4 kDa), inhibidor de tripsina (31,7 kDa), lisozima (17,2 kDa) y aprotinina (7,0 kDa).

Al evaluar las glicoproteínas con el azul Alcian solamente se observaron dos glicoproteínas de alto peso molecular (>200 kDa) en huevos y adultos respectivamente, estas se ubicaron en el inicio del gel de resolución (resultados no mostrados).

4.3.1 Identificación de glicoproteínas mediante el uso de lectinas

Como se mencionó anteriormente en este trabajo se emplearon cuatro lectinas (Con-A, DBA, UEA-I y PHAE) para la identificación de residuos de carbohidratos presentes en las glicoproteínas de los extractos solubles.

Cuando enfrentamos las glicoproteínas a Con-A (Figura 7) se pudo demostrar la presencia de ocho polipéptidos en huevos siendo los más evidentes de 140 y 94 kDa. En el extracto soluble de adultos se evidenciaron aproximadamente 16 bandas entre 15 y 150 kDa, siendo los polipéptidos de 84, 94, 120, 130 y 140 más prominentes además se puede decir que los polipéptidos presentes en huevos también son comunes con los de adultos. Estos polipéptidos expresan residuos de α -manosa y/o α -metilmanopiranosido.

Al evaluar la presencia de residuos de N-acetilgalactosamina mediante el uso de la lectina DBA (Figura 8) que es específica para este tipo de carbohidratos, sólo observamos reacción con el extracto soluble de adultos y huevos evidenciando una glicoproteína en común de 140 kDa.

Además se emplearon las lectinas UEA-I y PHAE las cuales son específicas para L-fucosa y galactosa $\beta(1,4)$ glucosamina $\alpha(1,2)$ manosa respectivamente, no

obstante al emplear dichas lectinas no se observó reacción en los extractos solubles evaluados.

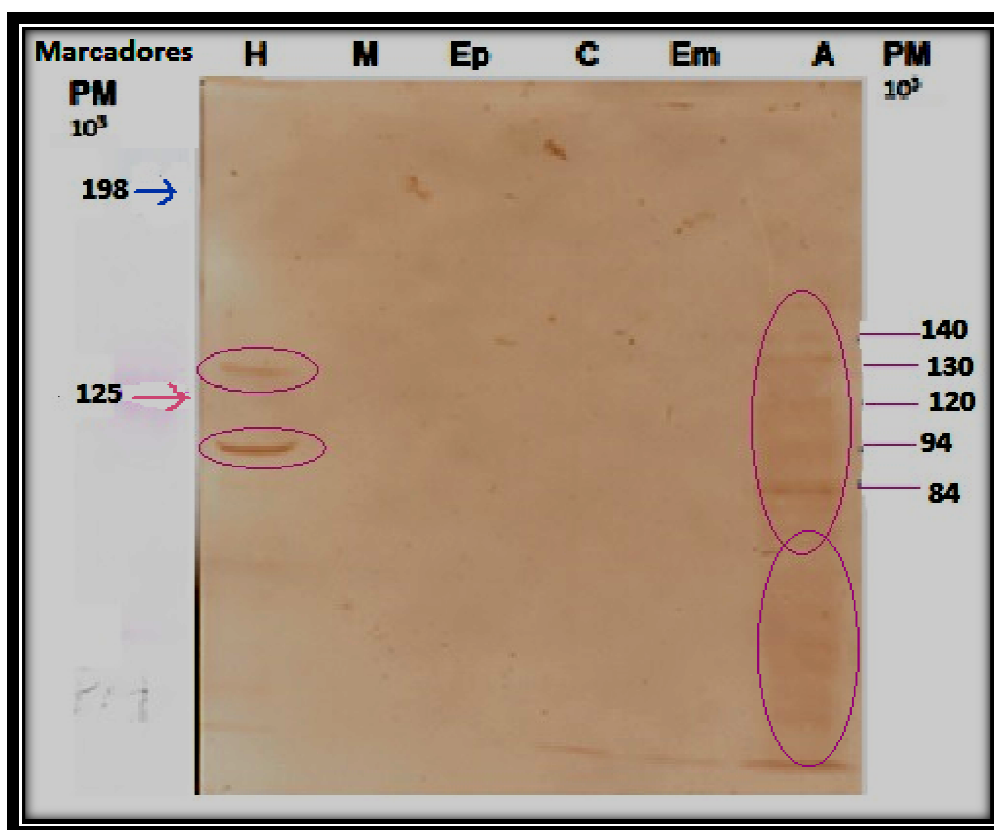


Figura 7. Blot con Con-A de los polipéptidos separados en SDS-PAGE con 20 μ g de los extractos solubles de H: huevo; M: miracidios; Ep: esporocisto *in vitro*; C: cercaria; Em: esquistosómulo mecánico y A: adultos de *S. mansoni*.

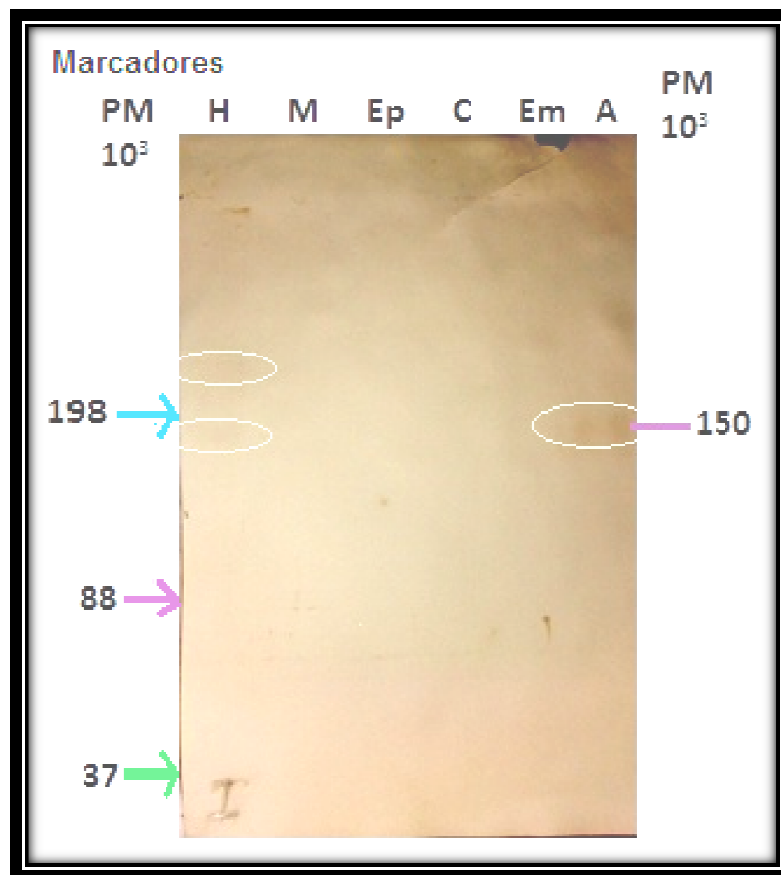


Figura 8. Blot con DBA de los polipéptidos separados en SDS-PAGE con 20 µg de los extractos solubles de H: huevo; M: miracidios; Ep: esporocisto *in vitro*; C: cercaria; Em: esquistosómulo mecánico y A: adultos de *S. mansoni*.

5. DISCUSIÓN

Como ya hemos mencionado el ciclo de vida de *Schistosoma mansoni* es complejo, no solamente requiere de dos hospedadores para su desarrollo sino que también el parásito sufre cambios morfológicos y bioquímicos durante su ciclo de vida para adaptarse a diferentes ambientes y poder sobrevivir. Hay que resaltar que el mantenimiento del ciclo en el laboratorio de un parásito multicelular como *Schistosoma mansoni* es un poco complicado debido a que se requieren tanto colonias de caracoles (hospedador intermediario) como de un bioterio en donde emplear las infecciones de ratones/hámster (hospedador vertebrado), por ello no se puede mantener el ciclo de vida en cultivo como por ejemplo se ha realizado con parásitos unicelulares como *Leishmania sp.* o *Trypanosoma sp.*, Esto ha sido una dificultad para los investigadores y por esta razón en nuestro país son pocos los que se enfocan en el estudio de este parásito o de otros trematodos. Aun cuando no se ha podido mantener en cultivo todo el ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*, se han logrado obtener dos de los estadios, estos son el esquistosómulo (Ramalho-Pinto y col., 1974) y el esporoquiste (Barrios y col., 2001).

Los esporoquistes obtenidos *in vitro* fueron muy similares a los observados en otros trabajos, estos muestran que la mayoría de ellos pierden sus cilios, tornándose globosos e inmóviles, los cilios aparecen como agregados redondos suspendidos en el medio, los esporoquistes tenían morfologías y movimientos vermiformes con vesículas bien definidas y células en flama activas. (Barrios y col. 2001; Ivanchenko y col., 1999).

En la obtención de esquistosómulos mecánicos se observaron características típicas en el proceso de transformación, presentando morfología y movimiento vermiforme y un tegumento grueso como los observados por Ramalho-Pinto y col., (1974) y Milligan y Jolly (2011), aunque no son esquistosómulos por definición presentan características similares a los esquistosómulos *in vivo*, se han demostrado las propiedades que presenta los esquistosómulos *in vitro* luego de su transformación, éstas incluyen ausencia del glicocáliz, intolerancia al agua, presencia de una doble superficie de membrana, migración de los gránulos y cercario-reacción negativa y pueden ser utilizadas para corroborar si los esquistosómulos en realidad se transformaron (Stirewalt y col., 1983).

La mayoría de los estudios con *S. mansoni* están relacionados con la identificación de proteínas de membranas o moléculas de superficie ya que estos representan la interface parásito-hospedador y pueden ser empleados para producción de vacunas (Wright y col., 1991; Simpson y Smither, 1985). Así mismo se han realizado diversos estudios en los cuales la identificación de proteínas está enfocada en la búsqueda de antígenos importantes en el diagnóstico siendo los antígenos provenientes de huevos y de gusanos los antígenos de elección. (Mott y Dixon, 1982; Abath y col., 1999; Vendrame y col., 2001; Márquez, 1994). No obstante en el diagnóstico se han empleado antígenos provenientes de otros estadios del parásito como el esquistosómulo (Grenfell y col. 2013) y la cercaria (Smith y col., 2012). Se ha propuesto que los métodos para detectar antígenos de esquistosomas deben emplear antígenos circulantes o excretados debido a que estos reflejan probablemente una infección activa de manera más segura (Smith y

col., 2012). Es por ello y lo poco que se conoce de los extractos solubles de algunos estadios del ciclo de vida de *S. mansoni* que en este trabajo nos propusimos evaluar los mismos y nos enfocamos en las glicoproteínas ya que se ha propuesto que estas son las principales moléculas que inducen una respuesta inmunológica. Desde hace tiempo se ha focalizado el estudio de los glicoconjugados del parásito ya que en el caso de huevos éstos son el foco principal de la respuesta inmunológica (Cumming y Nyame, 1996).

En esta investigación una vez obtenidos los distintos extractos solubles los evaluamos electroforéticamente y evidenciamos las proteínas mediante la coloración azul de Coomassie observando que los patrones proteícos son muy diferentes (Fig. 5) ya que aunque se corrió a misma cantidad de proteínas (20 µg/pozo), en algunos estadios solo se observaron dos polipéptidos. Así, vimos que los estadios de huevos y gusanos son los que presentan mayor cantidad de proteínas.

En huevos se identificaron nueve bandas polipeptídicas de pesos moleculares entre 19 y 140 kDa, lo cual difiere de los resultados por Márquez (1994) quien identificó 17 polipéptidos con pesos moleculares entre 92 y 12,5 kDa. Resultados similares por Carter y Colley (1978), sin embargo y aún cuando el mínimo de polipéptidos no es semejante al de estos reportes observamos de manera similar a estos autores la presencia de dos polipéptidos de peso molecular 24 y 34 kDa en huevo, se observó también un polipéptido de 37 kDa que podría ser equivalente al denominado omega-1 reportado por Everts y col., (2012).

En el extracto de adultos se identificaron aproximadamente once polipéptidos con pesos moleculares entre 15 y 65 kDa. En estudios previos se han reportado antígenos reconocidos en el extracto soluble de adultos con pesos moleculares entre 40 y 75 kDa (Gaber y col., 2010). En los estadios de miracidio, esporoquiste, cercaria, y esquistosómulo observamos muy pocas proteínas. En el extracto soluble de esporoquiste se evidenció aproximadamente cuatro proteínas de las cuales la más prominente fue la banda de 34 kDa, la misma o una banda de PM 34 kDa se observó en todos los extractos excepto en cercaria sugiriéndonos que es una proteína que se mantiene durante el proceso de maduración del parásito. Por otro lado se ha demostrado que el perfil proteico entre la cercaria y el esquistosómulo *in vitro* deberían ser similares porque la transformación de cercaria a esquistosómulo es un fenómeno en el que ocurren muchos cambios que son más lentos que cuando se da *in vivo*, debido a esto se esperaría que lo observado entre cercaria y esquistosómulo fuera un patrón proteico similar. (Stirewalt y col., 1983).

No esperábamos evidenciar pocas proteínas en los extractos solubles ya que el parásito al ser un organismo multicelular que presenta sistema digestivo, nervioso, reproductor y excretor, posee más proteínas que por ejemplo un parásito unicelular, aunque en los extractos donde se observaron pocas proteínas pueden estar relacionadas con el tamaño del parásito en esos estadios comparado con el estadio de adulto. Sin embargo Curwen y col. (2004) determinaron al menos 40 proteínas en extractos de cercaria, esquistosómulo de pulmón, adultos y huevos, no obstante la diferencia observada puede ser debido a la metodología empleada

pues estos autores realizaron una electroforesis bidimensional la cual, es más sensible que la empleada por nosotros pues la electroforesis monodimensional no discrimina por punto isoeléctrico y además la coloración empleada por nosotros es la menos sensible por lo cual podemos sugerir que empleando una coloración con nitrato de plata podríamos evidenciar mayor cantidad de proteínas. Entre las 40 proteínas evidenciadas por Curwen y col., (2004) algunas podrían representar enzimas citosólicas (Ver tabla 5) entre ellas está, la Ciclofilina con PM 17, 9 kDa que puede estar relacionada con la de 17 kDa observada en esquistosómulo mecánico y en adultos en nuestro trabajo; la GST26 de 25,5 kDa que podría estar relacionada a la de 24 kDa de huevos y adultos; la TPI de 28, 4 kDa, la 14-3-3 α de 28,9 que podrían relacionadas a la de 27 kDa observada en huevos y adultos y la calreticulina cuyo peso molecular de 45,5 y la SME16 de 45 kDa podrían ser las mismas evidenciadas en nuestro trabajo en los extractos de huevos, esporoquistes, esquistosómulos y adultos.

Otras proteínas que se podrían encontrar en los extractos solubles son las que están relacionadas a enzimas, moléculas reguladoras de actividades celulares, moléculas con funciones de transporte, proteínas presentes en el citoesqueleto de las células, componente del citoplasma o matriz extracelular o proteínas de excreción-secreción así como también a algunas proteínas que son solubles una vez que el parásito recambia su tegumento (Irie y Yasuoraoka, 1984). Por otro lado es interesante destacar que los dos estadios en la cual se observaron más polipéptidos (adultos y huevos) pudieran estar relacionados a proteínas solubles que han sido estudiadas e implicadas en el uso diagnóstico e inmunológico.

(Nash, 1978; Boctor y col., 1982; Lustigman y col., 1985; Dunne y col., 1986; Halkes y col., 1998; Planchart e Incani, 2007).

Después de determinado el patrón proteico de los diferentes extractos solubles nos propusimos estudiar las glicoproteínas presentes en los mismos, puesto que como ya se mencionó éstas son importantes desde el punto de vista inmunológico así como en la relación parásito-hospedador. Estas fueron evaluadas empleando tres técnicas diferentes, mediante una coloración PAS la cual es generalmente una técnica útil para identificar glicoproteínas sobre geles de poliacrilamida, no obstante su sensibilidad puede no ser suficiente (Packer y col., 2002), esto fue evidenciado en este trabajo ya que mediante esta técnica solo pudimos evidenciar cuatro glicoproteínas de pesos moleculares 80, 70, 61 y 56 kDa en el extracto de huevo siendo las dos últimas las más evidentes. La glicoproteína de 70 kDa podría estar relacionado con la reportada por Hamburger y col. (1982) quienes proponen que la denominada MEG presenta un PM de 70 kDa y no es ni especie, ni estadio específico sin embargo no observamos en los otros estadios ninguna glicoproteína, esto podríamos decir que es debido a la cantidad de glicoproteínas presentes en los extractos ya que para ser detectados por esta técnica debe estar presente al menos 10 µg de glicoproteínas altamente glicosilada para ser revelada por esta técnica (Packer y col., 2002).

La glicoproteína de 80 kDa encontrada en nuestro estudio podría estar relacionada con la de 84 kDa encontrada por Dunne y col., (1986) mientras que la de 61 kDa

podría estar relacionada con una glicoproteína característica del huevo de 69 kDa (Nyame y col., 1988). Meevissen y col., (2011) encontraron una molécula de 50 kDa llamada Kappa-5 en el antígeno soluble de huevo y demostraron que era una glicoproteína ésta puede estar relacionada con la de 56 kDa encontrada en este trabajo. (ver tabla 6).

Finalmente empleamos una técnica más sensible y más específica para identificar los carbohidratos presentes en las glicoproteínas de los extractos, esto es el uso de lectinas después de la transferencia a papel de nitrocelulosa de las proteínas de los extractos. Como se menciona previamente, las lectinas son proteínas que tienen la capacidad de unirse a carbohidratos de manera específica y reversible.

Diversos trabajos se han realizado para identificar glicoproteínas mediante el uso de lectinas, estas son principalmente glicoproteínas de membrana a diferencia de lo evaluado en este trabajo. En este sentido Simpson y col., (1983) demostraron en la superficie del esquistosómulo glicoproteínas las cuales fueron reconocidas por Con-A, una glicoproteína de 60 kDa reconocida por RCA, una de 120 kDa reconocida por FBP, una de 23 kDa reconocida por WGA y una de 120 y otra 110 kDa reconocida por SBA y PNA respectivamente. En adultos Linder y Hultdt (1982) demostraron la presencia de glicoproteínas reconocidas por WGA; PNA, RCA y Con-A lo cual indica que están presentes residuos de carbohidratos del tipo α -manosa; D-galactosa; N-acetilglucosamina; fucosa y N-acetilgalactosamina, esto en diferentes sitios de los adultos fijados, resultados similares fueron reportados por Márquez (2004). McGregor y col. (1985) demostraron en la superficie de

membrana del adulto glicoproteínas de 68, 52, 44 y 28 kDa con residuos tipo α -manosa (Con-A); de 68, 63,44 y 28 kDa con residuos tipo N-acetilglucosamina; de 100, 44, 33 y 28 kDa con residuos N-acetilgalactosamina (SBA); de 170, 44, 36 y 28 kDa con residuos de D-galactosa y una glicoproteína de PM mayor a 100 kDa con residuos N-acetilgalactosamina (DBA). No se observó glicoproteínas en la superficie del verme con residuos tipo L-fucosa (UEA). Estos trabajos evidencian la presencia de glicoproteínas en la superficie de distintos estadios del parásito, en este estudio se quiso evaluar la presencia de residuos de carbohidratos presentes en las glicoproteínas de los extracto soluble del parásito mediante el uso de lectinas como Con-A; DBA; UEA-I y PHAE, sin embargo solo pudimos detectar glicoproteínas al emplear la Con-A y DBA y solo en los extractos solubles de huevo y adultos. Observando en el primero aproximadamente ocho polipéptidos con residuos de tipo α -manosa las cuales presentan pesos moleculares entre 15 y 150 kDa mientras que en el extracto soluble de adultos hay una mayor cantidad de glicoproteínas con este tipo de residuos carbohidratos siendo los de 84, 94, 120 y 140 kDa los más evidentes, estos resultados difieren con los de Linder y Hultdt (1982) por lo cual no podríamos decir que estas son glicoproteínas de membrana eliminadas en el recambio del tegumento. Además en estos extractos pudimos identificar una glicoproteína de 140 kDa la cual expresa residuos tipo N-acetilgalactosamina.

Se han determinado las estructuras de los glicanos presentes en huevos de *S. mansoni* y de *S. japonicum* la cual contienen residuos de manosa, GlcNac β 1-2Man α 1-3 y principalmente fucosa. (Cumming y Nyame, 1999; Hokke y col.,

2007b), además se han aislado antígenos de huevos por cromatografía de afinidad a Con-A sepharosa (Boctor y col., 1982; Harrison y col., 1979) por otro lado se han evidenciado con SBA y Con-A glicoproteínas de extractos huevos que contienen residuos de manosa y GalNac (Linder y Huldt, 1982; Márquez, 2004). Estos estudios nos corroboran la presencia de residuos α -manosa en las glicoproteínas que reaccionaron en nuestro estudio con Con-A y DBA.

Estudios han demostrado estas glicoproteínas solubles presentes en adultos en la cual se han utilizado los componentes relacionados al intestino como el “vomito”, un material particulado oscuro con restos no digeridos, hematina, enzimas y otros componentes intestinales del parásito (Bogitsh 1989; Van Dam et al. 1996; Halton 1997, citados por Planchart e Incani, 2007) y los que se denominan antígeno circulante catódico (CCA) o antígeno circulante anódico (CAA) que son secretados por el intestino y son potencialmente importantes en el diagnóstico de la esquistosomosis. (Dunne, 1990; Cummings y Nyame, 1999; Planchart e Incani, 2007). En este sentido se han identificado glicoproteínas que contienen residuos de α -manosa y Nacetilgalactosamina, estos residuos concuerdan con los N-glicanos expresados en adultos (Hokke y col., 2007a) aunque también pueden estar relacionada a un proteoglicano con residuos GalNac y ácido glucurónico que son secretados por las células epiteliales del intestino del esquistosoma (Nash, 1978) por lo que podrían estar relacionados también a fragmentos de los antígenos circulantes del CAA ya que este contiene 30% de carbohidratos con residuos GalNac y Glc (Cumming y Nyame, 1999).

En base a los otros estadios se ha demostrado una serie de carbohidratos mediante el uso de lectinas (Murrel y col. 1978; Samuelson y Caulfield, 1982; Grzych y col. 1987; Coles y col., 1988; Zelck y Becker, 1990; Uchikawa y Loker, 1991 y Márquez, 2004; Hokke y col., 2007b; Georgieva y col., 2012) por lo que esperábamos evidenciar la presencia de estos en los extractos solubles de cercaria, miracidios, esporoquistes y esquistosómulos, sin embargo no se evidenció la presencia de este tipo de proteínas en los mismos. Es posible que estas no se evidenciaran debido a que en estos estadios la cantidad de glicoproteínas no fue suficiente. Además se podrían utilizar otras lectinas para evidenciar más glicoproteínas, pues existe una gran variedad de estas y en este trabajo solo empleamos cuatro aún cuando tres de estas son las que más se han utilizados en el estudio de los esquistosomas como lo son Con-A, UEA-I y DBA. En este sentido tendríamos que evidenciar residuos de fucosa en todos los estadios en la reacción con UEA-I ya que se ha demostrado la presencia de importantes antígenos glicoproteicos que presentan residuos tipo fucosa como lo es el antígeno de Lewis, entre otros (Schmidt, 1995; Srivatsan y col., 1992; Wuhler y col., 2000; Robjin y col., 2005; Hokke y Deelder, 2007; Peterson y col., 2009)

Finalmente para conocer más sobre la biología del parásito y encontrar posibles glicoproteínas para uso diagnóstico y/o blancos para fármacos, en este trabajo tratamos de identificar por diferentes técnicas las glicoproteínas presentes en los extractos solubles de los distintos estadios de *S. mansoni*, sin embargo solo pudimos demostrar la presencia de estos en los estadios de huevos y adultos,

probablemente debido a la cantidad de glicoproteínas presentes en estos extractos por lo cual sería recomendable en futuras investigaciones emplear una mayor cantidad de proteínas en los otros extractos infectando un gran número de hámster/ratones (entre 10 y 15) para obtener grandes cantidades de parásitos y por ende aumentar la concentración de proteína empleada, aún cuando es muy difícil obtenerlos debido a la complejidad del mantenimiento del ciclo de vida y cultivos *in vitro*, así mismo se propone la utilización de otros tipos de lectinas que sean específicos para un mismo residuo de carbohidrato.

Tabla 5. Posibles proteínas observadas en el gel de azul de Coomassie.

Técnica	Azul de Coomassie		
	PM Observados	Posibles proteínas observadas según lo reportado.	
Huevos	24 kDa	24 kDa	Proteína antigénica (Márquez, 2004)
	34 kDa	34 kDa	Proteína antigénica (Márquez, 2004)
		37 kDa	Omega-1 (Everts, y col., 2012)
	24 kDa	25,5 kDa	GST26 (Curwen y col., 2004)
	27 kDa	28,4 kDa	TPI (Curwen y col., 2004)
		28,9 kDa	14-3-3 α (Curwen y col., 2004)
	45 kDa	45 kDa	SME15 (Curwen y col., 2004)
		45,5 kDa	Calreticulina
Adultos	17 kDa	17,9 kDa	Ciclofilina (Curwen y col., 2004)
	24 kDa	25,5	GST26 (Curwen y col., 2004)
	27 kDa	28,4 kDa	TPI (Curwen y col., 2004)
		28,9 kDa	14-3-3 α (Curwen y col., 2004)
	45 kDa	45 kDa	SME15 (Curwen y col., 2004)
		45,5 kDa	Calreticulina (Curwen y col., 2004)

Tabla 6. Posibles glicoproteínas observadas mediante la técnica con PAS.

Técnica	Reactivo de Schiff (PAS)		
	PM Observados	Posibles glicoproteínas observadas según lo reportado.	
Huevos	56 kDa	50 kDa	Kappa-5 (Meevissen y col., 2011)
	61 kDa	69 kDa	Glicoproteína característica de huevo (Nyame y col., 1988)
	70 kDa	70 kDa	Principal glicoproteína de huevos (MEG) (Hamburger y col., 1982)
	80 kDa	84 kDa	Glicoproteína altamente antigénica (Dunne y col., 1986)

6. CONCLUSIONES

- El patrón de proteínas de los extractos solubles evaluados difiere tanto en el número de proteínas como en la cantidad de las mismas esto basándonos en la intensidad de coloración de los distintos polipéptidos.
- Mediante el uso de las técnicas empleadas solo se demostró la presencia de glicoproteínas en los extractos de adultos y de huevos tal vez debido a una mayor concentración de estas moléculas en estos estadios y al tamaño de los mismos.
- La metodología más sensible para evaluar la presencia de glicoproteínas fue la metodología que involucra el uso de lectinas ya que mediante esta se evidenció una gran cantidad de glicoproteínas que no fue observada ni con la coloración PAS ni con azul Alcian.
- Se sugiere que algunas de las glicoproteínas evidenciadas en estos estadios podrían estar relacionadas con glicoproteínas presentes en componentes de excreción-secreción y de los secretados por el intestino de los adultos.

7. RECOMENDACIONES

Para mejorar este estudio se indican las siguientes recomendaciones:

1. Por la poca cantidad observada en los extractos solubles se recomienda obtener más ejemplares de los estadios estudiados (huevos, miracidios, cercarias, adultos, esquistosómulos y esporoquistes) y así emplear más de 50 µg de proteínas en la electroforesis.
2. Utilizar más de dos lectinas que sean específicas para un mismo residuo y realizar controles tanto positivos como negativos.
3. Teñir los geles y las proteínas transferidas al papel de nitrocelulosa con tinción de nitrato de plata para evidenciar mejor las bandas observadas.

8. BIBLIOGRAFIA

Agraves, S. 2009. *Agraves Laboratory*, <http://argraves-lab.musc.edu/downloads/ArgravesLabProtocols.pdf> [Consultado en Junio de 2013]

Abath, F., Hirst, E., Hagan, P. y Simpson, A. 1999. Ultrastructural localization of Sm15 y Sm25, two major tegumental adult worm antigens of *Schistosoma mansoni*. *Parasite*. **6**: 243-247

Aguilar, C.M., Dávila, I., Pacheco, M.Incani, R.N. 1999. *Guia de parasitología*. Valencia, Venezuela: Universidad de Carabobo.

Alarcón de Noya, B. 2007. *En Venezuela están los tres géneros de parásitos de mayor importancia mundial en salud pública.*, Http://boletin.uc.edu.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=7936%3Aen-venezuela-estlos-tres-gros-de-partos-de-mayor-importancia-mundial-en-saludpca&itemid=12 [Consultado en agosto de 2012]

Alarcón de Noya, B., Ruiz, R., Colmenares, C., Losada, S., Cesari, IM., Toro, J, y Noya, O. 2002. Schistosomiasis mansoni in Areas of Low Transmission. Epidemiological Characterization of Venezuelan Foci. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , **97**: 5-10.

Alarcón de Noya, B., Ruiz, R., Colmenares, C., Losada, s. y Noya, O. 2006. Low transmission areas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* , **101**: 29-35.

Alarcón de Noya, B., Balzan, C., Arteaga, C., Cesari, I. y Noya, O. 1999. The last fifteen years of Schistosomiasis in Venezuela: Features and evolution. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , **94 (2)**: 139-146.

Ali, P., Jeffs, S., Meadows, H., Hollyer, T., Owen, C., Abath, F., Allen R., Hackett, F., Smithers, R. y Simpson, A. 1991. Structure of Sm25, an antigenic integral membrane glycoprotein of adult *Schistosoma mansoni*. *Mol and Biochem Parasitol*, **45**: 215-222.

Atkinson, K. y Atkinson, B. 1981. Protein synthesis in vivo by *Schistosoma mansoni* cercariae. *Mol and Biochem Parasitol* , **4**: 205-216.

Attallah, A., Attia, H., Ismail, H., Yones, E., El-Nashar, E., El-Kader, K., Saad, A. y Sultan, A. 1999. Vaccination againsts *Schistosoma mansoni* infection using 74 kDa *Schistosoma* protein antigen. *Vaccine* , **17**: 2786-2791.

Barrios, E., Delgado, V., Wolfan, A., Márquez, M. 2001. *Schistosoma mansoni* : transformación de miracidio en su huésped natural y en cultivo. *Salus* , **5 (3)**: 10-16.

Bennett, J. y Seed, J. 1977. Characterization and isolation of concanavalin A binding sites from the epidemics of *S. mansoni* . *Jou Parasitol* , **63**: 250-258.

Boctor, F., Cheever, A. y Higashi, G. 1982. *Schistosoma mansoni* : fractionation of polysaccharide egg antigens by lectin affinity chromatography. *Immunol* , **45**: 237-245.

Brooks, S., Leathem, B. y Schumcher, U. 1997. Lectin Histochemistry a concise practical handbook. Bios Scientific publishers.

Carter, C. y Colley, D. 1978. An electrophoretic analysis of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen preparation. *J. Parasitol.* **64(3)**: 385-389.

Caulfield, J., Yuan, HC., Cianci, C. y Hein, A. 1988. *Schistosoma mansoni* : Development of the cercarial glycocalix. *Exp Parasitol* , **65**: 10-19.

Cesari, I. y Alarcón de Noya, B. 1987. *Diagnostico y control de la esquistosomiasis mansoní*. Centro de Estudios Avanzados - I.V.I.C., Caracas.

Chernin, E. 1963. Observations on hearts explanted in vitro from the snail *Australorbis glabratus*. *Jou Parasitol* , **49**: 353-364.

Coles, G., Jansson, H. y Zuckerman, B. 1988. Lectin studies of surface carbohydrates and induction of gland secretion in the free-living stages of *Schistosoma mansoni* -. *J Chem Ecol*, **14**: 691-700.

Cummings, R. y Nyame, K. 1996. Glicobiology of Shistosomiasis. *University of Oklahoma Health Sciences Center* , .

Cummings, R. y Nyame, K. 1999. Review. Schistosome glycoconjugates. *Biochimica et Biophysica Acta* , 363-374.

Curwen, R., Ashthon, P., Johnston, D. y Wilson, A. 2004. The *Schistosoma mansoni* soluble proteoma: a comparison across four life-cycle stages. *Mol Biochem Parasitol*, **138**: 57-66.

Dalton, J., Lewis, S., Aronstein, W. y Strand, M. 1987. *Schistosoma mansoni* : Immunogenic glycoproteins of the cercarial glycocalix. *Exp Parasitol* , **63**: 215-226.

Díaz, P., González, O., Rodríguez, Y. y Baéz, F. 1999. Aplicaciones de las lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* , **15 (2)**: 91-5.

Dunne, D. 1990. Schistosome Carbohydrates. *Parasitol Today* , **9 (2)**: 45-48.

Dunne, D., Agnew, A., Modha, J y Doenhoff, M. 1986. *Schistosoma mansoni* egg antigens: preparation of rabbit antiser with monospecific immunoprecipitating activity, and their use in antigen characterization. *Parasite Immunol* , **8**: 575-586.

Dunne, D., Webster, M., Smith, P., Langley, J., Richardson, B., Fulford, A., Butterworth, A., Sturrock, R., Kariuki, H. y Ouma, J. 1997. The isolation of a 22

Kda band after SDS-PAGE of *Schistosoma mansoni* adult worms and its use to demonstrate that IgE responses against the antigen (s) it contains are associated with human resistance to reinfection. *Parasite Immunol*, **19**: 79-89.

El-Ansary, A. 2003. Biochemical and immunological adaptation in Schistosome parasitism. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. **136**:227-243.

Elbaz, T. y Esmat, G. 2013. Hepatic and intestinal Schistosomiasis: Review. *J. of Adv Research*, **4**:445-452

Evert, B., Husaarts, L., Driessen, N., Meevissen, M., Schramm, G., Van der Ham, A., Van der Hoeven y col. 2012. Schistosome –derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *J. Exp. Med*. **209**: 1753-1767.

Figuera, F. L. 1997. *Helmintología básica*. Cumaná, Edo. Sucre, Venezuela: Publitext.

Gaber, H. Maghraby, A., Ahmed, M. Ruppel, A. y Bahgat, M. 2010. Immune responses in mice after immunization with antigens from different stages of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Z. Naturforsch*. **65**:289-302

Gabius, H. 2001. Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins. *Anat. Histol. Embryol* , **30 (1)**, 3-31.

Georgieva, K., Georgieva, S., Mizinska, Y. y Stoitsova, S. 2012. *Fasciola hepatica* miracidia: Lecting binding and stimulation of *in vitro* miracidium –to-sporocyst transformation. *Act. Parasitol*. **57**:46-52.

González, A., Montenegro, J., Navarro, M., Alarcón de Noya, B. y López, M. 2010. Perfil epidemiológico de la esquistosomiasis: <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/2357/1/Perfil-epidemiologico-de-la-Esquistosomiasis.html>. [Consultado en Agosto de 2013]

Grenfell, R., Martins, W., Silva-Moraes, V., Araujo, N., Oliveira, E. Fonseca, C. y Coelho P. 2013. The schistosomula tegument antigen as a potential candidate for the early serological diagnosis of *schistosomiasis mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. **55**: 75-8

Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., y Kestens, L. 2006. Human shistosomiasis. *The lancet* , **368**: 1106-1118.

Grzych, J., Dissous, C., Capron, M., Torres, S., Lambert, P. y Capron, A. 1987. *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *J. Exp. Med.* **165**: 865-878.

Halkes, K., Henricus, V., Slaghek, T., Van Hooft, P., Loof, A., Kamerling, J. y Vliegthart, J. 1998. Preparation of spacer-containing di-, tri-, and tetrasaccharide fragments of the circulating anodic antigen of *Schistosoma mansoni* for diagnostic purposes. *Carbohydrate Research*. **309**: 175-188.

Hamburger, J., Lustigman, S., Siongok, T. Ouma, J. y Mahmoud, A. 1982. Characterization of a purified glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs: Specificity, stability, and the involvement of carbohydrate and peptide moieties in its serologic activity. *J Immun*, **128**: 1864-1860.

Harrison , J., Carter, C. y Colley, D. 1979. Immunoaffinity purification of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens. *J Immun* , **122**: 2210-2217.

Hayunga, E., Sumner, M., Stek, M., Vannier, W., Chestnut, R. 1983. Purification of the major Concanavalin A-binding surface glycoprotein from adult *Schistosoma mansoni* . *Proc, Helminthol Soc Wash* , **50 (2)**: 219-235.

Hokke, C. y Yazdanbakhsh, M. 2005. Schistosome glycans and innate immunity. *Parasite Immunol* , **27**: 257-264.

Hokke, C., Deelder, A., Hoffmann, K. y Wuhler, M. 2007a. Glycomics-driven discoveries in schistosome research. *Exp. Parasitol*, **117**: 275-283.

Hokke, C., Fitzpatrick, J. y Hoffmann, K. 2007b. Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of *Schistosoma* biology. *Trends Parasitol* , **23**: 165-174.

Hooke, C., Deelder, A. 2001. Shistosoma glycoconjugates in host-parasite interplay. *Glycoconjugate J*, **18**: 583-587.

Irie, S. y Yasuraoka, K. 1984. Comparison of protein composition between schistosomula of *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* . *Parasitol*, **89**: 453-459.

Iskratsch, T., Braun, A., Paschinger, K. y Wilson , I. 2009. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. *Anal Biochem*, **386**: 113-146.

Ivanchenko, M., Lerner, J., McCormick, R., Toumadje, A., Allen, B., Fischer, K., Hedstrom, O., Helmrich, A., Barnes, D., y Bayne, C. 1999. Continuous in vitro propagation and differentiation of cultures Continuous in vitro propagation and differentiation of cultures *Schistosoma mansoni* . *Proc. Natl. Acad. Sci* , **96**: 4965-70.

Jang-Lee, J., Curwen, R., Ashton, P., Tissot, B., Mathieson, W., Panico, M., Dell, A., y colaboradores. 2007. Glycomics analysis of *Schistosoma mansoni* egg and cercarial secretions. *Moll Cell Proteom* , **6**: 1485-1499.

Karcz, S., Barnard, B. y Podesta, R. 1988. Biochemical properties of a 24 Kilodalton membrane glycoprotein antigen complex from *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, **31**: 163-172.

Kusel, J. 1972. Protein composition and protein synthesis in the surface membranes of *Schistosoma mansoni* . *Parasitol* , **65**: 55-69.

Kusel, J. 1970. Studies on the surfaces of cercariae and schistosomula of *Schistosoma mansoni* . *Parasitol* , **61**: 127-134.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* , **227**: 680 85.

Lehr, T., Frank, S., Natsuka, S., Geyer, H., Beuerlein, K., Doenhoff, M., Hase, S. y Geyer, R. 2010. N-glycosylation patterns of hemolymph glycoproteins from *Biomphalaria glabrata* strains expressing different susceptibility to *Schistosoma mansoni* infection. *Exp. Parasitol.*, **126**: 592-602.

Linder, E. 1985. *Schistosoma mansoni*: Visualization with fluorescent lectins of secretions and surface carbohydrates of living cercariae. *Exp Parasitol* , **59**, 307-312.

Linder, E., Huldt, G. 1982. Distribution of exposed and hidden carbohydrates of *Schistosoma mansoni* adult worms demonstrated by selective binding of fluorochrome-conjugated lectins. *Parasitol*, **85**: 503-9.

Loukas, A., Tran, M. y Pearson, M. 2007. Schistosome membrane protein as vaccines. *Inter J Parasitol*, **37**: 257-263.

Lowry, O., Rosebrough, A., Farr, A., Randall, J. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem* , **193**: 265-275.

Lustigman, S., Mahmoud, A. y Hamburger J. 1985. Glycopeptides in soluble egg antigen of *Schistosoma mansoni* : isolation, characterization, and elucidation of their immunochemical and immunopathological relation to the major egg glycoprotein (MEG). *J Immunol*, **134**: 1961-1967.

McGregor, A., Stott, D. y Kusel, J.1985. Lectin binding to glycoproteins in the surface membrane of *Schistosoma mansoni*. *Mol Bio Parasitol*: **16**:163-172

Mann, V., Morales, M. Rinaldi, G., y Brindley, J. 2010. Culture for genetic manipulation of developmental stages of *Schistosoma mansoni* . *Parasitol* **137**: 451-462.

Marcial-Rojas, R. 1971. Pathology of protozoal and helminthic diseases. *Williams and Wilkins*.

Mark J., Stryer L. y Tymoczko, J. 2008. *Bioquímica*. Barcelona, España: Reverté, S.A.

Márquez, M. 1994. Identificación de antígenos de huevo de *Schistosoma mansoni* por sueros de pacientes y animales experimentalmente infectados. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Dep de Zoología, Caracas, Venezuela.

Márquez, M. 2004. *Biología del verme de 21 días de S. mansoni : Un estudio parasitológico, inmunológico y bioquímico*. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela, Dep de Zoología, Caracas, Venezuela.

Martínez, E. y Bastidas, G. 2012. *Esquistosomiosis: Un problema de salud pública en Venezuela. Aspectos socio-educativos*. Zulia, Venezuela: Universidad del Zulia.

Martins-Souza, R., Pereira, C., Rodrigues, L., Araújo, E., Coelho, P., Corrêa J, A., Negrão-Corrêa, D. 2011. Participation of N-acetyl-D-glucosamine carbohydrate moieties in the recognition of *Schistosoma mansoni* sporocysts by haemocytes of *Biomphalaria tenagophila*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , **106**: 884-891.

Mathews, C., Holde, V. y Ahern, K. 2006. *Bioquímica* . 3ra edición.

McLaren, D. 1980. *Schistosoma mansoni : The parasite surface in relation to host immunity*. London, Inglaterra: Editorial Research Studies Press.

Meevissen, M., Balog, C., Koeleman, C., Doenhoff, M., Schramm, G., Haas, H., Deelder, A. y col. 2011. Targeted glycoproteomic analysis reveals that Kappa-5 is a major, uniquely glycosylated component of *Schistosoma mansoni* egg antigen. *Mol Cell Proteomics*. **10 (5)**: 110-116

Meevissen, M., Driessen, N., Smits, H., Versteegh, R., Vliet, S., Kooyk, Y., Schramm, G. y colaboradores 2012. Specific glycan elements determine differential binding of individual egg glycoproteins of the human parasite *Schistosoma mansoni* by host C-type lectin receptors. *Inter J Parasitol*, **42**: 269-277.

Milligan, J. y Jolly, E. 2011. *Cercarial transformation and in vitro cultivation of Schistosoma mansoni schistosomules.*, de Journal of visualized experiments: <http://www.jove.com/details.php?id=3191> [Consultado en Marzo de 2013]

Mott, K. y Dixon, H. 1982. Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis. *World Health Organization*. **60**:729-753

Murrell, KD., Taylor, DW., Vannier, WE., Dean, DA. 1978. *Shistosoma mansoni*: Analysis of surface membrane carbohydrates using lectins. *Exp Parasito* , **46**, 247-255.

Nash, T. 1978. Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **27**: 938-043.

Norden, A. y Strand, M. 1985. Identification of antigenic *Schistosoma mansoni* glycoproteins during the course of infection in mice and humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34**: 495-507.

Nyame, K., Cumming, R., Damian, R. 1988. Characterization of the N- and O-linked oligosaccharides and glycoproteins synthesized by *Schistosoma mansoni* schistosomula. *J. Parasitolol*, **74**: 562-572

Nyame, A. Leppänen, A., Bogitsh, B. y Cummings, R. 2000. Antibody responses to the fucosylated LacdiNac glycan antigen in *Schistosoma mansoni* -infected mice and expression of the glycan among Schistosomes. *Exp. Parasitol*, **96**: 202-212.

Packer, N., Ball, M., Devine, P. y Patton, W. 2004. Detection of glycoproteins in gels and blots. The protein protocols handbook. Humana Press. 2da Edition, New Jersey, E.E.U.U.

Payares, G., MacLaren D., Evans, W. y Smithers, S. 1985. Changes in the surface antigen profile of *Schistosoma mansoni* during maturation from cercaria to adult worm. *Parasitol*, **91**: 83-99.

Payares, G., Simpson, JG. 1985. *Schistosoma mansoni* surface glycoproteins. Analysis of their expression and antigenicity. *Eur J Biochem*, **153**: 125-201.

Payares, G., Smithers R. y Evans, H. 1984. Purification and topographical location of tegumental alkaline phosphatase from adult *Schistosoma mansoni* . *Mol Biochem Parasitol* , **13**: 343-360.

Pearce, E., Magee, A. Smithers, R. y Simpson A. 1991. Sm25, a major schistosome tegumental glycoprotein, is dependent on palmitic acid for membrane attachment. *EMBO Jou* , **10**: 2741-2746.

Pereira, A. y Pérez, M. 2004. Esquistosomiosis. *Ambito Farmaceutico Parasitologia* , **23 (6)**: 104-110.

Peterson, N., Hokke, C. Deelder, A. y Yoshino, T. 2009. Glycotope analysis in miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni* : differential expression during the miracidum-to-sporocysts transformation. *Int J Parasitol*, **39**: 1331-1344.

Planchart, S. y Incani, R. 2007. Preliminary characterization of an adult worm "vomit" preparation of *Schistosoma mansoni* and its potential use as antigen for diagnosis. *Parasitol Res* , **101**: 301-309.

Pujol, FH., Cesari, IM. 1993. *Schistosoma mansoni* : Surface membrane isolation with lectin-coated beads. *Mem Bioschem*, **10**: 155-161.

Ramajo, A. 2008. *Análisis de los proteomas y glicoproteomas del tegumento y de los productos de excreción-secreción de Schistosoma bovis. Estudio de la interacción del parásito con el sistema fibrinolítico del hospedador*. Universidad de Salamanca, Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Departamento de Biología animal, parasitología, ecología., Salamanca.

Ramalho- Pinto. F., Gazzinelli, G., Howells, R., Mota-Santos, T., Figueiredo, E., Pellergrino, J. 1974. *Schistosoma mansoni* : defined system for stepwise transformation of cercaria schistosomula in vitro. *Exp Parasitol* , **36 (3)**: 360-372.

Rao, K., He, Y. y Kalyanasundaram, R. 2003. Expression of a 28-Kilodalton glutathione S-Transferase antigen of *Schistosoma mansoni* on the surface of filamentous phages and evaluation of its vaccine potential. *Clin diagn lab immun*, **10**: 536-541.

Robjin, M., Wuhrer, M., Kornelis, D., Deelder, A. Geyer, R. y Hokke, C. 2005. Mapping fucosylated epitopes on glycoproteins and glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, adult worms and eggs. *Parasitol*, **130**: 67-77.

Rojas-Marcos, J., Azcoaga, A., Vidal, S. Ceresuela, E. 2009. *Esquistosomiasis humana: manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento*. <http://www.jano.es>. [Consultado en Agosto de 2013]

Rumjanek, F. y Smithers, S. 1978. Mannosyl transferase activity in homogenates of adult *Schistosoma mansoni* . *Parasitol* , **77**: 75-86.

Ruppel, A. y Cioli, D. 1977. A comparative analysis of various developmental stages of *S. mansoni* with respect to their protein composition. *Parasitol* , **75**: 339-343.

Samuelson, J. y Caulfield, J. 1982. Loss of covalently labeled glycoproteins and glycolipids from the surface of newly transformed Schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Cell Bio.* **94**: 363-369.

Schmidt, J. (1995). Glycans with N-acetyllactosamine type 2-like residues covering adult *Schistosoma mansoni*, and glycomimesis as a putative mechanism of immune evasion. *Parasito.* **111**: 325-336.

Smith, H., Doenhoff, M., Aitken, C., Bailey, W., Ji, M., Dawson, E., Gilis, H., Spence, G., y col. 2012. Comparison of *Schistosoma mansoni* soluble cercarial antigens and soluble egg antigens for serodiagnosing Schistosome infection. *Plos Negl Trop Dis.* **6**: e1815

Simpson, A. y Smithers, R. 1980. Characterization of the exposed carbohydrates of the surface membrane of adult *Schistosoma mansoni* by analysis of lectin binding. *Parasitol.* **81**: 1-15.

Simpson, A. y McLaren, D. 1982. *Schistosoma mansoni* : Tegumental damage as a consequence of lectin binding. *Exp Parasitol* , **53**: 105-116.

Simpson, A., Correa, R., Smither, R., Sher, A. 1983. The exposed carbohydrates of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their modification during maturation in vivo. *Mol Biochem Parasitol* , **8**: 191-205.

Simpson, A., Rumjanek, F., Payares, G. y Howard, E. 1981. Glycosyl transferase activities are associated with the surface membrane in adult *Schistosoma mansoni* . *Mol Biochem Parasitol* , **4**: 107-115.

Smithers, S.R. y Terry, R.J. 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* , 695-700.

Snary, D., Smith, M. y Clegg, J. 1980. Surface proteins of *Schistosoma mansoni* and their expression during morphogenesis. *Eur. J. Immunol* , **10**: 573-575.

Solórzano, Y. 2011. *Diagnóstico serológico diferencial de la fase aguda y crónica de la Esquistosomiasis: estudio de las glicoproteínas del glicocáliz de la cercaria*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Srivatsan, J., Smith, D. y Cummings, R. 1992. The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing the Lewis X antigen. *J. Bio. Chem.* **267**:196-203

Stirewalt, M., Cousin, C. y Dorsey, C. 1983. *Schistosoma mansoni* : Stimulus and transformation of cercariae into schistosomules. *Exp Parasitol* , **56**: 358-368.

Suri, P., Goldberg, M., Madikizela, M. Petzke, M., Bungiro, R., Davies, S., Chakraborty, B. y colaboradores. 1997. Evaluation of recombinant protein r140, a polypeptide segment of tegumental glycoprotein Sm25, as a defined antigen vaccine against *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Immunol*, **19**: 515-529.

Tamer, E. y Gamal, E. 2013. Hepatic and intestinal Schistosomiasis: Review. *J Adv Research* , **4**: 445-452.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheet, procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* , **76**: 4350-4.

Uchikawa, R., Loker, E. 1991. Lectin-Binding properties of the surfaces of in vitro-transformed *Schistosoma mansoni* and *Eschistosoma paraensei* sporocysts. *J. Parasitology* .

Vendrame, C., Carvalho, M., Yamamoto, C., Nakhle, M., Carvalho, S. y Chieffi, P. 2001. Evaluation of anti- *Schistosoma mansoni* IgG antibodies in patients with chronic *Schistosomiasis mansoni* before and after specific treatment. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **43**: 153-159.

Wilson, M., Mentink-Kane, M., Pearsce, J., Ramalingam, T., Thompson, R. y Wynn, T. 2004. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol*, **85**: 148-154.

Wright, M., Henkle, K. y Mitchell, G. 1990. An immunogenic Mr 23000 integral membrane protein of *Schistosoma mansoni* worms that closely resemble a human tumor-associated antigen. *J Immunol* , **144**: 3195-3200.

Wright, M., Davern, K. y Mitchell, G. 1991. The functional and immunological significance of some Schistosoma surface molecules. *Parasitol Today*. **7**: 56-58.

Wuhrer, M., Dennis, R. Doenhoff, M., Lochnit, G. y Geyer, R. 2000. *Schistosoma mansoni* cercarial glycolipids are dominated by Lewis X and pseudo-Lewis Y structures. *Glycobiology* , **10**: 89-101.

Yoshino, TP., Cheng, TC., Renwranzt, LR. 1977. Lectin and human blood group determinants of *Schistosoma mansoni*: alteration following in vitro transformation of miracidium to mother sporocyst. *J. Parasitol* , 63 (5), 818-24.

Yoshino, T., Wu, XJ., Liu, H., Gonzalez, L., Deelder, A., Hooke, C. 2012. Glycotope sharing between snail hemolymph and larval Schistosomes: larval transformation products alter shared glycan patterns of plasma proteins. *Plos Negl Trop Dis* , **6**: 1569.

Yoshino,T., Wu, X., Gonzalez, L. y Hokke, C. 2013. Circulating Biomphalaria glabrata hemocyte subpopulation possess shared schistosome glycans and receptors capable of binding larval glycoconjugates. *Exp. Parasitol.* , **133**: 28-36.

Zelck, U. y Becker, W. 1990. Lecting binding to cells of *Schistosoma mansoni* sporocysts and surrounding Biomphalaria glabrata tissue. *J. Invetebra pathol*, **55**: 93-99.

Zhou, Y., Karcz, S., Podesta, R. y Clark, M. 1990. Localization of a 24-Kilodalton Glycoprotein in adult *Schistosoma mansoni* using immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Jou Parasitol* , **76**: 601-605.

Consulta en línea:

Report, I. 2012. *Schistosoma mansoni* .

http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=55320 [Consultado el 9 de noviembre de 2012]

A.M.S.E. (Asociación de médicos de sanidad exterior). 2013. *Esquistosomiasis: Epidemiología y situación mundial*.

http://www.amse.es/index.php?option=com_content&view=article&id=90:esquistosomiasis-epidemiologia-y-situacion-mundial&catid=42:inf-epidemiologica&Itemid=50
[Consultado en agosto de 2013]

WHO. 2012. Organización Mundial de la Salud.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/>. [Consultado en agosto de 2012]

<http://herramientas.educa.madrid.org/animalandia/ficha-imagenes.php?id=4145>.

Consultado en Noviembre de 2012]