



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Medicina

Evaluación de proteínas recombinantes del nematodo *Strongyloides stercoralis* en el control de la parasitosis y su efecto inmunomodulador

Liz Fiorella Sánchez Palencia

Directores:

Dr. Antonio Marcilla Díaz
Dra. M^a Dolores Bernal Membrilla
Dra. María Trelis Villanueva

Valencia, abril de 2024



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Medicina

Evaluación de proteínas recombinantes del nematodo *Strongyloides stercoralis* en el control de la parasitosis y su efecto inmunomodulador

por

Liz Fiorella Sánchez Palencia

Directores:

Dr. Antonio Marcilla Díaz

Dra. M^a Dolores Bernal Membrilla

Dra. María Trelis Villanueva

Valencia, abril de 2024

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

1.- Director y tutor: **MARCILLA DÍAZ, ANTONIO**, N.I.F. 05165770Q, Departamento: FARMACIA, TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA Y PARASITOLOGÍA Centro: FACULTAT DE FARMÀCIA

2.- Directora: **BERNAL MEMBRILLA, M^a DOLORES**, N.I.F. 52730379G, Departamento: BIOQUÍMICA Centro: FACULTAT DE BIOLÓGICAS

3.- Directora: **TRELIS VILLANUEVA, MARÍA**, N.I.F. 22574002P, Departamento: FARMACIA, TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA Y PARASITOLOGÍA Centro: FACULTAT DE FARMÀCIA

Directores y tutora, de la tesis doctoral: **Evaluación de proteínas recombinantes del nematodo *Strongyloides stercoralis* en el control de la parasitosis y su efecto inmunomodulador**

de D/Dña. **LIZ FIORELLA SÁNCHEZ PALENCIA**,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 en Medicina** (RD99/2011) de la Universitat de València, emiten informe **FAVORABLE** para la realización del depósito y la defensa de la Tesis Doctoral.

Fecha: Valencia, a 10 de abril de 2024

MARCILLA
DÍAZ ANTONIO
- 05165770Q

Firmado digitalmente
por MARCILLA DIAZ
ANTONIO - 05165770Q
Fecha: 2024.04.11
11:53:58 +02'00'

Fdo.: **Antonio Marcilla**

MARIA
DOLORES|
BERNAL|
MEMBRILLA

Firmado digitalmente
por MARIA DOLORES|
BERNAL|MEMBRILLA
Fecha: 2024.04.10
17:15:15 +02'00'

Fdo.: **M^a Dolores Bernal**

MARIA
TRELIS
VILLANUEVA
A

Firmado digitalmente por
MARIA TRELIS
VILLANUEVA
Fecha: 2024.04.11
12:07:10 +02'00'

Fdo.: **María Trelis**

A mi querida madre, Benilde

A mi compañero de vida, José

“No hay medicina que cure lo
que no cura la felicidad”

Gabriel García Márquez

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi familia, en especial a mi madre, **Benilde Palencia Torres**, porque gracias a ella pude realizar este sueño a pesar de que eso implicaba estar alejadas. Gracias por ser mi mejor amiga, mi refugio y sobre todo por inculcarme los valores con los que cuento, me siento muy orgullosa de ti, mi mamicha querida. A mi amado esposo, **José Miguel Acosta Cáceres**, por ser mi compañero de vida en esta gran aventura para ambos, además, ser mi fortaleza durante todo este tiempo lejos de casa. Me complace ver tu determinación y pasión en todo lo que haces y me impulsa a ser mejor cada día. A mi papá, **Isaías Sánchez Tena**, por su gran amor y por estar con mi mamá, cuidándose mutuamente estos años. A mi hermano, **Nilton Sánchez Palencia**, por estar al pendiente de nosotros, por su apoyo y ayuda a la distancia a pesar de sus actividades laborales y familiares con mis sobrinitas, **Vania** y **Luciana**, a quienes extraño tanto.

Mi más profundo agradecimiento, al **Dr. Antonio Marcilla Díaz**, catedrático de Parasitología de la Universitat de València, que desde un inicio me brindó su apoyo y confianza al darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación aceptando la dirección de esta Tesis Doctoral y con esto aumentar mis conocimientos y habilidades científicas. Muchas gracias por su preocupación durante todo el proceso de realización de la tesis.

A la **Dra. María Trelis Villanueva**, Profesora Titular de Parasitología de la Universitat de València, quien ha sido parte fundamental e imprescindible en este proyecto y me ha brindado su apoyo incondicional y asesoramiento en la realización de la presente Tesis Doctoral tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por tu gran profesionalismo y por compartir conmigo todos tus conocimientos en el campo de la Parasitología.

A la **Dra. M^a Dolores Bernal Membrilla**, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València, gracias por compartir tus amplios conocimientos, por tu sinceridad y apoyo en la finalización de la presente Tesis Doctoral y por ser un estímulo para esforzarme en mejorar la redacción de la tesis, ha sido un privilegio conocerte.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, **Gaby Tapia**, **Tephy Tapia**, **Aránzazu González**, **Maricruz Manzaneque**, **María Cholvi**, **Javi Roig**, por la buena experiencia en el laboratorio y los

gratos momentos durante los ensayos. En especial me gustaría agradecer a **Christian Sánchez López**, quien desde un principio me brindó su apoyo en cuanto a las labores del laboratorio, por todo lo que aprendí de él y sobre todo los momentos compartidos. Además, también quiero agradecer por el buen ambiente de trabajo llevado con **Emma Fiallos, Paola Cociancic y Jacklyn Comas**, compañeras y amigas de laboratorio con las que he pasado bonitos momentos tanto fuera como dentro del laboratorio.

En general me gustaría agradecer al Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología, me gustó mucho pertenecer a este grupo de trabajo, todos fueron muy amables siempre, a los profesores como la **Dra. Alba Cortés**, al **Dr. Marius Fuentes**, a la **Dra. Maria Teresa Galán**, con quienes siempre fue grato hablar y compartir momentos sobre todo en épocas festivas y al personal de secretaria del Departamento por siempre estar dispuestos a ayudar a quien lo necesite en todo momento. Además, al **Dr. Pedro Pérez-Bermúdez**, catedrático del Departamento de Biología Vegetal de la Universitat de València, quien siempre con su alegría y buen humor nos hacía pasar gratos momentos.

A todos los amigos que he conocido en Valencia, los cuales fueron muchísimos y sería difícil poner los nombres de todos, que de una manera u otra me han acompañado en estos años, compartiendo bonitas experiencias y alegres momentos, haciéndome sentir en compañía. Siempre guardaré esos bellos recuerdos en el corazón.

RESUMEN

La estrongiloidosis es una enfermedad tropical desatendida que afecta a millones de personas en el mundo. En España no es considerada una enfermedad endémica, pero su diagnóstico y vigilancia es importante debido a la presencia de casos (autóctonos e importados) que pueden producir síndrome de hiperinfección en pacientes inmunosuprimidos. Hasta el momento, no existe una técnica de elección para el diagnóstico de la estrongiloidosis. Las técnicas parasitológicas, tanto las tradicionales como las moleculares, detectan la presencia del parásito en las muestras biológicas, lo cual no siempre ocurre en infecciones crónicas. Las técnicas serológicas resultan más sensibles, pero menos específicas, dificultando el diagnóstico en los casos de coinfecciones parasitarias, presentando limitaciones y dificultades con las que se encuentran los programas de control en zonas endémicas. La presente Tesis busca ampliar el conocimiento sobre la posibilidad de utilizar proteínas recombinantes de la larva L3i de *Strongyloides stercoralis* en el diagnóstico, así como analizar su posible efecto modulador de la respuesta inmunitaria. Se produjeron las proteínas recombinantes 14-3-3 zeta (rSs14-3-3z), Ferritina (rSsFe) y Antígeno Principal o *Major Antigen* (rSsMA) de *S. stercoralis*, en *Escherichia coli*. Dichas proteínas fueron evaluadas para su posible utilidad diagnóstica en un ensayo inmunoenzimático *ELISA* indirecto utilizando sueros de pacientes de estrongiloidosis. Los resultados obtenidos mostraron que la proteína rSs14-3-3z proporcionó los mejores resultados diagnósticos en cuanto a sensibilidad y con mayor especificidad que la presentada por los ensayos comerciales disponibles. Para analizar el efecto modulador de la respuesta inmunitaria, se realizaron ensayos *in vitro* con dichas proteínas recombinantes, utilizando cultivos de células derivadas de macrófagos murinos (Raw BlueTM), y se evaluaron los posibles efectos citostáticos/citotóxicos, pro- o antiinflamatorios, y la polarización de la respuesta inmunitaria. Las células tratadas con rSs14-3-3z mostraron un perfil de citoquinas Th2/Th17, mientras que las tratadas con rSsMA mostraron un perfil Th2/Treg. A partir de los datos obtenidos *in vitro*, se diseñó y llevó a cabo un ensayo de inmunización con las proteínas rSs14-3-3z y rSsMA en un modelo experimental de ratón, para evaluar el nivel de protección frente a la infección por el parásito múrido *S. venezuelensis*. La inmunización con rSs14-3-3z y rSsMA no previno la infección, pero sí que produjo un efecto modulador de la respuesta inmunitaria. La proteína rSs14-3-3z, que parece favorecer el establecimiento y el desarrollo de las hembras parásitas, elicó una respuesta Th2/Treg en los bazo de ratones inmunizados y una elevada producción de TNF- α , confirmando su papel inmunomodulador.

Palabras clave: *Strongyloides stercoralis*, rSs14-3-3z, rSsFe, rSsMA, *ELISA*, inmunomodulación, citoquinas.

LISTADO DE ABREVIATURAS

AAMϕ	Macrófagos M2 o Macrófagos Activados Alternativamente
ADAD	Sistema Adyuvante Adaptado para vacunación
ANOVA	Análisis de la Varianza
AUC	Área bajo la curva
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CCDA	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
COVID-19	Enfermedad por Coronavirus de 2019
Ct	Ciclo umbral
DALY	<i>Disability Adjusted Life Years</i> (Años de Vida Ajustados por Discapacidad)
DMEM	Medio de cultivo <i>Dulbecco's Modified Eagle</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad Óptica
DOC	Deoxicolato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
GAH	<i>Goat anti-IgG Human</i>
GBD	<i>Global Burden of Diseases</i>
HPG	Huevos por gramo
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HTLV-1	Virus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1
HTS	Helmintos Transmitidos por el Suelo
IIS La Fe	Instituto de Investigación Sanitaria La Fe
iNOS	Óxido nítrico sintasa isoforma inducible
IPTG	Inductor Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IR	Antígeno Inmunorreactivo
L3i	Larvas infectantes L3
LAMP	Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle
LB	Medio de Luria-Bertani
LIPS	Sistemas de Inmunoprecipitación Luciferasa
LMC	Larva <i>Migrans</i> Cutánea
LPS	Lipopolisacárido
MBP	Proteína Básica Principal
MPO	Mieloperoxidasa
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	Factor de Transcripción Nuclear kappa B
Ni-NTA	Niquel-ácido nitrilotriacético
NK	<i>Natural Killer</i> (células citocidas naturales)
NO	Óxido Nítrico
NTD	<i>Neglected Tropical Disease</i> (Enfermedades Tropicales Desatendidas)

OPD	Diclorhidrato de o-fenilendiamina
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marcos de Lectura Abiertos)
PBS	Tampón fosfato salino (fosfatos de sodio/potasio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4)
PBST	PBS con Tween-20®
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso Molecular
Qs	<i>Quillaja saponaria</i>
ROC	Curva característica operativa del receptor
rSs14-3-3z	Proteína recombinante de <i>Strongyloides stercoralis</i> 14-3-3 zeta
rSsFe	Proteína recombinante de <i>Strongyloides stercoralis</i> Ferritina
rSsMA	Proteína recombinante de <i>Strongyloides stercoralis</i> <i>Major Antigen</i> (Antígeno principal)
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real
SARS-CoV-2	Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en presencia de Dodecilsulfato Sódico
SEAP	Fosfatasa Alcalina Embrionaria
SEM	Error estándar de la media
SFB	Suero bovino fetal
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> (libre de patógenos específicos)
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante beta
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TSLP	Linfopoyetina Estromal Tímica
UE	Unión Europea
YLD	<i>Years Lived with Disability</i> (Años Vividos con Discapacidad)
YLL	<i>Years of Life Lost</i> (Años de Vida Perdidos por muerte prematura)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de los estadios de <i>Strongyloides stercoralis</i>	5
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Strongyloides stercoralis</i>	8
Figura 3. Prevalencia de la infección por <i>Strongyloides stercoralis</i>	10
Figura 4. Diagnóstico por métodos parasitológicos	19
Figura 5. Respuesta inmunitaria en los tejidos barrera.	27
Figura 6. Respuesta inmunitaria adaptativa frente a larvas de <i>Strongyloides stercoralis</i>	29
Figura 7. Mapa de los vectores pQE30-32	40
Figura 8. Metabolización de MTT a una sal de formazán realizada por las células viables.	50
Figura 9. Células Raw Blue™ con cristales de formazán.	51
Figura 10. Ensayo QUANTI-Blue™	52
Figura 11. Grupos de animales que constituyeron los ensayos de inmunización.	54
Figura 12. Esquema del diseño experimental del ensayo de inmunización	55
Figura 13. Esquema para analizar la expresión de citoquinas mediante RT-qPCR	57
Figura 14. Obtención de las proteínas recombinantes	64
Figura 15. Reconocimiento de los sueros autóctonos mediante <i>ELISA</i> indirecto	66
Figura 16. Curva <i>ROC</i> de la prueba de <i>ELISA</i> indirecto	68
Figura 17. Reconocimiento de los sueros procedentes del ISCIII frente a rSs14-3-3z	69
Figura 18. Reconocimiento de los sueros procedentes del ISCIII frente a rSsFe.	70
Figura 19. Reconocimiento de los sueros procedentes del ISCIII frente a rSsMA.	70
Figura 20. Curva de AMC a las 24 h con concentraciones crecientes de proteína	73
Figura 21. Efecto citostático/citotóxico de las proteínas recombinantes.	74
Figura 22. Efecto proinflamatorio sobre las células Raw Blue™.	76
Figura 23. Células Raw Blue™ no estimuladas y estimuladas con LPS	76
Figura 24. Efecto antiinflamatorio de las proteínas recombinantes sobre células Raw Blue™.	77
Figura 25. Perfil de citoquinas de la respuesta Th1 en células Raw Blue™	78
Figura 26. Expresión de NOS2 en células Raw Blue™	79
Figura 27. Perfil de citoquinas de la respuesta Th2 y Th17 en células Raw Blue™	80
Figura 28. Número de huevos por gramo (HPG) de heces	83
Figura 29. Número de hembras partenogenéticas de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	83
Figura 30. Efecto de la inmunización en el índice esplénico e intestinal tras la infección	84
Figura 31. Niveles séricos de IgG anti-14-3-3 y anti-MA de <i>S. stercoralis</i> en ratones	85
Figura 32. Perfil de citoquinas según respuesta T cooperadora en bazo de ratones	87
Figura 33. Perfil de citoquinas según respuesta T cooperadora en pulmón de ratones.	89
Figura 34. Perfil de citoquinas según respuesta T cooperadora en intestino de ratones	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sueros utilizados en el desarrollo del <i>ELISA</i> indirecto	43
Tabla 2. Tampones utilizados para purificar las proteínas recombinantes	45
Tabla 3. Valoración del índice Kappa	49
Tabla 4. Esquema del ensayo del efecto citostático/citotóxico MTT	51
Tabla 5. Esquema del Ensayo QUANTI-Blue™	53
Tabla 6. Ensayos de expresión génica TaqMan™ usadas en la RT-qPCR.....	58
Tabla 7. Condiciones ensayadas durante la estandarización del <i>ELISA</i> Indirecto	65
Tabla 8. Sensibilidad y Especificidad del ensayo de <i>ELISA</i> indirecto <i>in house</i>	68
Tabla 9. Valores de concordancia obtenidos para la proteína rSs14-3-3z.....	71
Tabla 10. Índice Kappa para cada proteína recombinante	72

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.Importancia de las Enfermedades Tropicales Desatendidas en Salud Pública	1
1.2.<i>Strongyloides stercoralis</i>	3
1.2.1.Morfología	4
1.2.2.Ciclo de vida	6
1.3.Estrongiloidosis	8
1.3.1.Epidemiología	9
1.3.2.Cuadro clínico	12
1.3.2.1. <i>Estrongiloidosis aguda</i>	12
1.3.2.2. <i>Estrongiloidosis crónica</i>	13
1.3.2.3. <i>Estrongiloidosis grave</i>	14
1.3.3.Diagnóstico de la estrongiloidosis	17
1.3.3.1. <i>Métodos parasitológicos</i>	17
1.3.3.2. <i>Métodos inmunológicos</i>	19
1.3.3.3. <i>Métodos moleculares</i>	21
1.3.4.Tratamiento	22
1.3.4.1. <i>Vacunación</i>	24
1.4.Respuesta del hospedador frente a la infección por <i>S. stercoralis</i>	26
1.5.Conocimientos previos sobre el proteoma de <i>S. stercoralis</i>	30
2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1.Material parasitario	39
3.1.1.Larvas L3i de <i>S. stercoralis</i>	39
3.1.2. <i>Strongyloides venezuelensis</i>	39
3.2.Plásmidos recombinantes	40
3.3.Bacterias y condiciones de crecimiento	41

3.4. Línea celular para ensayos <i>in vitro</i>: macrófagos múridos (Raw Blue™)	41
3.5. Animales de experimentación	41
3.6. Sueros de pacientes con estrongiloidosis	42
3.7. Obtención de proteínas recombinantes.....	43
3.7.1. Transformación de bacterias por choque térmico	43
3.7.2. Inducción de la síntesis proteica.....	44
3.7.3. Purificación de las proteínas en condiciones desnaturalizantes	45
3.8 Ensayos inmunoenzimáticos.....	47
3.8.1. <i>ELISA</i> indirecto <i>in house</i>	47
3.8.2. <i>ELISA</i> indirecto para la detección de IgG en ratones inmunizados.....	49
3.9. Ensayo Colorimétrico MTT.....	50
3.10. Ensayo de activación de NF-κB.....	52
3.11. Ensayo de inmunización en ratones CD1 con proteínas recombinantes de <i>S. stercoralis</i>	53
3.12. Extracción del RNA total y obtención del cDNA	56
3.13. Determinación del perfil de citoquinas	57
3.14. Análisis estadístico	59
4. RESULTADOS	63
4.1. Obtención de las proteínas recombinantes de <i>S. stercoralis</i> candidatas para su evaluación en ensayos de diagnóstico e inmunización	63
4.2. Evaluación de la capacidad diagnóstica de las proteínas recombinantes de <i>S. stercoralis</i> mediante <i>ELISA</i> indirecto <i>in house</i>.....	64
4.2.1. Determinación de las condiciones óptimas del ensayo de <i>ELISA</i> indirecto.....	64
4.2.2. Análisis de la capacidad diagnóstica de <i>ELISA</i> indirecto y estudio de su especificidad	67
4.3. Evaluación de las propiedades inmunomoduladoras de las proteínas rSs14-3-3z, rSsFerritina y rSsMajor Antigen de <i>S. stercoralis</i>	72

4.3.1. Efecto de las proteínas recombinantes de <i>S. stercoralis</i> sobre macrófagos	72
4.3.1.1. <i>Análisis del efecto citostático/citotóxico de las proteínas recombinantes</i>	72
4.3.1.2. <i>Respuesta de macrófagos múridos al tratamiento con proteínas recombinantes</i>	75
4.3.1.3. <i>Estudio del perfil de citoquinas producidas por los macrófagos expuestos a proteínas recombinantes</i>	77
4.3.2. Ensayos de vacunación con las proteínas recombinantes de <i>S. stercoralis</i> frente a la infección experimental con <i>S. venezuelensis</i>	81
4.3.2.1. <i>Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas recombinantes de S. stercoralis con las de S. venezuelensis</i>	81
4.3.2.2. <i>Evaluación de la capacidad protectora de la inmunización frente a la infección</i>	82
4.3.2.2.1. <i>Análisis del número de Huevos Por Gramo (HPG) de heces y del número de hembras partenogenéticas</i>	82
4.3.2.2.2. <i>Análisis de los índices esplénico e intestinal</i>	84
4.3.2.3. <i>Estudio de la respuesta humoral frente a la inmunización con las proteínas recombinantes de S. stercoralis y/o infección con S. venezuelensis</i>	84
4.3.2.4. <i>Análisis del efecto inmunomodulador de las proteínas recombinantes de S. stercoralis en ratones frente a la infección con S. venezuelensis</i>	85
4.3.2.4.1. <i>Perfil de citoquinas en bazo</i>	85
4.3.2.4.2. <i>Perfil de citoquinas en pulmón</i>	88
4.3.2.4.3. <i>Perfil de citoquinas en intestino</i>	90
5. DISCUSIÓN	95
5.1. Sobre la utilidad en el diagnóstico de la estrogiloidosis humana mediante el uso del ensayo ELISA indirecto <i>in house</i> con las proteínas recombinantes rSs14-3-3z, rSsFe y rSsMA	96
5.2. Sobre el efecto de las proteínas recombinantes de <i>S. stercoralis</i> en macrófagos de ratón (Raw Blue™) en cultivo	101
5.3. Sobre la evaluación del efecto inmunomodulador de las proteínas recombinantes de <i>S. stercoralis</i> frente a la infección experimental con <i>S. venezuelensis</i>	102
6. CONCLUSIONES.....	113
7. BIBLIOGRAFÍA.....	117
ANEXOS	141

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de las Enfermedades Tropicales Desatendidas en Salud Pública

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha identificado veinte enfermedades tropicales que podrían considerarse "desatendidas" a nivel global o local debido a su frecuencia entre las comunidades con bajo desarrollo del sistema sanitario y su impacto clínico, social o económico. Estas enfermedades infecciosas afectan de manera desproporcionada a las poblaciones más olvidadas del mundo, por lo que se desarrollan en áreas donde el acceso a un saneamiento adecuado, agua limpia y atención médica es limitado. Además, se encuentran en áreas tropicales y subtropicales donde conviven con animales y vectores que facilitan su transmisión (Feasey et al., 2010; Engels & Zhou, 2020; OMS, 2023).

En los últimos años, se ha hecho un esfuerzo internacional por revertir esta situación, a partir de la creación de un departamento específico dentro de la Organización Mundial de la Salud (OMS) con programas de salud encargados de abordar el problema de las Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs), buscando acceder a las comunidades más olvidadas y de escasos recursos, además de una Red Global para el Control de Enfermedades Tropicales Desatendidas (www.ntd-network.org). La revista científica de acceso abierto, dedicada exclusivamente a este tema, PLoS Neglected Tropical Diseases (www.plosntds.org), publicada por primera vez en 2007 (Feasey et al., 2010), está dando una mayor visibilidad a este tipo de enfermedades desatendidas y, por ende, mayor conocimiento mundial.

Dentro de las enfermedades transmisibles y clasificadas como NTDs se incluyen parasitosis como las helmintosis transmitidas por el suelo (ascariosis, tricuriasis y anquilostomosis), filariosis linfática, oncocercosis (ceguera de los ríos), dracunculosis, esquistosomosis, helmintosis transmitidas por alimentos, taeniosis/cisticercosis, equinococosis, tripanosomosis americana (enfermedad de Chagas), tripanosomosis humana africana (enfermedad del sueño) y leishmaniosis. En una lista más amplia se incluye a la estrongiloidosis además de otras parasitosis. Estas enfermedades parasitarias y bacterianas identificadas como desatendidas suponen una carga económica y de salud sustancial para las poblaciones pobres de África, Asia y América Latina, afectando a cerca de 2 mil millones de personas (Hotez et al., 2007; Engels & Zhou, 2020).

Los helmintos transmitidos por el suelo (HTS) son un grupo de nematodos intestinales parásitos de los humanos que son adquiridos a través de la ingestión de huevos o tras el contacto con

tierra contaminada con estadios larvarios de estos helmintos (Bethony et al., 2006; Jourdan et al., 2018; Loukas et al., 2021). Los adultos de los HTS se alojan en el intestino, estableciendo infecciones crónicas y pudiendo vivir de 1 a 10 años, siendo la población infantil la más afectados. Probablemente, el intestino de un niño o niña que vive en zonas empobrecidas de países de renta baja esté parasitado con al menos uno y, en muchos casos, varios de los HTS de forma crónica, con las consiguientes deficiencias asociadas a los síndromes de malabsorción que provocan, que incluyen anemia, desnutrición, déficit cognitivo y reducción de la aptitud física (Nutman, 2017). Aunque la muerte es un resultado poco común, este grupo de infecciones tiene un enorme impacto negativo sobre la capacidad de desarrollo de las poblaciones afectadas, en la promoción social y en la reducción de la pobreza.

Se estima que más de una cuarta parte de la población mundial está en riesgo de infección con HTS. Dado que estas infecciones causan más incapacidad que muerte, su impacto sobre la salud humana se evalúa mediante el cálculo de los Años de Vida Ajustados por Discapacidad o *Disability Adjusted Life Years* (DALY) asociados al concepto de morbilidad. En los estudios de la carga global de enfermedades (GBD, *Global Burden of Diseases*), se estima el impacto de dichas enfermedades y sus lesiones en términos de Años Vividos con Discapacidad o *Years Lived with Disability* (YLDs), Años de Vida Perdidos por muerte prematura o *Years of Life Lost* (YLLs) y, como ya se ha comentado anteriormente, con los DALYs que consideran de forma conjunta los dos parámetros anteriores (YLD + YLL). Según el estudio GBD del 2016 la prevalencia de las infecciones por HTS era de 1.507 millones de personas, con un cómputo total de DALY de 2.946.000 años. Se ha observado que algunas de las afecciones que acompañan a los HTS, como infecciones de las vías respiratorias inferiores y enfermedades diarreicas, han disminuido en porcentaje de DALY totales desde el año 1990 al 2019, con valores de 8,7% y 7,3%, a un 3,8% y 3,2%, respectivamente (GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2017; GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators, 2020). Las estimaciones de las muertes anuales causadas por HTS varían ampliamente, desde 12.000 hasta 135.000 (Bethony et al., 2006).

Los HTS o geohelmintos son considerados como una amenaza mundial para la salud pública mientras persista la pobreza en el mundo, puesto que, aunque se encuentren mayormente en zonas tropicales y subtropicales, debido a la migración y a los viajes pueden movilizarse a zonas donde no son endémicas (Hotez et al., 2008; Caldrrer et al., 2022). De forma generalizada, cuando se hace alusión a nematodos intestinales parásitos de humanos, se piensa en *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, y las uncinarias (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*)

debido a su alta prevalencia (Buonfrate et al., 2015b; OMS, 2023). Sin embargo, aunque *Strongyloides stercoralis* comparte la transmisión por el suelo contaminado y se le considera como causa importante de morbilidad (Bethony et al., 2006; Feasey et al., 2010; Jourdan et al., 2018; Loukas et al., 2021), no se le incluye de forma habitual dentro del grupo de HTS. Además, se le suele subestimar a nivel mundial debido a su infradiagnóstico. El control de la morbilidad causada por *S. stercoralis* se ha añadido a los objetivos de la OMS para el 2030, en el marco de un ambicioso compromiso mundial donde se considera el tratamiento periódico a las personas que viven en situación de riesgo y en zonas endémicas como estrategia para su control, además de educar sobre salud e higiene y contar con sistemas adecuados de saneamiento (Feasey et al., 2010; OMS, 2020, 2022).

1.2. *Strongyloides stercoralis*

Strongyloides stercoralis es un nematodo parásito intestinal endémico de los trópicos y subtrópicos, donde las condiciones sanitarias deficientes u otros factores facilitan su transmisión a través del suelo contaminado fecalmente. Este parásito pertenece al phylum Nematoda, clase Secernentea, orden Rhabditida, familia Strongyloididae.

S. stercoralis es el principal agente causal de la estrongiloidosis en los seres humanos y es principalmente un parásito humano. Sin embargo, se han detectado infecciones con hembras parásitas en otros primates (chimpancés, monos, etc.) y perros domésticos (Olsen et al., 2009). Los gatos domésticos son susceptibles experimentalmente a las infecciones, aunque se desconoce si tienen un papel como reservorio natural (CDC, 2019).

Las especies más raras de *Strongyloides* que infectan a los humanos son las zoonóticas *S. fuelleborni* subespecie *fuelleborni* y *S. fuelleborni* subespecie *kellyi*. *S. fuelleborni* subespecie *fuelleborni*, se encuentra en primates no humanos como los macacos de cola larga (*Macaca fascicularis*) en todo el Viejo Mundo, registrándose la gran mayoría de las infecciones humanas en el África Subsahariana y algún caso esporádico en el sudeste asiático. *S. fuelleborni* subespecie *kellyi*, se sabe que sólo parasita a los humanos y se encuentra en Papúa Nueva Guinea, hasta el momento no se ha encontrado en ningún otro lugar (Nutman, 2017; CDC, 2019).

La estrongiloidosis se considera una enfermedad global emergente y constituye una de las helmintosis más desatendidas (Olsen et al., 2009).

1.2.1. Morfología

Strongyloides stercoralis tiene el ciclo de vida más complejo de todos los helmintos humanos con generaciones de vida libre o parasitaria. Inicialmente, se describirán las principales características morfológicas de los diversos estadios de vida del parásito (Figura 1).

Las hembras parásitas son vermes filiformes y casi transparentes de poco más de 2 mm de largo por 50 μm de diámetro (Figura 1A). La boca tiene forma hexagonal y está rodeada por seis papilas, presenta un esófago estrogiloide largo que ocupa el tercio anterior del cuerpo y, a continuación, un tubo largo y delgado que es el intestino, el cual termina en el ano cerca de la punta de la cola. El esófago está rodeado por el anillo nervioso. Hay dos canales excretores longitudinales que recorren la longitud del verme. Los dos úteros, que contienen una pequeña cantidad de huevos alineados en fila y ocupan la mayor parte del cuerpo del helminto, se observan paralelos al intestino y cada uno se abre hacia un oviducto que conduce a los ovarios. Cada útero se extiende, uno hacia adelante y el otro hacia atrás, a partir de la vulva, que es corta, y que se encuentra en la línea media ventral en el tercio posterior del cuerpo. Las hembras parásitas son partenogenéticas, no necesitando al macho para producir huevos fértiles (Grove, 1996; Ruano et al., 2005; Botero & Restrepo, 2012; Hernández-Castro, 2014; Buonfrate et al., 2023).

Los adultos de vida libre, machos y hembras, presentan una cutícula fina, transparente y con finas estrías. Las hembras, son siempre de mayor tamaño, aproximadamente 1 mm de longitud y 50-75 μm de diámetro (Figura 1B). Su extremo posterior es recto. El sistema reproductivo es similar al observado en la hembra parásita presentando hileras de numerosos huevos dentro del útero. Los machos miden 700 μm de longitud y 40-50 μm de diámetro (Figura 1C), presentan un testículo en el extremo anterior y en el extremo posterior presentan una cola puntiaguda que se dobla hacia adelante y le da al verme una “forma de J” con dos espículas copuladoras, que rodean la cloaca, y que se insertan en la hembra durante la cópula. Ambos especímenes de vida libre presentan un esófago típico rabditoide, seguido del intestino y luego el recto, que se abre en el ano cerca de la cola (Grove, 1996; Ruano et al., 2005; Hernández-Castro, 2014; Buonfrate et al., 2023).

Los huevos son elípticos, miden 50 - 55 μm de largo por 35 μm de diámetro y están recubiertos por una membrana delgada, transparente y algunas veces irregular debido al moco adherido a ellos. Los huevos que pueden presentar en su interior blastómeros o la larva de primer estadio (L1), son muy parecidos a los huevos de los ancilostómidos (Figura 1D). Los huevos son

expulsados y son morfológicamente indistinguibles entre los producidos por la hembra adulta partenogenética y los resultantes de la cópula entre el macho y hembra de vida libre. Embrionan rápidamente a larvas rabditoides por lo que su presencia en materia fecal es muy rara (Ruano et al., 2005; Botero & Restrepo, 2012; Hernández-Castro, 2014).

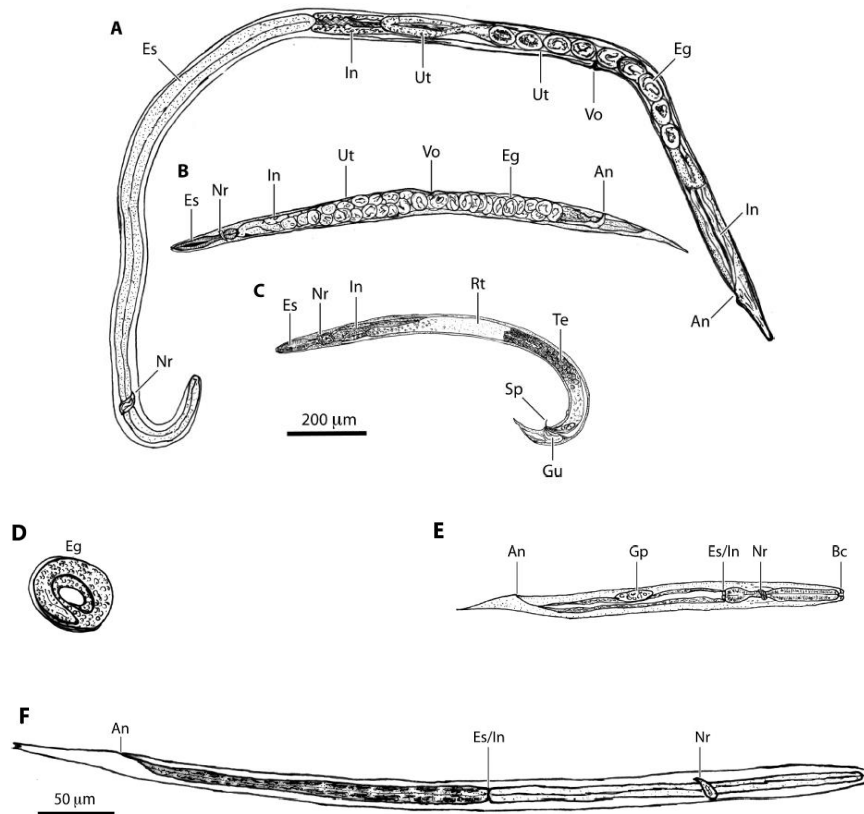


Figura 1. Características morfológicas de los distintos estadios evolutivos de *S. stercoralis*. A) Hembra parásita; B) Hembra de vida libre; C) Macho de vida libre; D) Huevo; E) Larva rabditoide L1; F) Larva filariforme con unión esófago-intestinal en la mitad del cuerpo mostrando extremo posterior que termina en muesca. An, ano; Eg, huevos; Es, esófago; In, intestino; Nr, anillo nervioso; Ut, útero; Vo, apertura vaginal; Rt, túbulo reproductivo; Sp, espícula; Te, testículo; Gu, gubernáculo; Gp, primordio genital; Es/In, unión esófago-intestinal; Bc, cavidad bucal (Buonfrate et al., 2023).

Las larvas L1 rabditoides miden entre 250 y 300 µm de longitud por 15 µm de diámetro; son móviles y son incapaces de invadir al hospedador a través de la mucosa o piel intacta. Se caracterizan por presentar un extremo anterior romo con una cápsula bucal corta, y un esófago típico rabditoide que continua en el intestino y desemboca en el ano, en su extremo posterior afilado (Figura 1E). Además, se puede observar un primordio genital nítido y muy desarrollado en forma de medialuna, en el lado ventral un poco posterior a la mitad del cuerpo; que lo diferencia de la larva de ancilostómidos (Hernández-Castro, 2014; González-Horna & Iglesias-Osores, 2017).

Las larvas L3i filariformes, que son el estadio infectivo de *S. stercoralis* (Figura 1F), miden de 500 a 700 µm de longitud por 15-16 µm de diámetro; son filiformes, alargadas, muy móviles y tienen capacidad invasiva. Se diferencian de las de ancilostómidos o uncinarias por tener el esófago estrongiloide más largo que se prolonga hasta la parte media del cuerpo, terminando en el extremo posterior bifurcado o en forma de muesca (Hernández-Castro, 2014; Page et al., 2018).

1.2.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Strongyloides stercoralis* (y *S. fuelleborni*) es complejo y único entre los nematodos infecciosos en el sentido de que las larvas que pasan a través de las heces pueden dar lugar a la generación tanto de vermes de vida libre como de vida parasitaria. Su ciclo comprende cuatro etapas larvianas seguidas de una etapa adulta de reproducción (Streit, 2008) (Figura 2). El ciclo de vida libre se denomina heterogónico y sirve como un mecanismo de diseminación que permite un mayor número de larvas infecciosas en el ambiente externo. La reproducción sexual ocurre exclusivamente en la etapa de vida libre (Streit, 2008; Nutman, 2017; Page et al., 2018).

A diferencia de otros geohelminths, en el hospedador sólo pueden encontrarse hembras adultas, cuya reproducción posterior se produce de forma asexual mediante partenogénesis (Streit, 2008). Las hembras partenogenéticas que se localizan en el intestino delgado producen hasta 40 huevos por día que no requieren fertilización de un macho, y son depositados en el epitelio intestinal donde eclosionan rápidamente liberando larvas L1 rabditoides, que se excretan en las heces. La detección de estas larvas L1 mediante microscopía es utilizada para el diagnóstico (Grove, 1996; Cox, 2002; Page et al., 2018; Czeresnia & Weiss, 2022). No se observan huevos de *S. stercoralis* en las heces, a no ser que se presenten cuadros diarreicos muy agudos (Ruano et al., 2005). En *S. fuelleborni*, a diferencia de *S. stercoralis*, se observan huevos en cadena con envoltura amorfa en el examen microscópico (Zerpa-Larrauri et al., 2014).

Inicialmente se consideraba que el modo de transmisión más probable era por ingestión de larvas filariformes, ya sea por consumo de agua o alimentos contaminados, o sexualmente, por contacto anal-oral (Sorvillo et al., 1983). Sin embargo, el descubrimiento de que la infección se produce a través de la piel fue realizado en 1902 por un médico belga, Paul Van Durme, quien demostró que las larvas filariformes de *Strongyloides* podían penetrar la piel intacta (Van Durme, 1902).

En el medio externo, en condiciones óptimas con una temperatura de 20 °C a 28 °C y alta humedad, condiciones que a menudo caracterizan las áreas endémicas tropicales y subtropicales, las larvas rabditoides pueden convertirse en larvas filariformes de tercer estadio (L3i), que son infecciosas y pueden sobrevivir en un ambiente adecuado hasta tres o cuatro semanas, mientras encuentran un nuevo hospedador, dando inicio a su ciclo biológico parasitario mediante la penetración a través de la piel intacta del hospedador (Buonfrate et al., 2023). Las larvas L3i pasan por el tejido celular subcutáneo, ingresan en un capilar venoso y migran a través del torrente sanguíneo hacia el lado derecho del corazón siendo transportadas a los pulmones, atravesando sus capilares y alveolos. Durante este proceso sufren una muda a larvas L4. Ascenden por el árbol bronquial superior hasta llegar a la tráquea, laringe y faringe, para ser deglutidas y llegar al tracto gastrointestinal donde alcanzan la madurez y, finalmente, se establecen como hembras adultas en el intestino delgado, encontrándose en los túneles de la submucosa del duodeno, yeyuno e íleon, representando el ciclo directo u homogónico.

Alternativamente, las larvas rabditoides pueden desarrollarse en el medio externo alimentándose de bacterias del suelo hasta convertirse en larvas L3 morfológicamente distintas y no infecciosas, que se convierten en larvas de cuarto estadio de vida libre, y finalmente en nematodos adultos de vida libre, hembras y machos (es decir, dioicos) que se alimentan de materia orgánica y solamente viven de 2 a 4 días, representando el ciclo indirecto o heterogónico. Por lo general, la progenie de los adultos de vida libre se convierte en larvas L3 infecciosas (L3i) y deben encontrar un hospedador en el que continuar el ciclo de vida parasitario (Cox, 2002; Ruano et al., 2005; Streit, 2008; Nutman, 2017; Page et al., 2018; Czeresnia & Weiss, 2022).

Las hembras parásitas excavan en el revestimiento del intestino donde los huevos fértiles eclosionan en las criptas de Lieberkühn de la mucosa intestinal, liberando las larvas L1 que serán excretadas. Ocasionalmente, en personas con un bajo tránsito intestinal, las larvas rabditoides pueden transformarse a larvas filariformes sin salir del intestino y pueden penetrar la mucosa colónica iniciando el ciclo de autoinfección endógena; o pueden reinfectar al hospedador a través de la piel, en aquellos pacientes con higiene muy deficitaria y en los que se produce contaminación fecal del margen perianal durante períodos prolongados. En este caso las larvas rabditoides alcanzan la etapa infectante en dicha zona y penetran en el hospedador de nuevo, causando irritación local y dando inicio al ciclo de autoinfección exógena (Hernández-Chavarría, 2001; Nutman, 2017; Page et al., 2018; Loukas et al., 2021; Czeresnia & Weiss, 2022).

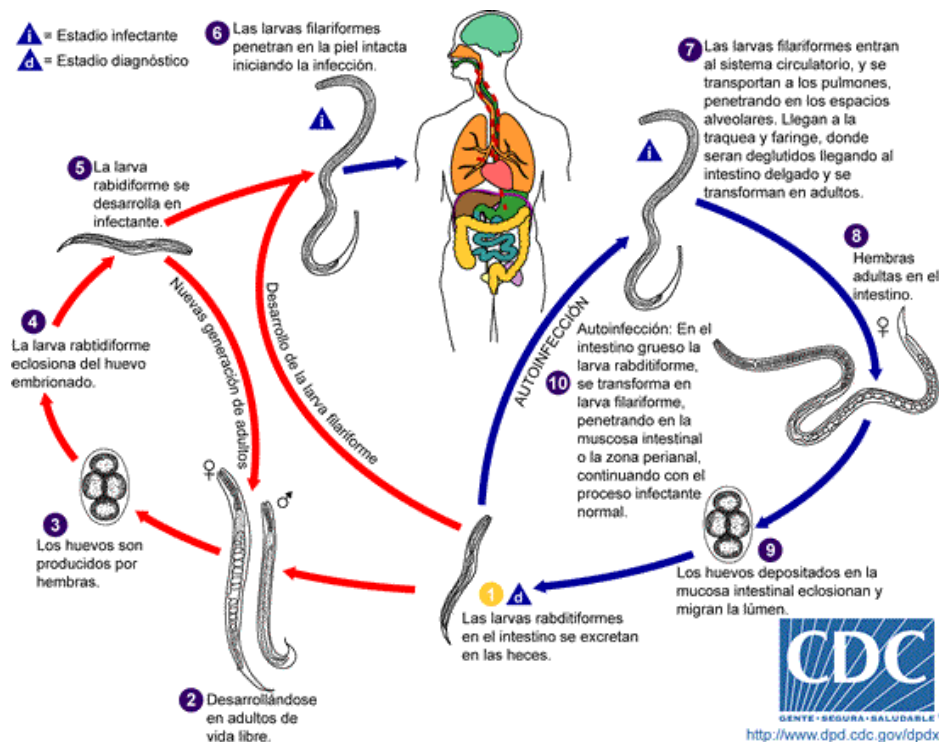


Figura 2. Ciclo de vida de *Strongyloides stercoralis* (CDC, 2019).

Cuando el ciclo de autoinfección escapa al control del hospedador, lo que ocurre con mayor frecuencia en situaciones con algún grado de inmunosupresión, puede producirse una autoinfección endógena con grandes cargas de parásitos y migración larvaria (Grove, 1996; Cox, 2002; Nutman, 2017). La autoinfección por *S. stercoralis* da como resultado la cronicidad de la enfermedad que en algunos casos persiste hasta por varias décadas. El caso de mayor cronicidad documentado hasta la fecha ha sido en una mujer de 74 años, con antecedentes desde la infancia de erupciones cutáneas y problemas gastrointestinales, la cual fue diagnosticada con eosinofilia periférica y posteriormente relacionada con la infección crónica por este parásito cuyo ciclo biológico explica que la infección persistiera durante 65 años (Leighton & Macsween, 1990).

1.3. Estrongiloidosis

La estrongiloidosis humana es una enfermedad causada principalmente por la infección por *Strongyloides stercoralis* y en menor medida por *S. fuelleborni* (Cox, 2002; Janwan et al., 2020). El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta (EE. UU.) menciona otras especies de *Strongyloides*, parásitas de animales, *S. myopotami* (nutria), *S. procyonis* (mapaches), y posiblemente otras más, como causantes de infecciones cutáneas leves y de corta

duración en humanos (larva *currens*), pero no llegan a producir estrongiloidosis verdadera (CDC, 2019).

Las infecciones por *S. stercoralis* en humanos se presentan bajo un amplio espectro clínico que varía desde infecciones agudas a crónicas, y desde infecciones asintomáticas o leves, hasta estrongiloidosis con la multiplicación incontrolada del parásito y/o diseminación de larvas por todo el organismo, potencialmente mortal en pacientes inmunocomprometidos, con unas tasas de mortalidad de hasta el 85% (Mejia & Nutman, 2012; Vásquez-Ríos et al., 2019).

1.3.1. Epidemiología

La estrongiloidosis es un importante problema de salud, ya que es endémica en todos los países tropicales y subtropicales del Sudeste de Asia, África subsahariana, América Central y del Sur, especialmente en aquellos con bajos recursos, infraestructuras en desarrollo y condiciones sanitarias deficientes (Figura 3) (Buonfrate et al., 2020; Kridaningsih et al., 2020; Czeresnia & Weiss, 2022); asimismo, la enfermedad no es exclusiva de estos países y está presente en naciones con rentas más altas como los Estados Unidos de América, Australia y España (Beknazarova et al., 2016a).

Según datos de la OMS de 2022, se calcula que hay más de 600 millones de personas infectadas con *S. stercoralis* en todo el mundo (OMS, 2022), siendo considerada como una NTD de gran relevancia. A pesar de estos datos, se sospecha que la prevalencia global de estrongiloidosis podría estar subestimada debido a varias causas, una de ellas sería que la mayoría de los estudios epidemiológicos se basan en pruebas de diagnóstico de rutina como el examen coproparasitológico directo para la detección de larvas, la cual es una técnica con baja sensibilidad (Hernández-Chavarría, 2001; Buonfrate et al., 2015b). Otra causa sería la presencia de síntomas inespecíficos y leves en los pacientes, donde el parásito puede causar autoinfección asintomática durante décadas. Y faltaría añadir que quedan muchos lugares potencialmente endémicos sin incluir en los estudios y por tanto sin datos disponibles (Figura 3).

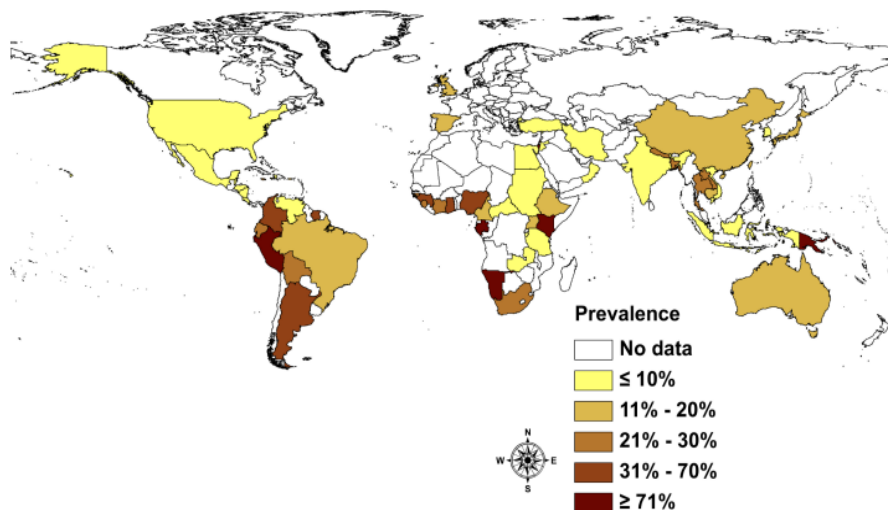


Figura 3. Prevalencia de la infección por *Strongyloides stercoralis* basado en estudios comunitarios realizados en cada país (Schär et al., 2013).

En algunos estudios de prevalencia realizados en América Latina, en áreas de presumible alta endemividad, como Venezuela y Brasil, se presentan prevalencias de menos del 20%, probablemente porque la mayoría de los estudios se basaron en el examen coproparasitológico directo (Buonfrate et al., 2015b). En estudios de prevalencia en Asia, se ha informado de una prevalencia superior al 40% en las islas del río Mekong, al sur de Laos, al emplear para el diagnóstico la técnica de concentración de Baermann, que se emplea para mejorar la sensibilidad del diagnóstico (Vonghachack et al., 2015). Con la aplicación de técnicas moleculares de PCR a tiempo real, se obtuvo una prevalencia de más del 30% en Papúa, Indonesia, superando la de cualquiera de los tres principales HTS (*A. lumbricoides*: 23,9%; *T. trichiura*: 18,4%; y ancilostómidos 17,2%) (Kridaningsih et al., 2020).

A pesar de que la infección por *S. stercoralis* afecta a una proporción importante de la población mundial la mayoría de los casos descritos de estrongiloidosis grave y generalmente mortal se notifican en países no endémicos. Esto no significa que estos casos letales no ocurran en zonas endémicas, sino que casi con total seguridad, la mayoría de las muertes causadas por este parásito simplemente pasan desapercibidas y quedan sin diagnosticar (Buonfrate et al. 2013; Belhassen-García et al., 2017; Buonfrate et al., 2020).

Como ya se ha comentado anteriormente, se notifican casos de infección en países de rentas más altas (Figura 3) (Martínez-Vázquez et al., 2003; Valerio et al., 2013; Beknazarova et al., 2016a). En EE. UU. y Europa la mayoría de los casos notificados se consideran importados desde zonas endémicas y asociados al aumento de los viajes y las migraciones humanas (Pacheco-

Tenza et al., 2016). La estrongiloidosis es un desafío de salud pública actual y universal como enfermedad importada, ya que es extremadamente más frecuente en refugiados e inmigrantes que en viajeros, con tasas de infección superiores al 75% (Buonfrate et al., 2012; Beknazarova et al., 2016a; Eslahi et al., 2021).

Por otro lado, y continuando con los países industrializados, se han registrado casos autóctonos, asociados a microfocos de transmisión, en algunas áreas restringidas de la Unión Europea (UE), como el norte de Italia, la Rumania rural o el sureste de España y en áreas rurales de la región de los Apalaches de los Estados Unidos (Genta, 1989; Magnaval et al., 2000; Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007). Sin embargo, los casos adquiridos endémicamente siguen sin ser diagnosticados en su totalidad por falta de sospecha clínica (Beknazarova et al., 2016a; Belhassen-García et al., 2017).

En España, se han realizado estudios tanto de casos importados asociados a inmigrantes (Valerio et al., 2013) como de casos autóctonos (Pérez-Valdés, 1895; Sanchis-Bayarri Vaillant et al., 1981) para tener un conocimiento epidemiológico de la enfermedad (Pacheco-Tenza et al., 2016; Barroso et al., 2019). La detección de casos importados por viajes a regiones endémicas con sospecha de infección, es un aspecto clave para el éxito en el diagnóstico, manejo y tratamiento de la enfermedad. Por lo tanto, el conocimiento de la distribución mundial de las zonas endémicas de la enfermedad tiene una importancia considerable (Genta, 1989; Barroso et al., 2019). En el área Metropolitana Norte de Barcelona (España), se realizó un estudio prospectivo entre 2003 y 2012 que encontró setenta casos de estrongiloidosis, de los cuales, los inmigrantes representaron hasta el 90% de los casos, por lo que a la luz de estos resultados los sistemas de vigilancia y programas de diagnóstico deberían centrarse en esta población, ya que la mayoría son asintomáticos y aumentan inevitablemente el número de portadores de la enfermedad (Valerio et al., 2013; Belhassen-García et al., 2017).

Por otro lado, aunque se espera que en España sean menos prevalentes, continúa siendo importante el diagnóstico de los casos autóctonos que pueden pasar años sin manifestaciones clínicas, pero con el riesgo de derivar a un síndrome de hiperinfección (Martínez-Vázquez et al., 2003). En este sentido, en la Comarca de La Safor de la provincia de Valencia, se registró el primer caso de estrongiloidosis autóctona española en 1895 y la primera muerte registrada asociada a la enfermedad grave en 1981 (Pérez-Valdés, 1895; Sanchis-Bayarri Vaillant et al., 1981). En 2003, se realizó un estudio de prevalencia en Gandía, capital de dicha comarca, obteniéndose un 12,4% de casos positivos. Con ello, se consideró a esta región del Mediterráneo como una zona endémica de *S. stercoralis* principalmente entre los agricultores (Román-Sánchez

et al., 2001, 2003). Los factores de riesgo asociados a los casos autóctonos resultaron ser las actividades agrícolas, principalmente asociadas al cultivo de arroz y la limpieza de acequias (sin botas de protección), y la edad avanzada (Román-Sánchez et al., 2001, 2003; Alcaraz et al., 2004; Barroso et al., 2019). Continuando con la Comunidad Valenciana, en la provincia de Alicante, estudios retrospectivos registraron un número reducido de casos autóctonos en la región de la Vega Baja, presentando todos ellos síntomas, pero pocos graves. En estos estudios, los factores de riesgo detectados fueron, de nuevo, la actividad agrícola y la edad avanzada, y se añadió el género masculino (Pacheco-Tenza et al., 2016; Dato et al., 2020).

En una revisión del 2019 sobre la situación de la estrongiloidosis en España, realizado por Barroso y colaboradores, se constató que el 97% de los casos autóctonos se dieron en la provincia de Valencia. Entre los motivos que justificarían esta localización estarían el clima de Valencia, puesto que presenta la combinación perfecta de temperatura y humedad, una extensa actividad agrícola y, además, las infraestructuras y las condiciones higiénicas deficientes propias de las zonas rurales durante los años 60 (falta de agua potable y sanitarios en algunas viviendas). A estos motivos cabría añadir que los profesionales de la salud en Valencia probablemente tienen un mayor conocimiento de la epidemiología y diagnóstico del parásito, mayor sospecha y, por ende, mayor número de casos detectados (Barroso et al., 2019). Para concluir, como los datos sobre los casos autóctonos de infección por *S. stercoralis* en España son escasos y se han obtenido sobre un área geográfica y de población muy concreta, se debe considerar al país como “no endémico” de estrongiloidosis (Martínez-Pérez & López-Vélez, 2015).

1.3.2. Cuadro clínico

La estrongiloidosis puede ser asintomática, forma más común en personas inmunocompetentes, o presentarse, según la fase aguda o crónica de la enfermedad, bajo un amplio espectro de manifestaciones clínicas, e incluso llegar hasta casos complicados de hiperinfección o estrongiloidosis diseminada, con síntomas exacerbados que afectan no sólo al sistema respiratorio y gastrointestinal, sino a otros sistemas, llegando a resultar mortales (Grove, 1996; Vadlamudi et al., 2006).

1.3.2.1. Estrongiloidosis aguda

Las primeras manifestaciones clínicas de la estrongiloidosis aguda se producen poco después de la penetración transcutánea de la larva filariforme (L3i) en el hospedador y están asociadas con la ruta de migración de las larvas (Nutman, 2017). Normalmente pasa inadvertida, aunque

puede desarrollarse casi inmediatamente una reacción local cutánea, denominada larva *currens* (5 a 10 cm/h) y patognomónica de esta parasitosis, antes de ingresar en la circulación (Grove, 1996; Keiser & Nutman, 2004; Ruano et al., 2005). Las larvas L3i migran rápidamente a través del tejido subcutáneo provocando una erupción urticariforme, serpiginosa y migratoria más frecuentemente en la parte inferior del tronco, las ingles y las nalgas (Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007; Nutman, 2017). El proceso de migración en busca de la circulación, es facilitado por proteasas liberadas por la larva, las cuales degradan la matriz extracelular del hospedador (Grove, 1996; Hernández-Castro, 2014). Como consecuencia de la migración de las larvas, en los primeros días postinfección, desde la circulación pulmonar hacia las cavidades del árbol bronquial aparecen las primeras manifestaciones respiratorias. El paso de las larvas hasta la tráquea, para acceder al tubo digestivo de camino hacia el intestino, provoca perforación en el endotelio capilar y en la pared de los alveolos pulmonares, produciendo síntomas respiratorios conocidos como el Síndrome de Loëffler; se trata de una neumonitis con pequeñas hemorragias, exudados, infiltrados alveolares difusos en las imágenes de tórax, eosinofilia periférica de carácter benigno y, casi siempre, subclínico. Otras manifestaciones respiratorias son tos, disnea, sibilancias y asma, que pueden estar asociadas a otros procesos subyacentes (Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007; Caumes & Keystone, 2011; Alabi et al., 2017; Czeresnia & Weiss, 2022).

Por otro lado, los síntomas gastrointestinales, por la presencia y reproducción de las hembras, comienzan aproximadamente 2 semanas después de la infección; las larvas L1 se detectan en las heces después de 3 a 4 semanas tras completarse el ciclo. En esta fase, se informa de manifestaciones inespecíficas como acidez de estómago, hinchazón, dolor abdominal leve, estreñimiento o diarrea intermitente, de leve a grave, y síndrome de malabsorción asociada a un mal estado general con debilidad y pérdida de peso (Keiser & Nutman, 2004; Ruano et al., 2005; Czeresnia & Weiss, 2022).

Las manifestaciones iniciales no son específicas de la enfermedad, por lo que a menudo no se diagnostica correctamente y el hospedador no recibe tratamiento, lo que conduce a un estado crónico de la enfermedad (Vadlamudi et al., 2006).

1.3.2.2. Estrongiloidosis crónica

Las infecciones crónicas se caracterizan por el establecimiento a largo plazo del parásito en el hospedador (Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007) y la repetición ininterrumpida del ciclo de vida, pudiendo provocar de nuevo los síntomas cutáneos, gastrointestinales o pulmonares

descritos para la fase aguda y que, en general, son inespecíficos e irregulares (Siddiqui & Berk, 2001). Así mismo, se han asociado manifestaciones inusuales como artritis, malabsorción crónica, síndrome nefrótico, obstrucción duodenal, lesiones hepáticas focales y asma recurrente en los casos crónicos (Czeresnia & Weiss, 2022). La mayoría de los pacientes crónicos permanecen asintomáticos durante años, siendo la eosinofilia, la única manifestación de la enfermedad, la cual es con frecuencia el signo que orienta hacia el diagnóstico, y que ocurre entre el 75% y 82% de los casos (Ruano et al., 2005; Vadlamudi et al., 2006; Rasul et al., 2021). Por ello, se debe considerar a *S. stercoralis* en el diagnóstico diferencial, con mayor frecuencia en viajeros e inmigrantes de áreas endémicas, durante el estudio de la eosinofilia periférica crónica (Czeresnia & Weiss, 2022).

1.3.2.3. *Estrongiloidosis grave*

Es conocido que los mecanismos efectores de la inmunidad celular del hospedador y la biología intrínseca del parásito sirven para regular la densidad poblacional de parásitos adultos en el intestino. En caso de una disminución en la capacidad inmunitaria del hospedador, incluso una hembra adulta puede multiplicarse rápidamente por partenogénesis, lo que llevaría a una infección masiva (Nutman, 2017).

La forma grave de la estrongiloidosis se produce en individuos inmunocomprometidos, en los que el ciclo de autoinfección se da de forma descontrolada provocando una hiperinfección; la carga de helmintos aumenta enormemente y son detectables en regiones extraintestinales, especialmente a su paso por los pulmones. Otra forma grave de la enfermedad es la estrongiloidosis diseminada, que se refiere a infecciones masivas en las que los helmintos acceden a sitios ectópicos, como por ejemplo el cerebro (Siddiqui & Berk, 2001; Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007). Las manifestaciones de estas infecciones graves son muy variadas y dependen de la intensidad de la infección y de los órganos afectados, así como de la presencia o ausencia de infecciones bacterianas secundarias (Grove, 1996).

Normalmente, la infección grave por *S. stercoralis* se asocia a factores de riesgo como los tratamientos inmunosupresores, ciertas neoplasias malignas, infección por Virus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1 (HTLV-1), infección por VIH, hipogammaglobulinemia, alcoholismo y desnutrición (Teixeira et al., 2016; Barroso et al., 2019). Además, cabe destacar la importancia del tratamiento con corticoides como factor desencadenante de la hiperinfección, por un lado, a altas dosis, tienen efectos negativos sobre las células inmunitarias, lo que produce una disminución de los eosinófilos circulantes y, por otro lado, algunos autores sugieren que pueden

actuar directamente sobre los parásitos, al incrementar la producción de la hormona ecdisona, hormona parasitaria que aceleraría la transformación de larvas rabditoides a filariformes que iniciarían nuevos ciclos de autoinfección (Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007).

El síndrome de hiperinfección describe la manifestación clínica que ocurre en situaciones de inmunosupresión por parte del hospedador, cuando las larvas L1 rabditoides de *S. stercoralis* mudan rápidamente a larvas L3 filariformes promoviendo una aceleración en el proceso de autoinfección y conduciendo a sepsis sistémica, fallo multiorgánico y muerte en el 87% de los casos (Siddiqui & Berk, 2001; Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007; Karanam et al., 2021). En la hiperinfección se produce una mayor carga larvaria, pero estas larvas están confinadas en las localizaciones propias del ciclo, intestino, pulmón y piel (Loukas et al., 2021). Incluso podría considerarse una manifestación de hiperinfección la observación en heces y/o esputo de un gran número de larvas, rabditoides y filariformes y, ocasionalmente, hembras partenogenéticas y huevos (Siddiqui & Berk, 2001; Keiser & Nutman, 2004; Rivero et al., 2007).

Las manifestaciones gastrointestinales son las más comunes, desde el dolor abdominal hasta hemorragias gastrointestinales con presencia de sangre en las heces (Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007). Es frecuente la presencia de úlceras en la mucosa del intestino delgado, incluso desde el esófago hasta el recto y, además, el apéndice también puede verse invadido por las larvas (Keiser & Nutman, 2004; Eslahi et al., 2021). Dichas úlceras, pueden favorecer el acceso de las bacterias entéricas al torrente sanguíneo y, de ahí, a cualquier órgano, provocando neumonía, meningitis, infección bacteriana diseminada y, en el peor de los casos, septicemia, lo que sería causa inmediata de muerte (Siddiqui & Berk, 2001; Keiser & Nutman, 2004; Botero & Restrepo, 2012). Se ha observado que algunas bacterias comensales intestinales aumentan la gravedad del síndrome hasta en un 60% (Eslahi et al., 2021); de hecho, es bastante frecuente aislar bacterias entéricas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter koseri*) en hemocultivos de muestras de esputo en casos de hiperinfección (Basile et al., 2010; Nabeya et al., 2017; Vázquez-Ríos et al., 2019). De igual manera, las infecciones pulmonares pueden ser asintomáticas, o dar síntomas que varían desde tos hasta hemoptisis (Pinilla-Roa & López-Páez, 2011). Las manifestaciones dermatológicas (larva *currens*) en la parte inferior del tronco, las ingles y las nalgas acompañan con frecuencia a la hiperinfección (Ly et al., 2003; Basile et al., 2010).

La estrongiloidosis diseminada a menudo ocurre después del síndrome de hiperinfección, aunque no es imprescindible. En individuos inmunodeficientes, como en pacientes con el HTLV-1, los estadios larvarios presentan la peculiaridad de que, además de afectar a los tractos propios

de la autoinfección, también pueden invadir otros órganos volviéndose ectópicos en varias partes del cuerpo. Estos incluyen los ganglios linfáticos mesentéricos, la vesícula biliar, el hígado, el tracto urinario, el diafragma, el corazón, el páncreas, el músculo esquelético, los riñones, los ovarios y el sistema nervioso central (Keiser & Nutman, 2004; Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007). En la infección ectópica, la tasa de mortalidad es del 100% sin tratamiento (Eslahi et al., 2021). En muchos casos, la diseminación no es fácilmente demostrable y sólo se constata con estudios anatomopatológicos (Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007). En estudios de autopsias se ha documentado la diseminación de larvas de *S. stercoralis* a varios órganos, incluidos los riñones (Keiser & Nutman, 2004), el parénquima hepático (Keiser & Nutman, 2004; Vásquez-Ríos et al., 2019), la vesícula biliar (Basile et al., 2010), y el líquido y tejido pericárdicos (Lai et al., 2002).

Del mismo modo que en los casos de hiperinfección, en la infección diseminada, se ha descrito el transporte de bacterias entéricas hacia el torrente sanguíneo, lo que provoca bacteriemia, neumonía y meningitis. Se ha observado en pacientes con meningitis, larvas en muestras de líquido cefalorraquídeo, además, el cultivo de dicho líquido suele ser positivo para bacterias como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus bovis*, entre otros. Inevitablemente, una vez que las larvas llegan al sistema nervioso central, el desenlace es fatal (Keiser & Nutman, 2004; Vásquez-Ríos et al., 2019).

Tanto el síndrome de hiperinfección como la estrongiloidosis diseminada son comunes en pacientes que han recibido un trasplante de órganos, llegando a ser fatales (Kim et al., 2016; Loukas et al., 2021). La mayoría de los casos de estrongiloidosis grave después de un trasplante de órganos está relacionada con la reactivación de una infección latente por el tratamiento inmunosupresor que acompaña al trasplantado; o por recibir aloinjertos de donantes infectados, principalmente renales y pancreáticos (Hoy et al., 1981; Hamilton et al., 2011; Weiser et al., 2011; Galiano et al., 2016b; Kim et al., 2016).

El Síndrome Respiratorio Agudo Severo (COVID-19) ocasionado por el coronavirus SARS-CoV-2 se ha relacionado con el síndrome de hiperinfección o enfermedad diseminada por *S. stercoralis*, al emplear el uso de altas dosis de corticosteroides provocando la reactivación del parásito en casos de infección crónica no diagnosticada con desenlace potencialmente mortal (Buonfrate et al., 2013; Kim & Sivasubramanian, 2022; Seeger et al., 2023).

La ivermectina es el fármaco de elección en el tratamiento de la estrongiloidosis y se consideró como un posible tratamiento para COVID-19. Sin embargo, no se ha demostrado que sea eficaz

por lo que no se recomienda su uso. Curiosamente en muchos países de América Latina, región con alta prevalencia de *S. stercoralis*, implementaron el uso masivo de ivermectina como tratamiento para COVID-19 a pesar de que no se había demostrado su efectividad (Mega, 2020). El uso a gran escala de ivermectina para COVID-19 pudo haber tratado inadvertidamente a muchos pacientes con estrongiloidosis crónica y también pudo haber prevenido casos de hiperinfección en estas zonas endémicas.

En casos de alcoholismo crónico, de más de 20 años, se han descrito casos de hiperinfección sin clínica gastrointestinal ni pulmonar, solo con anemia intensa y discreta eosinofilia (Teixeira et al., 2010). La inmunidad pudo verse afectada debido a que en los alcohólicos los niveles de cortisol endógeno están aumentados, lo que conlleva a una deficiencia en la respuesta protectora por parte de los linfocitos cooperadores o *helper* de tipo 2 (Th2), y que también esta hormona imita a la ecdisona, que como ya se ha comentado estimula la evolución de las larvas rabditoides a filariformes (Teixeira et al., 2016; Vásquez-Ríos et al., 2019).

1.3.3. Diagnóstico de la estrongiloidosis

Se debe sospechar de estrongiloidosis si hay signos y síntomas clínicos de la enfermedad, eosinofilia o hallazgos serológicos sugestivos (Siddiqui & Berk, 2001). El diagnóstico de la enfermedad se suele retrasar debido a la presencia de casos subclínicos o con sintomatología inespecífica, la carga parasitaria generalmente baja y con eliminación irregular de larvas en casos crónicos, y, por último, la falta de una prueba de diagnóstico *gold standard* (Eslahi et al., 2021).

El diagnóstico de *S. stercoralis* sigue haciéndose fundamentalmente por la observación de las larvas en las heces del paciente; no obstante, se han desarrollado métodos serológicos y moleculares para la detección de este nematodo (Hernández-Chavarría, 2001). La eosinofilia, presente en la mayoría de los casos excepto en pacientes inmunosuprimidos, suele ser el único indicio de la presencia de infección por *S. stercoralis*, pero no es específica de la enfermedad (Siddiqui & Berk, 2001).

1.3.3.1. Métodos parasitológicos

El diagnóstico de confirmación se establece al detectar larvas rabditoides de *S. stercoralis* mediante el examen microscópico de muestras fecales y/o fluido duodenal (Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007). Existen diferentes procedimientos para favorecer la detección de larvas en muestras fecales, mediante microscopía (examen directo con solución salina y lugol,

sedimentación con formalina-acetato de etilo y el método de concentración de Baermann) y mediante cultivo (cultivo con papel de filtro Harada-Mori y cultivo en placa de agar nutritivo) (Siddiqui & Berk, 2001).

El examen directo de heces al microscopio es la técnica más sencilla para la detección de *S. stercoralis*, se trata de tomar una pequeña muestra directa de las heces y añadirle solución salina o lugol (Figura 4A), pero presenta una sensibilidad especialmente baja (Ruano et al., 2005; Requena-Méndez et al., 2013). La principal ventaja de esta técnica es la facilidad en la obtención de la muestra, pero es frecuente obtener resultados falsos negativos, ya que se examina una pequeña cantidad de heces, por lo que se recomienda examinar varias muestras recogidas en días alternos. Las larvas pueden detectarse ocasionalmente mediante esta técnica, cuando la producción larvaria es particularmente alta (Bisoffi et al., 2013; Buonfrate et al., 2015a). Los métodos de concentración de heces antes del análisis microscópico permiten mejorar el rendimiento diagnóstico, aunque no se utilizan de forma rutinaria. Una posible técnica de concentración es la sedimentación espontánea en tubos (Tello et al., 2012), con la que se observa una mejoría en la detección del parásito frente al examen directo. Los métodos de concentración de heces más empleados son los de sedimentación con formalina-acetato de etilo, y los de migración larvaria (Siddiqui & Berk, 2001; Buonfrate et al., 2015a). Estos últimos están basados en la capacidad migratoria de las larvas rabditoides cuando las heces frescas son introducidas en un medio líquido (método de Baermann o técnica Harada-Mori) o sólido (agar enriquecido) (Ruano et al., 2005; Fernández-Rivas et al., 2019).

En cuanto a los métodos de cultivo de heces, el cultivo en agar se basa en la migración de la larva rabditoide fuera de la materia fecal, desplazándose hacia el agua que le rodea, o hacia la superficie del agar. A medida que las larvas móviles se arrastran sobre el agar, dejan surcos serpiginosos del crecimiento bacteriano sobre la superficie, creando huellas visibles (Figura 4B) (Keiser & Nutman, 2004; Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007; Silva-Díaz, 2018; Fernández-Rivas et al., 2019). Aunque el método de la placa de agar es laborioso y requiere mucho tiempo, es un método de elección sobre otros procedimientos debido a su alta sensibilidad (Siddiqui & Berk, 2001). En trabajos comparativos se demostró que esta técnica presentaba el mejor rendimiento diagnóstico, con una sensibilidad superior al 95% (Ruano et al., 2005).

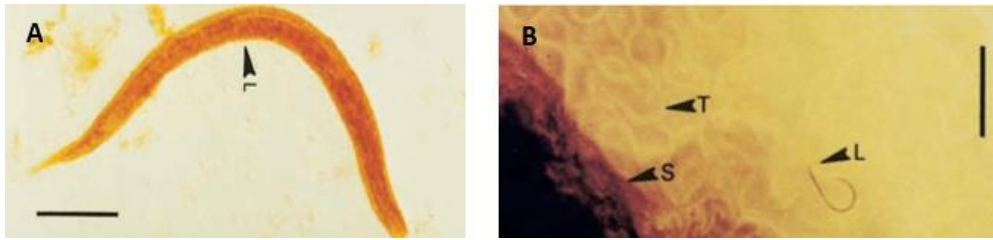


Figura 4. Diagnóstico por métodos parasitológicos. A) Larva rabditoide en examen de heces teñidas con lugol, procedimiento más utilizado en los laboratorios de microbiología clínica. Barra de escala = 25 µm. B) Método de cultivo en placa de agar. Huellas o surcos característicos (T) dejados por las larvas rabditoides (L) en el agar alrededor de la muestra de heces (S). Barra de escala = 250 µm (Siddiqui & Berk, 2001).

En infecciones crónicas por *S. stercoralis*, la sensibilidad de las técnicas basadas en microscopía óptica no es suficientemente buena, debido a que la excreción de larvas en esta etapa es escasa e irregular (Barroso et al., 2019). Sin embargo, en pacientes con hiperinfección, el diagnóstico parasitológico resulta ser más fácil, y un solo examen microscópico de heces y, usualmente de esputo, suele ser suficiente para descubrir larvas, en muchos casos filariformes (Siddiqui & Berk, 2001; Vásquez-Ríos et al., 2019).

1.3.3.2. Métodos inmunológicos

Es importante tener en cuenta que la falta de detección de larvas en un examen de heces no indica necesariamente la ausencia de la infección. Por lo tanto, existe la necesidad de contar con una prueba de serodiagnóstico altamente específica y eficiente para *S. stercoralis*, que tenga el potencial de usarse para el diagnóstico de casos crónicos, focos ectópicos, y que además resulte discriminatoria en casos de coinfecciones con otros helmintos como suele ocurrir en zonas tropicales y subtropicales (Siddiqui & Berk, 2001).

Las técnicas serológicas se consideran como una herramienta útil para detectar la infección por *Strongyloides*; sin embargo, su eficiencia diagnóstica es difícil de calcular debido a la ausencia de un método parasitológico de referencia con el que comparar resultados. Además, la detección de anticuerpos podría sobreestimar la prevalencia de la enfermedad debido a la reactividad cruzada con otras infecciones por helmintos y a la dificultad para distinguir entre infecciones actuales y pasadas (Siddiqui & Berk, 2001; Barroso et al., 2019). En estudios poblacionales, se cree que el examen de heces generalmente subestima la prevalencia de estrongiloidosis, mientras que los exámenes serológicos la sobreestiman (Buonfrate et al., 2015a).

La serología se puede utilizar para detectar infecciones crónicas por *S. stercoralis* asintomáticas (Czeresnia & Weiss, 2022) que, en caso de ser positiva, estimula a una búsqueda del parásito utilizando otros métodos (Siddiqui & Berk, 2001). En España, la serología se considera como una herramienta de diagnóstico muy útil en casos autóctonos, ya que es difícil encontrar coinfecciones con otras parasitosis, y se podría emplear como método de cribado, dada la baja sensibilidad de las técnicas parasitológicas convencionales (Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007).

Los ensayos de *ELISA* que se han desarrollado hasta la fecha para diagnosticar la estrongiloidosis utilizan distintos antígenos crudos y purificados a partir de larvas de *S. stercoralis*, *S. ratti* y *S. venezuelensis*. Existen pruebas comerciales disponibles como las de Bordier Affinity Products S.A. en Suiza e IVD Research Inc. en EE. UU., que utilizan antígenos larvarios somáticos de *S. ratti* y *S. stercoralis*, con una sensibilidad del 90% y 89%, y especificidad del 96% y 97,2%, respectivamente (Van Doorn et al., 2007). Estas pruebas de determinación de anticuerpos muestran reactividad cruzada con otras helmintosis altamente prevalentes como filariosis, ascariosis y esquistosomosis. Esta falta de especificidad ha sido considerada la principal limitación en su aplicación al diagnóstico en inmigrantes recién llegados (Gam et al., 1987; Grove, 1996; Siddiqui & Berk, 2001; Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007). Además, hay que añadir los casos falsos positivos como resultado de la persistencia de los anticuerpos durante años y los resultados falsos negativos entre pacientes inmunocomprometidos (Eslahi et al., 2021). En España, el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) considerado como Centro de Referencia Nacional, emplea para el diagnóstico de la estrongiloidosis el kit comercial *Strongyloides* IgG *ELISA* (DRG International Inc., EE. UU.). Se trata de un inmunoensayo enzimático cualitativo para la detección de anticuerpos contra *Strongyloides* en muestras de suero o plasma humano, utilizando antígeno total de la larva L3i de *Strongyloides* spp. Este kit tiene una sensibilidad del 89% y una especificidad del 70%, por lo que presenta limitaciones en casos de coinfecciones. Todas estas pruebas de *ELISA*, basadas en antígenos crudos, requieren un suministro constante de larvas filariformes recolectadas de las heces de animales infectados experimentalmente con un ciclo mantenido en ratas, lo que hace que el proceso sea laborioso, costoso y requiera de mucho tiempo, por lo que tiene una disponibilidad limitada (Krolewiecki et al., 2010; Requena-Méndez et al., 2013).

Para incrementar la especificidad y sensibilidad de las técnicas serológicas y evitar la utilización de las larvas como fuente de antígenos, se ha utilizado un antígeno recombinante denominado NIE de 31 kDa para desarrollar una prueba *ELISA* (NIE-*ELISA*) con unos resultados prometedores

en cuanto a sensibilidad (70,8%) y a especificidad (91,1%) (Ravi et al., 2002; Buonfrate et al., 2015a). La incorporación de otras proteínas recombinantes de *S. stercoralis* en formato multiplex podría aumentar aún más la precisión de este método (Buonfrate et al., 2015a). De ahí la importancia de seguir buscando nuevos antígenos candidatos.

En este contexto, trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación, identificaron y caracterizaron proteínas, a partir del transcriptoma de la larva L3i de *S. stercoralis*, que podrían resultar dianas diagnósticas y que, además, no presentarían un alto grado de homología con las de otros helmintos parásitos. Se realizaron ensayos de *ELISA* indirecto utilizando péptidos sintéticos de varias de estas proteínas, siendo los derivados de la metaloproteasa (MET1) y de la tropomiosina (TRO1) los que proporcionaron los valores más altos de sensibilidad (93,75% y 87,5%, respectivamente). Sin embargo, no fue posible evitar las reacciones cruzadas con otras helmintosis obteniéndose valores de especificidad de 64,4% para MET1 y de 80,4% para TRO1 (Galiano, 2016a). Basándonos en estos estudios previos, y en las proteínas ya identificadas y caracterizadas, en esta Tesis hemos intentado estandarizar una técnica de *ELISA* indirecto utilizando proteínas recombinantes de la larva L3i de *S. stercoralis*, forma infectiva del parásito, para mejorar la especificidad, evitar problemas de reactividad cruzada por coinfecciones, y eliminar el uso de antígeno crudo a partir de larvas filariformes. Debido a su abundancia en los análisis proteómicos previos, se han seleccionado fragmentos de las proteínas recombinantes 14-3-3 zeta, ferritina y antígeno principal o *major antigen*, para su estudio como nuevas dianas para el diagnóstico y, así buscar una solución al problema de disponibilidad de antígenos específicos.

1.3.3.3. Métodos moleculares

El uso de técnicas moleculares de detección de material genético para el diagnóstico parasitológico todavía está limitado a unos pocos laboratorios de referencia, principalmente en países industrializados. Entre ellas, suelen predominar en los laboratorios de análisis la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, la PCR anidada, la PCR en tiempo real (RT-PCR) y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). La técnica LAMP es más simple y económica ya que no requiere equipos sofisticados ni reactivos costosos, funciona a una temperatura constante por lo que el proceso se acelera y facilita su uso en entornos con recursos limitados, y presenta buenos valores de rapidez, sensibilidad y especificidad, por lo que resultaría idónea como herramienta diagnóstica para pruebas de campo (Bisoffi et al., 2013).

De la misma forma que ocurre con las técnicas parasitológicas, las técnicas moleculares de detección de DNA parasitario, también dependen de la eliminación de larvas en los individuos infectados, lo que dificulta su detección especialmente en pacientes con baja carga parasitaria. Existen otros factores que influyen en la baja sensibilidad de estas pruebas. Entre ellos, la extracción del DNA a partir de la muestra no es tarea fácil ya que la larva está formada por una pared de cutícula muy resistente y, además, la pequeña cantidad de muestra que se utiliza en el análisis puede producir falsos negativos. El modo de conservación de las muestras también influye en la eficiencia de estas pruebas, junto al hecho de que las heces presenten una gran cantidad de inhibidores que puedan interferir en la amplificación del DNA (Fernández-Rivas et al., 2019; Eslahi et al., 2021; Khurana et al., 2021).

Si bien estos procedimientos moleculares pueden ser considerados adecuados con fines diagnósticos, se deberían realizar junto a métodos parasitológicos, como el método de Baermann o el cultivo en placa de agar, y deberían estar orientados a estudios epidemiológicos en áreas endémicas. Además, dada su alta especificidad funcionarían sobre todo como pruebas confirmatorias (Saugar et al., 2015; Buonfrate et al., 2018).

1.3.4. Tratamiento

Una de las principales medidas de control de la estrongiloidosis se basa en el tratamiento antihelmíntico. Los benzimidazoles, son un grupo de antihelmínticos que incluyen el tiabendazol, el mebendazol y el albendazol, que actúan uniéndose a la tubulina e interrumpiendo el ensamblaje de los microtúbulos, afectando la locomoción y reproducción del parásito (Grove, 1996; Beknazarova et al., 2016b). El tiabendazol es el agente tradicional considerado para el tratamiento de la estrongiloidosis y está ampliamente disponible, aunque presenta una alta tasa de recaída, ya que no logra eliminar totalmente el parásito, es significativamente tóxico y presenta efectos gastrointestinales secundarios (Grove, 1996; Igual-Adell et al., 2004). El mebendazol presenta una menor eficacia que el tiabendazol y se ha observado que es activo contra los vermes adultos, pero no contra las larvas filariformes, por lo que un tratamiento continuo de varias semanas probablemente elimine en primer lugar las hembras del intestino, y posteriormente a las nuevas desarrolladas a partir de las larvas migratorias. El albendazol está disponible en muchos países y puede ser la opción preferida, presenta una mayor actividad larvicida en comparación con el mebendazol y puede ser eficaz en tratamientos más prolongados (Grove, 1996).

La ivermectina ha sido registrada como el fármaco de elección en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud para el tratamiento de *S. stercoralis* (Siddiqui & Berk, 2001; OMS, 2022). Actúa produciendo parálisis del parásito, inhibiendo su capacidad de alimentarse, provocando la muerte (Beknazarova et al., 2016b). En España, hasta 2021 se consideraba a la ivermectina un «medicamento extranjero», pero ese año se incluyó en el catálogo español de prestaciones farmacéuticas. El producto se vende en las farmacias con el nombre de Ivergalen 3 mg comprimidos EFG, y sus indicaciones son para el tratamiento de la estrongiloidosis, la filariasis y la sarna, entre otros. El tratamiento recomendado es de 200 µg/kg, en una o dos dosis vía oral, consiguiéndose recuperaciones del 100% en el caso de estrongiloidosis crónica no complicada (Igual-Adell et al., 2004). Sin embargo, pacientes con estrongiloidosis grave requieren tratamientos más prolongados (2-4 semanas), hasta observar que el esputo y las heces estén libres de larvas (Grove, 1996; Miller et al., 2008). Además, se utilizan antibióticos para tratar las infecciones bacterianas secundarias.

Como se ha mencionado anteriormente, las terapias inmunosupresoras pueden incrementar el riesgo de hiperinfección o diseminación por *S. stercoralis* (Belhassen-García et al., 2017), por lo que se debe fomentar la implementación de protocolos antes de la inmunosupresión, considerando a los pacientes en programas de quimioterapia, inmunoterapia y trasplante, para realizar un tratamiento preventivo con ivermectina. Este tratamiento estaría justificado sobre todo en pacientes viajeros e inmigrantes de zonas endémicas que presenten eosinofilia inexplicable, con o sin síntomas compatibles, incluso en el caso de obtener resultados negativos en las pruebas diagnósticas (Buonfrate et al., 2012, 2013).

En el caso de los geohelminthos en países endémicos, la desparasitación a gran escala en escolares, con una dosis única de albendazol o mebendazol, ha permitido reducir el número de infecciones o, por lo menos, ha controlado las cargas parasitarias, observándose una notable mejoría de la salud y de la capacidad cognitiva y reduciendo la morbilidad mundial. Pero este enfoque de desparasitación masiva no ha logrado la eliminación total de las geohelmintosis debido a la falta de suministros de agua y saneamiento adecuado que complementen los programas de control (Savioli et al., 1992; Bethony et al., 2006; Loukas et al., 2021). Y, además, en el caso concreto de *S. stercoralis*, la ivermectina es el fármaco de elección, por esa razón, resiste a las grandes campañas profilácticas contra estas enfermedades. El control de la morbilidad causada por *S. stercoralis* se ha añadido a los objetivos de la OMS para 2030. Este objetivo se puede alcanzar porque, actualmente, hay ivermectina a un coste asequible. La

distribución de ivermectina se puede hacer a través de las plataformas que se utilizan para luchar contra las otras geohelmintosis (OMS, 2020).

1.3.4.1. Vacunación

A pesar de la prevalencia e importancia de estas infecciones, las helmintosis se encuentran dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas para las que no existen, hasta el momento, vacunas aprobadas para uso en humanos (Perera & Ndao, 2021).

Los helmintos producen y secretan una amplia gama de productos, incluyendo vesículas extracelulares, que interactúan con los tejidos circundantes del hospedador donde orquestan diversos procesos de parasitismo, como la penetración de tejidos, la migración somática y la modulación inmunitaria, entre otros. Las proteínas involucradas en estos procesos son los principales candidatos a los que se deben dirigir las vacunas (Marcilla et al., 2012b; Montaner et al., 2014; Trelis et al., 2016).

Ante las dificultades expuestas para el control de la enfermedad en zonas endémicas, en cuanto al tratamiento farmacológico y la mejora de las condiciones higiénico-sanitarias, se considera que la vacunación sería el método comunitario más efectivo para la prevención de las geohelmintosis, proporcionando una defensa inmunológica a largo plazo, y ofreciendo la posibilidad de interrumpir en un solo paso la infección y la transmisión. Sin embargo, uno de los mayores obstáculos que impide el desarrollo de vacunas contra los HTS, son las potentes propiedades inmunorreguladoras de estos helmintos, que les permiten permanecer durante años en su hospedador (Bethony et al., 2006; Loukas et al., 2021).

El objetivo de las estrategias de vacunación actuales es buscar una inmunidad que minimice el impacto de las infecciones (Loukas et al., 2021). Existen seis vacunas antihelmínticas, para su uso en humanos, en fase de ensayos clínicos, incluyendo dos para infecciones frente ancilostómidos y cuatro para esquistosomosis (Levenhagen et al., 2016; Molehin et al 2022). Se les ha llamado vacunas contra la pobreza, ya que las geohelmintosis debido a su carácter crónico y estigmatizante, además de su impacto negativo en el desarrollo infantil y en la productividad de los trabajadores, son consideradas como enfermedades tropicales desatendidas que promueven la pobreza en las zonas donde son endémicas (Hotez & Ferris, 2006).

El primer estudio sobre vacunas para *Strongyloides* fue publicado por Conder y Williams en 1983. La inmunización de ratas con larvas infectantes de *S. ratti* expuestas a radiación con microondas,

produjo una reducción significativa en el número de vermes y, por ende, en el número de huevos (Conder & Williams, 1983). Desde entonces se han publicado varios artículos sobre estrategias inmunoterapéuticas contra este parásito probando diferentes preparados antigénicos derivados de *S. stercoralis*, *S. ratti* y *S. venezuelensis*, proteínas recombinantes y vacunas de DNA. Se han utilizado diferentes adyuvantes (deoxicolato (DOC), alumbre y el sistema ADAD (Sistema Adyuvante Adaptado para vacunación) y diferentes vías de inoculación (subcutánea o utilizando cámaras de difusión) (Ligas et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2004; Vlamincx et al., 2010; Levenhagen et al., 2016).

La mayoría de los estudios se basan en el uso de antígenos de la larva L3i para inducir una respuesta protectora de tipo Th2 (T *helper* o cooperador 2) en el hospedador, o bien, en la obtención experimental de anticuerpos contra proteínas específicas del parásito que podrían utilizarse para inmunización pasiva (Ruano et al., 2005; Levenhagen et al., 2016). Vlamincx y colaboradores, en 2010, probaron un extracto de la L3i de *S. venezuelensis* solubilizado en DOC, asociado a inmunomoduladores, frente a una infección homóloga en ratones CD1, observando una reducción casi del 100% en el número de huevos en heces, además de una reducción en la inflamación del intestino (Vlamincx et al., 2010). En el mismo sentido, en ratones que fueron inmunizados con antígenos solubles derivados de larvas de *S. stercoralis*, se observó una reducción en la supervivencia de las larvas a la mitad (Bonne-Année et al., 2011). En cuanto a ensayos de inmunización pasiva en ratones sin tratamiento previo, se demostró la transferencia de protección con anticuerpos IgG purificados de ratones inmunizados con larva L3i viva, mediante la activación del complemento y neutrófilos contra las larvas, en un mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) (Ligas et al., 2003).

Estudios que incluyeron los antígenos recombinantes de *S. stercoralis*, Ss-NIE y Ss-IR mostraron para el Ss-IR en alumbre como adyuvante, una disminución significativa en la supervivencia de las larvas de aproximadamente el 80%. Además, la IgG obtenida de los ratones inmunizados con Ss-IR podía transferir inmunidad pasivamente a ratones sin tratamiento previo (Abraham et al., 2011). Hasta el momento este antígeno recombinante es el que mejores resultados ha presentado por lo que se considera como un importante candidato para su uso en una vacuna contra *S. stercoralis*.

En la actualidad, se continúan investigando nuevas proteínas inmunogénicas de *S. stercoralis* en la búsqueda de nuevos candidatos vacunales. En este contexto, se debe mencionar que la principal proteína estudiada en diferentes organismos ha sido la 14-3-3 zeta, con resultados positivos, pero con diferentes grados de protección frente a parásitos como *Schistosoma bovis*

(Uribe et al., 2007), *S. mansoni* (Schechtman et al., 2001; Siles-Lucas et al., 2007), *Fasciola hepatica* (Pérez-Caballero et al., 2018) y *Echinococcus multilocularis* (Siles-Lucas et al., 2003).

1.4. Respuesta del hospedador frente a la infección por *S. stercoralis*

El sistema inmunológico comprende células y moléculas capaces de distinguir entre patógenos invasores y las propias células del cuerpo. Los helmintos, en sus diferentes formas, son capaces de regular la inmunidad del hospedador, protegiéndolos de ser eliminados (Iriemenam et al., 2010). Estas infecciones parasitarias provocan una respuesta inmunológica predominantemente de tipo Th2, y la interacción entre el parásito y el hospedador permite la persistencia de infecciones crónicas (Gause et al., 2013). Además, existe un mecanismo independiente de células T, que incluye la activación de macrófagos y producción de citoquinas proinflamatorias para la eliminación del parásito (Allen & Sutherland, 2014).

La respuesta inmunitaria en humanos frente a infecciones por *S. stercoralis* no se ha estudiado en gran detalle. La mayor parte de nuestro conocimiento sobre los mecanismos de inmunidad protectora innata y adaptativa frente a larvas de *S. stercoralis* proviene de estudios en ratones, que proporciona información adicional respecto al conocimiento de cuándo exactamente se inició la infección (Bonne-Année et al., 2011; Nutman, 2017).

Las barreras biológicas que encuentran los parásitos que entran a través de la piel, como los ancilostómidos y *Strongyloides* spp., son diferentes a las que encuentran los que ingresan vía oral como *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura* (Bethony et al., 2006). Los tejidos de barrera, en particular las células epiteliales que han sido dañadas liberan alarminas como interleuquinas (IL-25 y IL-33) y la linfopoyetina estromal tímica (TSLP, *Thymic Stromal Lymphopoietin*), que promueven la activación de varios tipos celulares como mastocitos, basófilos, eosinófilos, células linfoides innatas y células Th2. La inducción de la IL-33 sobre los mastocitos adyacentes a la lesión, reconocida a través de su receptor ST2, activa el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), con la posterior transcripción de varios genes proinflamatorios y la liberación conjunta de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa), quimioquinas y mediadores lipídicos que inician una respuesta inflamatoria que dirige el reclutamiento de neutrófilos, activación y migración de células dendríticas y termina con la polarización de los linfocitos T cooperadores (Th) a células Th2 (Figura 5), que promueven la expulsión del helminto (Lunderius-Andersson et al., 2012; Allen & Sutherland, 2014). En un modelo murino, los helmintos liberaron productos que bloquearon la vía de la IL-33 a través de HpARI (*Heligmosomoides polygyrus Alarmin Release Inhibitor*), bloqueando la citoquina y también a su

receptor (Vacca et al., 2020), neutralizando así la capacidad de las células epiteliales para iniciar la respuesta inmunitaria Th2.

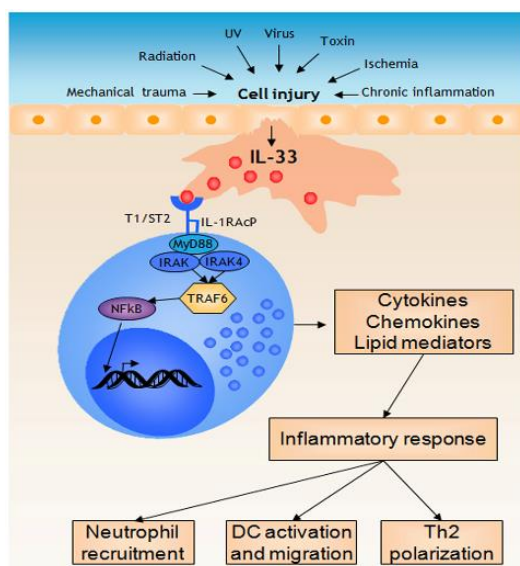


Figura 5. Respuesta inmunitaria en los tejidos barrera. Los mastocitos reconocen a través del receptor ST2 a la IL-33 liberada por las células epiteliales durante la lesión. Con la activación de NF-κB se inicia una respuesta inflamatoria que termina en una respuesta Th2 (Lunderius-Andersson et al., 2012).

Continuando con otras alarminas liberadas por la lesión celular, IL-25 induce la producción de citoquinas tipo 2 (IL-5 e IL-13) por las células linfoides innatas, y tiene propiedades antiinflamatorias que protegen contra el daño a nivel del intestino, mientras que la TSLP se expresa constitutivamente en el pulmón y en el intestino, donde suprime la respuesta inflamatoria de tipo 1 y promueve la respuesta de tipo 2 (Allen & Sutherland, 2014). La IL-5 es una citoquina esencial para la diferenciación, activación y proliferación de eosinófilos y con ellos la destrucción de los helmintos durante la inmunidad innata, además participa en la inducción de anticuerpos protectores (Herbert et al., 2000; Iriemenam et al., 2010). La lesión tisular por sí sola no siempre genera una respuesta de tipo 2, pero es propiciada por los productos secretados por los helmintos, los cuales inducen respuestas Th2 incluso en ausencia de lesión (Allen & Sutherland, 2014).

Los neutrófilos atacan a las larvas con mieloperoxidasa (MPO); mientras que los eosinófilos lo hacen mediante la proteína básica principal (MBP, *Major Basic Protein*). Además, para mediar la muerte de las larvas, se requiere de la activación del complemento de forma innata con el componente C3b activado sobre las larvas, el cual será reconocido por los neutrófilos y los eosinófilos (Bonne-Année et al., 2013).

Otro componente del sistema inmunitario requerido para la eliminación de *S. stercoralis* son los macrófagos que, en general, no pueden ingerir helmintos debido a su gran tamaño, pero colaboran con los neutrófilos (Bonne-Année et al., 2013, 2014). Los macrófagos expresan receptores tanto para IL-4 como para IL-13, ambos comparten la cadena común de IL-4R α . Los macrófagos M2 o macrófagos activados alternativamente (AAM ϕ , *Alternatively Activated Macrophages*), inducidos por IL-4/IL-13, son los más efectivos en regular negativamente mediadores inflamatorios favoreciendo una respuesta Th2 (Bonne-Année et al., 2013; Allen & Sutherland, 2014).

Los mecanismos efectores del hospedador impulsados por la Th2 frente a la larva L3i filariforme involucran la participación de respuestas inmunitarias celulares y humores, comenzando con la presentación de antígenos por parte de los eosinófilos a las células CD4+ a través del MHC clase II que induce la producción de IL-4, IL-5 e IL-13, de inmunoglobulinas IgM, IgG e IgE específicas, y que junto con los neutrófilos y eosinófilos destruyen a los helmintos mediante la desgranulación sobre el helminto (Figura 6) (Iriemenam et al., 2010; Bonne-Année et al., 2011; Anuradha et al., 2016; Breloer & Abraham, 2017). Los niveles de eosinófilos pueden ayudar a mitigar la infección por *S. stercoralis*. En individuos con estrongiloidosis grave, se encontraron niveles de eosinófilos por debajo de los encontrados en individuos asintomáticos (Keiser & Nutman, 2004; Iriemenam et al., 2010).

La exacerbación de la enfermedad por *S. stercoralis* se ha correlacionado con la infección por HTLV-1 (Mejia & Nutman, 2012). El virus HTLV-1 en hospedadores coinfectados con *S. stercoralis* provoca una respuesta Th1 con una alta producción de IFN- γ al tiempo que disminuye la producción de IL-4, IL-5, IL-13 e IgE, moléculas que participan en la defensa del hospedador contra los helmintos cambiando la respuesta inmunitaria de tipo Th2 a Th1. Los niveles reducidos de IgE son característicos de la inmunosupresión selectiva por retrovirus, creando un ambiente indulgente para la propagación de *Strongyloides* spp. (Carvalho & Da Fonseca Porto, 2004; Iriemenam et al., 2010).

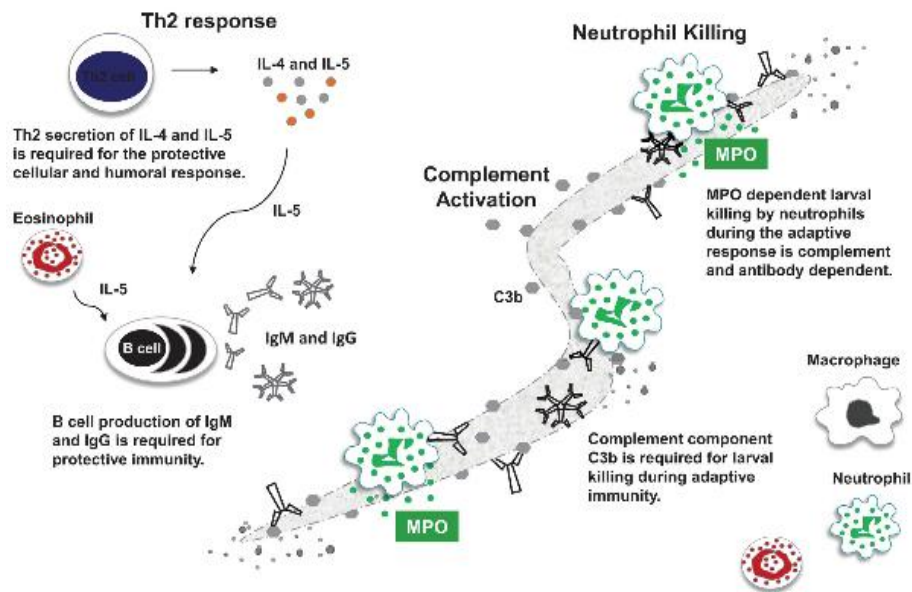


Figura 6. Respuesta inmunitaria adaptativa de tipo 2 frente a larvas de *Strongyloides stercoralis* en ratones. Se caracteriza por la producción de IL-4 e IL-5. Producción de IgM e IgG por parte de las células B que colaboran con los neutrófilos para destruir a los helmintos. Al igual que en la respuesta inmunitaria protectora innata, la muerte de las larvas depende de la liberación de mieloperoxidasa (MPO) de los neutrófilos y del componente C3b del complemento (Bonne-Année et al., 2011).

La respuesta de tipo 2 es una respuesta protectora del hospedador que busca reducir el número de parásitos, ya sea mediante la muerte directa en los tejidos o con su expulsión del intestino, estimulando la hiperplasia de las células caliciformes y la secreción de moco, y mediante la contracción del músculo liso, procesos que median la expulsión de los helmintos. Las mucinas recubren a las hembras partenogenéticas para prevenir su establecimiento en la mucosa y promover su eliminación del intestino (Bonne-Année et al., 2013; Allen & Sutherland, 2014; Levenhagen et al., 2016). La producción de IL-4 e IL-13 por parte de las células Th2 también protege al hospedador contra el daño mediado por estos helmintos parásitos a medida que migran por el cuerpo, acelerando la reparación de tejidos (Gause et al., 2013; Allen & Sutherland, 2014). La IL-13 parece ser la citoquina de tipo 2 crítica, implicada en una rápida reparación del tejido después de la migración del parásito, tanto a través de efectos directos en la producción y deposición de colágeno, como a través de efectos indirectos en la promoción de la reparación mediada por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), teniendo como consecuencia natural la formación de tejido cicatricial, cuya secuela dañina es la fibrosis (Allen & Sutherland, 2014). Además, IL-13 junto con IL-4 e IL-10, inhiben en los macrófagos la producción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-8, IFN- γ y TNF- α , por lo que estarían implicadas en la inmunorregulación de varios procesos inflamatorios (Vargas, 1995).

El éxito para la supervivencia de *S. stercoralis* en el hospedador sugiere lograr alguna forma de parasitismo equilibrado, en el que se mantiene la transmisión del parásito y se evita la morbilidad aguda del hospedador. Para lograr este estado homeostático ideal se necesita un entorno rico en mecanismos reguladores (Bethony et al., 2006). IL-10 es la citoquina reguladora más abundantemente producida durante las geohelmintosis. Sin embargo, su papel en el mantenimiento de la cronicidad de la enfermedad no está claro (Bethony et al., 2006). TGF- β es un regulador importante de la inflamación y mantiene el balance entre el control y la eliminación de parásitos (Monteon & Ligonio, 2008). Tanto IL-10 como TGF- β son citoquinas producidas por los linfocitos T reguladores, y su función se relaciona con la regulación de la inflamación y la inducción de infecciones crónicas (Anuradha et al., 2016).

1.5. Conocimientos previos sobre el proteoma de *S. stercoralis*

La disponibilidad de los genomas de helmintos durante las últimas décadas ha acelerado los estudios “-ómicos” en helmintos. El repositorio principal de estos datos, WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org>), contiene en la actualidad 210 genomas y anotaciones de 169 especies de nematodos y platelmintos, que representan algunas de las especies de helmintos más patógenas de humanos, animales y plantas (Bryant, 2024). Sin embargo, la aplicación de enfoques “-ómicos” a especies parásitas continúa presentando dificultades ya que el material parasitario puede resultar inaccesible según el estilo de vida del parásito y, además, es muy difícil el mantenimiento del ciclo de vida de los mismos en el laboratorio.

Se han llevado a cabo diversos estudios sobre transcriptómica de *Strongyloides* spp. con el objeto de investigar las interacciones parásito-hospedador, así como entender la regulación de la expresión génica a lo largo del ciclo de vida libre y parasitario (O’Meara et al., 2010; Marcilla et al., 2012a; Nagayasu et al., 2013; Hunt et al., 2017).

En cuanto a estudios proteómicos, el primer estudio sobre el proteoma de la larva L3i de *S. stercoralis* fue realizado en 2010, y se logró identificar 26 proteínas (Marcilla et al., 2010), aun cuando no se contaba con el genoma completo del parásito como referencia (Hunt et al., 2016). Más recientemente otros estudios han identificado proteínas antigénicas en larvas L3i que pudieran ser útiles como marcadores en el diagnóstico y candidatas vacunales (Rodpai et al., 2017; Dishnica et al., 2023). Asimismo, estudios bioinformáticos han identificado potenciales candidatos para diseñar epítomos útiles en diagnóstico o vacunación (Culma, 2021; Marlais et al., 2023).

Existe un gran interés en identificar y/o diseñar proteínas inmunogénicas eficientes para ser usadas en el desarrollo de vacunas o en el diagnóstico serológico de la estrongiloidosis. Sin embargo, hasta ahora, pocos estudios se han centrado en buscar e identificar inmunógenos potenciales en el proteoma de *S. stercoralis*. Uno de estos estudios abordó el análisis del extracto de la larva L3i de *S. stercoralis* mediante *immunoblot* empleando sueros de pacientes con estrongiloidosis y de otras infecciones parasitarias. Posteriormente, mediante espectrometría de masas, se identificaron algunas proteínas altamente inmunogénicas por su reactividad con la mayoría de los sueros. Posteriormente, dando un enfoque proteómico se categorizaron según su función molecular o el tipo de proceso biológico en el que participan (Rodpai et al., 2016, 2017).

El estudio más reciente realizado a partir de larvas L3i de *S. stercoralis* obtenidas de pacientes con estrongiloidosis, logró identificar más de 400 proteínas involucradas con el parasitismo, de las cuales sólo 9 presentaron potencial inmunogénico suficiente para usarse en nuevas pruebas de diagnóstico serológico, entre ellas la galectina, que ha sido descrita en interacciones parásito-hospedador (Dishnica et al., 2023).

En el estudio proteómico realizado por Marcilla y colaboradores en el 2010, se identificaron 13 proteínas de la superficie de la larva L3i del parásito, entre las que se encontraba la proteína 14-3-3 zeta. Posteriormente, en otro estudio de nuestro grupo sobre transcriptómica de la misma larva, se halló una mayor expresión de la proteína 14-3-3 zeta, y también de la denominada Antígeno Principal (Marcilla et al., 2012a). Asimismo, Rodpai y colaboradores (2017) comprobaron que la proteína 14-3-3 en su isoforma zeta era una de las 20 proteínas inmunorreactivas reconocidas por sueros de pacientes con estrongiloidosis. Las proteínas 14-3-3 han sido consideradas como moléculas clave y han sido descritas en una gran variedad de parásitos tanto unicelulares como pluricelulares (Siles-Lucas & Gottstein, 2003). Estas proteínas se han estudiado para identificar sus dominios más antigénicos mediante herramientas bioinformáticas (Galiano, 2016a; Wei et al., 2021), o para su aplicación en el serodiagnóstico de la estrongiloidosis (Sudré et al., 2007; Rodpai et al., 2016; Masoori et al., 2019).

A pesar de la importancia de la proteína Ferritina en mantener un balance de hierro intracelular, son pocos los estudios donde se haya caracterizado esta proteína en parásitos, pero cabe resaltar su presencia en vesículas extracelulares de trematodos parásitos (Marcilla et al., 2012b) y en la larva L3i de *S. stercoralis* (Marcilla et al., 2010). Un estudio detallado del transcriptoma de *S. stercoralis* reveló que la Ferritina se encuentra en mayor proporción en la hembra adulta partenogenética, y en menor proporción en la larva L3i. Los ensayos de inmunolocalización de

proteínas confirmaron que tanto la proteína 14-3-3 zeta, como la Ferritina, se encuentran asociadas a la superficie del parásito (Galiano, 2016a). Asimismo, se ha encontrado que la Ferritina de *S. ratt*i se encuentra en la superficie de la L3i (Murrell & Graham, 1982).

Los datos correspondientes a las secuencias parciales de mRNA para estas proteínas, que se tomarán como referencia en esta Tesis se encuentran depositados en el GenBank (LN715176.1: 14-3-3z; LN715179.1: Ferritina; LN715173.1: Antígeno Principal).

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La estrongiloidosis es una enfermedad tropical desatendida que afecta a millones de personas a nivel mundial. En España no es considerada una enfermedad endémica, pero su diagnóstico y vigilancia es importante debido a la presencia de casos (autóctonos e importados) que pueden producir síndrome de hiperinfección en pacientes inmunosuprimidos. Hasta el momento, no existe una técnica de elección para el diagnóstico de la estrongiloidosis. Las técnicas diagnósticas, tanto las parasitológicas como las moleculares, necesitan de la presencia del parásito en las muestras biológicas, lo cual no siempre es posible en infecciones crónicas. Por otro lado, las técnicas serológicas presentan mejores valores de sensibilidad, aunque la especificidad continúa siendo mejorable y presentan reacciones cruzadas con otros helmintos, situación a tener en cuenta en los casos importados. Debido a las limitaciones diagnósticas mencionadas y las dificultades con las que se encuentran los programas de control en zonas endémicas, se buscan nuevas dianas moleculares que puedan ser usadas para mejorar el diagnóstico, pero también para el desarrollo de una vacuna para el control efectivo de la estrongiloidosis.

La presente Tesis Doctoral, se enmarca en una línea de investigación que busca ampliar el conocimiento sobre el uso de proteínas recombinantes de la larva L3i de *Strongyloides stercoralis*, siendo el **objetivo principal** la evaluación de las proteínas rSs14-3-3 zeta (rSs14-3-3z), rSsFerritina (rSsFe) y rSsAntígeno Principal o *Major Antigen* (rSsMA) de *S. stercoralis* con fines diagnósticos e inmunomoduladores en estudios *in vitro* e *in vivo*.

Para alcanzar el objetivo principal se han planteado durante la tesis los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estandarizar y evaluar una técnica de *ELISA* indirecto *in house* con fragmentos recombinantes de las proteínas 14-3-3 zeta, Ferritina y Antígeno Principal, para su uso como herramienta diagnóstica de estrongiloidosis humana.
2. Evaluar las propiedades citostáticas/citotóxicas de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* en cultivo celular e investigar la posible acción de dichas proteínas en la activación de macrófagos.
3. Determinar la capacidad vacunal de dichas proteínas recombinantes de *S. stercoralis* frente a la infección con *S. venezuelensis* en un modelo de experimentación animal.

CAPÍTULO 3: MATERIALES y MÉTODOS

3. MATERIALES y MÉTODOS

3.1. Material parasitario

3.1.1. Larvas L3i de *S. stercoralis*

Para obtener el material genético del parásito se contó con ejemplares del parásito *S. stercoralis*, concretamente con larvas infectantes L3 (L3i). Las larvas fueron recolectadas a partir de cultivos en placas de agar, realizados con muestras fecales de pacientes afectados por la parasitosis, procedentes de diversos hospitales de la Comunidad Valenciana, considerada como probable zona endémica de parasitación. El estudio con muestras humanas fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València (16 de junio de 2020) (código de identificación del proyecto 2021.073).

3.1.2. *Strongyloides venezuelensis*

Strongyloides venezuelensis se obtuvo de una cepa utilizada originalmente en el Departamento de Parasitología de la Universidad de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. Esta cepa se mantuvo mediante pases seriados en ratas Wistar infectadas de forma rutinaria por el laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS).

Las larvas L3i filariformes de *S. venezuelensis* se recuperaron a partir de coprocultivos a partir de las heces de ratas infectadas utilizando el método de Baermann (Lima & Delgado, 1961). Las L3i fueron descontaminadas según la metodología desarrollada por Martins y colaboradores en 2000, quienes desarrollaron un método para obtener larvas infecciosas axénicas de *S. venezuelensis*. Las L3i recién obtenidas se trataron con hipoclorito de sodio al 0,25% durante 10 min, se lavaron seis veces en agua destilada y se incubaron con una solución acuosa que contenía 100 UI/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina y 0,8 mg/mL de fluconazol durante 30 min. La descontaminación de las larvas se confirmó cultivándolas en una placa de Petri con agar sangre a 28 °C durante 24 h (Martins et al., 2000).

Estas larvas del tercer estadio (L3i) de *S. venezuelensis* fueron usadas para mantener el ciclo de vida en ratas Wistar, infectándolas con 6000 L3i. Los ensayos experimentales se llevaron a cabo infectando experimentalmente ratones CD1 con 3000 L3i vía subcutánea (Legarda-Ceballos et al., 2016). Este estudio se realizó siguiendo estrictamente los protocolos aprobados por la

Consejería de Agricultura y Ganadería del Gobierno de la Comunidad de Castilla y León, España (resolución nº335 del 20 de febrero de 2019).

3.2. Plásmidos recombinantes

Para la producción de las proteínas recombinantes rSs14-3-3z, rSsFe y rSsMA, se contó con plásmidos clonados con el DNA codificante para los fragmentos de las proteínas recombinantes que, fueron obtenidos previamente como parte del trabajo de Tesis Doctoral de Alicia Galiano, realizada en el laboratorio de Parasitología del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universitat de València.

Se utilizaron vectores de la serie pQE30-32 (Qiagen, Alemania) como vectores de expresión, este vector permite la clonación del gen de interés como proteína de fusión a un péptido de histidinas (6xHis-tag). Presenta un sitio de restricción enzimática múltiple, además de contar con el gen para β -lactamasa (Figura 7), que confiere resistencia al antibiótico ampicilina, y, por tanto, permite la selección positiva de las bacterias transformadas. Además, cuenta con un elemento clave para la expresión regulada de las proteínas, el gen *lac*, el cual produce una proteína represora *lac* que evita la transcripción pero que al unirse con el inductor Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), se inactiva, permitiendo de esta manera que la RNA polimerasa de la bacteria pueda transcribir el gen, que finalmente es traducido en una proteína recombinante.

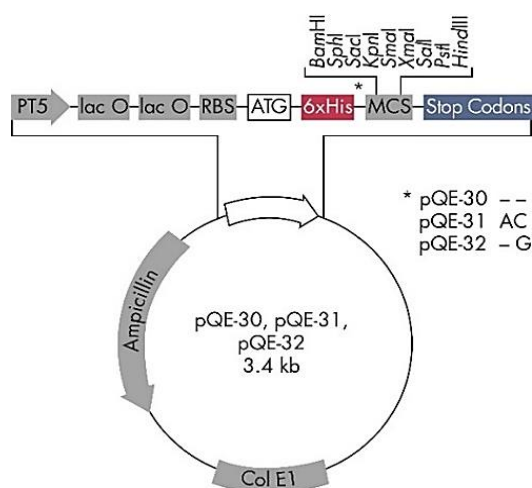


Figura 7. Mapa de los vectores pQE30-32, usado para la expresión de las proteínas recombinantes rSs14-3-3z, rSsFe y rSsMA (QIAGEN, Alemania).

3.3. Bacterias y condiciones de crecimiento

Para la transformación y producción de proteínas se utilizaron células de la cepa de *Escherichia coli* M15, las cuales se cultivaron a 37 °C en medio de Luria-Bertani (LB) (Merck, Alemania), compuesto por extracto de levadura 0,5%, triptona 1% y NaCl 1%, ajustando a pH 7. En los medios sólidos se añadió 1,5% de agar. Para la selección de cepas de *E. coli* M15, portadoras de plásmidos, se añadió Ampicilina (100 µg/mL) y Kanamicina (25 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EE. UU.) al medio de cultivo.

3.4. Línea celular para ensayos *in vitro*: macrófagos múridos (Raw Blue™)

En los estudios *in vitro* se empleó la línea celular RAW Blue™ (InvivoGen, EE. UU.), derivada de macrófagos RAW 264.7 de ratón. Estas células contienen un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) inducible por el factor de transcripción NF-κB. Las células se hicieron crecer en medio de cultivo *Dulbecco Modified Eagle* (Gibco™ DMEM, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) suplementado con 4,5 g/L glucosa, 2 mM L-glutamina, 10% suero bovino fetal (SFB, Sigma-Aldrich, EE. UU.) inactivado con calor (30 min a 56 °C), 100 µg/mL Normocin™, Penicilina-Streptomycin (100 U/mL-100 µg/mL), en atmósfera húmeda a 37 °C y 5% de CO₂. Además, para mantener la presión selectiva, se adicionó 200 µg/mL de Zeocina™ al medio de crecimiento en cada pase. Para los ensayos, las células se desprendieron utilizando un raspador de células.

3.5. Animales de experimentación

Para el desarrollo de los estudios experimentales llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral se ha requerido el empleo de animales de experimentación, utilizando procedimientos que cumplieran con la normativa de la Unión Europea (Di 2010/63/CE) y española (L32/2007, L6/2013, RD53/2013) sobre experimentación animal. Este estudio se realizó siguiendo estrictamente los protocolos aprobados por la Consejería de Agricultura y Ganadería del Gobierno de la Comunidad de Castilla y León, España (resolución n°335 del 20 de febrero de 2019). Se siguieron las normas básicas, aplicables a la protección de animales utilizados en la experimentación que tuvo lugar en el Servicio de Investigación y Bienestar Animal de la Universidad de Salamanca (USAL). La recuperación de hembras partenogenéticas y órganos se realizaron después de la eutanasia con pentobarbital (100 mg/kg) (Legarda-Ceballos et al., 2016) y se hizo todo lo posible para minimizar el sufrimiento.

Los animales de experimentación empleados fueron ratones hembra de la cepa CD1, libres de patógenos específicos o *specific pathogen free* (SPF), de 25 a 30 g de peso, para el diseño experimental de inmunización *in vivo*; y ratas Wistar de 80 a 120 g de peso, para el mantenimiento del ciclo de vida de *S. venezuelensis* en laboratorio. Se alojaron y mantuvieron en el Servicio de Investigación y Bienestar Animal de la Universidad de Salamanca en condiciones estándar, a una temperatura de 24 °C y un ambiente de humedad controlado, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y se les proporcionó de agua y alimento *ad libitum*.

3.6. Sueros de pacientes con estrongiloidosis

El estudio con muestras humanas fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València (16 de junio de 2020) (código de identificación del proyecto 2021.073). Todos los sujetos dieron su consentimiento informado para su inclusión antes de participar en el estudio. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki, modificación de Fortaleza (2013). Los datos fueron “pseudoanonimizados” y tratados de forma confidencial según el reglamento (UE 2016/679 del 27 de abril de 2016) relativo a la protección de las personas físicas, en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos, y la ley orgánica española 3/2018, de 5 de diciembre, sobre protección de datos personales y garantía de los derechos digitales. Cada paciente fue identificado con un código único y específico compatibilizando la confidencialidad y el seguimiento de los datos médicos. Para llevar a cabo varios de los experimentos incluidos en el presente trabajo se han contado con un total de 15 sueros autóctonos, que correspondían a pacientes infectados con *S. stercoralis* procedentes de la región de La Safor (Valencia) y fueron facilitados por el Servicio de Microbiología del Hospital La Ribera de Alzira, gracias a la Dra. Victoria Domínguez. También se dispuso de 40 sueros de voluntarios sanos donantes anónimos provenientes del IIS La Fe de Valencia (Tabla 1).

Asimismo, y con el fin de poner a punto un ensayo de *ELISA* indirecto una vez estandarizado, se recibieron 50 sueros del Instituto Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) en Madrid, de los cuales 40 sueros eran positivos a estrongiloidosis según la prueba diagnóstica comercial *Strongyloides* IgG *ELISA* (DRG International Inc., EE. UU.) realizada en el ISCIII. Cinco sueros correspondían a pacientes afectados por otras helmintosis, concretamente: esquistosomosis (*Schistosoma* sp.), cisticercosis (*Taenia solium*), anisakiosis (*Anisakis* sp.), toxocarosis (*Toxocara canis*) y filariosis; y los 5 sueros restantes eran negativos para parásitos (Tabla 1). Dichos sueros, cedidos gentilmente por el Dr. José María Saugar Cruz, del Centro

Nacional de Microbiología del ISCIII, fueron etiquetados como SSV1 sucesivamente hasta SSV50, y se guardaron en alícuotas a -20 °C hasta su uso.

Tabla 1. Sueros utilizados en el desarrollo del *ELISA* indirecto, con su respectivo centro de procedencia y el código empleado en el laboratorio.

Número de sueros	Código de Laboratorio	Parasitosis	Procedencia
15	S1-S11, S13-S16	Estrongiloidosis	Hospital de La Ribera, Alzira
40	SSV01-SSV50	Estrongiloidosis	Instituto de Salud Carlos III, Madrid
1	SVV40	Esquistosomosis	Instituto de Salud Carlos III, Madrid
1	SVV29	Cisticercosis	Instituto de Salud Carlos III, Madrid
1	SVV7	Anisakiosis	Instituto de Salud Carlos III, Madrid
1	SVV33	Toxocarosis	Instituto de Salud Carlos III, Madrid
1	SVV50	Filariosis	Instituto de Salud Carlos III, Madrid
5	SVV10, SVV12, SVV38, SVV43, SVV48	Negativos	Instituto de Salud Carlos III, Madrid
40	S1-, S2-, S6-, SM2- - SM50-	Negativos	Voluntarios anónimos Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

3.7. Obtención de proteínas recombinantes

3.7.1. Transformación de bacterias por choque térmico

Para incorporar los plásmidos pQE recombinantes conteniendo el DNA codificante para los fragmentos de las diferentes proteínas de *S. stercoralis* (Galiano, 2016a) en células competentes bacterianas de *E. coli* M15, se siguió el protocolo descrito por Hanahan en 1983 (Hanahan, 1983).

A 50 µL de bacterias competentes se añadió 5 µL del plásmido recombinante, y esta mezcla se incubó durante 20 min a 4 °C. Transcurrido el tiempo se sometió a las bacterias al choque térmico, incubando a 42 °C durante 40 seg, y seguidamente 2 min a 4 °C. Posteriormente, se añadió 1 mL de medio LB con ampicilina y se incubó durante 90 min a 37 °C en agitación a 350 rpm. Tras la incubación se centrifugó el cultivo a 13.000 rpm durante 3 min, se descartó el sobrenadante, y el sedimento de bacterias se resuspendió en 100 µL de medio, y se sembró en placas de agar LB suplementado con el antibiótico de selección ampicilina (100 µg/mL). Las placas se incubaron 24 h a 37 °C.

Las bacterias transformantes, tras su crecimiento en el medio de cultivo selectivo, se seleccionaron mediante reacciones de PCR en un termociclador MJ Mini PTC1148 (Bio-Rad, EE.UU.) a partir de varias colonias bacterianas crecidas utilizando los siguientes cebadores: para la proteína 14-3-3 zeta (forward: ACGGATCCATGGCTGAAAATAAGGATGAAC y reverse: AGCTGCAGCCATTGGTATCAGATGTC), para la ferritina (forward: ACGGATCCATTTTAGTGATGAAGT y reverse: AGCTGCAGAGTCTTCACCAATTCC) y para la proteína antígeno principal o *major antigen* (forward: ACGGATCCATCTGATGCAGCTAT y reverse: AGCTGCAGTAGCATTGTCATCGTG). Las mezclas de reacción contenían, además de la colonia seleccionada, 10µM de cada cebador, 0,25 mM de dNTPs, tampón de PCR comercial y 1 unidad de la polimerasa Kapa2G Robust (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Las condiciones para la amplificación fueron una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C seguido de 30 ciclos de tres segmentos (30 seg a 95 °C, 15 s a 95 °C, 1 min a 52 °C y 1 min a 72 °C) y con un tiempo de extensión final de 5 min a 72 °C. La posterior visualización de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) al 1% (p/v). El DNA plasmídico recombinante se purificó utilizando el kit *Miniprep QIAprep Spin* (QIAGEN, Alemania), para su verificación mediante secuenciación en la Sección de Genómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental, SCSIE-UV. Las secuencias se analizaron utilizando los programas SeqMan Pro (Software de ensamblaje de secuencias Sanger) y SeqBuilder (Herramienta de análisis de secuencias) del paquete de software bioinformático DNASTAR v.7.0.0 (DNASTAR Lasergene® Inc.). Los marcos de lectura abiertos (ORF, *Open Reading Frame*) de las secuencias nucleotídicas se analizaron utilizando la herramienta bioinformática ExpASy (*Expert Protein Analysis System*, <http://www.expasy.org>) (Gasteiger et al., 2003), disponible *online* y gratuita, observando también *in silico* las secuencias aminoacídicas deducidas. La búsqueda de similitudes mediante alineamientos por pares en las secuencias de proteínas (*Query*) con todas las secuencias de la base de datos (*Subject*) se realizó con el algoritmo BLASTp del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (Altschup et al., 1990).

3.7.2. Inducción de la síntesis proteica

Para inducir la producción de las proteínas recombinantes en los vectores pQE, se cultivó una colonia aislada de células de *E. coli* M15 transformadas con el plásmido recombinante correspondiente en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y kanamicina (25 µg/mL), y se incubó durante toda la noche en agitación constante a 37 °C. Se tomaron 500 µL de dicho cultivo y se añadieron a 20 mL de medio LB con antibióticos, se incubó en agitación constante a 37 °C

hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5 – 0,7. Se tomó una alícuota de 500 µL de cultivo para tener un control antes de la inducción (t=0), y se añadió el inductor de la expresión IPTG (Promega, EE. UU.) a una concentración final de 1 mM al resto del cultivo, incubándose en agitación a 37 °C. Se tomaron alícuotas de 500 µL de cultivo a cada hora postinducción, para determinar el tiempo óptimo de expresión de los genes para cada proteína recombinante. Se consideró que el tiempo óptimo fue de 3 horas (t=3) después de la inducción. El cultivo de bacterias transformantes se centrifugó 3500g durante 10 min para obtener el sedimento bacteriano a partir del cual se procedió a purificar las proteínas recombinantes.

3.7.3. Purificación de las proteínas en condiciones desnaturalizantes

Para purificar las proteínas recombinantes se empleó el kit *Ni-NTA Spin Column System* (Qiagen, Alemania) que proporciona un método simple para la purificación rápida de proteínas de fusión con colas de histidina a partir de cultivos de expresión a pequeña escala. Este sistema se basa en la notable afinidad de la resina Ni-NTA hacia las proteínas recombinantes que llevan una pequeña etiqueta de afinidad que consta de 6 residuos de histidina consecutivos, la etiqueta 6xHis. La alta afinidad de las resinas Ni-NTA por las proteínas de fusión se debe tanto a la especificidad de la interacción entre los residuos de histidina y los iones de níquel inmovilizados, como a la fuerza con la que estos iones se unen a la resina NTA (ácido nitrilotriacético). Se siguió el protocolo de purificación proporcionado por el fabricante, utilizando los tampones que se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Tampones utilizados para purificar las proteínas recombinantes bajo condiciones desnaturalizantes.

Tampón	Composición
Tampón de lisis	NaH ₂ PO ₄ 0,1 M, Tris base 0,01M, Urea 8M, pH 8,0
Tampón de lavado	NaH ₂ PO ₄ 0,1 M, Tris base 0,01M, Urea 8M, pH 6,3
Tampón de elución	NaH ₂ PO ₄ 0,1 M, Tris base 0,01M, Urea 8M, pH 4,5

El sedimento de bacterias transformadas con el plásmido procedentes de 18 mL de cultivo se resuspendió en 2,5 mL de tampón de lisis con el inhibidor de proteasas *cOmplete Tablets, Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche, Suiza), se dejó en hielo por 15-30 min, y se centrifugó durante 15 min a 14.000 rpm. El sobrenadante se cargó en fracciones de 600 µL en una columna de Ni-NTA, previamente equilibrada con el mismo tampón de lisis, y se centrifugó a baja velocidad (1600 rpm) durante 5 min. De este modo, la proteína recombinante quedó

unida a la columna de Ni-NTA, y se procedió a realizar un par de lavados con el tampón de lavado (centrifugando a 2000 rpm durante 2 min) para eliminar las proteínas o residuos no unidos o que se hubieran podido unir débilmente de forma inespecífica a la columna. Finalmente se añadieron 300 μ L de tampón de elución, y se centrifugó 2 min a 2000 rpm, para obtener la proteína recombinante. Se tomó una fracción en cada uno de los pasos de la purificación para su posterior análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida.

La concentración de las proteínas recombinantes obtenidas se determinó usando el sistema comercial *Protein Assay* (Bio-Rad, EE. UU.), basado en el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se mezclaron 10 μ L de cada muestra con 200 μ L del reactivo comercial *Protein Assay* (Reactivo de Bradford) diluido 1:5 con agua Milli-Q. Se hizo una recta patrón bajo las mismas condiciones empleando concentraciones decrecientes de una dilución de 1 mg/mL a 0,01 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA, *Bovine serum albumin*, Roche, Suiza). Cada muestra se analizó por duplicado y se procedió a la lectura de absorbancia a 595 nm en un lector *iMark Microplate* (Bio-Rad, EE. UU.) utilizando el software *Microplate Manager5.0* (Bio-Rad, EE. UU.).

Las proteínas recombinantes se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en un sistema MiniProtean® Tetra Cell (Bio-Rad, EE. UU.), siguiendo los protocolos descritos previamente (Laemmli, 1970). A las muestras se les añadió 4X *Laemmli sample* (2-mercaptoetanol al 15%, glicerol al 40% (p/v), SDS al 4% en Tris HCl 250 mM ajustado a pH 6,8; conteniendo trazas (0,02%) de azul de bromofenol), y se hirvieron a 95 °C durante 5 min, utilizando un sistema *Eppendorf Thermomixer 5350 Mixer*, para asegurar la desnaturalización de las proteínas de la muestra. Se cargó cada pocillo con 15 μ g de proteína recombinante purificada en un volumen final de 40 μ L de muestra, en geles prefabricados *nUView precast* Tris-Glicina NB 4-20% (NuSep, EE. UU.), que constan de una zona superior de empaquetamiento y una zona inferior de separación en gradiente. El tampón de electroforesis utilizado fue Tris/Glicina/SDS 1X (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3).

Las proteínas recombinantes se visualizaron mediante la tinción de los geles de poliacrilamida con una solución de Azul de Coomassie al 0,1% (*Coomassie Brilliant Blue R-250*, Bio-Rad, EE. UU.) en 40% metanol, 10% ácido acético y 50% agua destilada, durante 15 min en agitación. Los geles se decoloraron con una solución de metanol 250 mL, ácido acético 50 mL, agua 200 mL. Las bandas específicas para cada proteína recombinante se compararon con marcadores de peso molecular *Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards* (Bio-Rad, EE. UU.) como referencia.

3.8. Ensayos inmunoenzimáticos

3.8.1. *ELISA* Indirecto *in house*

Para evaluar la capacidad reactiva frente a sueros de pacientes de las proteínas recombinantes y su potencial utilidad como herramienta diagnóstica se procedió a estandarizar un protocolo de *ELISA* indirecto, empleando las proteínas recombinantes, rSs14-3-3z, rSsFe y rSsMA. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó utilizando un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana (GAH) conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, EE. UU.).

Para la estandarización del *ELISA* indirecto se probaron diferentes condiciones que afectaron fundamentalmente a la concentración de las proteínas recombinantes utilizadas para el tapizado de las placas, a la solución de bloqueo, y a la dilución de los sueros de pacientes, así como de los anticuerpos secundarios, tal y como se indica en el apartado de Resultados.

De forma general, se tapizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) con las proteínas recombinantes, incubando durante toda la noche a 4 °C en un tampón de carbonato/bicarbonato de sodio (0,05M) a pH 9,6. Tras la sensibilización de la placa, se adicionaron 100 µL del tampón de bloqueo (se evaluaron distintas formulaciones, ver Tabla 7) a los pocillos y se dejaron incubar durante 1 h a 37 °C, en agitación suave (60 rpm), para ocupar los sitios en el pocillo donde el antígeno no se hubiera adherido. Se incubó con los diferentes sueros individuales durante 1 h a 37 °C, en agitación suave, para permitir las uniones antígeno-anticuerpo. Tras 3 lavados con PBS (tampón fosfato salino, fosfatos de sodio/potasio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) con Tween-20® (Bio-Rad, EE.UU.) (PBST), el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana (GAH, *Goat anti-IgG Human*, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), acoplado a peroxidasa, se incubó durante 1 h a 37 °C, en agitación suave. Las diluciones de los sueros y del anticuerpo secundario se realizaron con el tampón de bloqueo. Tras cada incubación se realizaron tres lavados con la solución de lavado.

Las placas se revelaron con una solución conteniendo el cromógeno diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich, EE. UU.) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), como sustrato de la enzima peroxidasa de rábano (HRP, *Horseradish peroxidase*) conjugada con el anticuerpo secundario GAH (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Se incubó la placa durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad y se detuvo finalmente la reacción con 3N de ácido clorhídrico (HCl). Finalmente, se procedió a leer la placa en un lector *iMark Microplate* (Bio-Rad, EE. UU.), a una longitud de onda de 490 nm, utilizando el software *Microplate Manager 5.0* (Bio-Rad, EE. UU.).

El punto de corte o valor de *Cut off* se determinó graficando la curva *ROC* (Curva característica operativa del receptor), y considerando el área bajo la curva (*AUC*) para determinar la eficiencia de la prueba para discriminar pacientes con o sin la enfermedad, y el Índice de Youden, para determinar el punto de corte donde la sensibilidad y especificidad son más altas conjuntamente (Cerdeira & Cifuentes, 2012).

Cada curva *ROC* se construye trazando los valores de % Sensibilidad (Tasa de verdaderos positivos) en el eje de ordenadas, y $100\% - \%$ Especificidad (Tasa de los falsos positivos) en el eje de abscisas. Ambos ejes van del 0% al 100%, y se basa en la unión de los posibles puntos de corte (*Cut off*) correspondientes a los valores probados de la prueba diagnóstica. También se puede observar una línea diagonal trazada a modo de referencia desde el punto 0,0 al punto 100,100, que recibe el nombre de diagonal de referencia o línea de no-discriminación, una curva *ROC* que siga esta línea indicaría que la prueba diagnóstica produce tanto resultados falsos positivos como verdaderos positivos, lo que indicaría que la prueba diagnóstica es incapaz de discriminar entre enfermos y sanos; por lo que se espera que una buena prueba diagnóstica con una precisión razonable tenga la curva en el triángulo superior izquierdo sobre la diagonal de referencia (Hoo et al., 2017).

Otra herramienta estadística para determinar la validez de la prueba diagnóstica, para discriminar pacientes con y sin la enfermedad a lo largo de todo el rango de puntos de corte posibles, es la determinación del área bajo la curva. Considerando a la diagonal de referencia antes mencionada, una prueba diagnóstica tendrá mayor capacidad discriminativa en la medida que sus puntos de corte grafiquen una curva *ROC* lo más alejada posible de esta diagonal de referencia. En otras palabras, la curva debería estar lo más cerca posible del lado izquierdo y superior del gráfico. Por ejemplo, si la curva *ROC* coincide con la diagonal de referencia, cuya $AUC=0,50$, se considera no discriminativa; mientras que si se va acercando al valor de $AUC=1,00$, mayor será su capacidad discriminativa (Cerdeira & Cifuentes, 2012).

El Índice de Youden (I. Y.) es un parámetro que identifica el punto de corte donde se consideran los valores de sensibilidad y especificidad más altos conjuntamente, se realiza el cálculo de la siguiente manera: sensibilidad + especificidad -1; pero gráficamente lo podemos ver como el punto de la curva más cercano al punto 0,100; es decir, cercano al lado más superior e izquierdo de la gráfica (Bewick et al., 2004; Cerdeira & Cifuentes, 2012). Todos los gráficos y los análisis estadísticos se realizaron con el software *GraphPad Prism v9* para Windows (GraphPad Software, EE. UU., www.graphpad.com).

Se consideró el índice Kappa (κ) (Cohen, 1960) para evaluar el grado de concordancia entre el kit comercial *Strongyloides* IgG *ELISA* (DRG International Inc., EE. UU.) y nuestra técnica de *ELISA* indirecta *in house* sobre las mismas muestras. El coeficiente kappa (κ) toma valores entre -1 y +1; mientras más cercano a +1, mayor es el grado de concordancia (Cerdeira & Villarroel, 2008).

La interpretación del coeficiente kappa se realiza correlacionando su valor con una escala cualitativa que incluye seis niveles de fuerza de concordancia, tal y como se muestra en la Tabla 3, propuesta por (Landis & Koch, 1977).

Tabla 3. Valoración del índice Kappa.

Índice Kappa (κ)	Fuerza de la Concordancia
<0,00	Sin acuerdo
0,00 – 0,20	Insignificante
0,21 – 0,40	Mediano
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Considerable
0,81 – 1,00	Casi perfecta

3.8.2. *ELISA* indirecto para la detección de IgG en ratones inmunizados

Para determinar el nivel de anticuerpos IgG de los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes de *S. stercoralis*, frente a la infección con *S. venezuelensis*, se midieron los niveles séricos de anticuerpos IgG anti-14-3-3z, e IgG anti-MA individualmente para cada ratón por duplicado, mediante un ensayo de *ELISA* indirecto, usando la proteína recombinante correspondiente como antígeno de recubrimiento. El protocolo de *ELISA* seguido se describe de la siguiente manera, se recubrieron placas de poliestireno de 96 pocillos con 2 μ g de los antígenos de *S. stercoralis* (rSs14-3-3z y rSsMA) en tampón de carbonato-bicarbonato (pH 9,6) y se incubó durante la noche a 4 °C. Las placas recubiertas se lavaron tres veces con PBST al 0,05% (Bio-Rad, EE.UU.), y los sitios sin recubrir se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en PBST durante 1 h a 37 °C. Se agregaron 100 μ L de los sueros de los ratones, diluidos 1/100 en PBST, a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Las placas se lavaron tres veces con PBST y luego se incubaron con 100 μ L de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Sigma-Aldrich, EE. UU.), diluido 1/2000, como anticuerpo secundario. Tras el revelado añadiendo el sustrato, la absorbancia se midió a 490 nm utilizando un lector *iMark™ Microplate* (Bio-Rad, EE. UU.) con el software *Microplate Manager5.0* (Bio-Rad, EE. UU.).

3.9. Ensayo Colorimétrico MTT

Para evaluar las posibles propiedades citostáticas/citotóxicas de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* en ensayos *in vitro* con células derivadas de macrófagos Raw Blue™, se utilizó el ensayo colorimétrico MTT, el cual es una técnica colorimétrica utilizada para medir la actividad metabólica celular y, con ello, evaluar la viabilidad celular, la proliferación y/o la citotoxicidad (Kumar et al., 2018). Se ensayaron diferentes concentraciones de proteínas recombinantes y diferentes tiempos de tratamiento.

Este ensayo, se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT), compuesto soluble en agua y de color amarillo perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, formando un compuesto coloreado de color azul-violeta e insoluble en agua llamado formazán (Figura 8), que puede cuantificarse utilizando un disolvente orgánico, como dimetilsulfóxido (DMSO). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Kumar et al., 2018).

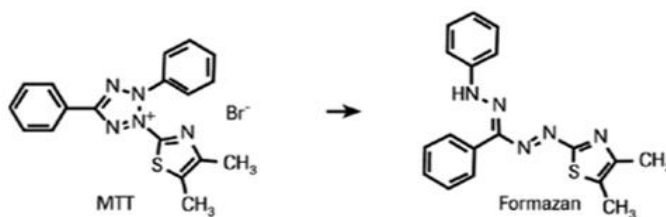


Figura 8. Metabolización de MTT a una sal de formazán realizada por las células viables.

Se crecieron células en placas de poliestireno para cultivo celular de 96 pocillos con fondo plano (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.). En cada pocillo se sembraron 2×10^4 células en 100 μ L de medio Gibco™ DMEM (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) y se incubaron durante 72 h a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂. Se cambió de medio y se expusieron a diferentes tratamientos con cada proteína recombinante a concentraciones finales de 25, 100, 250, 500 o 1000 ng/mL, durante 24, 48 y 72 h en atmósfera de 5% CO₂ a 37 °C (Tabla 4).

Tabla 4. Esquema del ensayo de efecto citostático/citotóxico MTT en la placa de 96 pocillos con las proteínas recombinantes 14-3-3z, *Major Antigen* (MA) y Ferritina (Fe) de *S. stercoralis*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Control (Sólo medio DMEM: 100µl)	rSs14-3-3z 25 ng/mL	rSs14-3-3z 100 ng/mL	rSs14-3-3z 250 ng/mL	rSsMA 25 ng/mL	rSsMA 100 ng/mL	rSsMA 250 ng/mL	rSsFe 25 ng/mL	rSsFe 100 ng/mL	rSsFe 250 ng/mL
B										
C										
D										
E		rSs14-3-3z 500 ng/mL	rSs14-3-3z 1000 ng/mL	rSs14-3-3z 0 ng/mL	rSsMA 500 ng/mL	rSsMA 1000 ng/mL	rSsMA 0 ng/mL	rSsFe 500 ng/mL	rSsFe 1000 ng/mL	rSsFe 0 ng/mL
F										
G										
H										

Para todos los ensayos colorimétricos, se incluyeron dos controles: un control de células sin tratamiento, sólo con el medio DMEM sin suero fetal, para comparar nuestros resultados en el tiempo y, un control negativo de crecimiento celular, donde se añadieron 20 µL de DMSO, un reactivo tóxico para las células. En todos los casos, los tratamientos se aplicaron por cuadruplicado, y el experimento se realizó tres veces.

Tras cada tiempo de tratamiento, se adicionaron 10 µL de MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, EE. UU.) a los pocillos y las placas se mantuvieron 4 h a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂, para que se formaran los cristales de formazán (Figura 9). Se adicionó 100 µL de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales y se midió la densidad óptica (DO) a 560 nm y a 655 nm, en un lector *iMark™* Microplate (Bio-Rad, EE. UU.), utilizando el software *Microplate Manager5.0* (Bio-Rad, EE. UU.).

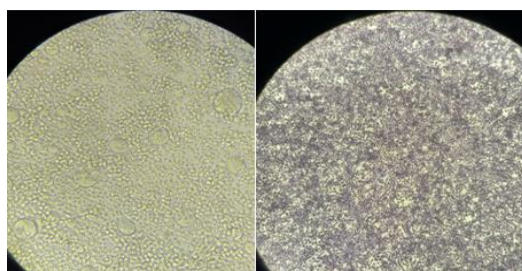


Figura 9. Células Raw Blue™ antes (izquierda) y después (derecha) de las 4 h de incubación con MTT con cristales de formazán.

Los valores finales se obtuvieron restando el valor de absorbancia a 655 nm (ruido de fondo) del valor de la absorbancia a 560 nm. Para determinar el porcentaje de actividad metabólica celular se calculó con respecto al grupo de control sin tratamiento.

3.10. Ensayo de activación de NF-κB

La activación de respuestas inmunitarias incluye procesos de inflamación donde participan macrófagos, y donde el factor de transcripción NF-κB se considera clave en este proceso. Una vez activados, los dímeros de NF-κB libres se trasladan al núcleo estimulando la transcripción de genes de citoquinas proinflamatorias (Lawrence, 2009). La línea celular RAW Blue™ (InvivoGen, EE. UU.), derivada de macrófagos RAW 264.7 de ratón, contiene un gen indicador de la fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP) que se expresa bajo el control del promotor del factor transcripcional NF-κB.

El ensayo de QUANTI-Blue™ (InvivoGen, EE. UU.) es un ensayo colorimétrico que, en presencia de SEAP secretada al medio de cultivo, cambia el color de la solución QUANTI-Blue™ de rosa a violeta/azul. La intensidad del color púrpura/azul refleja la actividad de la fosfatasa alcalina (Figura 10), por lo que los niveles de fosfatasa alcalina se pueden determinar cualitativamente a simple vista o cuantitativamente usando un espectrofotómetro y midiendo la absorbancia a 650 nm.

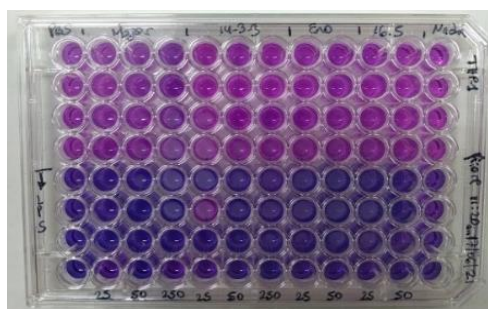


Figura 10. Imagen de una placa de ensayo QUANTI-Blue™. Se muestra el cambio de coloración de rosa a azul/violeta. En la parte inferior se observan células estimuladas con LPS, más azules debido a que tienen mayor actividad de la SEAP.

Para determinar si las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* tenían algún efecto sobre las células de macrófago de ratón, se midió la actividad de la fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP) secretada al medio de cultivo mediante el ensayo de QUANTI-Blue™ (InvivoGen, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se cultivaron 2×10^4 células RAW Blue™ /pocillo en 100 µL de medio en placas de poliestireno para cultivo celular de 96 pocillos con fondo plano, durante 72 h a 37 °C en ambiente de 5% de CO₂, y posteriormente se lavaron con PBS filtrado (filtros 0,22 µm, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Se añadió medio libre de suero fetal bovino, y se trató con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* K12 (InvivoGen, EE. UU.), como estimulante de macrófagos (implicados en inflamación), a una concentración final de 300

ng/mL durante 1h. Se adicionaron distintas concentraciones de las proteínas recombinantes según el esquema de la tabla 5, y se incubó durante 24 h a 37 °C en un ambiente de 5% de CO₂. Se contó con un control de activación, al que se adicionó solamente LPS (300 ng/mL). Se mezclaron 20 µL del sobrenadante del cultivo celular con 180 µL de solución QUANTI-Blue™, y se incubó a 37 °C durante 2 h en una nueva placa de 96 pocillos. La absorbancia se midió a 650 nm en un lector *iMark™ Microplate* (Bio-Rad, EE. UU.), utilizando el software *Microplate Manager5.0* (Bio-Rad, EE. UU.). Se calculó la actividad “antiinflamatoria” normalizando los valores de A_{650nm} de las células tratadas con las proteínas recombinantes con los valores de las células control que se trataron con LPS (ΔA_{650nm}).

Para la determinación de la actividad “proinflamatoria”, se realizó el mismo procedimiento, pero sin adicionar previamente LPS (Tabla 5). En este caso, los resultados de la actividad de NF-κB son directamente proporcionales a la actividad de la SEAP, y la actividad de la SEAP es proporcional a la absorbancia. De modo que a mayor absorbancia mayor es la actividad del factor transcripcional NF-κB.

En ambos casos, los datos se obtuvieron a partir de 3 ensayos independientes de los tratamientos, con 4 réplicas cada uno.

Tabla 5. Esquema del Ensayo QUANTI-Blue™.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Control	rSs14-3-3z 50 ng/mL	rSs14-3-3z 250 ng/mL	rSs14-3-3z 500 ng/mL	rSsMA 50 ng/mL	rSsMA 250 ng/mL	rSsMA 500 ng/mL	rSsFe 50 ng/mL	rSsFe 250 ng/mL	rSsFe 500 ng/mL
B										
C										
D										
E	Control LPS	rSs14-3-3z 50 ng/mL LPS	rSs14-3-3z 250 ng/mL LPS	rSs14-3-3z 500 ng/mL LPS	rSsMA 50 ng/mL LPS	rSsMA 250 ng/mL LPS	rSsMA 500 ng/mL LPS	rSsFe 50 ng/mL LPS	rSsFe 250 ng/mL LPS	rSsFe 500 ng/mL LPS
F										
G										
H										

3.11. Ensayo de inmunización en ratones CD1 con proteínas recombinantes de *S. stercoralis*

Para los ensayos de inmunización (siguiendo las pautas éticas de la USAL, ver apartado 3.5.), se utilizaron un total de 35 ratones hembra CD1 de 8 semanas de edad, los cuales se dividieron aleatoriamente en cinco grupos experimentales denominados como: grupo control (ni inmunizados ni infectados; n = 3); control de infección (infectados con *S. venezuelensis*; n = 8); control ADAD (control del adyuvante adaptado de vacunación, inmunizados solo con ADAD e

infectados; n = 8); grupo rSs14-3-3z (inmunizados con rSs14-3-3z en ADAD e infectados; n = 8); y grupo rSsMA (inmunizados con rSsMA en ADAD e infectados; n = 8) (Figura 11). Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea con 10 µg de la proteína recombinante correspondiente emulsionada en el sistema de vacunación (ADAD), que contiene una combinación de saponinas no hemolíticas de *Quillaja saponaria* (Qs, Sigma-Aldrich, EE. UU.) y un inmunomodulador diamina sintético AA0029 [terc-butilo (1-aminohexadecan-2-il) carbamato] emulsionados en un aceite no mineral Montanide™ ISA 763 AVG (SEPPIC, Francia), obteniéndose una emulsión agua/aceite en proporción 30/70 que se inyecta por vía subcutánea, para obtener una entrega a largo plazo (Martínez-Fernández et al., 2004; Vicente et al., 2015).

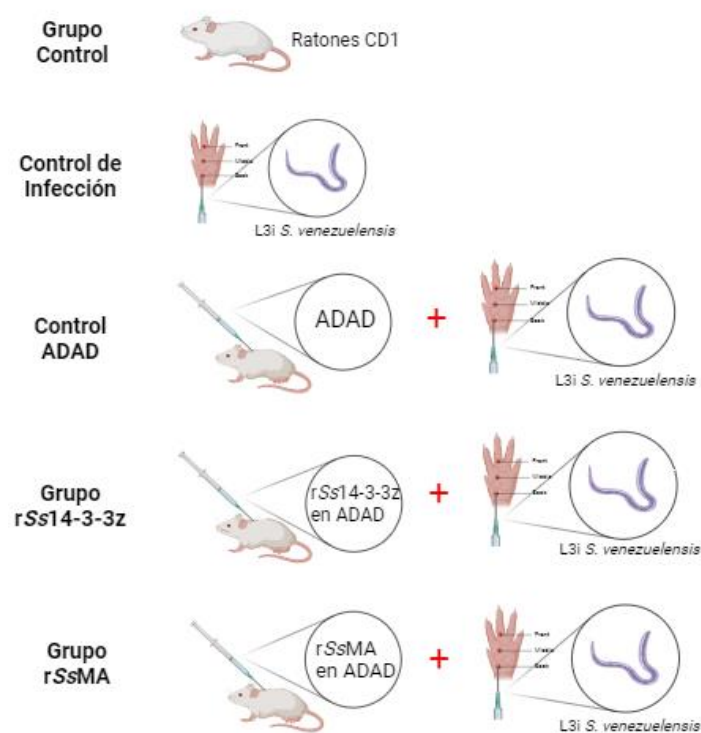


Figura 11. Grupos de animales que constituyeron los ensayos de inmunización.
Creado con BioRender.com

Se administró una dosis de refuerzo dos semanas después de la primera inmunización. Diecisiete semanas después de la segunda inmunización, los animales fueron infectados con 3000 larvas L3i de *S. venezuelensis* por vía subcutánea (Figura 12). ADAD es un sistema adyuvante de administración a largo plazo, por lo tanto, se aumentó el intervalo de exposición a la vacunación para evitar la interferencia del adyuvante descrito anteriormente (Vlaminck et al., 2010). Además, para una vacuna es necesario un amplio intervalo vacunación-desafío, ya que, en un caso ideal, la inmunidad debería permanecer durante mucho tiempo.

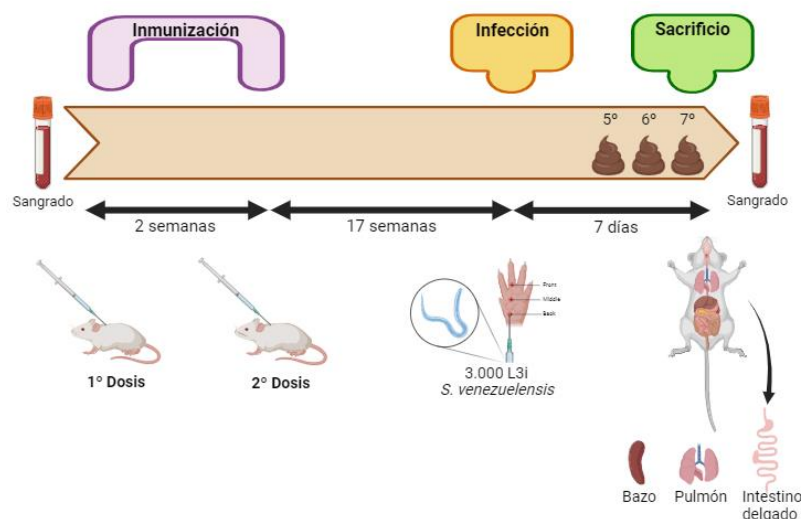


Figura 12. Esquema del diseño experimental del ensayo de inmunización con las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* frente a la infección experimental con *S. venezuelensis*. Creado con BioRender.com

Las muestras de sangre de cada ratón se tomaron al inicio y al final del ensayo para analizar la respuesta inmunitaria humoral. Los sueros se almacenaron a -20°C hasta su uso. Tras la eutanasia con pentobarbital (100 mg/kg) (Legarda-Ceballos et al., 2016) y disección de los ratones CD1, se tomaron muestras de intestino, bazo, y pulmón. La mitad superior del intestino delgado se colocó en una copa de sedimentación, envuelta por 8 capas de gasa en PBS, durante 2 h a 37°C , siguiendo el protocolo de Legarda-Ceballos y colaboradores, y se determinó el número de hembras partenogenéticas recuperadas del intestino delgado (Legarda-Ceballos et al., 2016). Los bazos e intestinos colectados tras la eutanasia se pesaron para calcular la proporción de peso del órgano con respecto al cuerpo (índices esplénico e intestinal). Parte de las muestras de los tejidos fueron conservadas en solución de *RNAlater* para posteriores estudios moleculares (Mei et al., 2020) y el resto se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para estudiar el potencial de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* en la protección de los ratones frente a la infección con *S. venezuelensis*, inicialmente se determinó el número de huevos liberados por gramo (HPG) de heces los días 5, 6 y 7 después de la infección, como un indicador de la carga helmíntica en el intestino delgado. Para ello, las muestras de heces se recogieron colocando cada ratón sobre rejillas con papel absorbente limpio y húmedo (Legarda-Ceballos et al., 2016). Se recogieron las muestras fecales, por triplicado, de cada ratón, y se conservaron en una solución tamponada de formalina al 10% v/v hasta su visualización utilizando un microscopio. El número HPG de heces se determinó utilizando la técnica de McMaster (Gibbons et al., 2011).

3.12. Extracción del RNA total y obtención del cDNA

A partir de células Raw BlueTM: se colectaron hasta 1×10^7 células cultivadas en placas de cultivo de 6 pocillos usando Tripsina-EDTA (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) al 0,25% durante 5 min de incubación a 37 °C, y se recuperaron mediante centrifugación a 6000 g x 1 min, se eliminó el sobrenadante, y el sedimento de células se lisó mediante la adición del tampón de lisis, suministrado en el kit, que contiene isotiocianato de guanidina, agente desnaturizante que inactiva las RNAsas para garantizar el aislamiento del RNA intacto.

A partir de órganos de ratones CD1: se pesaron 25 mg del tejido correspondiente de cada ratón, se cortaron en trozos pequeños, y con ayuda de un pistón acoplado a un taladro eléctrico, se homogenizaron los tejidos en microtubos tipo Eppendoff de 1,5 mL conteniendo tampón de lisis.

El RNA total de las muestras se extrajo utilizando el sistema comercial *Total RNA Spin Plus Purification* (Real Life-Science Solutions, España), que permite aislar el RNA total del tejido, libre de DNA genómico, gracias a la filtración del material obtenido a través de dos columnas *MiniSpin* que presentan una membrana de silicio, la primera elimina la mayor cantidad de DNA genómico sin necesidad de digestión con DNAsa, y la segunda permite la unión del RNA siguiendo el protocolo específico para tejidos y células proporcionado por el fabricante. Brevemente, los tejidos se lisaron en un tampón de lisis conteniendo inhibidor de proteasas *cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche, Suiza), que presenta una capacidad inhibidora de amplio espectro frente a las actividades serín- y cisteín-proteasas. La sal caotrópica incluida en el tampón de lisis inactiva inmediatamente las RNAsas. El lisado se añade a las columnas de eliminación de DNA genómico y de unión al RNA y, posteriormente, en dos pasos de lavado se eliminan sales, metabolitos y componentes celulares macromoleculares. El RNA total se eluye de la columna con agua libre de nucleasas, y se almacena a – 80 °C hasta su uso.

A partir del RNA total obtenido a partir de los distintos materiales biológicos (células y tejidos) se obtuvo el DNA complementario (cDNA), mediante transcripción reversa usando el sistema comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, EE. UU.), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Este sistema viene dotado de todos los componentes necesarios para el desarrollo del protocolo: tampón de reacción, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), mezcla de cebadores aleatorios, enzima (transcriptasa reversa *MultiScribeTM*) e inhibidor de RNAsas. La reacción se realizó empleando un termociclador *Thermal Cycler C1000* (Bio-Rad, EE. UU.) de acuerdo con las siguientes condiciones: un paso inicial de 10 min a 25 °C, seguido de 120 min a 37 °C, y un paso de 5 min a 85 °C, antes de enfriar la muestra hasta 4 °C.

La concentración del cDNA se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) a 280 nm. La pureza del cDNA se determinó por la relación de las absorbancias a 260/280 nm. Generalmente se acepta una proporción aproximada de 1,8 para considerar a una muestra de DNA como “pura”. Los productos de la reacción se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

3.13. Determinación del perfil de citoquinas

Para cuantificar la expresión relativa de las principales citoquinas se empleó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) siguiendo el protocolo esquematizado en la figura 13. Esta técnica posibilita la amplificación y cuantificación al mismo tiempo del producto amplificado, debido a la emisión de fluorescencia producida (incorporada en sondas marcadas). La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de DNA amplificado y, por tanto, a la cantidad de cDNA presente en la muestra (Costa, 2004).

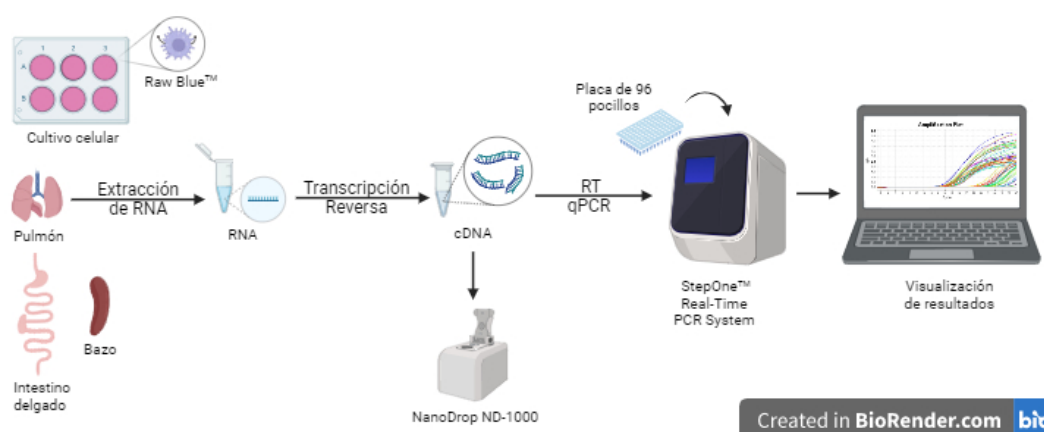


Figura 13. Esquema del protocolo para analizar la expresión de citoquinas a partir de órganos y cultivo celular mediante RT-qPCR. Creado con BioRender.com

Se realizó RT-qPCR a partir de los lisados de células Raw Blue™ estimuladas con 300 ng/mL de LPS, y tratadas con las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* a una concentración de 500 ng/mL: rSs14-3-3z, rSsFe y rSsMA, incluyendo un control sin tratamiento, durante 24, 48 y 72 h, en las mismas condiciones descritas anteriormente en el apartado 3.12.

Asimismo, en los ensayos de vacunación, se realizó PCR cuantitativa a partir del cDNA de los bazo, pulmones e intestinos obtenidos a partir de cada grupo de los ratones CD1 del ensayo de inmunización.

Los mRNAs de las citoquinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13 IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25 y NOS2 se analizaron mediante RT-qPCR utilizando el sistema *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems, EE. UU.), el cual contiene los pares de cebadores específicos para cada citoquina, y la sonda marcada con un fluorocromo 6-FAM™ (Tabla 6).

Tabla 6. Ensayos de expresión génica TaqMan™ usadas en la RT-qPCR.

Gen	Referencia del ensayo
Control endógeno	
β -actina	Mm00607939_s1
Citoquinas	
IFN- γ	Mm01168134_m1
TNF- α	Mm00443259_g1
TGF- β	Mm01178820_m1
IL-2	Mm00434256_m1
IL-4	Mm00445259_m1
IL-5	Mm00439646_m1
IL-6	Mm00446190_m1
IL-9	Mm00434305_m1
IL-10	Mm01288386_m1
IL-12	Mm00434165_m1
IL-13	Mm00434204_m1
IL-17	Mm00439618_m1
IL-21	Mm00517640_m1
IL-22	Mm00444241_m1
IL-23	Mm00518984_m1
IL-25	Mm00499822_m1
NOS2	Mm00440502_m1

Para la RT-qPCR, se utilizaron 40 ng de cDNA a los que se añadieron 10 μ L de *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix*, 1 μ L del ensayo de expresión génica específico en un volumen de reacción final de 20 μ L. Para realizar las reacciones de amplificación en placas de 96 pocillos, se empleó el *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EE. UU.) con las condiciones citadas a continuación: un paso inicial de 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C y 40 ciclos de desnaturalización de 15 s a 95 °C y 1 min de templado/extensión a 60 °C. En cada placa se analizó por duplicado un control endógeno, un control negativo y las muestras de estudio.

El valor del ciclo umbral (Ct) se calculó para los diferentes ensayos realizados. Para estimar el nivel de expresión de las citoquinas, se utilizó un método de cuantificación comparativo (método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak & Schmittgen, 2001), que puede ser usado para determinar cambios relativos en la expresión génica, y se basa en el hecho de que la diferencia en los ciclos umbral (ΔCt) entre el gen de interés y el gen constitutivo (control endógeno) es proporcional al nivel de expresión relativo del gen de interés (Klein, 2002).

La cuantificación se realizó utilizando β -actina como gen constitutivo y control endógeno, y así poder normalizar las posibles diferencias procedentes del proceso de extracción de RNA y/o síntesis de cDNA entre las distintas muestras. Se calculó la cuantificación relativa, expresada como *fold change*, de la expresión de las citoquinas en las muestras analizadas. La variación en la expresión del gen de interés se normalizó con respecto a β -actina y se relativizó frente a su expresión en los controles (Livak & Schmittgen, 2001). Los datos se analizaron siguiendo el método Livak antes mencionado, donde $\Delta\Delta Ct$ se halla con la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\beta\text{-actina}})_{\text{Grupo tratado}} - (Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\beta\text{-actina}})_{\text{Grupo control}}$$

3.14. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM). Se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) unidireccional y bidireccional, test paramétrico que requiere la distribución normal de los datos en cada grupo y la existencia de homocedasticidad entre los grupos de la variable independiente, para lo cual se empleó el test de Shapiro-Wilks. Cuando el test ANOVA revela la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados se aplicó la prueba de comparaciones múltiples Post hoc de Tukey. Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con el software *GraphPad Prism v9* para Windows (GraphPad Software, EE. UU., www.graphpad.com). Las pruebas utilizadas se indican en la leyenda de cada figura. Todos los análisis estadísticos se consideraron significativos con un valor de $p < 0,05$, y los valores representados por $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ y $****p < 0,0001$.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* candidatas para su evaluación en ensayos de diagnóstico e inmunización

La producción de las proteínas recombinantes se realizó a partir de los plásmidos previamente clonados con el DNA codificante para fragmentos de las proteínas rSs14-3-3z, rSsFerritina y rSsMajor Antigen en los vectores de expresión de la serie pQE30-32 (Galiano, 2016a). El DNA plasmídico se obtuvo a partir de las bacterias transformadas y confirmadas mediante PCR, para su secuenciación y verificación. Estas secuencias fueron depositadas en GenBank por nuestro grupo de investigación, tal y como se ha indicado en el apartado de Introducción, como parte del proyecto de investigación sobre *Identificación de proteínas de S. stercoralis con potencial diagnóstico*, que enmarca la presente Tesis Doctoral.

Para realizar el análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas obtenidas se utilizó el paquete de software bioinformático DNASTAR v.7.0.0 (DNASTAR LaserGene® Inc.), resultando en el ensamblaje de un solo *contig* para cada secuencia. Las secuencias nucleotídicas se tradujeron a proteína usando el software ExPasy (*Expert Protein Analysis System*) (<http://www.expasy.org>, Swiss Institute of Bioinformatics, SIB), y se verificó la pauta de lectura abierta (ORF, *Open Reading Frame*) para cada uno de los tres fragmentos de proteínas recombinantes rSs14-3-3z, rSsFe, rSsMA. Para analizar la homología de las secuencias proteicas se realizó un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), se alinearon y compararon los productos de la secuenciación (*Query*) con las secuencias de GenBank (*Subject*) rSs14-3-3: CEK45732.1; rSsFe: CEK45735.1; y rSsMA: CEK45729.1; observándose una identidad entre las secuencias del 100% y valores de *E-value* (*Expect*), en las tres secuencias, muy bajos, lo cual indica que los alineamientos son muy significativos.

Una vez comprobadas las secuencias aminoacídicas, se procedió a obtener las proteínas mediante el crecimiento de las bacterias transformantes en medio selectivo líquido, adicionando un inductor de la expresión, IPTG a 1mM, tal como se ha descrito en el apartado 3.7.2. Las proteínas fueron purificadas y cuantificadas obteniéndose las siguientes concentraciones: para rSs14-3-3z: 1 mg/mL, para rSsFe: 1,25 mg/mL y para rSsMA: 0,77 mg/mL. Se verificó el peso molecular de cada proteína recombinante (rSs14-3-3z: 26,5 kDa; rSsFe: 17,7 kDa; rSsMA: 26,7 kDa) mediante SDS-PAGE (Figura 14).

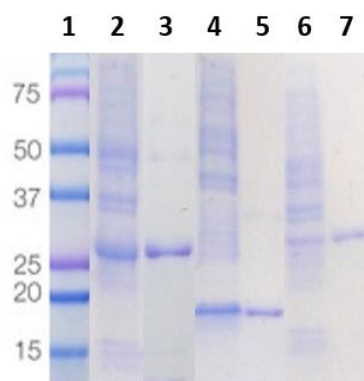


Figura 14. Obtención de las proteínas recombinantes. Mediante SDS-PAGE se observa el lisado total de bacterias con la proteína inducida y la proteína recombinante purificada: rSs14-3-3z (carriles 2 y 3), rSsFe (carriles 4 y 5) y rSsMA (carriles 6 y 7), respectivamente. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular en kDa.

4.2. Evaluación de la capacidad diagnóstica de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* mediante *ELISA* indirecto *in house*

4.2.1. Determinación de las condiciones óptimas del ensayo de *ELISA* indirecto

Para la estandarización del *ELISA* indirecto se usaron sueros de casos autóctonos provenientes de la Comarca de La Safor valenciana confirmados por microscopía para estrongiloidosis. Como sueros negativos se utilizaron los de donantes anónimos sin riesgo ni sospecha de estrongiloidosis. Se evaluaron diferentes condiciones de ensayo, que se muestran en la Tabla 7. Para evaluar la capacidad discriminativa del ensayo, es decir, el poder diferenciar entre sujetos sanos y enfermos, se estableció el punto de corte o valor de *Cut off* como la media de las lecturas para los controles negativos ± 3 veces las desviaciones estándar.

Tras múltiples ensayos, se estandarizó la prueba de la siguiente manera: placas de poliestireno de fondo plano y 96 pocillos se tapizaron con 50 μ L de proteína recombinante a una concentración final de 20 μ g/mL, en un tampón de tapizado carbonato/bicarbonato 0,05M a pH 9,6. Se incubó durante toda la noche a 4 °C.

Tabla 7. Condiciones ensayadas durante la estandarización del *ELISA* Indirecto.

Tapizado (rSs14-3-3z, rSsFe, rSsMA)	Solución de bloqueo	Sueros (Anticuerpo Primario)	Anticuerpo Secundario
Concentración: - 20 µg/mL - 10 µg/mL - 5 µg/mL - 2,5 µg/mL	BSA al: - 0,25%, - 1%, - 3%, - 5% en PBS con Tween® 20 (PBST) al 0,05%	Dilución en tampón de bloqueo: 1:25 1:50 1:100 1:200 1:400	Dilución en tampón de bloqueo: 1:5.000 1:10.000 1:20.000 1:40.000
	Leche: al 5% en PBS y al 5% en PBST 0,05%		
	Gelatina: al 1% en PBST 0,05%		
	BSA al 3% + Leche al 3% en PBST 0,1%		

Tras la sensibilización de la placa, se adicionaron 100 µL por pocillo de la solución de bloqueo (BSA al 3% + Leche al 3% en PBST 0,1%). Como anticuerpo primario se utilizaron los sueros individuales a una dilución 1:200 (por triplicado cada suero) y como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo de cabra anti-IgG humana (GAH, *Goat anti-IgG Human*), a una dilución 1:40.000. El procedimiento completo y el revelado se detalla en el apartado 3.8.1 de Material y Métodos.

En la Figura 15, se muestran los resultados obtenidos para cada caso positivo, así como para cada control negativo, frente a cada proteína recombinante, y con las condiciones del *ELISA* indirecto estandarizado. Como se puede observar, las proteínas recombinantes fueron reconocidas por la mayoría de los sueros positivos. La proteína rSs14-3-3z fue la que presentó mayor reactividad, siendo reconocida por los 15 sueros autóctonos, mientras que las proteínas rSsFe y rSsMA fueron reconocidas por 14 y 12 sueros, respectivamente. El *Cut off* o límite de positividad, se muestra en cada figura como una línea semicontinua en rojo, y ayuda a discriminar entre positivos y negativos. Las 3 proteínas presentaron una buena reactividad con los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes enfermos, y haciendo una valoración conjunta, la proteína rSs14-3-3z podría considerarse como la mejor candidata para ser usada en una prueba de *ELISA*.

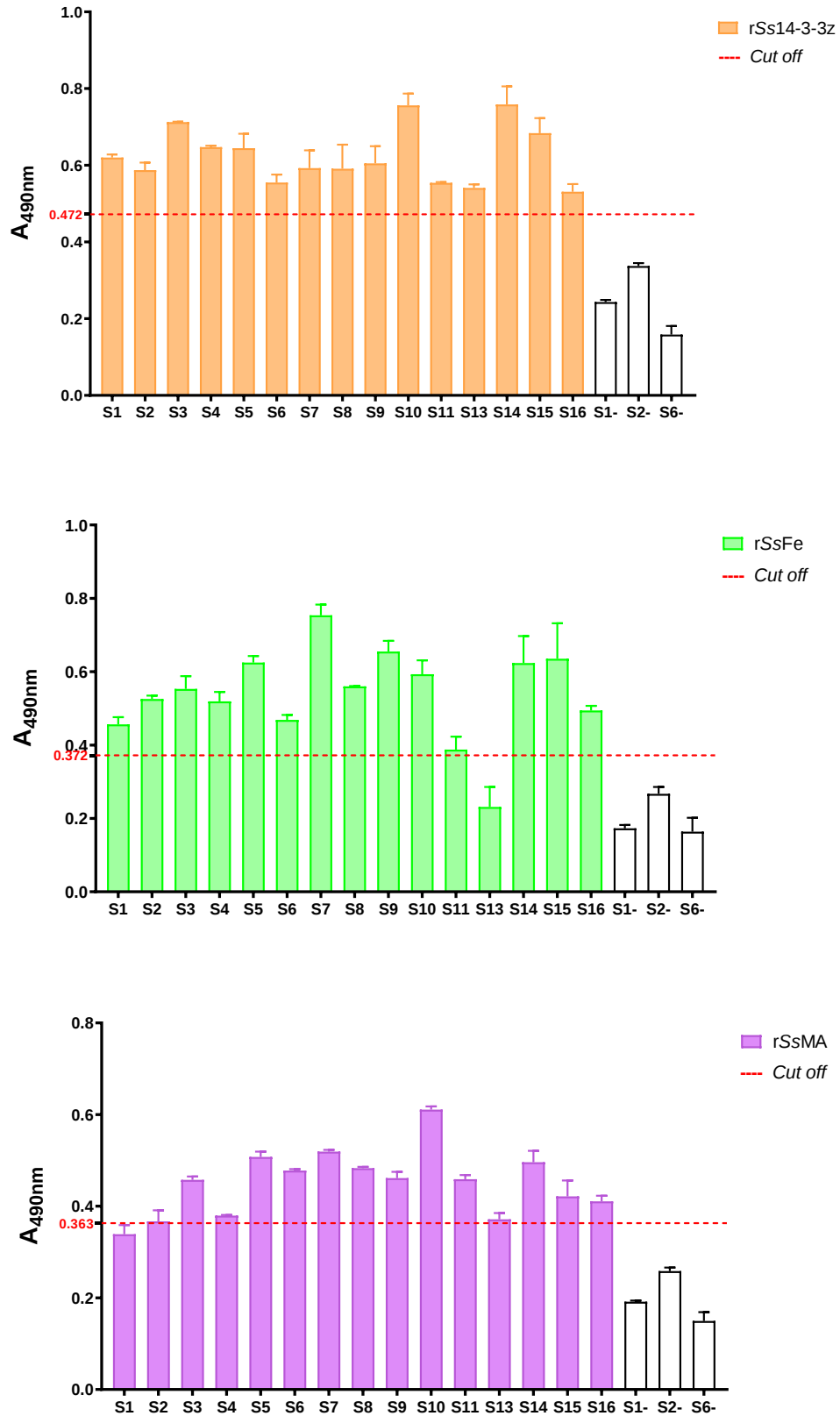


Figura 15. Ensayo *ELISA* indirecto que refleja la reactividad de los sueros autóctonos frente a las proteínas recombinantes rSs14-3-3z, rSsFe y rSsMA. Las barras en color blanco representan los controles negativos (S1-, S2- y S6-). La línea semicontinua representa el valor del límite de positividad. Las barras muestran el promedio $\pm$ SEM de los datos obtenidos por triplicado en cada muestra del ensayo.

4.2.2. Análisis de la capacidad diagnóstica de *ELISA* indirecto y estudio de su especificidad

Para analizar la capacidad diagnóstica del *ELISA* indirecto estandarizado con cada una de las proteínas recombinantes se utilizó un total de 90 sueros entre los que se encontraban: sueros positivos a estrongiloidosis autóctona de Valencia, cedido por el Hospital de la Ribera de Alzira; sueros positivos diagnosticados y sueros negativos, cedidos por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de Madrid; sueros positivos a otras parasitosis también cedidos por el ISCIII; y sueros negativos de donantes anónimos de Valencia.

Para discriminar pacientes con y sin la enfermedad, se realizó un análisis en base a las curvas *ROC* y a la determinación del área bajo la curva *ROC* (*AUC*) (Figura 16), según se ha explicado en el apartado 3.8.1., para cada proteína recombinante (rSs14-3-3z, rSsFe y rSsMA). Las curvas *ROC* fueron obtenidas representando los valores de % Sensibilidad (tasa de verdaderos positivos) respecto a tasa de los falsos positivos, y se puede observar que todas las curvas se encuentran en el triángulo superior izquierdo sobre la diagonal de referencia, indicativo de una buena prueba diagnóstica. El *AUC* fue, para todos los casos, superior a 0,5, indicando una buena capacidad discriminativa (Cerdeira & Cifuentes, 2012). Los valores de *AUC* obtenidos de mayor a menor fueron, para rSs14-3-3z (*AUC*= 0,7765), seguida por rSsFe (*AUC*= 0,7599) y, finalmente, rSsMA (*AUC*= 0,7386). El Índice de Youden (I.Y.), parámetro que identifica el punto de corte donde se consideran los valores de sensibilidad y especificidad más altos, se encuentra en el punto más alto y a la izquierda de la gráfica, tal y como se muestra en la figura 16.

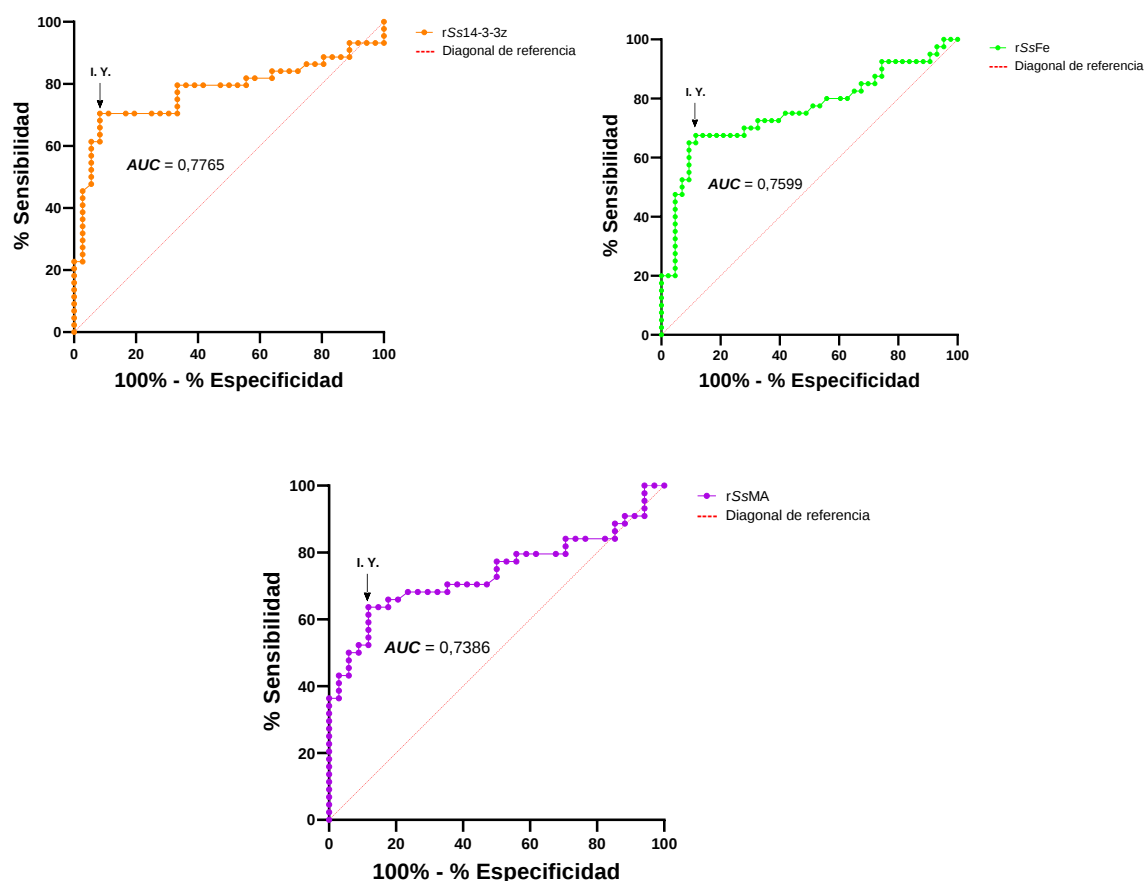


Figura 16. Curvas ROC de la prueba de ELISA indirecto realizado para cada proteína recombinante. Se muestra el valor de AUC y el índice de Youden.

En la tabla 8, se muestran los valores de límite de positividad obtenidos para cada proteína recombinante junto con su sensibilidad y especificidad, hallados por el índice de Youden, según cada curva ROC.

Tabla 8. Valores de Cut off, sensibilidad y especificidad del ensayo ELISA indirecto con cada proteína recombinante considerando el Índice de Youden en la curva ROC.

Proteína	Cut off	Sensibilidad	Especificidad
rSs14-3-3z	0,1970	70,45%	91,67%
rSsFe	0,2075	67,50%	88,37%
rSsMA	0,2513	63,64%	88,24%

Con los valores de Cut off, para cada ensayo, se analizó la reactividad de cada suero individual con respecto a cada proteína recombinante (Figuras 17, 18 y 19). Las muestras empleadas en el análisis, se clasificaron como “Con Ss” los sueros positivos a *S. stercoralis*, tanto de los casos

autóctonos valencianos como de los brindados por el Instituto de Salud Carlos III (ISCI), y como “Sin Ss” los sueros de personas negativas con el test referencia o controles negativos. Los sueros previamente tipificados por el ISCI según su test diagnóstico, se muestran con los códigos SSV01-50, entre ellos había tanto sueros positivos como negativos. Los sueros positivos de casos autóctonos confirmados por microscopía se identifican con el sufijo Au, mientras que los sueros de voluntarios negativos, están codificados con un signo negativo al final del código.

Las muestras de sueros procedentes del ISCI fueron previamente diagnosticadas como positivas o negativas utilizando el kit comercial *Strongyloides* IgG ELISA (DRG International Inc., EE. UU.).

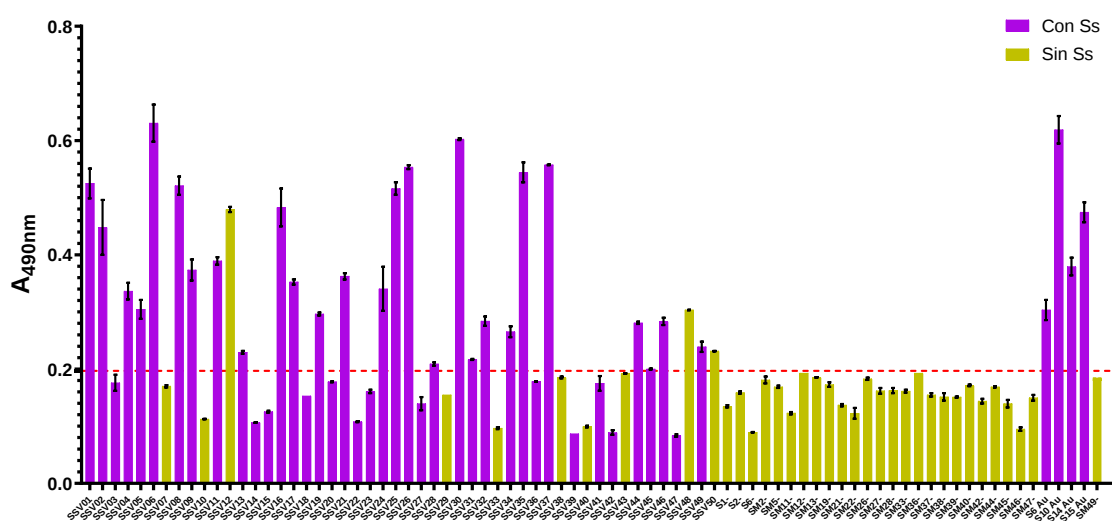


Figura 17. Análisis mediante *ELISA* indirecto *in house* utilizando como antígeno la proteína recombinante rSs14-3-3z. “Con Ss”: sueros positivos; “Sin Ss”: sueros negativos. Los sueros del ISCI se muestran con los códigos SSV01-50. Los sueros autóctonos valencianos se identifican con el sufijo Au. Los sueros de controles negativos están codificados con un signo negativo al final del código.

Según la Figura 17, en el ensayo realizado con rSs14-3-3z se reconocen como positivos a 27 sueros de los 40 que fueron diagnosticados previamente como positivos por el centro de referencia, además de los 4 sueros positivos autóctonos analizados. Los sueros diagnosticados previamente con otras helmintosis: SVV07 (anisakiosis), SVV29 (cisticercosis), SVV33 (toxocarosis) y SVV40 (esquistosomosis) dieron un resultado negativo, por tanto, en estos casos, no hubo reacción cruzada con rSs14-3-3z de *S. stercoralis*. Sin embargo, el suero SVV50, diagnosticado de filariosis, sí dio reactividad cruzada. Los sueros SSV10, SVV12, SVV38, SVV43 y SVV48 habían sido diagnosticados previamente como negativos, sin embargo, los sueros SVV12 y SVV48 dieron positivo con la proteína recombinante rSs14-3-3z y nuestro ensayo *ELISA*. Todos los sueros negativos se confirmaron como negativos.

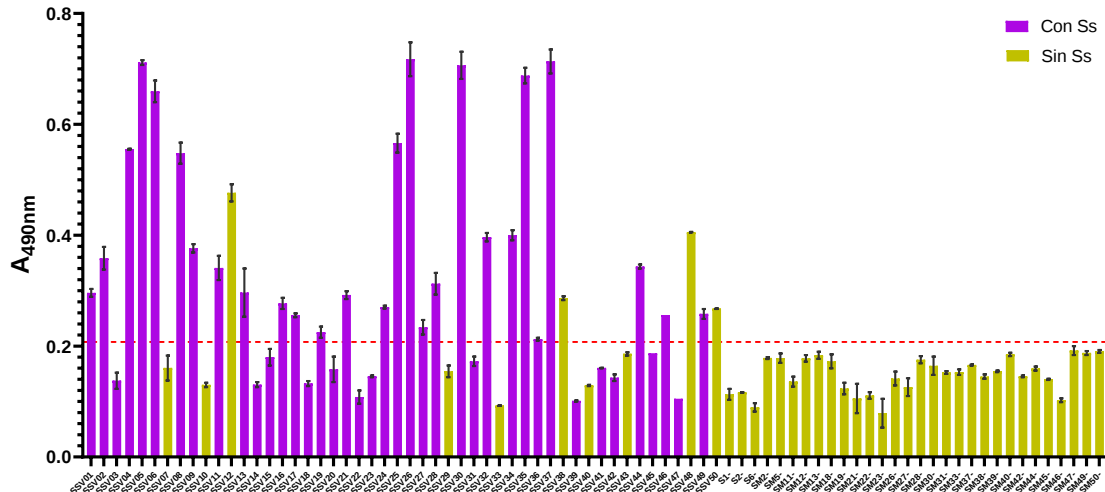


Figura 18. Análisis mediante *ELISA* indirecto *in house* utilizando como antígeno la proteína recombinante rSsFe. “Con Ss”: sueros positivos; “Sin Ss”: sueros negativos. Los sueros del ISCIII se muestran con los códigos SSV01-50. Los sueros autóctonos valencianos se identifican con el sufijo Au. Los sueros de controles negativos están codificados con un signo negativo al final del código.

Utilizando la proteína rSsFe (Figura 18) como antígeno en el *ELISA* indirecto *in house*, se reconocieron también 27 sueros de los 40 sueros dados como positivos. Con respecto a los sueros negativos a *Strongyloides*, pero positivos a otras parasitosis, pasó lo mismo que en el ensayo de *ELISA* indirecto con rSs14-3-3z, sólo se observó reactividad cruzada con el suero SVV50 de filariasis. Finalmente, solo hubo reactividad en 3 sueros de personas sin la enfermedad (SSV12, SVV38, SSV48) con la proteína recombinante rSsFe.

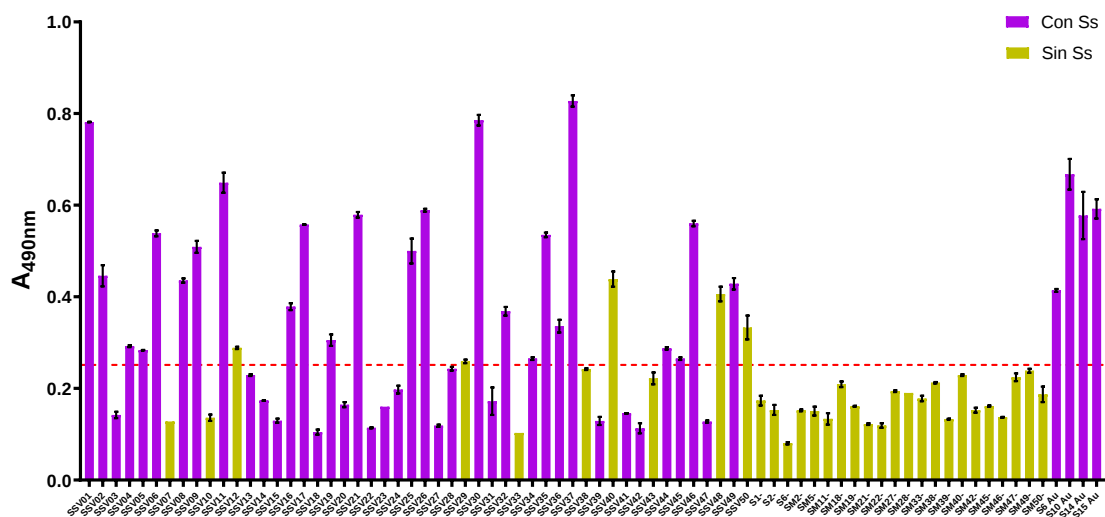


Figura 19. Análisis mediante *ELISA* indirecto *in house* utilizando como antígeno la proteína recombinante rSsMA. “Con Ss”: sueros positivos; “Sin Ss”: sueros negativos. Los sueros del ISCIII se muestran con los códigos SSV01-50. Los sueros autóctonos valencianos se identifican con el sufijo Au. Los sueros de controles negativos están codificados con un signo negativo al final del código.

Finalmente, utilizando como antígeno la proteína rSsMA (Figura 19) el ensayo proporcionó resultados positivos con 24 sueros del ISCIII. En este caso, se observaron reacciones cruzadas con tres sueros positivos para otras parasitosis: SVV29 (cisticercosis), SVV40 (esquistosomosis) y SVV50 (filariasis), y también se reconocieron como positivos, al igual que con las proteínas recombinantes anteriores, los sueros SVV12 y SVV48, considerados negativos según el ISCIII.

Según los datos obtenidos, se buscó la concordancia entre las dos técnicas de *ELISA*, la comercial empleada por el ISCIII y la realizada *in house*, mediante la determinación del índice Kappa (κ). En la Tabla 9, se muestra como ejemplo la determinación del índice κ , según Abaira (2000), con los datos obtenidos para la proteína recombinante rSs14-3-3z para las 50 muestras de sueros enviadas por el ISCIII.

Tabla 9. Valores de concordancia obtenidos para la proteína rSs14-3-3z.

Índice Kappa		Observador ISCIII		
	Observado	Con Ss	Sin Ss	Total
Observador UV	Con Ss	a = 27	b = 3	r = a+b = 30
	Sin Ss	c = 13	d = 7	s = c+d = 20
	Total	t = a+c = 40	u = b+d = 10	N = a+b+c+d = 50

Y siguiendo la ecuación, el índice de Kappa (κ) se define como:

$$\kappa = \frac{Po - Pe}{N - Pe}$$

Donde, Po: $\sum$ concordancias observadas

Pe: $\sum$ concordancias atribuibles al azar

N: Total de observaciones

Siendo,

$$Po = \frac{a + d}{N}$$

$$Pe = \frac{rt + su}{N^2}$$

Después de realizar el mismo procedimiento para las otras proteínas recombinantes los valores del índice κ obtenidos se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Índice Kappa para cada proteína recombinante.

Ensayo con la proteína recombinante	rSs14-3-3z	rSsFe	rSsMA
Índice Kappa	0,27	0,21	0,07

Según la escala de valoración del índice Kappa mostrada en la tabla 3 (Landis & Koch, 1977) del apartado 3.8.1., que incluye seis niveles de fuerza de concordancia, se considera que el grado de concordancia es mediano para los ensayos con rSs14-3-3z y rSsFe mientras que para rSsMA es insignificante.

4.3. Evaluación de las propiedades inmunomoduladoras de las proteínas rSs14-3-3z, rSsFerritina y rSsMajor Antigen de *S. stercoralis*.

Con el fin de analizar el posible efecto protector de las proteínas recombinantes en un modelo experimental de infección en ratón, inicialmente se evaluó su toxicidad y efecto inmunomodulador sobre células del sistema inmunitario, centrándonos en los macrófagos. Estas células, junto a los neutrófilos, han sido descritas como las responsables de la eliminación *in vivo* de larvas de *S. stercoralis* (Bonne-Année et al., 2013).

4.3.1 Efecto de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* sobre macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas del sistema inmunitario que participan en la respuesta efectora a nivel local desempeñando un papel crucial en la defensa contra infecciones y en la eliminación de células dañadas o muertas y contribuyendo a restaurar el tejido dañado. Dicha población celular juega un importante papel en los primeros días de las infecciones por helmintos (Regueiro-González et al., 2010).

4.3.1.1. Análisis del efecto citostático/citotóxico de las proteínas recombinantes

Para estudiar el efecto de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* sobre macrófagos de ratón, se evaluaron, en primer lugar, las propiedades citostáticas/citotóxicas de dichas proteínas mediante ensayos colorimétricos de Actividad Metabólica Celular (AMC). Para ello, se utilizaron células Raw Blue™ derivadas de macrófagos de ratón en un ensayo colorimétrico MTT *in vitro*. Esta línea celular ha sido ampliamente usada en estudios de inflamación por presentar una funcionalidad similar a la de los macrófagos *in vivo*. Se ensayaron diferentes concentraciones de proteínas recombinantes (25, 100, 250, 500 o 1000 ng/mL) y diferentes tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 h), tal y como se indica en la Tabla 4 del apartado 3.9. (Material y Métodos). Para

todos los ensayos de viabilidad celular, los tratamientos se aplicaron por cuadruplicado y el experimento se realizó tres veces.

Tras 24 h de tratamiento, se calculó el porcentaje de actividad metabólica celular para cada concentración de proteínas respecto a las células control, sin tratamiento, según lo mencionado en el apartado 3.9. En la Figura 20, se puede observar que la actividad para todas las concentraciones ensayadas se encontró entre el 75% y el 100%, por lo que se consideró que las proteínas no fueron ni citostáticas ni citotóxicas tras 24h de tratamiento.

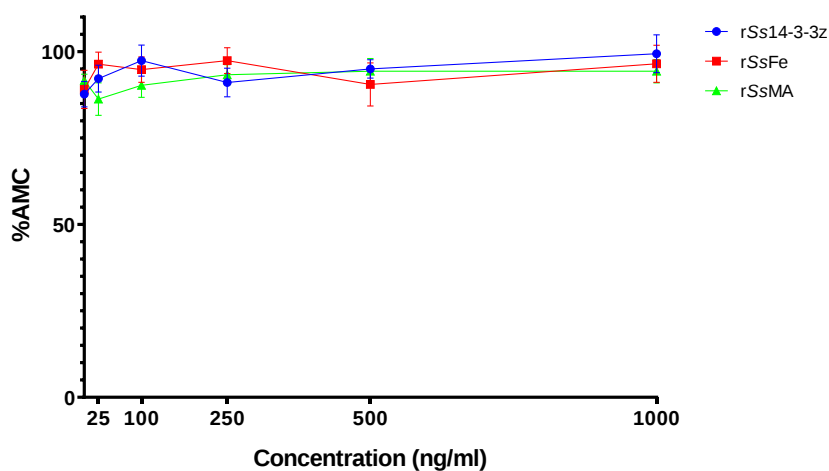


Figura 20. Curva de AMC a las 24 h de tratamiento con concentraciones crecientes de proteína.

La actividad celular también se ensayó tras 48 y 72 h de tratamiento a diferentes concentraciones de cada proteína recombinante. En la Figura 21, se refleja un ejemplo de resultados de la actividad obtenidos tras el tratamiento con las concentraciones indicadas de cada proteína recombinante a diferentes tiempos. Se incluyó un control de células de crecimiento negativo, donde se añadieron 20 μ L de DMSO, un reactivo usado como control citotóxico.

A las 48 h de tratamiento, la AMC en las células tratadas con rSs14-3-3z y con rSsMA disminuye ligeramente respecto a los valores obtenidos a las 24 h. En cambio, en las células tratadas con rSsFe, se observa una disminución del 75% de la actividad celular a las 48 h, con valores comparables con el valor obtenido para el control de células muertas. El tratamiento tras 72 h, produce un efecto mucho más notable, disminuyendo la actividad en el caso de las proteínas rSs14-3-3z y rSsFe similar a la presentada por el control de células muertas, mientras que para rSsMA la actividad celular disminuyó aproximadamente en un 40%. Por lo tanto, deducimos que tratamientos largos y a elevadas concentraciones no pueden ser utilizados dado el efecto tóxico de estas proteínas.

4.3.1.2. Respuesta de macrófagos murinos al tratamiento con proteínas recombinantes

Para investigar la respuesta de los macrófagos a las proteínas rSs14-3-3z, rSsMA y rSsFe, analizamos la producción de NF- κ B, 24 h tras su contacto con macrófagos Raw Blue™, mediante un ensayo colorimétrico con el reactivo QUANTI-Blue™. Se ensayaron 3 concentraciones de proteínas recombinantes (50, 250 y 500 ng/mL).

Según los datos obtenidos, la proteína rSsFe provoca la activación clásica de los macrófagos y promueve la inflamación, a partir de la menor de las concentraciones (50 ng/mL), mientras que las proteínas rSs14-3-3z y rSsMA provocan actividad inflamatoria a partir de los 250 ng/mL. Mayores concentraciones de la proteína rSsFe produjeron un incremento del efecto proinflamatorio (activación), aunque estos valores fueron siempre inferiores al producido por la administración de LPS (control proinflamatorio) a una concentración final de 300 ng/mL durante 1h (Figura 22).

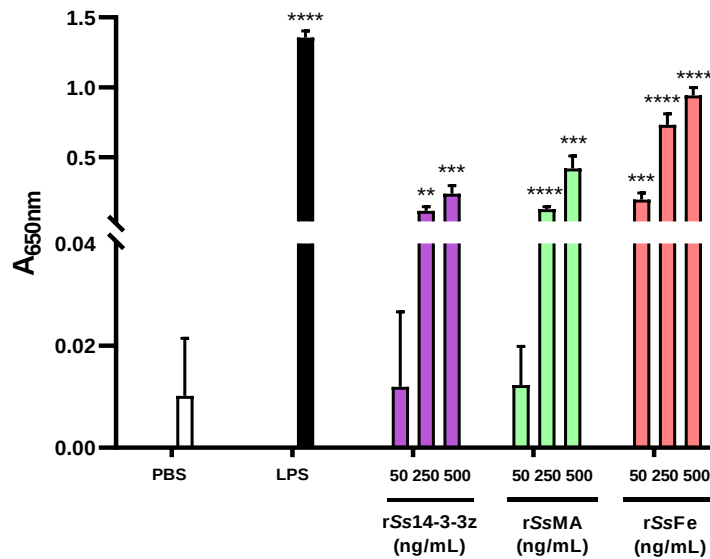


Figura 22. Estudio del efecto proinflamatorio de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* sobre las células Raw Blue™ tratadas durante 24 h. PBS fue usado como control negativo y LPS como control positivo de la activación (inflamación). PBS fue usado como control para los análisis estadísticos. Se realizó ANOVA bidireccional como análisis estadístico empleando *GraphPad Prism v9*. Los valores de *p* se muestran en la gráfica representados por **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001 y *****p* < 0,0001.

Para completar los estudios *in vitro* se investigó si, por el contrario, las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* podrían tener un efecto antiinflamatorio en los macrófagos previamente activados con LPS. Para ello, se analizó el efecto de dichas proteínas, a las mismas concentraciones utilizadas anteriormente, sobre macrófagos derivados de células Raw Blue™ previamente activados con LPS durante 1 hora, a una concentración final de 300 ng/mL, y se determinó la producción de NF-κB. Las células Raw Blue™ después de su activación con LPS muestran la formación de pseudópodos que utilizan para fagocitar agentes extraños y/o posiblemente patógenos (Figura 23).

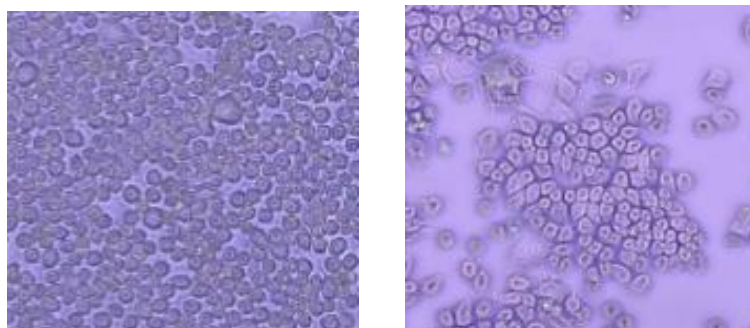


Figura 23. Células Raw Blue™ no estimuladas (izquierda) y estimuladas con LPS (derecha) durante 1 hora. Detalle de macrófagos activados con proyección de pseudópodos en la membrana.

Los resultados obtenidos reflejaron que la proteína rSsMA, a concentraciones de 50 y 250 ng/mL, tenía el mayor efecto inhibitor de la producción de NF- κ B comparando con las células control (Figura 24). En el caso de la proteína rSs14-3-3z, solo con la concentración más baja se detecta actividad inhibitoria, la cual se pierde a concentraciones mayores.

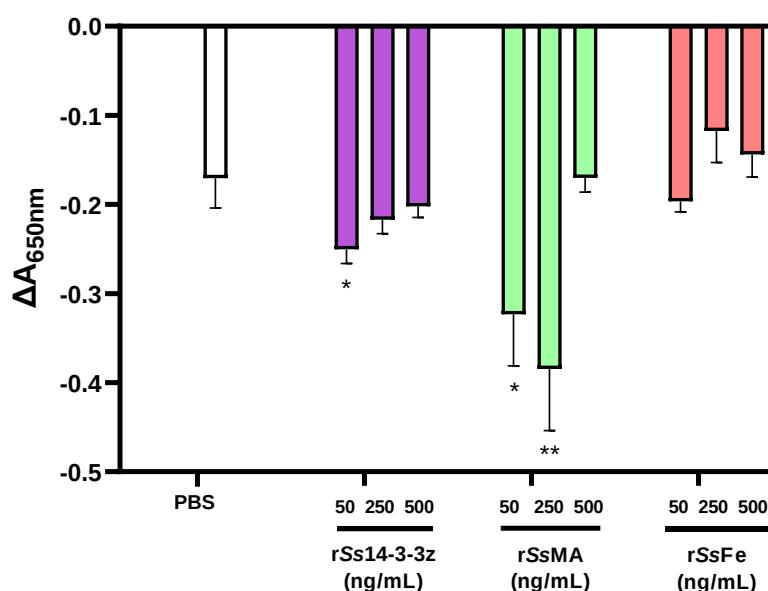


Figura 24. Estudio del efecto antiinflamatorio de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* sobre células Raw Blue™ activadas con LPS. Los resultados se expresan como la diferencia de A_{650nm} obtenida tras cada tratamiento y la A_{650nm} obtenida de las células control estimuladas con LPS. PBS fue usado como control para los análisis estadísticos. Se realizó ANOVA bidireccional como análisis estadístico empleando *GraphPad Prism v9*.

4.3.1.3. Estudio del perfil de citoquinas producidas por los macrófagos expuestos a proteínas recombinantes

Una vez confirmado el efecto sobre macrófagos en cultivo de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis*, procedimos a analizar el perfil de citoquinas de dichos macrófagos en respuesta a las mismas. Analizamos distintas citoquinas participantes en procesos pro- y antiinflamatorios (IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13 IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25 y NOS2) producidas por macrófagos previamente activados con LPS. La expresión del mRNA de estos genes se evaluó mediante RT-qPCR a partir de los cDNAs obtenidos de los lisados de células Raw Blue™ tras 24 y 48 h de tratamiento con las proteínas recombinantes, rSs14-3-3z (500 ng/mL), rSsFe (500 ng/mL) y rSsMA (500 ng/mL). Se calculó el valor del ciclo umbral (Ct) para todas las citoquinas y se obtuvieron los datos de *fold change*. Los resultados se muestran teniendo en cuenta el perfil de citoquinas para cada tipo de respuesta T cooperadora (Th).

A las 24 h, se observó un incremento en la expresión de las citoquinas TNF- α e IL-12, que participa en la producción de IFN- γ , citoquinas características de la respuesta Th 1 (Figura 25). A las 48 h del tratamiento disminuyó la expresión de la IL-12 con respecto del control, mientras que TNF- α e IFN- γ recuperaron niveles similares a los de las células control.

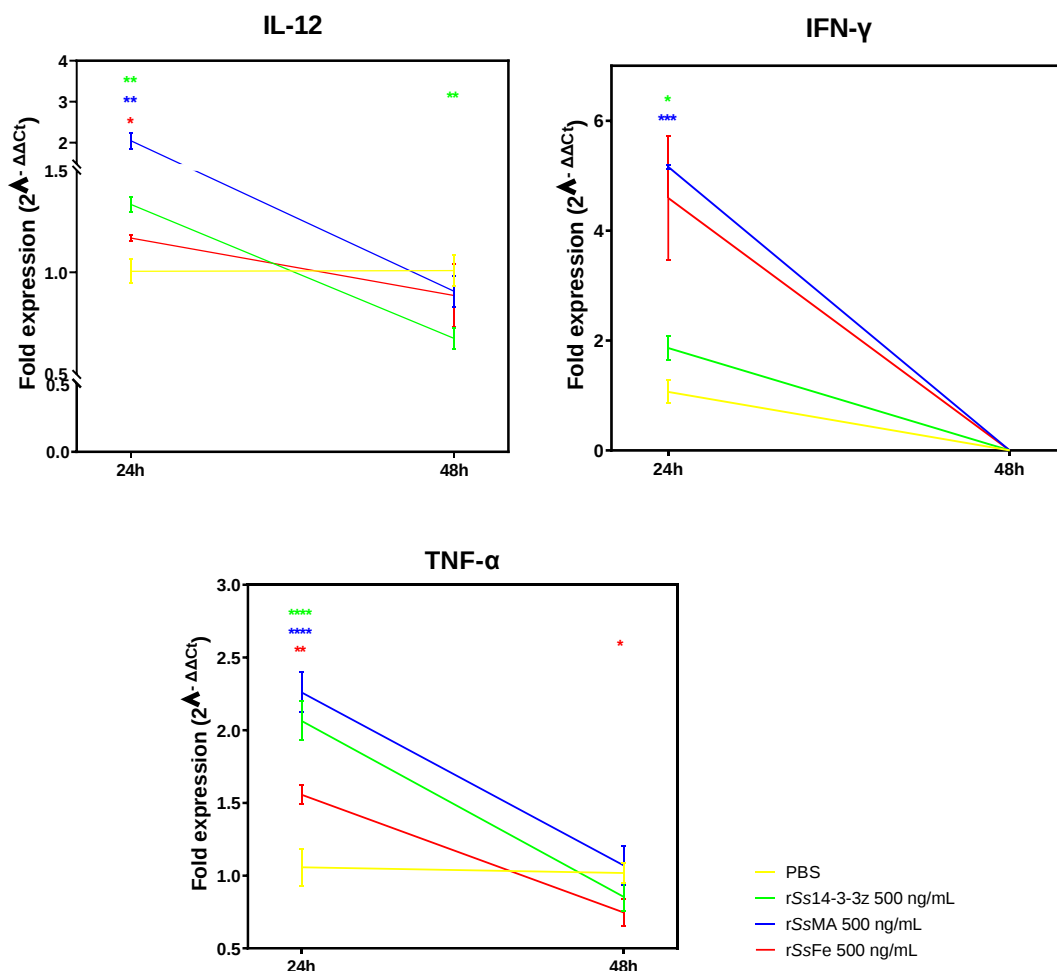


Figura 25. Perfil de citoquinas de respuesta Th1 en células Raw BlueTM tratadas con las proteínas recombinantes de *S. stercoralis*. Se realizó ANOVA bidireccional como análisis estadístico empleando *GraphPad Prism v9*. Se muestran la media y SEM a partir de los datos obtenidos por duplicado de cada muestra con su respectivo control endógeno de tres ensayos realizados independientemente. Los valores de p se muestran en la gráfica representados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Por otro lado, también se evaluó la presencia de la enzima NOS2 expresada por los macrófagos, cuyo efecto citotóxico se relaciona con la producción de óxido nítrico (NO). Pudimos observar que, a las 24 h, tanto para rSs14-3-3z como para rSsFe, se dió la mayor expresión de la enzima en comparación con el control (Figura 26), lo que indicaría una mayor activación de los macrófagos a las 24h, además de validar la producción de IL-12 mostrada en la Figura 25.

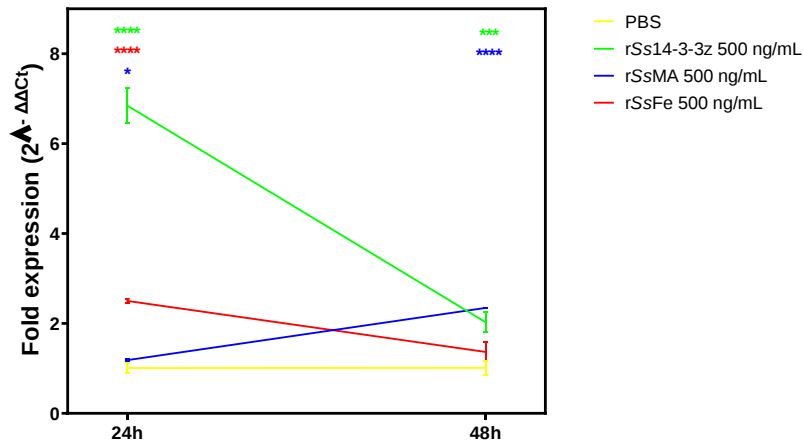


Figura 26. Expresión de NOS2 en células Raw Blue™ activadas con LPS y tratadas con las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* a diferentes tiempos. Se realizó ANOVA bidireccional como análisis estadístico empleando *GraphPad Prism v9*. Se muestran la media y SEM a partir de los datos obtenidos por duplicado de cada muestra con su respectivo control endógeno de tres ensayos realizados independientemente. Control: células Raw Blue™ activadas con LPS (300 ng/mL) sin tratamiento con las proteínas recombinantes. Los valores de *p* se muestran en la gráfica representados por **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001 y *****p* < 0,0001.

Las células tratadas con las proteínas recombinantes también expresaron citoquinas de la respuesta Th2, tales como IL-5, IL-6 e IL-10 a pesar de la expresión del IFN-γ, el cual es antagonista de la expresión de este tipo de citoquinas. Tras 24 h de tratamiento, las células tratadas con rSs14-3-3z y rSsFe incrementaron la expresión de IL-5 e IL-6; y la expresión de la IL-10 a las 48 h de tratamiento. Las células tratadas con rSsMA incrementaron la expresión de las tres citoquinas a las 24 h (Figura 27).

La expresión de TGF-β se incrementó a las 24 h en las células tratadas con las proteínas rSs14-3-3z y rSsMA. TGF-β e IL-10 son consideradas como citoquinas reguladoras, orientadas a un tipo de respuesta T reguladora frente a la infección por helmintos y que antagonizan las actividades de las citoquinas de tipo 1. Adicionalmente, para que exista una orientación hacia este tipo de respuesta tienen que estar presentes tanto la IL-10 como TGF-β, la expresión de ambas citoquinas se detectó en las células tratadas con las tres proteínas recombinantes, aunque a diferentes tiempos de tratamiento.

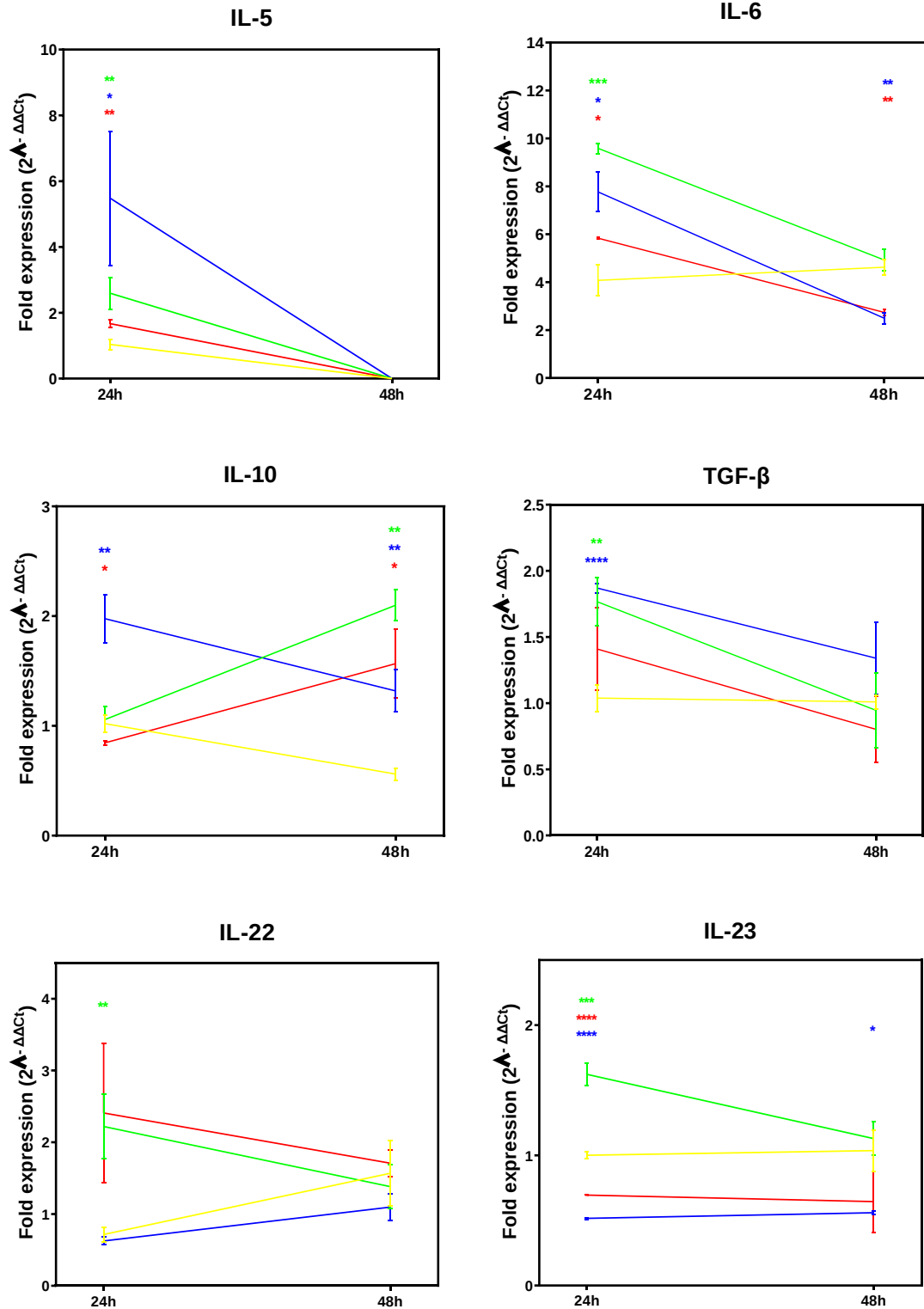


Figura 27. Perfil de citoquinas de la respuesta Th2 y Th17 en células Raw BlueTM tratadas con las proteínas recombinantes de *S. stercoralis*. Se realizó ANOVA bidireccional como análisis estadístico empleando GraphPad Prism v9. Se muestran la media y SEM a partir de los datos obtenidos por duplicado de cada muestra con su respectivo control endógeno de tres ensayos realizados independientemente. Los valores de p se muestran en la figura representados por *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 y ****p < 0,0001.

Se vió que las células tratadas con rSs14-3-3z y rSsMA incrementaron la expresión de IL-6 y TGF- β , citoquinas típicas de una respuesta Th2, pero también, citoquinas precursoras de una respuesta T cooperadora 17. Como respuesta de tipo Th17, se observó también un incremento en producción de IL-23 e IL-22 en las células tratadas con rSs14-3-3z a las 24 h (Figura 27). No hay expresión de IL-17. Los niveles de expresión de IL-23 e IL-22 estuvieron por debajo del control a las 48 h después del tratamiento con las proteínas recombinantes (Figura 27). El único aumento a las 72 h de tratamiento observado para IL-22 (dato no mostrado), no se consideró como dato fiable, considerando los valores de Ct obtenidos del gen constitutivo. En general se consideró que los datos obtenidos sobre los niveles de expresión de las citoquinas a 24 y 48 h fueron los más fiables.

4.3.2. Ensayos de vacunación con las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* frente a la infección experimental con *S. venezuelensis*

4.3.2.1. Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* con las de *S. venezuelensis*

Para evaluar la capacidad inmunizadora de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* obtenidas en este estudio, en colaboración con el grupo de Inmunología Parasitaria y Molecular del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), se diseñaron unos ensayos en un modelo de infección experimental por *S. venezuelensis* en ratones.

Previamente a dichos ensayos se analizó la homología entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis*, a emplear en la inmunización, con las proteínas de *S. venezuelensis*, para lo cual se realizó una comparación entre sus secuencias nucleotídicas y aminoacídicas en las bases de datos (GeneBank) del NCBI (www.ncbi.nih.gov). Las secuencias nucleotídicas disponibles de *S. venezuelensis* de la proteína 14-3-3z (LM524971.1) y el Antígeno Principal (LM525011.1) se tradujeron empleando la herramienta bioinformática Expasy (*Expert Protein Analysis System*, <http://www.expasy.org>) (Gasteiger et al., 2003), y se realizó un alineamiento local de proteínas mediante BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (Altschup et al., 1990) para determinar el porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos. Este alineamiento reflejó que la proteína 14-3-3z de *S. venezuelensis* tiene un porcentaje de identidad del 81,97% con la proteína recombinante 14-3-3z de *S. stercoralis*; y que la proteína antígeno principal o *major antigen* de *S. venezuelensis* tiene 82,38% de identidad con su homóloga en *S.*

stercoralis, por lo que ambas proteínas recombinantes de *S. stercoralis* (rSs14-3-3z y rSsMA) parecían buenas candidatas para ser usadas en ensayos de inmunización frente a infecciones experimentales por *S. venezuelensis*. Sin embargo, el análisis y alineamiento de las secuencias de la ferritina de *S. venezuelensis*, obtenida de la base de datos del WormBase Parasite (<http://parasite.wormbase.org>) (Bryant et al., 2024), con la secuencia de ferritina para *S. stercoralis*, proporcionó un porcentaje de identidad de solamente el 45,10%, por lo que no se consideró para los ulteriores ensayos de inmunización por su baja homología, además de su alta citotoxicidad observada en los ensayos *in vitro*.

4.3.2.2. Evaluación de la capacidad protectora de la inmunización frente a la infección

Se utilizó el diseño del experimento de inmunización descrito en el apartado 3.11. de Material y Métodos y esquematizado en la Figura 12. Brevemente, para ensayar el efecto de la inmunización experimental con las proteínas recombinantes formuladas en ADAD, se administraron dos tandas de inmunización previas a la infección con 3.000 larvas L3 de *S. venezuelensis*, y se utilizaron 5 grupos de ratones CD1: grupo control, control de infección, control ADAD, grupo rSs14-3-3z y grupo rSsMA (Figura 11). Los animales se sacrificaron a los 7 días tras la infección.

4.3.2.2.1. Análisis del número de Huevos Por Gramo (HPG) de heces y del número de hembras partenogenéticas

Para estudiar el potencial de las proteínas de *S. stercoralis*, rSs14-3-3z y rSsMA, para proteger a los ratones frente a la infección por *S. venezuelensis*, se determinó en primer lugar el número de Huevos Por Gramo (HPG) de heces (Figura 28), como indicador de la carga parasitaria en el intestino delgado.

Se observaron huevos en las heces a partir de los 5 días tras la infección y se contabilizaron los HPG en los días 5, 6 y 7. La comparación del número de HPG entre grupos en el mismo día postinfección, reveló un aumento en los grupos inmunizados respecto al grupo control de infección, en el séptimo día postinfección para el grupo rSs14-3-3z ($387,506.439 \pm 49,571.363$ vs. $350,851.027 \pm 82,665.61$), y en el sexto día postinfección para el grupo rSsMA ($350,851.027 \pm 82,665.61$ vs. $161,666.79 \pm 27,739.972$).

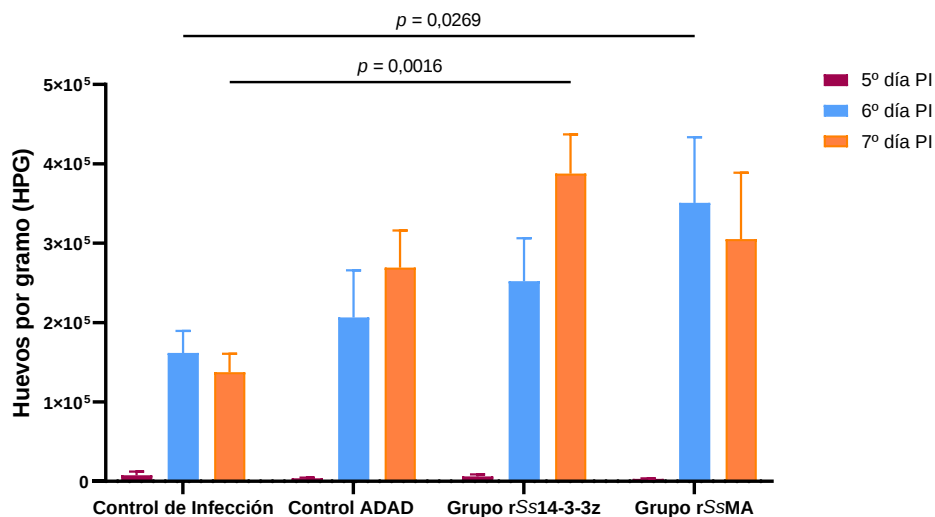


Figura 28. Número de huevos por gramo (HPG) de heces tomado los días 5, 6 y 7 después de la infección (PI) experimental con *S. venezuelensis* en ratones inmunizados con las distintas proteínas recombinantes de *S. stercoralis*. Las barras representan el promedio $\pm$ SEM. Las diferencias entre grupos se determinaron mediante ANOVA bidireccional $F_{(3,84)} = 4,18$; $p = 0,0083$. Los valores p de la prueba de comparaciones múltiples Post hoc de Tukey se muestran en la figura.

Asimismo, al realizar el recuento del número de hembras partenogenéticas, recuperadas del intestino delgado de los ratones, y compararlos entre grupos, se observó un aumento en el número de hembras en ambos grupos inmunizados con las proteínas recombinantes (para rSs14-3-3z: 222.418 ± 30.616 y para rSsMA: 243.016 ± 35.251) respecto a ambos controles, de infección y de adyuvante ADAD (Figura 29), lo que fue consistente con los resultados anteriores para el HPG (Figura 28).

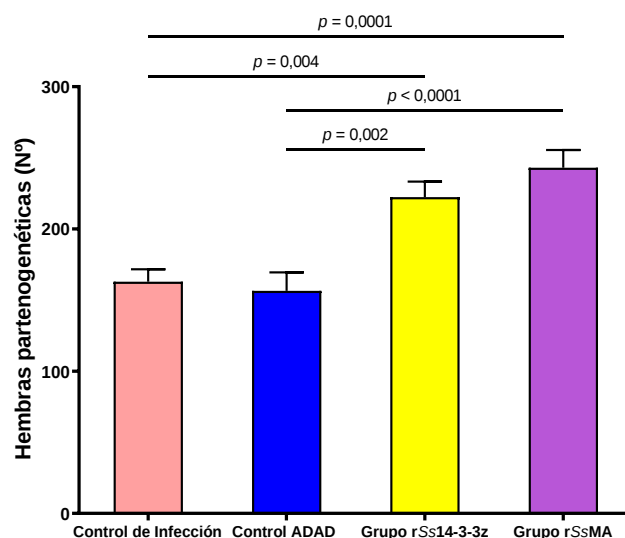


Figura 29. Número de hembras partenogenéticas de *S. venezuelensis* recuperadas de ratones infectados experimentalmente e inmunizados con distintas proteínas recombinantes de *S. stercoralis*. Las barras representan el promedio $\pm$ SEM. El número de hembras recuperadas en cada condición experimental se evaluó mediante análisis ANOVA unidireccional ($F_{(3,27)} = 1$; $p < 0,0001$).

4.3.2.2.2. Análisis de los índices esplénico e intestinal

Uno de los índices que refleja la activación de la respuesta inmunitaria celular después de una infección o vacunación es el índice esplénico. El volumen del bazo disminuye en peso y tamaño con la edad, pero aumenta tras una infección (Manente et al., 2018). Al analizar el efecto de la inmunización en cuanto al índice esplénico, la administración de las proteínas rSs14-3-3z y rSsMA produjo un ligero aumento de este índice respecto a los controles, tanto de infección como solo con adyuvante ADAD (Figura 30A).

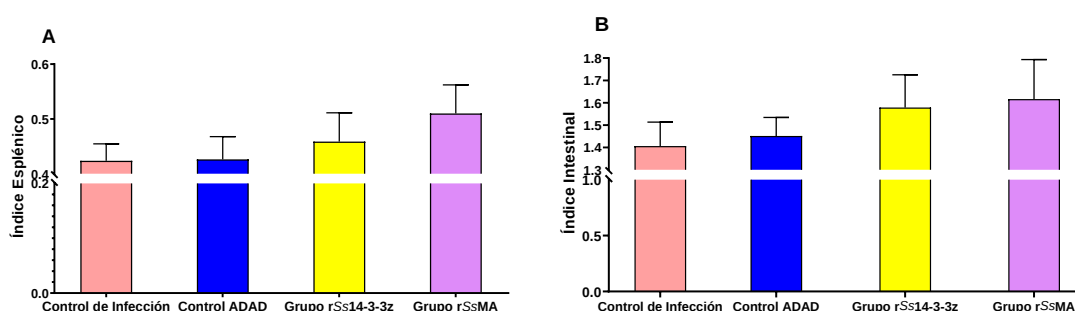


Figura 30. Efecto de la inmunización en el índice Esplénico (A) e Intestinal (B) tras la infección con *Strongyloides venezuelensis*. Las barras representan el promedio $\pm$ SEM. Los datos fueron evaluados mediante análisis ANOVA unidireccional, pero no hubo diferencias significativas ($F_{(3,28)} = 0$; $p = 0,5086$ para el índice esplénico y $F_{(3,28)} = 0,569$; $p = 0,627$ para el índice intestinal).

Otro de los indicadores de activación inmunitaria local en el caso de helmintos intestinales es el índice intestinal, el cual indica los efectos inflamatorios locales de la infección por *S. venezuelensis*. Los índices intestinales presentaron un valor similar y aumentaron ligeramente en ambos grupos de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* en comparación con los controles de infección y ADAD (Figura 30B). Las diferencias entre los grupos experimentales no fueron significativas, lo que sugiere que las proteínas recombinantes no previenen la inflamación local.

4.3.2.3. Estudio de la respuesta humoral frente a la inmunización con las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* y/o infección con *S. venezuelensis*

Para investigar la capacidad inmunogénica de las proteínas rSs14-3-3z y rSsMA se evaluaron los niveles de IgG específicos en suero de los ratones mediante *ELISA* indirecto antes y después del tratamiento (inmunización e infección). Todos los grupos de ratones presentaron niveles más altos de anticuerpos IgG específicos contra la proteína recombinante correspondiente después de la inmunización con rSs14-3-3z (Figura 31A) o rSsMA (Figura 31B) y/o después de la infección.

La inmunización no incrementó los niveles séricos de IgGs tras 7 días de infección, ya que no hubo diferencias significativas entre los grupos después del tratamiento (Figura 31).

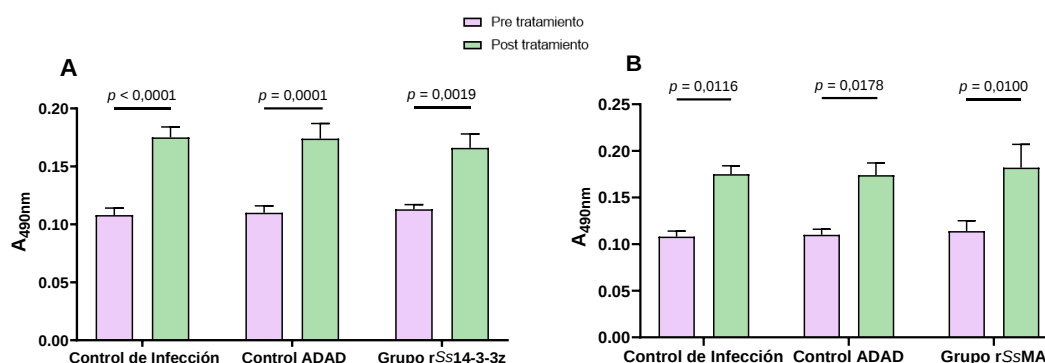


Figura 31. Niveles séricos de: A) IgG anti-14-3-3z de *S. stercoralis* y B) IgG anti-MA de *S. stercoralis* en ratones antes y después del tratamiento (inmunización e infección). Los niveles de IgGs se cuantificaron mediante *ELISA* indirecto utilizando 1 µg de cada proteína recombinante por pocillo. Las barras representan la media ± SEM. Las diferencias entre grupos se determinaron mediante ANOVA bidireccional. Los niveles de IgG aumentan significativamente después del ensayo ((A): $F_{(1,42)} = 70,24$; $p < 0,0001$; (B): $F_{(1,42)} = 37,08$; $p < 0,0001$). Los valores p de la prueba de comparaciones múltiples Post hoc de Tukey se muestran en la figura.

Asimismo, comprobamos que se producía la generación de anticuerpos que reconocen de manera cruzada las proteínas 14-3-3z y antígeno principal o *major antigen* de *S. stercoralis* en el modelo de ratón tras la infección con *S. venezuelensis* (Figura 31).

4.3.2.4 Análisis del efecto inmunomodulador de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* en ratones frente a la infección con *S. venezuelensis*

Los resultados obtenidos reflejaron que la inmunización con las proteínas recombinantes (rSs14-3-3z y rSsMA) no inducían protección frente a la infección en los ratones. Por ello, se investigó el tipo de respuesta inmunitaria inducida tras la inmunización con posterior infección, mediante el análisis de los niveles de expresión de las citoquinas producidas en bazo, pulmón e intestino usando RT-qPCR.

4.3.2.4.1. Perfil de citoquinas en bazo

El perfil de citoquinas obtenido en los bazos de ratones inmunizados con rSs14-3-3z permitió detectar un incremento en la expresión de mRNA de TNF-α (Figura 32A), citoquina propia de la respuesta Th1, que se expresa cuando se da la activación de macrófagos y promueve la generación de linfocitos T citotóxicos y células asesinas naturales (NK, *Natural Killer*). Asimismo, se detectó aumento del mRNA de IL-12 con respecto al grupo control y al control de la infección. Sin embargo, este aumento ya se producía en el grupo ADAD, por lo que su variación se puede

atribuir al adyuvante. No se observó producción de mRNA de IFN- γ , que es un antagonista en la expresión de las citoquinas de tipo 2. Y en el caso de la enzima NOS2, ya se encontró aumentada como consecuencia únicamente de la infección (Figura 32A). Por otro lado, la inmunización con rSs14-3-3z produjo un aumento en la expresión de IL-4, IL-13 y IL-10 (Figura 32B), lo que muestra la capacidad moduladora a nivel inmunitario de la proteína rSs14-3-3z hacia una respuesta Th2. Además, se incrementó la expresión de TGF- β (Figura 32B), que junto con IL-10 son conocidas como las citoquinas reguladoras. Se obtuvieron niveles de expresión de las citoquinas correspondientes a la respuesta Th17 por debajo de los controles (Figura 32C), excepto en el caso de TGF- β , pero para que se dé este tipo de respuesta la IL-6 debería estar incrementada.

En el caso de los ratones inmunizados con rSsMA, no se detectaron en bazo niveles de expresión incrementados para ninguna citoquina de tipo Th1, y el incremento observado de IL-12 y NOS2 ya se producía con el adyuvante ADAD (Figura 32A). Por otro lado, los niveles de expresión de las citoquinas de tipo 2, IL-10 e IL-13, presentaron un aparente aumento en comparación con los controles (Figura 32B). Los niveles de expresión de las citoquinas de la respuesta Th17 estuvieron por debajo de los controles (Figura 32C).

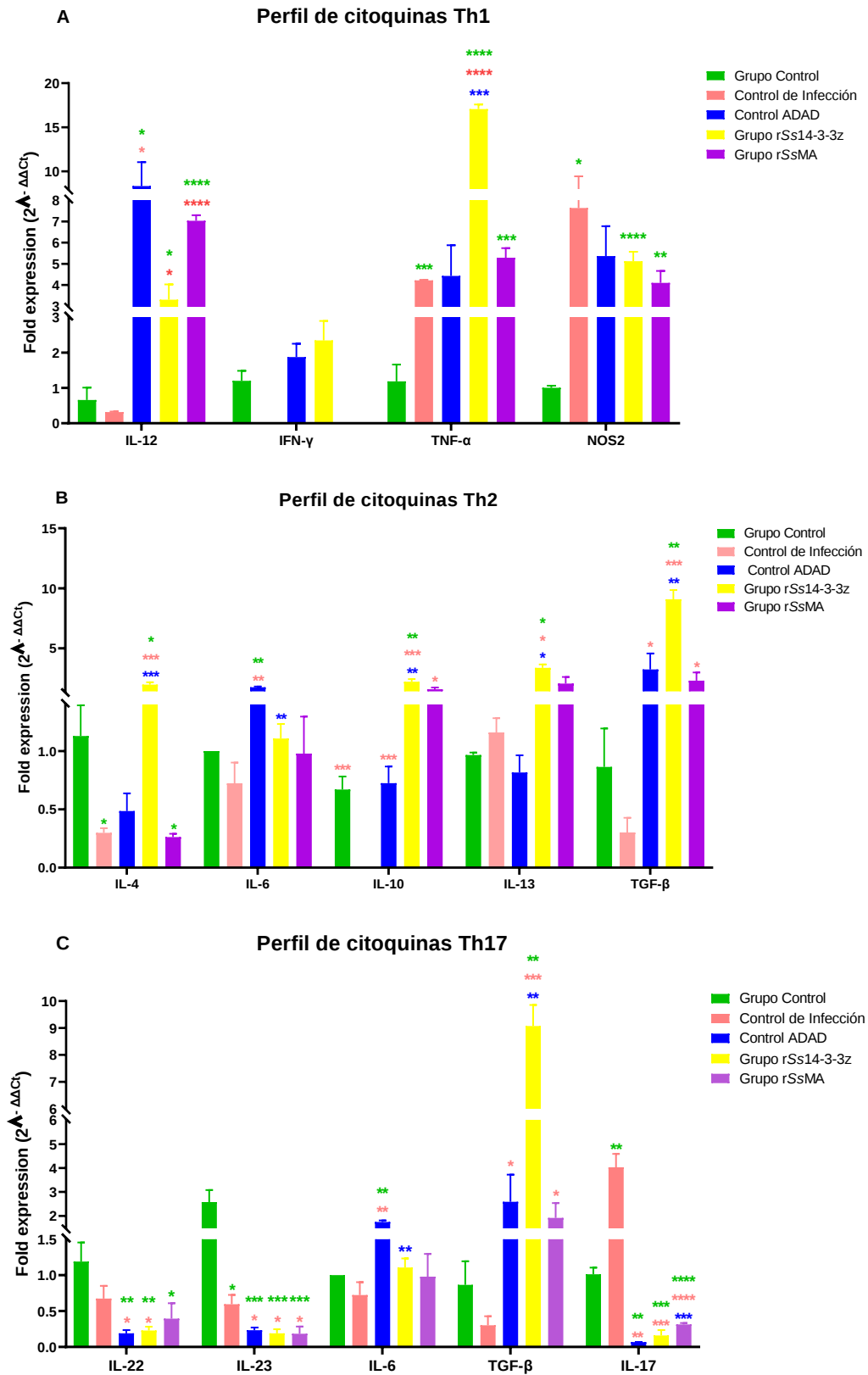


Figura 32. Perfil de citoquinas según respuesta T cooperadora (Th) en bazo de ratones inmunizados con rSs14-3-3z y rSsMA formulados en ADAD e infectados con 3000 L3i de *S. venezuelensis*. Las barras representan la media $\pm$ SEM. Los datos se evaluaron mediante análisis ANOVA unidireccional para cada citoquina comparándola con todos los controles. Los valores de p se muestran en la gráfica representados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

4.3.2.4.2. Perfil de citoquinas en pulmón

Como se mencionó anteriormente, el ciclo de vida de *Strongyloides* spp. incluye los pulmones durante la migración larvaria, originando un daño en el tejido pulmonar que se trata de reparar mediante la secreción de citoquinas.

El estudio del perfil de citoquinas obtenido de pulmones de ratones inmunizados con rSs14-3-3z reflejó una disminución en el nivel de expresión de las citoquinas propias de la respuesta Th1, IL-12 y TNF- α (Figura 33A). La expresión de IL-12 y TNF- α se vieron incrementadas de forma importante por la infección, expresión que se vió disminuida por efecto de la inmunización con rSs14-3-3z. Este efecto se repitió en el caso de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (Figura 33B), características de la respuesta Th2, ya que se vieron incrementadas por la infección. Con respecto a las citoquinas reguladoras, no se detectó expresión de IL-10 y los niveles de TGF- β se expresaron por debajo de los controles (Figura 33B). Los niveles de expresión de las citoquinas correspondientes a la respuesta Th17 estuvieron por debajo de los controles (Figura 33C).

La inmunización con rSsMA indujo una disminución en los niveles de expresión de las citoquinas de tipo 1, IL-12 y TNF- α , en pulmones con respecto al control de infección, en el cual estas citoquinas se vieron aumentadas respecto al grupo control (Figura 33A). Por otro lado, la infección también produjo un aumento de las citoquinas de tipo 2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, y la inmunización con rSsMA indujo una disminución en este aumento, aunque estas citoquinas también se vieron disminuidas en el grupo control ADAD, por lo que este efecto parece no ser debido a la proteína recombinante (Figura 33B). Los niveles de expresión de las citoquinas de la respuesta Th17 tampoco sufrieron una variación destacable por efecto de la inmunización, estando casi todas ellas disminuidas frente a los controles (Figura 33C).

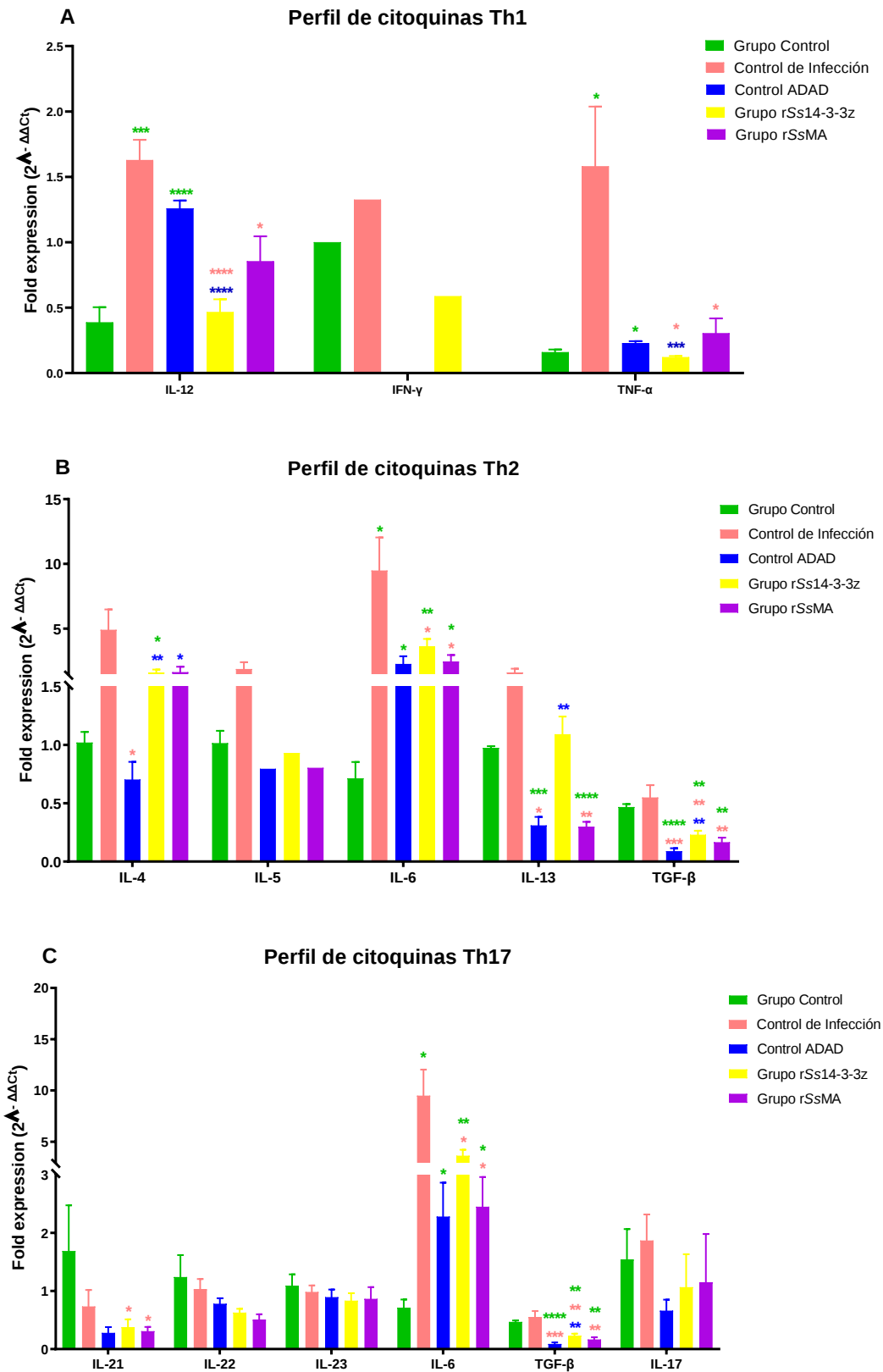


Figura 33. Perfil de citoquinas según respuesta T cooperadora (Th) en pulmón de ratones inmunizados con rSs14-3-3z y rSsMA formulados en ADAD e infectados con 3000 L3i de *S. venezuelensis*. Las barras representan la media $\pm$ SEM. Los datos se evaluaron mediante análisis ANOVA unidireccional para cada citoquina comparándola con todos los controles. Los valores de p se muestran en la gráfica representados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

4.3.2.4.3. Perfil de citoquinas en intestino

El intestino es la localización final de *Strongyloides* spp. y presenta una serie de mecanismos implicados en la eliminación del helminto. Tanto las células del epitelio intestinal como macrófagos y linfocitos presentes en la mucosa intestinal liberan citoquinas que podrían tener un papel importante en la homeostasis del sistema inmunitario local y en la regulación de las funciones de barrera y de absorción de la mucosa.

En el intestino, se observaron bajos niveles de expresión de TNF- α en todos los grupos experimentales, aunque tanto la inmunización con rSs14-3-3z como con rSsMA disminuyeron estos niveles de expresión de TNF- α por debajo del grupo control. La inmunización con ambas proteínas recombinantes también disminuyó la expresión de la IL-12, pero en este caso respecto al control de infección y en el control del adyuvante (Figura 34A). Por otro lado, con respecto a las citoquinas características de la respuesta Th2, se observó un aumento en la expresión de la IL-13 tras la inmunización con rSs14-3-3z (Figura 34B), respecto a los controles, aunque como se observa en la figura, estas citoquinas no se detectaron en todos los casos. No se expresaron citoquinas de la respuesta Th17, sólo se observó que los niveles de expresión de IL-22 se encontraron por debajo de los controles (datos no mostrados).

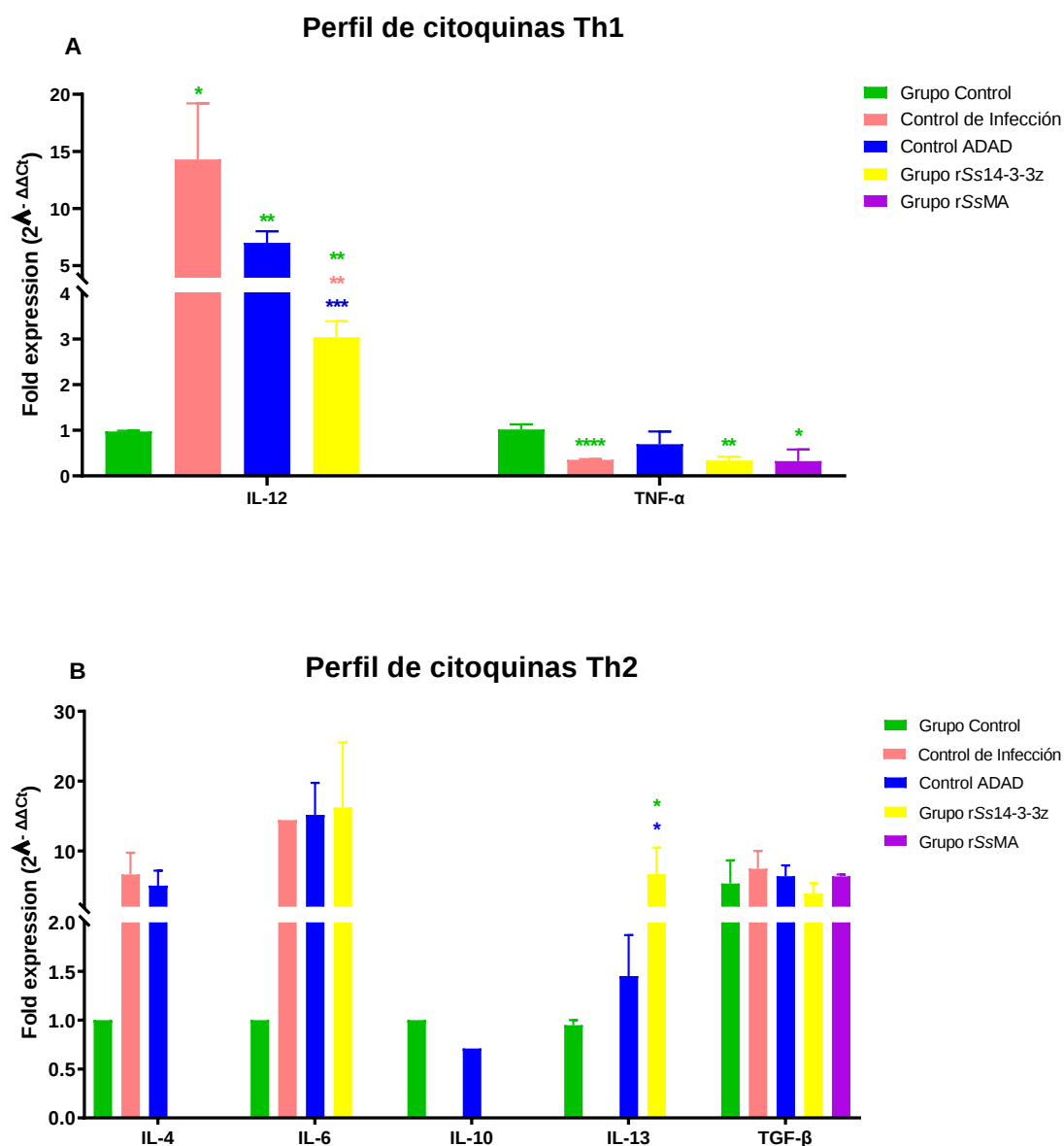


Figura 34. Perfil de citoquinas según respuesta T cooperadora (Th) en intestino de ratones inmunizados con rSs14-3-3z y rSsMA formulados en ADAD e infectados con 3.000 L3i de *S. venezuelensis*. Las barras representan la media $\pm$ SEM. Los datos se evaluaron mediante análisis ANOVA unidireccional para cada citoquina comparándola con todos los controles. Los valores de p se muestran en la gráfica representados por $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ y $****p < 0,0001$.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El helminto parásito *Strongyloides stercoralis* es considerado como uno de los nematodos intestinales más importantes a nivel mundial (Olsen et al., 2009). Es el causante de la estrongiloidosis, que se caracteriza por producir una infección parasitaria crónica que afecta a los seres humanos (Grove, 1996), y puede llegar a producir casos de hiperinfección en pacientes inmunodeprimidos (Buonfrate et al., 2013) o en personas que reciben algún tipo de terapia inmunosupresora (Keiser & Nutman, 2004), por lo que es importante considerar su diagnóstico antes de sugerir el empleo de corticoides (Schär et al., 2013). A pesar de su importancia, la OMS la considera como una enfermedad tropical desatendida (OMS, 2023).

Actualmente, la estrongiloidosis es una enfermedad emergente en España debido al incremento de la inmigración y al turismo, por lo que se debe enfatizar la vigilancia activa entre los inmigrantes y viajeros (Buonfrate et al., 2012; Salvador et al., 2024). Además, esto se combina con la presencia de casos autóctonos en zonas endémicas de la UE como, por ejemplo, la Comarca de La Safor valenciana en la que se ha mantenido la enfermedad activa durante años. Se han descrito diversos estudios que relacionan los casos autóctonos con las actividades agrícolas asociadas principalmente al cultivo de arroz, actividad en la que se suele trabajar descalzo y que supone un factor que predispone a contraer la enfermedad (Román-Sánchez et al., 2001, 2003; Alcaraz et al., 2004; Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007). Junto a estos casos, la reciente pandemia de COVID-19 y el uso de dexametasona y otros inmunosupresores, ha puesto de manifiesto la necesidad de unificar criterios de búsqueda y tratamientos en potenciales pacientes de estrongiloidosis (Rodríguez-Guardado et al., 2023). Estos estudios refuerzan la necesidad de contar con una vacuna, hasta la fecha inexistente, que brinde protección en zonas donde las medidas higiénico-sanitarias sean deficientes y se cuente con factores de riesgo que mantengan al parásito. Asimismo, debido a que la estrongiloidosis puede producir más discapacidad que muerte (GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2017; GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators, 2020) y su diagnóstico es muy difícil, debido a la eliminación de poca carga parasitaria y a que no existe aún un diagnóstico *gold standard* (Fernández-Rivas et al., 2019), es importante conseguir pruebas fiables para su diagnóstico.

En este sentido, la presente Tesis Doctoral busca aumentar el conocimiento acerca de proteínas con potencial aplicabilidad en el diagnóstico de la enfermedad mediante el desarrollo de una técnica de *ELISA* indirecta *in house* probando la inmunorreactividad de tres proteínas recombinantes de *S. stercoralis*, rSs14-3-3z, rSsFerritina y rSsMajorAntigen, además de

investigar su potencial como candidatas a vacunas, analizando su capacidad de modular la respuesta inmunitaria.

5.1. Sobre la utilidad en el diagnóstico de la estrongiloidosis humana mediante el uso del ensayo *ELISA* indirecto *in house* con las proteínas recombinantes rSs14-3-3z, rSsFe y rSsMA.

Es esencial el conocimiento de moléculas, fundamentalmente proteínas, que puedan ser utilizadas en el diagnóstico o como posibles candidatas para el desarrollo de vacunas. Gracias a la disponibilidad del genoma de *S. stercoralis* (Hunt et al., 2016), se están ampliando los conocimientos sobre el transcriptoma y proteoma de este parásito. Recientemente, mediante análisis de espectrometría de masas de alto rendimiento, realizado por Dishnica y colaboradores, se han identificado 430 proteínas de la larva L3i de *S. stercoralis* involucradas con el parasitismo, la mayoría con actividad peptidasa; este estudio se considera el análisis proteómico experimental más extenso hasta la fecha (Dishnica et al., 2023). Cuando no se contaba con el genoma completo del parásito como referencia (Hunt et al., 2016), los primeros estudios de transcriptómica y proteómica de la fase L3i del parásito fueron realizados por nuestro grupo de investigación en 2010 y 2012, respectivamente (Marcilla et al., 2010; 2012a), con el objetivo de seleccionar las proteínas altamente representadas en la fase larvaria e infectante. Es importante disponer de más estudios proteómicos para identificar antígenos potenciales para la selección posterior de candidatos terapéuticos en función de su inmunogenicidad y su capacidad para estimular una respuesta inmunitaria en su hospedador (Perera & Ndao, 2021).

En nuestro laboratorio se identificaron los fragmentos proteicos de proteínas con un perfil marcadamente antigénico y se produjeron recombinantes en el procariota *Escherichia coli* (Galiano, 2016a). De hecho, este es el sistema más utilizado para la producción de proteínas recombinantes biológicamente activas en poco tiempo, aunque especies de *Bacillus* como *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* están cobrando cada vez más importancia. Entre las ventajas de este sistema encontramos que su cultivo es sencillo y económico, son fáciles de modificar genéticamente, además sus mecanismos de transcripción y traducción son bien conocidos facilitando su uso (Guevara-Hernández et al., 2013; Lara, 2011).

Una de las proteínas identificadas en dichos estudios fue la proteína 14-3-3z, que además constituía uno de los transcritos más abundantes de larvas L3i de *S. stercoralis* (Marcilla et al., 2012a). Posteriormente, dicha proteína ha sido identificada también en el proteoma somático

de la larva L3i de *S. venezuelensis* (Fonseca et al., 2020). Las proteínas 14-3-3 son pequeñas, aproximadamente 30 kDa, con un punto isoeléctrico alrededor de 5, y pertenecen a una familia de proteínas altamente conservadas entre organismos eucarióticos que comparten aproximadamente el 50% de identidad de aminoácidos. En mamíferos se han identificado siete isoformas (β -beta, γ -gamma, ζ -zeta, σ -sigma, ϵ -épsilon, η -eta y τ -tau). Son proteínas básicamente intracelulares, intervienen en eventos celulares básicos relacionados con la proliferación celular, incluida la transducción de señales, por lo que podría actuar como regulador en los procesos de activación de las defensas (Aitken et al., 1992). Las proteínas 14-3-3 han sido descritas y caracterizadas en varios parásitos como *Strongyloides stercoralis* (Sudré et al., 2007; Masoori et al., 2019), *Schistosoma bovis* (Siles-Lucas et al., 2007; Uribe et al., 2007), *Echinococcus* spp. (Siles-Lucas et al., 2003; Andrade et al., 2004; Siles-Lucas et al., 2008; Wei et al., 2021), *Fasciola hepatica* (Pérez-Caballero et al., 2018), *Trichinella britovi* (Stachyra et al., 2020) y otros parásitos tanto unicelulares como pluricelulares (Siles-Lucas & Gottstein, 2003). Además, se ha descrito como altamente inmunogénica, ya que fue reconocida por los sueros de pacientes con estrongiloidosis (Rodpai et al., 2016). Asimismo, como se ha comentado, se encontró mayor producción relativa de mRNA de la proteína 14-3-3 zeta en la larva L3i de *S. stercoralis* (Marcilla et al., 2012a), por lo que a pesar de ser proteínas conservadas se considera como una candidata interesante para su estudio.

Nuestro equipo de investigación también demostró la presencia de la proteína ferritina en la larva L3i de *S. stercoralis* (Marcilla et al., 2010; Galiano, 2016a), proteína con marcado carácter antigénico. El hierro es un componente esencial de numerosas macromoléculas que participan en importantes reacciones celulares en prácticamente todos los organismos. La ferritina es una proteína citosólica que se encarga del almacenamiento del hierro y que se puede encontrar en casi todos los organismos vivos, incluidas bacterias, hongos, plantas, animales y también se ha mencionado su presencia en vesículas extracelulares lo que explicaría su posible implicación en interacciones parásito-hospedador (Marcilla et al., 2012b). Se ha observado que la deficiencia del hierro en *Schistosoma japonicum* afecta el crecimiento y desarrollo del esquistosómulo, pero no afecta la producción de huevos por parte de la hembra parasita (Zeng et al., 2022). La principal función fisiológica de la ferritina es mantener el balance del hierro intracelular, almacenarlo en una forma insoluble no tóxica, y al mismo tiempo mantenerlo biodisponible intracelularmente convirtiéndolo a su forma soluble. Asimismo, proporciona un efecto protector contra la toxicidad del hierro libre, como la generación de especies reactivas de oxígeno que pueden dañar la maquinaria celular y provocar la muerte celular. El hierro se absorbe en forma ferrosa y se deposita como hidróxidos férricos después de la oxidación (Munro & Linder, 1978).

Debido a la importancia de esta proteína para mantener el ambiente libre de toxicidad por hierro libre, y a que se ha encontrado en diferentes estadios de *S. stercoralis*, se ha considerado a la ferritina para su estudio en la presente Tesis Doctoral.

El análisis de las secuencias de los transcritos obtenidos de la larva L3i de *S. stercoralis*, realizado anteriormente por nuestro grupo de investigación, mostró que el mRNA de la proteína denominada antígeno principal o *major antigen*, presentó un mayor número de copias en comparación con las hembras partenogenéticas (Marcilla et al., 2012a; Galiano, 2016a), lo que muestra una mayor presencia de esta proteína en las larvas infectantes lo que refuerza su estudio como una potencial diana candidata. Dicha proteína fue identificada gracias a su homología con las secuencias depositadas en las bases de datos de *Toxocara canis* (Zhu et al., 2015). Se ha observado homología de secuencia con la proteína Lin-5 de *Caenorhabditis elegans*, proteína del centrosoma, componente esencial del huso mitótico y necesaria para la correcta replicación celular y también miofibrilar, perteneciente a la superfamilia de las tropomiosinas (Lorson et al., 2000).

A pesar del conocimiento que tenemos acerca de algunas proteínas de *S. stercoralis*, nuestra información acerca de su proteoma sigue siendo todavía limitada, por lo que estudios como éste ayudan a seguir ampliando el conocimiento para que en un futuro a corto plazo podamos contar con nuevas proteínas potencialmente inmunogénicas candidatas a ser evaluadas para el desarrollo de nuevas pruebas serológicas de diagnóstico o como marcadores inmunológicos para el desarrollo de vacunas.

La estrongiloidosis es frecuentemente subdiagnosticada porque la mayoría de los casos son asintomáticos; además, los métodos de diagnóstico serológicos carecen de elevada sensibilidad. La búsqueda de un método de diagnóstico adecuado, con alta sensibilidad y especificidad, es primordial para realizar un tratamiento adecuado de la infección y evitar su persistencia de por vida y sus posibles complicaciones. En España la estrongiloidosis se está volviendo cada vez más frecuente y su incidencia está aumentando debido al número de casos diagnosticados entre los inmigrantes recién llegados (Pardo et al., 2007; Belhassen-García et al., 2017; Salvador et al., 2024). Es importante enfatizar la vigilancia activa de esta enfermedad debido a que puede ser fatal en personas inmunocomprometidas, si bien el número de casos graves ha disminuido en los últimos años, se recomienda que todas aquellas personas procedentes de zonas endémicas, viajeros o incluso sujetos autóctonos de áreas endémicas de la UE, sean examinados para detectar la presencia de *S. stercoralis* antes de iniciar cualquier terapia inmunosupresora,

especialmente aquellos que presentan eosinofilia (Igual-Adell & Domínguez-Márquez, 2007; Valerio et al., 2013; Barroso et al., 2019; Dato et al., 2020; Rodríguez-Guardado et al., 2023).

En un estudio realizado en una zona endémica como la Amazonía peruana, las larvas de *S. stercoralis* fueron diagnosticadas en el 8,7% de la población analizada a partir de muestras de heces de 792 participantes, combinando técnicas directas como el frotis directo, método de Baermann y sedimentación simple. En paralelo con el empleo de una técnica de *ELISA* realizado a 609 sueros se obtuvo un resultado positivo en el 72% de las muestras (Yori et al., 2006), demostrando que la técnica de *ELISA* es muy sensible y constituye una herramienta de detección muy adecuada para el diagnóstico de la enfermedad (Yori et al., 2006).

Aunque las técnicas serológicas son consideradas los métodos de diagnóstico más precisos, aún es necesario mejorar su rendimiento como métodos de diagnóstico que, en comparación con los métodos parasitológicos directos, presentan una especificidad menor debido a posibles reacciones cruzadas con otras helmintosis, lo cual es altamente probable en zonas endémicas (Gam et al., 1987; Conway et al., 1993; Lindo et al., 1994). Además, la sensibilidad de los métodos serológicos puede disminuir en casos de inmunosupresión (Keiser & Nutman, 2004) o en una fase muy temprana de la infección (Arifin et al., 2019). Por ello es necesario mejorar los métodos de diagnóstico actuales, sobre todo en cuanto a especificidad, para su aplicación a inmigrantes y viajeros.

En este trabajo se ha abordado la estandarización de un método de diagnóstico serológico al que hacemos referencia como *ELISA* indirecto *in house*, con tres proteínas recombinantes de *S. stercoralis*, analizando su capacidad inmunorreactiva frente a sueros de pacientes con estrongiloidosis.

Según nuestros resultados de *ELISA* indirecto, los mejores resultados se obtuvieron con las proteínas rSs14-3-3z y rSsFe, al reconocer 15 y 14 de los 15 sueros autóctonos, respectivamente. Adicionalmente, ambas proteínas dieron resultados positivos con la mayoría de los sueros de pacientes con estrongiloidosis (27/40), diagnosticados como tales por el ISCIII, usando el kit comercial *Strongyloides* IgG *ELISA* (DRG International Inc., EE. UU). En el caso de ferritina, estudios de Cabán-Hernández y colaboradores en el 2012, utilizándola como antígeno para el inmunodiagnóstico de fasciolosis, observaron una fuerte reactividad con el suero de conejos infectados con *F. hepatica* (Cabán-Hernández et al., 2012). Además, algo muy importante a mencionar de nuestro estudio es que en la prueba realizada con las proteínas recombinantes rSs14-3-3z y rSsFe, sólo se obtuvo reacción cruzada con el suero de un paciente con filariosis, lo

cual ya se había descrito anteriormente empleando antígenos larvarios, además de reacciones cruzadas con ascariosis y esquistosomosis (Gam et al., 1987). Asimismo, Rodpai y colaboradores en 2016 describieron reacciones cruzadas de una banda inmunorreactiva de la larva L3i de *S. stercoralis* de 26 kDa (correspondiente a la proteína 14-3-3z) con varias helmintosis (Rodpai et al., 2016). En la presente Tesis Doctoral se contó con sueros procedentes de pacientes con otras helmintosis, entre ellos un suero de paciente de esquistosomosis, con el que ni rSs14-3-3z ni rSsFe dieron reacción cruzada. Por el contrario, el *ELISA* realizado con rSsMA presentó reacción cruzada con tres sueros procedentes de pacientes con otras helmintosis (cisticercosis, esquistosomosis y filariosis), evidenciando que sería en nuestro caso la proteína menos específica, y por tanto de menor interés diagnóstico. Aunque también cabría la posibilidad de que se tratase de pacientes con coinfecciones no diagnosticadas para estrongiloidosis.

En estudios previos, mediante un análisis de *immunoblot* se observó la reactividad de una banda polipeptídica de 26 kDa frente a sueros obtenidos de pacientes con estrongiloidosis, mostrando una sensibilidad del 90% y una especificidad del 76,5%. Por análisis proteómicos, se identificó dicha proteína como 14-3-3 zeta (Rodpai et al., 2016). En el presente trabajo, con la aplicación de un *ELISA* indirecto se obtuvieron resultados de sensibilidad más bajos que en dichos estudios, con las tres proteínas recombinantes (rSs14-3-3z: 70,45%; rSsFe: 67,50% y rSsMA: 63,64%), sin embargo, los valores de la especificidad sí resultaron mejorar en todos los casos (rSs14-3-3z: 91,67%; rSsFe: 88,37% y rSsMA: 88,24%), pero especialmente para la 14-3-3 zeta.

Además, nuestros resultados se encuentran validados por la curva *ROC* (Hoo et al., 2017) y el valor de *AUC* (Cerdeira & Cifuentes, 2012), que con cada proteína recombinante mostraron tener una capacidad aceptable para discriminar entre enfermos y sanos, siendo la prueba realizada con la proteína recombinante rSs14-3-3z la que presenta un valor de *AUC* más cercano a 1, seguido por rSsFe y, finalmente, rSsMA. Por último, al calcular el Índice de Youden, que determina la sensibilidad y especificidad de las pruebas realizadas (Bewick et al., 2004), se obtuvo que nuestro *ELISA* indirecto realizado con la proteína rSs14-3-3z tiene la sensibilidad y especificidad más altas, en comparación con las otras dos proteínas recombinantes, si bien la sensibilidad está por debajo de la del *ELISA* comercial usado por el ISCIII. No obstante, los valores de especificidad obtenidos fueron muy buenos, por lo que se podría considerar a la proteína rSs14-3-3z como una candidata para su uso como herramienta diagnóstica, sobre todo indicada como método de confirmación de los casos positivos obtenidos con otra técnica más sensible.

Otro punto a mencionar son los resultados falsos positivos obtenidos mediante nuestra prueba sobre los sueros diagnosticados previamente como negativos usando el kit comercial. Los sueros

SVV12 y SVV48, considerados inicialmente como negativos, resultaron positivos con las tres proteínas recombinantes (rSs14-3-3z, rSsFe y rSsMA), por lo que quedarían como dudosos a falta de una prueba diagnóstica confirmatoria a partir de heces. Por otro lado, los valores de especificidad obtenidos para los *ELISA* con las tres proteínas recombinantes fueron superiores al del kit comercial, lo cual se vio reflejado en los pocos falsos positivos obtenidos.

Finalmente, respecto al valor del índice Kappa (Abaira, 2000) empleado para medir el nivel de concordancia entre ambas técnicas *ELISA*, y según la escala de Landis & Koch (1977), mostraría que no hay concordancia entre los resultados obtenidos en ambos ensayos.

El kit de *ELISA* comercial es aparentemente más sensible (89%) que el *ELISA in house*. Sin embargo, no se han realizado pruebas coprológicas confirmatorias, por lo que se podrían estar dando valores falsos positivos. En cuanto a la especificidad de las técnicas, nuestro *ELISA* con la rSs14-3-3z demostró una muy buena especificidad (91,7%) en comparación con la del kit comercial cuya especificidad es del 70%, por lo que se podría considerar su uso como prueba confirmatoria, en especial la prueba con la proteína rSs14-3-3z. Además, la proteína 14-3-3 ha mostrado una fuerte reactividad con sueros de pacientes infectados con otros parásitos como *Wuchereria bancrofti* (Ahmad et al., 2020) y *Schistosoma japonicum* (Luo et al., 2009) por lo que el uso de esta proteína recombinante está en auge con resultados prometedores

5.2. Sobre el efecto de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* en macrófagos de ratón (Raw Blue™) en cultivo

Los ensayos en cultivo de células Raw Blue™ para determinar el efecto citostático/citotóxico de las proteínas recombinantes mostraron que dichas proteínas no eran tóxicas a tiempos cortos, 24 h, incluso a altas concentraciones. A partir de las 48 h de cultivo, ya comenzó a registrarse un descenso de la actividad metabólica celular, más marcado en el caso de la proteína rSsFe, que fue la que mayor efecto tóxico tuvo sobre estas células.

En relación con el estudio de la capacidad pro- o antiinflamatoria de las proteínas recombinantes sobre macrófagos, se observó que la proteína rSsMA indujo una disminución significativa en la expresión de NF-κB en células activadas con LPS, mostrando por tanto propiedades antiinflamatorias. Por el contrario, nuestros resultados con la proteína 14-3-3z en células Raw Blue™, y en las condiciones de ensayo utilizadas, no han podido poner de manifiesto actividad antiinflamatoria, a pesar de que estudios previos mostraron que sus diferentes isoformas presentaban la capacidad de regular procesos inflamatorios (Munier et al., 2021) e incluso, que la proteína 14-3-3 zeta puede regular la inflamación a nivel tumoral (Han et al., 2015).

Por último, en el estudio del perfil de citoquinas producidas por los macrófagos Raw BlueTM tratados con las proteínas recombinantes, se observó un aumento de expresión de citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-12 e IFN- γ , así como de la enzima NOS2, a las 24 h de incubación, lo que indicaría una activación temprana de los macrófagos (Lawrence, 2009). Dichos niveles bajan tras mayores tiempos de tratamiento. Un estudio realizado por Andrade y colaboradores en el 2004, con la proteína 14-3-3z de *Echinococcus multilocularis* durante 18 h en macrófagos activados previamente con LPS y utilizando 10 μ g/mL y 20 μ g/mL de la proteína, demostró que los niveles de NOS2 disminuían tras la incubación, indicando una actividad antiinflamatoria, si bien es cierto que en ese estudio se emplearon concentraciones mayores que las que usamos nosotros (Andrade et al., 2004). Esta disminución se observó a las 48 h de tratamiento con la proteína rSs14-3-3.

A pesar de la mayor expresión de citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ , el cual es antagonista de la expresión de citoquinas de tipo 2 (Eschbach et al., 2010), también se observó expresión de ciertas citoquinas antiinflamatorias. Los macrófagos activados con LPS y tratados con las proteínas rSs14-3-3z y rSsFe aumentaron la expresión de IL-5 e IL-6, y los tratados con la proteína rSsMA además incrementaron la expresión de IL-10 y TGF- β , citoquinas T reguladoras, por lo que concluimos que en cultivo la proteína rSsMA induciría la expresión de citoquinas relacionadas con respuestas Th2/Treg.

La respuesta Th17 ha sido siempre relacionada con enfermedades autoinmunes o en respuestas inmunitarias frente a infecciones por bacterias y hongos extracelulares; y también se ha descrito su función en el rechazo temprano de vermes adultos en el intestino de ratas, mediado por el desarrollo de respuestas Th17/Th2 (Sotillo et al., 2011). Las citoquinas IL-22, IL-21 e IL-17 han sido identificadas como citoquinas efectoras producidas por las células Th17 (Ouyang et al., 2008). La proteína rSs14-3-3z ha inducido la expresión de citoquinas tipo 17, con expresión de IL-6, TGF- β , IL-22, IL-23, pero también con expresión de IL-5 (respuesta Th17/Th2).

5.3. Sobre la evaluación del efecto inmunomodulador de las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* frente a la infección experimental con *S. venezuelensis*

La estrongiloidosis es una enfermedad desatendida para la cual no se dispone de vacunas. Es por ello que existe la necesidad de desarrollarlas, dada la capacidad de *S. stercoralis* para producir infecciones persistentes y diseminarse a todos los órganos internos en pacientes con un sistema inmunitario comprometido.

La búsqueda de antígenos inmunogénicos para ser usados como vacunas es el enfoque en el que se basan la mayoría de los estudios inmunoterapéuticos (Levenhagen et al., 2016). Las vacunas tradicionales se basan en el uso de un patógeno inactivado o atenuado de modo que pierdan su patogenicidad, pero puedan ser reconocidos por el sistema inmunológico para provocar una respuesta inmunitaria. Una alternativa a este tipo de vacunas de primera generación son las vacunas que se basan en la síntesis química de epítomos específicos de proteínas antigénicas implicados en la activación de la respuesta inmunitaria. Las vacunas basadas en epítomos tienen las características de generar un fuerte efecto de inmunidad protectora y una alta especificidad (Wei et al., 2021). En este caso, es fundamental la búsqueda de epítomos con buena antigenicidad. En este contexto, en la presente Tesis hemos analizado la capacidad protectora de dos fragmentos recombinantes de las proteínas 14-3-3z y Antígeno Principal de *S. stercoralis*.

En nuestro estudio, como en otros ensayos vacunales previos, se utilizó el sistema adyuvante adaptado para vacunación (ADAD) (Martínez-Fernández et al., 2004), que se combinó con la diamina alifática AA0029 en ensayos de inmunización (Vicente et al., 2015). Dicho adyuvante se había desarrollado como una alternativa al adyuvante clásico de Freund, el cual tiene efectos secundarios que limitan su uso en vacunas comerciales (Powers et al., 2007; Fontes et al., 2017). Diversos estudios anteriores con ADAD, lo combinaron con la proteína 14-3-3 zeta de *Schistosoma mansoni* (Siles-Lucas et al., 2007), la proteína FABP de *Fasciola hepatica* (Martínez-Fernández et al., 2004; Vicente et al., 2014, 2016), e incluso con un antígeno soluble en deoxicolato (DOC) de la larva L3 de *S. venezuelensis* (Vlaminck et al., 2010), obteniéndose buenos resultados en cuanto a disminución de carga parasitaria en todos los casos, así como la regulación positiva (disminución) de citoquinas proinflamatorias (IL-1 e IL-6) (Vicente et al., 2014).

En nuestro ensayo de vacunación, la inmunización con las proteínas recombinantes (rSs14-3-3z y rSsMA) no resultó en una protección efectiva contra la infección experimental, ni redujo la carga parasitaria en los animales, a pesar de la elevada homología entre las proteínas usadas en ambas especies de *Strongyloides*. Por el contrario, observamos un aumento del número de HPG, correlacionado directamente con el aumento del número de hembras partenogenéticas de *S. venezuelensis* en intestino de los animales inmunizados. En un estudio de vacunación con la proteína 14-3-3 zeta de *Echinococcus multilocularis*, inyectándola dos veces en ratones BALB/c vía subcutánea, y posteriormente infectando los ratones con 2.000 huevos de dicho helminto, se consiguió una reducción de un 97% de la carga parasitaria (Siles-Lucas et al., 2003). En otro ensayo de vacunación con la proteína 14-3-3z, se pudo observar una protección del 87% en

ratones vacunados e infectados con *E. multilocularis* asociada con la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a (Siles-Lucas et al., 2008). Asimismo, Lampe y colaboradores en el 2017 inmunizaron por primera vez monos *rhesus* con la proteína recombinante 14-3-3 de *E. multilocularis* empleando aluminio como adyuvante, lo que resultó en una inmunidad protectora duradera con producción de anticuerpos específicos de antígeno (Lampe et al., 2017). En otros modelos de helmintos, como *Schistosoma mansoni*, se ha considerado a la proteína 14-3-3z como candidata para vacunar contra esquistosomosis, reduciendo la carga de adultos en un rango de 25-46% (Schechtman et al., 2001), y en el caso de parásitos de animales también se observaron altas tasas de protección con la proteína 14-3-3z de *S. bovis* frente a su infección homóloga en ratones (Uribe et al., 2007). Por otra parte, se han descrito estudios donde, como en nuestro ensayo, la proteína 14-3-3z no ejerció un efecto protector, al no reducir la carga parasitaria, como ocurrió frente a la infección con *Trichinella britovi*, a pesar de producir una respuesta inmunitaria con producción de anticuerpos (Stachyra et al., 2020). De igual modo, ovejas que fueron inmunizadas con la proteína r14-3-3z de *F. hepatica* tampoco mostraron protección significativa frente a la infección (Pérez-Caballero et al., 2018).

El índice esplénico de los animales vacunados muestra niveles de activación de la respuesta inmunitaria celular después de la infección o vacunación (Manente et al., 2018). En este sentido, Mei y colaboradores (2020), encontraron índices esplénicos elevados en ratones infectados con el protozoo sanguíneo *Plasmodium berghei* y, además, este índice fue mayor en ratones coinfectados con el helminto *Trichinella spiralis* (Mei et al., 2020). Además, ratones inmunodeprimidos infectados con *Sporothrix schenckii*, un hongo oportunista, presentaron índices esplénicos más altos (Manente et al., 2018). Nuestros resultados, muestran un ligero aumento del índice esplénico en los animales inmunizados tanto con las proteínas rSs14-3-3z como rSsMA, y posteriormente infectados con *S. venezuelensis*, respecto a los controles de infección o ADAD, sugiriendo la estimulación de este órgano. Este aumento podría estar condicionado por una mayor abundancia de parásitos intestinales, lo cual concuerda con el incremento del número de huevos por gramo (HPG) y el mayor número de hembras partenogenéticas recuperadas en ambos casos. Algo similar ocurre con el índice intestinal, el cual indica los efectos inflamatorios locales de la infección por *S. venezuelensis*. En este caso, la presencia de un mayor número de hembras partenogenéticas en los grupos de ratones inmunizados explicaría el aumento observado en el índice intestinal. En nuestros ensayos, se puede observar un incremento de ambos índices en los grupos inmunizados con las proteínas recombinantes, rSs14-3-3z y rSsMA, mostrando que las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* no previnieron la infección, ni tampoco la inflamación local ni sistémica.

En un estudio de inmunización con una proteína de *Schistosoma japonicum*, Sj-p80, en adyuvante Montanide™ ISA61VG y realizado en ratones infectados con dicho parásito, hubo una reducción en la carga de hembras parásitas, pero el número de huevos no disminuyó. Sin embargo, las tasas de viabilidad/eclosión de los huevos se redujeron (Molehin et al., 2021). Sorprendentemente, en nuestro ensayo el número de hembras partenogenéticas recuperadas del intestino delgado y el número de HPG fue más alto en los animales inmunizados. Estos resultados sugieren que la inmunización no sólo no protegió de la infección, sino que tampoco interfirió en el desarrollo y maduración de las hembras partenogenéticas, ya que la presencia de huevos en las heces está relacionada con el establecimiento y desarrollo exitoso de los parásitos. En un ensayo de inmunización con vesículas extracelulares de *Echinostoma caproni* en ratones, realizado por nuestro grupo de trabajo, se puso de manifiesto que la cantidad de huevos en las heces se redujo después de 6 semanas de infección, lo que sugiere que la inmunización no afectó al establecimiento de la infección, pero sí produjo un retraso en el desarrollo del parásito, mejorando los síntomas de la infección (Trelis et al., 2016). En nuestro ensayo de inmunización se contó con sólo una semana después de la infección, por lo que presumiblemente dicho tiempo tan corto no llegó a permitir una disminución en los niveles de carga parasitaria o en el estado de desarrollo del parásito.

El análisis de los anticuerpos IgG específicos contra rSs14-3-3z y rSsMA en sueros de ratones infectados con *S. venezuelensis* después del tratamiento (inmunización e infección), demostró que la inmunización no potenció la respuesta inmunitaria humoral producida por la infección. Nuestros resultados sugieren que es la infección la que en sí misma está induciendo una respuesta humoral específica contra estas dos proteínas nativas. Esto confirmaría que las proteínas 14-3-3z y MA se encuentren entre las proteínas más abundantes e inmunogénicas del parásito, correspondiéndose con elevados niveles de mRNA, como se describió anteriormente en el análisis transcriptómico de L3i de *S. stercoralis* (Marcilla et al., 2012a). Asimismo, la proteína 14-3-3 zeta ha sido identificada como uno de los componentes más abundantes en el proteoma de la larva L3i de *S. venezuelensis* (Fonseca et al., 2020). Esta observación valida aún más el uso del modelo de ratón para simular respuestas relevantes comparables a la infección humana, y sugiere que es probable que los genes que codifican estas proteínas sean inducidos tras la infección por *S. venezuelensis*. Así, tanto el nivel de similitud entre las proteínas homólogas, como la observación de que la infección induce la producción de anticuerpos específicos para estas dos proteínas validan el diseño experimental aquí elegido.

Hasta ahora, se han estudiado pocas proteínas recombinantes como posibles candidatas para el serodiagnóstico de la estrongiloidosis (Rodpai et al., 2016, 2017; Dishnica et al., 2023). Los anticuerpos IgG contra rSs14-3-3z y rSsMA no aumentaron con la inmunización y, por lo tanto, no proporcionaron ningún efecto protector frente a la infección por *S. venezuelensis*, pero sí podrían ser útiles para el diagnóstico y como marcadores de la severidad de la infección (Fernández-Rivas et al., 2019; Masoori et al., 2019).

Como se ha comentado, la inmunización con las proteínas recombinantes no indujo protección contra la infección por *S. venezuelensis*, sin embargo, sí tuvo un efecto inmunomodulador. La doble inmunización con la proteína rSs14-3-3z, previa a la infección, provocó una sobreexpresión de las citoquinas antiinflamatorias IL-4, IL-13, IL-10 y TGF- β en el bazo, perfil de citoquinas asociado a una respuesta inmunitaria sistémica de tipo Th2/Treg, que lejos de inducir un estado de protección, pudo promover el establecimiento del parásito y el éxito de la infección. Estos datos corroboran, en cierta medida, los resultados obtenidos *in vitro* para la proteína rSs14-3-3z.

En el caso de la inmunización con la proteína rSsMA los resultados obtenidos del perfil de citoquinas no fueron concluyentes en el ensayo de vacunación. Sin embargo, los resultados *in vitro* sugieren que la respuesta temprana frente a la misma (donde previamente se estimularon los macrófagos con LPS) produce resultados más rápidos que los obtenidos en un sistema complejo como lo es un modelo animal.

Se sabe que las infecciones por helmintos, y en particular por *Strongyloides* spp., generan en el sistema inmunológico adaptativo del hospedador una respuesta inmunitaria de tipo Th2, que tiene la ventaja de causar daños colaterales reducidos, en comparación con las respuestas de tipo Th1 o Th17. Este tipo de respuesta antiinflamatoria involucra la expresión de citoquinas tales como IL-4, IL-5 e IL-13, por las células Th2 (Bonne-Année et al., 2011; Nutman, 2017). Las citoquinas de tipo 2 expresadas orientan a un tipo de respuesta de protección al hospedador, reparación de tejido y control de la inflamación (Gause et al., 2013).

Como resultado del aumento de expresión de las citoquinas IL-4 e IL-13, se produce el reclutamiento y activación de eosinófilos, además, de la diferenciación de los macrófagos a macrófagos de tipo M2, un tipo de AAM ϕ que también es antiinflamatorio, regulando negativamente al IFN- γ y favoreciendo a una respuesta de tipo Th2 (Bonne-Année et al., 2013). Las respuestas de las citoquinas de tipo 2 (particularmente IL-13) desempeñan un papel importante en la fibrosis y la cicatrización de heridas, y se postula que ayudan a curar el daño

tisular inducido por muchos parásitos helmintos que invaden los tejidos (Allen & Sutherland, 2014). Asimismo, se considera una citoquina importante en la inmunorregulación de procesos alérgicos y autoinmunes (Allen & Sutherland, 2014; McSorley et al., 2019). La IL-13, junto con la IL-10, pueden inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias en los macrófagos (Gause et al., 2013).

Además, las infecciones por helmintos también están asociadas con el aumento de la expresión de las citoquinas IL-10 y TGF- β , que regulan la respuesta de tipo Th2, y antagonizan las actividades de las citoquinas de tipo Th1, suprimiendo la inflamación y dirigiendo a una respuesta inmunológica tolerante frente a la infección por helmintos (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003; Palomares et al., 2014). Estas citoquinas reguladoras, IL-10 y TGF- β , están sobreexpresadas en el bazo de los ratones inmunizados con la proteína rSs14-3-3z, lo que demuestra su capacidad para regular el sistema inmunitario del hospedador en procesos inflamatorios, como ya se había mencionado anteriormente (Han et al., 2015; Munier et al., 2021). IL-10 y TGF- β podrían provocar tolerancia inmunológica, y ciertos tipos de daño en el hospedador, pero al mismo tiempo podrían impedir la expulsión de los helmintos, promoviendo así infecciones crónicas (McSorley et al., 2019). Se ha investigado, en varios modelos de ratón, los mecanismos mediante los cuales las moléculas secretadas por los parásitos restringen las respuestas inmunitarias del hospedador. Un requisito común a todas las infecciones por helmintos es que los parásitos buscan evadir todos los efectos de las respuestas inmunitarias del hospedador y sobrevivir en él durante largos períodos (Behnke et al., 1992; Maizels & Yazdanbakhsh, 2003). Experimentos adicionales con ratones *knock-out* para células NK, IL-10 y TGF- β ayudarán a aclarar la responsabilidad de las citoquinas sobreexpresadas en el efecto de la evolución de la patología del parásito.

En un estudio previo, se examinaron los niveles de citoquinas proinflamatorias de tipo 1 y de tipo 17 asociadas a la infección por *S. stercoralis* en personas positivas a la enfermedad, tanto por microscopía como por serología, sin tratamiento anti-helmíntico previo, y en concordancia con nuestros resultados, demostraron bajos niveles de expresión de citoquinas de tipo 1, incluidas IFN- γ e IL-2, las cuales generalmente se relacionan con inmunidad a patógenos intracelulares (Anuradha et al., 2016).

La interacción entre las respuestas Th1, Th2 y las células T reguladoras parece ser crucial en la defensa contra la infección por *S. stercoralis* (Flores-Aldana et al., 2005). Este parásito es capaz de replicarse en el hospedador humano, realizando ciclos de autoinfección. Aunque la autoinfección está limitada por la respuesta inmunitaria del hospedador, puede ocurrir una

hiperinfección potencialmente fatal y/o producir una enfermedad diseminada cuando la inmunidad está comprometida (Krishnamurthy et al., 2007; Botero & Restrepo, 2012). En relación a las citoquinas proinflamatorias, se observaron niveles bajos de IL-12 e IFN- γ , mientras que TNF- α se expresó en niveles altos en bazo como consecuencia de la inmunización con la proteína rSs14-3-3z, por encima del aumento producido por la infección. Se considera que TNF- α actúa como una citoquina pleiotrópica, además de ser una citoquina proinflamatoria. El TNF- α tiene un papel fundamental en la regulación de la protección del hospedador mediada por citoquinas de tipo Th2 contra las infecciones por helmintos (Artis et al., 1999). Se han descrito algunos casos de hiperinfección por *S. stercoralis* en pacientes en estados inmunodeprimidos, debido a la administración de anti-TNF- α para tratar enfermedades autoinmunes (Krishnamurthy et al., 2007; Khaliq et al., 2018; Prior-Español et al., 2020). Por tanto, niveles elevados de TNF- α podrían prevenir el síndrome de hiperinfección causado por *S. stercoralis*, que se asocia con una alta mortalidad. En consecuencia, los pacientes deben someterse a pruebas de descarte de estrongiloidosis antes de iniciar un tratamiento inmunosupresor para identificar a los portadores asintomáticos tanto en regiones endémicas como no endémicas.

Al analizar la enzima NOS2 en bazo de animales de experimentación, ambas proteínas, rSs14-3-3z y rSsMA, indujeron niveles de expresión similares a los obtenidos en los controles de infección y del adyuvante, lo que estaría relacionado con una respuesta inflamatoria sistémica provocada por la presencia intestinal de las hembras partenogenéticas. En condiciones patológicas, por ejemplo, durante la inflamación, se producen altos niveles temporales de óxido nítrico (NO) en el cuerpo, después de la inducción de la expresión de un tipo de isoforma de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS, también denominada NOS2). En este contexto, el NO puede considerarse un arma de doble filo. Por un lado, puede ejercer efectos beneficiosos sobre el organismo, actuando como agente antibacteriano, antiparasitario, antiviral o como agente tumoricida. Por otro lado, los niveles elevados de NO, si no se controlan, pueden ser perjudiciales (Colasanti & Suzuki, 2000).

La inmunización con las proteínas rSs14-3-3z y rSsMA no indujo un cambio significativo en el perfil de citoquinas en pulmón e intestino. Ambos órganos pueden contactar con agentes patógenos, y aunque no son órganos linfoides, como el bazo, presentan mecanismos de respuesta inmunitaria en los que intervienen neutrófilos, macrófagos y células NK, así como también presentan barreras de protección frente a patógenos como secreción de moco, enzimas y las células epiteliales capaces de secretar citoquinas cuando son atacadas (Rivas-Santiago, 2005; Ramiro-Puig, 2008). Si bien, en nuestro estudio no se detectaron cambios significativos en

la expresión de citoquinas en los animales tratados, esto pudo deberse al corto tiempo que se dio tras la infección experimental con *S. venezuelensis*. El desarrollo del ciclo biológico completo de *Strongyloides* spp. necesita semanas, por lo que, en un futuro, los estudios se diseñarán teniendo en cuenta un tiempo de infección más prolongado para que el ciclo del parásito pueda ser completado, estableciéndose en otros órganos.

Somos conscientes de las limitaciones de nuestro estudio, debido a la carencia de un modelo experimental utilizando *S. stercoralis*, pero la elevada homología entre las proteínas (14-3-3 zeta y antígeno principal) de las distintas especies de *Strongyloides* spp. nos ha permitido el uso del modelo de *S. venezuelensis* en ratón, demostrando que la inmunización con rSs14-3-3z y rSsMA en el sistema de adyuvante ADAD puede modular la respuesta del hospedador, favoreciendo la infección por *S. venezuelensis*, por lo que no pueden ser usadas como candidatos vacunales. Sin embargo, nuestros resultados muestran que ambas proteínas, rSs14-3-3z y rSsMA, podrían usarse para diagnosticar estrongiloidosis mediante test *ELISA*, ya que han detectado IgGs específicas en el suero de ratones infectados. En este sentido dichas proteínas tienen una potencial utilidad en diagnóstico en humanos, como se ha puesto de manifiesto en los ensayos realizados *in house*. Son necesarios experimentos adicionales para investigar la respuesta inmunitaria a más largo plazo tras la inmunización y la infección, para evaluar la respuesta adaptativa completa en infección crónica y evaluar los efectos de la inmunomodulación.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral permiten extraer las siguientes conclusiones:

- 1) La técnica de *ELISA* indirecto con la proteína rSs14-3-3z de *S. stercoralis* ha mostrado una buena relación de sensibilidad y especificidad, y que destaca respecto a otras técnicas *ELISA* disponibles por su especificidad.
- 2) El tratamiento con las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* sobre macrófagos de ratón no ha mostrado efectos citostáticos ni citotóxicos tras 24 h de cultivo, a ninguna de las dosis ensayadas.
- 3) La proteína rSs14-3-3z mostró un efecto proinflamatorio sobre los macrófagos, durante 24 h y a 500 ng/mL, mientras que la rSsMA evidenció un efecto antiinflamatorio sobre macrófagos activados con LPS.
- 4) Macrófagos tratados con la proteína rSs14-3-3z muestran una inducción de la expresión de citoquinas hacia una respuesta de tipo Th17/Th2; mientras que la proteína rSsMA induce respuestas de tipo Th2/Treg.
- 5) Tras ensayos de inmunización en ratones con las proteínas rSs14-3-3z y rSsMA y posterior infección experimental con *S. venezuelensis*, se detectaron niveles de anticuerpos IgG específicos contra cada proteína recombinante de *S. stercoralis*, lo que confirma el reconocimiento cruzado entre antígenos de ambas especies.
- 6) Los ensayos de vacunación con las proteínas recombinantes de *S. stercoralis* no consiguieron proteger en ninguno de los casos a los animales frente a la infección por *S. venezuelensis*. Al contrario, dichas inmunizaciones favorecieron el establecimiento y desarrollo de la infección, confirmado por un aumento del número de hembras recuperadas, así como del número de huevos por gramo de heces.
- 7) La inmunización de animales con la proteína rSs14-3-3z tiene la capacidad de polarizar la respuesta inmunitaria del hospedador hacia Th2/Treg en bazo.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abraham, D., Hess, J. A., Mejía, R., Nolan, T. J., Lok, J. B., Lustigman, S., & Nutman, T. B. (2011). Immunization with the recombinant antigen Ss-IR induces protective immunity to infection with *Strongyloides stercoralis* in mice. *Vaccine*, 29(45), 8134–8140. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.030>
- 2) Abaira, V. (2000). El índice kappa. *SEMERGEN*, 27(5), 247–249. http://www.hrc.es/bioest/Intro_errores.html
- 3) Ahmad, F., Kumar, R., Gupta, S., & Rathaur, S. (2020). Identification of a HSP14-3-3 in *Setaria cervi* and its cross-reactivity with *Wuchereria bancrofti*-infected human sera. *Parasite Immunology*, 42(11), e12777. <https://doi.org/10.1111/pim.12777>
- 4) Aitken, A., Collinge, D. B., van Heusden, B. P. H., Isobe, T., Roseboom, P. H., Rosenfeld, G., & Soll, J. (1992). 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(12), 498–501. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90339-B](https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90339-B)
- 5) Alabi, A., Boggild, A. K., & Bitnun, A. (2017). Acute strongyloidiasis in a child recently returned from vacation in Cuba. *Canadian Medical Association journal*, 189(46), E1416–E1420. <https://doi.org/10.1503/cmaj.170464>
- 6) Alcaraz, C. O., Adell, R. I., Sánchez, P. S., Blasco, M. J., Sánchez, O. A., Auñón, A. S., & Calabuig, D. R. (2004). Characteristics and geographical profile of strongyloidiasis in healthcare area 11 of the Valencian community (Spain). *Journal of Infection*, 49(2), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.01.016>
- 7) Allen, J. E., & Sutherland, T. E. (2014). Host protective roles of type 2 immunity: Parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. *Seminars in Immunology*, 26(4), 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.06.003>
- 8) Altschup, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- 9) Andrade, M. A., Siles-Lucas, M., Espinoza, E., Arellano, J. L. P., Gottstein, B., & Muro, A. (2004). *Echinococcus multilocularis* laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages *in vitro*. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 10(3), 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2004.03.002>
- 10) Anuradha, R., Munisankar, S., Bhootra, Y., Jagannathan, J., Dolla, C., Kumaran, P., Shen, K., Nutman, T. B., & Babu, S. (2016). Systemic cytokine profiles in *Strongyloides stercoralis* infection and alterations following treatment. *Infection and Immunity*, 84(2), 425–431. <https://doi.org/10.1128/IAI.01354-15>

- 11) Arifin, N., Hanafiah, K. M., Ahmad, H., & Noordin, R. (2019). Serodiagnosis and early detection of *Strongyloides stercoralis* infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 52(3), 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.10.001>
- 12) Artis, D., Humphreys, N. E., Bancroft, A. J., Rothwell, N. J., Potten, C. S., & Grencis, R. K. (1999). Tumor Necrosis Factor is a critical component of Interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection. *Journal of Experimental Medicine*, 190(7), 953–962. <https://doi.org/10.1084/jem.190.7.953>
- 13) Barroso, M., Salvador, F., Sánchez-Montalvá, A., Bosch-Nicolau, P., & Molina, I. (2019). *Strongyloides stercoralis* infection: A systematic review of endemic cases in Spain. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(3), e0007230. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007230>
- 14) Basile, A., Simzar, S., Bentow, J., Antelo, F., Shitabata, P., Peng, S. K., & Craft, N. (2010). Disseminated *Strongyloides stercoralis*: Hyperinfection during medical immunosuppression. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63(5), 896–902. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.09.037>
- 15) Behnke, J. M., Barnard Christopher, J., & Wakelin, D. (1992). Understanding chronic nematode infections: evolutionary considerations, current hypotheses and the way forward. *International Journal for Parasitology*, 22(7), 861–907. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90046-n](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90046-n)
- 16) Beknazarova, M., Whiley, H., & Ross, K. (2016a). Strongyloidiasis: A disease of socioeconomic disadvantage. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(5), 517. <https://doi.org/10.3390/ijerph13050517>
- 17) Beknazarova, M., Whiley, H., & Ross, K. (2016b). Advocating for both environmental and clinical approaches to control human strongyloidiasis. *Pathogens*, 5(4), 59. <https://doi.org/10.3390/pathogens5040059>
- 18) Belhassen-García, M., Alonso-Sardón, M., Martínez-Pérez, A., Soler, C., Carranza-Rodríguez, C., Pérez-Arellano, J. L., Muro, A., & Salvador, F. (2017). Surveillance of strongyloidiasis in Spanish inpatients (1998–2014). *PLoS ONE*, 12(12), e0189449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189449>
- 19) Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S. M., Loukas, A., Diemert, D., & Hotez, P. J. (2006). Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *The Lancet*, 367(9521), 1521–1532. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68653-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4)
- 20) Bewick, V., Cheek, L., & Ball, J. (2004). Statistics review 13: Receiver operating characteristics curves. *Critical Care*, 8(6), 508–512. <https://doi.org/10.1186/cc3000>
- 21) Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Montresor, A., Requena-Méndez, A., Muñoz, J., Krolewiecki, A. J., Gotuzzo, E., Mena, M. A., Chiodini, P. L., Anselmi, M., Moreira, J., & Albonico, M. (2013).

Strongyloides stercoralis: A plea for action. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002214>

- 22) Bonne-Année, S., Hess, J. A., & Abraham, D. (2011). Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. *Immunologic Research*, 51(2–3), 205–214. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8258-2>
- 23) Bonne-Année, S., Kerepesi, L. A., Hess, J. A., O’Connell, A. E., Lok, J. B., Nolan, T. J., & Abraham, D. (2013). Human and mouse macrophages collaborate with neutrophils to kill larval *Strongyloides stercoralis*. *Infection and Immunity*, 81(9), 3346–3355. <https://doi.org/10.1128/IAI.00625-13>
- 24) Bonne-Année, S., Kerepesi, L. A., Hess, J. A., Wesolowski, J., Paumet, F., Lok, J. B., Nolan, T. J., & Abraham, D. (2014). Extracellular traps are associated with human and mouse neutrophil and macrophage mediated killing of larval *Strongyloides stercoralis*. *Microbes and Infection*, 16(6), 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.02.012>
- 25) Botero, D., & Restrepo, M. (2012). *Parasitosis Humanas Incluye animales venenosos y ponzoñosos*. 5a Edición. Medellín, Corporación para Investigaciones Biológicas.
- 26) Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- 27) Breloer, M., & Abraham, D. (2017). *Strongyloides* infection in rodents: Immune response and immune regulation. *Parasitology*, 144(3), 295–315. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000111>
- 28) Bryant, A. S., Akimori, D., Stoltzfus, J. D. C., & Hallem, E. A. (2024). A standard workflow for community-driven manual curation of *Strongyloides* genome annotations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 379(1894), 20220443. <https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0443>
- 29) Buonfrate, D., Angheben, A., Gobbi, F., Muñoz, J., Requena-Méndez, A., Gotuzzo, E., Mena, M. A., & Bisoffi, Z. (2012). Imported strongyloidiasis: Epidemiology, presentations, and treatment. *Current Infectious Disease Reports*, 14(3), 256–262. <https://doi.org/10.1007/s11908-012-0248-6>
- 30) Buonfrate, D., Requena-Mendez, A., Angheben, A., Muñoz, J., Gobbi, F., Van Den Ende, J., & Bisoffi, Z. (2013). Severe strongyloidiasis: A systematic review of case reports. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 78. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-78>
- 31) Buonfrate, D., Formenti, F., Perandin, F., & Bisoffi, Z. (2015a). Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(6), 543–552. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.04.001>

- 32) Buonfrate, D., Mena, M. A., Angheben, A., Requena-Mendez, A., Muñoz, J., Gobbi, F., Albonico, M., Gotuzzo, E., Bisoffi, Z., Bonati, M., Severino, F., Confalonieri, V., Pandolfini, C., Bartoloni, A., Strohmeyer, M., Zammarchi, L., Muñoz, J., Pool, R., Requeña, A., ... Bruno, E. (2015b). Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: A systematic review of the literature. *Epidemiology and Infection*, 143(3), 452–460. <https://doi.org/10.1017/S0950268814001563>
- 33) Buonfrate, D., Requena-Mendez, A., Angheben, A., Cinquini, M., Cruciani, M., Fittipaldo, A., Giorli, G., Gobbi, F., Piubelli, C., & Bisoffi, Z. (2018). Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection—A systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(2), e0006229. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006229>
- 34) Buonfrate, D., Bisanzio, D., Giorli, G., Odermatt, P., Fürst, T., Greenaway, C., French, M., Reithinger, R., Gobbi, F., Montresor, A., & Bisoffi, Z. (2020). The global prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection. *Pathogens*, 9(6), 1–9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060468>
- 35) Buonfrate, D., Bradbury, R. S., Watts, M. R., & Bisoffi, Z. (2023). Human strongyloidiasis: complexities and pathways forward. *Clinical Microbiology Reviews*, e0003323. <https://doi.org/10.1128/cmr.00033-23>
- 36) Cabán-Hernández, K., Gaudier, J. F., & Espino, A. M. (2012). Characterization and differential expression of a ferritin protein from *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 182(1–2), 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.12.005>
- 37) Caldres, S., Ursini, T., Santucci, B., Motta, L., & Angheben, A. (2022). Soil-Transmitted Helminths and Anaemia: A Neglected Association Outside the Tropics. *Microorganisms*, 10(5), 1027. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051027>
- 38) Carvalho, E. M., & Da Fonseca Porto, A. (2004). Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunology*, 26(11–12), 487–497. <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00726.x>
- 39) Caumes, E., & Keystone, J. S. (2011). Acute strongyloidiasis: a rarity. Chronic strongyloidiasis: a time bomb!. *Journal of travel medicine*, 18(2), 71–72. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2010.00492.x>
- 40) CDC. (2019, June 6). *Strongyloidiasis*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/index.html>
- 41) Cerda, J., & Cifuentes, L. (2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica. Aspectos teórico-prácticos. *Revista Chilena de Infectología*, 29(2), 138–141. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000200003>

- 42) Cerda, J., & Villarroel, L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista Chilena de Pediatría*, 79(1), 54–58
- 43) Cohen, J. (1960). A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, 20(1), 37–46. <https://doi.org/10.1177/001316446002000104>
- 44) Colasanti, M., & Suzuki, H. (2000). The dual personality of NO. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(7), 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01499-1](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01499-1)
- 45) Conder, G. A., & Williams, J. F. (1983). Immunization with infective larvae of *Strongyloides ratti* (Nematoda) exposed to microwave radiation. *The Journal of Parasitology*, 69(1), 83–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3281280>
- 46) Conway, D. J., Atkins, N. S., Lillywhitel, J. E., Bailey, J. W., Robinson, R. D., Lindo, J. F., Bundy, D. A. P., & Bianco, A. E. (1993). Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect ELISA. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(2), 173–176.
- 47) Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X)
- 48) Cox, F. E. G. (2002). History of human parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 595–612. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595-612.2002>
- 49) Culma, M. F. (2021). *Strongyloides stercoralis* proteome: A reverse approach to the identification of potential immunogenic candidates. *Microbial Pathogenesis*, 152(2021) 104545. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104545>
- 50) Czeresnia, J. M., & Weiss, L. M. (2022). *Strongyloides stercoralis*. *Lung*, 200(2), 141–148. <https://doi.org/10.1007/s00408-022-00528-z>
- 51) Dato, A. L., Pacheco-Tenza, M. I., Borrajo, E., Martínez, B., García, M., González, I., Gregori, J., Navarro, M., Saugar, J. M., García-Vázquez, E., Ruiz-Maciá, J. A., & Llenas-García, J. (2020). Strongyloidiasis in Southern Alicante (Spain): Comparative retrospective study of autochthonous and imported cases. *Pathogens*, 9(8), 601. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080601>
- 52) Dishnica, K., Piubelli, C., Manfredi, M., Kondaveeti, R. T., Longoni, S. S., Degani, M., Buonfrate, D., Giorgetti, A., & Tiberti, N. (2023). Novel insights into the somatic proteome of *Strongyloides stercoralis* infective third-stage larvae. *Parasites and Vectors*, 16(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05675-7>
- 53) Engels, D., & Zhou, X. N. (2020). Neglected tropical diseases: An effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infectious Diseases of Poverty*, 9(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-0630-9>

- 54) Eschbach, M.-L., Klemm, U., Kolbaum, J., Blankenhaus, B., Brattig, N., & Breloer, M. (2010). *Strongyloides ratti* infection induces transient nematode-specific Th2 response and reciprocal suppression of IFN- γ production in mice. *Parasite Immunology*, 32(5), 370–383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01199.x>
- 55) Eslahi, A. V., Badri, M., Nahavandi, K. H., Houshmand, E., Dalvand, S., Riahi, S. M., Johkool, M. G., Asadi, N., Hoseini Ahangari, S. A., Taghipour, A., Zibaei, M., & Khademvatan, S. (2021). Prevalence of strongyloidiasis in the general population of the world: a systematic review and meta-analysis. *Pathogens and Global Health*, 115(1), 7–20. <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1851922>
- 56) Feasey, N., Wansbrough-Jones, M., Mabey, D. C. W., & Solomon, A. W. (2010). Neglected Tropical Diseases. *British Medical Bulletin*, 93(1), 179–200. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldp046>
- 57) Fernández-Rivas, G., Rivaya, B., Romaní, N., Hao Wang, J., Alcaide, M., & Matas, L. (2019). Diagnosis of soil-transmitted helminth infections. An unsolved problem in the omics era. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(1), 20–25. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(19\)30178-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(19)30178-8)
- 58) Flores-Aldana, M., Peralta-Zaragoza, O., & Barquera-Cervera, S. (2005). El paradigma inmune Th1-Th2: un vínculo entre obesidad, aterosclerosis y diabetes mellitus. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 17(5), 232–248. [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(05\)73348-9](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(05)73348-9)
- 59) Fonseca, P. D. M., Corral, M. A., Cosenza-Contreras, M., Meisel, D. M. C. L., Melo, G. B., Antunes, M. M. S., Santo, M. C. E., Gryscek, R. C. B., Costa-Cruz, J. M., Castro-Borges, W., & Paula, F. M. (2020). Shotgun proteomics of *Strongyloides venezuelensis* infective third stage larvae: Insights into host–parasite interaction and novel targets for diagnostics. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 235(2020), 111249. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.111249>
- 60) Fontes, J. A., Barin, J. G., Talor, M. V., Stickel, N., Schaub, J., Rose, N. R., & Čiháková, D. (2017). Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during initiation of the immune response. *Immunity, Inflammation and Disease*, 5(2), 163–176. <https://doi.org/10.1002/iid3.155>
- 61) Galiano, A. (2016a). Identificación y caracterización de proteínas de *Strongyloides stercoralis* de utilidad para el diagnóstico y control de la enfermedad mediante técnicas “ómicas” [Tesis Doctoral]. *Repositorio de Objetos Digitales para la Enseñanza, la Investigación y la Cultura*. RODERIC - Universitat de València, 1-207pp.
- 62) Galiano, A., Trelis, M., Moya-Herráiz, Sánchez-Plumed, J., & Merino, J. F. (2016b). Donor-derived *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome after simultaneous kidney/pancreas transplantation. *International Journal of Infectious Diseases*, 51(2016), 19–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.08.014>

- 63) Gam, A. A., Krotoski, W. A., & Neva, F. A. (1987). Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(1), 157–161. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.37.157>
- 64) Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784–3788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>
- 65) Gause, W. C., Wynn, T. A., & Allen, J. E. (2013). Type 2 immunity and wound healing: Evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nature Reviews Immunology*, 13(8), 607–614. <https://doi.org/10.1038/nri3476>
- 66) Genta, R. M. (1989). Global prevalence of Strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. *Reviews of Infectious Diseases*, 2(5), 755–767. <https://doi.org/10.1093/clinids/11.5.755>
- 67) Gibbons, L., Jacobs, D., Fox, M., & Hansen, J. (2011). *La guía RVC/FAO para el diagnóstico parasitológico veterinario. Examen fecal para la determinación de helmintos parásitos*. Royal Veterinary College. <http://www.rvc.ac.uk/review/Parasitology/Index/Index.htm>
- 68) González-Horna, P. J., & Iglesias-Osores, S. A. (2017). Morfología de *Strongyloides stercoralis*. *Revista Del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 10(3), 169–170. <https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2017.103.11>
- 69) Grove, D. I. (1996). Human strongyloidiasis. *Advances in Parasitology*, 38(1996), 251–309. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60036-6](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60036-6)
- 70) Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutiérrez, L., & Sotelo-Mundo, R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *BIOtecnia*, 15(3), 8. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i3.152>
- 71) Hamilton, K. W., Abt, P. L., Rosenbach, M. A., Bleicher, M. B., Levine, M. S., Mehta, J., Montgomery, S. P., Hasz, R. D., Bono, B. R., Tetzlaff, M. T., Mildiner-Early, S., Introcaso, C. E., & Blumberg, E. A. (2011). Donor-derived *Strongyloides stercoralis* infections in renal transplant recipients. *Transplantation*, 91(9), 1019–1024. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182115b7b>
- 72) Han, X., Han, Y., Jiao, H., & Jie, Y. (2015). 14-3-3 ζ regulates immune response through stat3 signaling in oral squamous cell carcinoma. *Molecules and Cells*, 38(2), 112–121. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.02101>
- 73) Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)

- 74) Herbert, D. R., Lee, J. J., Lee, N. A., Nolan, T. J., Schad, G. A., & Abraham, D. (2000). Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *The Journal of Immunology*, 165(8), 4544–4551. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4544>
- 75) Hernández-Castro, C. (2014). *Strongyloides stercoralis*: un geohelminto olvidado. *Medicina & Laboratorio*, 20(7–8), 383–398.
- 76) Hernández-Chavarría, F. (2001). *Strongyloides stercoralis*: Un parásito subestimado. *Parasitología al Día*, 25(1–2), 40–49. <https://doi.org/10.4067/S0716-07202001000100008>
- 77) Hoo, Z. H., Candlish, J., & Teare, D. (2017). What is an ROC curve? *Emergency Medicine Journal*, 34(6), 357–359. <https://doi.org/10.1136/emered-2017-206735>
- 78) Hotez, P. J., & Ferris, M. T. (2006). The antipoverty vaccines. *Vaccine*, 24(31–32), 5787–5799. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.008>
- 79) Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Ehrlich Sachs, S., Sachs, J. D., & Savioli, L. (2007). Control of Neglected Tropical Diseases. *New England Journal of Medicine*, 357(10), 1018–1045. <https://doi.org/https://doi.org/10.1056/NEJMra064142>
- 80) Hotez, P. J., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J., & Jacobson, J. (2008). Helminth infections: The great neglected tropical diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1311–1321. <https://doi.org/10.1172/JCI34261>
- 81) Hoy, W. E., Roberts, N. J., Bryson, M. F., Bowles, C., Lee, J. C., Rivero, A. J., & Ritterson, A. L. (1981). Transmission of strongyloidiasis by kidney transplant? Disseminated strongyloidiasis in both recipients of kidney allografts from a single cadaver donor. *Journal of the American Medical Association*, 246(17), 1937–1939. <https://doi.org/10.1001/jama.1981.03320170049031>
- 82) Hunt, V. L., Tsai, I. J., Coghlan, A., Reid, A. J., Holroyd, N., Foth, B. J., Tracey, A., Cotton, J. A., Stanley, E. J., Beasley, H., Bennett, H. M., Brooks, K., Harsha, B., Kajitani, R., Kulkarni, A., Harbecke, D., Nagayasu, E., Nichol, S., Ogura, Y., ... Berriman, M. (2016). The genomic basis of parasitism in the *Strongyloides* clade of nematodes. *Nature Genetics*, 48(3), 299–307. <https://doi.org/10.1038/ng.3495>
- 83) Hunt, V. L., Tsai, I. J., Selkirk, M. E., & Viney, M. (2017). The genome of *Strongyloides* spp. gives insights into protein families with a putative role in nematode parasitism. *Parasitology*, 144(3), 343–358. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001554>
- 84) Igual-Adell, R., Oltra-Alcaraz, C., Soler-Company, E., Sánchez-Sánchez, P., Matogo-Oyana, J., & Rodríguez-Calabuig, D. (2004). Efficacy and safety of ivermectin and thiabendazole in the treatment of strongyloidiasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 5(12), 2615–2619. <https://doi.org/10.1517/14656566.5.12.2615>

- 85) Igual-Adell, R., & Domínguez-Márquez, V. (2007). Estrongiloidiasis: epidemiología, manifestaciones clínicas y diagnóstico. Experiencia en una zona endémica: la comarca de La Safor (Valencia). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(3), 38–44.
- 86) Iriemenam, N. C., Sanyaolu, A. O., Oyibo, W. A., & Fagbenro-Beyioku, A. F. (2010). *Strongyloides stercoralis* and the immune response. *Parasitology International*, 59(1), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.10.009>
- 87) Janwan, P., Rodpai, R., Intapan, P. M., Sanpool, O., Tourtip, S., Maleewong, W., & Thanchomnang, T. (2020). Possible transmission of *Strongyloides fuelleborni* between working Southern pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*) and their owners in Southern Thailand: Molecular identification and diversity. *Infection, Genetics and Evolution*, 85(2020), 104516. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104516>
- 88) Jourdan, P. M., Lamberton, P. H. L., Fenwick, A., & Addiss, D. G. (2018). Soil-transmitted helminth infections. *The Lancet*, 391(10117), 252–265. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31930-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31930-X)
- 89) Karanam, L. S., Basavraj, G., & Papireddy, C. (2021). *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome. *Indian Journal of Surgery*, 83(3), 582–586. <https://doi.org/10.1007/s12262-020-02292-x>
- 90) Keiser, P. B., & Nutman, T. B. (2004). *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 208–217. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.208-217.2004>
- 91) Khaliq, M. F., Ihle, R. E., & Perry, J. (2018). Immunosuppression with Anti-tumour Necrosis Factor therapy leading to *Strongyloides* hyperinfection syndrome. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2018(6341680), 1–4. <https://doi.org/10.1155/2018/6341680>
- 92) Khurana, S., Singh, S., & Mewara, A. (2021). Diagnostic techniques for soil-transmitted helminths – recent advances. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 12(2021), 181–196. <https://doi.org/10.2147/rrtm.s278140>
- 93) Kim, J. H., Kim, D. S., Yoon, Y. K., Sohn, J. W., & Kim, M. J. (2016). Donor-derived strongyloidiasis infection in solid organ transplant recipients: a review and pooled analysis. *Transplantation Proceedings*, 48(7), 2442–2449. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2015.11.045>
- 94) Kim, J. M., & Sivasubramanian, G. (2022). *Strongyloides* hyperinfection syndrome among COVID-19 patients treated with corticosteroids. *Emerging Infectious Diseases*, 28(7), 1531–1533. <https://doi.org/10.3201/eid2807.220198>
- 95) Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), 257–260. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(02\)02355-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(02)02355-9)

- 96) Kridaningsih, T. N., Sukmana, D. J., Mufidah, H., Diptyanusa, A., Kusumasari, R. A., Burdam, F. H., Kenangalem, E., Poespoprodjo, J. R., Fuad, A., Mahendradhata, Y., Supargiyono, S., Utzinger, J., Becker, S. L., & Murhandarwati, E. E. H. (2020). Epidemiology and risk factors of *Strongyloides stercoralis* infection in Papua, Indonesia: a molecular diagnostic study. *Acta Tropica*, 209(2020), 105575. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105575>
- 97) Krishnamurthy, R., Dincer, H. E., & Whittemore, D. (2007). *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a patient with rheumatoid arthritis after anti-TNF- α therapy. *Journal of Clinical Rheumatology*, 13(3), 150–152. <https://doi.org/10.1097/RHU.0b013e3180690933>
- 98) Krolewiecki, A. J., Ramanathan, R., Fink, V., McAuliffe, I., Cajal, S. P., Won, K., Juarez, M., Di Paolo, A., Tapia, L., Acosta, N., Lee, R., Lammie, P., Abraham, D., & Nutman, T. B. (2010). Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using recombinant antigen-based serologies in a community-wide study in northern Argentina. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(10), 1624–1630. <https://doi.org/10.1128/CVI.00259-10>
- 99) Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 469–471. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- 100) Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- 101) Lai, C.-P., Hsu, Y.-H., Wang, J.-H., & Lin, C.-M. (2002). *Strongyloides stercoralis* infection with bloody pericardial effusion in a non-immunosuppressed patient. *Circulation Journal*, 66(6), 613–614. <https://doi.org/10.1253/circj.66.613>
- 102) Lampe, K., Gottstein, B., Becker, T., Stahl-Hennig, C., Kaup, F.-J., & Mätz-Rensing, K. (2017). Immunization of rhesus macaques with *Echinococcus multilocularis* recombinant 14-3-3 antigen leads to specific antibody response. *Parasitology Research*, 116(1), 435–439. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5303-z>
- 103) Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159–174. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/2529310>
- 104) Lara, A. R. (2011). Producción de Proteínas Recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 209–223. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62020825005>
- 105) Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappa B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), a001651. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>
- 106) Legarda-Ceballos, A. L., López-Abán, J., Del Olmo, E., Escarcena, R., Bustos, L. A., Rojas-Caraballo, J., Vicente, B., Fernández-Soto, P., San Feliciano, A., & Muro, A. (2016). *In vitro*

and *in vivo* evaluation of 2-aminoalkanol and 1,2-alkanediamine derivatives against *Strongyloides venezuelensis*. *Parasites and Vectors*, 9(1), 364. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1648-5>

- 107) Leighton, P. M., & Macsween, H. M. (1990). *Strongyloides stercoralis* the cause of an urticarial-like eruption of 65 years' duration. *Archives of Internal Medicine*, 150(8), 1747–1748. <https://doi.org/https://doi.org/10.1001/archinte.150.8.1747>
- 108) Levenhagen, M. A., Conte, H., & Costa-Cruz, J. M. (2016). Current progress toward vaccine and passive immunization approaches for *Strongyloides* spp. *Immunology Letters*, 180(2016), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.10.005>
- 109) Ligas, J. A., Kerepesi, L. A., Galioto, A. M., Lustigman, S., Nolan, T. J., Schad, G. A., & Abraham, D. (2003). Specificity and mechanism of immunoglobulin M (IgM)-and IgG-dependent protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infection and Immunity*, 71(12), 6835–6843. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.12.6835-6843.2003>
- 110) Lima, J. P., & Delgado, P. G. (1961). Diagnosis of strongyloidiasis: Importance of Baermann's method. *The American Journal of Digestive Diseases*, 6(9), 899–904. <https://doi.org/10.1007/BF02231086>
- 111) Lindo, J. F., Conway, D. J., Atkins, N. S., Bianco, A. E., Robinson, R. D., & Bundy, D. A. P. (1994). Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51(2), 175–179. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.175>
- 112) Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- 113) Lorson, M. A., Horvitz, H. R., & van den Heuvel, S. (2000). LIN-5 Is a Novel Component of the Spindle Apparatus Required for Chromosome Segregation and Cleavage Plane Specification in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology*, 148(1), 73–86. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.1.73>
- 114) Loukas, A., Maizels, R. M., & Hotez, P. J. (2021). The yin and yang of human soil-transmitted helminth infections. *International Journal for Parasitology*, 51(13–14), 1243–1253. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.11.001>
- 115) Lunderius-Andersson, C., Enoksson, M., & Nilsson, G. (2012). Mast cells respond to cell injury through the recognition of IL-33. *Frontiers in Immunology*, 3(82), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00082>
- 116) Luo, Q.-L., Qiao, Z.-P., Zhou, Y.-D., Li, X.-Y., Zhong, Z.-R., Yu, Y.-J., Zhang, S.-H., Liu, M., Zheng, M.-J., Bian, M.-H., & Shen, J.-L. (2009). Application of signaling protein 14-3-3 and

26kDa glutathione-S-transferase to serological diagnosis of Schistosomiasis japonica. *Acta Tropica*, 112(2), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.06.011>

- 117) Ly, M. N., Bethel, S. L., Usmani, A. S., & Lambert, D. R. (2003). Cutaneous *Strongyloides stercoralis* infection: An unusual presentation. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(2 B), 157–160. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.338>
- 118) Magnaval, J.-F. O., Mansuy, J.-M., Villeneuve, L., & Cassaing, S. (2000). A retrospective study of autochthonous strongyloidiasis in Région Midi-Pyrénées (Southwestern France). *European Journal of Epidemiology*, 16(2), 179–182. <https://doi.org/10.1023/a:1007632028471>
- 119) Maizels, R. M., & Yazdanbakhsh, M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature reviews. Immunology*, 3(9), 733–744. <https://doi.org/10.1038/nri1183>
- 120) Manente, F. A., Quinello, C., Ferreira, L. S., De Andrade, C. R., Jellmayer, J. A., Portuondo, D. L., Batista-Duharte, A., & Carlos, I. Z. (2018). Experimental sporotrichosis in a cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice model. *Medical Mycology*, 56(6), 711–722. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx098>
- 121) Marcilla, A., Pérez-García, A., Espert, A., Bernal, D., Muñoz-Antolí, C., Esteban, J. G., & Toledo, R. (2007). *Echinostoma caproni*: Identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. *Experimental Parasitology*, 117(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.03.011>
- 122) Marcilla, A., Sotillo, J., Pérez-García, A., Igual-Adell, R., Valero, M. L., Sánchez-Pino, M. M., Bernal, D., Muñoz-Antolí, C., Trelis, M., Toledo, R., & Esteban, J. G. (2010). Proteomic analysis of *Strongyloides stercoralis* L3 larvae. *Parasitology*, 137(10), 1577–1583. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000314>
- 123) Marcilla, A., Garg, G., Bernal, D., Ranganathan, S., Forment, J., Ortiz, J., Muñoz-Antolí, C., Domínguez, M. V., Pedrola, L., Martínez-Blanch, J., Sotillo, J., Trelis, M., Toledo, R., & Esteban, J. G. (2012a). The transcriptome analysis of *Strongyloides stercoralis* L3i larvae reveals targets for intervention in a neglected disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), e1513. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001513>
- 124) Marcilla, A., Trelis, M., Cortés, A., Sotillo, J., Cantalapiedra, F., Mínguez, M. T., Valero, M. L., Sánchez del Pino, M. M., Muñoz-Antolí, C., Toledo, R., & Bernal, D. (2012b). Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS ONE*, 7(9), e45974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045974>
- 125) Marlais, T., Bickford-Smith, J., Talavera-López, C., Le, H., Chowdhury, F., & Miles, M. A. (2023). A comparative ‘omics’ approach for prediction of candidate *Strongyloides stercoralis* diagnostic coproantigens. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 17(4), e0010777. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010777>

- 126) Martínez-Fernández, A. R., Nogal-Ruiz, J. J., López-Abán, J., Ramajo, V., Oleaga, A., Manga-González, Y., Hillyer, G. V., & Muro, A. (2004). Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Veterinary Parasitology*, 126(3), 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.023>
- 127) Martínez-Pérez, A., & López-Vélez, R. (2015). Is Strongyloidiasis endemic in Spain? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), e0003482. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003482>
- 128) Martínez-Vázquez, C., González Mediero, G., Núñez, M., Pérez, S., García-Fernández, J. M., & Gimena, B. (2003). *Strongyloides stercoralis* in the south of Galicia. *Anales de Medicina Interna*, 20(9), 477–479. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992003000900008&lng=es&nrm=iso
- 129) Martins, W. A., Melo, A. L., Nicoli, J. R., Cara, D. C., Carvalho, M. A. R., Lana, M. A., Vieira, E. C., & Farias, L. M. (2000). A method of decontaminating *Strongyloides venezuelensis* larvae for the study of strongyloidiasis in germ-free and conventional mice. *Journal of Medical Microbiology*, 49(4), 387–390. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-4-387>
- 130) Masoori, L., Falak, R., Mokhtarian, K., Bandehpour, M., Razmjou, E., Jalallou, N., Jafarian, F., Akhlaghi, L., & Meamar, A. R. (2019). Production of recombinant 14-3-3 protein and determination of its immunogenicity for application in serodiagnosis of strongyloidiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 113(6), 326–331. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz006>
- 131) McSorley, H. J., Chayé, M. A. M., & Smits, H. H. (2019). Worms: Pernicious parasites or allies against allergies? *Parasite Immunology*, 41(6), e12574. <https://doi.org/10.1111/pim.12574>
- 132) Mega, E. R. (2020). Latin America's embrace of an unproven COVID treatment is hindering drug trials. *Nature*, 586(7830), 481–482. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02958-2>
- 133) Mei, X., Ye, Z., Chang, Y., Huang, S., Song, J., & Lu, F. (2020). *Trichinella spiralis* co-infection exacerbates *Plasmodium berghei* malaria-induced hepatopathy. *Parasites and Vectors*, 13(1), 440. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04309-6>
- 134) Mejía, R., & Nutman, T. B. (2012). Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 25(4), 458–463. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283551dbd>
- 135) Miller, M. A., Church, L. W. P., & Salgado, C. D. (2008). *Strongyloides* hyperinfection: A treatment dilemma. *American Journal of the Medical Sciences*, 336(4), 358–361. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31815cff89>

- 136) Molehin, A. J., Gray, S. A., Turner, C., Davis, J., Zhang, W., Khatoon, S., Rattan, M., Kernen, R., Peterson, C., Sennoune, S. R., Carter, D., & Siddiqui, A. A. (2021). Process development of Sj-p80: A low-cost transmission-blocking veterinary vaccine for Asiatic Schistosomiasis. *Frontiers in Immunology*, 11(578715), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.578715>
- 137) Montaner, S., Galiano, A., Trelis, M., Martin-Jaular, L., del Portillo, H. A., Bernal, D., & Marcilla, A. (2014). The role of extracellular vesicles in modulating the host immune response during parasitic infections. *Frontiers in Immunology*, 5(433), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00433>
- 138) Monteon, A. L., & Ligonio, A. R. (2008). El papel inmunorregulador del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) en las infecciones parasitarias. *Revista Médica de La Universidad Veracruzana*, 8(1), 38–44. <https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2008/muv081e.pdf>
- 139) Munier, C. C., Ottmann, C., & Perry, M. W. D. (2021). 14-3-3 modulation of the inflammatory response. *Pharmacological Research*, 163(105236), 1–39. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105236>
- 140) Munro, H. N., & Linder, M. C. (1978). Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. *Physiological Reviews*, 58(2), 317–396. <https://doi.org/10.1152/physrev.1978.58.2.317>
- 141) Murrell, K. D., & Graham, C. (1982). Solubilization studies on the epicuticular antigens of *Strongyloides ratti*. *Veterinary Parasitology*, 10(2–3), 191–203. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(82\)90024-3](https://doi.org/10.1016/0304-4017(82)90024-3)
- 142) Nabeya, D., Haranaga, S., Parrott, G. L., Kinjo, T., Nahar, S., Tanaka, T., Hirata, T., Hokama, A., Tateyama, M., & Fujita, J. (2017). Pulmonary strongyloidiasis: Assessment between manifestation and radiological findings in 16 severe strongyloidiasis cases. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 320. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2430-9>
- 143) Nagayasu, E., Ogura, Y., Itoh, T., Yoshida, A., Chakraborty, G., Hayashi, T., & Maruyama, H. (2013). Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitology International*, 62(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.09.006>
- 144) Nutman, T. B. (2017). Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology*, 144(3), 263–273. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000834>
- 145) Olsen, A., van Lieshout, L., Marti, H., Polderman, T., Polman, K., Steinmann, P., Stothard, R., Thybo, S., Verweij, J. J., & Magnussen, P. (2009). Strongyloidiasis - the most neglected of the neglected tropical diseases? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(10), 967–972. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.02.013>

- 146) O'Meara, H., Barber, R., Mello, L. V., Sangaralingam, A., Viney, M. E., & Paterson, S. (2010). Response of the *Strongyloides ratti* transcriptome to host immunological environment. *International Journal for Parasitology*, 40(14), 1609–1617. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.06.005>
- 147) OMS. (2020). 2030 targets for soil-transmitted helminthiases control programmes. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/330611>. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- 148) OMS. (2022, January 10). Soil-transmitted helminth infections. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>
- 149) OMS. (2023). Global Report on Neglected Tropical Diseases 2023. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/365729/9789240067295-eng.pdf?sequence=1>
- 150) Ouyang, W., Kolls, J. K., & Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 28(4), 454–467. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.004>
- 151) Pacheco-Tenza, M. I., Ruiz-Maciá, J. A., Navarro-Cots, M., Gregori-Colomé, J., Cepeda-Rodrigo, J. M., & Llenas-García, J. (2016). *Strongyloides stercoralis* infection in a Spanish regional hospital: Not just an imported disease. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 36(1), 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.08.007>
- 152) Page, W., Judd, J. A., & Bradbury, R. S. (2018). The unique life cycle of *Strongyloides stercoralis* and implications for public health action. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 3(2), 53. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3020053>
- 153) Palomares, O., Martín-Fontecha, M., Lauener, R., Traidl-Hoffmann, C., Cavkaytar, O., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2014). Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: Roles of IL-10 and TGF- β . *Genes and Immunity*, 15(8), 511–520. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.45>
- 154) Pardo, J., Pérez-Arellano, J. L., Galindo, I., Belhassen, M., Cordero, M., & Muro, A. (2007). Diagnóstico de helmintiasis importadas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(5), 329–335. <https://doi.org/10.1157/13102269>
- 155) Perera, D. J., & Ndao, M. (2021). Promising Technologies in the Field of Helminth Vaccines. *Frontiers in Immunology*, 12(711650), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711650>
- 156) Pérez-Caballero, R., Siles-Lucas, M., González-Miguel, J., Martínez-Moreno, F. J., Escamilla, A., Pérez, J., Martínez-Moreno, A., & Buffoni, L. (2018). Pathological, immunological and parasitological study of sheep vaccinated with the recombinant protein 14-3-3z and experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary*

- 157) Pérez-Valdés, R. (1895). Un caso de anguillula intestinales. *Revista de Medicina y Cirugía Prácticas*, 38(338).
- 158) Pinilla-Roa, A. E., & López-Páez, M. C. (2011). Hiperinfección por *Strongyloides* en anciano con EPOC. *Revista de La Facultad de Medicina*, 59(1), 46–55.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=576363543005>
- 159) Powers, J. G., Nash, P. B., Rhyan, J. C., Yoder, C. A., & Miller, L. A. (2007). Comparison of immune and adverse effects induced by AdjuVac and Freund's complete adjuvant in New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab Animal*, 36(9), 51–58.
<https://doi.org/10.1038/labon1007-51>
- 160) Prior-Español, Á., Roure, S., Mateo, L., & Martínez-Morillo, M. (2020). Anaemia and eosinophilia secondary to *Strongyloides* in a patient treated with Anti-TNF-Alpha. *Reumatología Clínica*, 16(6), 508–509. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2018.11.009>
- 161) Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F. J., Castellote, C., Franch, A., & Castell, M. (2008). El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(1), 29–34. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082008000100006&lng=es&tlng=es.
- 162) Rasul, T. F., Bergholz, D. R., & Faiz, A. (2021). Latent *Strongyloides stercoralis* in an asymptomatic male with chronic peripheral eosinophilia. *Cureus*, 13(12), e20140. <https://doi.org/10.7759/cureus.20140>
- 163) Ravi, V., Ramachandran, S., Thompson, R. W., Andersen, J. F., & Neva, F. A. (2002). Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 125(1–2), 73–81. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(02\)00214-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0166-6851(02)00214-1)
- 164) Regueiro, J. R., & López Vázquez, A. (2006). *Inmunología: biología y patología del sistema inmune*. 3a Edición. Madrid, Médica Panamericana.
- 165) Requena-Méndez, A., Chiodini, P., Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Gotuzzo, E., & Muñoz, J. (2013). The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(1), e2002. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002002>.
- 166) Rivas-Santiago, B. T., Torres-Rojas, M., Bobadilla-Lozoya, K., & Sada-Díaz, E. (2005). Papel de las células epiteliales en la respuesta inmune del pulmón. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(4), 321–326. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852005000400011&lng=es&tlng=es.

- 167) Rivero, Z., Salazar, S., Villalobos, R., & Bracho, A. (2007). Infestación por *Strongyloides stercoralis* en una paciente inmunosuprimida, hallazgo de hembra adulta en heces. *Vitae: Academia Biomédica Digital*, 33(5), 1–7. http://vitae.ucv.ve/index_pdf.php?module=articulo_pdf&n=1169&rv=39
- 168) Rodpai, R., Intapan, P. M., Thanchomnang, T., Sanpool, O., Janwan, P., Laummaunwai, P., Wongkham, C., Insawang, T., & Maleewong, W. (2016). *Strongyloides stercoralis* diagnostic polypeptides for human strongyloidiasis and their proteomic analysis. *Parasitology Research*, 115(10), 4007–4012. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5170-7>
- 169) Rodpai, R., Intapan, P. M., Thanchomnang, T., Sanpool, O., Janwan, P., Laummaunwai, P., Wongkham, C., Insawang, T., & Maleewong, W. (2017). Identification of antigenic proteins in *Strongyloides stercoralis* by proteomic analysis. *Parasitology Research*, 116(6), 1687–1693. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5443-9>
- 170) Rodríguez-Guardado, A., Álvarez-Martínez, M. J., Flores, M. D., Sulleiro, E., Torrés-Tendero, D., Velasco, M., & Membrillo, F. J. (2023). Cribado de estrongiloidiosis en España en el contexto de la pandemia SARS-CoV-2: resultados de una encuesta sobre diagnóstico y tratamiento. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 41(6), 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2021.11.010>
- 171) Román-Sánchez, P., Pastor-Guzmán, A., Moreno-Guillen, S., Igual-Adell, R., Martín-Estruch, A., Navarro-Gonzalo, I., & Ricart-Olmos, C. (2001). Endemic strongyloidiasis on the Spanish Mediterranean coast. *Quarterly Journal of Medicine*, 94(7), 357–363. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/qjmed/94.7.357>
- 172) Román-Sánchez, P., Pastor-Guzmán, A., Moreno-Guillén, S., Igual-Adell, R., Suñer-Generoso, S., & Tornero-Estébanez, C. (2003). High prevalence of *Strongyloides stercoralis* among farm workers on the Mediterranean coast of Spain: analysis of the predictive factors of infection in developed countries. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(3), 336–340. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.69.336>
- 173) Ruano, A. L., Martín, T., Pardo, J., López-Abán, J., & Muro, A. (2005). Avances en el estudio sobre la estrongiloidosis. *Enfermedades Emergentes*, 7(2), 102–109. <https://produccioncientifica.usal.es/documentos/608ab8c31c42383529dec315?lang=fr>
- 174) Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Bosch-Nicolau, P., Aznar, M. L., Goterris, L., Espinosa-Pereiro, J., Pou, D., Sánchez-Montalvá, A., Oliveira, I., Martínez-Campreciós, J., Serre-Delcor, N., Sao-Avilés, A., & Molina, I. (2024). Epidemiological and clinical trends of imported strongyloidiasis in a referral international health unit, Barcelona, Spain: A 12-year period experience. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 58(2024), 102690. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2024.102690>
- 175) Sanchis-Bayarri Vaillant, V., González-Cruz Cervellera, A., & Sanchis-Bayarri Lahoz, V. (1981). Infestación grave por estrongiloides y síndrome paraneoplásico. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 30(1), 125–127.

- 176) Saugar, J. M., Merino, F. J., Martín-Rabadán, P., Fernández-Soto, P., Ortega, S., Gárate, T., & Rodríguez, E. (2015). Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides* spp. in clinical samples in a reference center in Spain. *Acta Tropica*, 142(1), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.10.020>
- 177) Savioli, L., Bundy, D., & Tomkins, A. (1992). Intestinal parasitic infections: a soluble public health problem. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(4), 353–354. <https://academic.oup.com/trstmh/article/86/4/353/1940778>
- 178) Schär, F., Trostorf, U., Giardina, F., Khieu, V., Muth, S., Marti, H., Vounatsou, P., & Odermatt, P. (2013). *Strongyloides stercoralis*: Global distribution and risk factors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(7), e2288. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002288>
- 179) Schechtman, D., Tarrab-Hazdai, R., & Arnon, R. (2001). The 14-3-3 protein as a vaccine candidate against schistosomiasis. *Parasite Immunology*, 23(4), 213–217.
- 180) Seeger, D., Cornejo Cisneros, E., Lucar, J., & Denyer, R. (2023). *Strongyloides* and COVID-19: challenges and opportunities for future research. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(2), 127. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8020127>
- 181) Siddiqui, A. A., & Berk, S. L. (2001). Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 33(7), 1040–1047. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/322707>
- 182) Siles-Lucas, M., & Gottstein, B. (2003). The 14-3-3 protein: A key molecule in parasites as in other organisms. *Trends in Parasitology*, 19(12), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.10.003>
- 183) Siles-Lucas, M., Merli, M., Mackenstedt, U., & Gottstein, B. (2003). The *Echinococcus multilocularis* 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. *Vaccine*, 21(5-6), 431–439.
- 184) Siles-Lucas, M., Uribe, N., López-Abán, J., Vicente, B., Orfao, A., Nogal-Ruiz, J. J., Feliciano, A. S., & Muro, A. (2007). The *Schistosoma bovis* Sb14-3-3 ζ recombinant protein cross-protects against *Schistosoma mansoni* in BALB/c mice. *Vaccine*, 25(41), 7217–7223. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.021>
- 185) Siles-Lucas, M., Merli, M., & Gottstein, B. (2008). 14-3-3 proteins in *Echinococcus*: their role and potential as protective antigens. *Experimental Parasitology*, 119(4), 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.01.009>
- 186) Silva-Díaz, H. (2018). Diferencias morfológicas relevantes para la identificación específica de larvas de uncinarias y *Strongyloides stercoralis*. *Revista Médica Herediana*, 29(4), 211–216. <https://doi.org/10.20453/rmh.v29i4.3445>
- 187) Sorvillo, F., Mori, K., Sewake, W., & Fishmant, L. (1983). Sexual transmission of *Strongyloides stercoralis* among homosexual men. *The British Journal of Venereal Diseases*, 59(5), 342. <https://doi.org/10.1136/sti.59.5.342>

- 188) Sotillo, J., Trelis, M., Cortes, A., Fried, B., Marcilla, A., Esteban, J. G., & Toledo, R. (2011). Th17 responses in *Echinostoma caproni* infections in hosts of high and low compatibility. *Experimental Parasitology*, 129(3), 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.08.004>
- 189) Stachyra, A., Grzelak, S., Basałaj, K., Zawistowska-Deniziak, A., & Bień-Kalinowska, J. (2020). Immunization with a recombinant protein of *Trichinella britovi* 14-3-3 triggers an immune response but no protection in mice. *Vaccines*, 8(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030515>
- 190) Streit, A. (2008). Reproduction in *Strongyloides* (Nematoda): A life between sex and parthenogenesis. *Parasitology*, 135(3), 285–294. <https://doi.org/10.1017/S003118200700399X>
- 191) Sudré, A. P., Siqueira, R. C., Barreto, M. G. M., Peralta, R. H. S., Macedo, H. W., & Peralta, J. M. (2007). Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Parasitology Research*, 101(4), 1117–1123. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0596-6>
- 192) Teixeira, M. C. A., Inês, E. J., Pacheco, F. T. F., Silva, R. K. N. R., Mendes, A. V., Adorno, E. V., Lima, F. M., & Soares, N. M. (2010). Asymptomatic *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in an alcoholic patient with intense anemia. *Journal of Parasitology*, 96(4), 833–835. <https://doi.org/10.1645/GE-2358.1>
- 193) Teixeira, M. C. A., Pacheco, F. T. F., Souza, J. N., Silva, M. L. S., Inês, E. J., & Soares, N. M. (2016). *Strongyloides stercoralis* Infection in Alcoholic Patients. *BioMed Research International*, 2016(4872473), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/4872473>
- 194) Tello, R., Terashima, A., Marcos, L. A., Machicado, J., Canales, M., & Gotuzzo, E. (2012). Highly effective and inexpensive parasitological technique for diagnosis of intestinal parasites in developing countries: Spontaneous sedimentation technique in tube. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(6), e414–e416. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.12.017>
- 195) Trelis, M., Galiano, A., Bolado, A., Toledo, R., Marcilla, A., & Bernal, D. (2016). Subcutaneous injection of exosomes reduces symptom severity and mortality induced by *Echinostoma caproni* infection in BALB/c mice. *International Journal for Parasitology*, 46(12), 799–808. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.003>
- 196) Uribe, N., Siles-Lucas, M., López-Abán, J., Esteban, A., Suarez, L., Martínez-Fernández, A., del Olmo, E., & Muro, A. (2007). The Sb14-3-3ζ recombinant protein protects against *Schistosoma bovis* in BALB/c mice. *Vaccine*, 25(23), 4533–4539. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.024>
- 197) Vacca, F., Chauché, C., Jamwal, A., Hinchy, E. C., Heieis, G., Webster, H., Ogunkanbi, A., Sekne, Z., Gregory, W. F., Wear, M., Perona-Wright, G., Higgins, M. K., Nys, J. A., Cohen, E.

- S., & McSorley, H. J. (2020). A helminth-derived suppressor of st2 blocks allergic responses. *Elife*, 9(e54017), 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.54017>
- 198)** Vadlamudi, R. S., Chi, D. S., & Krishnaswamy, G. (2006). Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clinical and Molecular Allergy*, 4(8), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1476-7961-4-8>
- 199)** Valerio, L., Roure, S., Fernández-Rivas, G., Basile, L., Martínez-Cuevas, O., Ballesteros, Á. L., Ramos, X., & Sabrià, M. (2013). *Strongyloides stercoralis*, the hidden worm. Epidemiological and clinical characteristics of 70 cases diagnosed in the North Metropolitan Area of Barcelona, Spain, 2003–2012. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(8), 465–470. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt053>
- 200)** Van Doorn, H. R., Koelewijn, R., Hofwegen, H., Gilis, H., Wetsteyn, J. C. F. M., Wismans, P. J., Sarfati, C., Vervoort, T., & Van Gool, T. (2007). Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 438–442. <https://doi.org/10.1128/JCM.01735-06>
- 201)** Van Durme, P. (1902). Quelques notes sur les embryons de “*Strongyloides Intestinalis*” et leur pénétration par le peau. *Thompson Yates Lab Rep*, 4, 471–474.
- 202)** Vargas, Leonardo. (1995). Interleuquina 13: una nueva citoquina con propiedades similares a la interleuquina 4. *Iatreia*, 8(4), 160–165. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/view/3592>
- 203)** Vásquez-Ríos, G., Pineda-Reyes, R., Pineda-Reyes, J., Marín, R., Ruiz, E. F., & Terashima, A. (2019). *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome: a deeper understanding of a neglected disease. *Journal of Parasitic Diseases*, 43(2), 167–175. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01090-x>
- 204)** Vicente, B., López-Abán, J., Rojas-Caraballo, J., Pérez del Villar, L., Hillyer, G. V., Martínez-Fernández, A. R., & Muro, A. (2014). A *Fasciola hepatica*-derived fatty acid binding protein induces protection against schistosomiasis caused by *Schistosoma bovis* using the adjuvant adaptation (ADAD) vaccination system. *Experimental Parasitology*, 145(1), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.08.007>
- 205)** Vicente, B., López-Abán, J., Rojas-Caraballo, J., del Olmo, E., Fernández-Soto, P., Ramajo-Martín, V., & Muro, A. (2015). The combination of the aliphatic diamine AA0029 in ADAD vaccination system with a recombinant fatty acid binding protein could be a good alternative for the animal schistosomiasis control. *Experimental Parasitology*, 154, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.022>
- 206)** Vicente, B., López-Abán, J., Rojas-Caraballo, J., Del Olmo, E., Fernández-Soto, P., & Muro, A. (2016). Protection against *Schistosoma mansoni* infection using a *Fasciola hepatica*-derived fatty acid binding protein from different delivery systems. *Parasites and Vectors*, 9(216). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1500-y>

- 207) Vlaminc, J., López-Abán, J., Ruano, A. L., Olmo, E. Del, & Muro, A. (2010). Vaccination against *Strongyloides venezuelensis* with homologue antigens using new immunomodulators. *Journal of Parasitology*, 96(3), 643–647. <https://doi.org/10.1645/GE-2276.1>
- 208) Vonghachack, Y., Sayasone, S., Bouakhasith, D., Taisayavong, K., Akkavong, K., & Odermatt, P. (2015). Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* on Mekong islands in southern Laos. *Acta Tropica*, 141(Part B), 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.09.016>
- 209) GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 390(10100), 1211–1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2)
- 210) GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, 396(10258), 1204–1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
- 211) Wei, W., Wang, L., Zhou, P., Jiang, B., Liu, H., Feng, L., Ge, R. L., Tang, F., & Li, R. (2021). Bioinformatic prediction and identification of immunogenic epitopes of the antigenic 14-3-3 protein of *Echinococcus multilocularis*. *Acta Tropica*, 220(105955), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105955>
- 212) Weiser, J. A., Scully, B. E., Bulman, W. A., Husain, S., & Grossman, M. E. (2011). Periumbilical parasitic thumbprint purpura: *Strongyloides* hyperinfection syndrome acquired from a cadaveric renal transplant. *Transplant Infectious Disease*, 13(1), 58–62. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2010.00516.x>
- 213) Yori, P. P., Kosek, M., Gilman, R. H., Cordova, J., Bern, C., Banda Chavez, C., Olortegui, M. P., Montalvan, C., Meza Sanchez, G., Worthen, B., Worthen, J., Leung, F., & Oré, C. V. (2006). Seroepidemiology of strongyloidiasis in the Peruvian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(1), 97–102.
- 214) Zeng, F., Yi, C., Zhang, W., Cheng, S., Sun, C., Luo, F., Feng, Z., & Hu, W. (2022). A new ferritin SjFer0 affecting the growth and development of *Schistosoma japonicum*. *Parasites and Vectors*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05247-1>
- 215) Zerpa-Larrauri, R., Espinoza-Blanco, Y., & Náquira, C. (2014). Ciclo Biológico de *Strongyloides fuelleborni*: Imágenes y Videos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(2), 390–392. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000200032&lng=es&nrm=iso

- 216)** Zhu, X.-Q., Korhonen, P. K., Cai, H., Young, N. D., Nejsum, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Boag, P. R., Tan, P., Li, Q., Min, J., Yang, Y., Wang, X., Fang, X., Hall, R. S., Hofmann, A., Sternberg, P. W., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2015). Genetic blueprint of the zoonotic pathogen *Toxocara canis*. *Nature Communications*, 6(1), 6145. <https://doi.org/10.1038/ncomms7145>

ANEXOS

Puedes descargar el artículo en:



Article

Evaluation of the Immunomodulatory Effect of the Recombinant 14-3-3 and Major Antigen Proteins of *Strongyloides stercoralis* against an Infection by *S. venezuelensis*

Liz F. Sánchez-Palencia ¹, María Trelis ^{1,2,*} , Julio López-Abán ³, Alicia Galiano ¹, Belén Vicente ³, Esther del Olmo ⁴, Antonio Muro ³ , Dolores Bernal ⁵ and Antonio Marcilla ^{1,2,*} 

¹ Àrea de Parasitologia, Departament Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia, Universitat de València, 46100 Burjassot, Spain

² Unidad Mixta de Endocrinología, Nutrición y Dietética Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, 46026 Valencia, Spain

³ Grupo de Enfermedades Infecciosas y Tropicales (e-INTRO), IBSAL-CIETUS (Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Méndez Nieto s/n, 37007 Salamanca, Spain

⁴ Departamento de Ciencias Farmacéuticas: Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, IBSAL CIETUS, 37007 Salamanca, Spain

⁵ Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València, 46100 Burjassot, Spain

* Correspondence: maria.trelis@uv.es (M.T.); antonio.marcilla@uv.es (A.M.)



Citation: Sánchez-Palencia, L.F.; Trelis, M.; López-Abán, J.; Galiano, A.; Vicente, B.; del Olmo, E.; Muro, A.; Bernal, D.; Marcilla, A. Evaluation of the Immunomodulatory Effect of the Recombinant 14-3-3 and Major Antigen Proteins of *Strongyloides stercoralis* against an Infection by *S. venezuelensis*. *Vaccines* **2022**, *10*, 1292. <https://doi.org/10.3390/vaccines10081292>

Academic Editor: Yanmin Wan

Received: 4 July 2022

Accepted: 6 August 2022

Published: 10 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Strongyloidiasis, caused by *Strongyloides stercoralis*, is a neglected parasitic disease that represents a serious public health problem. In immunocompromised patients, this parasitosis can result in hyperinfection or disseminated disease with high levels of mortality. In previous studies, the mRNAs encoding for the 14-3-3 and major antigen proteins were found to be expressed at high levels in *S. stercoralis* L3 larvae, suggesting potential key roles in parasite-host interactions. We have produced them as recombinant proteins (rSs14-3-3 and rSsMA) in a bacterial protein expression system. The serum levels of anti-rSs14-3-3 and anti-rSsMA IgGs are increased upon infection with *S. venezuelensis*, validating the use of the mouse model since the native 14-3-3 and MA proteins induce an immune response. Each recombinant protein was formulated in the adjuvant adaptation (ADAD) vaccination system and injected twice, subcutaneously, in CD1 mice that were experimentally infected with 3000 *S. venezuelensis* L3 to evaluate their protective and immunomodulatory activity. Our results, including the number of parthenogenetic females, number of eggs in stool samples and the analysis of the splenic and intestinal indexes, show that the vaccines did not protect against infection. The immunization with rSs14-3-3 induced changes in the cytokine profile in mice, producing higher expression of IL-10, TGF- β , IL-13 and TNF- α in the spleen, suggesting a Th2/Treg-type response with an increase in TNF- α levels, confirming its role as an immunomodulator.

Keywords: *Strongyloides stercoralis*; 14-3-3; major antigen; vaccination; ADAD; cytokines

1. Introduction

Human strongyloidiasis is an infection caused by *Strongyloides stercoralis* (and rarely *S. fülleborni*) which, like other soil-transmitted helminthiases (STHs), is acquired through direct contact with contaminated soil [1]. Some of these helminths are considered cosmopolitan although, according to epidemiological data, their location is mostly limited to tropical and subtropical areas, affecting the poorest and most disadvantaged communities [2]. The World Health Organization (WHO) [1] estimates that between 30 and 100 million individuals are infected worldwide by strongyloidiasis; however, these data may be underestimated because this disease requires special laboratory methods for diagnosis. Moreover, drugs other than those recommended by the WHO are routinely used for the treatment of the STHs, which are not included in control programs [3]. This disease is caused by direct

penetration of the *S. stercoralis* infective larvae through human skin in contact with contaminated soil during agricultural, domestic, and recreational activities. Walking barefoot is therefore a major risk factor for acquiring the infection [1]. The L1 rhabditiform larvae eliminated with the feces are transformed in the soil into the L3 filariform larvae with infective capacity able to penetrate through the skin and initiate the parasitic cycle. The life cycle of *S. stercoralis* is unique and complex, combining two possibilities, free life cycles (with males and females outside the host) and parasitic cycles within the host (with intestinal parthenogenetic females) [4]. Its capacity for self-infection and multiplication in the host is unique, especially in immunocompromised patients in which strongyloidiasis derives in hyperinfection or in a disseminated disease with high levels of mortality [5]. The genus *Strongyloides* contains around 60 species. Two of these, *S. ratti* and *S. venezuelensis*, can experimentally infect laboratory rodents [6]. In fact, *S. venezuelensis* exhibits a life cycle in rats and mice that is similar to that observed for *S. stercoralis* in humans. For this reason, it is often used as a model for human strongyloidiasis, particularly for immunological studies [7].

Autochthonous strongyloidiasis has been detected in Spain since 1895, especially in Mediterranean regions, such as Valencia and Murcia. Currently only residual cases remain. Factors associated with autochthonous cases are agricultural activities mainly associated with the growing of rice and cleaning of irrigation ditches, or advanced age [8–12]. Moreover, the number of imported cases, mainly from Cambodia and Latin America, are increasing due to the change in the migratory flow [8]. Imported strongyloidiasis is a current and universal challenge as an imported disease in developed healthcare systems.

The control of strongyloidiasis in endemic areas with deficient healthcare systems continues to require efforts in prevention and treatment. The availability of a vaccine would be of great interest since it would limit the intensity of the disease burden and control transmission. With the aim of identifying potential new markers that could be used in disease diagnosis, vaccination, and treatment, we previously reported a proteomic analysis of the third larval stage of *S. stercoralis* obtained from patients in Valencian hospitals [13]. In the transcriptome study of this stage, the mRNAs encoding the 14-3-3 and major antigen proteins were present at high levels, suggesting that these proteins might be involved in the entry of the parasite through the skin of the host and participate in modulating the immune response [14]. Little is known about the role of the 14-3-3 protein family in *S. stercoralis* pathogenicity. Most researchers have suggested that 14-3-3 proteins may transmit regulatory signals related to cell physiology, such as proliferation, migration, and morphological changes during the parasite life cycle [15]. These proteins are considered to be good targets for anthelmintic drugs and vaccines, as well as candidates to develop new diagnostic methods [16,17].

To explore and evaluate the immunomodulatory activity and the vaccine and the diagnostic potential of *S. stercoralis* 14-3-3 (Ss14-3-3) and major antigen (SsMA) proteins in an experimental infection with *S. venezuelensis* in female CD1 mice, we produced them as recombinant proteins (rSs14-3-3 and rSsMA) in bacteria and formulated them in an adjuvant adaptation (ADAD) vaccination system. This vaccination system has been successfully used with similar antigens, for example a 14-3-3 protein from *Schistosoma bovis* and FABP from *Fasciola hepatica* [18,19].

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statements

This study was performed in strict accordance with the protocols approved by the Ministry of Agriculture and Livestock of the Government of the Community of Castilla y León, Spain (resolution n° 335 of 20 February 2019). The basic rules, applicable to the protection of the animals used in the experimentation that took place in the Animal Research and Welfare Service of the University of Salamanca, were followed. All surgeries were performed under pentobarbital anesthesia and every effort was made to minimize suffering.

2.2. *S. venezuelensis* and Experimental Mice Model

Strongyloides venezuelensis was obtained from a strain originally used in the Department of Parasitology, University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. This strain was maintained by serial passages in Wistar rats routinely infected in the laboratory of Parasitic and Molecular Immunology, CIETUS, University of Salamanca. Rats were subcutaneously infected with third-stage larvae (L3) of *S. venezuelensis*, as previously described [20]. CD1 female experimental mice and maintenance rats were housed and maintained at the Research and Animal Welfare Service of the University of Salamanca under standard conditions, at a temperature of 24 °C and a humidity-controlled environment with 12 h day-night cycles and provided with water and food ad libitum.

2.3. Cloning of *S. stercoralis* Recombinant 14-3-3 and Major Antigen Proteins

The purification of *S. stercoralis* L3 larvae RNA has been previously described [14]. Briefly, total RNA was obtained with a Real Total RNA Spin Plus kit (Real Life-Sciences Solutions, Valencia, Spain), following the manufacturer's protocol. The integrity of the RNA was verified by agarose gel (1%) electrophoresis. The RNA template was then used for cDNA synthesis with a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), and performed in a C1000 thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The cDNAs encoding Ss14-3-3 and SsMA were amplified by PCR with specific primers designed from the known nucleotide sequence of the parasite (GenBank codes CEK45735 and CEK45729, respectively). The Ss14-3-3 primers were: F: 5'-ACGGATCCATGGCTGAAAATAAGGATGAAC-3' and R: 5'-AGCTGCAGCCATTGGTATCAGATGTC-3'; and F: 5'-ACGGATCCATCTGATGCAGCTAT-3' and R: 5'-AGCTGCAGTAGCATTGTCATCGTG-3' for the SsMA. The DNA encoding Ss14-3-3 and SsMA were successfully amplified and subcloned into the bacterial expression vector pQE30-32, containing a His-tag at the C-terminus (QIAGEN, Hilden, Germany). Transformed bacteria were selected by growth on LB agar medium with ampicillin. Plasmid DNA was isolated from candidate clones and the constructs were analyzed by sequencing using SeqMan Pro and SeqBuilder (Lasergene, DNASTAR Inc., v.7.0.0, Madison, WI, USA). The correct open reading frames of the sequences were confirmed using the ExpASY bioinformatics tool (Expert Protein Analysis System, <http://www.expasy.org>; accessed on 1 February 2021) [21], and homology with 14-3-3 (LM524971.1) and major antigen (LM525011.1) of *S. venezuelensis* was confirmed by comparison with the sequences reported in the NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nih.gov, accessed on 1 February 2021) database, revealing a 82.38% identity for MA proteins and a 97.46% identity for the 14-3-3 homologues of *S. venezuelensis* and *S. stercoralis*.

2.4. Expression and Purification of rSs14-3-3 and rSsMA Proteins in *E. coli*

Individual clones of transformed *Escherichia coli* M15 cells were grown in LB medium with ampicillin until they reached an optical density at 600 nm of 0.6, and then the recombinant proteins were induced by the addition of isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside to a final concentration of 1 mM (IPTG, Promega, Madison, WI, USA) for 3 h. The recombinant proteins were then purified by Ni-NTA Spin Column System (Qiagen, Hilden, Germany). The protein concentrations were determined using a Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Recombinant protein samples were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis using nUView Precast Gels Tris-Glycine NB 4–20% (NuSep Inc., Germantown, MD, USA) and stained with Coomassie blue. Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) were used as the molecular weight marker.

2.5. Vaccination Experiment Protocol

A total of 35 female CD1 mice, 8 weeks of age, were used for the immunization experiments. Mice were randomly divided into five experimental groups: control (neither immunized nor infected; $n = 3$), infection control (infected; $n = 8$), ADAD control (injected only with ADAD and infected; $n = 8$), rSs14-3-3 group (immunized with rSs14-3-3 in ADAD

and infected; $n = 8$); and rSsMA group (immunized with rSsMA in ADAD and infected; $n = 8$). Animals were immunized subcutaneously with 10 μg of rSs14-3-3 or 10 μg of rSsMA emulsified in the ADAD vaccination system (a combination of the non-hemolytic saponins from *Quillaja saponaria* and a synthetic immunomodulator diamine AA0029 with the non-mineral oil Montanide ISA 763AVG) to obtain a long-term delivery [22]. Immunization was performed twice at an interval of two weeks. Seventeen weeks after the immunization, animals were infected with 3000 *S. venezuelensis* L3 larvae subcutaneously. ADAD is a long-term delivery adjuvant system with anti-inflammatory properties. Therefore, the vaccination challenge interval was increased to avoid the interference from the adjuvant described previously [23]. In addition, a wide vaccination-challenge interval is necessary for a vaccine, since in an ideal case, immunity should remain for a long time. Stool samples were obtained on the 5th, 6th, and 7th day post-infection. Blood samples were taken before and at the end of the assay (one-week post-infection). Serum was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for indirect ELISA. After sacrificing the mice, spleens and intestines were collected and weighed to calculate organ-to-body weight ratios. The splenic index (SI) was calculated using the formula: $\text{SI} = \text{spleen weight (g)} / \text{body weight (g)} \times 100$ [24], and the intestinal index (II) was calculated in a similar way. Parthenogenetic females were recovered from the first third of the small intestine. Spleens were stored in RNAlater (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further gene expression analysis.

2.6. Detection of Antibodies in Sera by Indirect ELISA

Serum levels of anti-14-3-3 and anti-MA IgG antibodies were measured individually for each mouse in duplicate, by indirect ELISA, using the recombinant protein as a coating antigen. Briefly, 96-well polystyrene microtiter plates were coated overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of protein in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). The coated plates were washed three times with PBS with 0.05% Tween 20 (PBST) and uncoated sites were blocked with 5% fat-free dry milk in PBST for 1 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. 100 μL of sera diluted 1/100 in PBST were added to each well and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for one hour. The plates were washed three times with PBST, and then incubated with 100 μL HRP-conjugated antibody goat anti-mouse IgG (1/2000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as the secondary antibody. The enzymatic color reaction was generated using a solution with chromogen orthophenylenediamine 0.04% in phosphate-citrate buffer (0.2 M Na_2HPO_4 , 0.1 M citric acid; pH 5) and 0.001% H_2O_2 as a substrate. The absorbance was measured at 490 nm using an iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.7. RNA Isolation, Reverse Transcription and Quantification of Cytokine mRNAs

Total RNA from spleens was purified using a Total RNA Spin Plus Purification kit (Real Life-Sciences Solutions, Valencia, Spain), following the specific protocol for tissues provided by the manufacturer. The quantity and quality of the RNA were determined by absorbance at 260/280 nm. The cDNA was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's protocol. The cytokine mRNAs (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-10, TGF- β , IL-23) were analyzed by quantitative PCR (qPCR) using TaqMan™ Gene Expression Assays containing a specific pair of primers and 6-FAM™ dye-labeled probe (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). For quantitative PCR, 40 ng of cDNA were added to 10 μL of TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), 1 μL of the specific gene expression assay and water to a final reaction volume of 20 μL . To perform the amplification reactions in 96-well plates, the StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) was employed, using the following thermal cycler conditions: 2 min for activation at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ followed by 10 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, and 40 cycles of 15 s denaturation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ and finally 1 min of anneal/extend at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. In each plate, an endogenous and a negative control were analyzed in duplicate. The quantification was performed using β -actin as the housekeeping gene.

The cycle threshold (Ct) value was calculated for each sample. To estimate the influence of the immunization and/or infection in the expression levels of cytokines, a comparative quantitation method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ —method) was used [25].

2.8. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using a GraphPad Prism v9 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com, accessed on 1 February 2021). Results were expressed as the mean $\pm$ the standard error of the mean (SEM). One-way and two-way analyses of variance (ANOVA), followed by post-hoc Tukey's multiple comparisons test, were used to compare significant differences between different conditions. The tests used are indicated in each figure legend. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Cloning, Expression and Purification of Recombinant Ss14-3-3 and SsMA Proteins from *S. stercoralis*

The DNA encoding Ss14-3-3 (GenBank n° LN715176.1) and SsMA (GenBank n° LN715173.1) was successfully amplified and subcloned into the expression vector. The recombinant His-tagged proteins were purified under denaturing conditions, obtaining a final concentration of 1 mg/mL for rSs14-3-3 and 0.77 mg/mL for rSsMA. SDS-PAGE analysis showed that both displayed the expected molecular weight (26.5 kDa and 26.7 kDa, respectively) (Figure 1).

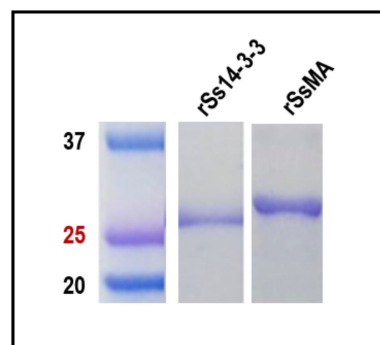


Figure 1. Synthesis and purification of rSs14-3-3 and rSsMA in *E. coli*. Purified recombinant Ss14-3-3 and SsMA proteins (10 μ g/lane) were separated on SDS-PAGE and visualized using Coomassie blue stain. Molecular weight markers in kDa are shown (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)).

3.2. Immunization with rSs14-3-3 and rSsMA Proteins Do Not Induce Effective Protection against the Experimental Infection

To study the potential of the rSs14-3-3 and rSsMA proteins to protect mice against infection with *S. venezuelensis*, we first determined the number of eggs per gram (EPG) in feces (Figure 2), as an indicator of worm burden in the small intestine. Eggs were observed in feces after 5 days of infection. The comparison of the number of EPG between groups on the same day post-infection revealed an increase in immunized groups compared to the infection control group, on the seventh day post-infection for the rSs14-3-3 ($387,506.439 \pm 49,571.363$ vs. $350,851.027 \pm 82,665.61$), and on the sixth day post-infection for rSsMA ($350,851.027 \pm 82,665.61$ vs. $161,666.79 \pm 27,739.972$) (Figure 2).

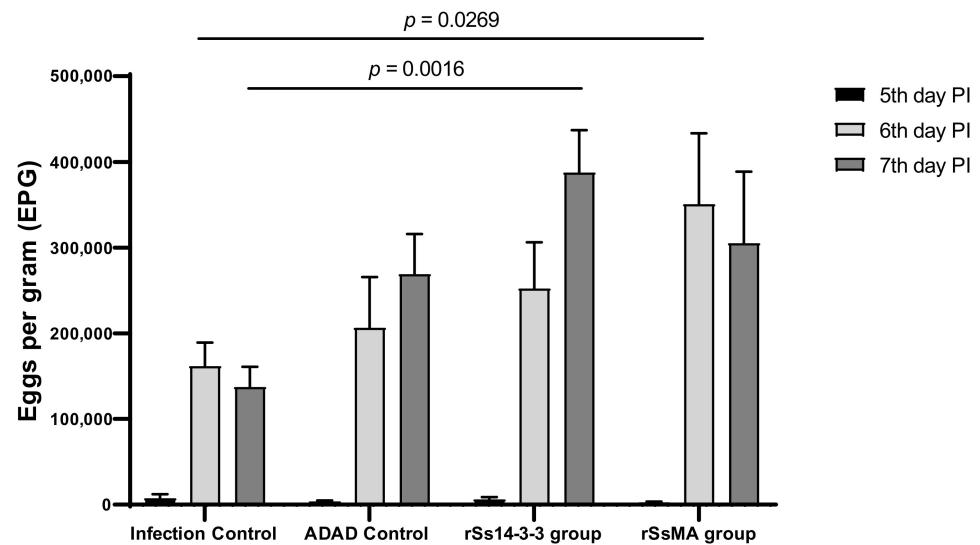


Figure 2. Number of eggs per gram (EPG) in mice feces after immunization with rSs14-3-3 and rSsMA formulated in ADAD vaccination system and challenged with 3000 *S. venezuelensis* L3 determined at 5, 6, and 7 days post-infection (PI). Bars represent means $\pm$ SEM. Differences between groups were determined by two-way ANOVA $F_{(3,84)} = 4.18$; $p = 0.0083$. Post-hoc Tukey's honestly significant difference (HSD) test p -values are shown in the graph.

When the number of recovered parthenogenetic females was determined and compared between groups, an increase in the number of females was observed in both groups immunized with the recombinant proteins (rSs14-3-3: 222.418 ± 30.616 and rSsMA: 243.016 ± 35.251) (Figure 3), which was consistent with the previous results for the EPG.

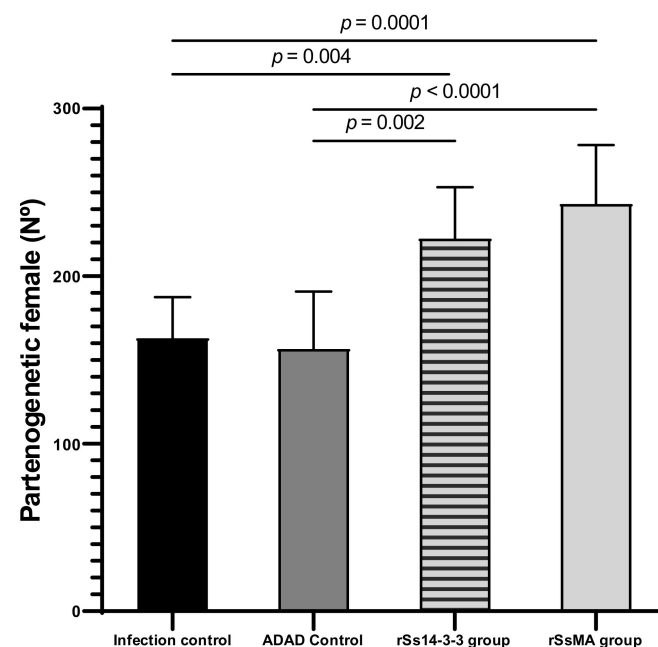


Figure 3. Number of *S. venezuelensis* parthenogenetic females after immunization with rSs14-3-3 and rSsMA formulated in ADAD vaccination system and challenged with 3000 L3. Bars represent means $\pm$ SEM. The number of recovered females under each experimental condition was evaluated by one-way ANOVA analysis with respect to the infection control group ($F_{(3,27)} = 1$; $p < 0.0001$). Post-hoc Tukey's honestly significant difference (HSD) test p -values are shown in the graph.

3.3. Splenic and Intestinal Indexes Reflect the Non-Protection of the Vaccine against Infection

The splenic index indicates an immunological cellular response activation after infection or vaccination. The spleen volume decreases in weight and size with age, but increases upon infection [26]. When analyzing the effect of immunization in the splenic index, the administration of the rSs14-3-3 and rSsMA proteins produce a slight increase in this index with respect to the infection and ADAD controls (Figure 4A).

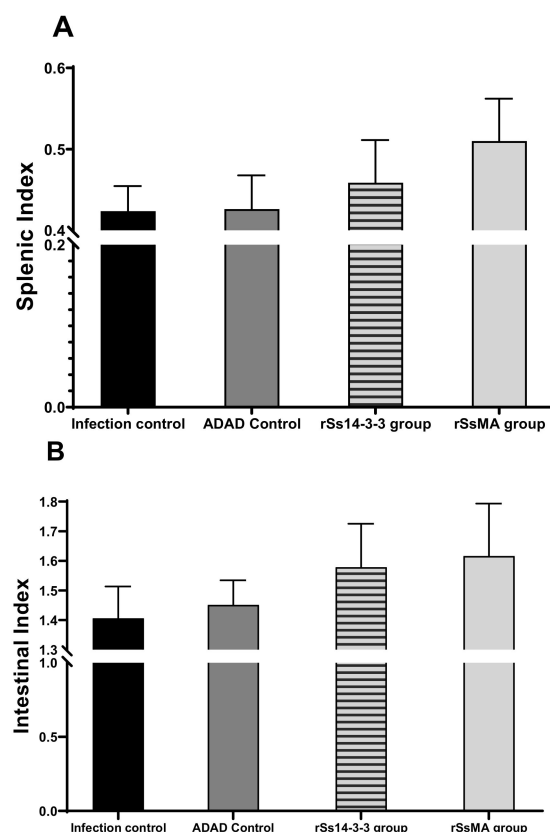


Figure 4. Effect of the immunization in the Splenic (A) and Intestinal (B) indexes after infection of mice with *S. venezuelensis*. Bars represent means $\pm$ SEM. Data were evaluated by one-way ANOVA analysis against infection and ADAD controls, but there were not significant differences ($F_{(3,28)} = 0$; $p = 0.5086$ for the splenic index and $F_{(3,28)} = 0.5649$; $p = 0.6427$ for the intestinal index).

The intestinal index indicates the local inflammatory effects of the infection by *S. venezuelensis*. The intestinal indexes present a similar value and are slightly increased in both mice groups immunized with the recombinant proteins when compared to the infection and ADAD controls (Figure 4B). The differences between experimental groups are not statistically significant, suggesting that the recombinant proteins did not prevent local inflammation.

3.4. Humoral Antibody Response to the Immunization of Mice with rSs14-3-3 and rSsMA Proteins and/or Infection with *S. venezuelensis*

To investigate the capacity of rSs14-3-3 and rSsMA proteins to induce an antibody response, specific IgG levels in serum were evaluated by indirect ELISA before and after the treatment (immunization and infection) (Figure 5). All mice presented higher specific IgG antibody levels against the corresponding protein after the immunization with rSs14-3-3 or rSsMA and/or after the infection. The immunization did not increase the IgG levels after 7 days of infection.

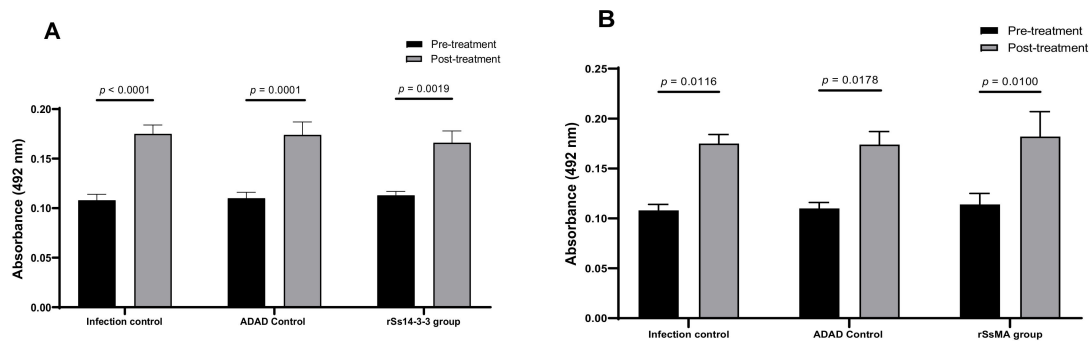


Figure 5. Serum levels of anti-14-3-3 IgG (A) and anti-MA IgG (B) in mice before and after the treatment (immunization and infection). IgG levels were measured by indirect ELISA by coating the plates with 2 µg/mL of 14-3-3 protein or 2 µg/mL MA protein per well, respectively. (A) IgG levels against rSs14-3-3 protein; (B) IgG levels against rSsMA protein. Bars represent means $\pm$ SEM. Differences between groups were determined by two-way ANOVA. The IgG levels are significantly increased after the assay ((A): $F_{(1,42)} = 70.24$; $p < 0.0001$; (B): $F_{(1,42)} = 37.08$; $p < 0.0001$). Post-hoc Tukey's honestly significant difference (HSD) test p -values are shown in the graph.

In addition, we tested the generation of antibodies against *S. venezuelensis* 14-3-3 and major antigen proteins in the mouse model and could show that they increase upon infection (Figure 5). This result further validates the use of the mouse model to simulate relevant responses comparable to the human infection and suggests that the genes encoding these proteins are likely to be induced upon *S. venezuelensis* infection. Thus, both the level of similarity between the homologues and the observation that infection induces the production of antibodies specific for these two proteins validate the experimental design chosen here.

3.5. Cytokine Profile in Mice after Immunization with rSs14-3-3 and rSsMA and Experimental Infection

To further investigate the type of response that was induced by immunization with rSs14-3-3 and rSsMA, followed by the infection, the levels of expression of selected cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-10, TGF- β , IL-23) were measured in the spleen using qPCR. Higher expression levels of IL-10, TGF- β , IL-13 and TNF- α were detected in the rSs14-3-3 group when compared to control groups, which confirmed its immunomodulatory capacity (Figure 6). In the rSsMA group, there are no differences in the expression of the cytokines analyzed; however, the expression of IL-10 and IL-13 presents a slight increase compared to controls, but the results were not statistically significant (Figure 6).

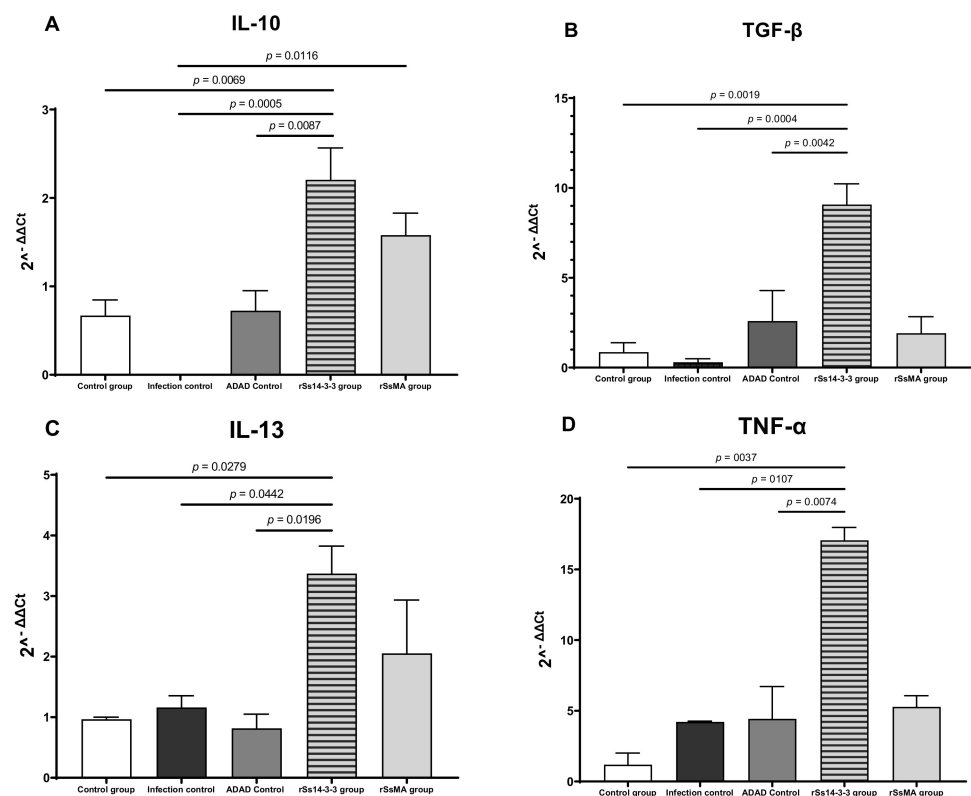


Figure 6. Expression levels of IL-10, TGF- β , IL-13 and TNF- α in spleen of mice immunized with rSs14-3-3 and rSsMA formulated in ADAD and challenged with 3000 *S. venezuelensis* infective L3. (A) IL-10 mRNA levels; (B) TGF β mRNA levels; (C) IL-13 mRNA levels; (D) TNF α mRNA levels. Bars represent means $\pm$ SEM. Data were evaluated by one-way ANOVA analysis for each cytokine IL-10 ($F_{(4,9)} = 13$; $p = 0.0007$); TGF- β ($F_{(4,19)} = 1$; $p = 0.0001$); IL-13 ($F_{(4,10)} = 5$; $p = 0.0152$); TNF- α ($F_{(4,6)} = 12$; $p = 0.0042$). Post-hoc Tukey's honestly significant difference (HSD) test p -values are shown in the graphs.

4. Discussion

Strongyloidiasis is a neglected tropical disease with no available vaccines, and it is not included in WHO control programs. There is a need for vaccine development due to the potential ability of *S. stercoralis* to replicate within the host as part of their autoinfection cycle, which leads to persistent infections. These situations can cause uncontrolled multiplication and dissemination, where larvae spread to and affect all the internal organs of people with compromised immune systems [27,28]. Identification and characterization of *S. stercoralis* immunogenic proteins are usually carried out by proteomic analysis on crude helminth homogenates, which are then chosen based on immunogenicity, ability to stimulate an immune response, and minimization of potential secondary effects [2,4,29]. Recent studies have predicted promising candidates in proteomic analyses of *S. stercoralis* using bioinformatic tools [13,17,30]. Our group was pioneering in detailing the transcriptome of the infective *S. stercoralis* L3 larvae [14]. In that study, two mRNAs, corresponding to major antigen and 14-3-3 proteins, were the most abundant transcripts found in this larval phase [14]. In the present study, we produced and purified these two proteins in bacteria and evaluated their potential protective and immunomodulatory capacity. We used the adjuvant adaptation (ADAD) vaccination system, developed and tested for vaccination against other helminth infections, such as fasciolosis and schistosomiasis, to improve the limitations of classical Freund's adjuvant [22,31,32].

Our results indicate that the assayed recombinant proteins did not produce an efficient protection against the experimental infection using the *S. venezuelensis* mouse model, despite the homology between proteins 14-3-3 and the major antigen of both species. Surprisingly, the numbers of parthenogenetic females recovered from the small intestine

and the numbers of EPG were higher in immunized animals, as compared to the control groups. These results suggest that not only did the immunization not protect from the infection, but that the infection was favored by the immunization. The presence of eggs in feces is related to the successful establishment and development of parasites. In mice immunized with exosomes from *Echinostoma caproni*, the number of eggs in feces was reduced after 6 weeks of infection. These data suggest that the immunization produced a delay in the development of the parasite, ameliorating the symptoms of the infection, but not preventing the infection [33]. In a different immunization study with Sj-p80 in Montanide™ ISA61VG adjuvant carried out in mice infected with *Schistosoma japonicum*, there was a reduction in the female burden, but the number of eggs did not decrease. However, the viability/hatching rates of the eggs were reduced [34]. A vaccination system using the 14-3-3 protein from *Schistosoma bovis* and FABP from *Fasciola hepatica* yielded high protection in terms of parasite burden and liver damage [19,22].

The splenic index increases upon infection. In this sense, Mei and colleagues found elevated splenic indexes in mice infected with *Plasmodium bergeri* and this index was higher in mice co-infected with *Trichinella spiralis* [24]. In addition, immunosuppressed mice infected with *Sporothrix schenckii*, an opportunistic fungus, presented higher splenic indexes [26]. In our study, the infected groups previously immunized with the recombinant proteins showed higher indexes, suggesting a stimulation of this organ. The intestinal index indicates inflammation associated with the parasitic infection. The presence of a higher number of parthenogenetic females in immunized groups explains the increase observed in the intestinal index.

Recombinant proteins did not induce any protection against helminth infection; however, the immunization with the rSs14-3-3 previous to infection elicited a higher expression of the anti-inflammatory cytokines IL-13, IL-10 and TGF- β associated with a Th2/Treg response in the spleen, which could be involved in promoting the establishment of the parasite and the success of the infection. IL-13 is considered to be an important cytokine in the immunoregulation of inflammatory, allergic and autoimmune processes [35–37]. Control of *Strongyloides* spp. infections generally requires type 2 immune responses that have the advantage of causing reduced collateral damage, as compared to Th1 or Th17 responses. Type 2 cytokine responses (particularly IL-13) play an important role in fibrosis and wound healing and they are postulated to help healing tissue damage induced by many tissue-invasive helminth parasites [36]. In addition, in response to IL-4 and IL-13, macrophages differentiate to M2 macrophages, a type of alternatively activated macrophage that is also anti-inflammatory, producing IL-10 and TGF- β [37]. IL-13, together with IL-10, can inhibit the production of pro-inflammatory cytokines in macrophages [35]. In addition, helminth infections are also intricately associated with the increased expression of the regulatory cytokines IL-10 and TGF- β [38]. The overexpressed cytokines IL-10 and TGF- β could lead to immunological tolerance and certain types of damage in the host, but at the same time, they could prevent the expulsion of worms, thereby promoting chronic helminth infections [37]. The mechanisms by which parasite-secreted molecules restrain host immune responses have been investigated in various mouse models. A requirement common to all progressing parasitic infections is that parasites must be able to evade the full effects of host immune responses and survive in the host for long periods [38,39]. Further experiments with NK IL10 and TGF- β knock-out mice will help to clarify the responsibility of the overexpressed cytokines in the effect of the evolution of the pathology of the parasite.

S. stercoralis is a parasite able to replicate in the human host, carrying out autoinfection cycles. Although autoinfection is limited by the host immune response, potentially fatal hyperinfection with a disseminated disease can occur when immunity is compromised [4,40]. The immunization with the rSs14-3-3 protein has also elicited, in the spleen, a higher expression of the TNF- α , which is considered to act as a pleiotropic cytokine, in addition to being a pro-inflammatory cytokine. TNF- α has a critical role in the regulation of Th2 cytokine-mediated host protection against helminth infections [41]. Some cases of hyperinfection by *S. stercoralis* have been reported in patients in immunosuppressed states, due to the ad-

ministration of anti-TNF- α to treat autoimmune diseases. Therefore, high levels of TNF- α could prevent the hyperinfection syndrome caused by *S. stercoralis*, which is associated with high mortality [40,42,43]. Accordingly, patients should be tested for strongyloidiasis prior to the start of an immunosuppressive treatment to identify asymptomatic carriers from endemic regions.

An interesting result was obtained when analyzing specific IgG antibodies against rSs 14-3-3 and rSsMA in sera from mice infected with *S. venezuelensis*. Even though the immunization did not potentiate the humoral immune response produced by the infection, our results suggest that the infection itself is inducing a humoral response against these two native proteins. This confirms that 14-3-3 and MA proteins are among the more abundant and immunogenic proteins of the parasite, as described previously in the transcriptomic analysis of the third larval stage of *S. stercoralis* [14]. This observation further validates the use of the mouse model to simulate relevant responses comparable to the human infection and suggests that the genes encoding these proteins are likely to be induced upon *S. venezuelensis* infection. Thus, both the level of similarity between the homologues and the observation that infection induces the production of antibodies specific for these two proteins validate the experimental design chosen here. Until now, few recombinant proteins have been studied as potential immunogenic molecules for serodiagnosis of strongyloidiasis [16,44]. The antibodies against rSs14-3-3 and rSsMA are not increased with the immunization and they then do not provide any protective effect, but their quantification could be useful for diagnosis and as a marker of the severity of the infection [44,45].

We know that one of the limitations of the study is the lack of an accessible experimental model for *S. stercoralis*, but the high homology between *Strongyloides* species in the selected proteins (14-3-3 and MA) allowed us to use the *S. venezuelensis* model in mice demonstrating that the immunization with rSs14-3-3 and rSsMA in ADAD system can modulate the immune response of the host, favoring *S. venezuelensis* infection instead of protecting it; therefore, they cannot be used as potential vaccine candidates. However, both, rSs14-3-3 and rSsMA can be used in ELISA assays to diagnose strongyloidiasis, since they have detected specific IgGs in the serum of infected mice. Further experiments to investigate the immune response at longer times after the immunization and infection are needed to assess the production of other specific cytokines and antibody isotypes to confirm the suggested immunomodulation.

5. Conclusions

Immunization with recombinant Ss14-3-3 and SsMA did not prevent the *S. venezuelensis* infection, but they do promote immunomodulatory effects that appear to favor the establishment and development of parasite females. The recombinant proteins have the potential to be used in ELISA assays to diagnose the disease since the serum levels of anti-Ss14-3-3 and anti-SsMA IgGs both increased in strongyloidiasis. In addition, immunization with the rSs14-3-3 protein activates the immune response with an induction of a Th2/Treg-type response together with a high production of TNF- α , confirming its role as an immunomodulator.

Author Contributions: Conceptualization, J.L.-A., A.M. (Antonio Muro) and A.M. (Antonio Marcilla); Data curation, L.F.S.-P., M.T. and J.L.-A.; Formal analysis, M.T., J.L.-A., A.M. (Antonio Muro), D.B. and A.M. (Antonio Marcilla); Funding acquisition, A.M. (Antonio Muro) and A.M. (Antonio Marcilla); Investigation, L.F.S.-P., A.G., B.V. and E.d.O.; Methodology, L.F.S.-P., M.T., A.G., B.V. and E.d.O.; Project administration, M.T. and A.M. (Antonio Marcilla); Software, L.F.S.-P. and J.L.-A.; Supervision, M.T.; Validation, M.T., J.L.-A., A.M. (Antonio Muro), D.B. and A.M. (Antonio Marcilla); Visualization, M.T., J.L.-A., A.M. (Antonio Muro), D.B. and A.M. (Antonio Marcilla); Writing—original draft, L.F.S.-P.; Writing—review & editing, J.L.-A., D.B. and A.M. (Antonio Marcilla). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: LFSP has been the beneficiary of a Juan Castelló doctoral scholarship (Valencia City Council-Universitat de València). Study funded by the State Research Agency, Ministry of Science and Innovation, Spain (RICET RD16/0027/0018; PI19/01727; RTI2018-099474-B-I00; PID2019-105713GB-I00/AEI/10.13039/501100011033), and Department of Education, Culture and Sports, Generalitat Valenciana, Valencia, Spain (PROMETEO/2020/071).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of the Ministry of Agriculture and Livestock of the Government of the Community of Castilla y León, Spain (resolution N° 335 of 20 February 2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Lynne Yenush is acknowledged for critically reading the Manuscript. We would like to thank the University of Salamanca's Animal Experimentation Service (Reg.# PAE/SA/001) and to Alba Torres Valle for her technical help regarding the *S. venezuelensis* life cycle and animal management. European Union co-financing by FEDER JCyL co-financed by FEDER (Una manera de hacer Europa Iniciativa de Empleo Juvenil BDNS: 427002).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. Soil-Transmitted Helminth Infections. Newsroom. 10 January 2022. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections> (accessed on 1 June 2022).
2. Olsen, A.; van Lieshout, L.; Marti, H.; Polderman, T.; Polman, K.; Steinmann, P.; Stothard, R.; Thybo, S.; Verweij, J.; Magnussen, P. Strongyloidiasis—The most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *103*, 967–972. [CrossRef] [PubMed]
3. Aramendia, A.A.; Anegagrie, M.; Zewdie, D.; Dacal, E.; Saugar, J.M.; Herrador, Z.; Hailu, T.; Yimer, M.; Periago, M.V.; Rodríguez, E.; et al. Epidemiology of intestinal helminthiasis in a rural community of Ethiopia: Is it time to expand control programs to include *Strongyloides stercoralis* and the entire community? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008315. [CrossRef] [PubMed]
4. Botero, D.; Restrepo, M. *Parasitosis Humanas*, 5th ed.; Corporación para Investigaciones Biológicas: Medellín, Colombia, 2012; pp. 162–177.
5. Igual Adell, R.; Domínguez Márquez, V. Strongyloidiasis: Epidemiología, manifestaciones clínicas y diagnóstico. Experiencia en una zona endémica: La comarca de La Safor (Valencia). *Enferm. Infecc. Microb. Clin.* **2007**, *25*, 38–44. [CrossRef]
6. Viney, M.; Kikuchi, T. *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*—Rodent models of *Strongyloides* infection. *Parasitology* **2017**, *144*, 285–294. [CrossRef] [PubMed]
7. Ruano, A.L.; Martín, T.; Pardo, J.; López-Abán, J.; Muro, A. Avances en el estudio sobre la strongyloidosis. *Enferm. Emerg.* **2005**, *7*, 102–109. Available online: <http://enfermedadesemergentes.com/articulos/a414/s-7-2-003.pdf> (accessed on 2 February 2022).
8. Lucas Dato, A.; Pacheco-Tenza, M.I.; Borrajo Brunete, E.; Martínez López, B.; García López, M.; González Cuello, I.; Gregori Colomé, J.; Navarro Cots, M.; Saugar, J.M.; García-Vázquez, E.; et al. Strongyloidiasis in Southern Alicante (Spain): Comparative Retrospective Study of Autochthonous and Imported Cases. *Pathogens* **2020**, *9*, 601. [CrossRef]
9. Barroso, M.; Salvador, F.; Sánchez-Montalvá, A.; Bosch-Nicolau, P.; Molina, I. *Strongyloides stercoralis* infection: A systematic review of endemic cases in Spain. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007230. [CrossRef]
10. Martínez-Vázquez, C.; González Mediero, G.; Núñez, M.; Pérez, S.; García-Fernández, J.M.; Gimena, B. *Strongyloides stercoralis* en el sur de Galicia. *Ann. Med. Interna.* **2003**, *20*, 39–41. Available online: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992003000900008&lng=es (accessed on 1 June 2022). [CrossRef]
11. Román-Sánchez, P.; Pastor-Guzmán, A.; Moreno-Guillén, S.; Igual-Adell, R.; Suñer-Generoso, S.; Tornero-Estébanez, C. High prevalence of *Strongyloides stercoralis* among farm workers on the mediterranean coast of Spain: Analysis of the predictive factors of infection in developed countries. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *69*, 336–340. [CrossRef]
12. Alcaraz, C.O.; Adell, R.I.; Sánchez, P.S.; Blasco, M.J.; Sánchez, O.A.; Auñón, A.S.; Calabuig, D.R. Characteristics and geographical profile of strongyloidiasis in healthcare area 11 of the Valencian community (Spain). *J. Infect.* **2004**, *49*, 152–158. [CrossRef]
13. Marcilla, A.; Sotillo, J.; Pérez-García, A.; Igual-Adell, R.; Valero, M.L.; Sánchez-Pino, M.M.; Bernal, D.; Muñoz-Antolí, C.; Trelis, M.; Toledo, R.; et al. Proteomic analysis of *Strongyloides stercoralis* L3 larvae. *Parasitology* **2010**, *137*, 1577–1583. [CrossRef] [PubMed]
14. Marcilla, A.; Garg, G.; Bernal, D.; Ranganathan, S.; Forment, J.; Ortiz, J.; Muñoz-Antolí, C.; Dominguez, M.V.; Pedrola, L.; Martinez-Blanch, J.; et al. The transcriptome analysis of *Strongyloides stercoralis* L3i larvae reveals targets for intervention in a neglected disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1513. [CrossRef] [PubMed]
15. Siles-Lucas, M.; Gottstein, B. The 14-3-3 protein: A key molecule in parasites as in other organisms. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 575–581. [CrossRef] [PubMed]

16. Rodpai, R.; Intapan, P.M.; Thanchomnang, T.; Sanpool, O.; Janwan, P.; Laummaunwai, P.; Wongkham, C.; Insawang, T.; Maleewong, W. *Strongyloides stercoralis* diagnostic polypeptides for human strongyloidiasis and their proteomic analysis. *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 4007–4012. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Rodpai, R.; Intapan, P.M.; Thanchomnang, T.; Sanpool, O.; Janwan, P.; Laummaunwai, P.; Wongkham, C.; Insawang, T.; Maleewong, W. Identification of antigenic proteins in *Strongyloides stercoralis* by proteomic analysis. *Parasitol. Res.* **2017**, *116*, 1687–1693. [\[CrossRef\]](#)
18. Vicente, B.; López-Abán, J.; Rojas-Caraballo, J.; Pérez del Villar, L.; Hillyer, G.V.; Martínez-Fernández, A.R.; Muro, A. A *Fasciola hepatica*-derived fatty acid binding protein induces protection against schistosomiasis caused by *Schistosoma bovis* using the adjuvant adaptation (ADAD) vaccination system. *Exp. Parasitol.* **2014**, *145*, 145–151. [\[CrossRef\]](#)
19. Vicente, B.; López-Abán, J.; Rojas-Caraballo, J.; del Olmo, E.; Fernández-Soto, P.; Muro, A. Protection against *Schistosoma mansoni* infection using a *Fasciola hepatica*-derived fatty acid binding protein from different delivery systems. *Parasites Vector* **2016**, *9*, 216. [\[CrossRef\]](#)
20. Legarda-Ceballos, A.L.; López-Abán, J.; Del Olmo, E.; Escarcena, R.; Bustos, L.A.; Rojas-Caraballo, J.; Vicente, B.; Fernández-Soto, P.; San Feliciano, A.; Muro, A. In vitro and in vivo evaluation of 2-aminoalkanol and 1,2-alkanediamine derivatives against *Strongyloides venezuelensis*. *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 364. [\[CrossRef\]](#)
21. Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R.D.; Bairoch, A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3784–3788. [\[CrossRef\]](#)
22. Martínez-Fernández, A.R.; Nogal-Ruiz, J.J.; López-Abán, J.; Ramajo, V.; Oleaga, A.; Manga-González, Y.; Hillyer, G.V.; Muro, A. Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Vet. Parasitol.* **2004**, *126*, 287–298. [\[CrossRef\]](#)
23. Vlamincx, J.; López-Abán, J.; Ruano, A.L.; del Olmo, E.; Muro, A. Vaccination against *Strongyloides venezuelensis* with homologue antigens using new immunomodulators. *J. Parasitol.* **2010**, *96*, 643–647. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Mei, X.; Ye, Z.; Chang, Y.; Huang, S.; Song, J.; Lu, F. *Trichinella spiralis* co-infection exacerbates *Plasmodium berghei* malaria-induced hepatopathy. *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 440. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Manente, F.A.; Quinello, C.; Ferreira, L.S.; de Andrade, C.R.; Jellmayer, J.A.; Portuondo, D.L.; Batista-Duharte, A.; Carlos, I.Z. Experimental sporotrichosis in a cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice model. *Med. Mycol.* **2018**, *56*, 711–722. [\[CrossRef\]](#)
27. Karanam, L.S.K.; Basavraj, G.K.; Papireddy, C.K.R. *Strongyloides stercoralis* Hyper infection Syndrome. *Indian J. Surg.* **2020**, *12*, 1–5. [\[CrossRef\]](#)
28. Czeresnia, J.M.; Weiss, L.M. *Strongyloides stercoralis*. *Lung* **2022**, *200*, 141–148. [\[CrossRef\]](#)
29. Perera, D.; Ndao, M. Promising Technologies in the Field of Helminth Vaccines. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 711650. [\[CrossRef\]](#)
30. Culma, M.F. *Strongyloides stercoralis* proteome: A reverse approach to the identification of potential immunogenic candidates. *Microb. Pathog.* **2021**, *152*, 104545. [\[CrossRef\]](#)
31. Siles-Lucas, M.; Uribe, N.; López-Abán, J.; Vicente, B.; Orfao, A.; Nogal-Ruiz, J.J.; Feliciano, A.S.; Muro, A. The *Schistosoma bovis* Sb14-3-3zeta recombinant protein cross-protects against *Schistosoma mansoni* in BALB/c mice. *Vaccine* **2007**, *25*, 7217–7223. [\[CrossRef\]](#)
32. Rojas-Caraballo, J.; López-Abán, J.; Pérez del Villar, L.; Vizcaíno, C.; Vicente, B.; Fernández-Soto, P.; del Olmo, E.; Patarroyo, M.A.; Muro, A. In vitro and in vivo studies for assessing the immune response and protection-inducing ability conferred by *Fasciola hepatica*-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105323. [\[CrossRef\]](#)
33. Trelis, M.; Galiano, A.; Bolado, A.; Toledo, R.; Marcilla, A.; Bernal, D. Subcutaneous injection of exosomes reduces symptom severity and mortality induced by *Echinostoma caproni* infection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* **2016**, *46*, 799–808. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Molehin, A.J.; Gray, S.A.; Turner, C.; Davis, J.; Zhang, W.; Khatoun, S.; Rattan, M.; Kern, R.; Peterson, C.; Sennoune, S.R.; et al. Process Development of Sj-p80: A Low-Cost Transmission-Blocking Veterinary Vaccine for Asiatic Schistosomiasis. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 578715. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Gause, W.C.; Wynn, T.A.; Allen, J.E. Type 2 immunity and wound healing: Evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 607–614. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Allen, J.E.; Sutherland, T.E. Host protective roles of type 2 immunity: Parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. *Semin. Immunol.* **2014**, *26*, 329–340. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. McSorley, H.J.; Chayé, M.A.M.; Smits, H.H. Worms: Pernicious parasites or allies against allergies? *Parasite Immunol.* **2019**, *41*, e12574. [\[CrossRef\]](#)
38. Maizels, R.M.; Yazdanbakhsh, M. Immune regulation by helminth parasites: Cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 733–744. [\[CrossRef\]](#)
39. Behnke, J.M.; Barnard, C.J.; Wakelin, D. Understanding Chronic Nematode Infections: Evolutionary Considerations, Current Hypotheses and The Way Forward. *Int. J. Parasitol.* **1992**, *22*, 861–907. [\[CrossRef\]](#)
40. Krishnamurthy, R.; Dincer, H.E.; Whittemore, D. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a patient with rheumatoid arthritis after anti-TNF- α therapy. *J. Clin. Rheumatol.* **2007**, *13*, 150–152. [\[CrossRef\]](#)

41. Artis, D.; Humphreys, N.E.; Bancroft, A.J.; Rothwell, N.J.; Potten, C.S.; Grencis, R.K. Tumor Necrosis Factor Is a Critical Component of Interleukin 13-mediated Protective T Helper Cell Type 2 Responses during Helminth Infection. *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 953–962. [[CrossRef](#)]
42. Khaliq, M.F.; Ihle, R.E.; Perry, J. Immunosuppression with Antitumour Necrosis Factor Therapy Leading to *Strongyloides* Hyperinfection Syndrome. *Case Rep. Infect Dis.* **2018**, *2018*, 6341680. [[CrossRef](#)]
43. Prior-Español, Á.; Roure, S.; Mateo, L.; Martínez-Morillo, M. Anaemia and Eosinophilia Secondary to *Strongyloides* in a Patient Treated with Anti-TNF- α . *Reumatol. Clin.* **2020**, *16*, 508–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Masoori, L.; Falak, R.; Mokhtarian, K.; Bandehpour, M.; Razmjou, E.; Jalallou, N.; Jafarian, F.; Akhlaghi, L.; Meamar, A.R. Production of recombinant 14-3-3 protein and determination of its immunogenicity for application in serodiagnosis of strongyloidiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *113*, 326–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Fernández-Rivas, G.; Rivaya, B.; Romaní, N.; Wang, J.; Alcaide, M.; Matas, L. Diagnosis of soil-transmitted helminth infections. An unsolved problem in the omics era. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2019**, *37*, 20–25. [[CrossRef](#)]