



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**IDENTIFICACIÓN *in silico* DE PROTEÍNAS
EXCRETORAS/SECRETORAS EN MONOGÉNEOS Y SU
POTENCIAL COMO BLANCOS DE FÁRMACOS**

Por:

Martha Beatriz Chapa López

TESIS ANALIZADA POR LA

COORDINACIÓN EN ACUACULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Martha Beatriz Chapa López, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

Dr. Francisco Neptalí Morales Serna
Director de tesis

Dr. Guillermo de Anda Jáuregui
Co-director de tesis

Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Integrante del comité de tesis

Dr. Rubén Darío Díaz Martín
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Identificación *in silico* de Proteínas Excretoras/Secretoras en Monogéneos y su Potencial como Blancos de Fármacos” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Martha Beatriz Chapa López, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para la realización de mi Maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por abrirme las puertas y dejarme usar sus instalaciones para mi formación como estudiante. Gracias a los técnicos y profesores por sus conocimientos brindados y al personal administrativo por atender las necesidades de los estudiantes.

Al CONACYT por el financiamiento otorgado a través del proyecto FORDECYT 292474.

Al proyecto Cátedras-CONACYT número 3285 titulado Fortalecimiento del Programa de Cultivo de peces marinos de CIAD Mazatlán.

A mi director de tesis, el Dr. Francisco Neptalí Morales Serna, quien siempre me alienta a ser mejor, me apoya en mis decisiones y estuvo al pendiente de mi trabajo todo el tiempo. Gracias por ser también un amigo.

A los integrantes de mi comité de tesis, el Dr. Guillermo de Anda Jáuregui, Dra. Alejandra García Gasca y Dr. Rubén Darío Díaz Martín, por su apoyo en el proceso y sus observaciones que dieron lugar a un mejor trabajo.

A mi amigo Víctor Caña, quien me tuvo paciencia durante toda la maestría y me enseñó muchas cosas que apliqué para realizar este trabajo. ¡Gracias también por todos los momentos de diversión!

A mis compañeros de laboratorio, con quienes aprendo, me divierto y recibo los regaños.

A mis papás y mi familia, que siempre están al pendiente de mí.

A mis amigos Guillermo, Claudia, Santa y Melissa con quienes pasé muchos momentos felices y nos dimos apoyo moral y académico mutuo.

DEDICATORIA

A mis padres, por su apoyo incondicional.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Generalidades de los Plelmintos Parásitos	14
2.2. Secretoma	16
2.2.2. Estudios de Proteínas en Monogéneos.....	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo General.....	21
3.2. Objetivos Específicos	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1. Obtención de Datos y Predicción de Secretomas	22
4.2. Análisis de Grupos Ortólogos	23
4.3. Anotación funcional de proteínas	24
4.4. Análisis de Rutas KEGG	25
4.5. Identificación de Potenciales Blancos de Fármacos.....	25
4.6. Preparación del Receptor y el Ligando.....	27
4.7. Acoplamiento Molecular (Docking).....	29
4.8. Análisis Filogenético de Receptores	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Predicción de Secretomas.....	31
5.2. Anotación Funcional de Secretoma.....	40
5.3. Análisis de Enriquecimiento.....	45
5.4. Análisis de Rutas KEGG	49
5.5. Análisis de Grupos Ortólogos	54
5.6. Identificación de Potenciales Blancos de Fármacos.....	56
5.7. Acoplamiento Molecular	57
5.8. Análisis Filogenético de Receptores	57
6. DISCUSIÓN	59

CONTENIDO (continuación)

7. CONCLUSIONES.....	64
8. RECOMENDACIONES.....	65
9. REFERENCIAS	66
10. ANEXOS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Relaciones filogenéticas entre los grupos del subfilo Neodermata.	15
2. Diferencias en el haptor de los monogéneos de la subclase A. Polyopisthocotylea y B. Monopisthocotylea.	16
3. Programas bioinformáticos utilizados para la predicción de proteínas ES y para el análisis de anotación funcional.	23
4. Pasos para la identificación de potenciales blancos de fármacos y sus ligandos.	27
5. Asignación de Términos GO al secretoma de platelmintos de la clase Monogenea.	41
6. Asignación de Términos GO al secretoma de platelmintos de la clase Trematoda.	41
7. Asignación de Términos GO al secretoma de platelmintos de la clase Cestoda.	42
8. Asignación de Términos GO al secretoma de platelmintos de la clase Rhabditophora.	42
9. Asignación de Términos GO al secretoma del monogéneo <i>G. salaris</i>	43
10. Asignación de Términos GO al secretoma del monogéneo <i>P. xenopodis</i>	43
11. Asignación de Términos GO al secretoma del monogéneo <i>N. melleni</i>	44
12. Asignación de Términos GO al secretoma del monogéneo <i>E. nipponicum</i>	44
13. Análisis de enriquecimiento de términos GO del secretoma comparado con los del genoma de la clase Monogenea.	45
14. Análisis de enriquecimiento de términos GO del secretoma comparado con los del genoma de la clase Cestoda.	46
15. Análisis de enriquecimiento de términos GO del secretoma comparado con los del genoma de la clase Trematoda.	47
16. Análisis de enriquecimiento de términos GO del secretoma comparado con los del genoma de la clase Rhabditophora.	48
17. Análisis comparativo de proteínas del secretoma entre cuatro especies de monogéneos. El asterisco rojo indica el número de clusters compartido entre todas las especies.	54
18. Análisis comparativo de proteínas del secretoma entre diferentes clases de platelmintos.	56
19. Análisis filogenético de GyrC con respecto a catepsinas de otros organismos.	58

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Receptores seleccionados para el acoplamiento molecular.....	28
2. Fármacos catalogados como antihelmínticos.	28
3. Proteínas del secretoma en las distintas especies de platelmintos.....	32
4. Proteínas ES predichas encontradas en el análisis de espectrometría de masas de proteínas ES de <i>F. hepatica</i> del estudio hecho por Robinson et al. (2009).....	33
5. Proteínas ES predichas encontradas en el análisis de espectrometría de masas de proteínas ES de <i>S. mansoni</i> del estudio hecho por Knudsen et al. (2005).	36
6. Proteínas ES predichas encontradas en el análisis de espectrometría de masas de proteínas ES de <i>S. mansoni</i> del estudio hecho por Floudas et al. (2017).....	37
7. Rutas KEGG más representativas en las diferentes clases de platelmintos.	50
8. Clusters compartidos entre la clase Monogenea y sus funciones.....	55
9. Valores de afinidad entre los receptores y ligandos evaluados en el análisis de acoplamiento molecular.	57

RESUMEN

Los parásitos utilizan diferentes mecanismos moleculares para detectar, invadir y subsistir en sus hospederos. En estos mecanismos intervienen las proteínas excretoras/secretoras (ES), también conocidas como secretoma. El interés en estas proteínas como blancos de fármacos ha crecido dada su importancia en la interacción hospedero-parásito. La creciente disponibilidad de genomas ha permitido el estudio de las proteínas ES en algunos parásitos de animales terrestres; sin embargo, el conocimiento y estudio de estas proteínas en parásitos de la clase Monogenea es escaso. Los monogéneos son parásitos que ocasionan daños en distintas especies de peces en cultivo. El objetivo principal de este trabajo fue predecir y anotar funcionalmente los secretomas en cuatro especies de monogéneos (*Gyrodactylus salaris*, *Neobenedenia melleni*, *Eudiplozoon nipponicum* y *Protopolystoma xenopodis*) y compararlos con secretomas de otros platelmintos parásitos (clases Trematoda y Cestoda) y de vida libre (Rhabditophora) por medio de herramientas bioinformáticas. El tamaño de los secretomas fue variado en un intervalo de 4.33 a 11.6%, donde el monogéneo *P. xenopodis* presentó la mayor proporción de proteínas ES con respecto a su proteoma. La anotación funcional en términos GO destacó funciones de procesos metabólicos, celulares, actividad catalítica y la respuesta a estímulos. Los secretomas fueron comparados entre las distintas especies mediante diagramas de Venn; cuatro especies de monogéneos analizadas comparten 13 proteínas del secretoma (3 clusters), mientras que las especies representantes de las cuatro clases de platelmintos comparten 56 proteínas del secretoma (22 clusters). En el monogéneo *Gyrodactylus salaris*, se identificaron un total de 15 proteínas ES únicas (o exclusivas) de esta especie); por lo tanto, estas proteínas se consideran como posibles blancos de fármacos. De estas 15 proteínas, una (denominada aquí GyrC) resultó homóloga de la procatepsina L (2O6X), la cual se ha registrado como un blanco farmacológico viable en el tremátodo *Fasciola hepatica*. Por lo tanto, se realizó un análisis de Acoplamiento Molecular entre la proteína 2O6X (junto con otras ocho proteínas homólogas) y distintos antihelmínticos, de los cuales la Emodepsida resultó ser el ligando con mejor puntaje de afinidad (-12 Kcal/mol) con el receptor 2O6X. Así, la Emodepsida podría ser un antihelmíntico efectivo para combatir a *G. salaris* y quizá otros monogéneos. Esta información puede ser útil para un mejor estudio del secretoma de parásitos monogéneos y su importancia como posible terapia antihelmíntica.

Palabras clave: Monogenea, proteínas ES, secretoma, blanco de fármacos, acoplamiento

ABSTRACT

Different molecular mechanisms are deployed by parasite to colonize into their hosts. Excretory/Secretory (ES) proteins, also known as secretome, play an important role in the host-parasite interactions. Therefore, these proteins have received attention as therapeutic targets for parasitic diseases. The availability of genomes and transcriptomes have facilitated the study of ES proteins in parasites of medical and veterinary importance; however, the knowledge is poor for parasites of the class Monogenea. Some monogenean species may cause health problems in farmed fish. The goal of the present study was to identify and functionally annotate the secretomes in four monogenean species (*Gyrodactylus salaris*, *Neobenedenia melleni*, *Eudiplozoon nipponicum* and *Protopolystoma xenopodis*) and compare to secretomes from other parasitic (class Trematoda and Cestoda) and free-living (Rhabditophora) plathelminths by using a bioinformatic approach. The secretome sizes ranged from 4.33 to 11.6% of the total predicted proteome. The most represented Gene Ontology Terms were metabolic process, cellular process, catalytic activity, and stimulus response. The four monogenean species shared 13 ES proteins (three clusters), whereas representants of the four classes of plathelminths shared 56 ES proteins (22 clusters). A total of 15 unique ES proteins were identified in *G. salaris*. These proteins were considered as potential drug targets, but only one (herein named GyrC) was homologue of the procathepsin L (2O6X), which is a viable drug target in the trematode *Fasciola hepatica*. The molecular docking analysis were run with procathepsin L (along eight other homologue proteins) and different anthelmintics. The anthelmintic emodepside had the best affinity (-12 Kcal/mol) with 2O6X. Therefore, emodepside could be an effective anthelmintic against *G. salaris* and other monogeneans. These finding may be informative for future studies that analyze the secretome of monogeneans and their importance as therapeutic targets.

Keywords: Monogenea, ES proteins, secretome, drug targets, molecular docking

1. INTRODUCCIÓN

Los platelmintos pueden ser de vida libre (Clase Rhabditophora) o parásitos (Superclase Neodermata). Estos últimos se clasifican en tres clases (Cestoda, Trematoda y Monogenea) e incluyen especies responsables de diversas enfermedades en humanos y animales (Collins, 2017). Los monogéneos pueden causar problemas respiratorios y osmorregulatorios, irritación y anemia en los peces (Rohde, 2005; Ogawa, 2015). Estos parásitos tienen un ciclo de vida directo, con tiempos generacionales cortos y fecundidad muy alta, que al desarrollarse completamente dentro de los sistemas de cultivo, dificulta la prevención o control de las infecciones (Ogawa, 2015; Hoai, 2020). Un monogéneo altamente patógeno es *Gyrodactylus salaris*, el cual ha impactado negativamente el cultivo de salmón (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) y de algunas otras especies como la trucha arcoiris y trucha ártica (Bakke et al., 2002).

Existen distintos tratamientos para combatir a estos parásitos. La aplicación de baños de formalina, praziquantel, ivermectina y extractos de plantas son comunes; sin embargo, hay ocasiones en que las dosis no son adecuadas y los tratamientos resultan tóxicos para los peces o no son eficaces contra todos los estadios del parásito, como huevos o larvas (Sharp et al., 2004; Forwood et al., 2013; Militz et al., 2013; Morales-Serna et al., 2018). Por ello, es importante buscar alternativas que permitan atacar de una manera más eficiente al parásito.

Entre las alternativas está la identificación de blancos moleculares hacia los cuales dirigir los fármacos. En ese sentido, un grupo interesante de moléculas son las proteínas excretoras/secretoras (ES) que en conjunto conforman el secretoma. Estas proteínas son aproximadamente 30% del total de proteínas codificadas (proteoma) que ingresan a la vía secretora (Skach, 2007). Las proteínas ES de un organismo pueden ser distintas moléculas, tales como enzimas digestivas, proteasas extracelulares, hormonas y anticuerpos (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003; Bonin-Debs et al., 2004), las cuales tienen funciones como la adhesión, proteólisis y organización de la matriz extracelular (Gomez et al., 2015). Varias proteínas que se han detectado en el secretoma de parásitos cumplen funciones metabólicas y ayudan a evadir el sistema inmune del hospedero (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003; Zarowiecki y Berriman, 2015). Además, las proteínas ES suelen ser antígenos de diagnóstico inmunogénico por su accesibilidad para ser reconocidas por los sistemas

inmunitarios del hospedero, siendo así posibles biomarcadores para detectar infecciones parasitarias (Wang et al., 2015).

Las proteínas ES son posibles blancos de fármacos, ya que al salir de la célula pueden ser inhibidas por los medicamentos. Ejemplo de ello son la insulina, el interferón, anticuerpos recombinantes, activadores de plasminógeno y hormona del crecimiento (Bonin-Debs et al., 2004). Algunas proteínas que se han estudiado como candidatas a blancos de fármacos en parásitos son las catepsinas, serinas, proteínas de choque térmico y quinasas, las cuales han sido estudiadas mayormente en parásitos como *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus multilocularis*, *E. granulosus*, *Taenia solium* y *Fasciola hepatica*, que parasitan animales terrestres (Cass et al., 2007; Merckelbach y Ruppel, 2007; Abaza, 2014; Jedlicková et al., 2019).

En el pasado, la identificación de nuevos blancos de fármacos se basaba en la detección de una molécula activa y su validación se hacía después de que un fármaco antiparasitario estaba disponible para posteriormente hacer un ensayo y determinar si el medicamento funcionaba contra el parásito (Woods y Williams, 2007). Dado que la determinación experimental de las interacciones fármaco - molécula blanco siguen siendo procedimientos complicados y demandantes la relación costo-tiempo, la intervención de métodos computacionales (análisis *in silico*) para su optimización se ha hecho cada vez más presente (Saldívar-González et al., 2017). En los últimos años, el procedimiento computacional del Acoplamiento Molecular (docking) ha permitido evaluar la afinidad de unión entre miles de macromoléculas (receptor) y moléculas pequeñas (ligando) (Trott y Olson, 2010), lo que reduce el abanico de posibilidades y da lugar a una validación experimental más objetiva y segura.

La información que se conoce acerca de la clase Monogenea es limitada en esta área, tan solo se tienen proteomas predichos pero sin estar anotados y de manera general no se sabe mucho de la biología molecular de estos organismos, ni de parásitos que sean de ambientes acuáticos. En el presente trabajo se aplican herramientas computacionales para predecir el secretoma de monogéneos y compararlo con el de otros platelmintos parásitos y de vida libre. Adicionalmente, se realiza la anotación funcional de las proteínas ES y la predicción de posibles blancos de fármacos mediante acoplamiento molecular.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de los Platelminthos Parásitos

El filo Platyhelminthes comprende una gran diversidad de especies tanto acuáticas como terrestres. Por lo general tienen una simetría bilateral y un cuerpo suave que carece de protección, son dorsoventralmente aplanados, usualmente hermafroditas y pueden ser pequeños o muy grandes. Estos pueden ser de vida libre (Clase Rhabditophora) o parásitos (Subfilo Neodermata). Los platelmintos parásitos se dividen en tres clases: Cestoda, Trematoda y Monogenea (Maule y Marks, 2006; Collins, 2017). Estas clases han pasado por procesos evolutivos que les conceden características únicas para adaptarse al medio en el que se desarrollan, por lo cual diferentes hipótesis han sido planteadas. Park y colaboradores (2007) corroboran la idea de que el ectoparasitismo es una condición primitiva y el endoparasitismo una condición derivada, que está relacionado con los ciclos de vida directo (clase Monogenea) e indirecto (clase Trematoda y Cestoda) (Figura 1).

Por otro lado, hay una característica que todas comparten: el tegumento. Éste se extiende por todo el cuerpo del parásito y tiene la función de absorber nutrientes, así como la comunicación química inicial entre parásito y hospedero. El tegumento representa una defensa contra los mecanismos de ataque del hospedero y es capaz de unir moléculas externas de 'señalización' para iniciar procesos celulares, moleculares o bioquímicos internos involucrados en numerosas funciones, lo cual explica su larga y exitosa vida en el hospedero (Maizels et al., 2004; Maule y Marks, 2006).

La clase Monogenea está representada por especies ectoparásitas de peces (Tinsley, 2005). Aunque hay excepciones, como los monogéneos de la familia Polystomatidae que parasitan la superficie u órganos internos de animales semiacuáticos, como anfibios, tortugas e hipopótamos (Héritier et al., 2015).

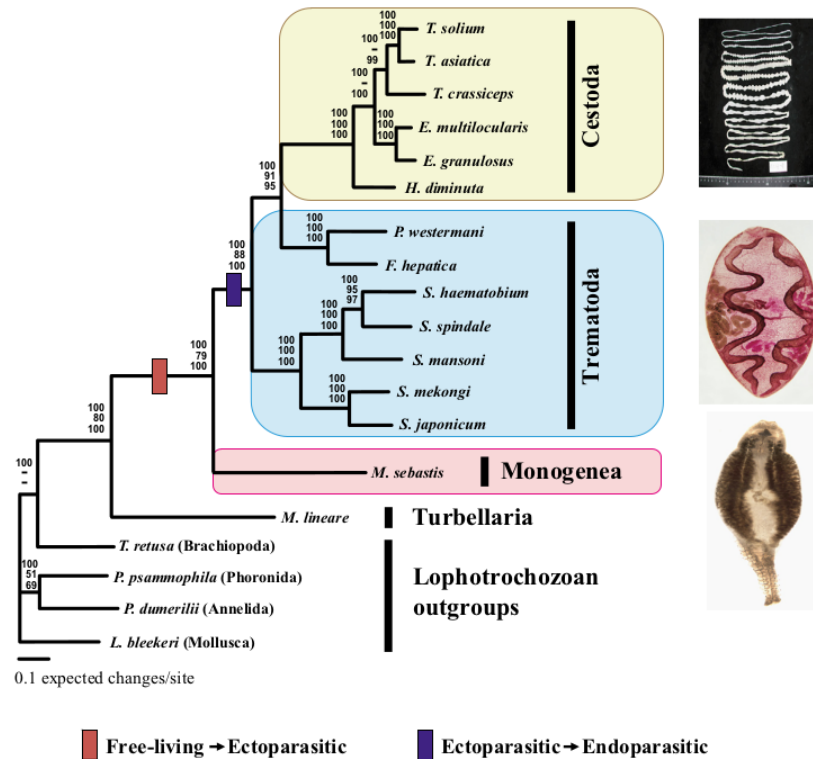


Figura 1. Relaciones filogenéticas entre los grupos del subfilo Neodermata basadas en el análisis de datos de secuencias de aminoácidos de proteínas mitocondriales utilizando el análisis Bayesiano, métodos de máxima probabilidad y máxima parsimonia. Imagen tomada de Park et al. (2007).

La principal característica de los monogéneos es su órgano llamado haptor, que les ayuda a sujetarse de la superficie de su hospedero. Por esta característica, la clase Monogenea se divide en dos subclases: Monopisthocotylea y Polyopisthocotylea (Figura 2). La primera incluye especies que habitan principalmente en superficies externas como piel, aletas, branquias, cavidad oral y cabeza; pueden moverse fácilmente en el hospedero, se alimentan de células epiteliales y presentan un haptor único compuesto por ganchos. Por otro lado, los monogéneos de la subclase Polyopisthocotylea, prefieren las branquias de los teleósteos, se alimentan de sangre y tienen un haptor que lleva numerosas unidades de agarre en forma de ventosas esclerotizadas (Rohde, 2005).

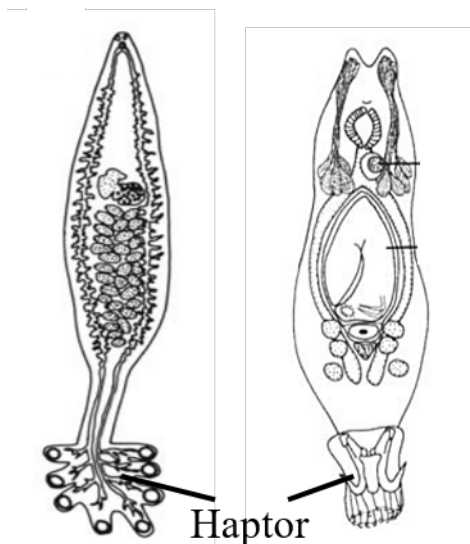


Figura 2. Diferencias en el haptor de los monogéneos de la subclase A. Polyopisthocotylea y B. Monopisthocotylea. Imagen tomada y modificada de Rohde (2005).

2.2. Secretoma

El término secretoma fue utilizado por primera vez por el autor Tjalsma et al. (2000) mientras trabajaban con la bacteria gram positiva *Bacillus subtilis*. Este concepto hace alusión al conjunto de proteínas que son secretadas y a la maquinaria involucrada en este proceso. Otro autor lo define como “el estudio global de proteínas que son secretadas por una célula, tejido u organismo en un momento dado o bajo ciertas condiciones” (Hathout, 2007) y más tarde Agrawal y colaboradores (2010) proponen al secretoma como “el grupo global de proteínas secretadas en el espacio extracelular por una célula, tejido, órgano u organismo en cualquier momento y condiciones a través de mecanismos secretores conocidos y desconocidos que involucran orgánulos secretores constitutivos y regulados”. La secretómica es un subconjunto de la proteómica que incluye información sobre las proteínas secretadas, los compuestos orgánicos y otras vías de secreción (Ganesan, 2016).

Las células exportan proteínas desde su sitio de síntesis hacia otros destinos dentro o fuera de la célula. Las proteínas ES son transportadas convencionalmente mediante el retículo endoplásmico (RE) al aparato de Golgi y luego a la membrana plasmática para ser liberada al espacio extracelular.

Para esto, las proteínas se forman como pre-proteínas con un péptido señal en el extremo N-terminal, el cual es removido por peptidasas señal específicas (SPase) una vez que la proteína se ha liberado en su lugar correcto. Una de las principales rutas para la exportación de proteínas es la dependiente del sistema Sec; no obstante, para algunas proteínas particulares hay rutas alternas, como el sistema Tat (twin arginine transport) o rutas dependientes de transportadores ABC (Tjalsma et al., 2000). La ruta del sistema Sec tiene varios componentes divididos en seis grupos: chaperones citosólicos, motor de translocación (SecA), componentes del canal de translocación (SecYEG y SEcDF-YajC), SPases, SPPases y factores de plegado. En general, una pre-proteína es reconocida primero por factores de focalización solubles para su transporte a la membrana blanco, donde la proteína llega a ser asociada con la maquinaria de translocación. Enseguida, la cadena de polipéptidos es transportada a través de un canal protéinico. En la mayoría de los casos este transporte es manejado por un motor de translocación que une e hidroliza nucleósidos trifosfatos. Finalmente, la péptido señal es removido, resultando en la liberación de una proteína madura. Si la proteína es translocada en una conformación desplegada, la proteína madura se doblará en su forma original poco después de su liberación.

Algunas proteínas pueden también ser liberadas a la membrana plasmática y espacio extracelular sin pasar por la ruta convencional de secreción (RE-Golgi). Hay dos categorías de estas proteínas (Rabouille, 2017). La primera abarca proteínas sin péptido señal que atraviesan la membrana plasmática y son activas en el medio extracelular, siendo secretadas por tres rutas con distintos mecanismos: Tipo I, translocación a través de la membrana mediada por poro; Tipo II, secreción basada en transportadores ABC; y Tipo III, secreción basada en autofagosoma/endosoma. La segunda categoría abarca proteínas con péptido señal y/o un dominio transmembrana que entra en el RE pero evita el aparato de Golgi en su camino hacia la membrana plasmática. Una característica común entre estas rutas es que, con algunas excepciones, se inducen por estrés.

La secreción de proteínas es un proceso necesario para un funcionamiento normal del organismo, por lo que un desequilibrio en la producción de proteínas secretoras podría indicar alguna patología (Hathout, 2007).

Las proteínas excretoras/secretoras (ES) están presentes en todos los seres vivos y se involucran en

procesos de adhesión celular, migración celular, diferenciación, supervivencia, determinación de patogenicidad, factores de virulencia en bacterias y en la respuesta inmune de los organismos (Bonin-Debs et al., 2004; Ganesan, 2016), por lo que su presencia en parásito no es una excepción.

2.2.1. Proteínas ES como Blancos de Fármacos en Parásitos

Un nuevo campo se ha concentrado en estudiar a las proteínas ES ya que tienen funciones de comunicación célula-célula y adhesión y en los parásitos son esenciales para procesos de evasión del sistema inmune del hospedero (Gomez et al., 2015). El secretoma en los parásitos pueden cambiar dependiendo de los estímulos y mensajes que sus células reciban, es decir, puede secretar diferentes proteínas si se encuentra en situaciones de estrés (por ejemplo la acción de un fármaco) o el estadio de vida por el que esté pasando (Hathout, 2007; Wang et al., 2015). Las proteínas ES circulan por todo el cuerpo y se localizan o liberan en la superficie celular (Ranganathan y Garg, 2009). Los antígenos “secretados” incluyen enzimas digestivas que producen los parásitos adultos en sus intestinos, así como contenidos uterinos liberados por helmintos junto con huevos o larvas (Hewitson et al., 2009).

Con el desarrollo de las plataformas digitales de bases de datos y la obtención de nuevos genomas, proteomas y transcriptomas, el estudio *in silico* del secretoma en parásitos ha sido posible y ha permitido la detección de nuevos posibles blancos de fármacos. Por ejemplo, mediante herramientas bioinformáticas, Cuesta-Astro et al. (2017) predijeron los secretomas de 31 especies de Nematoda y 13 especies de Platyhelminthes, incluyendo especies de parásitos de plantas y animales, así como especies de vida libre. Los nemátodos tuvieron secretomas más grandes con respecto a los platelmintos, así mismo, los parásitos que infectan a animales siguen la tendencia de tener un secretoma más chico (en promedio 7.1% con respecto al proteoma). Seis especies de los platelmintos analizados tuvieron menos de 500 proteínas secretoras (dentro de las clases Cestoda y Trematoda). La mayoría de las proteínas ES tuvieron una longitud de 100-300 aa, mientras que algunas pocas tuvieron una longitud mayor a 1000 aa, las cuales forman parte de secretomas en organismos de vida libre como *Caenorhabditis elegans* y *Pristionchus pacificus*. El secretoma más

grande fue el del nemátodo *Bursaphelenchus xylophilus* (porcentaje de 13.9% con respecto al proteoma), que es parásito de la madera del pino, seguido por *C. elegans* (13% del proteoma). Aunque el porcentaje del secretoma en *B. xylophilus* es mayor (con respecto a las proteínas del proteoma), el secretoma de *C. elegans* tiene un mayor número de proteínas en su secretoma (2,077 proteínas del secretoma en *B. xylophilus* y 3,121 proteínas del secretoma en *C. elegans*). El secretoma más pequeño correspondió al platelminto parásito *Schistosoma mansoni* (4.2% del proteoma). El único monogéneo (*Gyrodactylus salaris*) incluido en el estudio tuvo un secretoma con 653 proteínas, equivalente a 5.8% del proteoma total.

También con métodos bioinformáticos, Gahoi et al. (2019) predijeron y anotaron funcionalmente las proteínas ES en el genoma de 73 especies de nemátodos. Los autores identificaron un total de 452 proteínas ES de nemátodos parásitos del humano y plantas, las cuales presentaron homología con blancos aprobados por DrugBank y con genes clasificados como letales (indispensables para la vida) en *C. elegans*, por lo tanto sugirieron que estas proteínas representan potenciales blancos para el control de parásitos y para realizar futuros experimentos que ayuden a entender las interacciones hospedero-parásito.

En otro ejemplo, Wang et al. (2015) analizaron computacionalmente el proteoma del céstodo *Echinococcus multilocularis* e identificaron 673 proteínas ES putativas, las cuales estuvieron representadas principalmente por inhibidores de proteasas, proteasas, glucosidasas, pliegues similares a inmunoglobulinas y factores de crecimiento. Estos autores identificaron 383 proteínas ES como potenciales blancos de fármacos; además, determinaron que cuatro de estas proteínas blanco tienen correspondencia con fármacos conocidos.

Las afinidades de unión y estabilidad entre proteínas ES blanco y fármacos pueden analizarse también con métodos computacionales. Uno de estos métodos es el acoplamiento (docking) molecular, el cual predice la orientación preferida de una molécula sobre otra. Esta orientación se usa para predecir la fuerza de la unión entre las dos moléculas. Así, el docking se usa frecuentemente para predecir la orientación de la unión entre potenciales moléculas de fármacos y su proteína blanco, con la idea de predecir a la vez la afinidad y actividad del fármaco (Prakash et al., 2010). Por ejemplo, Chávez-Fumagalli et al. (2019) analizaron el proteoma del parásito

Leishmania y encontraron una proteína hipotética, parecida a glucosidasa, como ideal blanco de fármaco. Esta proteína fue modelada para obtener su estructura 3D, a partir de la cual, mediante docking, confirmaron que dos fármacos comerciales presentaron afinidad hacia el sitio activo identificado en el modelo molecular.

2.2.2. Estudios de Proteínas en Monogéneos

Los monogéneos del género *Gyrodactylus*, *Neobenedenia* y *Eudiplozoon* han sido de los más estudiados por su impacto en los cultivos de peces. Algunas proteínas como las catepsinas (cisteínas proteasas que tienen diferentes familias) se describe que cumplen roles en la alimentación y crecimiento del parásito; éstas han sido encontradas en *Neobenedenia melleni* (catepsina L) y *E. nipponicum* (catepsina L, catepsina B y catepsina D) (Rao y Yang, 2007; Jedličková et al., 2016; Jedličková et al., 2018). En el parásito *E. nipponicum* también se han detectado proteínas importantes como las serinas proteasas (proteínas Kunitz) que son responsables de procesos como la digestión y homeostasis del parásito (Jedličková et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Identificar *in silico* el secretoma y posibles blancos de fármacos en monogéneos.

3.2. Objetivos Específicos

- 1) Predecir el secretoma de los monogéneos *G. salaris*, *Protopolystoma xenopodis*, *Eudiplozoon nipponicum* y *Neobenedenia melleni*, así como de otros platelmintos parásitos (Trematoda: *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepatica*, Cestoda: *Echinococcus multilocularis*) y de vida libre (Tricladida: *Schmidtea mediterranea* y *Macrostomum lignano*) para fines comparativos.
- 2) Realizar la anotación funcional de los secretomas, agrupándolos de acuerdo a las tres categorías de la Ontología de Genes (GO): Componentes celulares (CC), Función Molecular (MF) y Procesos Biológicos (BP).
- 3) Comparar la función de las proteínas del secretoma entre especies de monogéneos y otros platelmintos parásitos y de vida libre.
- 4) Identificar la estructura 3D de proteínas esenciales y únicas del monogéneo *G. salaris* para determinar posibles blancos de fármacos.
- 5) Realizar el acoplamiento molecular entre las proteínas potenciales de blancos de fármacos elegidas por homología y los ligandos catalogados como antihelmínticos en la base de datos de DrugBank enfocado hacia un posible reposicionamiento de fármacos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención de Datos y Predicción de Secretomas

Los proteomas predichos de *Gyrodactylus salaris* (Hahn et al., 2014), *Protopolystoma xenopodis*, *Fasciola hepatica*, *Schmidtea mediterranea*, *Schistosoma mansoni* y *Macrostomum lignano* se descargaron de WormBase Parasite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) (Howe et al., 2016). Los marcadores de secuencia expresadas (ESTs) de *Neobenedenia melleni* se descargaron de NCBI y el transcriptoma de *Eudiplozoon nipponicum* de <https://github.com/jirivorel/Eudiplozoon-nipponicum-transcriptome-secretome>. Para la predicción de las proteínas ES se utilizaron diferentes programas bioinformáticos (Figura 3). Primero, las proteínas excretadas por la vía clásica se identificaron con SignalP 4.0 (Petersen et al., 2011), el cual predice la presencia de péptidos señal y su sitio de escisión en las proteínas. Las proteínas secretadas por la vía no clásica fueron predichas con SecretomeP 1.0 (Bendtsen et al., 2004) bajo parámetros automáticos para mamíferos, seleccionando sólo aquellas con puntaje NN mayor o igual a 0.9 (Garg y Ranganathan, 2011; Cuesta-Astro et al., 2017). Una vez obtenidas las proteínas con péptido señal, se usó TMHMM 2.0 para descartar proteínas con regiones transmembranales (Krogh et al., 2001). Las proteínas con al menos un dominio transmembranal se verificaron con el algoritmo Phobius, con el fin de distinguir tramos de residuos hidrofóbicos y topología transmembranal (Käll et al., 2004, 2007). Con el programa TargetP 1.1 se identificaron proteínas mitocondriales con una especificidad de 90% y usando las opciones automáticas para organismos que no forman parte del Reino Plantae (Emanuelsson et al., 2000). Estas proteínas mitocondriales fueron descartadas. Las proteínas restantes se analizaron con el programa PS-Scan 1.86 (de Castro et al., 2006), el cual detecta la secuencia señal en el retículo endoplásmico (código prosite: PS00014), mientras que PredGPI 1.1 (Pierleoni et al., 2008) se usó para excluir las señales de anclaje GPI o anclaje glicosilfosfatidilinositol en proteínas. El programa Cd-hit 4.8.1 (Li y Godzik, 2006; Fu et al., 2012) Los falsos positivos o proteínas redundantes con una identidad de secuencia global de 1 se removieron con el programa Cd-hit 4.8.1 (Li y Godzik, 2006; Fu et al., 2012) y así finalmente se obtuvieron las proteínas ES.

Para verificar los resultados predichos por el pipeline, se llevó a cabo un BLASTP entre el proteoma predicho de *F. hepatica* y *S. mansoni* y las proteínas detectadas por espectrometría de masas en los trabajos de Robinson y colaboradores (2009), Floudas y colaboradores (2017) y Knudsen y colaboradores (2005).

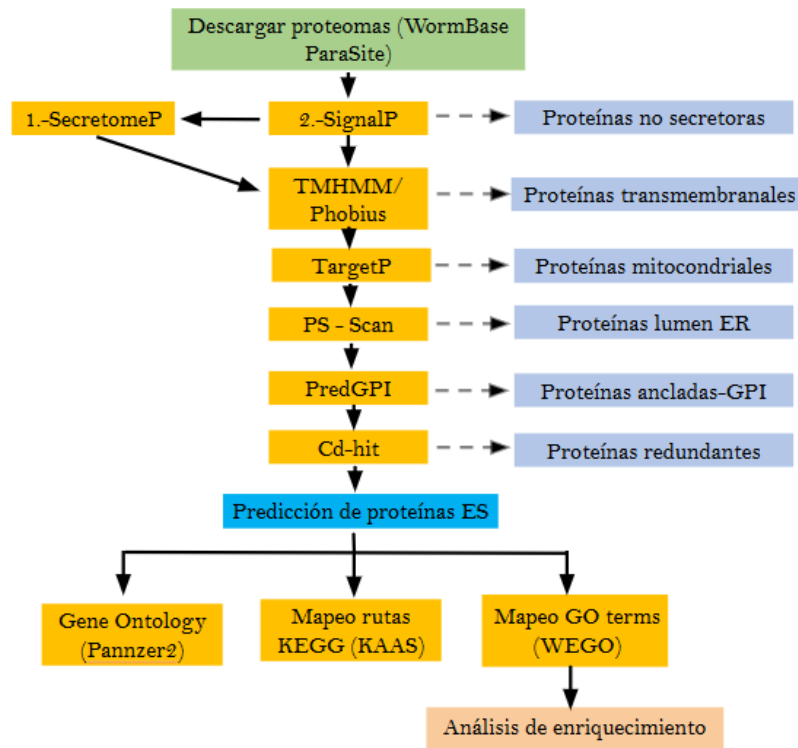


Figura 3. Programas bioinformáticos utilizados para la predicción de proteínas ES y para el análisis de anotación funcional.

4.2. Análisis de Grupos Ortólogos

Se realizó un análisis de ortología comparando los secretomas mediante el programa Orthovenn 2 (Xu et al., 2019), con un e-value de 0.00001 y un valor de inflación de 1.5. Este índice de inflación (con valores 1 a 4) equilibra la sensibilidad y la selectividad entre grupos de proteínas y mide cómo los miembros de un grupo son similares entre sí, por lo que entre mayor sea el índice, la agrupación será más ajustada (habrá un mayor número de clusters), pero se deben tener en cuenta el número

de secuencias de los análisis, para evitar que las secuencias con diferentes funciones queden juntas y a su vez se puedan separar los verdaderos ortólogos (Li et al., 2003). Orthovenn2 utiliza el método heurístico de OrthoMCL (Li et al., 2003) para la detección de homología entre proteínas de distintos organismos. Este método genera clusters de proteínas ortólogas o parálogas recientes entre al menos dos especies y se basa en el algoritmo Markov Cluster que sigue la teoría de probabilidad y flujo de gráficos y permite la clasificación simultánea de relaciones globales en un espacio de similitud (Li et al., 2003; van Dongen, 2000).

Se compararon los secretomas de las cuatro especies de monogéneos (*G. salaris*, *N. melleni*, *P. xenopodis* y *E. nipponicum*). Además, se comparó el secretoma del monogéneo *G. salaris* contra los secretomas de especies representantes de las otras dos clases de platelmintos parásitos (Trematoda: *S. mansoni* y Cestoda: *E. multilocularis*) y una especie de vida libre (*S. mediterranea*).

4.3. Anotación funcional de proteínas

La anotación funcional permite categorizar a un gran número de genes en clases funcionales para tener una mejor comprensión fisiológica de ellos y evaluar sus diferencias. La base de datos Ontología de Genes (Gene Ontology Consortium, 2004) organiza la información disponible de un gen en relación a su rol funcional, analiza una secuencia y le proporciona un término GO (del inglés Gene Ontology). Los términos GO se clasifican en 3 categorías: 1) Función Molecular (MF por sus siglas en inglés), describe actividades catalíticas o de unión, pero no hace referencia a entidades como moléculas, ni especifica cuándo o en qué lugar se lleva a cabo la acción; 2) Procesos Biológicos (BP) que refieren a objetivos biológicos logrados por uno o más conjuntos de funciones moleculares, tales como la apoptosis, que es una actividad de alto nivel que tiene subprocesos; y 3) Componente Celular (CC), describe ubicaciones de los niveles de estructuras de complejos macromoleculares, por ejemplo, membrana interna nuclear o matriz extracelular. La anotación funcional del conjunto de proteínas del secretoma se dividió en grupos de: platelmintos parásitos, vida libre y monogéneos. Estos se analizaron en el servidor en línea PANNZER2 (Törönen et al., 2018). Este programa funciona con tres servidores distintos: el servidor web frontend que contiene

la interfaz, SANSparallel (Somervuo y Holm, 2015) y DictServer. SANSparallel se utiliza para la búsqueda de homólogos en la base de datos de Uniprot, a este paso se le llama filtrado de secuencias, ya que sólo se aceptan secuencias con 40% de identidad y 60% de cobertura de alineación entre las secuencias de consulta y destino. Además de una longitud mínima de alineación de 100 aminoácidos. Las secuencias asociadas con anotaciones de GO se recopilan para cada resultado de búsqueda llamando al DictServer, que se encarga de administrar metadatos asociados. Todos los predictores GO implementados por PANNZER2 se basan en estadísticas de enriquecimiento de la vecindad de secuencias problema, en donde para este caso se utilizó la función de puntuación de Argot (Falda et al., 2012).

Después de este análisis, se descargó el archivo de salida “GO prediction details” y se graficaron los resultados (términos GO) con el programa en línea de WEGO 2.0 (Ye et al., 2018). El análisis de enriquecimiento de las proteínas se realizó por medio de la prueba Chi-cuadrada ($p\text{-value} < 0.05$) y se compararon las distribuciones de los términos del secretoma contra genoma de tres grupos: parásitos, vida libre y monogéneos.

4.4. Análisis de Rutas KEGG

El servidor en línea de KAAS (<https://www.genome.jp/kegg/kaas/>) fue utilizado para predecir las rutas metabólicas (Kanehisa et al., 2016) representativas del secretoma de los distintos platelmintos, esto con el fin de saber si las proteínas ES intervienen en alguna ruta que pueda ser importante en los parásitos. Se seleccionó como grupo de genes representativos a Eucariotas y el método bidireccional (BBH). Su predicción se agrupó en cuatro clases: Monogenea, Trematoda, Cestoda y Rhabditophora.

4.5. Identificación de Potenciales Blancos de Fármacos

Un buen blanco antiparasitario es aquel que tiene el potencial de identificar moléculas, las cuales

pueden ser administradas de manera eficiente y rentable para lograr una eliminación rápida y segura del parásito (Woods y Williams, 2007).

Para elegir potenciales proteínas blanco de fármacos se realizó un primer filtro, el cual consistió en comparar el secretoma predicho de *G. salaris* contra el proteoma de su pez hospedero, el salmón del Atlántico (*S. salar*), mediante BLASTP (e-value 0.00001) (Figura 4). Esto permitió descartar proteínas homólogas que pudieran generar problemas de toxicidad en el pez. El criterio del filtrado fue exigente y cualquier proteína compartida entre parásito y hospedero, sin importar su porcentaje de identidad, fue descartada. Posteriormente, los potenciales blancos de fármacos se identificaron al comparar las proteínas ES “exclusivas” de *G. salaris* con las bases de datos de Uniprot y Protein Data Bank (Berman et al., 2003) mediante BLASTP (e-value 0.00001), seleccionando sólo proteínas homólogas con porcentaje de identidad igual o mayor que 60%.

El siguiente paso fue descargar los genes RNAi de *C. elegans* de la lista `rnai_phenotypes_quick.WS276.wb` (<ftp://ftp.wormbase.org/pub/wormbase/releases/current-production-release/ONTOLOGY/>). El ARN de interferencia (ARNi) del nemátodo modelo *C. elegans*, al ser uno de los mejores estudiados, se utiliza en la validación de blancos farmacológicos y para el estudio de genes que desempeñan funciones importantes para la biología y desarrollo de los parásitos (Kumar et al., 2007; Woods y Williams, 2007; Doyle et al., 2010). La eliminación de un gen clave y su proteína relacionada, conduce a una falla en las funciones del parásito que puede dar lugar al descubrimiento de moléculas antiparasitarias (Woods y Williams, 2007).

En la página de Wormbase, se utilizó la herramienta Wormine (<http://intermine.wormbase.org/tools/wormmine/begin.do>) para extraer los genes RNAi clasificados como letales. En Wormine se creó una lista nueva y se cargó un archivo (.txt) con los códigos de los genes letales (separados por comas, e.g., `WBGene00019433`, `WBGene00007110`, `WBGene00019400`). Se descendieron los archivos (secuencias de ácidos nucleicos) en formato FASTA y se compararon las proteínas ES exclusivas de *G. salaris* con los RNAi letales de *C. elegans* mediante TBLASTN (e-value 0.00001), seleccionando sólo las proteínas con porcentaje de identidad mayor o igual que 60%, para al final obtener las secuencias de proteínas catalogadas como posibles blancos de fármacos.

Las secuencias de proteínas ES catalogadas como potenciales blancos de fármacos fueron mapeadas contra las bases de datos de Uniprot y Protein Data Bank (www.rcsb.org) (Berman et al., 2003), usando BLASTP con un e-value <0.00001 , para seleccionar las estructuras 3D a emplear en el docking. La selección de proteínas para el análisis de acoplamiento molecular se basó en su función y cercanía filogenética con *G. salaris*.

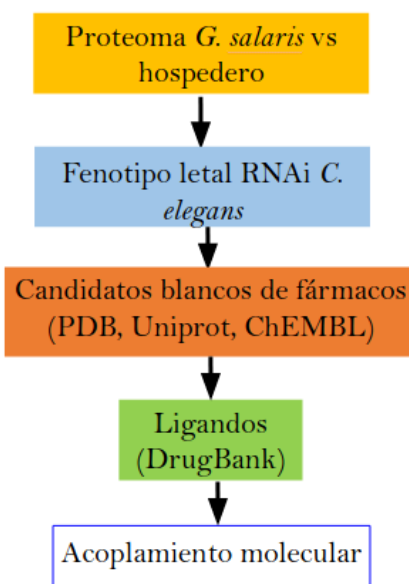


Figura 4. Pasos para la identificación de potenciales blancos de fármacos y sus ligandos.

4.6. Preparación del Receptor y el Ligando

Las estructuras 3D de las proteínas se descargaron en formato pdb (Tabla 1) y se procesaron con el programa UCSF Chimera 1.14 (www.cgl.ucsf.edu/chimera) (Pettersen et al., 2004) para la preparación de la proteína, que consta de la limpieza de moléculas de agua, ligandos y minimización de energía mediante descensos más pronunciados y técnicas de gradiente conjugado (Ali et al., 2020), se agregaron los hidrógenos polares y se hizo una minimización (campo de Fuerza Ámbar), que se realizó en forma cargada. Esto nos permitió convertir los archivos de proteínas de formato pdb a pdbqt para ser procesadas en el acoplamiento molecular.

Los ligandos catalogados como antihelmínticos se descargaron en formato mol2 de la base de datos ZINC y DrugBank (Sterling e Irwin, 2015; Wishart et al., 2017) (Tabla 2). Estos fueron procesados con el programa UCSF Chimera 1.14 (www.cgl.ucsf.edu/chimera) (Pettersen et al., 2004), en donde se removieron solventes, se agregaron hidrógenos y se asignaron cargas.

Tabla 1. Receptores seleccionados para el acoplamiento molecular.

Receptor (Código PDB)	% de identidad	Organismo al que pertenece
ProCatepsina L1 (2O6X)	45.25	<i>Fasciola hepatica</i>
Procatepsina L 3 digestiva (3QT4)	48.52	<i>Tenebrio molitor</i>
Catepsina L (5I4H)	66.3	<i>Homo sapiens</i>
Procatepsina L (1CS8)	50.33	<i>Homo sapiens</i>
Catepsina L mutante (6JD0)	50.33	<i>Homo sapiens</i>
Procatepsina S humana (2C0Y)	42.24	<i>Homo sapiens</i>
Mutante de catepsina K (5Z5O)	41.82	<i>Homo sapiens</i>
Inhibidor de catepsina L (3OF8)	56.33	<i>Homo sapiens</i>
Procatesina K (1BY8)	42.73	<i>Homo sapiens</i>

Tabla 2. Fármacos catalogados como antihelmínticos.

Antihelmíntico	Fuente
Albendazol	Zinc
Carbamazina	Zinc
Carbamazina (pH 7.4)	Zinc
Cythioate	Zinc
Emodepsida	Drug Bank
Fenbendazol	Zinc
Fenbendazol (pH 7.4)	Zinc
Flubendazol	Zinc
Levamisol	Zinc
Levamisol (pH 7.4)	Zinc
Mebendazol	Zinc
Oxamniquina	Zinc
Oxana	Zinc
Pirantel	Zinc

Piperazina	Zinc
Pirvinio	Zinc
Praziquantel	Zinc
Quinacrina	Zinc
Quinacrina (pH 8.4)	Zinc
Triclabendazol	Zinc
Triclabendazol (pH 7.4)	Zinc
Violeta de Genciana	Drug Bank

4.7. Acoplamiento Molecular (Docking)

El acoplamiento molecular se llevó a cabo con el programa AutoDock Vina 1.1.2 (Trott y Olson, 2009). Una vez preparados los receptores y ligandos en formato pdbqt se diseñó una caja grid o rejilla de caja en UCSF Chimera 1.14 (Pettersen et al., 2004), la cual consta de tres medidas (para los ejes X, Y y Z) y que usualmente abarca el sitio activo de la proteína, ya que es el área en el que usualmente se lleva a cabo la interacción del ligando con la proteína (Roy et al., 2015). Sin embargo, en este caso, se decidió hacer un acoplamiento “ciego”, es decir, se seleccionó toda la proteína para detectar el sitio de interacción. El acoplamiento se realizó con receptores rígidos y ligandos flexibles. Posteriormente se descargó del manual de AutoDock Vina (<http://vina.scripps.edu/manual.html>) el script que nos permitió hacer el acoplamiento molecular con varios ligandos (http://vina.scripps.edu/vina_screen_local.sh) y se generó un archivo de configuración que incluye las coordenadas X, Y, Z, el nombre del receptor, el rango de energía (igual a tres para todos los acoplamientos), la exhaustividad (igual a 1000) y el número de modos de unión (igual a nueve). La afinidad entre receptor y ligando se representó en valores de energía de unión (unidades Kcal / Mol) y se eligió la mejor, que resulta ser la que tiene la energía de unión más baja.

4.8. Análisis Filogenético de Receptores

Para conocer la cercanía evolutiva entre los receptores del acoplamiento molecular (Tabla 1) y el blanco farmacológico seleccionado en *G. salaris*, se realizó un análisis filogenético. Para esto, las secuencias fueron alineadas con el programa MUSCLE 3.8.31 (Edgar, 2004) usando parámetros preestablecidos y recortadas con TrimAL 1.2 (Capella-Gutiérrez et al., 2009). Posteriormente, la selección del mejor modelo evolutivo, usando el Criterio de Información Akaike Corregido (AICc), y la construcción del árbol filogenético se llevaron a cabo en MEGA X 10.1.8 (Kumar et al., 2018), usando el método de máxima verosimilitud.

5. RESULTADOS

5.1. Predicción de Secretomas

El presente estudio incluyó cuatro especies de monogéneos además de otras cinco especies de platelmintos con fines comparativos. Los programas que integran el pipeline establecido para la predicción de proteínas ES descartaron diferente número de proteínas en el proceso (Tabla 3). De un total de 215,025 proteínas, los programas SignalP y SecretomeP predijeron 23,017 como secretadas por las vías clásica y no clásica, mientras que TMHMM y phobius descartaron 4,899 proteínas transmembranales. TargetP identificó 99 proteínas mitocondriales y Ps-Scan 159 proteínas del retículo endoplasmático, dejando un total de 17,860 proteínas. Estas proteínas fueron procesadas por PredGPI que identificó 659 proteínas con anclaje glifosilfosfatidilinositol. Un total de 17,201 pasaron por un último programa, cd-hit, para descartar proteínas redundantes y se obtuvieron 14,459 proteínas ES, de las cuales, 11,040 pertenecieron a platelmintos parásitos (8,297 de clase Monogenea, 2,071 de clase Trematoda y 672 de clase Cestoda) y 3,429 a platelmintos de vida libre (clase Rhabditophora).

Los proteomas predichos en las cuatro especies de monogéneos presentaron secretomas de distintos tamaños (Tabla 3). Cabe señalar que sólo para *E. nipponicum*, *P. xenopodis* y *G. salaris* se tuvieron proteomas predichos completos, mientras que para *N. melleni* se analizó sólo un grupo de secuencias EST. En relación al tamaño de su proteoma, los secretomas de *E. nipponicum* y *G. salaris* fueron más pequeños (6.3% y 6.5% del proteoma, respectivamente), que *P. xenopodis* (11.4%). En las secuencias EST de *N. melleni* se encontraron 567 proteínas ES. En el caso de los tremátodos *S. mansoni* y *F. hepatica* y el céstodo *E. multilocularis* el tamaño de su secretoma fue, respectivamente, 5.08%, 8.47% y 6.29% con respecto al proteoma. En el caso de los platelmintos de vida libre *M. lignano* y *S. mediterranea* sus secretomas representaron 4.3% del proteoma.

Tabla 3. Proteínas del secretoma en las distintas especies de platelmintos.

Especie	Proteínas secretadas (SignalP y SecretomeP)	Proteínas transmembranales (tmhmm y phobius)	Proteínas mitocondriales y del retículo endoplásmico (TargetP, Ps-scan)	Proteínas con anclaje GPI (PredGPI)	Proteínas redundantes (cd-hit)	Proteínas del secretoma/ Proteínas totales
<i>Gyrodactylus salaris</i>	1395	277	1, 11	11	79	1016/15436 – 6.5%
<i>Neobenedenia melleni</i>	789	87	0,0	22	113	567/4851 – 11.6%
<i>Eudiplozoon nipponicum</i>	3340	591	6 , 10	55	307	2371/37062 – 6.39%
<i>Protopolystoma xenopodis</i>	4839	372	42, 2	56	24	4343/37906- 11.4%
<i>Fasciola hepatica</i>	1619	229	12, 3	30	11	1334/15739 - 8.47%
<i>Schistosoma mansoni</i>	1325	404	1, 6	16	161	737/14499 - 5.08%
<i>Echinococcus multilocularis</i>	1173	384	2, 9	62	44	672/10669 – 6.29%
<i>Macrostomum lignano</i>	6724	2186	34, 115	392	1863	2134/49013 – 4.35%
<i>Schmidtea mediterranea</i>	1823	369	1, 3	15	140	1295/29850 – 4.33%

En la comparación que hicimos entre proteínas obtenidas por espectrometría de masas para *F. hepatica* y las proteínas ES predichas, se registró que 15 proteínas predichas coincidieron con 51 proteínas del estudio experimental (Tabla 4) (Robinson et al., 2009), que en su mayoría fueron catepsinas. En el caso de *S. mansoni*, 9 proteínas ES predichas coincidieron con 13 del estudio experimental (Floudas et al., 2017; Knudsen et al., 2005) (Tabla 5 y 6).

Tabla 4. Proteínas ES predichas encontradas en el análisis de espectrometría de masas de proteínas ES de *F. hepatica* del estudio hecho por Robinson et al. (2009).

Código Uniprot	Proteína	Proteína ES predicha	% identidad	e-value
Larvas enquistadas				
A7UNB2	<i>F. hepatica</i> cathepsin B	D915_14770	99	0
		D915_10733	71	8e-124
		D915_15401	65	2e-54
Q8I7B2	<i>F. hepatica</i> procathepsin B2 precursor	D915_10733	99	6e-171
		D915_14770	69	6e-172
A5X494	<i>F. hepatica</i> cathepsin B3	D915_14770	98	0
		D915_10733	70	1e-111
		D915_12220	63	1e-137
A8W7J0	<i>F. hepatica</i> procathepsin L	D915_14227	75	2e-180
		D915_08575	69	5e-163
Q9GRW6	<i>F. hepatica</i> procathepsin L3	D915_14227	74	9e-178
		D915_08575	68	3e-161
Q711M2	<i>F. hepatica</i> legumain-like precursor	D915_13585	74	4e-39
Q71TT8	<i>S. japonicum</i> actin	-		
Q27655	<i>F. hepatica</i> enolase	-		
Q5DF69	<i>S. japonicum</i> SJCHGC06318 protein	-		
B0LT92	<i>F. gigantica</i> thioredoxin peroxidase	D915_05992	86	7e-164
Q2YHG1	<i>C. sinensis</i> myosin regulatory light chain	-		
Q86ET3	<i>S. japonicum</i> Clone ZZD1444 mRNA sequence	-		
Juveniles recién eclosionados				
Q27655	<i>F. hepatica</i> enolase	-		
P80527	<i>F. hepatica</i> Hemoglobinase-like protein 1	D915_10788	80	9e-08
P91883	<i>F. hepatica</i> thioredoxin peroxidase	D915_05992	82	2e-138
Q7M4G1	<i>F. hepatica</i> fatty acid-binding protein type-2			
Q9U1G6	<i>F. hepatica</i> fatty acid-binding protein type-3			
Q7M4G0	<i>F. hepatica</i> fatty acid-binding protein Fh15	-		
Q9GRW4	<i>F. hepatica</i> partial procathepsin L3 (pFH64)	D915_14227	73	5e-173
		D915_08575	69	1e-159
Q9GRW6	<i>F. hepatica</i> partial procathepsin	D915_14227	74	9e-178

Q95VA7	L3 (pFH22) <i>F. gigantica</i> cathepsin L	D915_08575 D915_14227	68 74	3e-161 0
B3TM67	<i>F. hepatica</i> cathepsin L3 (CL3-uy5)	D915_08575 D915_14227	68 73	3e-170 7e-175
B3TM68	<i>F. hepatica</i> cathepsin L3 (CL3-uy9)	D915_08575 D915_14227	69 74	2e-163 1e-175
A8W638	<i>F. hepatica</i> metacercariae cathepsin L	D915_08575 D915_14227	69 76	6e-159 0
A8W7J0	<i>F. hepatica</i> metacercariae procathepsin L	D915_08575 D915_14227	68 75	3e-169 2e-180
		D915_08575	69	5e-163
Parásito Inmaduro				
Q27655	<i>F. hepatica</i> enolase	-		
Q5FX78	<i>F. gigantica</i> 14-3-3 protein	-		
A7UNB2	<i>F. hepatica</i> cathepsin B	D915_14770	99	0
		D915_10733	71	8e-124
		D915_15401	65	2e-54
Q8I7B2	<i>F. hepatica</i> pro-cathepsin B2 precursor	D915_10733	99	6e-171
		D915_14770	69	6e-172
Q711M2	<i>F. gigantica</i> legumain-like precursor	D915_13585	74	4e-39
A6Y9U8	<i>F. gigantica</i> legumain-1	D915_14251	97	0
		D915_15009	78	4e-73
A6Y9U9	<i>F. gigantica</i> legumain-2	D915_14251	56	4e-107
Q06A71	<i>F. hepatica</i> GST sigma class	-		
P56598	<i>F. hepatica</i> GST mu class 26 kDa isozyme 1 (GST1)	-		
P31671	<i>F. hepatica</i> GST mu class 26 kDa isozyme 7 (GST7)	-		
P31670	<i>F. hepatica</i> GST mu class 26 kDa isozyme 47 (GST47)	-		
P30112	<i>F. hepatica</i> GST mu class 26 kDa isozyme 51 (GST51)	-		
B0LT92	<i>F. gigantica</i> thioredoxin peroxidase	D915_05992	86	7e-164
O76945	<i>F. hepatica</i> protein disulphide isomerase	D915_10097	99	0
Q8T5Z9	<i>F. hepatica</i> cathepsin L	D915_08575	78	0
		D915_15922	70	0
		D915_14227	74	2e-175
Q7JNQ9	<i>F. hepatica</i> secreted cathepsin L1	D915_08575	79	0
		D915_15922	69	0
		D915_14227	74	0
Q6R018	<i>F. hepatica</i> cathepsin L protein	D915_08575	78	0
		D915_15922	69	0
		D915_14227	73	0
Q24940	<i>F. hepatica</i> cathepsin L-like proteinase	D915_08575	78	0
		D915_15922	69	0
		D915_14227	74	0
Q9GRW5	<i>F. hepatica</i> cathepsin L1	D915_08575	78	0
		D915_15922	70	0
		D915_14227	73	9e-173
Q7JNQ8	<i>F. hepatica</i> secreted cathepsin L2	D915_08575	76	0
		D915_15922	66	3e-179
		D915_14227	71	1e-172
A5Z1V3	<i>F. hepatica</i> secreted cathepsin L2	D915_08575	77	0
		D915_15922	67	0
		D915_14227	71	1e-173

A5X483	<i>F. hepatica</i> cathepsin L2	D915_08575	75	8e-119
		D915_15922	63	5e-111
		D915_14227	71	3e-110
A3FMG6	<i>F. hepatica</i> cathepsin L	D915_08575	76	0
		D915_15922	66	7e-177
		D915_14227	70	2e-168
Q95VA7	<i>F. gigantica</i> cathepsin L	D915_14227	74	0
		D915_08575	68	3e-170
A8W638	<i>F. hepatica</i> cathepsin L	D915_14227	76	0
		D915_08575	68	3e-169
Q9NGW3	<i>F. hepatica</i> cathepsin L	D915_08575	78	0
		D915_15922	71	0
		D915_14227	72	0
Q9NB30	<i>F. hepatica</i> cathepsin L	D915_08575	79	0
		D915_15922	70	0
		D915_14227	72	1e-180
Q711N7	<i>F. hepatica</i> putative cys1 protein	-		
Q9UAS2	<i>F. gigantica</i> fatty acid-binding protein 1	-		
Q7M4G1	<i>F. hepatica</i> fatty acid-binding protein type-2			
Q9U1G6	<i>F. hepatica</i> fatty acid-binding protein type-3			
Q7M4G0	<i>F. hepatica</i> fatty acid-binding protein Fh15	-		
Q2HPD3	<i>F. hepatica</i> cathepsin L1 proteinase	D915_08575	77	0
		D915_15922	69	0
		D915_14227	73	2e-179
Q4KSL8	<i>F. gigantica</i> saposin-1	D915_14814	57	1e-28
Secretoma de adulto				
Q7JNQ9	<i>F. hepatica</i> secreted cathepsin L1	D915_08575	79	0
		D915_15922	69	0
		D915_14227	74	0
A5Z1V3	<i>F. hepatica</i> secreted cathepsin L2	D915_08575	77	0
		D915_15922	67	0
		D915_14227	71	1e-173
Q9NB30	<i>F. hepatica</i> cathepsin L	D915_08575	79	0
		D915_15922	70	0
		D915_14227	72	1e-180
Q8T5Z9	<i>F. hepatica</i> cathepsin L	D915_08575	78	0
		D915_15922	70	0
		D915_14227	74	2e-175
Q9GRW5	<i>F. hepatica</i> cathepsin L1	D915_08575	78	0
		D915_15922	70	0
		D915_14227	73	9e-173
Q6R018	<i>F. hepatica</i> cathepsin L protein	D915_08575	78	0
		D915_15922	69	0
		D915_14227	73	0
Q24940	<i>F. hepatica</i> cathepsin L-like proteinase precursor	D915_08575	78	0
		D915_15922	69	0
		D915_14227	74	0
A5X483	<i>F. hepatica</i> cathepsin L2	D915_08575	75	8e-119
		D915_15922	63	5e-111
		D915_14227	71	3e-110
Q24945	<i>F. hepatica</i> cathepsin L-like protease	D915_08575	78	9e-97
		D915_15922	69	2e-84
		D915_14227	69	2e-81

Q9NGW3	<i>F. hepatica</i> cathepsin L	D915_08575	78	0
		D915_15922	71	0
		D915_14227	72	0
A5X484	<i>F. hepatica</i> cathepsin L1	D915_08575	75	2e-120
		D915_15922	65	4e-115
		D915_14227	67	5e-105
A8I598	<i>F. hepatica</i> cathepsin L	D915_08575	74	9e-142
		D915_15922	61	2e-129
		D915_14227	68	5e-127
		D915_08406	56	1e-85
B0LT92	<i>F. gigantica</i> thioredoxin peroxidase	D915_05992	86	7e-164
Q9U1G7	<i>F. hepatica</i> thioredoxin	-		
Q9UAS2	<i>F. gigantica</i> fatty acid-binding protein 1	-		
Q7M4G1	<i>F. hepatica</i> fatty acid-binding protein type-2			
Q9U1G6	<i>F. hepatica</i> fatty acid-binding protein type-3			
Q7M4G0	<i>F. hepatica</i> fatty acid-binding protein Fh15	-		

Tabla 5. Proteínas ES predichas encontradas en el análisis de espectrometría de masas de proteínas ES de *S. mansoni* del estudio hecho por Knudsen et al. (2005).

Código Uniprot	Proteína	Proteína ES predicha	% identidad	e-value
Q27877	Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase) <i>a</i> (Sm)	-		
P53442	Fructose-bisphosphate aldolase <i>a</i> (Sm)	-		
AAC46966	Actin 2 <i>a</i> (Sm)	-		
P09792	Glutathione <i>S</i> -transferase, <i>a</i> 28 kDa (GST 28) (Sm)	-		
P48501	Triose-phosphate isomerase <i>a</i> (TIM) (Sm)	-		
AAB21173	GST (Sm, 218 aa)	-		
Q26540	14-3-3 protein homolog 1 <i>a</i> (Sm)	-		
A45630	Vaccine-dominant antigen Sm21.7 <i>a</i> (Sm)	-		
AAL79841	Thioredoxin <i>a</i> (Sm)	-		
P20287	GAPDH (major larval surface antigen) <i>a</i> (P-37) (Sm)	-		
AAC79131	Tegumental protein Sm20.8 <i>a</i> (Sm)	-		
AAM43941	Elastase 2 <i>a</i> (Sm)	S330290.1	99	0
P16641	ATP:guanidino kinase SMC74 <i>a</i> (Sm)	-		
A28942	Pancreatic elastase precursor (elastase 1 <i>a</i>) (Sm)	S330290.1	82	2e-159
AAB00448	Developmentally regulated albumin gland gene (Bg)	-		
AAD17299	Thioredoxin peroxidase 2 <i>a</i> (Sm)	-		
AAC46967	Elastase (elastase 1 <i>b</i>) (Sm)	S330290.1	80	2e-158
AAL15461	Fatty acid-binding protein Sm14 <i>a</i> (Sm)	-		
AAD24794	Phosphoenolpyruvate carboxykinase <i>a</i> (Sm)	-		
A39343	Calpain (EC 3.4.22.17) large chain <i>a</i> (Sm)	-		
Q26565	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase <i>a</i> (PPIase) (Sm)	S040790.1	57	1e-56
P41759	Phosphoglycerate kinase <i>a</i> (Sm)	-		
TC7546	Homolog to phosphoglycerate mutase <i>a</i> (Sm)	-		
TC16735	Weakly similar to lactate dehydrogenase <i>a</i> (Sm)	-		

TC17066	Similar to malate dehydrogenase, <i>a</i> cytosolic (Sm)	-		
TC14578	Similar to histone H4 (Sm)	-		
Q94748	Probable dynein light chain (SM10) (Sm)	-		
TC16844	Similar to malate dehydrogenase, <i>a</i> mito (Sm)	-		
AAF26741	Chlorophyll a/b-binding protein (Ee)	-		
AAB41442	Putative cytosol aminopeptidasea (Sm)	-		
AAB86571	Unknown (serpin) (Sm)	-		
P25319	Ferritin-2 heavy chain (Sm)	-		
TC16812	Homolog to calmodulin (Sm)	-		
TC7454	Similar to pyruvate kinasea (Sm)	-		
AAD26122	SPO-1 proteina (anti-inflammatory protein 6) (Sm)	S341790.1	100	5e-85
	70,000 molecular weight antigen/hsp70	S337250.1	54	5e-23
CAA28976	homologa (Sm)	-		
Q26551	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor (Sm)	S040790.1	99	6e-158
	Similar to muscle glycogen phosphorylasea (Sm)	-		
TC13591	Calcium-binding protein (Sm)	-		
AAA29921	Heat shock protein 86a (Sm)	-		
A45529	Homolog to tubulin β -2 chaina (Sm)	-		
TC7336	Similar to carbonyl reductasea (Sm)	-		
AAC46898	Homolog to H2B histone (Sm)	-		
TC13606	Similar to histone H3 (Sm)	-		
TC13658	Cysteine protease inhibitor (Sm)	-		
AAQ16180	ATP-diphosphohydrolase 1a (Sm)	-		
AAP94734	Similar to ATP synthase β -chain mitoa (Sm)	-		
TC13604	Calponin homolog (Sm)	-		
AAB47536	Elongation factor 1- <i>aa</i> (Sm)	-		
CAA69721	Actin-binding/filamin-like proteina (Sm)	-		
AAR26703	Cu,Zn-superoxide dismutase (Sm)	S095980.1	45	5e-32
AAC14467	Fimbrina (Sm)	-		
AAA2988	Heat shock protein HSP60a (Sm)	-		
AAM69406	6-Phosphofructokinasea (Sm)	-		
Q27778	Similar to nucleoside-diphosphate kinasea (Sm)	-		
TC11413		-		

Tabla 6. Proteínas ES predichas encontradas en el análisis de espectrometría de masas de proteínas ES de *S. mansoni* del estudio hecho por Floudas et al. (2017).

Código Uniprot	Proteína	Proteína ES predicha	% identidad	e-value
Smp_000100	Filamin	-		
Smp_000660	Ornithine--oxo-acid transaminase	-		
Smp_001360	Thymidylate kinase	-		
Smp_003230	Sh3 domain grb2-like protein B1 (endophilin B1)	-		
Smp_003990	Triosephosphate isomerase, putative	-		
Smp_004350	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 1, putative	-		
Smp_004470.1	Peroxiredoxin, Prx3	-		
Smp_004780.1	Immunophilin, putative	-		
Smp_005350	Calcium-binding protein, putative	-		
Smp_006390	Cystatin B, putative	-		

Smp_007270.1	Alpha-actinin, putative	-		
Smp_008070	Thioredoxin, Trx1	-		
Smp_008110	WD40-repeat containing protein	-		
Smp_008660.1	Gelsolin, putative	-		
Smp_009760	14-3-3 protein, putative	-		
Smp_009780.2	14-3-3 protein, putative	-		
Smp_011830	Hypothetical protein / C4Q068 (101)	S011830.1	100	7e-164
Smp_014010	Adenylyl cyclase-associated protein, putative	-		
Smp_017730	200-kDa GPI-anchored surface glycoprotein	-		
Smp_018240.3	Cell division control protein 48 aaa family protein, putative	-		
Smp_018890	Phosphoglycerate kinase	-		
Smp_019050.2	Hypothetical protein / C4Q286	-		
Smp_019640.1	Calcyphosine/tpp, putative	-		
Smp_020920.1	DNAj homolog subfamily B member 4, putative	-		
Smp_021800	Prefoldin subunit 3-related	-		
Smp_022340	Pdz and lim domain protein, putative	-		
Smp_024110	Phosphopyruvate hydratase	-		
Smp_028670.1	Carbonic anhydrase II (carbonate dehydratase II), putative	-		
Smp_030000	Leucine aminopeptidase (M17 family)	-		
Smp_030370	Calreticulin autoantigen homolog precursor, putative	-		
Smp_030730	Tubulin beta chain, putative	-		
Smp_031770.4	Tropomyosin, putative	-		
Smp_032580.2	Subfamily T1A non-peptidase homologue (T01 family)	-		
Smp_032950	Calmodulin (CaM), putative	-		
Smp_033540	Carbonyl reductase, putative	-		
Smp_034490	Proteasome catalytic subunit 1 (T01 family)	-		
Smp_034840.2	14-3-3 epsilon	-		
Smp_035270.2	Malate dehydrogenase, putative	-		
Smp_038950	L-lactate dehydrogenase, putative	-		
Smp_040130	Cyclophilin (79)	S040790.1	57	1e-56
Smp_040790	Cyclophilin B, putative (80)	S040790.1	100	1e-159
Smp_042160.2	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase, putative	-		
Smp_042400	Hypothetical protein / C4Q8L5	S042400.1	100	8e-138
Smp_043030	Hexokinase	-		
Smp_043120	Universal stress protein, putative	-		
Smp_044010.2	Tropomyosin, putative	-		
Smp_046600	Actin-1, putative	-		
Smp_046690	Ubiquitin (ribosomal protein L40), putative	-		
Smp_047370	Malate dehydrogenase, putative	-		
Smp_047650	Ferritin, putative	-		
Smp_049250	Heat shock protein, putative	-		
Smp_049270	Heat shock protein, putative	-		
Smp_049550	Heat shock protein 70 (hsp70), putative	-		
Smp_050390	Aldehyde dehydrogenase, putative	-		
Smp_053220.1	Aldo-keto reductase, putative	-		

Smp_054160	Glutathione S-transferase 28 kDa (GST 28) (GST class-mu), putative	-		
Smp_054240	Translationally-controlled tumor protein homolog (TCTP) (Histamine-releasing factor), putative	-		
Smp_056440	Superoxide dismutase [mn], putative	-		
Smp_056760	Protein disulfide-isomerase, putative	-		
Smp_056970.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)	-		
Smp_059480	Peroxiredoxin, Prx1	-		
Smp_059660	Hypothetical protein / C4QDG6	-		
Smp_059980	Arginase, putative	-		
Smp_063120.1	Inosine triphosphate pyrophosphatase (itpase) (inosine triphosphatase), putative	-		
Smp_063530.1	Apoferitin-2	S063530.1	96	3e-140
Smp_064380	Aspartate aminotransferase, putative	-		
Smp_064860	Heat shock protein 70 (hsp70)-interacting protein, putative	-		
Smp_066760.2	Merlin/moesin/ezrin/radixin, putative	-		
Smp_067890	Proteasome subunit alpha 2 (T01 family)	-		
Smp_072900.1	Hsp90 co-chaperone (tebp), putative	-		
Smp_078690	Calponin homolog, putative	-		
Smp_079010	Camp-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit, putative	-		
Smp_079770.1	Protein disulfide-isomerase ER-60 precursor (ERP60), putative	S079770.1	100	0.662
Smp_081430	Short chain dehydrogenase, putative	-		
Smp_082030	Family C56 non-peptidase homologue (C56 family)	-		
Smp_083870	PwLAP aminopeptidase (M17 family)	-		
Smp_086330.2	Calponin-related	-		
Smp_086480	Antigen Sm21.7, putative	-		
Smp_086530	Tegumental protein Sm 20.8, putative	-		
Smp_090080	Serpin, putative	-		
Smp_090120.1	Alpha tubulin, putative	-		
Smp_091010	Glyoxalase II (Hydroxyacylglutathione hydrolase), putative	-		
Smp_092280	Proteasome subunit alpha 3 (T01 family)	-		
Smp_092750	Nucleoside diphosphate kinase	-		
Smp_095360.1	Fatty acid binding protein	-		
Smp_096760	Phosphoglycerate mutase	-		
Smp_102070	GST class-mu, SM26/2 antigen, glutathione S-transferase 26 kDa	-		
Smp_103320	Nuclear movement protein nudc, putative	-		
Smp_105020	Titin, putative	-		
Smp_106930.2	Heat shock protein 70, putative	-		
Smp_123440.1	Fad oxidoreductase, putative	-		
Smp_130110	Proteasome subunit alpha 6 (T01 family)	-		
Smp_132670.1	Myosin regulatory light chain, putative	-		
Smp_135950	Lethal giant larvae homolog 2, cell polarity protein , inorganic pyrophosphatase, putative	-		
Smp_136240.6	Vesicle-associated membrane protein (vamp), putative	-		
Smp_140900.2	Hypothetical protein / C4Q6S1	-		

Smp_143470.2	Spectrin beta chain, brain 3 (Spectrin, non- erythroid beta chain 3) (Beta-IV spectrin), putative	-
Smp_146950	Hypothetical protein / C4Q9Q0	-
Smp_147470	Leucine-rich transmembrane proteins, putative	-
Smp_150820	Acyl-CoA thioesterase-related	-
Smp_151690	Translation initiation inhibitor, putative	-
Smp_152710.2	Glutathione-s-transferase omega, putative	-
Smp_155060.2	Set, putative	-
Smp_157500	Calpain (C02 family)	-
Smp_158110.2	Peroxiredoxin, Prx2	-
Smp_161920	Actin, putative	-
Smp_163720	Endophilin B1, putative	-
Smp_176200.2	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	-
Smp_179810	Troponin t, invertebrate, putative	-
Smp_187370	Phosphoglycerate kinase	-
Smp_194770	ATP:guanidino kinase (Smc74), putative	-

5.2. Anotación Funcional de Secretoma

Para los platelmintos parásitos, de las 14,469 proteínas ES, 3,416 (23.6%) se anotaron con 6,269 términos GO. En los cuatro grupos de platelmintos, los términos GO más representados fueron unión y actividad catalítica dentro de la categoría Función Molecular, proceso metabólico y proceso celular dentro de la categoría de Procesos Biológicos, y membrana, parte de la membrana, célula y parte de la célula en la categoría Componente Celular (Figura 5-8). Haciendo el análisis por separado para cada una de las cuatro especies de monogéneos se observó que la distribución de los términos GO fue similar entre las especies y no se encontraron diferencias puntuales respecto a las otras clases de platelmintos (Figuras 9-12).

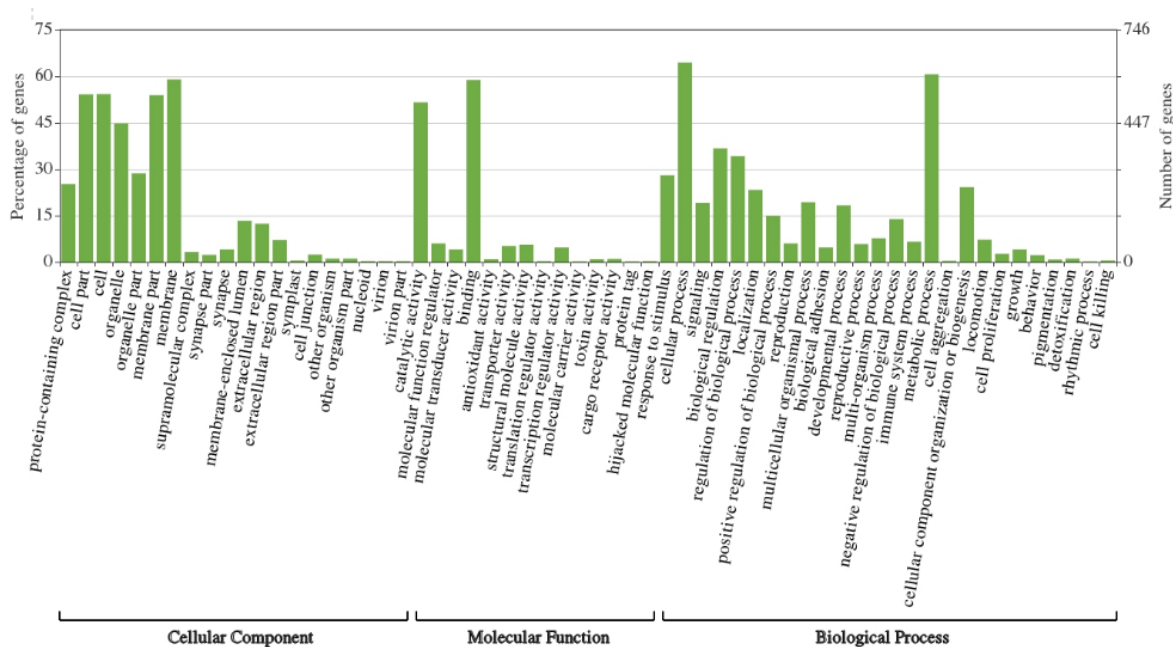


Figura 5. Asignación de términos GO al secretoma de platelmintos de la clase Monogenea.

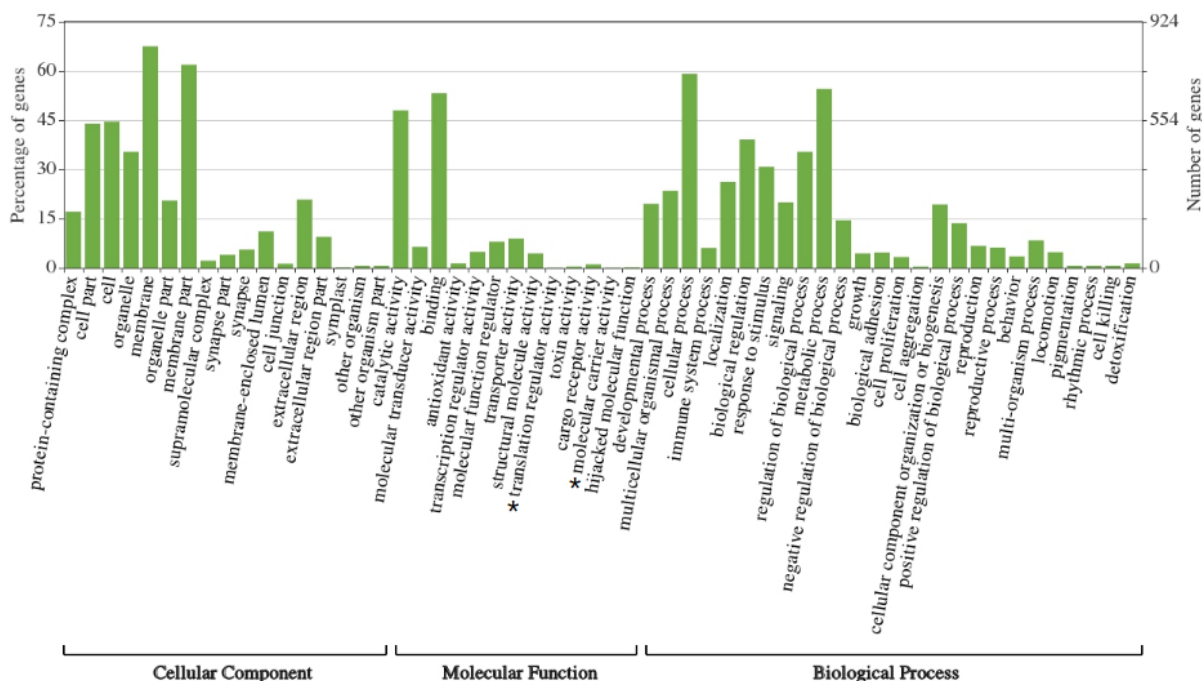


Figura 6. Asignación de términos GO al secretoma de platelmintos de la clase Trematoda.

*Términos GO con un porcentaje de genes de 0.1%.

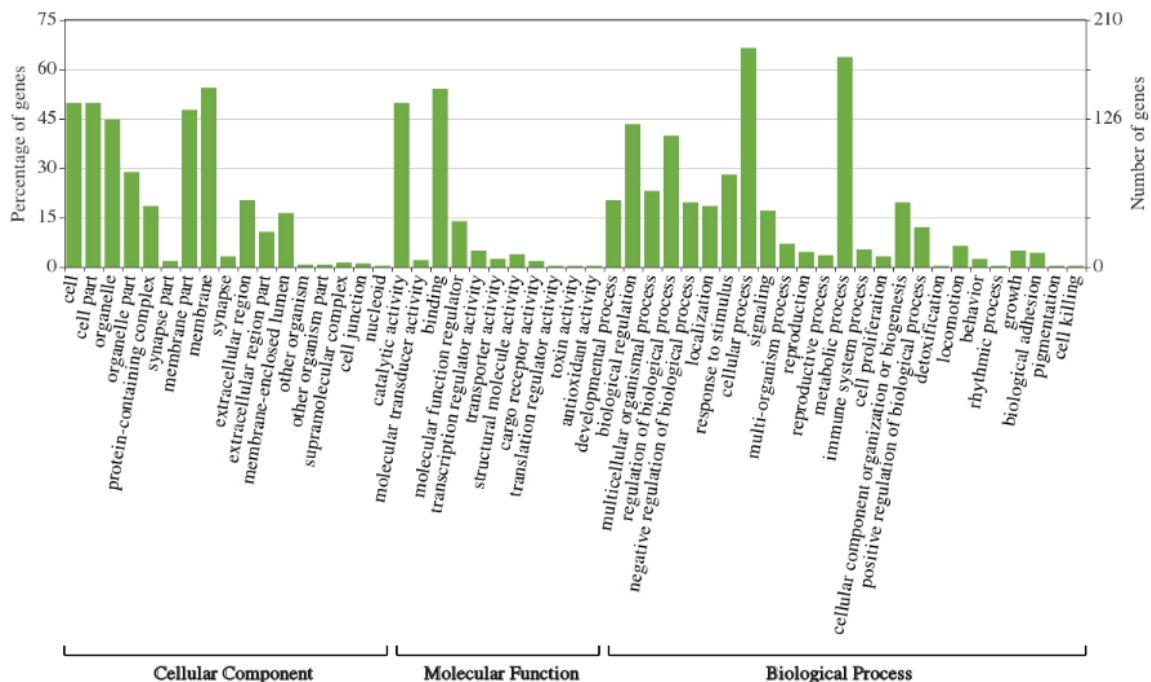


Figura 7. Asignación de términos GO al secretoma de platelmintos de la clase Cestoda.

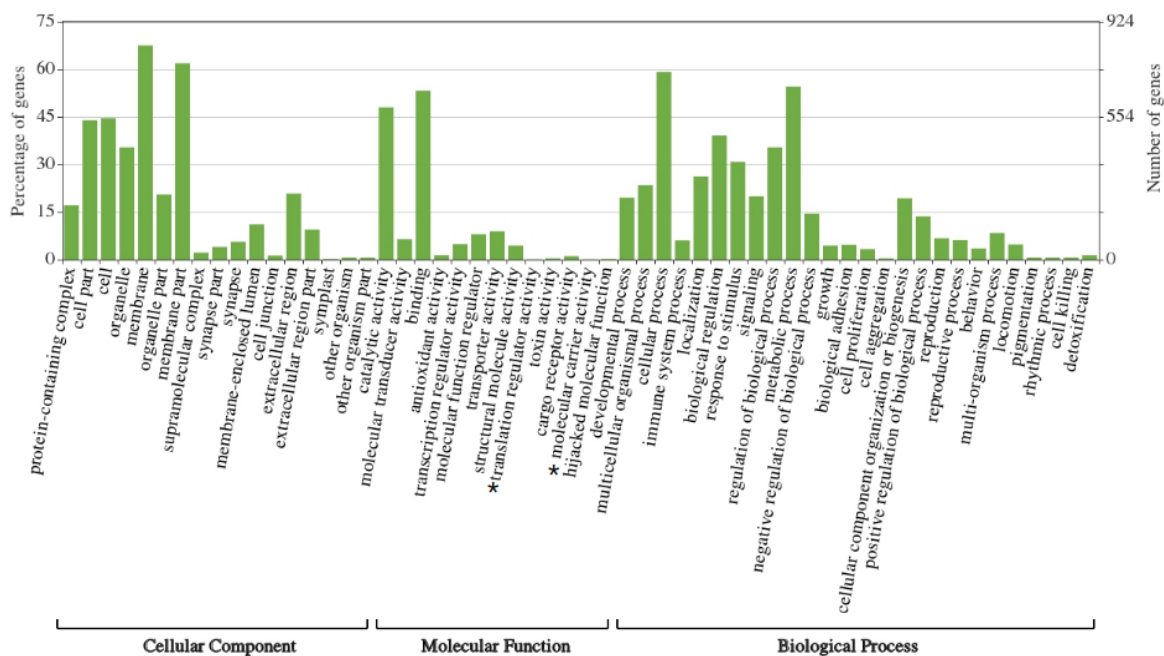


Figura 8. Asignación de términos GO al secretoma de platelmintos de la clase Rhabditophora.

*Términos GO con un porcentaje de genes de 0.1%

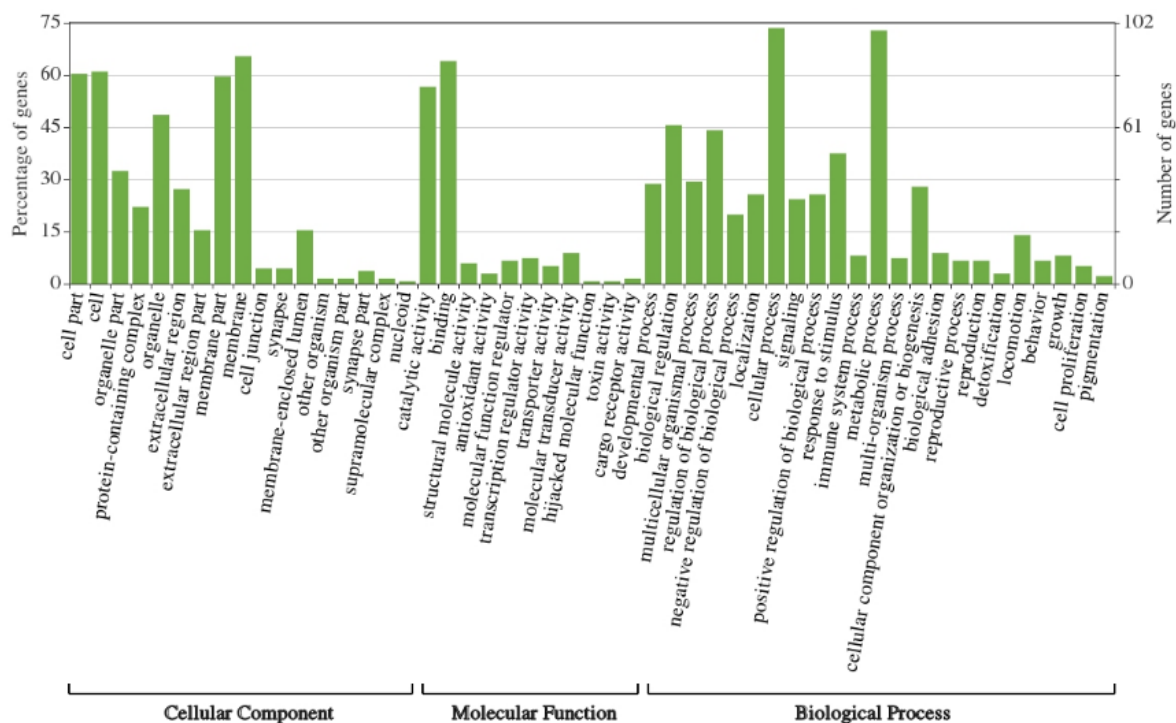


Figura 9. Asignación de términos GO al secretoma del monogéneo *G. salaris*.

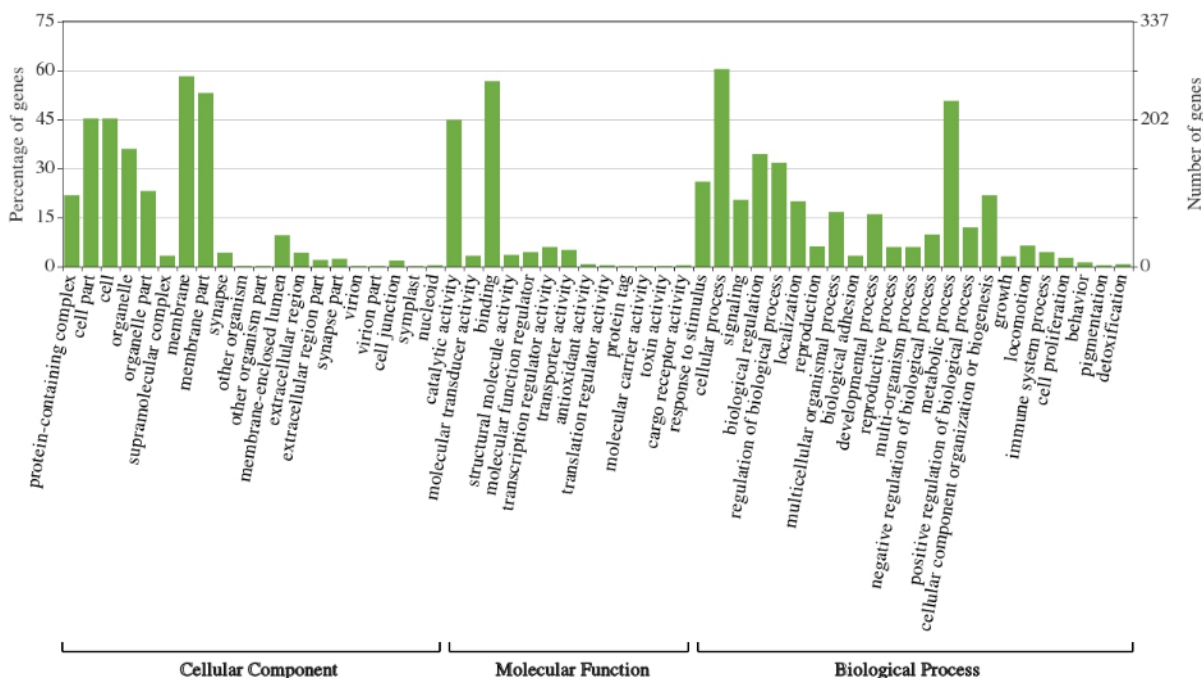


Figura 10. Asignación de términos GO al secretoma del monogéneo *P. xenopodis*.

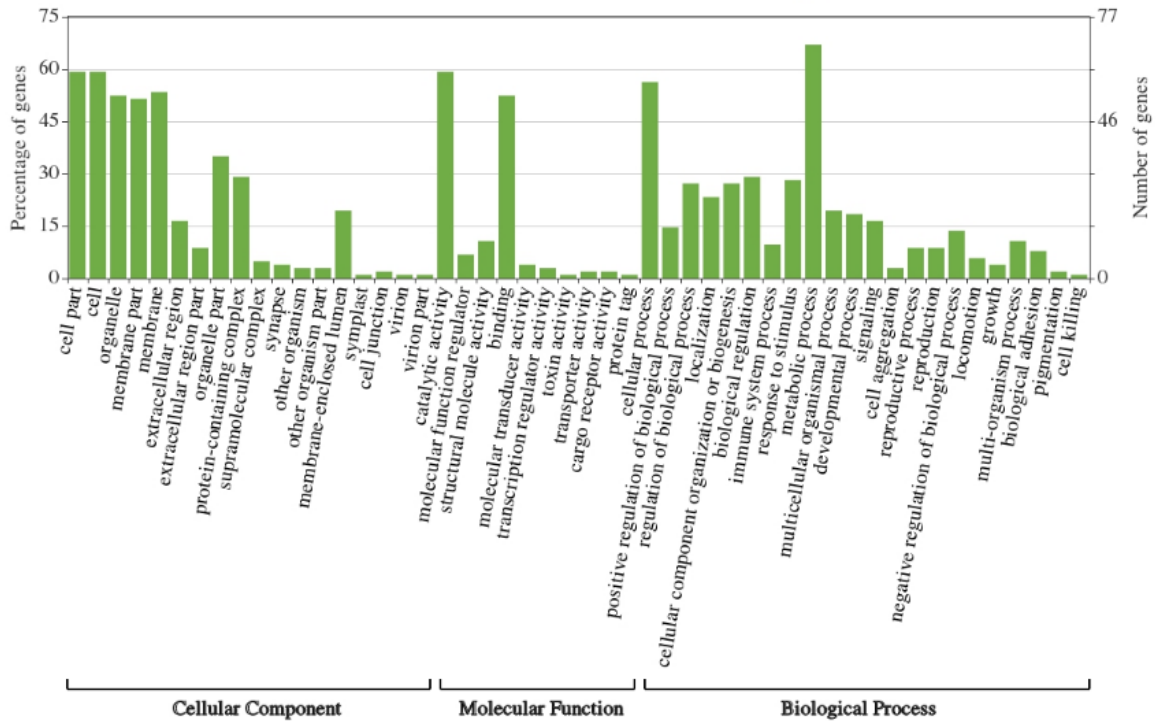


Figura 11. Asignación de términos GO al secretoma del monogéneo *N. melleni*.

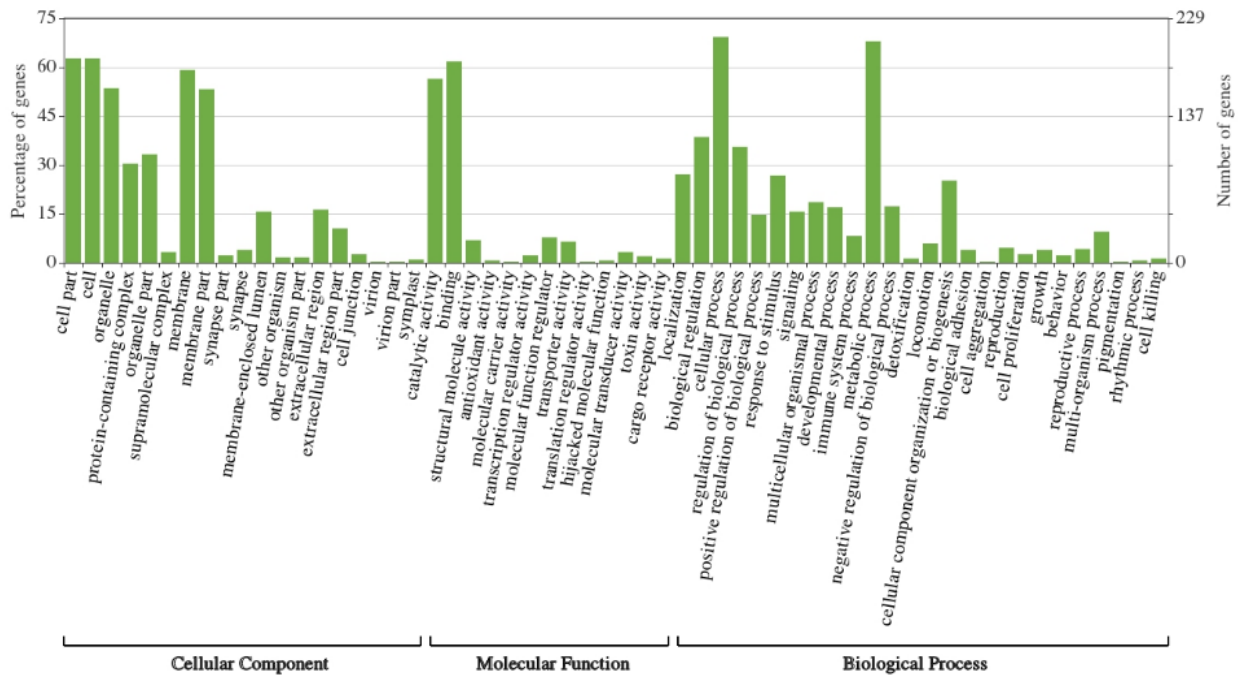


Figura 12. Asignación de términos GO al secretoma del monogéneo *E. nipponicum*.

5.3. Análisis de Enriquecimiento

El análisis de enriquecimiento de ontología de genes se realizó para determinar los términos enriquecidos del secretoma predicho en comparación con las distribuciones de términos del proteoma para monogéneos (Figura 13). Los términos regulación de la locomoción (GO:0040012), regulación del crecimiento (GO:0040008), regulación de la adhesión celular (GO:0030155), regulación positiva de locomoción (GO: 0040017), regulación positiva del crecimiento (GO: 0045927), locomoción (GO: 0040011), motilidad celular (GO: 0048870), taxis (GO: 0042330), la región de la membrana (GO: 0098589) estuvieron sobrerrepresentados solamente en el secretoma de monogéneos, mientras que los términos actividad de liasa (GO: 0016829), movimiento de la célula o componente subcelular (GO: 0006928), actividad catalítica que actúa sobre una proteína (GO:0140096), respuesta inmune (GO:0006955) y respuesta a estímulo externo (GO: 0009605), también estuvieron sobrerrepresentados en la clase Trematoda o Cestoda (Figura 14 y 15). El análisis de enriquecimiento de ontología de genes para Rhabditophora es presentado en la Figura 16.

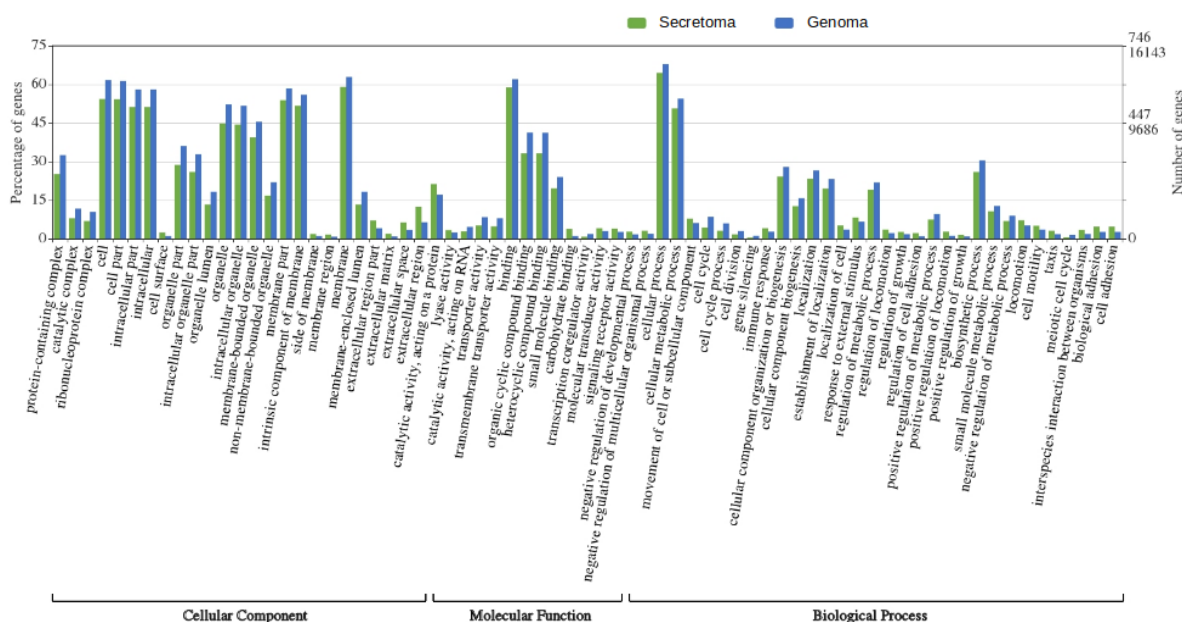


Figura 13. Análisis de enriquecimiento de términos GO del secretoma comparado con los del genoma de la clase Monogenea.

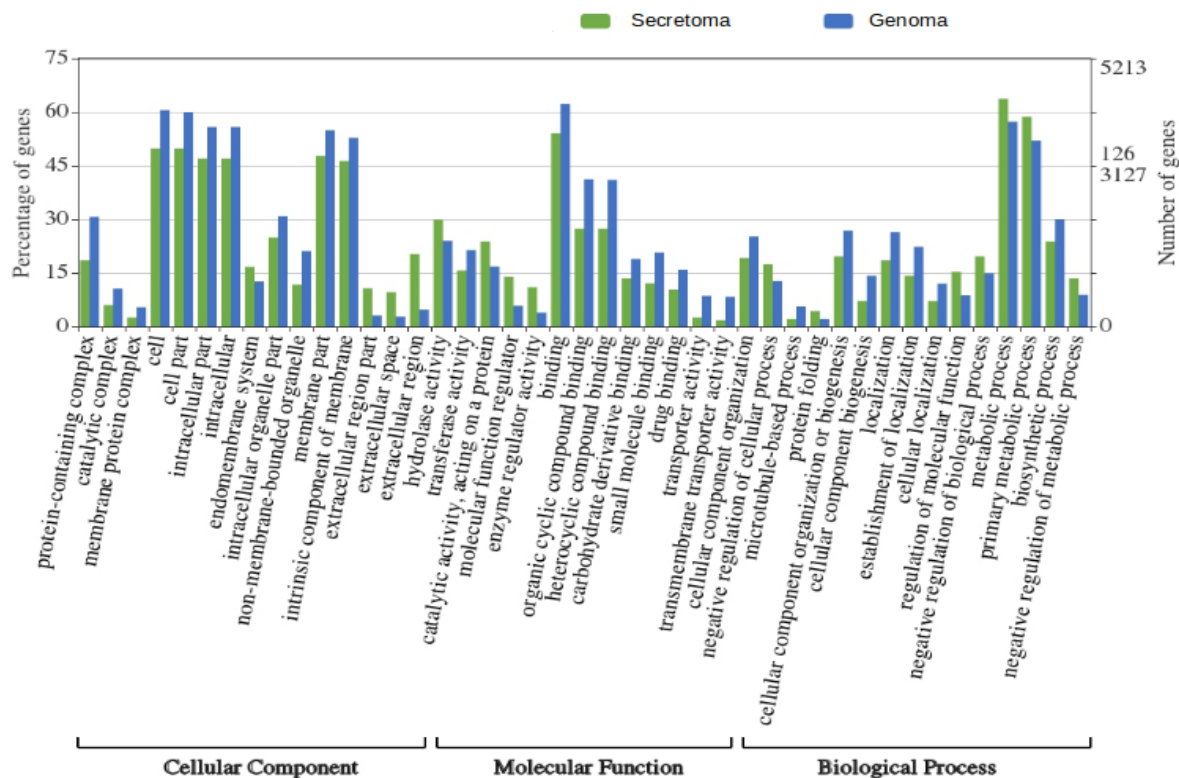


Figura 14. Análisis de enriquecimiento de términos GO del secretoma comparado con los del genoma de la clase Cestoda.

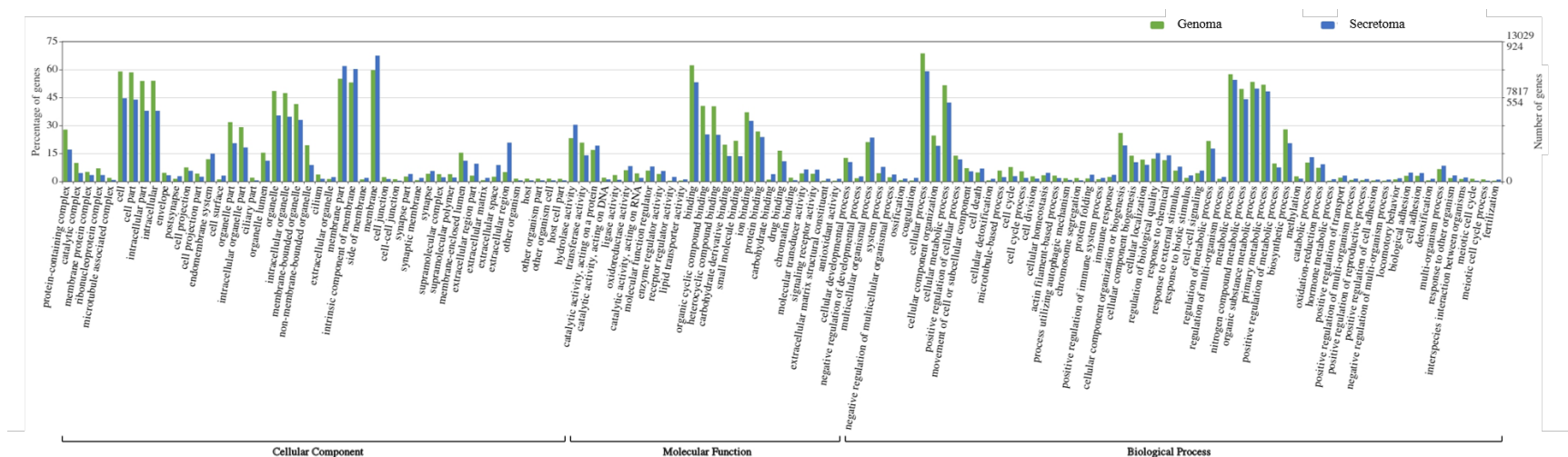


Figura 15. Análisis de enriquecimiento de términos GO del secretoma comparado con los del genoma de la clase Trematoda.

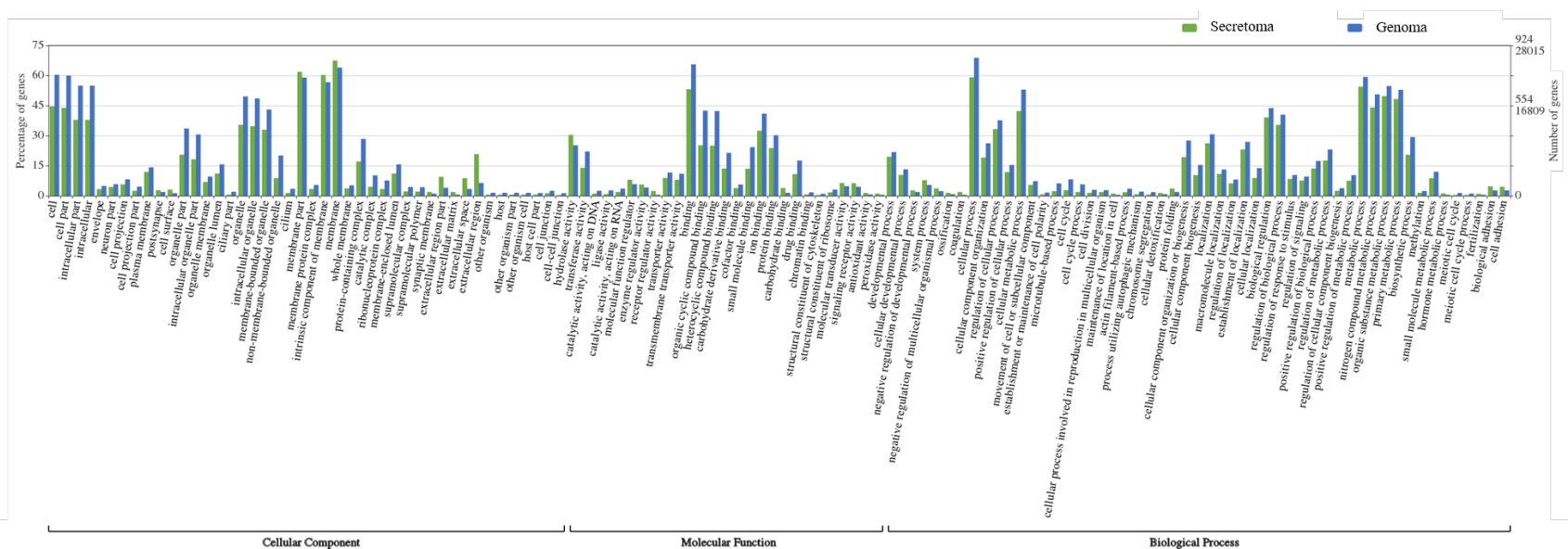


Figura 16. Análisis de enriquecimiento de términos GO del secretoma comparado con los del genoma de la clase Rhabditophora.

5.4. Análisis de Rutas KEGG

Un total de 3,193 (21.92%) de todas las proteínas ES de los platelmintos fueron asignadas a 1,710 rutas KEGG detectadas. Entre las 5 rutas más representativas, la ruta de Lisosoma [PATH:ko04142] estuvo presente en todas las clases (Tabla 7), que incluye proteínas como catepsinas B, L, C, D, A. La ruta del procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático [PATH:ko04141] y rutas del cáncer [PATH:ko05200] estuvieron presentes en las clases Monogena, Cestoda y Trematoda, que incluyen proteínas como proteína disulfuro-isomerasa A1 [EC:5.3.4.1], chaperón BiP del retículo endoplásmico [EC:3.6.4.10], manosil-oligosacárido alfa-1,3-glucosidasa [EC:3.2.1.207], factor de conjugación de ubiquitina E4 B [EC:2.3.2.27] y laminina, alfa 1/2, proteína morfogenética ósea 2, Notch 1, respectivamente.

Tabla 7. Rutas KEGG más representativas en las diferentes clases de platelmintos.

Clase	Ruta KEGG [código]	Proteína [código]	Número de proteínas ES (%)
Monogenea	Lysosome [PATH:ko04142]		63 (1.83)
		LYPLA3; lysophospholipase III [EC:3.1.1.5]	7 (0.20)
		CTSB; cathepsin B [EC:3.4.22.1]	6 (0.17)
		CTSC; cathepsin C [EC:3.4.14.1]	5 (0.15)
		CTSD; cathepsin D [EC:3.4.23.5]	5 (0.15)
		CTSL; cathepsin L [EC:3.4.22.15]	5 (0.15)
	Protein processing in endoplasmic reticulum [PATH:ko04141]		50 (1.45)
		PDIA1, P4HB; protein disulfide-isomerase A1 [EC:5.3.4.1]	4 (0.12)
		DNAJB11; DnaJ homolog subfamily B member 11	3 (0.09)
		HSPA5, BIP; endoplasmic reticulum chaperone BiP [EC:3.6.4.10]	3 (0.09)
	Human papillomavirus infection [PATH:ko05165]		47 (1.36)
		LAMA1_2; laminin, alpha 1/2	3 (0.09)
		DVL; segment polarity protein dishevelled	3 (0.09)
	Pathways in cancer [PATH:ko05200]		47 (1.36)
		DVL; segment polarity protein dishevelled	3 (0.09)
		LAMA1_2; laminin, alpha 1/2	3 (0.09)
	Huntington disease [PATH:ko05016]		45 (1.31)
		DNAH; dynein heavy chain, axonemal	15 (0.44)
		SOD1; superoxide dismutase, Cu-Zn family [EC:1.15.1.1]	3 (0.09)
Cestoda	Lysosome [PATH:ko04142]		20 (6.01)

	CTSB; cathepsin B [EC:3.4.22.1]	2	(0.60)
	CTSL; cathepsin L [EC:3.4.22.15]	2	(0.60)
Protein processing in endoplasmic reticulum [PATH:ko04141]		12	(3.60)
	PDIA1, P4HB; protein disulfide-isomerase A1 [EC:5.3.4.1]	1	(0.30)
	DNAJB11; DnaJ homolog subfamily B member 11	1	(0.30)
Pathways in cancer [PATH:ko05200]		9	(2.70)
	BMP2; bone morphogenetic protein 2	2	(0.60)
Hippo signaling pathway [PATH:ko04390]		8	(2.40)
	BMP2; bone morphogenetic protein 2	2	(0.60)
	SNAI2, SLUG; snail 2	2	(0.60)
Alzheimer disease [PATH:ko05010]		6	(1.80)
	APP; amyloid beta A4 protein	2	(0.60)
Trematoda	Lysosome [PATH:ko04142]	45	(3.20)
	CTSL; cathepsin L [EC:3.4.22.15]	7	(0.50)
	CTSB; cathepsin B [EC:3.4.22.1]	4	(0.28)
	LYPLA3; lysophospholipase III [EC:3.1.1.5]	3	(0.21)
	LIPA; lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase [EC:3.1.1.13]	3	(0.21)
	CTSA, CPY; cathepsin A (carboxypeptidase C) [EC:3.4.16.5]	3	(0.21)
Protein processing in endoplasmic reticulum [PATH:ko04141]		32	(2.27)
	EDEM2; ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 2	2	(0.14)
	ERLEC1, XTP3B; endoplasmic reticulum lectin 1	2	(0.14)
	GANAB; mannosyl-oligosaccharide alpha-1,3-glucosidase [EC:3.2.1.207]	2	(0.14)
	HYOU1; hypoxia up-regulated 1	2	(0.14)

		PDIA3, GRP58; protein disulfide-isomerase A3 [EC:5.3.4.1]	2	(0.14)
		UBE4B, UFD2; ubiquitin conjugation factor E4 B [EC:2.3.2.27]	2	(0.14)
	Pathways in cancer [PATH:ko05200]		22	(1.56)
		NOTCH1; Notch 1	2	(0.14)
	Human papillomavirus infection [PATH:ko05165]		19	(1.35)
		NOTCH1; Notch 1	2	(0.14)
	Antigen processing and presentation [PATH:ko04612]		18	(1.28)
		CTSL; cathepsin L [EC:3.4.22.15]	7	(0.50)
		CTSB; cathepsin B [EC:3.4.22.1]	4	(0.28)
Rhabditophora	Lysosome [PATH:ko04142]		93	(2.10)
		CTSL; cathepsin L [EC:3.4.22.15]	14	(0.32)
		NPC2; Niemann-Pick C2 protein	8	(0.18)
		LYPLA3; lysophospholipase III [EC:3.1.1.5]	6	(0.14)
		PSAP, SGP1; saposin	6	(0.14)
		CTSA, CPY; cathepsin A (carboxypeptidase C) [EC:3.4.16.5]	5	(0.11)
		GAA; lysosomal alpha-glucosidase [EC:3.2.1.20]	5	(0.11)
		MAN2B1, LAMAN; lysosomal alpha-mannosidase [EC:3.2.1.24]	5	(0.11)
	Proteoglycans in cancer [PATH:ko05205]		82	(1.85)
		ACTB_G1; actin beta/gamma 1	25	(0.56)
		CTSL; cathepsin L [EC:3.4.22.15]	14	(0.32)
		ANK; ankyrin	12	(0.27)
	Pathways in cancer [PATH:ko05200]		79	(1.78)
		COL4A; collagen, type IV, alpha	11	(0.25)

	NOTCH3; Notch 3	6 (0.14)
	LAMA1_2; laminin, alpha 1/2	4 (0.09)
	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG	4 (0.09)
	NOTCH1; Notch 1	4 (0.09)
Focal adhesion [PATH:ko04510]		74 (1.67)
	ACTB_G1; actin beta/gamma 1	25 (0.56)
	COL4A; collagen, type IV, alpha	11 (0.25)
	COL6A; collagen, type VI, alpha	5 (0.11)
	LAMA1_2; laminin, alpha 1/2	4 (0.09)
Human papillomavirus infection [PATH:ko05165]		66 (1.49)
	COL4A; collagen, type IV, alpha	11 (0.25)
	NOTCH3; Notch 3	6 (0.14)
	COL6A; collagen, type VI, alpha	5 (0.11)
	NOTCH1; Notch 1	4 (0.09)

5.5. Análisis de Grupos Ortólogos

Los secretomas de las cuatro especies de monogéneos estudiadas comparten tres clusters (13 proteínas) que participan en unión de iones calcio y en procesos biológicos (Figura 17) (Tabla 8). *P. xenopodis* y *E. nipponicum* fueron las dos especies de monogéneos que más proteínas compartieron (114 proteínas agrupadas en 51 clusters), entre las que destacan proteínas destinadas a procesos biológicos como la intervención en procesos metabólicos, proceso metabólico de macromoléculas, lípidos y carbohidratos, proteólisis, transporte de péptidos y organización del retículo endoplásmico. El siguiente par de monogéneos que compartió más proteínas fue *E. nipponicum* y *G. salaris* (76 proteínas agrupadas en 23 clusters), la mayoría involucradas en procesos biológicos como respuesta a estímulos, procesos metabólicos celulares y de lípidos, reproducción y proteólisis. Cada especie de monogéneo tuvo un número alto de clusters que no comparten entre ellas, excepto por *G. salaris*. Por otro lado, *G. salaris* presentó como únicas algunas proteínas dedicadas a la ubiquitinación y a la regulación de transcripción por RNA polimerasa.

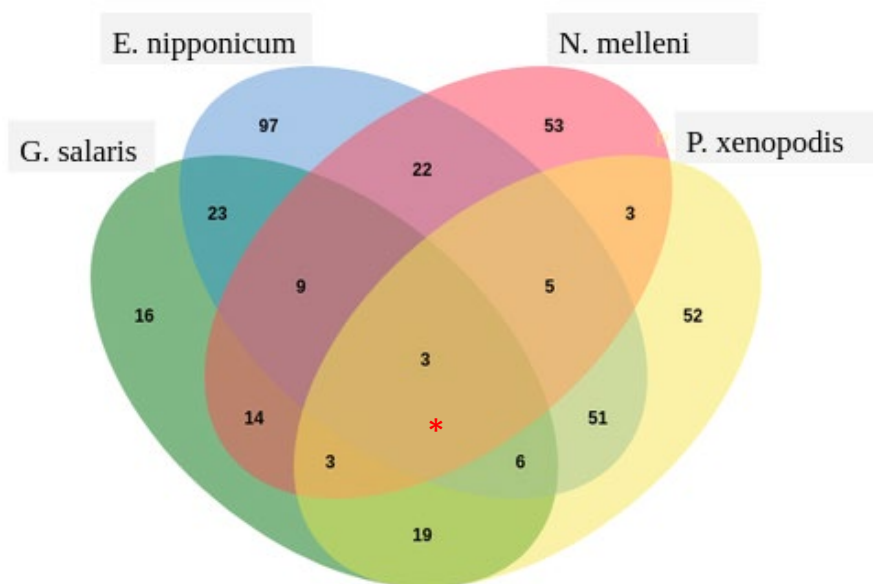


Figura 17. Análisis comparativo de proteínas del secretoma entre cuatro especies de monogéneos. El asterisco rojo indica el número de clusters compartido entre todas las especies.

Tabla 8. Clusters compartidos entre la clase Monogenea y sus funciones.

Cluster	Número de proteínas	Función asignada
1	5	Unión de iones calcio
2	4	Plegamiento de proteínas
3	4	Acetilación de aminoácidos N-terminal en proteínas

Los representantes de las cuatro clases de platelmintos (Rhabditophora, Trematoda, Cestoda y Monogenea) compartieron 22 clusters de proteínas involucradas principalmente en procesos metabólicos (Figura 18), respuesta a estímulos, comunicación celular y algunas otras funciones como reproducción, energía de reserva y procesos del sistema inmune. El céstodo *E. multilocularis* y el tremátodo *S. mansoni* son el par de platelmintos que compartieron más proteínas (32 clusters), involucradas principalmente en procesos biológicos, como respuesta a estímulos, transporte, procesos metabólicos y transporte iónico, también participando en funciones moleculares como actividad estructural de las moléculas. Algo muy notable es que el platelminto de vida libre *S. mediterranea* tiene un número alto de clusters que son propios de la especie y que al momento de relacionarse con las otras clases de platelmintos (todos parásitos) su afinidad es baja y más si se van sumando el número de organismos al tiempo de compartir proteínas. *S. mediterranea* posee proteínas involucradas en procesos biológicos, de función molecular y componentes celulares, entre los que destacan los procesos metabólicos, proceso metabólico del nitrógeno, actividad de hidrolasa, actividad reguladora enzimática, unión de nucleótidos y presencia en regiones extracelulares, intracelulares y del núcleo. Las proteínas únicas de *S. mansoni* tienen algunas otras funciones como organización de cromosoma, división celular (procesos biológicos), actividad oxidoreductasa y antioxidante y actividad peptidasa (funciones moleculares), así como un papel importante en regiones extracelulares.

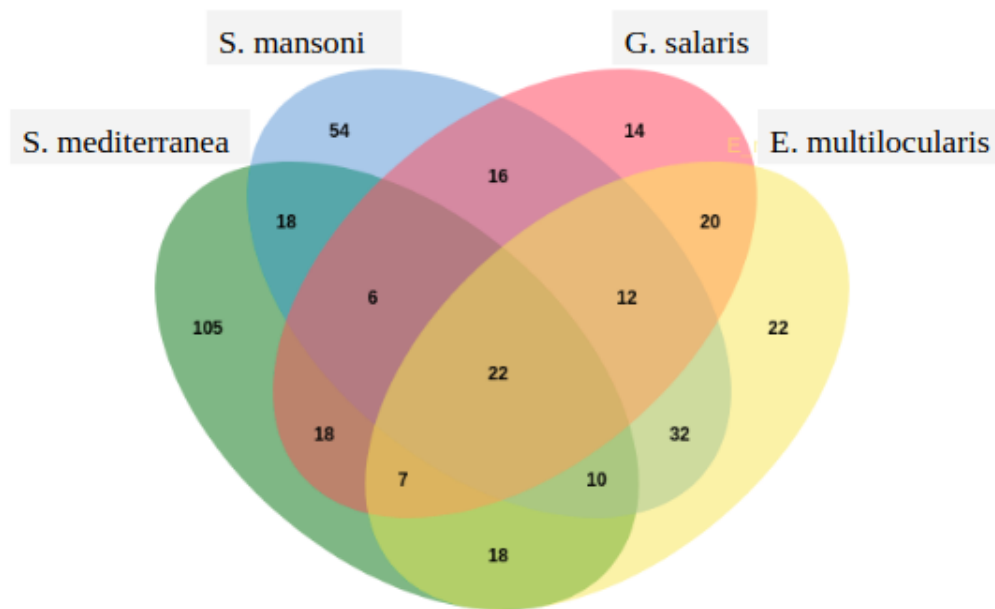


Figura 18. Análisis comparativo de proteínas del secretoma entre diferentes clases de platelmintos.

5.6. Identificación de Potenciales Blancos de Fármacos

Para *G. salaris* se predijeron un total de 1,016 proteínas ES. El análisis de detección de homólogos entre el secretoma de *G. salaris* y el proteoma de su hospedero *S. salar* reveló que 269 proteínas son exclusivas del parásito. El siguiente filtro en donde se buscó homología con genes RNAi de fenotipo letal de *C. elegans* descartó 254 proteínas, dejando un total de 15 proteínas candidatas a ser blancos de fármacos en *G. salaris*. De estas 15 proteínas ES, sólo una cumplió con el criterio de selección, basado en su función y cercanía filogenética. A su vez esta proteína se comparte entre los parásitos de la clase Trematoda, Cestoda y Monogenea, a excepción de *P. xenopodis*. Esta proteína considerada como potencial farmacológico, estuvo relacionada con ProCapesina L1 de *F. hepatica*, y se denominó GyrC. Debido a la ausencia de información estructural de proteínas de *G. salaris*, la estructura 3D de ProCapesina L1 de *F. hepatica* y ocho proteínas homólogas de otras especies fueron obtenidas de la base de datos PDB para el análisis de acoplamiento molecular.

5.7. Acoplamiento Molecular

Los mejores valores de afinidad para el acoplamiento molecular se mostraron en tres diferentes ligandos, que fueron Emodepsida, Praziquantel y Pirvinio (Tabla 9). El mejor valor de afinidad fue de -12 Kcal/mol entre la proteína ProCatesina L1 del parásito *F. hepatica* y el ligando Emodepsida, seguido de -11.9 Kcal/mol entre la proteína ProCatesina L 3 digestiva de *T. molitor* y el mismo ligando. El rango de valores de afinidad del ligando Pirvinio fue entre -7.0 y -8.7 Kcal/mol, mostrando el mejor valor con el receptor Procatesina L 3 digestiva de *T. molitor*. El intervalo de valores de afinidad del ligando Praziquantel fue entre -6.9 y -8.4 Kcal/mol, mostrando el mejor valor con el receptor mutante de catesina K de *H. sapiens*.

5.8. Análisis Filogenético de Receptores

El análisis filogenético mostró que las catesinas se separaron en dos grupos: el primero que incluyó a GyrC y las proteínas 3QT4 y 2O6X, que corresponden a la Procatesina L 3 digestiva del insecto *T. molitor* y a ProCatesina L1 del tremátodo *F. hepatica*, respectivamente; el segundo que agrupó catesinas de *H. sapiens* (Figura 19).

Tabla 9. Valores de afinidad entre los receptores y ligandos evaluados en el análisis de acoplamiento molecular.

Ligandos	Receptores									
	2O6X	3QT4	5I4H1	5I4H2	1CS8	6JD0	2C0Y	5Z5O	3OF8	1BY8
Albendazol	-6.1	-6.4	-5.8	-5	-5.5	-6.1	-6.2	-6.8	-5.9	-6.1
Carbamazina pH 7.4	-4.7	-5.1	-4.5	-4.4	-4.5	-4.7	-5	-5.6	-4.3	-4.5
Carbamazina	-4.6	-5.1	-4.5	-4.2	-4.5	-4.5	-5	-5.6	-4.3	-4.5
Cythioate	-5.5	-5.6	-5.4	-4.8	-5.1	-5.6	-5.3	-5.8	-5.2	-5.3
Emodepsida	-12	-11.9	-9.6	-10.8	-9.9	-10.7	-10.4	-11.4	-10.3	-11.5
Fenbendazol pH 7.4	-6.9	-7.1	-6.7	-5.9	-6.3	-7.4	-8.1	-7.5	-6.8	-7
Fenbendazol	-7	-7.1	-6.5	-6	-6.2	-7.6	-7.5	-7.8	-6.9	-6.9

Flubendazol	-7.5	-7.9	-7.5	-6.4	-7.6	-8.2	-8.1	-8.3	-7.3	-7.2
Hexilresorcinol	-5.6	-5.9	-6.1	-4.7	-4.9	-5.7	-5.9	-6.1	-5.5	-6
Levamisol pH 7.4	-5.4	-6.3	-5.7	-5.2	-5.1	-5.7	-6.5	-6.4	-5.6	-5.7
Levamisol	-5.5	-6.1	-5.7	-5.3	-5.4	-5.7	-6.5	-6.4	-5.6	-6
Mebendazol	-7.5	-8	-7.5	-6.3	-7.8	-8	-8.1	-8.3	-7.2	-7.5
Oxamniquina	-6.4	-7.4	-6.2	-5.6	-6.1	-6.4	-6.6	-7	-6.4	-6.3
Piperazina	-3.8	-3.7	-3.4	-3.3	-4	-4	-3.6	-4	-3.7	-3.3
Pirantel	-5.4	-5.9	-5.2	-5	-5.6	-5.2	-5.5	-6.3	-8.1	-5.3
Pirvinio	-7.4	-8.7	-8.1	-7.1	-7	-7.9	-7.5	-7.8	-7.6	-7.4
Praziquantel	-8	-7.9	-8	-6.8	-7.3	-7.8	-7.8	-8.4	-6.9	-7.5
Quinacrina pH 8.4	-6.2	-7.4	-6.2	-6	-5.9	-6.5	-6.5	-6.7	-6.9	-6
Quinacrina	-6.4	-7.4	-6.2	-5.3	-6	-6.5	-6.7	-6.7	-6.9	-6
Triclabendazol pH 7.4	-6.8	-6.8	-6.5	-6	-6	-6.7	-6.2	-7.2	-6.4	-6.2
Triclabendazol	-7	-7	-6.7	-6.2	-6	-6.6	-6.3	-7.2	-6.4	-6.3
Violeta de Genciana	-6.1	-6.6	-6.5	-5.6	-6	-6.2	-6	-6.4	-6.3	-6

5I4H1 y 5I4H2 forman el dímero 5I4H.

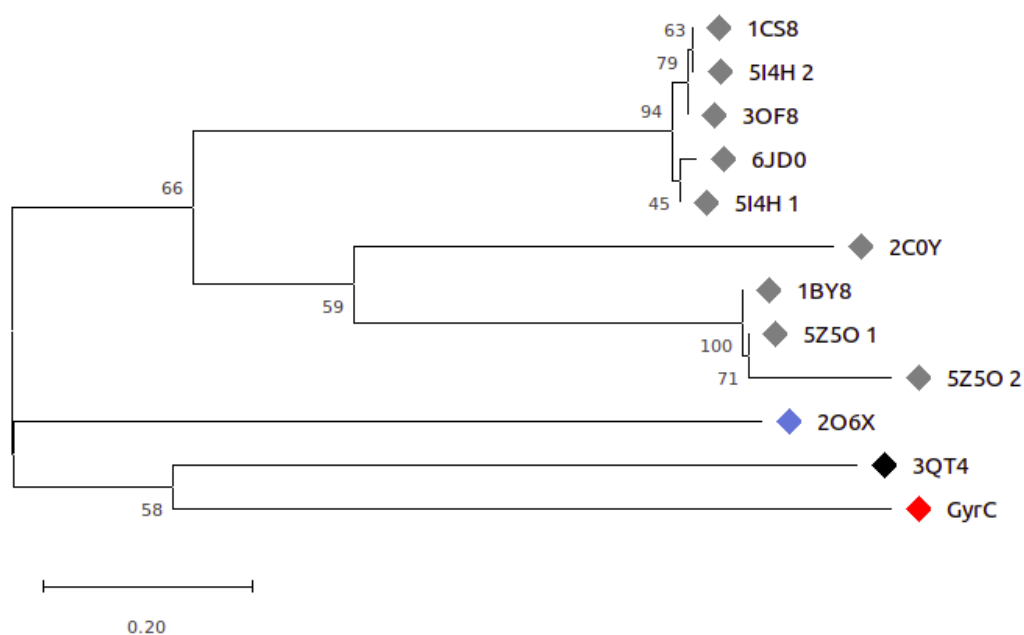


Figura 19. Análisis filogenético de GyrC con respecto a catepsinas de otros organismos. El árbol filogenético fue construido con el método de máxima verosimilitud con un bootstrap de 100 interacciones con el modelo de sustitución de aminoácido WAG+G. La barra de escala representa el valor 0.20 sustituciones de aminoácidos por sitio. Cada especie está representada por un color de la siguiente manera: rojo, *G. salaris*; azul, *F. hepatica*; negro, *T. molitor*; gris, *H. sapiens*.

6. DISCUSIÓN

Las diferencia en el tamaño de los secretomas observadas entre las nueve especies de platelmintos pueden estar relacionadas con sus estilos de vida, ya que se incluyeron platelmintos ectoparásitos, endoparásitos y de vida libre. Los secretomas de parásitos de animales tienden a un menor número de proteínas, posiblemente debido a que sus hospederos representan un ambiente que les provee los nutrientes necesarios sin esfuerzo alguno y esta propiedad a su vez es una manera sigilosa para la evasión del sistema inmune, ya que se reduce el número de moléculas extrañas expedidas por el parásito para disminuir el ataque por parte del sistema inmune del hospedero (Krijger et al., 2014).

De las tres especies de monogéneos para las cuales se tuvo el proteoma predicho completo, llama la atención que el porcentaje del secretoma en *P. xenopodis* fue mayor que en *G. salaris* y *E. nipponicum*. Una posible explicación apunta al hecho que *P. xenopodis* es un endoparásito de la rana africana *Xenopus laevis*, mientras que las otras dos especies son ectoparásitos de peces. La familia Polystomatidae, a la cual pertenece *P. xenopodis*, muestra una coevolución parásito-hospedero a una escala macroevolutiva (Héritier et al., 2015). Los ancestros del hospedero *X. laevis* incluyeron procesos de divergencia que dieron origen a anfibios a partir de peces. Se hace evidente la transición entre ecosistemas acuático-terrestre en donde el parásito requiere de nuevas adaptaciones para sobrevivir (Verneau et al., 2002; Benevenuto et al., 2018). El parásito *P. xenopodis* está sometido a distintos nichos en su ciclo de vida, desde que infecta (como oncomiracidio) a la rana en etapa posmetamórfica se aloja en la cloaca, después migra al riñón, órgano en el que dura de dos a tres meses, y por último llega a la vejiga urinaria, en donde va madurar y reproducirse (Theunissen et al., 2014). Estas especializaciones se traducen en un proceso divergente evolutivo que puede ocasionar la expansión y ganancia de genes en el parásito. Estas ganancias pueden surgir como nuevas proteínas secretoras o por medio de una adición de péptido señal en proteínas existentes, fenómeno que se ha registrado en organismos fúngicos (Misner et al., 2015).

Si bien la predicción del secretoma en monogéneos es muy útil para darnos información, el estudio experimental de estas proteínas aún es escaso y existe la posibilidad de que no todas las proteínas

predichas puedan ser identificadas experimentalmente, como se observa en el análisis de validación de resultados que hicimos para estas proteínas en los tremátodos *F. hepatica* y *S. mansoni*. En parte, esto dependería de la fase de desarrollo del parásito, ya que algunas proteínas se producen sólo en etapas específicas. Por ejemplo, proteínas como vpB1 que forman la cáscara del huevo, así como proteínas confinadas a tejidos internos del parásito o que son secretadas a niveles por debajo de la capacidad de los métodos de detección, no fueron encontradas en las secreciones de adultos de *Fasciola* sp. (Robinson et al., 2009). También, podría suceder que estudios futuros identifiquen proteínas ES que no han sido predichas en el presente estudio debido a la posibilidad de que SignalP no detectara péptidos señal verdaderos (Savojardo et al., 2018). Situaciones como esta se irán resolviendo con el mejoramiento de las herramientas bioinformáticas como DeepSig, la cual predice péptidos señal con base en métodos de aprendizaje profundo (Savojardo et al., 2018).

El enriquecimiento de proteínas relacionadas con respuesta inmune, con localización de la respuesta celular al estímulo externo, interacción entre especies entre organismos, en monogéneos y otros platelmintos parásitos sugiere que estas proteínas secretadas podrían desempeñar un papel importante en la interacción con sus hospederos. Para los parásitos en general, las proteasas son esenciales para la colonización del hospedero, ya que intervienen en la evasión de la respuesta inmune, evitan la coagulación de la sangre y potencian el crecimiento (Dzik, 2006). La secreción de proteasas sucede en organismos parásitos y de vida libre; sin embargo, la secreción de proteasas que degradan la matriz extracelular parece ocurrir sólo en organismos parásitos (Dzik, 2006). Una característica particular de las infecciones helmínticas es la inducción de una respuesta inmune Th2/Treg modificada como una defensa contra la reacción inflamatoria del hospedero. Esta consiste, a nivel de citosinas, de una sub-regulación de citosinas pro-inflamatorias (e.g., $\text{INF}\gamma$, IL-1, $\text{TNF}\alpha$) y sobre-regulación de citosinas antiinflamatorias (principalmente IL-10 y $\text{TGF}\beta$) (Hewitson et al., 2009). Proteasas como las catepsinas son especialmente importantes para los helmintos parásitos (Robinson et al., 2008). Por ejemplo, el tremátodo *Echinostoma caprioni* secreta catepsinas-L que están funcionalmente activas en la superficie de su cuerpo para la evasión del sistema inmune mediante la degradación de los anticuerpos locales del hospedero (Cortés et al., 2019). Asimismo, catepsinas-L secretadas por *F. hepatica* suprimen la proliferación de células T y reducen la expresión de DC4 en mamíferos hospederos (Prowse et al., 2002).

Las proteasas han sido muy poco estudiadas en monogéneos. Se han hecho algunas caracterizaciones en *Neobenedenia* spp. (Hirazawa et al., 2006; Rao y Yang, 2007), pero el análisis experimental de estas proteínas se ha profundizado en *E. nipponicum*, reconociéndose una predominancia de las catepsinas-L que entre sus funciones está la ruptura del tejido del hospedero (Jedlicková et al., 2017). Recientemente, mediante pruebas *in vitro*, Ilgová et al. (2020) demostraron que un inhibidor de peptidasa de serina (rEnStef) de *E. nipponicum* suprimió la expresión de TNF α , lo cual podría resultar en peces más susceptibles a infecciones por patógenos.

La mayor representación de catepsinas-C y D en las rutas metabólicas de monogéneos podría en parte ser explicada porque nuestro análisis incluyó a *N. melleni*, una especie con una baja especificidad de hospedero que posiblemente cuente con diversos mecanismos moleculares para colonizar y subsistir en las decenas de especies de peces en donde se ha encontrado. Además, las especies de monogéneos analizadas tienen hábitos alimenticios distintos, unas se alimentan de células epiteliales y otras de sangre. Las catepsinas-C y D son importantes para la alimentación de los parásitos y podrían influir en la especificidad de hospedero. De acuerdo con Williamson et al. (2002) la compatibilidad de la estructura molecular del alimento proveído por el hospedero con la estructura molecular de las proteasas del parásito es un factor importante para la compatibilidad hospedero-parásito y el número de especies hospederas. En el tremátodo *Clonorchis sinensis*, algunas catepsinas-C han sido detectadas en las ventosas orales y ventrales, las cuales son órganos que el parásito usa para adherirse al hospedero y, por lo tanto, intervienen en la absorción y digestión de nutrientes, así como daño mecánico y químico (Liang et al., 2014). Asimismo, en dos especies nemátodos parásitos se observó que las catepsinas-D fueron más eficientes en digerir hemoglobina de su hospedero adecuado (o permisivo) que de un hospedero no adecuado (Williamson et al., 2002). En otro ejemplo, Kang et al. (2019) comprobaron que dos catepsinas-D se expresan en el intestino y huevos del tremátodo *C. sinensis*, con lo cual los autores sugirieron que ambas catepsinas son importantes para la nutrición y reproducción del parásito. En *Schistosoma* spp., hay miembros específicos de catepsinas-D que son esenciales para el metabolismo y por lo tanto se consideran como potenciales blancos de tratamientos terapéuticos (Araujo-Montoya et al., 2020). En ese sentido, sería interesante identificar catepsinas-C y D en monogéneos y comprobar si tienen funciones como las que se acaban de describir, lo cual sería informativo para el mejoramiento de tratamientos antiparasitarios.

Las catepsinas-B y L también parecen ser moléculas importantes en la vida de monógenos al igual que otros grupos de parásitos. Dentro de los platelmintos, dichas catepsinas han sido estudiadas principalmente en *Fasciola* spp. y *Schistosoma* spp., sus funciones son diversas, pero no totalmente claras. En *Fasciola gigantica*, las catepsinas-B2 y B3 digieren sustratos del hospedero, tal como inmunoglobulina, fibronectina y colágeno, mientras que la catepsina-B5 digiere proteínas (Sethadavit et al., 2009; Chantree et al., 2012, 2013; Siricoon et al., 2015). Recientemente, Chen et al. (2019) demostraron que una catepsina-B (rFgCatB) de *F. gigantica* interactúa con el suero de su hospedero y se acumula en la superficie de las células mononucleares de sangre periférica, causando aumentos en la producción de citosinas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TGF- β y IFN- γ) y óxido nítrico, aumento de la apoptosis, e inhibición de la viabilidad celular, lo cual indica que esta catepsina-B puede modular funciones inmunológicas y celulares clave del hospedero. Yang et al. (2011) observaron que la catepsina-B AcCP-2 fue más abundante en huevos y larvas del nematodo *Ancylostoma caninum*, por lo que sugirieron que esta proteasa es importante para el desarrollo del parásito. En otro nematodo parásito, *Necator americanus*, Ranjit et al. (2008) sugirieron que cuatro catepsinas-B (Na-CP-2, -3, -4, -5) están involucradas en la adquisición de nutrientes. Las catepsinas-L también intervienen en varios procesos biológicos de los platelmintos parásitos. Por ejemplo, en *F. hepatica* se ha observado que la larva infectiva usa la catepsina-L3 para atravesar la pared intestinal del hospedero, las etapas migratorias usan la catepsina-L2 para penetrar el hígado, y los adultos las catepsinas-L1, L2 y L5 para digerir proteínas del hospedero (McVeigh et al., 2012). Hasta ahora, la caracterización bioinformática y bioquímica más completa de proteasas, particularmente cisteínas peptidasas, en monógenos fue realizada recientemente por Jedlicková et al. (2018) en *E. nipponicum*. Estos autores observaron que los monógenos adultos expresan una variedad de catepsinas-L, con una amplia variedad de sitios de unión a sustratos, lo que sugiere adaptaciones específicas para varios procesos biológicos que requieren proteólisis. Las caracterizaciones futuras en otras especies de monógenos dará lugar a la posibilidad de una investigación bioquímica comparativa y entender mejor las interacciones hospedero-parásito a nivel molecular.

Los blancos farmacológicos ProCatesina L1 de *F. hepatica* y Procatepsina L 3 digestiva de *T. molitor* tuvieron afinidades más altas con el fármaco Emodepsida. Las catepsinas L resultan interesantes para calificar como blancos de control de enfermedades parasitarias (Rao y Yang,

2007), ya que se encuentran en todos los parásitos, muchas de las cuales son secretadas e interactúan con moléculas del hospedero, por lo que se les atribuyen funciones de migración, evasión del sistema inmune y alimentación, ya que digieren tejidos del hospedero (Dalton et al., 2003). La Emodepsida, por su lado, ha sido sugerida como un antihelmíntico de amplio espectro que tiene un efecto inhibitorio sobre la movilidad (Martin et al., 2012). Diferentes estudios reportan que este fármaco actúa sobre receptores acoplados a proteína G como latrofilina y canales de potasio activados con calcio en helmintos (Rana y Misra-Bhattacharya, 2013;), sugiriendo una acción en la unión neuromuscular mediante la liberación de neuropéptidos inhibidores (Wilson et al., 2003). Al igual que los canales de potasio, las catepsinas L pueden estar relacionadas con el mecanismo neuromuscular, por ejemplo, en *F. hepatica* son requeridas para un comportamiento neuromuscular normal, por lo que su inhibición puede ocasionar fenotipos de movilidad aberrantes, incluyendo parálisis (McGonigle et al., 2008; Song et al., 2010), caso similar en mamíferos, donde su función se enfoca en la producción de neuropéptidos para una comunicación célula-célula eficiente en el sistema nervioso (Hook et al., 2012). . Nosotros hipotetizamos que la acción del fármaco Emodepsida puede estar involucrada en la regulación de otras rutas metabólicas que incluyen a la catepsina L. Cabe mencionar que este antihelmíntico sólo se ha aplicado en nemátodos. No obstante, los valores de afinidad obtenidos en el acoplamiento molecular sugieren que su aplicación contra monogéneos puede ser efectiva.

El blanco farmacológico del monogéneo *G. salaris* mostró cercanía filogenética con los genes ProCatepsina L1 de *F. hepatica* y Procatepsina L 3 digestiva de *T. molitor*, mientras que las catepsinas de humanos formaron un grupo separado. Las catepsinas se dividen principalmente en tres subfamilias: catepsinas B, L y F y sus variaciones se basan en el grado general de identidad de secuencia y similitud entre las proteasas (Lecaille et al., 2002). A pesar de esta separación, el pliegue tridimensional y sitio activo de las catepsinas es conservado entre distintas especies, lo cual puede explicar los valores similares de afinidad en el acoplamiento molecular de distintos receptores (Jedličková et al., 2018). La cercanía filogenética de ProCatepsina L1 de *F. hepatica* con monogéneos sugiere funcionalidades similares involucradas con la alimentación, la penetración de tejidos y la inmunomodulación que les permiten infectar y establecer la enfermedad en el hospedero (Collins et al., 2004).

7. CONCLUSIONES

El tamaño del secretoma en monogéneos y otros platelmintos está relacionado con sus nichos y ciclos de vida distintos; prueba de esto fue el monogéneo *P. xenopodis*, parásito que tuvo el mayor secretoma de todos los organismos y que presenta procesos evolutivos complejos, además de ser un endoparásito, en una clase donde la mayoría de las especies son ectoparásitos.

En el secretoma existen proteínas y rutas metabólicas dedicadas a funciones esenciales de los parásitos como procesos metabólicos, respuesta a estímulos y las dedicadas a procesos del sistema inmune. En los monogéneos y los demás platelmintos, las catepsinas fueron un grupo de proteínas que tuvieron en común y que al participar en la invasión de tejidos y evasión del sistema inmune, resultaron atractivas como blancos farmacológicos.

La proteína parecida a catepsina L en el monogéneo *G. salaris* puede ser un potencial blanco de fármaco para su control y la Emodepsida podría ser un antihelmíntico alternativo para la aplicación en peces infestados por este parásito.

8. RECOMENDACIONES

Es necesario el estudio experimental del secretoma de la clase Monogenea para conocer mejor las proteínas que lo componen, así como sus funciones, ya que a pesar de que se hizo la anotación, algunas proteínas no tenían una función definida.

Si bien se tienen algunos genomas y transcriptomas de monogéneos, la información en bases de datos de este grupo aún es escasa, por lo que su óptima secuenciación daría lugar a una mejor comprensión de su interacción hospedero-parásito.

La utilización de Emodepsida como antihelmíntico en monogéneos es una opción que resulta atractiva y podría ser efectiva para su ataque, por lo que la realización de bioensayos sería el siguiente paso para verificarlo.

9. REFERENCIAS

- Abaza S.M. 2014. Heat shock proteins and parasitic diseases: Part 1: Helminths. *Parasitologists United Journal*. 7(2):93.
- Ali M. C., Munni Y.A., Das R., Sultana M., Akter N., Rahman M., Uddin M.N., Das K., Hossen M., Hannan M.A. y Dash R. 2020. In silico chemical profiling and identification of neuromodulators from *Curcuma amada* targeting Acetylcholinesterase. *bioRxiv*.
- Agrawal G.K., Jwa N.S., Lebrun M.H., Job D. y Rakwal R. 2010. Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*. 10(4):799-827.
- Araujo-Montoya B.O., Senger M.R., Gomes B.F., Harris G., Owens R. J., Silva-Jr. F.P. 2020. *Schistosoma mansoni* cathepsin D1: biochemical and biophysical characterization of the recombinant enzyme expressed in HEK293T cells. *Protein Expression and Purification*, 167:105532.
- Bakke T.A., Harris P.D. y Cable, J. 2002. Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *International Journal for Parasitology* 32:281-308.
- Bendtsen J.D., Jensen L.J., Blom N., Von Heijne G. y Brunak S. 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering Design and Selection*. 17(4):349-356.
- Berman H., Henrick K. y Nakamura H. 2003. Announcing the worldwide protein data bank. *Nature Structural & Molecular Biology*. 10(12):980.
- Bonin-Debs A. L., Boche I., Gille H. y Brinkmann U. 2004. Development of secreted proteins as biotherapeutic agents. *Expert opinion on biological therapy*. 4(4):551-558.
- Capella-Gutiérrez S., Silla-Martínez J.M. y Gabaldón T. 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*. 25(15):1972-1973.
- Cass C.L., Johnson J.R., Califf L.L., Xu T., Hernandez H.J., Stadecker M.J., Yates III J.R., y Williams D.L. 2007. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. *Molecular and biochemical parasitology*. 155(2):84-93.
- Chantree P., Wanichanon C., Phatsara M., Meemon K. y Sobhon P. 2012. Characterization and expression of cathepsin B2 in *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology*. 132:249-256.
- Chantree P., Phatsara M., Meemon K., Chaichanasak P., Changklungmoa N., Kueakhai P. Lorsuwannarat N., Sangpairoj K., Songkoomkrong S., Wanichanon C., Itagaki T. y Sobhon P. 2013. Vaccine potential of recombinant cathepsin B against *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology*. 135:102-109.
- Chávez-Fumagalli M.A., Lage D.P., Tavares G.S. V., Mendonca, D.V.C., Dias D.S., Ribeiro P. A.F. Ludolf F., Costa L.E., Coelho V.T.S y Coelho E.A.F. 2019. In silico Leishmania proteoma mining applied to identify drug target potential to be used to treat against visceral and tegumentary leishmaniasis. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 87:89-97.
- Chen D., Tian A.-L., Hou J.-L., Li J.-X., Tian X., Yuan X.D., Li X., Elsheikha H.M., y Zhu X.-Q. 2019. The multitasking *Fasciola gigantica* cathepsin B interferes with various functions of

- goat peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Frontiers in Immunology*. 10:1707.
- Choi K.M. 2016. The impact of organokines on insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology and Metabolism*. 31(1):1-6.
- Collins III, J.J. 2017. Platyhelminthes. *Current Biology*. 27(7):R252-R256.
- Collins P.R., Stack C.M., O'Neill, S.M., Doyle S., Ryan T., Brennan G.P., Mousley A., Stewart M., Maule A.G., Dalton J.P. y Donnelly S. 2004. Cathepsin L1, the Major Protease Involved in Liver Fluke (*Fasciola hepatica*) virulence propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *Journal of Biological Chemistry*. 279(17):17038-17046.
- Cuesta-Astroz Y., de Oliveira F.S., Nahum L.A. y Oliveira G. 2017. Helminth secretomes reflect different lifestyles and parasitized hosts. *International Journal for Parasitology*. 47(9):529-544.
- Dalton J.P., Neill S.O., Stack C., Collins P., Walshe A., Sekiya M., Doyle S., Mulcahy G., Hoyle D., Khaznadji E., Moire N., Brennan G., Mousley A., Kreshchenko N., Maule A.G. y Donnelly S.M. 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International journal for parasitology*, 33(11):1173-1181.
- De Castro E., Sigrist C.J., Gattiker A., Bulliard V., Langendijk-Genevaux P.S., Gasteiger E., Bairoch A. y Hulo, N. 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2): W362-W365.
- Doyle M.A., Gasser R.B., Woodcroft B.J., Hall R.S. y Ralph S.A. 2010. Drug target prediction and prioritization: using orthology to predict essentiality in parasite genomes. *BMC genomics*. 11(1):1-14.
- Eckel J. 2018. *The Cellular Secretome and Organ Crosstalk*. 1era Edición. Editorial Academic Press. Londres, Reino Unido. 240 p.
- Edgar R.C. 2004. "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." *Nucleic Acids Research*. 32:1792-1797.
- Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S. y von Heijne G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*. 300(4):1005-16.
- Falda M., Toppo S., Pescarolo A., Lavezzo E., Di Camillo B., Facchinetti A., Cilia E., Velasco R. y Fontana O. 2012. Argot2: a large scale function prediction tool relying on semantic similarity of weighted Gene Ontology terms. *BMC bioinformatics*. 13(4):1-9.
- Floudas A., Cluxton C.D., Fahel J., Khan A.R., Saunders S.P., Amu S., Alcamí A. y Fallon P.G. (2017). Composition of the *Schistosoma mansoni* worm secretome: Identification of immune modulatory Cyclophilin A. *PLoS neglected tropical diseases*. 11(10):e0006012.
- Forwood J.M., Harris J.O. y Deveney M.R. 2013. Efficacy of bath and orally administered praziquantel and fenbendazole against *Lepidotrema bidyana* Murray, a monogenean parasite of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). *Journal of fish diseases*. 36(11):939-947.
- Fu L., Niu B., Zhu Z., Wu S. y Li W. 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. 28(23):3150-3152.

- Gahoi S., Singh S. y Gautam B. 2019. Genome-wide identification and comprehensive analysis of excretory/Secretory proteins in nematodes provide potential drug targets for parasite control. *Genomics*. 111:297-309.
- Ganesan B. 2016. *Aspergillus* Secretome: An overview. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 69-77).
- Garg G., y Ranganathan S. 2011. In silico secretome analysis approach for next generation sequencing transcriptomic data. In *Bmc Genomics*. 12(S3):S14.
- Gene Ontology Consortium. 2004. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Research*. 32(suppl_1):D258-D261.
- Gomez S., Adalid-Peralta L., Palafox-Fonseca H., Cantu-Robles V.A., Soberon X., Sciutto E., Fragoso G., Bobes R.J., Laclette J.P., Yauner L. y Ochoa-Leyva A. 2015. Genome analysis of Excretory/Secretory proteins in *Taenia solium* reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR). *Scientific reports*. 5:9683.
- Hahn C., Fromm B. y Bachmann L. 2014. Comparative genomics of flatworms (Platyhelminthes) reveals shared genomic features of ecto-and endoparasitic Neodermata. *Genome biology and evolution*. 6(5):1105-1117.
- Hathout Y. 2007. Approaches to the study of the cell secretome. *Expert review of proteomics*, 4(2):239-248.
- Héritier L., Badets M., Du Preez L.H., Aisien M.S.O., Lixian F., Combes C. y Verneau O. 2015. Evolutionary processes involved in the diversification of chelonian and mammal polystomatid parasites (Platyhelminthes, Monogenea, Polystomatidae) revealed by palaeoecology of their hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 92:1-10.
- Hewitson J.P., Grainger J.R. y Maizels R.M. 2009. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and biochemical parasitology*. 167(1):1-11.
- Hoai T.D. 2020. Reproductive strategies of parasitic flatworms (Platyhelminthes, Monogenea): the impact on parasite management in aquaculture. *Aquaculture International*. 28:421-447.
- Hook V., Funkelstein L., Wegrzyn J., Bark S., Kindy M. y Hook G. 2012. Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: Cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 1824(1):89-104.
- Howe K.L., Bolt B.J., Shafie M., Kersey P. y Berriman M. 2017. WormBase ParaSite— a comprehensive resource for helminth genomics. *Molecular and biochemical parasitology*. 215:2-10.
- Jedličková L., Dvořáková H., Kašný M., Ilgova J., Potěšil D., Zdráhal Z. y Mikeš L. 2016. Major acid endopeptidases of the blood-feeding monogenean *Eudiplozoon nipponicum* (Heteronchoinea: Diplozoidae). *Parasitology*. 143(4):494-506.
- Jedličková L., Dvořáková H., Dvořák J., Kašný M., Ulrychová L., Vorel J., Žárský V. y Mikeš L. 2018. Cysteine peptidases of *Eudiplozoon nipponicum*: a broad repertoire of structurally assorted cathepsins L in contrast to the scarcity of cathepsins B in an invasive species of haematophagous monogenean of common carp. *Parasites & vectors*. 11(1):1-17.

- Jedličková L., Dvořák J., Hrachovinová I., Ulrychová L., Kašný M. y Mikeš L. 2019. A novel Kunitz protein with proposed dual function from *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) impairs haemostasis and action of complement in vitro. *International journal for parasitology*. 49(5):337-346.
- Käll L., Krogh A. y Sonnhammer E.L. 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of molecular biology*. 338(5): 1027-1036.
- Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M. y Tanabe M. 2015. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic acids research*. 44(D1):D457-D462.
- Kanehisa M., Furumichi M., Tanabe M., Sato Y. y Morishima K. 2016. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic acids research*. 45(D1):D353-D361.
- Käll L., Krogh A. y Sonnhammer E. L. 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic acids research*. 35(suppl_2):W429-W432.
- Kang J.-M., Yoo W.-G., Le H. G., Thái T. L., Hong S.-J., Sohn W.-M., Na B.-K. 2019. Partial characterization of two cathepsin D family aspartic peptidases of *Clonorchis sinensis*. *Korean Journal of Parasitology*. 57:671-680.
- Krijger J.J., Thon M.R., Deising H.B. y Wirsal S. G. 2014. Compositions of fungal secretomes indicate a greater impact of phylogenetic history than lifestyle adaptation. *BMC genomics*. 15(1):722.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G. y Sonnhammer E.L.L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305(3):567-80.
- Kumar S., Chaudhary K., Foster J.M., Novelli J.F., Zhang Y., Wang S., Spiro D., Ghedin E. y Carlow C.K. 2007. Mining predicted essential genes of *Brugia malayi* for nematode drug targets. *PloS one*. 2(11):e1189.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. y Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*. 35(6):1547-1549.
- Lecaille F., Kaleta J. y Brömme D. 2002. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chemical reviews*. 102(12):4459-4488.
- Li L., Stoeckert C.J., y Roos D.S. 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome research*. 13(9):2178-2189.
- Li W. y Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 22(13):1658-1659.
- Liang P., He L., Xu Y., Chen X., Huang Y., Ren M. Liang C., Li X., Xu J., Lu G. y Yu X. 2014. Identification, immunolocalization, and characterization analyses of an exopeptidase of papain superfamily, (cathepsin C) from *Clonorchis sinensis*. *Parasitology Research*. 113:3621-3629.
- Maizels R.M., Balic A., Gomez-Escobar, N., Nair M., Taylor M.D. y Allen, J. E. 2004. Helminth parasites-masters of regulation. *Immunological reviews*, 201(1):89-116.

- Maizels R.M. y Yazdanbakhsh M. 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology*. 3(9):733.
- Martin R.J., Buxton S.K., Neveu C., Charvet C.L. y Robertson A.P. 2012. Emodepside and SL0-1 potassium channels: a review. *Experimental parasitology*. 132(1):40-46.
- Maule A.G. y Marks N.J. 2006. *Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology*. Editorial CAB Internacional. Londres. Reino Unido. 480 pp.
- McVeigh P, Maule AG, Dalton JP, Robinson MW. 2012. *Fasciola hepatica* virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes and Infection*. 14:301-310.
- Meinken J., Walker G., Cooper C.R. y Min X.J. 2015. MetazSecKB: the human and animal secretome and subcellular proteome knowledgebase. *Database (Oxford)*. 2015:bav077.
- McGonigle, L., Mousley A., Marks N.J., Brennan G.P., Dalton J.P., Spithill T.W., Day T.A. y Maule A.G. 2008. The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *International journal for parasitology*. 38(2):149-155.
- McVeigh P., Maule A. G., Dalton J.P. y Robinson M.W. 2012. *Fasciola hepatica* virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes and infection*. 14(4):301-310.
- Merckelbach A. y Ruppel A. 2007. Biochemical properties of an intracellular serpin from *Echinococcus multilocularis*. *Molecular and biochemical parasitology*. 156(1):84-88.
- Militz T.A., Southgate P.C., Carton A.G. y Hutson K.S. 2013. Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. *Journal of fish diseases*. 37(5):451-461.
- Misner I., Blouin N., Leonard G., Richards T. A. y Lane C.E. 2015. The secreted proteins of *Achlya hypogyna* and *Thraustotheca clavata* identify the ancestral oomycete secretome and reveal gene acquisitions by horizontal gene transfer. *Genome Biology and Evolution*. 7(1):120-135.
- Morales-Serna F.N., Chapa-López M., Martínez-Brown J.M., Ibarra-Castro L., Medina-Guerrero R.M. y Fajer-Ávila E.J. 2018. Efficacy of praziquantel and a combination anthelmintic (Adepto®) in bath treatments against *Tagia ecuadori* and *Neobenedenia melleni* (Monogenea), parasites of bullseye puffer fish. *Aquaculture*. 492:361-368.
- Ogawa. M.K. 2015. Diseases of cultured marine fishes caused by Platyhelminthes (Monogenea, Digenea, Cestoda). *Parasitology*. 142(1):178-195.
- Park J.K., Kim K.H., Kang S., Kim W., Eom K.S. y Littlewood D.T.J. 2007. A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). *BMC evolutionary biology*. 7(1):11.
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C. y Ferrin T. E. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*. 25(13):1605-1612.
- Petersen T.N., Brunak S., Von Heijne G. y Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*. 8(10):785-786.

- Pierleoni A., Martelli P.L. y Casadio R. 2008. PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC bioinformatics*. 9(1):392.
- Prakash N, Patel S, Faldu N.J., Ranjan R., Sudheer D.V.N. 2010. Molecular Docking Studies of Antimalarial Drugs for Malaria. *J Comput Sci Syst Biol* 3:070-073.
- Rabouille, C. 2017. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology*, 27, 230–240.
- Rana A.K. y Misra-Bhattacharya S. 2013. Current drug targets for helminthic diseases. *Parasitology research*. 112(5):1819-1831.
- Ranganathan S. y Garg G. 2009. Secretome: clues into pathogen infection and clinical applications. *Genome medicine*. 1(11):113.
- Ranjit N., Zhan B., Stenzel D.J., Mulvenna J., Fujiwara R., Hotez P.J. y Loukas A. 2008. A family of cathepsin B cysteine proteases expressed in the gut of the human hookworm, *Necator americanus*. *Molecular and biochemical parasitology*. 160(2):90-99.
- Rao Y.Z. y Yang T.B. 2007. cDNA cloning, mRNA expression and recombinant expression of a cathepsin L-like cysteine protease from *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae). *Aquaculture*. 269(1-4):41-53.
- Robinson M.W., Dalton J.P. y Donnelly S. 2008. Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends in biochemical sciences*. 33(12):601-608.
- Robinson M.W., Menon R., Donnelly S.M., Dalton J.P. y Ranganathan S. 2009. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Molecular & Cellular Proteomics*. 8(8):1891-1907.
- Rohde K. 2005. Marine parasitology. Csiro publishing. Australia. 565 pp.
- Roy K., Kar S. y Das R.N. 2015. Understanding the basics of QSAR for applications in pharmaceutical sciences and risk assessment. Academic press.
- Saldívar-González F., Prieto-Martínez F.D. y Medina-Franco J.L. 2017. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación química*. 28(1):51-58.
- Sethadavit M, Meemon K, Jardim A, Spithill TW, Sobhon P. 2009. Identification, expression and immunolocalization of cathepsin B3, a stage-specific antigen expressed by juvenile *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica*. 112:164-173.
- Sharp N.J., Diggles B.K., Poortenaar C. W. y Willis T.J. 2004. Efficacy of Aquí-S, formalin and praziquantel against the monogeneans, *Benedenia seriola* and *Zeuxapta seriola*, infecting yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi* in New Zealand. *Aquaculture*. 236(1-4):67-83.
- Siricoon S, Vichasri Grams S, Lertwongvisarn K, Abdullohfakeeyah M, Smooker PM, Grams R. 2015. *Fasciola gigantica* cathepsin B5 is an acidic endo- and exopeptidase of the immature and mature parasite. *Biochimie*. 119:6-15.
- Somervuo P. y Holm L. 2015. SANSparallel: interactive homology search against Uniprot. *Nucleic acids research*. 43(W1):W24-W29.
- Song C., Gallup J.M., Day T.A., Bartholomay L.C. y Kimber M.J. 2010. Development of an in vivo RNAi protocol to investigate gene function in the filarial nematode, *Brugia malayi*.

PLoS Pathogens. 6(12):e1001239.

- Sterling T. y Irwin J.J. 2015. ZINC 15-ligand discovery for everyone. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 55(11):2324-2337.
- Theunissen M., Tiedt L. y Du Preez L.H. 2014. The morphology and attachment of *Protopolystoma xenopodis* (Monogenea: Polystomatidae) infecting the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Parasite*. 21.
- Tinsley R.C. 2005. Parasitism and hostile environments. *Parasitism and ecosystems*. 85-112.
- Tjalsma H., Bolhuis A., Jongbloed J.D., Bron S. y van Dijk J.M. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 515-547.
- Törönen P., Medlar A y Holm L. 2018. PANNZER2: a rapid functional annotation web server. *Nucleic acids research*. 46(W1):W84-W88.
- Trott O. y Olson A.J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 31(2):455-461.
- Van Dongen S.M. 2000. Graph clustering by flow simulation (Doctoral dissertation). Utrecht University, Utrecht.
- Verneau O., Bentz S., Sinnappah N.D., Preez L.D., Whittington I. y Combes C. 2002. A view of early vertebrate evolution inferred from the phylogeny of polystome parasites (Monogenea: Polystomatidae). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 269(1490):535-543.
- Wang S., Wei W. y Cai X. 2015. Genome-wide analysis of excretory/secretory proteins in *Echinococcus multilocularis*: insights into functional characteristics of the tapeworm secretome. *Parasites & vectors*. 8(1):666.
- White R. R. y Artavanis-Tsakonas K. 2012. How helminths use excretory secretory fractions to modulate dendritic cells. *Virulence*, 3: 668-677.
- Wishart D.S., Feunang Y.D., Guo A.C., Lo E.J., Marcu A., Grant J.R., Assempour N., Sajed T., Johnson D., Li C., Sayeeda Z., Iynkkaran I., Liu Y., Maciejewski A., Gale N., Wilson A., Chin L., Cummings R., Le D., Pon A., Knox C. y Wilson M. 2017. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic acids research*. 46(D1):D1074-D1082.
- Williamson A. L., Brindley P. J., Abbenante G., Prociv P., Berry C., Girdwood K., Pritchard D. I., Fairlie D.P., Hotez P.J., Dalton J.P. y Loukas A. 2002. Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potential contribution to host specificity. *FASEB Journal*, 16: 1458-1460.
- Wilson E.H., Katz E., Goodridge H.S., M. Harnett M. y Harnett W. 2003. In vivo activation of murine peritoneal B1 cells by the filarial nematode phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. *Parasite immunology*. 25(8-9):463-466.
- Woods D.J. y Williams T.M. 2007. The challenges of developing novel antiparasitic drugs. *Invertebrate Neuroscience*. 7(4):245-250.
- Xu L., Dong Z., Fang L., Luo Y., Wei Z., Guo H., Zhang G., Gu Y.Q., Coleman-Derr D., Xia Q. y

- Wang, Y. (2019). OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic acids research*. 47(W1):W52-W58.
- Yang Y., Qin W., Wei H., Ying J. y Zhen J. 2011. Characterization of cathepsin B proteinase (AcCP-2) in eggs and larvae stages of hookworm *Ancylostoma caninum*. *Experimental parasitology*. 129(3):215-220.
- Ye J., Zhang Y., Cui H., Liu J., Wu Y., Cheng Y., Xu H., Huang X., Li S., Zhou A., Zhang X., Bolund L., Chen Q., Wang J., Yang H., Fang L. y Shi C. 2018. WEGO 2.0: a web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update. *Nucleic acids research*. 46(W1):W71-W75.
- Zarowiecki M. y Berriman M. 2015. What helminth genomes have taught us about parasite evolution. *Parasitology*. 142(S1):S85-S97.

10. ANEXOS

Lista de los nombres de las secuencias de potenciales blancos de fármacos de *G. salaris*

- 1.- maker-scf7180006952137-snap-gene-0.60-mRNA-1 (blanco escogido)
- 2.- maker-scf7180006950314-snap-gene-0.44-mRNA-1
- 3.- maker-scf7180006947269-snap-gene-0.51-mRNA-1
- 4.- maker-scf7180006946989-snap-gene-0.31-mRNA-1
- 5.- augustus_masked-scf7180006947166-processed-gene-0.1-mRNA-1
- 6.- augustus_masked-scf7180006947344-processed-gene-0.0-mRNA-1
- 7.- genemark-scf7180006947175-processed-gene-0.2-mRNA-1
- 8.- genemark-scf7180006950008-processed-gene-0.3-mRNA-1
- 9.- maker-scf7180006951109-exonerate_protein2genome-gene-0.17-mRNA-1
- 10.- maker-scf7180006952873-augustus-gene-0.51-mRNA-1
- 11.- maker-scf7180006953297-exonerate_protein2genome-gene-0.13-mRNA-1
- 12.- maker-scf7180006953299-snap-gene-0.83-mRNA-1
- 13.- snap_masked-scf7180006950517-processed-gene-0.37-mRNA-1
- 14.- snap_masked-scf7180006951821-processed-gene-0.31-mRNA-1
- 15.- snap_masked-scf7180006953095-processed-gene-0.14-mRNA-1