



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Sub-área Biología Molecular y Celular

**“Estudios de las propiedades inmunogénicas de la
Leucina Aminopeptidasa de *Fasciola hepatica*:
contribución de la estructura cuaternaria y evaluación
de su capacidad transportadora de péptidos”**

Lic. Cecilia Salazar

Orientador: Dr. Carlos Carmona

Co-orientador: Dr. José F. Tort

Montevideo-Uruguay

Julio 2017

A mi madre...

Agradecimientos

A mis orientadores Carlos y Pepe por guiarme en la realización de este trabajo, por sus enseñanzas y aportes para la culminación de esta etapa. Particularmente a Carlos, quien me ha recibido en la UBP y me permitió desarrollarme con total libertad a lo largo de Maestría.

A la Dra. Ileana Corvo del Laboratorio de Moléculas Bioactivas PDU-Paysandú y la Bch. Sabina Wlodek del Depto. de Genética por cederme material valioso para este trabajo.

A la Cátedra de Inmunología de Facultad de Química, en particular a la Dra. Sylvia Dematteis por facilitarme el uso de las instalaciones del Bioterio.

A los miembros del Tribunal por el tiempo dedicado a la lectura y corrección de esta Tesis.

A la ANII y la CISC por el apoyo económico.

A mis queridos compañeros de la UBP Gaby, Fede, Mono y Pat por las horas de trabajo compartidas, el intercambio de ideas y sobre todo el apoyo en los momentos más difíciles. Agradecerle especialmente a Gaby por la ayuda en sacar el trabajo adelante y a Fede por su ayuda en el trabajo con los ratones.

A quienes ya no están en la UBP, pero siguen siendo parte importante de este grupo: Gualberto, Dinorah, Tati y Anita.

A mis amigos, a José y Gea por la paciencia, el apoyo y por entender mi ausencia en muchas ocasiones.

A mi familia, principalmente mis padres por su apoyo incondicional, por enseñarme a no bajar nunca los brazos y alentarme a dedicarme a lo que me gusta.

Índice

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	4
1.1 Ciclo de vida de <i>F. hepatica</i>	6
1.1.1 Rol de las proteasas en el proceso infeccioso	8
1.1.2 La leucina aminopeptidasa de <i>F. hepatica</i>	10
1.2 Respuesta inmune frente a la infección con <i>F. hepatica</i>	11
1.2.1 La respuesta innata frente a <i>F. hepatica</i>	14
1.2.2 Contribución de eosinófilos y macrófagos	15
1.2.3 Respuesta inmune mediada por anticuerpos	16
1.3 Control de la infección por <i>F. hepatica</i>	17
1.3.1 Drogas fasciolicidas	17
1.3.2 Resistencia frente al TCBZ	18
1.4 Antecedentes de vacunas contra <i>F. hepatica</i>	19
1.5 Las enzimas proteolíticas de <i>F. hepatica</i> y su potencial como antígenos vacunales	22
1.5.1 La <i>Fh</i> LAP como vacuna contra la fasciolosis	23
1.6 Nuevos abordajes para el diseño y producción de vacunas: utilización de oligómeros como transportadores de proteínas y péptidos antigénicos	25
1.6.1 La Vacunología Reversa como herramienta para el diseño de vacunas	26
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
2.1 Hipótesis	30
2.2 Objetivo general	30
2.3 Objetivos específicos	30
3 MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 Materiales	33
3.1.1 Cepa bacteriana	33
3.1.2 Vector de Expresión	33
3.1.3 Péptido	33
3.1.4 Medios de cultivos	33
3.1.5 Matriz Cromatográfica	33
3.1.6 Agente entrecruzante de proteínas	34
3.1.7 Sustratos flurogénicos	34
3.1.8 Adyuvantes	34
3.1.9 Sustratos cromogénicos de peroxidasa	34

3.1.10	Animales de Experimentación-----	35
3.1.11	Anestésico -----	35
3.1.12	Material infeccioso -----	35
3.1.13	<i>FhCL3</i> recombinante y suero hiper-inmune anti- <i>FhCL3r</i> -----	35
3.1.14	Anticuerpos conjugados -----	35
3.1.15	Otros materiales -----	36
3.2	Métodos-----	36
3.2.1	Evaluación de la inmunogenicidad sistémica inducida por <i>FhLAPr</i> en su conformación monómero y hexámero en ratones BALB/c-----	36
3.2.2	Evaluación de la inmunogenicidad por vía mucosa de las formas monómero y hexámero de la <i>FhLAPr</i> en ratones de la cepa C57BL/6. -----	41
3.2.3	Predicción de las estructuras tridimensionales de <i>FhLAP</i> y <i>mFhCL3</i> y de las RPIs de <i>FhCL3</i> ---	43
3.2.4	Expresión y purificación de la proteína de fusión <i>FheCL3-LAP</i> en <i>E. coli</i> BL21 (DE3)-----	44
3.2.5	Ensayo de inmunoprotección con <i>FheCL3-LAP</i> en ratones de la cepa BALB/c-----	48
3.2.6	Análisis de datos-----	51
3.3	Metodologías generales de laboratorio -----	51
3.3.1	Cuantificación de proteínas -----	51
3.3.2	Reacción de entrecruzamiento con DMS -----	51
3.3.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) -----	52
3.3.4	Preparación de las muestras -----	52
3.3.5	Condiciones de la Electroforesis SDS-PAGE -----	52
3.3.6	Transferencia de proteínas para Western Blot-----	53
3.3.7	Evaluación de la actividad enzimática con el sustrato Leu-AMC -----	53
3.3.8	Reducción de los niveles de endotoxinas de <i>FhLAPr</i> -----	54
3.3.9	Cuantificación de los niveles de endotoxinas-----	54
3.3.10	Técnicas de inmunización -----	54
3.3.11	Recolección de sangre y procesamiento de suero -----	55
3.4	Software y servidores de análisis informático -----	56
4	RESULTADOS -----	59
4.1	Producción y purificación de <i>FhLAPr</i>-----	60
4.1.1	Obtención de las formas monómero y hexámero de <i>FhLAPr</i> -----	60
4.2	Evaluación de la respuesta humoral frente a las formas monómero y hexámero de <i>FhLAPr</i> en ratones de la cepa BALB/C inmunizados vía sub-cutánea-----	63
4.3	Evaluación de la respuesta humoral frente a las formas monómero y hexámero de <i>FhLAPr</i> en ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados vía intranasal-----	66
4.4	Evaluación de la <i>FhLAPr</i> como transportador de péptidos inmunogénicos-----	69
4.4.1	Generación del modelo tridimensional de <i>mFhCL3</i> -----	69
4.4.2	Generación del modelo tridimensional de <i>FhLAP</i> -----	71
4.4.3	Determinación de las regiones potencialmente inmunogénicas (RPI) de la <i>mFhCL3</i> -----	72
4.4.4	Generación de una proteína quimérica <i>FheCL3-LAP</i> -----	77
4.4.5	Generación del modelo tridimensional de <i>FheCL3-LAP</i> -----	79
4.5	Producción y purificación de la <i>FheCL3-LAP</i> en el sistema de expresión <i>E. coli</i> BL21 (DE3) -----	81
4.5.1	Recuperación de la <i>FheCL3-LAP</i> de los cuerpos de inclusión -----	82
4.5.2	Purificación de <i>FheCL3-LAP</i> mediante cromatografía de afinidad -----	82

4.5.3	Formación del hexámero de <i>FheCL3</i> -LAPr	83
4.5.4	Evaluación de la capacidad de reconocimiento de un suero policlonal anti- <i>FheCL3</i> -LAP de <i>FhLAPr</i> , <i>FhCL3r</i> y <i>FheCL3</i>	85
4.6	Ensayo de inmunoprotección contra <i>F. hepatica</i> en un modelo murino de infección experimental	87
5	DISCUSIÓN	95
5.1	Evaluación del estado de oligomerización de <i>FhLAPr</i> y generación de las formas <i>hFhLAPr</i> y <i>mFhLAPr</i>	96
5.2	Evaluación de la inmunogenicidad de <i>mFhLAPr</i> y <i>hFhLAPr</i> en ratones	98
5.3	Predicción de las regiones potencialmente inmunogénicas de la <i>mFhCL3</i> y utilización de la <i>FhLAP</i> como transportador	102
5.4	Expresión y purificación de la proteína <i>FheCL3</i> -LAP	103
5.5	Evaluación del potencial inmunoprotector de <i>FheCL3</i> -LAP en comparación con <i>FhLAPr</i> y <i>FhCL3r</i> en ratones BALB/c	104
6	PERSPECTIVAS	107
7	BIBLIOGRAFÍA	111
	Datos suplementarios 1	121
	Datos suplementarios 2	124
	Datos suplementarios 3	126
	Datos suplementarios 4	127
	Datos suplementarios 5	128

Resumen

La leucina aminopeptidasa de *Fasciola hepatica* (*FhLAP*) es una proteasa multimérica presente en el tubo digestivo del parásito asociada con los procesos de degradación de proteínas provenientes de la sangre del hospedero. La misma ha mostrado su capacidad de inducir una respuesta inmune protectora contra la fasciolosis en el rango de aplicación comercial en ovinos. Sin embargo, ha fallado en reproducir niveles similares de protección en bovinos, la especie de mayor relevancia económica en nuestro país. El Triclabendazol (TCBZ) es la droga de elección para el tratamiento del ganado afectado, ya que elimina tanto las formas maduras como inmaduras del parásito. No obstante, la creciente aparición de resistencia al TCBZ y la preocupación por la inocuidad farmacológica de los alimentos, han determinado que la estrategia vaccinal gane relevancia, ya que a partir de ésta se estimulan los mecanismos de defensa propios y permitiría reducir la aplicación de tratamientos fasciolicidas en especies destinadas al consumo humano. A modo de generar una formulación con potencial aplicación al modelo de infección en bovinos y a partir de la estabilidad funcional observada en la forma recombinante de la *FhLAP* como proteína de fusión con la tiorredoxina de *E. coli*, se postuló que la *FhLAP* en su forma multimérica podría actuar en forma simultánea como inmunógeno y transportador de pequeños péptidos. A modo de obtener evidencia del perfil inmunogénico de la forma multimérica frente a la monomérica, se llevaron a cabo ensayos de inmunogenicidad tanto a nivel sistémico como de mucosas en ratones de endocría, encontrándose un nivel mayor de respuesta de anticuerpos específicos frente a la forma hexamérica respecto de la monomérica. Ulteriormente, se desarrolló un antígeno quimérico resultante de la fusión de *FhLAP* con una región potencialmente inmunogénica de la catepsina L3 madura (*mFhCL3*), una proteasa del estadio juvenil relevante para los procesos de invasión y migración en el hospedero. La búsqueda de ésta región potencialmente inmunogénica de *mFhCL3* (*FheCL3*) se realizó a través de métodos informáticos y se generó el modelo tridimensional de la proteína quimérica *FheCL3-LAP* que permitió determinar la exposición de *FheCL3* en la superficie de la estructura.

La proteína de fusión *FheCL3*-LAP fue expresada en los cuerpos de inclusión de *E. coli* y la forma multimérica y con actividad Leu-AMC específica se obtuvo tras el proceso de extracción, replegamiento y clivaje de la etiqueta de histidinas. Su perfil inmunoprotector fue evaluado en combinación con Adyuvac 50 en un modelo de infección experimental en ratones de la cepa BALB/c en paralelo con la *FhLAPr* y *FhCL3r* recombinantes. Los resultados obtenidos no permitieron confirmar la capacidad protectora en el modelo murino y no se pudo detectar inmunoreactividad de los sueros generados contra la porción *FheCL3* de la proteína quimérica. A partir de esto, se concluye la necesidad de desarrollar un nuevo abordaje para la evaluación de la inmunogenicidad y capacidad protectora de la *FheCL3*-LAP, en particular en lo que refiere al modelo de infección a utilizar y así determinar, por un lado, si la respuesta humoral anti-*FheCL3* es desarrollada cuando se inocula la proteína de fusión *FheCL3*-LAP y, por otro lado, si ésta genera niveles de protección mayores que los que puedan generar *FhLAPr* y *FhCL3r* empleados en forma individual o combinada.

1 Introducción

la fasciolosis causa enfermedad aguda y crónica en el ganado, en especial el bovino y ovino, generando pérdidas que se estiman en más de 3000 millones de dólares anuales a nivel global

como consecuencia de la reducción en la producción de carne, lana y leche, aparición de infecciones secundarias, interferencia en la fertilidad de los animales y gastos derivados del tratamiento fasciolicida (Sptihill, 1998). La fasciolosis en rumiantes es endémica en la gran mayoría de las regiones ganaderas de Sudamérica (Carmona & Tort, 2016). En Uruguay, la infección conocida vulgarmente como “saguaypé” está presente en todo el territorio nacional. A nivel de animales faenados un total de 34.4% de los hígados bovinos fueron decomisados en el período 2013-2015 en Uruguay, 25% de los cuales correspondieron a hígados conteniendo adultos de *F. hepatica* y 53.1% presentan lesiones compatibles con la infección (INAC, 2015). El caso de los ovinos, 32.3% de los hígados fueron decomisados en el mismo período, de los cuales 1.5% correspondieron a hígados infectados y 48.6% presentaron lesiones compatibles con la infección (INAC, 2015a).

1.1 Ciclo de vida de *F. hepatica*

F. hepatica es un platelminto trematodo hematófago de la subclase Digenea, que posee un ciclo biológico heteroxeno es decir, requiere de un hospedador definitivo (mamíferos herbívoros) y un hospedador intermediario (caracoles de agua dulce) para completar su ciclo (**Figura 2**). Los huevos producidos por los adultos hermafroditas alojados en los canalículos biliares del hígado son arrastrados por la bilis hasta el duodeno y luego son expulsados al exterior con las heces del hospedador definitivo, formándose en su interior el embrión ciliado al cabo de 10-12 días. La eclosión de los huevos sólo se produce en el agua donde el opérculo del huevo se abre para la salida del miracidio. Este nada libremente por medio de los cilios que recubren su tegumento hasta encontrar al hospedador intermediario adecuado; éstos son caracoles pulmonados pertenecientes a la familia Lymaeidea (Correa et al., 2010).

El miracidio atraviesa los tegumentos del molusco, pierde los cilios y se localiza en la cámara pulmonar, donde se transforma en esporocisto. En el interior del esporocisto se generan redias de primera generación por reproducción asexual a partir de células germinales

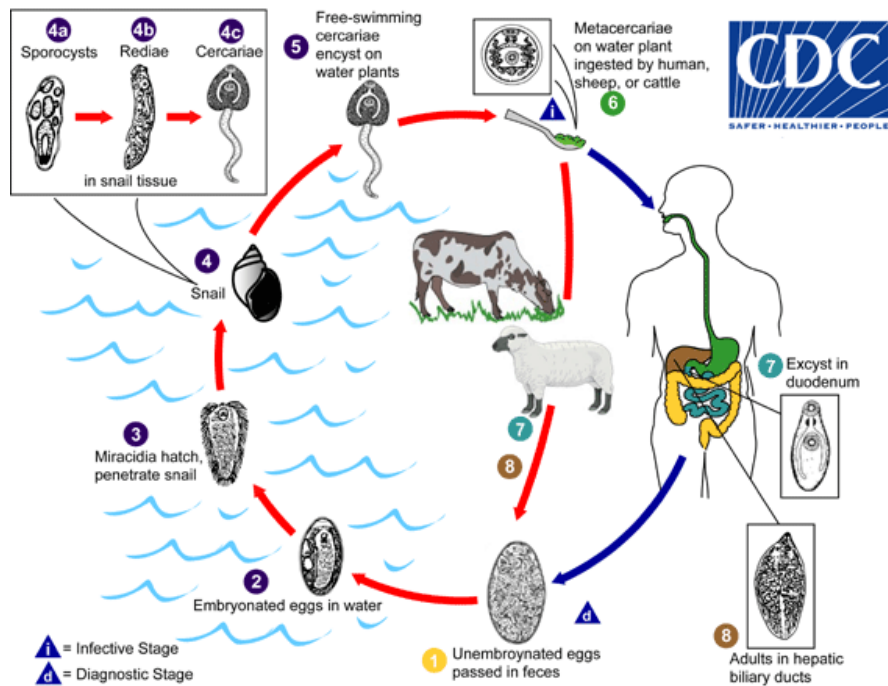


Figura 2: Ciclo biológico de *F. hepatica*. El ciclo de vida del parásito es complejo, teniendo un hospedador definitivo que aloja la forma sexualmente madura del parásito y un hospedador intermediario que aloja la fase larvaria. Imagen tomada del portal del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC: <https://www.cdc.gov/>).

indiferenciadas, las que migrarán a la glándula digestiva del caracol para formar también endógenamente redias hijas o de segunda generación. Estas últimas formarán las cercarias, que abandonarán el caracol para nadar hasta tomar contacto con vegetales acuáticos lo que desencadena la pérdida de la cola y el enquistamiento dando lugar a la forma de resistencia llamada metacercaria.

El hospedador natural se infecta al ingerir las metacercarias junto con estos vegetales. En el rumen, las condiciones reductoras, la elevada concentración de anhídrido carbónico y la temperatura de 39°C desencadenan el proceso de desenquiste (Andrews, 1998). En el duodeno, las sales biliares estimulan la emergencia de la forma juvenil de *F. hepatica* llamada juvenil recientemente desenquistado (JDR) que migra y atraviesa la pared del intestino delgado, llegando al peritoneo donde recorre la serosa hasta alcanzar el hígado al que atraviesa. Finalmente, y luego de varias semanas de migración a través del parénquima hepático, la forma adulta y sexualmente madura, se instala en el interior de los conductos

biliares y se fija a sus paredes a través de ventosas comenzando la deposición de huevos entre 8 y 12 semanas post-infección (Sukhdeo & Sukhdeo, 2002). En su recorrido, *F. hepatica* sufre importantes modificaciones en su morfología, siendo su tamaño el más evidente, pasando de la forma juvenil de 300 µm a la forma adulta de hasta 3 cm de largo. El proceso migratorio implica atravesar distintos tejidos enfrentándose a microambientes variables, y es posible gracias a la acción combinada de distintos grupos de medidores expresados por parte del parásito.

1.1.1 Rol de las proteasas en el proceso infectivo

Los productos de excreción y secreción (PES) de *F. hepatica* contienen una gran proporción de cistein proteasas, mayoritariamente catepsinas de tipo L y B que intervienen tanto en el proceso de invasión como en la adquisición de nutrientes (Dalton et al., 2003). Las catepsinas L son expresadas de manera diferencial a lo largo del ciclo de vida del parásito (**Figura 3**). Hasta el momento se han identificado cinco catepsinas L de *F. hepatica* en los PES: *FhCL1*, *FhCL2*, *FhCL3*, *FhCL4* y *FhCL5*. De ellas *FhCL1*, *FhCL2* y *FhCL5* fueron identificadas a partir de parásitos adultos presentes en los canalículos biliares (Robinson et al., 2009) mientras que *FhCL3* y *FhCL4* se identificaron a partir de JRDs (Cancela et al., 2008).

En ensayos *in vitro* utilizando JRDs, se observó que las catepsinas bloquean la inmunotoxicidad mediada por anticuerpos (Carmona et al., 1993). Por otro lado, ambas catepsinas L son capaces de clivar inmunoglobulinas lo que sugiere un papel activo en mecanismos de evasión de la respuesta humoral (Berasain et al., 2000). También se ha postulado su participación en la degradación *in vitro* de colágeno, fibronectina y laminina, por lo que podrían estar involucradas en los procesos de degradación tisular que tienen lugar durante la invasión y migración (Berasain et al., 1997).

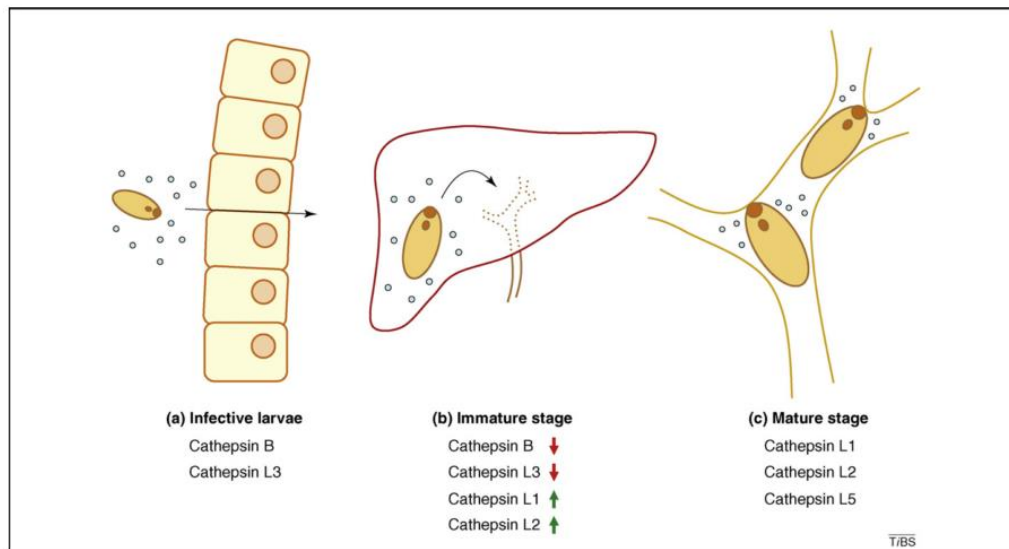


Figura 3: Expresión de las catepsinas L y B en los estadios larvario (a), inmaduro (b) y maduro (c) de *F. hepatica*. Extraído de Robinson et al., 2008.

La *FhCL3* es la catepsina L predominante secretada por el JRD y en junto con la actividad de *FhCB* suman el 80% de la actividad proteolítica en este estadio (Cancela et al., 2008; Robinson et al., 2009; Di Maggio et al., 2016). Durante el proceso de penetración y migración el JRD debe degradar componentes de la matriz extracelular para abrirse camino hacia su destino final. Dentro de los componentes presentes en la matriz extracelular se encuentran el colágeno, fibronectina y laminina. La *FhCL3* posee especificidad restringida por el sustrato, principalmente debido a la presencia de un residuo triptófano en la posición 69 de la proteasa madura, lo que resulta en la preferencia de sustratos con una prolina o glicina en la posición P2. Estas preferencias están asociadas con la habilidad de la *FhCL3* de clivar el colágeno, por lo cual la misma podría tener un rol relevante durante la penetración y migración del parásito en el hospedador mamífero (Corvo et al., 2009, 2013).

En el PES de los JRDs la familia de las Catepsinas L son las más representadas dentro del grupo de las cistein proteasas comprendiendo un 50% del total de las proteasas de este estadio, seguidas de la catepsina B (25%) y legumainas (25%) (Di Maggio et al., 2016). Al utilizar inhibidores de catepsinas se demostró que el proceso de desenquiste es dependiente de *FhCL3*

y *FhCB* (Robinson et al., 2009). Asimismo, en un estudio llevado a cabo por McGonigle et al. (2008) se demostró que el silenciamiento de transcritos de catepsinas L y B inhibía la capacidad de movimiento del juvenil, por lo que su capacidad de penetración se veía afectada. Las serina proteasas se han identificado como mediadores de diversas funciones críticas para el parasitismo exitoso de diversos helmintos (Yang et al., 2015). En el caso de *F. hepatica* se ha identificado una exoproteasa a del tipo dipeptidil peptidasa (DPP), a partir de PES de adultos. La DPP de *F. hepatica* presenta diferencias con las DPP de mamífero en cuanto a su comportamiento frente a diferentes sustratos e inhibidores (Carmona et al., 1994).

Dentro del grupo aspártico proteasas, se han identificado asparagil endopeptidasas también llamadas legumaínas en PES de juveniles y adultos (Cancela et al., 2010). Estas proteasas de especificidad restringida se han postulado como activadores de otras proteasas a nivel de la luz del intestino parasitario (Spithill et al., 2012) y podrían tener un rol de relevancia en el caso del proceso infectivo por *F. hepatica* colocándolas como posibles blancos farmacológicos o vacunales.

Respecto a las metalopeptidasas, un estudio de tamizaje de actividades aminopeptidasas en los PES de gusanos adultos detectó una actividad minoritaria de tipo leucina aminopeptidasa (LAP). Esta actividad demostró ser prominente en extractos de adultos solubles en deoxicolato y por métodos histoquímicos, se la localizó intensamente expresada en el epitelio del intestino y con menor intensidad a nivel del tegumento de la forma adulta (Acosta et al.1998).

1.1.2 La leucina aminopeptidasa de *F. hepatica*

Las LAPs son un grupo diverso de metalopeptidasas que requieren de un metal para su función y comparten la preferencia por la hidrólisis de polipéptidos blanco que presentan Leu en el extremo N-terminal y son capaces de actuar sobre otros aminoácidos con eficiencia variable. El amplio espectro de complejidad y heterogeneidad de las LAPs ha generado la necesidad de agruparlas en distintas familias (Kim & Lipscomb, 1994; Matsui et al., 2006). La LAP identificada

en *F. hepatica* presenta características distintivas de la familia M17 como la secuencia de aminoácidos altamente conservada a nivel del dominio C-terminal, ausencia del motivo HEXXE, el ensamblaje de los monómeros en una estructura homo-hexamérica y el requerimiento de dos iones metálicos por cada monómero, imprescindibles para la unión y estabilización del sustrato. Los aminoácidos esenciales del sitio catalítico son dos residuos de lisina, tres residuos de ácido aspártico y un residuo de arginina. Las LAPs se caracterizan por presentar protómeros bi-lobulados con un dominio C-terminal mayor al N-terminal y las subunidades se ensamblan con sus sitios activos cercanos al interior del hexámero (Matsui et al., 2006). El arreglo estructural cuaternario es imprescindible para que las enzimas sean completamente activas y éste arreglo se encuentra muy conservado por lo que se sugiere que se trata de un plegamiento generalizado para todos los miembros de la familia.

Se ha postulado que la función de esta enzima es la proteólisis inespecífica en la fase final post proteosoma del catabolismo proteico. Si bien el rol de la LAP de *F. hepatica* aún no está establecido, es posible postular su participación en la degradación final de proteínas del hospedador. De esta forma, se sugiere que pequeños polipéptidos o dipéptidos, producidos por la acción de otras proteasas serían hidrolizados a aminoácidos metabolizables por la acción de esta enzima (Acosta et al. 1998).

1.2 Respuesta inmune frente a la infección con *F. hepatica*

Los helmintos son parásitos multicelulares complejos que infectan una gran proporción de la población mundial y de las especies productivas. Se dividen en dos taxa altamente divergentes como son los gusanos redondos (nematodos) y los gusanos planos (trematodos y cestodos). A pesar de ésta divergencia, la respuesta inmune generada por ambos es similar, caracterizada por ser del tipo 2 (término referido tanto a los componentes innatos como adaptativos de la respuesta inmune). Éstas respuestas se caracterizan por la presencia de niveles elevados de interleuquina 4 (IL-4) y otras citoquinas del tipo 2 como IL-5, IL-9 IL-13 y IL-21, lo que lleva a la

generación de IgE y activación y expansión de las células T CD4⁺ Th₂ así como activación de mastocitos, eosinófilos y basófilos (Maizels et al., 2004).

En la **Figura 4** se resume los componentes característicos de la respuesta del tipo 2. En el caso de los trematodos de los géneros *Fasciola* y *Schistosoma* se ha postulado que la respuesta del tipo 2 operaría destruyendo las formas invasoras por medio de un mecanismo de citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC por *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) donde la respuesta humoral específica del tipo 2 colabora con los componentes celulares para atacar el tegumento del parásito (Carmona et al., 1993; Trottein et al., 1997).

Se ha demostrado la asociación de las respuestas del tipo 2 y los mecanismos de reparación tisular. En el contexto de una infección por helmintos la reparación tisular aliviaría los daños producidos por los mismos, en lugar de atacar al parásito de forma directa. Es por esto que este mecanismo podría ser considerado de tolerancia frente a la infección (Anthony et al.,

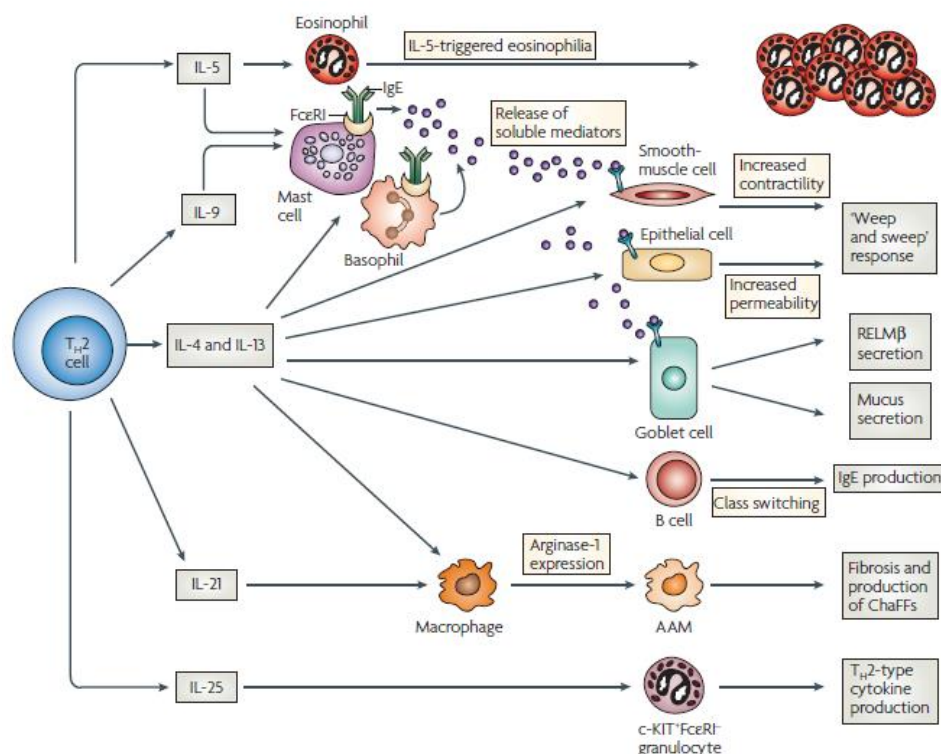


Figura 4: Células efectoras y componentes solubles característicos de la respuesta inmune del hospedador mamífero que participan de la respuesta frente a la infección por helmintos (Anthony et al., 2007).

2007). Se ha descrito que muchas especies de mamíferos pueden infectarse con parásitos del género *Fasciola*, sin embargo, se ha observado una amplia variación en los niveles de susceptibilidad a la infección y en la habilidad de adquirir resistencia a la reinfección.

En este contexto, la sobrevivencia de los parásitos se atribuye a la puesta en escena de mecanismos de evasión como el recambio tegumentario y bloqueo de la ADCC (**Figura 5**), así como de inmunomodulación a través de la expresión de moléculas con capacidad de inducir respuestas reguladoras (Moreau & Chauvin 2010).

El hospedador ovino es susceptible a la infección y en muchos casos sufre la muerte en la etapa aguda de la enfermedad. En cambio, en algunas razas ovinas se ha observado un alto grado de resistencia a la infección primaria y secundaria con *F. gigantica* (Spithill & Dalton 1998). Esto indicaría que *F. hepatica* y *F. gigantica* presentan diferencias biológicas significativas que permiten que los mecanismos inmunológicos efectores del hospedador ovino puedan imponerse frente a la infección de *F. gigantica* y no a la de *F. hepatica*. Estos mecanismos de resistencia a la infección con *F. gigantica* se asocian a la inducción temprana de una respuesta Th_1 en contraste con la respuesta Th_1/Th_2 que se induciría por *F. hepatica*.

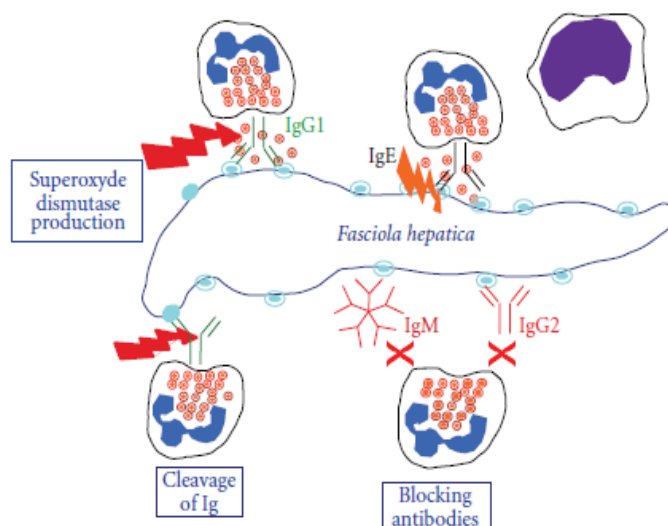


Figura 5: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune desarrollados por *F. hepatica* contra la citotoxicidad mediada por anticuerpos. 1) Producción de superóxido dismutasa, la cual neutraliza los radicales superóxido. 2) Clivaje de IgG e IgE por parte de las catepsinas L, lo que evita la ADCC y 3) Producción de IgM e IgG₂, que bloquean la adhesión de los eosinófilos (Moreau & Chauvin 2010).

(Raadsma et al., 2007). El ganado bovino presenta una resistencia mayor a la infección con *F. hepatica* que los ovinos. Sin embargo, no desarrollan una respuesta inmune capaz de evitar la re-infección (Clery & Mulcahy 1998). En el modelo experimental de infección aguda con *F. hepatica* en ratones induce una respuesta dominante del tipo 2 caracterizada por la producción de citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13 por parte de las células del bazo, así como la secreción de IL-10 y TGF- β por parte de macrófagos y células dendríticas (Rojas-Caraballo et al., 2017). La modulación de la respuesta inmune por parte del parásito ocurre a partir de las primeras horas luego de la penetración de la pared intestinal. La población de macrófagos peritoneales comienza a desarrollar marcadores característicos del fenotipo alternativo/regulador con la expresión de Arg-1 y PD-L1 y secreción de IL-10 y TGF- β luego de 24 hr de la infección y responden pobremente a estímulos Th₁. Al entrar a la fase crónica de la infección (21 días p.i) hay un aumento en la proporción de Tregs (productoras de IL-10) resultando en la supresión de la respuesta Th₂ específica (revisado en Robinson et al., 2012). La administración de PES a ratones, al igual que en una infección natural, inhibe el desarrollo de la respuesta Th₁ y favorece la respuesta Th₂ (Donnelly et al., 2005).

1.2.1 La respuesta innata frente a *F. hepatica*

La respuesta inmune innata jugaría un papel importante frente a la infección por *F. hepatica*, no sólo en iniciar y polarizar la respuesta adaptativa, sino que, además tendría un rol directo en la defensa contra este parásito. Se ha determinado que los antígenos asociados al tegumento *FhTeg* inducen la supresión de la producción *in vivo* de los mediadores de la respuesta Th₁ (IFN γ y IL-12p70) en el modelo de shock séptico en ratón. El mecanismo de acción de *FhTeg* sería independiente de TLRs y estaría asociada a la supresión de las vías de señalización por NF- κ B y MAPK (Ravidà et al., 2016). Se ha demostrado que el TLR2 estaría involucrado en la interacción con los productos de excreción/secreción (PES) de *F. hepatica* por medio de un experimento donde los PES de adultos inhiben la activación de los

macrófagos por proteínas purificadas de *Mycobacterium bovis*, ya sea por inhibición de la transducción de señales o competencia directa por el TLR2 (Flynn & Mulcahy, 2008). Este efecto está parcialmente asociado con la presencia de residuos glucídicos, ya que al eliminarlos se compromete la activación de los macrófagos. Otro experimento indicaría que los receptores de manosa también podrían estar involucrados en la activación alternativa de los macrófagos (Guasconi et al., 2011). Se ha visto que componentes glicosilados parasitarios podrían también estar modulando la supresión de respuestas inflamatorias mediadas por células dendríticas, y hay pruebas indirectas de que el mecanismo es dependiente de receptores de tipo lectina (Rodríguez et al., 2015).

1.2.2 Contribución de eosinófilos y macrófagos

Los mecanismos efectores estimulados luego de la infección incluyen una rápida y pronunciada eosinofilia (característica de la mayoría de las infecciones por helmintos) y activación de macrófagos. En bovinos, se ha encontrado un elevado conteo de eosinófilos desde la cuarta semana y persistencia hasta la semana 16 p.i (Flynn et al. 2010), mientras que en ovinos se demostró la presencia bifásica de eosinofilia ocurriendo en la semana 4 post-infección y nuevamente en la semana 9-10 (Zhang et al., 2005). En este contexto, se ha demostrado que los PES de *F. hepatica* inducen apoptosis en eosinófilos de ratas en un proceso dependiente de la dosis y el tiempo de exposición (Serradell et al., 2007) . Asimismo, a través de métodos inmunohistoquímicos utilizando un anticuerpo anti-caspasa 3⁺ y microscopía electrónica se observaron eosinófilos apoptóticos en las lesiones hepáticas e infiltrado alrededor de los canalículos de ovejas infectadas con *F. hepatica* (Escamilla et al., 2015).

Ha tenido creciente aceptación que la activación alternativa de los macrófagos durante la infección por helmintos tendría un rol central para comprender la respuesta frente a ellos. Los macrófagos alternativamente activados (AAMφ) se caracterizan por una elevada actividad arginasa 1 y expresión de IL-10 sumado a bajos niveles de producción de óxido nítrico. Las

funciones de estas células no están totalmente claras, sin embargo, se cree que están implicadas en la diferenciación de los linfocitos Th₂ o que podrían actuar como un tipo celular supresor de la producción de citoquinas pro-inflamatorias y por lo tanto de la respuesta Th₁, dado su elevada expresión de IL-10 (Sica & Mantovani, 2012). Se ha demostrado que la infección por *F. hepatica* es capaz de generar AAMφ tanto *in vitro* (Donnelly et al., 2005) como *in vivo* (Flynn et al., 2007). Por otro lado, existe una fuerte correlación entre la presencia de AAMφ con la capacidad de supresión y susceptibilidad a una infección secundaria (Flynn & Mulcahy, 2008). La evidencia de su rol en iniciar la diferenciación a células Th₂ proviene de un estudio donde se utilizaron macrófagos activados por *F. hepatica* para estimular un perfil de secreción de citoquinas Th₂ en células T vírgenes estimuladas a través del CD3 (Donnelly et al., 2008). Otros estudios indican que los macrófagos activados de forma alternativa están asociados con una respuesta de memoria protectora, fibrosis e inmunopatología (revisado Flynn et al., 2010). Adicionalmente, se demostró la elevada proporción de macrófagos apoptóticos peritoneales en ovejas experimentalmente infectadas con *F. hepatica* a partir del 1^{er} día post-infección, lo que sugiere que *F. hepatica* induciría la muerte en éstas células, al igual que en eosinófilos y otros leucocitos como mecanismo de evasión/supresión de la respuesta inmune del hospedador (Escamilla et al., 2017).

1.2.3 Respuesta inmune mediada por anticuerpos

Luego de 4 semanas p.i en rumiantes se desarrolla una respuesta adaptativa mediada por células B con la generación de anticuerpos específicos contra antígenos del parásito. Varios estudios han mostrado que IgG₁ es la subclase dominante en bovinos tanto en la primo infección como la reinfección (Bossart et al. 2000; Clery et al. 1996; Flynn et al. 2009) y esta subclase predominante también ha sido encontrada en ovinos (Raadsma et al., 2007). En un modelo murino de infección experimental se demostró que la respuesta humoral predominante tanto en las cepas BALB/c como en C57BL/6 viene dada por la subclase IgG₁.

Como es típico de las respuestas Th₂ la generación de anticuerpos IgG₁ viene mediada por IL-4 (O'Neill et al., 2000).

En definitiva, la cronicidad de la infección con *F. hepatica* está asociada con el desarrollo de una respuesta Th₂ superpuesta a una respuesta reguladora a medida que la infección se establece comprometiendo la capacidad en desarrollar lo que sería una respuesta Th₁ protectora. Como efecto colateral, esta inmunomodulación dependiente del parásito no le permitiría al hospedador desarrollar una respuesta apropiada frente a infecciones bacterianas dejándolo expuesto a una variedad de enfermedades (revisado en Cwiklinski et al., 2016).

1.3 Control de la infección por *F. hepatica*

En Uruguay, las zonas con mayor prevalencia de la infección en el ganado bovino y ovino se encuentran asociadas a zonas bajas y mal drenadas, propicias para el desarrollo del ciclo biológico del parásito (Nari & Cardozo, 1976). A su vez, la velocidad de desarrollo de los huevos del parásito, de las cercarias emitidas por el caracol y la viabilidad de las metacercarias enquistadas en las pasturas se encuentran afectadas por las condiciones de temperatura y humedad. El drenado de zonas bajas, la forestación y la utilización de agentes químicos molusquicidas constituyen medidas de control del hospedador intermediario ensayadas de forma poco sistemática. En la actualidad, la forma de control más extendida se basa en el uso de fármacos anti-parasitarios.

1.3.1 Drogas fasciolicidas

Existen drogas antihelmínticas altamente eficaces como el Triclabendazol (TCBZ), Closantel, Nitroxinil, Oxiclozanida, Diamfenetida y Clorsulon (Kelley et al., 2016). Todas las drogas eliminan eficientemente el parásito en etapas tardías de su desarrollo. Sin embargo, en esta etapa ya se ha producido el daño hepático y el consecuente debilitamiento de la salud del

hospedador. El TCBZ, es la droga de elección para el tratamiento de animales de producción y se ha comenzado a utilizar con éxito en casos de fasciolosis humana (Villegas et al., 2012). Se trata de la única droga que tiene actividad contra las formas inmaduras del parásito (**Figura 6**), en especial contra la forma migratoria que produce los daños más significativos a nivel hepático. Dentro de los mecanismos de acción del TCBZ se encuentran la unión a la β -tubulina afectando los procesos que involucran microtúbulos, lesiones del tegumento, disminución metabólica, reducción de la síntesis proteica y alteraciones del citoesqueleto (Kelley et al., 2016).

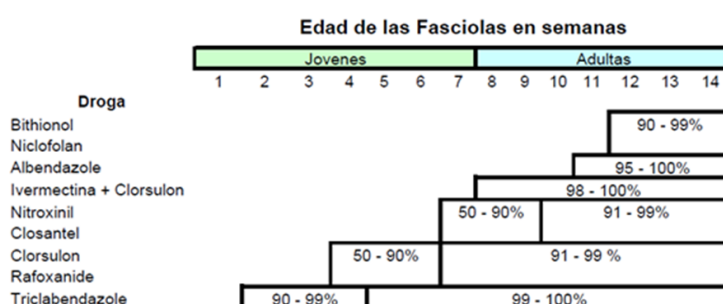


Figura 6: Antihelmínticos y su espectro de acción contra *F. hepatica* (Riet-Correia et al., 2001)

1.3.2 Resistencia frente al TCBZ

En las últimas décadas se ha detectado la creciente aparición de resistencia a ésta droga tanto en bovinos como ovinos. Se han reportaron casos en el Irlanda, Escocia, Gales, Australia, Nueva Zelanda, Perú y Argentina y más recientemente, se han reportado casos de resistencia en humanos (revisado en Kelley et al., 2016).

El escaso conocimiento del ciclo de vida del parásito por parte de los productores, la incorrecta administración del fármaco y la falta de seguimiento de la eficacia del tratamiento contribuyen a la aparición de la resistencia al TCBZ. En este contexto, es indispensable el desarrollo de nuevas estrategias de control de la fasciolosis, ya sea a través de la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos como es el caso reciente de la evaluación de los compuestos con

actividad antihelmíntica Curcumina y Timoquinona descritos para *F. gigantica* (Ullah et al., 2017) o a través del desarrollo de vacunas profilácticas o terapéuticas (Kelley et al., 2016).

1.4 Antecedentes de vacunas contra *F. hepatica*

La vacunación tiene como objetivo proteger a los organismos de la infección por medio del desarrollo de una respuesta inmune inducida por la inoculación de organismos atenuados, fracciones de dichos parásitos o componentes específicos en forma de proteínas o ADN. El criterio para el desarrollo de una vacuna veterinaria eficaz varía dependiendo del grupo de especies a ser considerado. En el caso de las vacunas desarrolladas para las especies productivas el objetivo de la vacunación es fundamentalmente la reducción del impacto negativo en la producción por parte de la infección manteniendo un balance costo-beneficio. Las vacunas veterinarias comprenden aproximadamente el 23% del mercado global de los productos para la salud animal, habiendo tenido un crecimiento consistente debido al desarrollo de avances tecnológicos para el desarrollo de vacunas, la continua aparición de resistencia y la aparición de nuevas enfermedades. Adicionalmente, el desarrollo de vacunas veterinarias tienen impacto sobre la Salud Pública a través de la reducción del uso de productos farmacéuticos, lo cual limita la cantidad de residuos farmacológicos que llega al consumidor (Meeusen et al., 2007). Las dificultades inherentes en el desarrollo de vacunas contra helmintos parásitos está demostrada por el muy escaso número de vacunas efectivas disponibles comercialmente (Vercruysse et al., 2004). En el caso de las infecciones parasitarias, generalmente crónicas, la utilización de organismos vivos o atenuados para la inmunización no sería una opción viable debido a la capacidad del parásito de inducir una respuesta modulada en el hospedador re-direccionando la misma a su favor (Turner et al., 2016).

Lang, 1967, 1974; Lang & Dronen, 1972 llevaron a cabo los primeros experimentos de inmunización homóloga en un modelo de infección experimental en ratones a modo de determinar el desarrollo de resistencia a la infección con *F. hepatica* mediante una infección

primaria o una infección primaria y una secundaria seguida del desafío. Posteriormente, los mismos autores utilizaron distintos modelos animales que incluían bovinos, ratas y ratones, todos ellos con distinta susceptibilidad para adquirir la infección. Los resultados indicaron que en estos modelos había un elevado porcentaje de resistencia al desafío (ratas 77%, ratones 67% y bovinos 56%). En cambio, cuando utilizaron conejos y ovejas, se observó mayor susceptibilidad a la infección, con bajos niveles de resistencia a la re-infección (Lang., 1976; Lang & Hall, 1977).

Más adelante, los ensayos de vacunación llevados a cabo con metacercarias atenuadas por irradiación o drogas, extractos somáticos o PES de adulto demostraron la posibilidad de inducir inmunidad protectora pese a los bajos niveles de protección obtenidos. Sin embargo, se lograron niveles significativos de protección en bovinos no expuestos a través de la transferencia de suero de animales infectados y además se lograron niveles significativos de protección utilizando PES de gusanos inmaduros en ratas y ratones (revisado en Haroun & Hillyer, 1986).

En ovinos, que presentan elevada susceptibilidad a la infección, se llevaron a cabo ensayos de infección homóloga primaria (Sinclair, 1962, Boray, 1967; Rushton, 1977; Knight, 1980; Sandeman & Howell, 1981), vacunación con metacercarias irradiadas (Boray, 1967; Armour et al., 1974; Campbell et al., 1978), o con extractos del parásito ya sea somático (Ross, 1967) o PES de gusanos adultos (Sandeman et al., 1980). En ninguno de los casos se reportaron niveles significativos de protección.

A partir de los años 80 se realizaron los primeros ensayos de vacunación que emplearon proteínas purificadas a partir de extractos parasitarios. Estas fueron las proteínas de unión a ácidos grasos o FABPs (por *fatty acid binding protein*) reconocidas por su potencial protector contra *S. mansoni*. La misma fracción purificada a partir en *F. hepatica* fue capaz de reducir la carga parasitaria en un 78% en ratones y un 55% en terneros luego del desafío con metacercarias (Hillyer, 1987, 1985). Posteriormente, la fracción llamada *Fh12n* redujo la carga

parasitaria en conejos en un 40% (Muro et al., 1997). Al aumentar a 20 semanas el período entre la primera inmunización y el refuerzo se obtuvo una reducción de 76% en el mismo modelo con *Fh12n* (Casanueva et al., 2001). A continuación, se introdujo nuevo sistema de vacunación (sistema ADAD), utilizando primero la inmunización subcutánea con una micela que contiene *Quillaja saponaria*, un extracto hidroalcohólico de *Polipodium leucotomos* (Anaspos) emulsificado con el aceite no mineral Montadine (período de adaptación) (Martínez-Fernández et al., 2004). En la segunda inmunización la micela contiene los mismos componentes y además el antígeno nativo (*Fh12n*). Como resultado del uso de este sistema adyuvante se obtuvieron reducciones significativas en los huevos recuperados en la vesícula biliar y heces (58.1% y 40.3% respectivamente), y una reducción en la carga parasitaria en el hígado respecto del control (24.5%). La *Fh12n* purificada a partir de adultos de *F. hepatica*, formulada con el sistema ADAD y el agregado de un inmunomodulador indujo niveles altos de protección en ensayos experimentales con roedores, mientras que en ovinos se observó una marcada reducción de parásitos recuperados en la necropsia (43%), daño hepático y aumento de peso post-infección (López-Abán et al., 2008).

Las enzimas antioxidantes y detoxificantes han sido otro grupo de moléculas ensayadas como vacunas contra la fasciolosis. Dentro de este grupo se han estudiado las Glutación S-transferasas (GSTs), la proxirredoxina (*FhPrx*) y la tiorredoxina glutatión reductasa (*FhTGR*).

Las GSTs son un grupo de isoenzimas involucradas en la detoxificación de una variedad de sustratos. Las GSTs de *F. hepatica* fueron elegidas en base al potencial protector observado en animales de laboratorio con las GSTs de *S. mansoni* y *S. japonicum*. El primer ensayo que mostró su capacidad protectora (57%) se llevó a cabo en ovinos por Sexton et al. (1994). Luego se realizaron experimentos de inmunización con múltiples adyuvantes en rumiantes empleando una fracción de GST nativa, que mostraron una reducción de la carga parasitaria de 57% y 69% en ovinos y bovinos, respectivamente (Spithill & Dalton 1998). Sin embargo, no se encontró correlación entre niveles de anticuerpos y protección (Morrison et al., 1996).

Adicionalmente, se han llevado a cabo ensayos de vacunación utilizando una GST de la clase Sigma recombinante (*FhGST-S1r*) en cabras, con resultados poco alentadores (Zafra et al., 2013).

Otra de las enzimas antioxidantes estudiadas como antígenos vaccinales se encuentra la *FhPrx*. La *FhPrx* recombinante es capaz de metabolizar el peróxido de hidrógeno previniendo el estrés celular (Sekiya et al., 2006). Su función durante la infección estaría relacionada con la protección frente a las especies reactivas del oxígeno (EROs) provenientes de procesos metabólicos y de las células efectoras del sistema inmune del hospedador. Como se mencionó anteriormente, la *FhPrx* también se encuentra asociada a la activación alternativa en macrófagos en el modelo murino (Donnelly et al., 2008). En un ensayo llevado a cabo en cabras con la forma recombinante formulada con Quil A no se obtuvo un porcentaje de protección significativo. Sin embargo, se observó menor daño hepático y reducción de la infiltración por células del sistema inmune (Mendes et al., 2010).

La *FhTGR*, es una selenoproteína que se encuentra involucrada en la homeostasis redox del parásito habiéndose demostrado que su inhibición compromete severamente la sobrevivencia del JRD. La *FhTGR* recombinante funcional mezclada con adyuvante de Freund indujo una disminución de casi el 100% en la carga parasitaria en conejos infectados experimentalmente (Maggioli et al. 2011). Sin embargo, la inoculación en bovinos asociada a distintos adyuvantes, fue incapaz de generar niveles significativos de protección (Maggioli et al., 2016).

1.5 Las enzimas proteolíticas de *F. hepatica* y su potencial como antígenos vacunales

El primer experimento de vacunación donde se emplearon las cistein proteasas purificadas a partir del PES de adulto fue realizado en bovinos obteniéndose niveles de protección significativos que llegaron al 69% (Wijffels et al., 1994). A partir de la caracterización y purificación de *FhCL1* y *FhCL2* como las principales proteasas secretadas por los adultos, se

inició su valoración como vacunas ya sea solas o combinadas entre ellas y con proteínas del parásito. La inmunización con una mezcla de *FhCL1* y hemoglobina del parásito (Hb) generó una reducción de parásitos adultos del 52% (Dalton et al., 1996). En ovinos, la inmunización con *FhCL1* y *FhCL2* por separado mostró una reducción de la carga parasitaria del 33% y 34%, sin embargo, la inoculación de ambas proteasas en forma combinada generó una reducción del número de parásitos del 60%, lo que sugiere su efecto sinérgico (Piacenza et al., 1998).

Las catepsinas B propias de las formas inmaduras del parásito han sido notoriamente menos exploradas como antígenos vacunales. En el único experimento publicado donde se analiza la capacidad protectora de una catepsina B (*FhCB2*), los autores la emplean en ratas en combinación con las *FhCL1* y *FhCL5* secretadas por los adultos, reportando una protección máxima del 83% en el grupo inoculado con la mezcla de *FhB2* y *FhCL5* (Jayaraj et al., 2009).

1.5.1 La *FhLAP* como vacuna contra la fasciolosis

Otras de las proteasas evaluadas en estudios de inmunoprotección en rumiantes ha sido la *FhLAP*. Cuando la enzima nativa fue inoculada en ovejas sola o en combinación con la mezcla *FhCL1/FhCL2*, se obtuvieron reducciones en el número de gusanos en el hígado del 89% y 78%, respectivamente. En ambos casos el daño hepático provocado por los parásitos fue mínimo, de acuerdo a los niveles del marcador de daño γ -glutamyl transferasa. Este resultado indicaría que las formulaciones utilizadas tienen un impacto negativo en el desarrollo de los estadios juveniles del parásito. Por otra parte, en ensayos de inhibición enzimática se observó una disminución de la actividad de la enzima al incubarla con anticuerpos IgG provenientes de ovinos inmunizados, pero no de ovinos del grupo control (Piacenza et al., 1998). Posteriormente, la enzima fue clonada y expresada en *E. coli* como proteína de fusión con la Tiorredoxina de la bacteria (*FhLAP-Trxr*) con un peso molecular aparente estimado en ~ 58 KDa. El estudio de su secuencia muestra que está estrechamente relacionada con la LAP descrita para *S. mansoni* y alejada de los homólogos en mamíferos. Esta pobre similitud y la

ausencia de sitios de glicosilación la posicionan como candidato vacunal contra la fasciolosis (Acosta et al., 2008). En función de estos antecedentes, nuestro grupo de trabajo llevó a cabo un experimento donde se comprobó la capacidad inmunoprotectora de la *FhLAP-Trxr* administrada con distintos adyuvantes en el modelo de infección ovino, obteniéndose los niveles más elevados de protección para un antígeno recombinante hasta el momento (87% formulado con $\text{Al}(\text{OH})_3$, 83% con Adyuvante Completo /Incompleto de Freund, 74% con Adyuvac 50, 51% con DEAE-D y 50% con Ribi (Maggioli et al., 2011). En el grupo Adyuvac 50 se obtuvieron niveles significativamente elevados de anticuerpos anti-*FhLAP-Trxr* a partir de la cuarta semana, llegando a un máximo en la semana del desafío. Sin embargo, en el grupo $\text{Al}(\text{OH})_3$ los niveles de anticuerpos en esta semana son de un orden inferior a los obtenidos con Adyuvac 50. Sorprendentemente, los porcentajes de reducción parasitaria fueron mayores con $\text{Al}(\text{OH})_3$ que con Adyuvac 50. Al analizar los niveles de subclases IgG_1 e IgG_2 a lo largo de las semanas se observó una respuesta mixta, con una leve predominancia de IgG_1 sobre IgG_2 . Existe, además, correlación inversa significativa entre los niveles de anticuerpos IgG , IgG_1 e IgG_2 presentes al momento de la infección y la carga parasitaria hepática *post-mortem*.

En función de estos resultados obtenidos con la *FhLAPr* recombinante, se procedió a realizar un segundo ensayo de vacunación en ovinos utilizando una vacuna con el antígeno *FhLAP-Trxr* formulado con Adyuvac 50 en dos esquemas de vacunación. El primer esquema tuvo como objetivo reproducir los resultados del ensayo anteriormente descrito y consistió en una inmunización en la semana 0, seguido de un refuerzo en la semana 4 y el desafío oral con metacercarias en la semana 6. El segundo esquema consistió en una inmunización, seguido de dos refuerzos, el primero en la semana 4 y el segundo en la semana 8 con el desafío en la semana 10.

Los resultados obtenidos en cuanto a la carga parasitaria mostraron que el esquema de un refuerzo induce altos porcentajes de reducción significativa de la carga parasitaria (75 %), mientras que el esquema de dos refuerzos no se observa una fuerte caída en la protección

registrándose una reducción no significativa del 25% de los gusanos recuperados al final del ensayo respecto del control (datos sin publicar).

Si bien la inmunización con la *Fh*LAP-Trx mostró niveles de protección alentadores frente a la infección experimental en ovinos, éstos resultados no han podido replicarse en el modelo bovino, la especie con mayor relevancia desde el punto de vista económico. Por tal motivo, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para la generación de una respuesta inmune protectora contra *F. hepatica* en bovinos, ya sea a partir de la búsqueda de nuevos adyuvantes o nuevos candidatos vacunales acompañados de las herramientas disponibles para el diseño racional de vacunas.

1.6 Nuevos abordajes para el diseño y producción de vacunas: utilización de oligómeros como transportadores de proteínas y péptidos antigénicos

En los últimos años han utilizado distintas herramientas biotecnológicas para la mejora en la eficacia de las formulaciones vacunales. Se ha demostrado la capacidad de inducir una respuesta inmune efectiva contra pequeños péptidos cuando los mismos son fusionados a determinadas proteínas multiméricas. Este tipo de construcciones utilizan proteínas oligoméricas cuya principal característica es el nivel elevado de estabilidad en su estructura cuaternaria luego de la fusión de las mismas con proteínas o péptidos foráneos. A su vez, la repetitividad y el grado de organización de los antígenos expuestos en la superficie de los mismos permite la inducción eficiente de una respuesta humoral, posiblemente por la fuerte señalización inducida en las células B a través del BCR por parte de los epítopes repetidos (Berguer et al., 2006). Tal es el caso de la lumazina sintetasa de *Brucella* (BLS), una proteína decamérica con extraordinarias propiedades inmunogénicas, la cual ha sido utilizada como proteína transportadora de distintos péptidos (Alfano et al., 2015; Cassataro et al., 2007; Du & Wang, 2015; Hiriart et al., 2017; Mejías et al., 2014; Mejías et al., 2013; Rossi et al., 2015). El elevado grado de orden molecular e inmunogenicidad de la BLS presenta características

similares a la subunidad B de la toxina de cólera (TC) y a la Toxina termo-lábil de *E. coli* (TL). Tanto la TC como la TL han sido utilizadas como proteínas transportadoras de proteínas y péptidos antigénicos en distintos modelos experimentales de vacunación vía mucosas. (Nozoye et al., 2009; Price & Holmes, 2012, 2014; Song et al., 2004). Se han evaluado diferentes formulaciones en modelos experimentales de infección con helmintos utilizando este tipo de abordaje. La inmunización oral con el péptido GK-1 fusionado con la BLS mostró protección frente al desafío con *Taenia crassiceps* en un modelo de infección murino (Rosas et al., 2006). Asimismo, la administración oral del péptido KETc-1 acoplado con BLS resultó protectora contra *Taenia solium* en un modelo de infección en hámster (Cruz-Revilla et al., 2006).

Dado el conocimiento acumulado de las funciones de determinadas proteasas en el ciclo de vida de *F. hepatica* y en función de los altos niveles de protección inducidos por la forma hexamérica funcional recombinante de la *FhLAP* en ovinos, el presente trabajo plantea explorar la contribución de la estructura cuaternaria de la *FhLAP* a la inmunogenicidad a nivel sistémico y de mucosas. Asimismo, plantea determinar el potencial de la *FhLAP* de actuar como transportador multimérico de pequeños péptidos, en particular una región potencialmente inmunogénicas (RPI) de la *FhCL3*, una de las proteasas más relevantes durante el estadio JRD de *F. hepatica*. La finalidad de esta construcción es la generación de anticuerpos anti-RPI a través de su fusión con la *FhLAP*, de éste modo la *FhLAP* actuaría simultáneamente como inmunógeno y transportador de pequeños péptidos dirigiendo la respuesta inmune hacia la forma juvenil del parásito.

1.6.1 La Vacunología Reversa como herramienta para el diseño de vacunas

Para la mayoría de las ETDs no existen vacunas eficaces y ello es un reflejo de la escasa financiación en I+D para éstas enfermedades relacionadas en su mayoría con países de bajo recursos y en vías de desarrollo. Afortunadamente, los genomas de muchos de los agentes

causales de éstas enfermedades se encuentran disponibles y a partir de ello es posible aplicar las herramientas de la vacunología reversa.

La identificación de las regiones antigénicas de una proteína es uno de los componentes fundamentales de esta disciplina, así como para la producción de anticuerpos terapéuticos y la generación de nuevas herramientas de inmuno-diagnóstico. Teniendo en cuenta la estructura tridimensional de los antígenos; los epítopes B pueden clasificarse en lineales o discontinuos (conformacionales). A su vez, se cree que los determinantes antigénicos lineales son componentes estructurales de los epítopes conformacionales (Potocnakova et al., 2016). Los métodos tradicionales de mapeo de estas regiones antigénicas son en la mayoría de los casos, de costo elevado, laboriosos y de baja especificidad. El método definitivo de determinación de epítopes es la cristalografía de rayos X del complejo proteína-anticuerpo, el cual además de brindar información precisa sobre los residuos de aminoácidos involucrados de interacción, brinda información sobre la fuerza de unión del complejo. Debido a la creciente cantidad de información respecto a las regiones inmunogénicas de distintos antígenos surgió la necesidad de ordenar esta información para el acceso más fácil, de este modo surgió la base de datos IEDB (por *Immune Epitope Data Base*) (Fleri et al., 2017) y otras bases de datos como AntiJen, BciPep, Epitome y SDAP. Paralelamente, han surgido distintos algoritmos de predicción inmuno-informáticos que hacen uso de la información alojada en éstas bases de datos. Utilizando este tipo de estrategias, han surgido distintas formulaciones vacunales experimentales como es el caso de la vacuna multi-epítope de *E. granulosus* EgA31, la cual demostró la inducción de una fuerte respuesta Th₁ en ratones (Esmaelizad et al., 2013a, 2013b; Zhou et al., 2010). También se determinaron mediante métodos inmunoinformáticos los epítopes Sm141290 y Sm050890 como posibles candidatos para una vacuna contra *S. mansoni* (Oliveira et al., 2016) En el caso de *F. hepatica*, se evaluó el potencial inmunorpotector de diferentes péptidos correspondientes a las predicciones de 4 epitopes B y 3 epítopes T en ratones BALB/c, obteniéndose un porcentaje de supervivencia mayor tras el desafío con la

forma infectante con el péptido B2 (homólogo amebaporo) y T15 (*FhCB*) ambos péptidos formulados con el sistema adjuvante ADAD (Rojas-Caraballo et al., 2014). También se utilizó un epítoto predicho por un método bioinformático de *FhCL1* como proteína de fusión a una región relacionada con el dominio Pfam de la *FhLAP* y se evaluó como herramienta para el diagnóstico de la infección por *F. hepatica* en humanos (Hernández-Guzmán et al., 2014).

2 Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

Dada la naturaleza multimérica de la *FhLAPr* y de sus antecedentes inmunoprotectores postulamos que la *FhLAPr* en su forma hexamérica presenta mejor capacidad de estimular la respuesta humoral que la forma monomérica. En este contexto, podría actuar tanto como inmunógeno, como transportador de péptidos, y de esta forma mejorar la respuesta inmunoprotectora contra la infección con *F. hepatica*.

2.2 Objetivo general

Nos proponemos determinar la inmunogenicidad humoral de la *FhLAPr* multimérica en relación a la forma no funcional monomérica y a continuación construir y evaluar en forma piloto la capacidad protectora de una proteína quimérica de *FhLAPr* y una región potencialmente inmunogénica de la catepsina L3 de *F. hepatica*.

2.3 Objetivos específicos

1. Determinación de la inmunogenicidad de las formas monómero y hexámero de *FhLAPr*.

- a) Determinación de la respuesta humoral de la *FhLAPr* en su forma monomérica y hexamérica administrada vía sub-cutánea sola o en combinación con el adyuvante Adyuvac 50 en ratones BALB/c
- b) Determinación de la respuesta humoral inducida por las formas monomérica y hexamérica administradas por vía intranasal solas o en combinación con la subunidad B de Toxina de Cólera como adyuvante en ratones C57BL/6.

2. Evaluación del potencial transportador de *FhLAPr* de un péptido inmunogénico de *FhCL3* madura.

- a) Identificación de las regiones potencialmente inmunogénicas (RPIs) de *mFhCL3* a través del uso de herramientas inmuno-informáticas de predicción de regiones asociadas a epítopes B y T.

- b) Producción de la proteína quimérica *FheCL3*-LAP en un sistema de expresión procariota.
- c) Evaluación de las propiedades inmuno-protectoras de *FheCL3*-LAP en comparación con las proteínas *FhLAPr* y *FhCL3r* en un modelo de infección en ratones BALB/c.

3 Materiales y Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Cepa bacteriana

Para la expresión de *FhLAPr* y *FheCL3-LAP* se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (New England BioLabs, USA).

3.1.2 Vector de Expresión

Para la expresión de la *FhLAPr* se amplificó la secuencia correspondiente con primers específicos (datos sin publicar) y se clonó entre los sitios Bam H I y Sal I del vector pET28a (+) (Novagen, USA). Para la expresión de *FheCL3-LAP* se sintetizó la secuencia codificante de la proteína de fusión y se clonó entre los sitios Nde I y Bam H I del vector pET28a (+) (Genscript, USA).

3.1.3 Péptido

Se realizó la síntesis del péptido $\text{NH}_2\text{-SGLETASDYPYQGWEYQCQYRKELGV-COOH}$ correspondiente a la RPI de la *FhCL3* madura (Genscript, USA).

3.1.4 Medios de cultivos

El medio de cultivo de bacterias utilizado fue Luria-Bertani (LB) descrito en Sambroock et al (1989). Para el cultivo de bacterias transformadas con el vector de expresión pET28a (+)-*FhLAPr* y pET28a (+)-*FheCL3-LAPr* LB se añadió Sulfato de Kanamicina (Kan) (Sigma-Aldrich, # 60615) en una concentración final de 50 µg/ml.

Para la extensión de bacterias en medio sólido se añadió al medio LB 1.5% (p/v) de Agar Bacteriológico (Sigma-Aldrich, # A5306).

Se utilizó el medio SOC, compuesto por Triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM para la recuperación de las bacterias *E. coli* transformadas.

3.1.5 Matriz Cromatográfica

Para la purificación de la *FhLAPr* y la *FheCL3-LAP* se utilizó la resina para cromatografía de afinidad al Ni²⁺ Sepharose Chelating Fast Flow (GE, Healthcare # 17057501), la cual fue cargada con 400 mM de Sulfato de Níquel hexahidratado (Sigma-Aldrich, # N4882).

3.1.6 Agente entrecruzante de proteínas

Para la reacción de entrecruzamiento de proteínas se preparó inmediatamente antes de su uso una solución del agente Dimetil Suberimidato (Aldrich, # 179523) en una concentración de 5 mg/ml diluido en tampón Trietanolamina (Sigma, # T 1377) 0.2 M, pH 8.5.

3.1.7 Sustratos flurogénicos

Para determinar la actividad enzimática se utilizó el sustrato Leucina acoplado a 7-amino, 4-metil cumarina (Leu-AMC) (Bachem, # I-1245) en un stock de concentración 10 mM disuelto en dimetilformamida mantenido a -20 °C. Para la determinación de la actividad enzimática específica, se utilizó una curva de calibración con AMC (Bachem, # Q-1025) en un rango de 0-100 nM.

3.1.8 Adyuvantes

Para la formulación de los antígenos en el ensayo de inmunización subcutánea se utilizó el adyuvante Adyuvac 50 (cedido gentilmente por Laboratorios VIRBAC-Santa Elena, Montevideo) emulsionado al 50% (v/v) con el antígeno en solución salina. Se trata de un adyuvante aprobado para su uso veterinario en nuestro país. Para los ensayos de inmunización intranasal, se utilizó como adyuvante la subunidad B de la toxina de *Vibrio cholerae* (Sigma-Aldrich, # C9903).

3.1.9 Sustratos cromogénicos de peroxidasa

Solución de o-fenilendiamina (OPD) (Sigma, # P9029) en una concentración final de 0.4 mg/ml en un tampón fosfato-citrato 0.05 M, pH 5. Al momento de usar se agregó 0.012% de H₂O₂ al 30%.

Solución de 4-cloro, 1-naftol (Sigma-Aldrich, # C6788). Se disolvió una tableta en 10 ml de metanol. 2 ml de esta solución se disolvieron en 10 ml de tampón Trietanolamina 20 mM, pH 7.5. Al momento de usar se agregó 0.015% de H₂O₂ al 30%.

3.1.10 Animales de Experimentación

Los ensayos de inmunogenicidad se llevaron a cabo en ratones hembra de la cepa BALB/c y C57BL/6 y el ensayo de inmunoprotección se llevó a cabo en ratones de la cepa BALB/c. Los mismos fueron provistos por de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) “Miguel C. Rubino”. Los animales fueron alojados en el bioterio del Instituto de Higiene en condiciones de temperatura y humedad controladas con un ciclo día/noche de 12 hrs. El agua y el alimento fueron provistos *ad libitum*.

La producción de suero hiper-inmue anti-*FheCL3*-LAP se llevó a cabo en un conejo hembra New Zeland de 3 meses de edad, alojado en el campo Experimental del Instituto de Higiene. El agua y alimento fueron provistos *ad libitum*.

3.1.11 Anestésico

Isoflurano (Terrel, Laboratorio Libra-Uruguay) al 5% en Propilenglicol administrado en cámara cerrada.

3.1.12 Material infeccioso

Las metacercarias de *F. hepatica* fueron provistas gentilmente de la Bch. Sabina Wlodek del Depto. de Genética de Facultad de Medicina.

3.1.13 *FhCL3* recombinante y suero hiper-inmune anti-*FhCL3r*

La *FhCL3r* y el suero policlonal anti-*FhCL3r* fueron gentilmente cedidos por la Dra. Ileana Corvo del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Moléculas Bioactivas, PDU-Paysandú y expresada según el método descrito en Corvo et al. (2009).

3.1.14 Anticuerpos conjugados

Para la evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-*FhLAPr* se utilizó el anticuerpo anti-IgG de ratón, Fab específico conjugado a la peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, # M6898). Para la evaluación de las subclases de ratón se utilizaron los anticuerpos anti-IgG₁ y anti-IgG_{2a} conjugadas a biotina (Biolegend, # 406603 y # 407103) y para la evaluación de la respuesta anti-IgA, se utilizó el anticuerpo anti-IgA de ratón conjugado a biotina (Biolegend, # 407003).

La reacción antígeno-anticuerpo fue revelada con estreptavidina unida a peroxidasa (Biolegend, # 405210).

Para determinación de los niveles de anticuerpos anti-*FheCL3*-LAP en conejo se utilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (# A0545, Sigma).

3.1.15 Otros materiales

Peso molecular para SDS-PAGE 11-245 KDa (AccuRuler RGB Plus-Maestrogen, # 02102-250).

3.2 Métodos

3.2.1 Evaluación de la inmunogenicidad sistémica inducida por *FhLAPr* en su conformación monómero y hexámero en ratones BALB/c

A modo de determinar la capacidad de *FhLAPr* de inducir una respuesta inmune humoral en sus formas monómero (*mFhLAPr*) y hexámero (*hFhLAPr*), se llevó a cabo la expresión y purificación de la proteína recombinante en *E. coli*. A continuación, se determinaron las condiciones de la generación de las formas *mFhLAPr* y *hFhLAPr* y se determinó el perfil inmunogénico inducido por ambas formas en ratones de la cepa BALB/c. Todas las actividades que involucraron la experimentación con animales fueron llevadas a cabo utilizando pautas de bioseguridad y bienestar animal. Los protocolos fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA).

3.2.1.1 Producción y purificación del antígeno *FhLAPr*

La región codificante de *FhLAPr* fue clonada en un plásmido pET28a (+) entre los sitios Bam H I y Sal I y transformado en células competentes de *E. coli* BL21(DE3). A partir del stock de bacterias productoras de *FhLAPr* gentilmente cedidas por la Dra. Gabriela Maggioli, se realizó el extendido en placa de LB/Agar conteniendo Kan en una concentración final de 50 µg/ml y se incubó a 37 °C durante toda la noche. Una colonia aislada se cultivó en un medio LB/Kan (50

µg/ml) a 37 °C durante toda la noche en agitación constante a 200 rpm. El mismo se inoculó en 1 Lt de medio de cultivo LB/Kan en una relación aproximada 1:100 y se dejó en agitación constante a 28 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de aprox. 0,8. En este momento se bajó la temperatura a 25 °C y se indujo la producción de la proteína *FhLAPr* mediante el agregado de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en una concentración final 0,4 mM. El cultivo se incubó a 200 rpm durante toda la noche. Las bacterias se recolectaron mediante centrifugación a 7.000 rpm durante 10 min a 4 °C y el pellet bacteriano se resuspendió en un tampón de lisis conteniendo Tris 50 mM, NaCl 100 mM, Imidazol 5 mM, pH 8,5. La suspensión bacteriana se incubó con 1 µg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich, # L2879) durante 30 min a temperatura ambiente (TA) y a continuación se realizó un ciclo de sonicación en baño de hielo de 5 pulsos de 30 seg a una amplitud de 40% con 1 min de descanso en un Homogeneizador de Ultrasonido (Cole Parmer 4710). La suspensión se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 min y a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante (SND) conteniendo la *FhLAPr* para su posterior purificación a través una cromatografía de afinidad al Ni^{2+} con la matriz Sepharose Chelating Fast Flow. El SND conteniendo la *FhLAPr* fue aplicado a la columna previamente equilibrada con el tampón Tris 50 mM, NaCl 100 mM, Imidazol, 5 mM, pH 8,5. Tras el lavado de la columna con aproximadamente 10 volúmenes del mismo tampón, la *FhLAPr* fue eluída de la matriz utilizando concentraciones crecientes de Imidazol (50 a 400 mM). Se realizó una electroforesis SDS-PAGE 10% a modo de determinar la fracción con mayor recuperación de la proteína recombinante. Dicha fracción se dializó durante toda la noche contra un tampón Tris 50 mM pH 8,5. A continuación, la fracción fue concentrada y lavada con PBS utilizando una unidad de ultrafiltración 30 KDa (#UFC903008 Amicon, Millipore) y se realizó la cuantificación de la proteína con el método del ácido bicinónico.

3.2.1.2 Obtención de la forma monómero y hexámero de *FhLAPr*

A modo de determinar el grado de oligomerización de la *FhLAPr* tras la purificación, la misma fue sometida a una reacción de entrecruzamiento con el agente DMS según el método descrito

por Davies & Stark, 1970 con modificaciones. A su vez, se evaluó el rol de los iones divalentes Mn^{2+} , Zn^{2+} y Mg^{2+} en la generación y estabilización de la estructura cuaternaria de la *FhLAPr*. Con la finalidad de visualizar la influencia de la adición de los mencionados iones divalentes, la *FhLAPr* fue lavada y concentrada (0,20 mg/ml) en un tampón trietanolamina 0,2 M, pH 8,5 con una membrana de corte de 30 KDa y pre-incubada durante 15 min a 37 °C con las distintas soluciones de $MnCl_2$, $ZnCl_2$ y $MgCl_2$ (0 a 50 mM). A continuación, las muestras fueron incubadas con una concentración final de 1.0 mg/ml de DMS durante 2 hrs a 37 °C. La reacción se detuvo con el agregado de un tampón de muestra conteniendo una proporción final de SDS del 1% y β -mercaptoetanol 1%. Posteriormente, las muestras se incubaron a 100 °C durante 3 min a modo de disgregar cualquier interacción no covalente y fueron sometidas a una electroforesis SDS-PAGE al 10%.

La forma monómera del antígeno se obtuvo mediante el procedimiento de desnaturalización térmica. La *FhLAPr* en tampón Trietanolamina 0.2 M, pH 8,5 (0.2 mg/ml) fue incubada en un baño a 100 °C durante 2, 10, 20 y 30 min. Inmediatamente las muestras fueron incubadas con el agente DMS (1 mg/ml) durante 1 hr a 37 °C y la reacción de amidación se detuvo con el agregado de tampón de muestra conteniendo una proporción final de SDS al 1 % y β -mercaptoetanol 1%. Las muestras se hirvieron durante 3 min y fueron sometidas a una electroforesis SDS-PAGE 4-12.5%.

3.2.1.3 Evaluación de la actividad enzimática de *FhLAPr*

Se realizó la evaluación de los cambios de la actividad enzimática de la *FhLAPr* utilizando aproximadamente 125 ng de la proteasa recombinante con una concentración final de 250 μ M del sustrato fluorogénico Leu-AMC. La reacción se llevó a cabo en tampón Tris 50 mM pH 8,5 durante 1 hr a 37 °C, luego de pre-incubar las muestras de *FhLAPr* y controles con cantidades crecientes de $MnCl_2$, $ZnCl_2$ y $MgCl_2$ (0-50 mM) durante 15 min a 37 °C. Asimismo, a modo de evaluar los cambios en la actividad enzimática tras el tratamiento térmico, se utilizaron

igualmente 125 ng de *Fh*LAPr con 250 μ M del sustrato fluorogénico Leu-AMC durante 1 hr a 37 °C. Los resultados se expresaron en Unidades de Fluorescencia (UF) en función del tratamiento recibido.

3.2.1.4 Evaluación de la inmunogenicidad del monómero y hexámero de *Fh*LAPr en ratones de la cepa BALB/c

A modo de determinar la capacidad de inducción de la respuesta humoral a nivel sistémico de *Fh*LAPr en sus formas *mFh*LAPr y *hFh*LAPr, se llevó a cabo un ensayo de inmunización en ratones de la cepa BALB/c. Los animales fueron distribuidos en 6 grupos de 6 animales cada uno de la siguiente manera: *Grupo 1*: inmunizado con *hFh*LAPr en combinación con Adyuvac 50, *Grupo 2*: inmunizado con *hFh*LAPr en combinación con solución salina, *Grupo 3*: inmunizado con *mFh*LAPr en combinación con Adyuvac 50, *Grupo 4*: inmunizado con *mFh*LAPr en combinación con solución salina, *Grupo 5*: control Adyuvac 50 y *Grupo 6*: control PBS. Los animales inmunizados con el antígeno recibieron una cantidad de 25 μ g/dosis del antígeno en un volumen final de 100 μ l. Las dosis emulsionadas con las formas *hFh*LAPr y *mFh*LAPr fueron preparadas inmediatamente antes de su utilización. El control Adyuvac 50 recibió el adyuvante emulsionado en partes iguales de PBS estéril en un volumen final de 100 μ l. El control PBS recibió únicamente PBS estéril en un volumen final de 100 μ l. El esquema de inmunización utilizado consistió en una primo-inmunización, seguida de dos refuerzos en las semanas 4 y 8. Todas las dosis fueron administradas por vía subcutánea. Se recolectaron muestras de sangre de las semanas 0, 4, 6, 8 y 10 del ensayo. Los niveles de anticuerpos IgG, IgG₁ e IgG_{2a} específicos a lo largo de las semanas se evaluaron a través de la técnica de ELISA.

3.2.1.5 Determinación del nivel de anticuerpos IgG anti-*hFh*LAPr

Las placas para ELISA de 96 pocillos se sensibilizaron con una concentración de 4 μ g/ml de *Fh*LAPr en un volumen final de 100 μ l durante toda la noche a 4 °C. Luego se lavaron 3 veces con PBS-T 0,05% y se bloquearon con una solución de BSA 1% en PBS (volumen final 200 μ l) durante 1 hr a 37 °C. La dilución de trabajo fue previamente determinada a través de la

dilución seriada (desde 1:2.000 hasta 1:64.000) de los pools de sueros correspondientes a la semana 6 de cada grupo del ensayo tanto contra la forma *mFhLAPr* como *hFhLAPr*. Luego los sueros se incubaron individualmente durante 1 hr a 37 °C (dilución 1:10.000) en PBS-T 0,005%, BSA 0.1%. A continuación, las placas se incubaron con una dilución 1:10.000 del anticuerpo anti-IgG (Fab específico) de ratón conjugado a peroxidasa en BSA 0,1% en PBS-T 0,005% durante 1 hr a 37 °C. Finalmente, las placas fueron lavadas con PBS-T 0,05% y la reacción antígeno-anticuerpo se evidenció con el agregado de una solución conteniendo OPD y H₂O₂. Se incubó durante 15 min en oscuridad y se detuvo la reacción con el agregado de 50 µl de una solución de HCl 1M. La medición de la densidad óptica se realizó en un lector Lab System Multiskan MS de placas a 492 nm (D.O_{492nm}) y los resultados se expresaron como D.O_{492nm} en función de la semana.

3.2.1.6 Determinación del nivel de anticuerpos anti-*FhLAPr* de las subclases IgG₁ e IgG_{2a}

La sensibilización con *hFhLAPr* y bloqueo de las placas se realizó de igual manera que para la determinación de IgG total. Los sueros correspondientes cada semana del ensayo fueron incubados en una dilución 1:4.000 en BSA 0,1% en PBS-T 0,005% durante 1 hr a 37 °C tanto para la detección de IgG₁ como de IgG_{2a}. La dilución de trabajo fue previamente determinada mediante la dilución seriada (desde 1:100 hasta 1: 25.600) de los pools de sueros correspondientes a la semana 6 del ensayo. Luego del lavado con PBS-T 0,05%, las placas se incubaron toda la noche a 4 °C con una dilución 1:2000 de los conjugados anti-IgG₁ y anti-IgG_{2a} conjugados a biotina en BSA 0,1%, PBS 0,005%. A continuación, las placas se lavaron con PBS-T 0,5% y se incubaron durante 1 hr a 37 °C una dilución 1:500 de estreptavidina conjugada a peroxidasa. Finalmente, se evidenció la reacción antígeno-anticuerpo con el agregado de una solución conteniendo OPD y H₂O₂ durante 15 min en oscuridad. La reacción se detuvo con el agregado de 50 µl de HCl 1 M y se procedió a la lectura de la D.O_{492nm}. Los resultados se expresaron como D.O_{492nm} en función de las semanas del ensayo.

3.2.2 Evaluación de la inmunogenicidad por vía mucosa de las formas monómero y hexámero de la *Fh*LAPr en ratones de la cepa C57BL/6.

3.2.2.1 Producción y purificación del antígeno *Fh*LAPr

La producción y purificación de la *Fh*LAPr se realizó, según el método descrito anteriormente, al igual que la obtención de las formas *mFh*LAPr y *hFh*LAPr. Adicionalmente, se realizó una etapa de reducción de la concentración de endotoxinas utilizando una resina unida a Polimixina B. Las alícuotas se almacenaron a -80 °C alícuotas para su posterior utilización y cuantificación de endotoxinas.

3.2.2.2 1er ensayo de Inmunogenicidad a nivel de mucosas de la forma monómero y hexámero de *Fh*LAPr en ratones C57BL/6

A modo de determinar la capacidad de inducción de la respuesta humoral a nivel de mucosas la *Fh*LAPr en sus formas monómero y hexámero se administraron las mismas en combinación con la subunidad B de TC como adyuvante o con PBS. Se inmunizaron ratones de la cepa C57BL/6 distribuidos en 6 grupos de 6 animales cada uno: *Grupo 1*: inmunizado con *hFh*LAPr en combinación con TC, *Grupo 2*: inmunizado con *hFh*LAPr en solución salina, *Grupo 3*: *mFh*LAPr en combinación con TC, *Grupo 4*: *mFh*LAPr en solución salina, *Grupo 5*: control TC, *Grupo 6*: control PBS. El esquema de inmunización fue el mismo que para el ensayo anterior, una primo-inmunización seguida por dos refuerzos en las semanas 4 y 8. En todos los casos se administró 50 µg/dosis vía intranasal en un volumen de 25 µl con los animales bajo anestesia inhalatoria leve con Isoflurano. La concentración de TC utilizada fue de 5 µg/ml. Todas las dosis fueron preparadas inmediatamente antes de su utilización. Se monitoreó la producción de IgG total en las semanas 0, 4, 6, 8 y 10 a través de la técnica ELISA a partir del suero de los animales. Se determinaron los niveles de IgG e IgA sérica.

3.2.2.3 Determinación de niveles de IgA sérica

Al igual que para el ensayo anterior, las placas para ELISA de 96 pocillos se sensibilizaron con 4 µg/ml de antígeno en PBS durante toda la noche a 4 °C y se bloquearon con BSA 1% en PBST 0,05%. Se ensayaron diluciones desde 1:50 a 1:400 de los sueros correspondientes a cada

semana y se incubaron durante 1 hr a 37 °C o toda la noche a 4 °C. Para la determinación de IgA se incubó con un anticuerpo anti-IgA de ratón conjugado a Biotina en una dilución 1:500 durante toda la noche a 4 °C. Luego de lavar la placa con PBST 0,05% se incubó con una solución de Estreptavidina-peroxidasa en una dilución 1:2000 durante 1 hr a 37 °C. Se procedió a lavar la placa con PBST 0,05% y se incubó a TA durante 10 minutos con una solución de OPD a T.A protegido de la luz. Finalmente, la reacción se detuvo con el agregado de HCl 1 M y se realizó la lectura de la densidad óptica a 492 nm.

3.2.2.4 Determinación de los niveles de IgG sérica anti-*FhLAPr*

Las placas para ELISA de 96 pocillos se sensibilizaron con *hFhLAPr* y bloquearon al igual que para el ensayo anterior. Las mismas se incubaron durante 1 hr a 37 °C con una dilución 1:800 de los sueros obtenidos a lo largo de las semanas del ensayo en un volumen final de 100 µl/pocillo. La dilución de trabajo se determinó ensayando diluciones seriadas (1:500 a 1:16.000) de los pools de sueros de la semana 6 correspondientes a cada grupo tanto con la forma *mFhLAPr* como *hFhLAPr*. A continuación, las placas se lavaron con PBS-T 0,05% y se agregó una dilución 1:10.000 del anticuerpo anti-IgG (Fab específico) de ratón conjugado a peroxidasa durante 1 hr a 37 °C (100 µl/pocillo). Finalmente, las placas fueron lavadas con PBS-T 0,05% y se evidenció la reacción antígeno-anticuerpo con el agregado del sustrato OPD H₂O₂ durante 15 min. La reacción se detuvo con el agregado de 50 µl de una solución de HCl 1M y se realizó la medición de la densidad óptica a 492 nm. Los resultados se expresaron como D.O_{492nm} en función de la semana del ensayo.

3.2.2.5 2do ensayo de evaluación de la inmunogenicidad por vía mucosa de *hFhLAP* en ratones de la cepa C57BL/6

Se utilizaron 24 ratones de la cepa C57BL/6 distribuidos en 4 grupos de 6 animales cada uno de la siguiente manera: *Grupo 1: hFhLAPr* en combinación con TC, *Grupo 2: hFhLAPr* en solución salina, *Grupo 3: Control TC* y *Grupo 4: Control solución salina*. En todos los casos se administró 25 µg/dosis de la *hFhLAPr* en un volumen final de 25 µl. La cantidad de TC administrada fue de

2 µg/ml y el esquema de inmunización utilizado consistió en una primo inmunización y dos refuerzos en las semanas 4 y 10, respectivamente. Se obtuvieron muestras de suero en las semanas 0, 4, 10 y 12 con el método descrito más arriba.

3.2.2.6 Determinación de los niveles de IgA sérica anti-FhLAPr

La determinación de los niveles de IgA sérica del 2^{do} ensayo de inmunogenicidad vía mucosa se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para el 1^{er} ensayo.

3.2.2.7 Determinación de los niveles de IgG sérica anti-FhLAPr

Las placas de 96 pocillos se sensibilizaron y bloquearon con el mismo procedimiento descrito para el ensayo anterior. Las placas se incubaron con una dilución 1: 4.000 de los sueros obtenidos a lo largo de las semanas del ensayo en un volumen final de 100 µl/pocillo durante 1 hr a 37 °C. La dilución de las muestras fue determinada ensayando diluciones seriadas (1:500 a 1:16.000) de los pools de sueros de la semana 10 correspondientes a cada grupo. A continuación, se lavaron las placas con PBS-T 0.05% y se agregó una dilución 1:10.000 del anticuerpo anti-IgG (Fab específico) de ratón conjugado a peroxidasa durante 1 hr a 37 °C (100 µl/pocillo). Finalmente, las placas fueron lavadas con PBS-T 0.05% y se evidenció la reacción antígeno-anticuerpo con el agregado de una solución conteniendo OPD H₂O₂ durante 15 min. La reacción se detuvo con el agregado de 50 µl de una solución de HCl 1M y se realizó la medición de la D.O._{492nm}.

3.2.3 Predicción de las estructuras tridimensionales de FhLAP y mFhCL3 y de las RPIs de FhCL3

3.2.3.1 Construcción de los modelos tridimensionales de FhLAP y mFhCL3

Se generaron los modelos tridimensionales de FhLAP y mFhCL3 a través de la herramienta de modelado basado en homología Phyre2. La calidad de las estructuras de FhLAP y mFhCL3 generadas fueron evaluadas utilizando los servidores QMEAN (Benkert et al. 2008), ERRAT (MacArthur et al. 1994) y RAMPAGE (Lovell et al., 2003).

3.2.3.2 Determinación de las regiones potencialmente inmunogénicas de *mFhCL3*

Se realizó la búsqueda de las regiones potencialmente inmunogénicas (RPI) en *mFhCL3* utilizando las herramientas descritas en la **Tabla 2** de la sección 3.4. Luego las RPIs fueron alineadas con el software MEGA 5 a modo de determinar las regiones consenso entre los diferentes métodos de predicción. Estas regiones consenso fueron mapeadas en el modelo de *mFhCL3* y se seleccionó la RPI en base al consenso entre los métodos de predicción y el grado de exposición en la superficie de la proteína. A continuación, se generó el modelo tridimensional de la proteína de fusión de la RPI unida al extremo N-Terminal de la *FhLAP* utilizando el software MODELLER 9.14 (Webb & Sali 2014).

3.2.3.3 Construcción del plásmido de expresión de *FheCL3-LAP*

Se determinó que la clonación de secuencia nucleotídica correspondiente a la proteína de fusión *FheCL3-LAP* sería en el vector de expresión pET28a (+) entre los sitios Nde I y Bam H I a modo de minimizar la cantidad de aminoácidos agregados por el vector en el extremo N-Terminal de la secuencia. Se realizó el esquema de clonación en el software Serial Cloner 2.0 y se verificó el marco de lectura con la herramienta EMBOSS Traseq (Li et al., 2015).

3.2.4 Expresión y purificación de la proteína de fusión *FheCL3-LAP* en *E. coli* BL21 (DE3)

3.2.4.1 Transformación del plásmido pET28a (+)-*FheCL3-LAP* en bacterias *E. coli* BL21 (DE3)

Aproximadamente 100 ng del vector pET28a (+) clonado con la secuencia de la proteína *FheCL3-LAP* se transformó en 50 µl de células competentes de *E. coli* BL21 (DE3). Se incubó en hielo durante 30 min y luego se realizó un choque térmico a 42 °C durante 10 seg. Se dejó reposar en hielo durante 5 min y se agregaron 950 µl de medio SOC. Se incubó durante 1 hr a 37 °C en agitación constante y una alícuota de 100 µl se extendió sobre una placa LB/Kan (50 µg/ml) incubándose a 37 °C durante toda la noche. A continuación, se pre-cultivaron distintas colonias aisladas en 3 ml de medio LB/Kan a 37 °C durante toda la noche. Luego se inoculó 3 ml de medio LB/Kan fresco por triplicado (tubo inducido, no inducido y testigo) y se incubó a 30 °C

en agitación constante a 250 rpm hasta alcanzar una D.O_{600nm} de ~ 0.6. En ese momento se indujo la expresión de la proteína *FhLAP-eCL3* con IPTG 0.4 mM y se incubó durante toda la noche a 25 °C. Se realizó paralelamente y a modo de control la transformación de la misma cepa bacteriana con una el vector pET28a (+) clonado con la Leucina Aminopeptidasa 1 de *S. mansonii* (*SmLAP1*), expresada previamente en el laboratorio y de peso molecular aparente conocido (60 KDa). Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min y se recuperaron el SND y el pellet. Los mismos se sometieron a una SDS-PAGE al 10% a modo de confirmar la presencia de la banda correspondiente a la esperada para *FheCL3-LAP* (~ 63 KDa). El stock de bacterias productoras de *FheCL3-LAP* se almacenó a -80 °C en glicerol 10%.

3.2.4.2 Expresión de *FheCL3-LAP* en *E. coli*

A modo de determinar las condiciones óptimas de expresión de la proteína, se realizó un pre-cultivo de una colonia aislada productora de *FheCL3-LAP* en LB/Kan (50 ug/ml) durante toda la noche a 37 °C y en agitación constante (200 rpm). A continuación, se procedió a inocular un cultivo de 20 ml de LB/Kan (50 µg/ml) por cuadruplicado en una proporción aproximada de 1:100 y se incubó en agitación constante (200 rpm) a 28 °C hasta una D.O_{600nm} de 0,8. En este momento se indujo la expresión de la proteína recombinante con la adición de 0, 0,05, 0,1 y 0,4 mM de IPTG y se dejó en agitación constante toda la noche a 25 °C. Las bacterias fueron recolectadas mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min. El pellet fue resuspendido en H₂O destilada y luego sometido a una electroforesis SDS-PAGE 10% a modo de determinar la mejor condición de inducción de la expresión.

Una vez obtenida la condición óptima de expresión se pre-cultivó una colonia aislada productora de *FheCL3-LAP* y se cultivó en 1 Lt de medio LB/Kan. La expresión de la proteína de fusión se indujo durante toda la noche con 0,4 mM de IPTG 25 °C. Las bacterias se recolectaron mediante centrifugación a 7.000 rpm y 4 °C. Posteriormente, el pellet bacteriano fue resuspendido en un tampón de lisis conteniendo Tris 50 mM, NaCl 200 mM, pH 8,5 con el

agregado de lisozima (1 µg/ml). Se incubó durante 1 hr a T.A. y se procedió a realizar un ciclo de sonicación de 5 pulsos de 40% de amplitud durante 30 s e intervalos de 1 min en baño de hielo. Luego, la suspensión bacteriana se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 min a 4 °C y se recuperó el pellet para su posterior procesamiento.

3.2.4.3 Recuperación de la proteína *FheCL3-LAP* de los cuerpos de inclusión

El pellet bacteriano se incubó con un tampón (10 ml cada 1 gr de pellet) conteniendo Tris 50 mM, Urea 1 M, Tritón X-100 1%, pH 8,5 y se procedió a realizar un ciclo de sonicación de 5 pulsos de 40% de amplitud durante 30 seg e intervalos de 1 min en baño de hielo. A continuación, la suspensión se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 min a 4 °C y el pellet se resuspendió en un tampón Tris 50 mM, Urea 8 M, DTT 1 mM, pH 8,5 con el agregado de PMFS (# P7626, Sigma) 1 mM durante 1 hr en agitación suave a T.A. Luego se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm durante 30 min a 4 °C y se recuperó el SND el cual se dializó toda la noche a 4 °C contra un tampón Tris 50 mM, Urea 4 M, pH 8,5.

3.2.4.4 Purificación de *FheCL3-LAP* por cromatografía de afinidad al Ni^{2+} y recuperación de la actividad enzimática

La purificación de la *FheCL3-LAP* se realizó a través de una cromatografía de afinidad al Ni^{2+} con la resina Sepharose Chelating Fast flow. La misma se cargó con una solución conteniendo NiSO_4 según las instrucciones del fabricante. El SND conteniendo la *FhLAP-eCL3* en tampón con Urea 4 M se aplicó en la columna previamente equilibrada con el tampón Tris 50 mM, Urea 4 M, pH 8,5. A continuación, se procedió a lavar la columna con 5 vol del tampón Tris 50 mM, pH 8,5 con concentraciones decrecientes de Urea (4 a 1 M) y en presencia de L-Arginina 0.1 mg/ml. Finalmente, la proteína fue eluída de la matriz con un gradiente de Imidazol de 20 a 400 mM en tampón Tris 50 mM, Urea 1 M, pH 8.5. Se recuperaron todas las fracciones y se realizó una electroforesis SDS-PAGE 10%. La fracción con mayor recuperación de la proteína se dializó toda la noche a 4 °C contra el tampón Tris 50 Mm, pH 8.5.

3.2.4.5 Clivaje de la etiqueta de histidinas (His-tag) y verificación de la actividad enzimática de *FheCL3-LAP*

La proteína *FheCL3-LAP* se lavó y concentró con un corte 30 KDa con un tampón Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, pH 8,0 hasta obtener una concentración aproximada de 1 mg/ml. La reacción de clivaje se llevó a cabo en una resina de agarosa unida a trombina (Thrombin Clean Cleave Kit, Sigma-Aldrich) previamente equilibrada con tampón Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, pH 8.0. La *FheCL3-LAP* (1 mg/ml) se aplicó a la resina y se incubó a T.A. Se tomaron alícuotas de la reacción luego de 2, 12 y 24 hs. Los productos de clivaje se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% a modo de determinar el tiempo óptimo de exposición a la trombina. Se cuantificó la cantidad de proteínas y se verificó la actividad enzimática de la *FheCL3-LAP*, *FheCL3-LAPc* en comparación con *FhLAPr* en un ensayo fluorogénico con el sustrato Leu-AMC de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.7.

3.2.4.6 Producción de suero policlonal anti-*FheCL3-LAP*

La producción de suero anti-*FheCL3-LAP* se realizó tras la inmunización de un conejo New Zealand con 100 μg /dosis de proteínas totales obtenidas a partir del resuspendido de los cuerpos de inclusión en Tris 50 mM, Urea 1M, pH 8.5 obtenidos durante la producción de *FheCL3-LAP*. El esquema de inmunización consistió en una primo-inmunización con las proteínas totales de la fracción conteniendo *FheCL3-LAP* en combinación con el adyuvante completo de Freund (FCA) seguida de dos refuerzos en las semanas 4 y 8 con la misma cantidad de proteína en combinación con el adyuvante incompleto de Freund (FIA). El nivel de anticuerpos anti-*FheCL3-LAP* se verificó a lo largo de las semanas a través de la técnica ELISA. Brevemente, las placas de 96 pocillos se sensibilizaron con 4 μg /ml de *FheCL3-LAP* purificada durante toda la noche a 4 °C. Luego se bloquearon con una solución de BSA 1% en PBS-T 0,05% durante 1 hr a 37 °C y a continuación, se incubaron con diluciones seriadas de los sueros obtenidos a lo largo del ensayo durante 1 hr a 37 °C. Tras el lavado de las placas con PBS-T 0,05%, las mismas fueron incubadas con un conjugado anti-IgG de conejo en una dilución 1:12.000 durante 1 hr a 37 °C. La reacción antígeno-anticuerpo se evidenció mediante el

agregado de una solución de OPD (0.4 mg/ml) y H₂O₂ al 0.012% durante 15 min en oscuridad a T.A. La lectura de la placa se realizó a 492 nm y los resultados se expresaron como la D.O_{492 nm} en función de la semana. Se conservó a -20 °C el suero correspondiente al mayor nivel de anticuerpos anti-*FheCL3*-LAP detectados.

3.2.5 Ensayo de inmunoprotección con *FheCL3*-LAP en ratones de la cepa BALB/c

Se llevó a cabo un ensayo de inmunización con *FheCL3*-LAP, *FhLAPr* y *FhCL3r* a modo de determinar la capacidad de inmunoprotección de estas proteínas en ratones de la cepa BALB/c tras el desafío oral con la forma infectante de *F. hepatica*. Las proteínas *FheCL3*-LAP y *FhLAPr* fueron producidas y purificadas en nuestro laboratorio según los métodos descritos anteriormente y la *FhCL3r* fue cedida por la Dra. Ileana Corvo. Para el ensayo de inmunoprotección se utilizaron 24 ratones hembra de la cepa BALB/C (8 a 10 semanas de edad) distribuidos de la siguiente manera: *Grupo 1*: inmunizado con *FhLAPr* en combinación con Adyuvac 50, *Grupo 2*: inmunizado con *FheCL3*-LAP en combinación con Adyuvac 50, *Grupo 3*: inmunizado con *FhCL3r* en combinación con Adyuvac 50 y *Grupo 4*: Control Adyuvac 50. El esquema de inmunización y desafío se basó en el protocolo descrito por Changklungmoa et al. (2013) para el modelo murino de infección de *F. gigantica* y vacunación con *FgLAP*. El mismo consiste en una primo-inmunización seguida de dos refuerzos en los días 14 y 28. En todos los casos se administró 25 µg/dosis de cada una de las proteínas y se realizó el seguimiento de la respuesta humoral en los días 0, 14, 28 y 42. El desafío oral se realizó en el día 42 con aproximadamente 12 metacercarias de *F. hepatica*. Las mismas fueron administradas vía oral a través de una sonda orogástrica utilizando PBS estéril como vehículo. Se realizó el seguimiento de la sobrevivencia de los animales y se determinó el punto final para cada animal al momento de la aparición de las primeras señales de dolor, estrés severo o muerte inminente. El hígado de cada uno de los animales fue recuperado para su observación macroscópica a modo de

determinar la presencia del parásito y el nivel de daño generado. Se realizó el mismo procedimiento de los animales sobrevivientes al día 45 post-infección.

3.2.5.1 Evaluación de la viabilidad del material infeccioso

Se separaron del stock 100 metacercarias de *F. hepatica* y se incubaron con hipoclorito al 10% durante ~ 5 min o hasta observarse el borde las mismas traslúcidas bajo lupa. Luego se lavaron con H₂O destilada a modo de retirar el exceso de hipoclorito y a continuación se preparó la solución de desenquiste. La misma fue preparada inmediatamente antes de su uso y se respetó la adición de los componentes como se muestra a continuación: 1. 5ml de una solución 0.84% (v/v) de HCl en H₂O destilada, 2. 50 µl de una solución de Cisteína (568 mg/ml), 3. 5 ml de una solución NaCl 273 mM, NaHCO₃ 240 mM en H₂O destilada y 4. 1 ml de Taurocolato 2%. Las metacercarias se incubaron en cámara cerrada por ~ 2 hs a 39 °C en esta solución y se realizó el control de desenquiste a partir de la hora y media del tratamiento con la solución de desenquiste.

3.2.5.2 Determinación de los niveles de anticuerpo IgG anti-*hFhLAP*, anti-*FheCL3-LAP* y anti-*FhCL3r*

Las placas para ELISA de 96 pocillos fueron sensibilizadas con 4 µg/ml de *FhLAP*, *FheCL3-LAP* y *FhCL3r*, separadamente toda la noche a 4°C y bloqueadas con BSA 1% en PBS-T 0.05% durante 1 hr a 37 °C. Las muestras de suero de cada uno de los grupos fueron incubadas durante 1 hr a 37 °C individualmente en una dilución 1: 8000 para el grupo *hFhLAP* + Adyuvac 50, 1:1000 para el grupo *FheCL3-LAP* + Adyuvac 50 y 1:2000 para el grupo *FhCL3r* + Adyuvac 50. El control Adyuvac 50 fue diluido de la misma forma para cada uno de los grupos. Todas las diluciones fueron determinadas previamente ensayando diluciones seriadas de los pools de sueros de la semana 6 correspondientes a cada grupo. A continuación, las placas fueron incubadas 1 hr a 37 °C con una dilución 1:10.000 de un anticuerpo anti-IgG de ratón (Fab específico) conjugado a peroxidasa. Tras el lavado de las mismas, se reveló con una solución de OPD y H₂O₂ durante 15 min a T.A. La reacción se detuvo con el agregado de HCl 1 M y se procedió a la lectura de la

D.O a 492 nm. Los resultados para cada uno de los grupos se expresaron en D.O_{492 nm} en función de los días del ensayo.

3.2.5.3 Determinación de los niveles de anticuerpo IgG₁ e IgG_{2a} anti-*Fh*LAPr, anti-*Fhe*CL3-LAP y anti-*Fh*CL3r

Las placas para ELISA se sensibilizaron y bloquearon de igual forma que para la determinación de IgG total. Las muestras de cada grupo fueron incubadas individualmente durante 1 hr a 37 °C en una dilución previamente determinada. Para el grupo *Fh*LAPr + Adyuvac 50 los sueros fueron diluidos en una relación 1:16.000, para *Fhe*CL3-LAP + Adyuvac 50 la relación fue de 1:2.000 y para *Fh*CL3r + Adyuvac 50 la relación fue de 1:1.000. Asimismo, se determinó la respuesta anti-*Fhe*CL3 de los sueros del grupo *Fhe*CL3-LAP (dilución 1:500) y del grupo m*Fh*CL3r (dilución 1:500). Adicionalmente, se determinó la respuesta anti-*Fhe*CL3-LAP de los sueros del grupo m*Fh*CL3r (dilución 1:500). A continuación, las placas se incubaron toda la noche a 4 °C con una dilución 1:2000 de los conjugados anti-IgG₁ y anti-IgG_{2a} de ratón conjugados a biotina en BSA 0,1%, PBS 0,005%. A continuación, las placas se lavaron con PBS-T 0,05% y se incubaron durante 1 hr a 37 °C una dilución 1:500 de estreptavidina conjugada a peroxidasa. Finalmente, se evidenció la reacción antígeno-anticuerpo con el agregado de una solución conteniendo OPD y H₂O₂ durante 15 min en oscuridad. La reacción se detuvo con el agregado de 50 µl de HCl 1 M y se procedió a la lectura de la D.O_{492nm}. Los resultados se expresaron como D.O_{492nm} en función de los días del ensayo.

3.2.5.4 Determinación macroscópica del daño hepático

El daño hepático causado por la infección fue evaluado macroscópicamente considerando el tamaño, consistencia y color de los canalículos biliares y presencia de focos hemorrágicos en cada lóbulo. Se adjudicó un puntaje para cada una de las características donde la ausencia de lesiones corresponde a 0 puntos, la presencia de una lesión puntual en un lóbulo corresponde a 1 punto, la lesión extendida del lóbulo corresponde a 2 puntos y si presenta lesiones en más de un lóbulo corresponde a 3 puntos. Se consideró el daño como severo (+++) si el puntaje

final se encuentra entre 11-15 , moderado (++) si el puntaje es de 6-10 y leve (+) si el puntaje es de 1 a 5 o sin lesión (-) (Rojas-Caraballo et al., 2014).

3.2.6 Análisis de datos

Los datos fueron expresados como media $\pm$ SEM de los resultados obtenidos en muestras ensayadas por duplicado. Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism. Se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Bartlett. En los casos de obtención de datos con distribución normal, se aplicó un test paramétrico (ANOVA de una vía). Valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3.3 Metodologías generales de laboratorio

3.3.1 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas se realizó con el método del ácido bicinonínico (Pierce BCA kit assay, Thermo Scientific) utilizando una curva de calibración estándar de albúmina sérica bovina (BSA por *Bovin Serum Albumin*) de 0-1 mg/ml. Las muestras y el estándar (25 μ l) se incubaron durante 30 min a 37 °C con 200 μ l de la mezcla 50:1 de las soluciones A y B, respectivamente.

3.3.2 Reacción de entrecruzamiento con DMS

El DMS es un agente entrecruzante el cual presenta dos grupos amino-éster que reaccionan con las aminos primarias libres en las proteínas (en el extremo N-terminal y en la cadena lateral de los residuos de lisina). Los grupos amino-éster del DMS están separados por un brazo espaciador de 11 Å e interaccionan con los grupos amino a un pH alcalino (8-10) formando un enlace covalente (**Figura 7**). De este modo se pueden entrecruzar proteínas que se encuentran interaccionando tanto de manera permanente y estable, como transitoria.

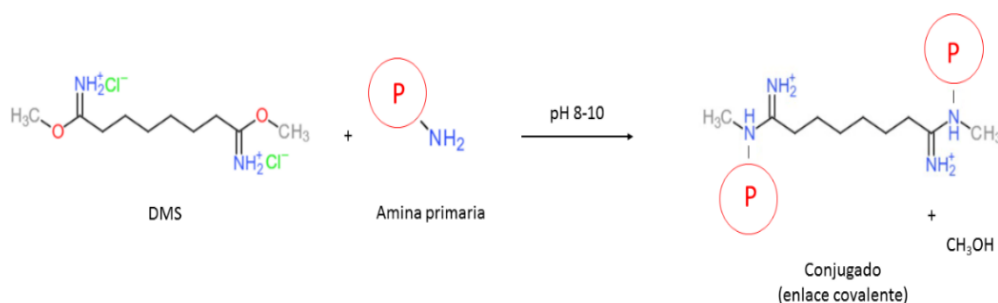


Figura 7: Reacción del dimetil suberimidato (DMS) con una amina primaria presente en proteínas (N-terminal o cadena lateral de los residuos de lisina). Luego de la reacción de entrecruzamiento a pH alcalino, se forma un enlace covalente entre el grupo amino-éster del DMS y el grupo amino de la proteína.

3.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Es una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. En esta técnica se emplean un gel concentrador (stacking) y un gel separador (running). El gel concentrador consiste en la mezcla de un tampón Tris-HCl 0,126 M pH 6,8, SDS al 0,1%, acrilamida-bisacrilamida (#A3553, Sigma-Aldrich) al 4%, TEMED al 0,1% y PSA al 0,1%. El gel separador está formado por un tampón Tris-HCl 0,39 M pH 8,8, SDS al 0,1% y una concentración de acrilamida-bisacrilamida de 10 a 12 %. A esta mezcla se añadieron dos catalizadores de la polimerización, TEMED al 0,06% y persulfato de amonio (PSA) al 0,1%.

3.3.4 Preparación de las muestras

A cada muestra se le añadió la correspondiente cantidad de tampón de carga 4X; (Tris-HCl 250 mM pH6,8, 2-mercaptoetanol, SDS 4 %, azul de bromofenol al 0,5 % y glicerol al 50 %) y se incubaron durante 5 minutos a 100 °C.

3.3.5 Condiciones de la Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis se realizó en una cuba ATTO, Japón utilizando un tampón glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM y SDS 0,2 %. Luego de cargar las muestras en el gel se conectó la fuente (ATTO, Japón) a voltaje máximo y amperaje constante a 25 mA y se llevó a cabo la separación hasta que el frente alcanzó el borde del gel.

3.3.5.1 Tinción con Coomassie Blue R-250

La tinción se realizó incubando los geles toda la noche en la solución de tinción de Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,5% en metanol: ácido acético: agua en proporción 473: 57: 520. La decoloración del gel se realizó con una solución decolorante de metanol: ácido acético: agua en partes iguales.

3.3.5.2 Estimación del Peso Molecular (PM) por SDS-PAGE

La movilidad electroforética relativa (Rf) es inversamente proporcional al logaritmo del PM. Trazando un gráfico con estándares de PM conocido, se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido. El Rf se calcula dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de bromofenol. El PM de la proteína incógnita se obtiene interpolando una regresión lineal en los puntos adecuados.

3.3.6 Transferencia de proteínas para Western Blot

Luego de la separación de las proteínas mediante una electroforesis SDS-PAGE, las mismas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio Rad, # 1620115) en un equipo de transferencia semi-húmeda (ATTO, Japón) utilizando un tampón Tris Base 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8.3 a voltaje máximo y amperaje constante de 9 mA/cm³.

3.3.7 Evaluación de la actividad enzimática con el sustrato Leu-AMC

Se realizó una curva de calibración con el fluoróforo AMC en el rango 0.1 μ M a 1 μ M disuelto en el mismo tampón. La cantidad de AMC liberado en la hidrólisis enzimática se midió en un fluorímetro FLUOstar equipado con el software OPTIMA (BMG Lab-technologies, Offenburg, Alemania), con longitudes de onda de excitación y emisión de 390 nm y 430 nm, respectivamente. Arbitrariamente, se definió que 1 unidad de actividad enzimática, equivale a la cantidad que cataliza la liberación de 1 μ mol de AMC por min a 37 °C. La actividad enzimática se expresó en nmoles min⁻¹mg⁻¹ o en Unidades de Fluorescencia (UF), según corresponda.

3.3.8 Reducción de los niveles de endotoxinas de *Fh*LAPr

La reducción en la concentración de la fracción *Fh*LAPr purificada se llevó a cabo utilizando una resina unida a Polimixina B (Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel, Thermo Scientific # 20339). Brevemente, la *Fh*LAPr (1mg/ml) en PBS previamente filtrada (filtro PVDF 0.22 μ m, Millipore, USA) se aplicó a la resina previamente equilibrada con el mismo tampón. Tras la incubación durante 1 hr a TA la *Fh*LAPr fue eluída con el flujo constante de PBS en tubos estériles. Se tomaron alícuotas de cada tubo y se realizó la cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinequínico. A su vez, se verificó la calidad de la misma a través de una electroforesis SDS-PAGE 10%.

3.3.9 Cuantificación de los niveles de endotoxinas

Los niveles de endotoxinas fueron cuantificados a través del método colorimétrico LAL (lisado de amebocitos de *Limulus*) (Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit, Thermo Scientific # 88282). Una placa estéril de 96 pocillo (Costar-Corning, USA) se equilibró a 37 °C durante 10 min. Manteniendo la misma a esa temperatura se dispensaron por duplicado 50 μ l de la muestra y el estándar de endotoxinas (0.1-1.0 EU/ml) y se incubó durante 5 min a 37 °C. A continuación, se agregaron 50 μ l del reactivo LAL y se incubó a 37 °C durante 10 min. Inmediatamente, se agregaron 100 μ l del sustrato cromogénico y se incubó la placa a 37 °C por 6 min adicionales. La reacción se detuvo con el agregado de una solución de ácido acético al 25% y se procedió a la medición de la D.O a 415 nm. Los resultados se expresaron en EU/ml.

3.3.10 Técnicas de inmunización

Las inmunizaciones a través de la vía sub-cutánea fueron llevadas a cabo en un volumen final de 100 μ l/dosis. La primo-inmunización se realizó en el dorso del animal y los refuerzos en los flancos izquierdo y derecho, respectivamente.

Las inmunizaciones intranasales se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l utilizando una pipeta automática. El animal permaneció bajo anestesia inhalatoria leve durante el procedimiento.

3.3.11 Recolección de sangre y procesamiento de suero

La extracción de sangre de los ratones se realizó mediante la punción con una aguja 23G en el ángulo caudal del seno venoso submandibular del animal, obteniéndose un volumen aproximado de 250 μ l de sangre por animal. Las muestras de sangre se incubaron durante 1 hr a 37 °C y el suero se obtuvo mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 min. Todas las muestras de suero se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

3.4 Software y servidores de análisis informático

- Software de análisis estadístico y representaciones gráficas: GraphPad Prism 6.1
- Generación de modelos tridimensionales de *FhLAPr* y *mFhCL3*: *Phyre2 Protein Fold Recognition Server*: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>

Tabla 1: Métodos de evaluación de la calidad de los modelos tridimensionales generados

Método	Descripción	Referencias
QMEAN	El servidor QMEAN (de <i>Qualitative Model Energy Analysis</i>) asigna un puntaje a distintos aspectos geométricos de la estructura, generando un puntaje final.	Benkert et al. 2008
ERRAT	ERRAT es un servidor que verifica el modelo tridimensional y lo compara con datos de estructuras cristalográficas. Distintas regiones del modelo pueden rechazarse hasta un 99%.	MacArthur et al. 1994
RAMPAGE	Genera como resultado el gráfico de Ramachandran, el cual permite determinar si los principales ángulos de torsión de la proteína (ϕ y ψ) son estereoquímicamente factibles.	(Lovell et al., 2003)

- Estructuras: RCSB Protein Data Base <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Estructura	PDB ID	Referencia
Bovine lens leucine aminopeptidase	1LAM	(Sträter & Lipscomb, 1995)
<i>E.coli</i> YfgJ bound to two Zn ⁺² .	2JNE	No publicado

- Software de generación del modelo tridimensional del monómero de *FheCL3-LAP*: MODELLER 9.14 para Windows (Webb & Sali 2014).

Tabla 2: Servidores de predicción de las regiones potencialmente inmunogénicas de las *Fh*CLs

<u>EMBOSS ANTIGENIC</u>	Basado en la presencia de los residuos hidrofóbicos Cys, Leu y Val en la superficie de la proteína	(Kolaskar & Tongaonkar 1990; Parker et al. 1986)
<u>Chou & Fasman Beta-Turn Prediction</u>	El método se basa en la predicción de giros β en la secuencia de aminoácidos	(Chou & Fasman 1978)
<u>Bepipred Linear Epitope Prediction</u>	El método predice la localización de epítopes B lineales utilizando como dataset epitopes encontrados en la literatura y las bases de datos AntiJen y Los Alamos HIV. Hace uso de la combinación de un modelo de Markov oculto (HMM por Hidden Markov Model) y un método de escala de propensión.	(Jespersen, et al., 2017)
<u>Emini Surface Accessibility Prediction</u>	El método asigna una escala de accesibilidad superficial de la secuencia de aminoácidos	(Emini et al., 1985)
<u>Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity</u>	Es un método semi-empírico que utiliza las propiedades fisicoquímicas de los residuos de aminoácidos y sus frecuencias en epítopes conocidos experimentalmente para predecir los determinantes antigénicos en las proteínas	(Kolaskar & Tongaonkar, 1990)
<u>SVMTrip</u>	Método de predicción de regiones antigénicas utilizando el "Support Vector Machine" combinando "Tri Peptide and similarity scores" y "Propensity score" además de la base de datos del IEDB	(Yao et al., 2012)
<u>BCPred</u>	Se basa en la implementación y optimización de tres métodos: AAP, BCPred y FCPred.	(Yasser et al., 2008)
<u>ABCpred</u>	Utiliza la técnica de "machine learning" y una red neural artificial para predecir las regiones antigénicas.	(Saha & Raghava 2006)
<u>ElliPro</u>	Predice epítopes lineales y discontinuos basados en la estructura 3D del antígeno. En caso de no poseer la estructura 3D	(Ponomarenko et al., 2008)

utiliza MODLLER para determinar la estructura por homología con la base de datos del PDB

[MHC class II binding prediction](#)

El método predice la afinidad de unión (alta, media, baja) de regiones de la secuencia de interés (15 aminoácidos) a través del consenso entre distintos métodos de predicción. Permite la elección del alelo correspondiente a la especie de interés (por ejemplo, H2-IAb de ratón).

(Wang et al., 2008, 2010)

[MHC class I binding prediction](#)

El método predice la afinidad de unión (alta, media, baja) de regiones de la secuencia de interés (de 8-15 aminoácidos) a través del consenso entre distintos métodos de predicción. Permite la elección del alelo correspondiente a la especie de interés (por ejemplo, H-2-Db de ratón).

(Andreatta & Nielsen 2015)

- Software de visualización de modelos y generación del modelo tridimensional del hexámero de *Fh*LAPr y *Fhe*CL3-LAP: Swiss PDB Viewer 4.10 para Windows (Guex & Peitsch 1997)
- Software de generación de vectores de expresión: Serial Cloner 2.6 para Windows.
- Software para el alineamiento de secuencias peptídica: MEGA 6 y UGene.
- Otros servidores

Traducción de la secuencia nucleotídica: http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/

Predicción de clivaje con Trombina: http://web.expasy.org/peptide_cutter/

Predicción del Peso Molecular esperado y Punto Isoeléctrico:

http://web.expasy.org/compute_pi/

Predicción de la solubilidad de proteínas recombinantes sobre-expresadas en *E. coli*:

<http://www.biotech.ou.edu>

4 Resultados

4.1 Producción y purificación de *FhLAPr*

La purificación de la proteína se llevó a cabo mediante el cultivo de una colonia asilada de *E. coli* BL21 (DE3) productora de *FhLAPr* en 1 Lt de medio de cultivo LB según el procedimiento descrito en materiales y métodos. En la **Figura 8** se muestra el gel de electroforesis SDS-PAGE 10% de las fracciones purificadas de *FhLAPr* a través de una cromatografía de afinidad al Ni^{2+} utilizando concentraciones crecientes de Imidazol (50-400 mM). La fracción correspondiente al escalón con 200 mM fue posteriormente dializada contra PBS y cuantificada a partir del método del ácido bicinconínico. El rendimiento de la producción de *FhLAPr* fue de aproximadamente de 10 mg/Lt.

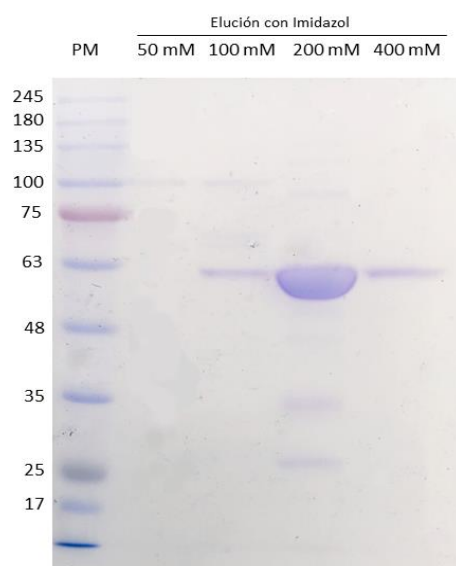


Figura 8: Purificación de *FhLAPr* analizada por SDS-PAGE 10%. Las fracciones de elución con Imidazol (50-400 mM) correspondientes a la purificación de *FhLAPr* por cromatografía de afinidad al Ni^{2+} . El rendimiento de la producción de la fracción de *FhLAPr* eluída en el escalón de 200 mM de Imidazol fue de aproximadamente 10 mg/Lt. La *FhLAPr* presenta un peso molecular aparente de ~ 59 KDa.

4.1.1 Obtención de las formas monómero y hexámero de *FhLAPr*

Se ha reportado previamente el incremento de hasta un 300% en la actividad enzimática específica Leu-AMC cuando la proteína *FhLAP* nativa es incubada con MnCl_2 y MgCl_2 en un rango de 0.01-10 mM. En cambio, cuando *FhLAPn* es incubada con ZnCl_2 , CaCl_2 o CoCl_2 se

observa un efecto inhibitorio a partir de 0.1 mM (Acosta et al., 1998). A modo de visualizar el efecto de estos iones en la estructura de la forma recombinante, la misma fue incubada con concentraciones crecientes de los metales divalentes MnCl_2 , MgCl_2 y ZnCl_2 (0-50 mM) y luego sometida a la reacción de entrecruzamiento con DMS. El grado de oligomerización se visualizó a través de un gel de electroforesis SDS-PAGE 10%. La **Figura 9** muestra que en presencia de dichos iones metálicos se observa una banda de peso molecular por encima a la de 245 KDa, la cual podría corresponder con la forma hexámero de la *FhLAPr*. Adicionalmente, se pudo observar que las muestras incubadas con MnCl_2 (**Figura 9b**) retienen la forma *hFhLAPr* con concentraciones crecientes de MnCl_2 , sin embargo, se observó la formación de agregados insolubles con concentraciones mayores a 1 mM. Esta formación de agregados también se observa tras la incubación con ZnCl_2 (**Figura 9b**), pero contrario a lo que sucede con MnCl_2 , concentraciones crecientes de ZnCl_2 tienden a favorecer la formación de las estructuras intermedias de *FhLAPr* (monómeros, dímeros, trímeros, tetrameros y pentámeros) con una mayor proporción de la forma monómero (*mFhLAPr*) respecto de las demás. Paralelamente, tras la incubación con MgCl_2 (**Figura 9a**) se pudo observar la formación de *hFhLAPr* con la ventaja de no observarse agregados insolubles en ninguna de las concentraciones ensayadas.

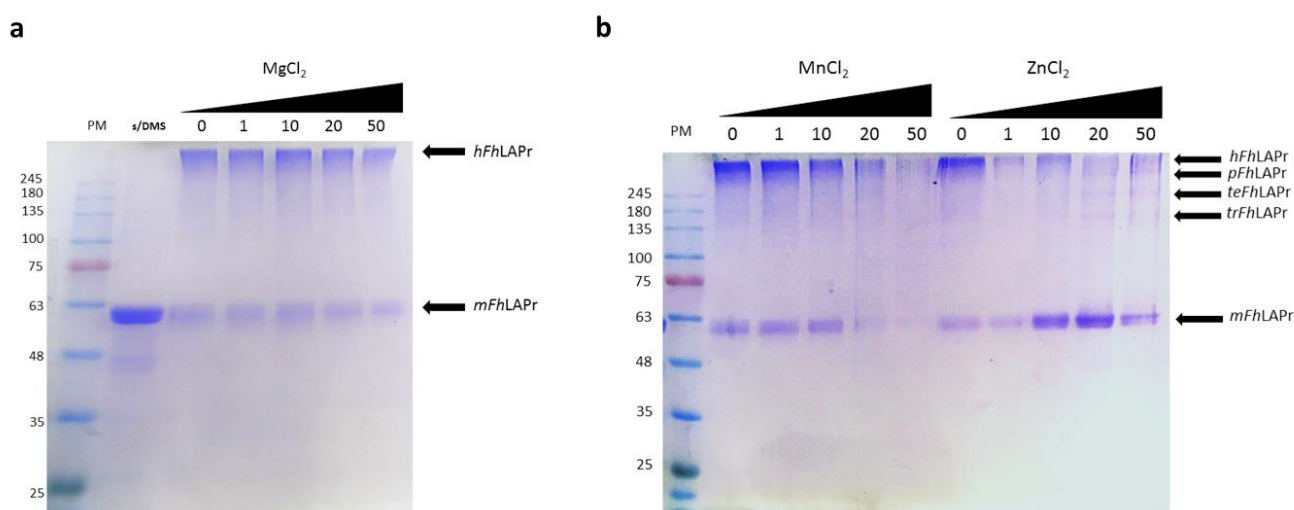


Figura 9: Reacción de entrecruzamiento de la *FhLAPr* con DMS analizada por SDS-PAGE 10%. Las muestras de *FhLAPr* (0.2 mg/ml) fueron incubadas con concentraciones crecientes de iones metálicos (0-50 mM) y luego tratadas con DMS (1 mg/ml) durante 2 hrs a 37 °C. **a)** Incubación de *FhLAPr* con MgCl_2 . **b)** Incubación de *FhLAPr* con MnCl_2 y ZnCl_2 .

Se determinó el efecto sobre la función de la *FhLAPr* en presencia de las distintas concentraciones ensayadas de MnCl_2 , MgCl_2 y ZnCl_2 a través del seguimiento en los niveles de actividad Leu-AMC. En la **Figura 10** se observa que la *FhLAPr* presenta actividad enzimática basal y podría auto-ensamblarse hacia su conformación funcional en ausencia de éstos iones agregados, en tanto las concentraciones crecientes de los iones MnCl_2 y MgCl_2 aumentan la capacidad de clivaje del sustrato Leu-AMC lo que podría ser un indicativo de que éstos iones favorecen la conformación funcional o mejoran la capacidad amidolítica de la enzima. En cambio, en presencia del ZnCl_2 la actividad Leu-AMC se ve drásticamente disminuida, llegando a valores nulos con concentraciones de 50 mM.

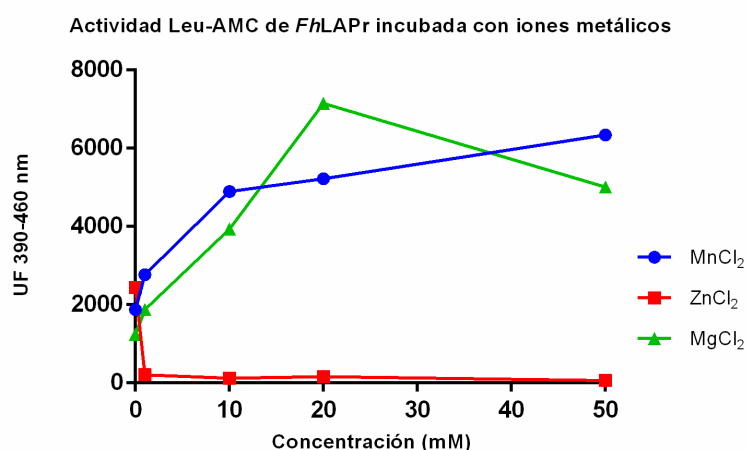


Figura 10: Efecto de diferentes metales divalentes sobre la actividad enzimática de *FhLAPr*. La *FhLAPr* presenta actividad enzimática Leu-AMC basal y sufre una disminución drástica de la misma en presencia de ZnCl_2 . Por otro lado, se observa un aumento progresivo de la actividad enzimática en presencia de MnCl_2 y MgCl_2 , reportados previamente como activadores para la forma nativa de *FhLAP*.

Otra forma rápida de obtención de la forma monomérica de *FhLAPr* es a través de la desnaturalización de la proteína por la acción de temperaturas extremas. Tras la incubación durante 2, 10, 20 y 30 min en un baño a 100 °C los productos de la reacción térmica fueron incubados con el agente entrecruzante DMS y el estado de oligomerización de la proteína fue evaluado a través de una electroforesis SDS-PAGE 4-12%.

En la **Figura 11a** se muestra que la *mFhLAPr* se obtiene en mayor proporción luego de 10 min de incubación a 100 °C. Incubaciones durante tiempos mayores inducen visiblemente la formación de agregados insolubles. Adicionalmente, se puede observar que la actividad Leu-AMC de la enzima se ve drásticamente disminuida a partir del inicio del tratamiento térmico como consecuencia de la desnaturalización de la misma (**Figura 11b**).

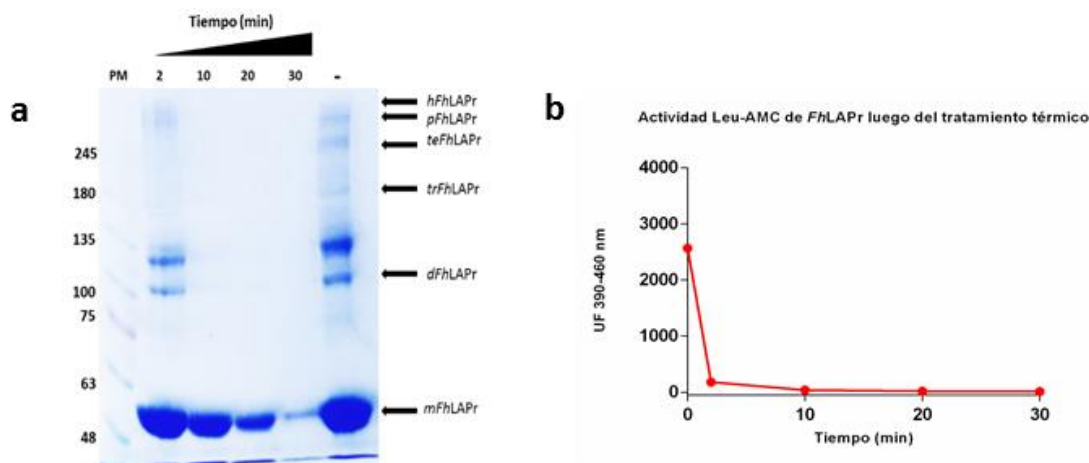


Figura 11: Generación de la forma monómero de *FhLAPr* a través de la desnaturalización térmica a) Gel de electroforesis SDS-PAGE 4-12.5% teñido con Coomassie Blue R-250. Las muestras de *FhLAPr* (0.2 mg/ml) fueron incubadas a 100 °C a distintos tiempos (0-30 min) y entrecruzadas con DMS durante 1 hr a 37 °C. **b)** Evaluación de la actividad de la enzima con el sustrato Leu-AMC luego del tratamiento térmico. Tras 10 min de incubación a 100 °C, la enzima recombinante se encuentra mayoritariamente en su forma monómero y con su actividad enzimática drásticamente disminuida.

El análisis de la conformación y actividad Leu-AMC de la *FhLAPr* indica que, tras la expresión y purificación, la misma es obtenida en su conformación hexamérica y funcional. Asimismo, el agregado de $MgCl_2$ incrementa la actividad de la misma sin afectar la solubilidad.

4.2 Evaluación de la respuesta humoral frente a las formas monómero y hexámero de *FhLAPr* en ratones de la cepa BALB/C inmunizados vía subcutánea

Se ha demostrado que la utilización de proteínas inmunogénicas oligoméricas podrían utilizarse como transportadores de epítopes T y B a modo de mejorar la respuesta inmune ante éstos últimos (Van Montfort et al., 2011) y a su vez, el reconocimiento del epítipo en el

contexto del transportador debería ser indistinguible del epítipo en la estructura de la proteína nativa (Janssen et al., 1996). Con el objetivo de determinar el potencial de la utilización de la *Fh*LAPr como inmunógeno y transportador se llevó a cabo en primera instancia un ensayo de inmunización en la cepa BALB/c con las formas *hFh*LAPr y *mFh*LAPr en combinación con un adyuvante oleoso o solución salina (PBS). La inmunoreactividad de los sueros a lo largo de las semanas fue evaluada contra la forma *hFh*LAPr con la cual se observan mayores niveles de reactividad con la técnica ELISA respecto de la forma *mFh*LAPr, posiblemente debido a que la *hFh*LAPr abarca tanto los epítipes lineales como conformacionales de la *hFh*ALPr (**Datos suplementarios 1**). En la **Figura 12** se muestra la evolución de la respuesta de anticuerpos anti-*hFh*LAPr a lo largo del ensayo. Se observa un aumento progresivo de los niveles de IgG anti-*Fh*LAPr a medida que transcurren las semanas para todos los grupos inmunizados con el antígeno, siendo significativa mayor en el grupo inmunizado con *hFh*LAPr en combinación con Adyuvac 50 a partir de la semana 4. Asimismo, se observa que el grupo inmunizado con *mFh*LAPr + Adyuvac 50 presenta niveles significativamente elevados de anticuerpos en la semana 10 respecto de las semanas previas

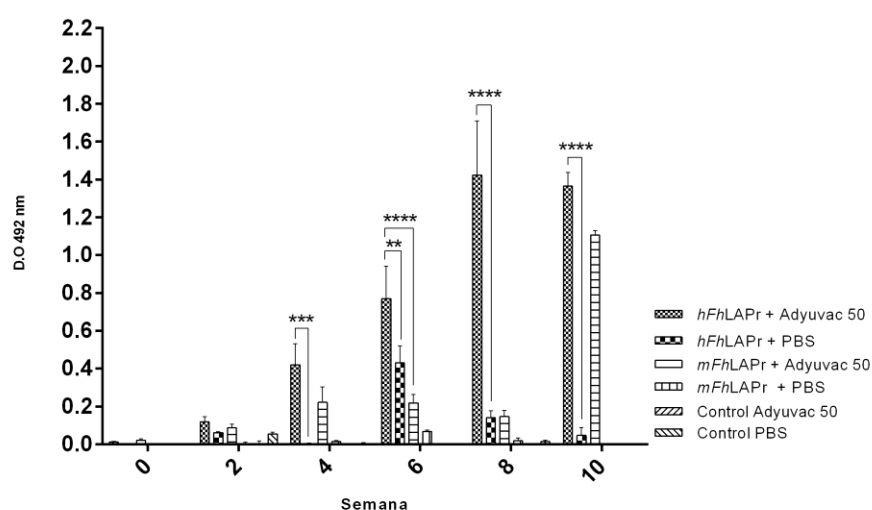


Figura 12: Evolución de la respuesta de anticuerpos IgG anti-*Fh*LAPr a lo largo del ensayo de inmunización subcutánea. Los niveles de anticuerpos se determinaron con una dilución 1:10.000 de los sueros y se representaron como D.O._{492 nm} promedio $\pm$ SEM a lo largo de las semanas del ensayo. Valores de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos.

del ensayo. Adicionalmente, se determinaron los niveles de anticuerpos anti-*hFhLAPr* IgG₁ e IgG_{2a} a través de la técnica ELISA utilizando en este caso para la detección de la interacción antígeno-anticuerpo un sistema biotina-estreptavidina unida a la peroxidasa.

Los resultados se muestran en la **Figura 13**, donde se observa que los niveles de IgG₁ son significativamente mayores que los de IgG_{2a} a lo largo de todo el ensayo y en todos los grupos.

A su vez, se observa que para los grupos que recibieron el antígeno en combinación con

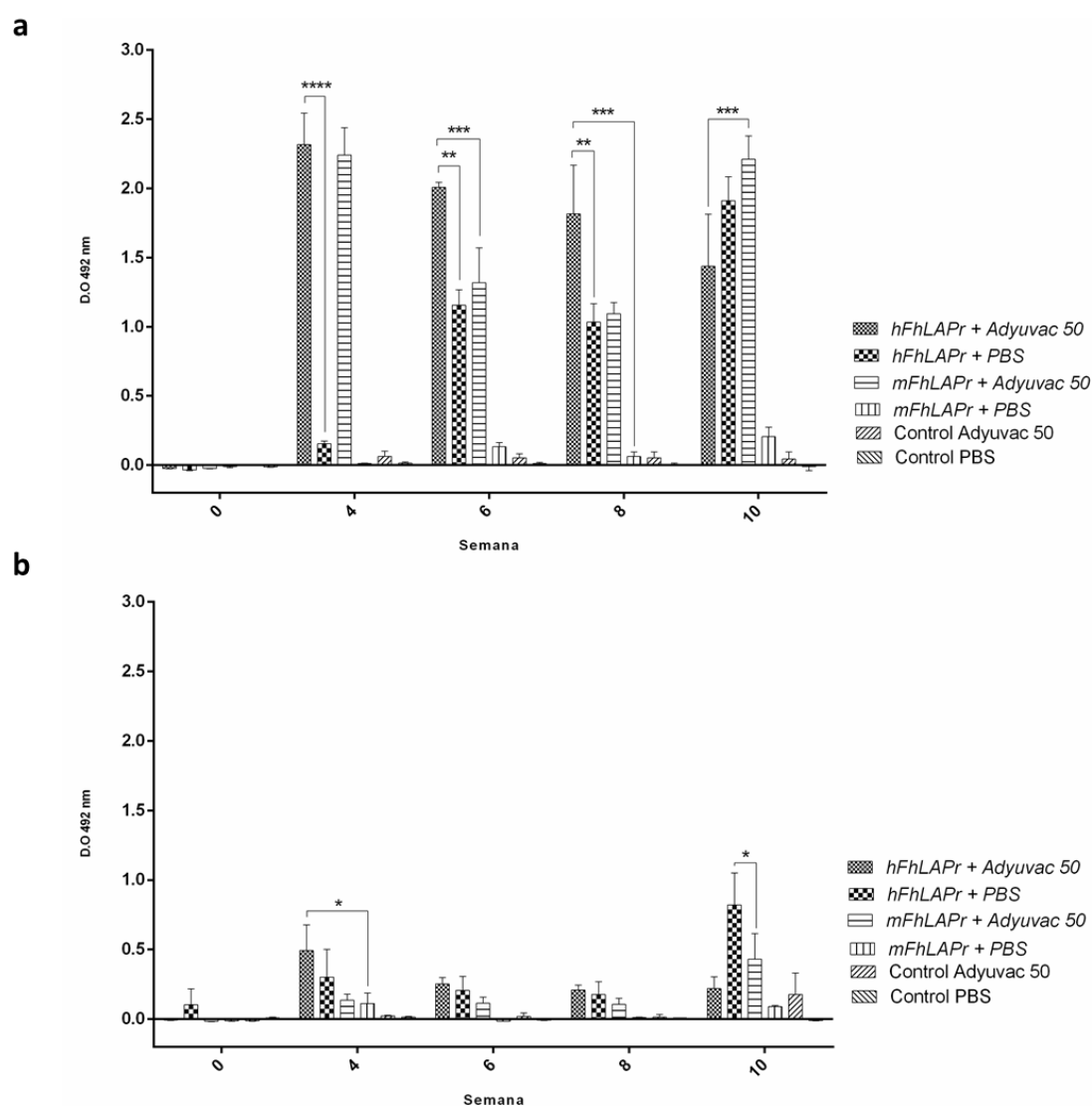


Figura 13: Evolución de la respuesta de subclases de IgG anti-FhLAPr a lo largo del ensayo de inmunización subcutánea. a) IgG₁ y b) IgG_{2a}. Los niveles de anticuerpos se determinaron por ELISA en una dilución 1:4.000 y se representaron como D.O. 492 nm promedio ± SEM en función de la semana. Valores de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos.

Adyuvac 50, los niveles de IgG₁ (**Figura 13a**) se mantuvieron altos y relativamente constantes, a diferencia de los que recibieron el antígeno en combinación con la solución salina, donde los niveles de anticuerpos IgG₁ fueron aumentando de manera progresiva en el grupo *hFhLAPr*, mientras que en el grupo *mFhLAPr* apenas fueron detectados. Los niveles de anticuerpos anti-*hFhLAPr* IgG_{2a} fueron significativamente mayores para el grupo *hFhLAPr* en combinación con la solución salina en la semana 10.

En conjunto, se observó que en la semana 10, los grupos que recibieron la forma *hFhLAPr* presentaron niveles de anticuerpos IgG significativamente mayores que los grupos que recibieron la forma *mFhLAPr*. A su vez, la respuesta fue predominantemente de IgG₁ a lo largo de todo el ensayo para los grupos que recibieron la forma *hFhLAPr* y para *mFhLAPr* en combinación con el adyuvante.

4.3 Evaluación de la respuesta humoral frente a las formas monómero y hexámero de *FhLAPr* en ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados vía intranasal

La patología producida por la infección por *F. hepatica* está relacionada fundamentalmente por la migración del mismo a través de la mucosa intestinal, peritoneo y finalmente a través del hígado. A modo de determinar la capacidad de la *FhLAPr* en inducir una respuesta humoral a nivel de las mucosas se llevó a cabo un ensayo de inmunización en ratones de la cepa C57BL/6 a través de la vía intranasal con las formas monómero y hexámero de la *FhLAPr* en combinación con un adyuvante específico de mucosas (TC 5 µg/ml) o con solución salina.

Los animales fueron divididos en grupos de 6 animales por grupo de la siguiente manera: *Grupo 1*: inmunizado con *hFhLAPr* en combinación con TC, *Grupo 2*: inmunizado con *hFhLAPr* en solución salina, *Grupo 3*: *mFhLAPr* en combinación con TC, *Grupo 4*: *mFhLAPr* en solución salina, *Grupo 5*: control TC, *Grupo 6*: control PBS. Al igual que para el ensayo anterior, el esquema de inmunización utilizado consistió en una primo-inmunización, seguida de dos refuerzos en las semanas 4 y 8. La evolución de los niveles de anticuerpos se determinó a

través de la técnica ELISA y la dilución de trabajo de las muestras fue seleccionada a partir de los datos obtenidos en **Datos suplementarios 2**.

En la **Figura 14** se muestran los resultados de serología donde se puede observar que hay mayor inducción de la producción de anticuerpos anti-*Fh*LAPr en los grupos que recibieron la forma *hFh*LAPr, respecto de los demás grupos. En la semana 10, se muestra que hay una diferencia significativa entre los grupos que recibieron *hFh*LAPr, ya sea en combinación con TC o en solución salina respecto de los demás grupos. Adicionalmente, no se detectaron anticuerpos IgA anti-*hFh*LAPr en ninguna de las semanas del ensayo y se pudo constatar el progresivo deterioro de la salud de los animales que recibieron la TC luego del 1^{er} refuerzo. Este deterioro vino dado por conducta hiperactiva, acompañado de pelaje descuidado y notorio retraso del crecimiento respecto al control que solamente recibió PBS. Por este motivo, se realizó un segundo ensayo de inmunización utilizando una concentración menor, tanto de antígeno como del adyuvante TC.

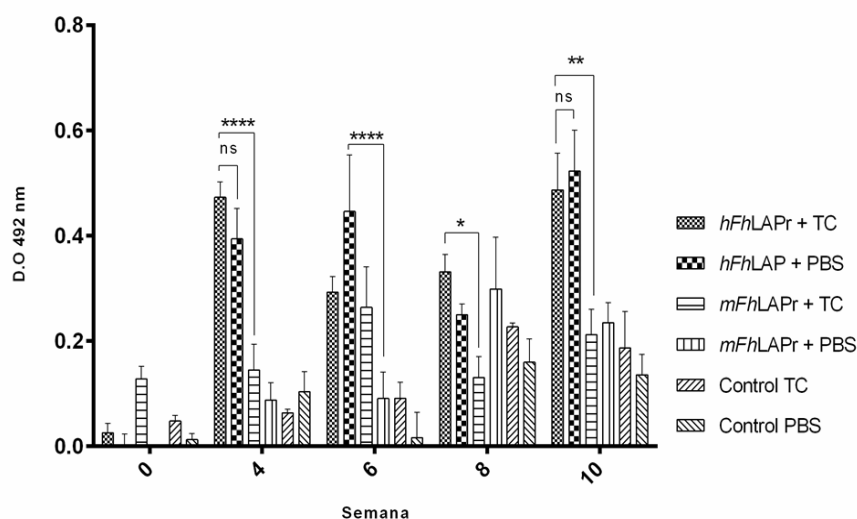


Figura 14: Evolución de la respuesta IgG anti-*Fh*LAP representada a lo largo del 1^{er} ensayo de inmunización por vía nasal. Los niveles de anticuerpos se determinaron por ELISA para todas las muestras individualmente en una dilución 1:800 y se representaron como D.O._{492 nm} promedio $\pm$ SEM en función de la semana del ensayo. Valores de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos.

Para este ensayo se inmunizaron 24 animales distribuidos en 4 grupos de 6 animales cada uno distribuido de la siguiente manera: Grupo 1: *hFhLAPr* en combinación con TC, Grupo 2: *hFhLAPr* en PBS, Grupo 3: Control TC y Grupo 4: Control PBS. En todos los casos se administró 25 µg/dosis de la *hFhLAPr* en un volumen final de 25 µl. La cantidad de TC que se administró se redujo de 5 a 2 µg/ml y el esquema de inmunización utilizado consistió de una primo inmunización y dos refuerzos en la semana 4 y 10, respectivamente. Se obtuvieron muestras de sangre de las semanas 0, 4, 10 y 12. Los niveles de anticuerpos de IgG determinados a partir del suero se muestran en la **Figura 15**.

Los niveles de anticuerpos anti-*FhLAPr* fueron significativamente mayores en el grupo inmunizado con *hFhLAPr* en combinación con TC, respecto al grupo *hFhLAPr* en combinación con la solución salina a lo largo de todo el ensayo. Asimismo, se observó una mayor respuesta de anticuerpos específicos respecto al ensayo anterior (reflejado en la dilución de las muestras de suero) y no se observaron señales evidentes de estrés en los animales inmunizados con TC. Al igual que en el ensayo anterior, no se detectaron anticuerpos IgA anti-*hFhLAPr* en ningún punto del ensayo.

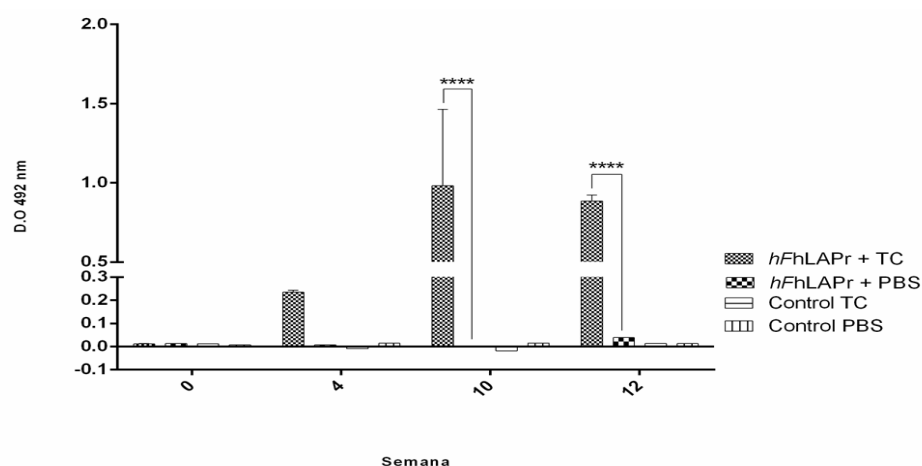


Figura 15 Evolución de la respuesta IgG anti-*FhLAPr* a lo largo del 2^{do} ensayo de inmunización por vía nasal. Los niveles de anticuerpos se determinaron por ELISA en una dilución 1:4.000 y se representaron como D.O. 492 nm promedio $\pm$ SEM en función de la semana del ensayo. Valores de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos.

En resumen, se observó que la *FhLAPr* estimula la producción de IgG contra la forma *hFhLAPr* cuando es administrada a través de la mucosa nasal de los ratones C57BL/6, sin embargo, no se detectaron anticuerpos IgA (la subclase predominante a nivel de mucosas) a nivel de suero en ninguno de los ensayos.

4.4 Evaluación de la *FhLAPr* como transportador de péptidos inmunogénicos

En función de la estructura cuaternaria de la forma funcional de *FhLAPr*, postulamos que la *FhLAPr* podría actuar tanto como inmunógeno como transportador de pequeños péptidos antigénicos o haptenos en su superficie. Debido a su naturaleza hexamérica, la misma actuaría desplegando éstas secuencias cortas en la superficie del hexámero como epítopes repetidos. Con el fin de poner a prueba este concepto, se propuso la utilización de *hFhLAPr* como proteína de fusión a una región con potencial inmunogénico de la *mFhCL3* (*FheCL3*). Para ello se realizó la búsqueda de éstas regiones de *mFhCL3* utilizando herramientas inmunoinformáticas de predicción de epítopes. Estas regiones fueron mapeadas en un modelo tridimensional de *mFhCL3* generado con Phyre2 y se seleccionó el péptido a ser transportado en base a la región consenso entre los distintos métodos de predicción y el grado de exposición superficial observado en el modelo de *mFhCL3*.

4.4.1 Generación del modelo tridimensional de *mFhCL3*

El modelo estructural tanto de la *mFhCL3* como de la *FhLAP* fueron generados utilizando la herramienta de modelado basado en homología Phyre2. El algoritmo utilizado por la misma busca el perfil evolutivo de la secuencia blanco y lo compara con una serie de homólogos colectados en una extensa base de datos. Esta búsqueda de homólogos se realiza a través de un método heurístico HHBlits a partir del cual se realiza la predicción de α hélices y hojas β con el método PSIPRED. El perfil evolutivo y la estructura secundaria son convertidas a un modelo oculto de Markov (HMM, por *Hidden Markov Model*) el cual es comparado con una base de

datos de HMMs de estructuras tridimensionales determinadas de forma experimental. Finalmente se realiza un paso de refinamiento de lazos y posicionamiento de cadenas laterales (Kelly et al., 2015).

Para la generación del modelo de mFhCL3 se encontraron 18 estructuras con porcentajes de identidad que oscilan entre 29-63%. El modelo resultante de mFhCL3 fue modelado con 100% de confianza a partir del molde correspondiente al de la procatepsina L1 de *F. hepatica* (PDB ID 2O6X) (Figura 16).

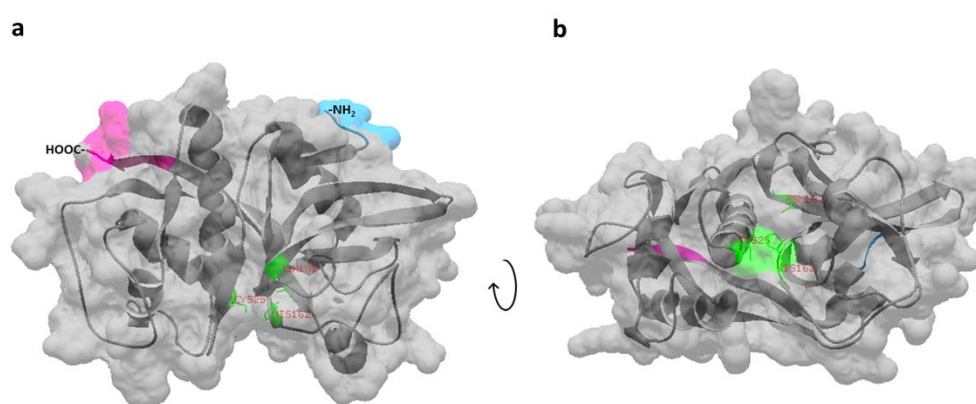


Figura 16: Modelo tridimensional de mFhCL3 a) vista general y b) vista de la región del sitio activo. El mismo fue generado con el método homología con la herramienta Phyre2 a partir de la estructura de la procatepsina L1 de *F. hepatica* (PDB ID 2O6X). La visualización y edición de la estructura se realizó con el software Swiss PDB Viewer 4.10. El extremo N-terminal se indica en celeste y el C-terminal en rosa. Los residuos del sitio activo se indican en verde.

La calidad del modelo de mFhCL3 fue evaluada a través de los servidores QMEAN, ERRAT y RAMPAGE (Figura 17). El puntaje QMEAN, es una función compuesta por seis descriptores que evalúa el modelo tridimensional y asigna un puntaje de 0-1, siendo 1 bueno. En el caso del modelo de mFhCL3 el puntaje fue de 0.740 (Z-score: -0.34), el factor de calidad general asignado por ERRAT fue 81.1% y el gráfico de Ramachandran muestra que el 97.2% de los residuos se encuentran en la región favorable, lo que indica que se trata de un modelo confiable.

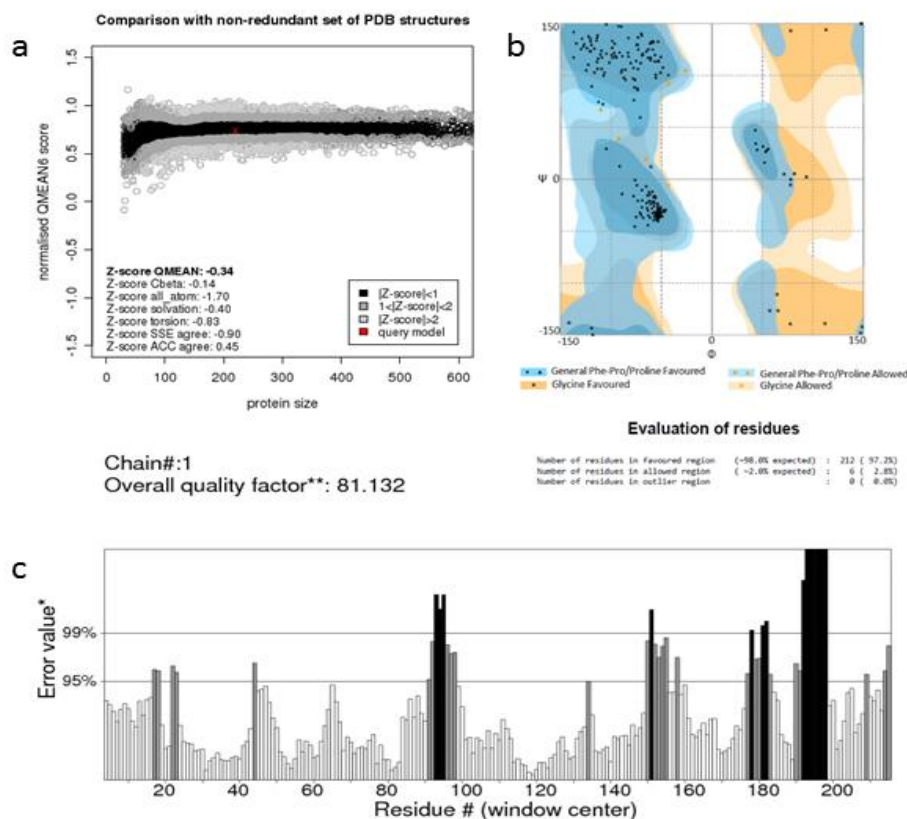


Figura 17: Evaluación de la calidad del modelo de mFhCL3 generado con Phyre2. a) QMEAN 0.740. b) RAMPAGE 97.2% de los residuos de aminoácidos se encuentran en la región favorable. c) ERRAT 81.1% (en negro se muestran las regiones que son rechazadas con un 99% de confianza).

4.4.2 Generación del modelo tridimensional de FhLAP

Para la generación del modelo de FhLAP, Phyre2 se basó en la estructura del complejo Bestatina - Leucina Aminopeptidasa de *Pseudomonas putida* (PDB ID 3H8G). Los porcentajes de identidad entre las secuencias utilizadas se encuentran entre 10-23%. El modelo resultante de FhLAP fue evaluado a través de los servidores QMEAN ERRAT y RAMPAGE (**Figura 18**). Como resultado de la evaluación realizada con estos servidores, se muestra que el modelo de FhLAP es confiable, sin embargo, el factor ERRAT, determina una zona de menor confiabilidad (45% de la estructura) en el extremo N-terminal, la región menos conservada de la secuencia. La construcción del modelo tridimensional del hexámero de FhLAP se llevó a cabo utilizando el software Swiss PDB Viewer 4.1.0 utilizando como molde para el ensamblaje la estructura

cristalográfica de la Leucina Aminopeptidasa del cristalino bovino *BtLAP* (PDB ID 1LAM) (**Figura 19**).

La calidad del modelo se evaluó con el servidor RAMPAGE y el gráfico de Ramachandran indica que un 93.8% de los residuos se encuentran en la región favorable, indicando que es un modelo confiable.

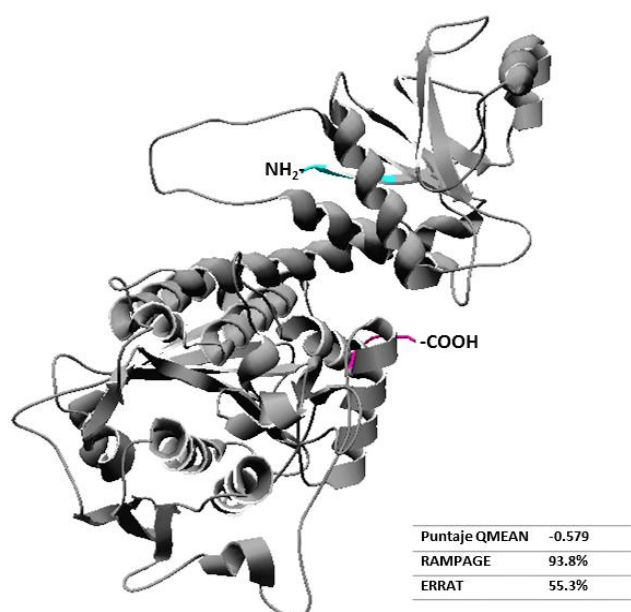


Figura 18: Modelo tridimensional del monómero de la *FhLAP*. El mismo fue generado con el método basado en homología Phyre2 a partir del complejo Bestatina - Leucin Aminopeptidasa de *P. putida* (PDB ID 3H8G). La calidad del modelo fue evaluada con los servidores QMEAN, RAMPAGE y ERRAT.

4.4.3 Determinación de las regiones potencialmente inmunogénicas (RPI) de la *mFhCL3*

La *mFhCL3* ha demostrado tener un rol potencialmente relevante en el proceso invasivo de *F. hepatica*, particularmente en lo que se refiere a la actividad collagenasa de la misma (Corvo et al., 2013). El bloqueo de esta función sería de interés, dada la necesidad del JRD de generar la degradación de componentes de la matriz extracelular y tejido conectivo en su proceso migratorio a través de la mucosa intestinal. Por esto, se propuso la identificación de las

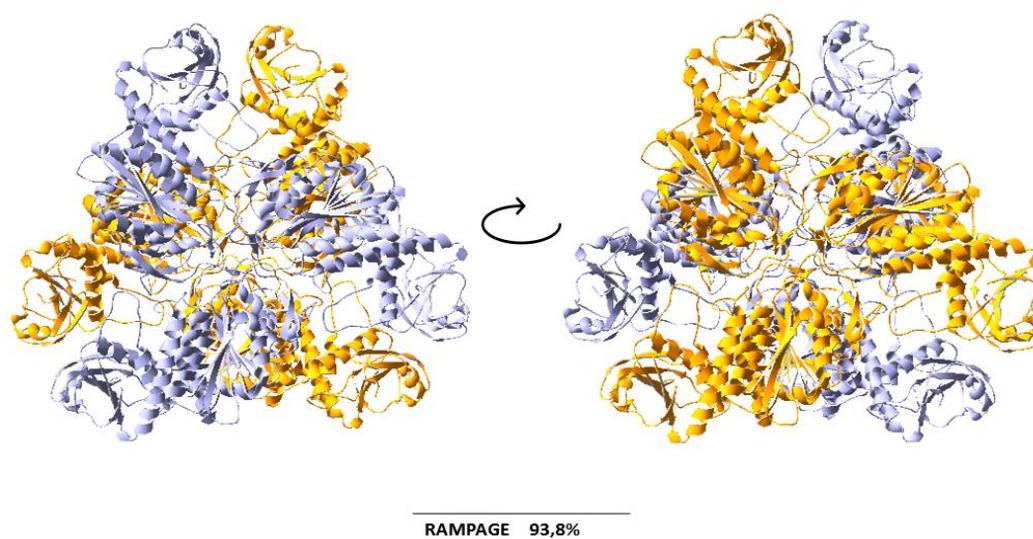


Figura 19: Modelo tridimensional del hexámero de la *FhLAP*. El ensamblado se realizó a través del fit iterativo del software Swiss PDB Viewer utilizando como molde la estructura cristalográfica de la Leucina Aminopeptidasa del cristalino de *Bos taurus* (*BtLAP*, PDB ID 1LAM). La calidad del modelo fue evaluada con el servidor RAMPAGE.

regiones potencialmente inmunogénicas de la *mFhCL3* con la finalidad de seleccionar una de ellas a los efectos de generar una proteína de fusión con la *FhLAPr*. La búsqueda de las RPI de la *mFhCL3* se realizó mediante distintas herramientas inmuno-informáticas de predicción de epitopes B y regiones de alta afinidad de unión al MHC clase II H2-IAb (ratón BALB/c). Las regiones identificadas por cada uno de los métodos como RPI fueron alineadas con el software MEGA 6.0 y se identificó aquella de mayor densidad de coincidencias entre los métodos.

Como puede observarse en el alineamiento de las secuencias peptídicas, más del 95% es reconocido como potencialmente antigénico por alguno de los métodos de predicción, sugiriendo lo limitado de los mismos. La región de mayor densidad de coincidencias entre los métodos corresponde a la región situada entre las posiciones 57 y 118 siendo particularmente relevante las regiones entre las posiciones 72-76 y 91-96 (**Figura 20**). La región comprendida entre las posiciones 86 y 97 se encuentra formando parte de un lazo en la superficie del modelo (indicada en amarillo en la **Figura 21**), tal como lo indica el método de predicción de accesibilidad superficial de Emini para *mFhCL3*. Al contrario de las demás RPIs, esta región se

encuentra flanqueada por regiones potencialmente inmunogénicas con un promedio menor de coincidencias entre los métodos. Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento de búsqueda de RPIs para mFhCL1 y mFhCL2, las cuales presentan un 67% y 72% de identidad con mFhCL3, respectivamente. Tanto en mFhCL1 como en mFhCL2, se identificó una RPI en la misma región que la descrita para mFhCL3 (***Datos Suplementarios 3***).

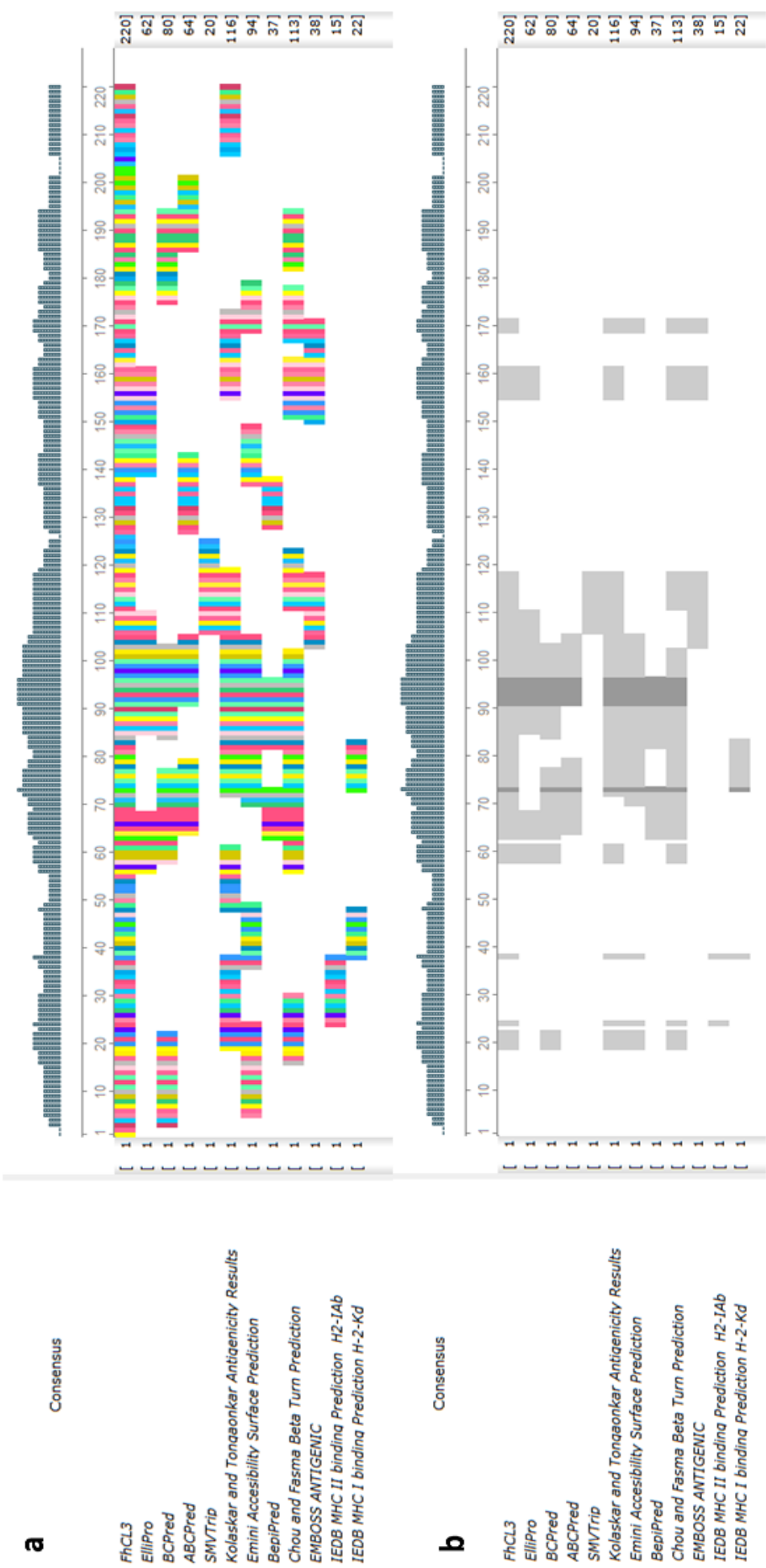


Figura 20: Alineamiento de las RPIs de mFhCL3 obtenidas a partir de los distintos métodos de predicción inmunoinformáticos. a) Alineamiento de epítopes predichos por distintos métodos inmunoinformáticos con la secuencia de la mFhCL3. b) Porcentaje de identidad: en gris oscuro se muestra la región de mayor coincidencias entre los métodos (64%).

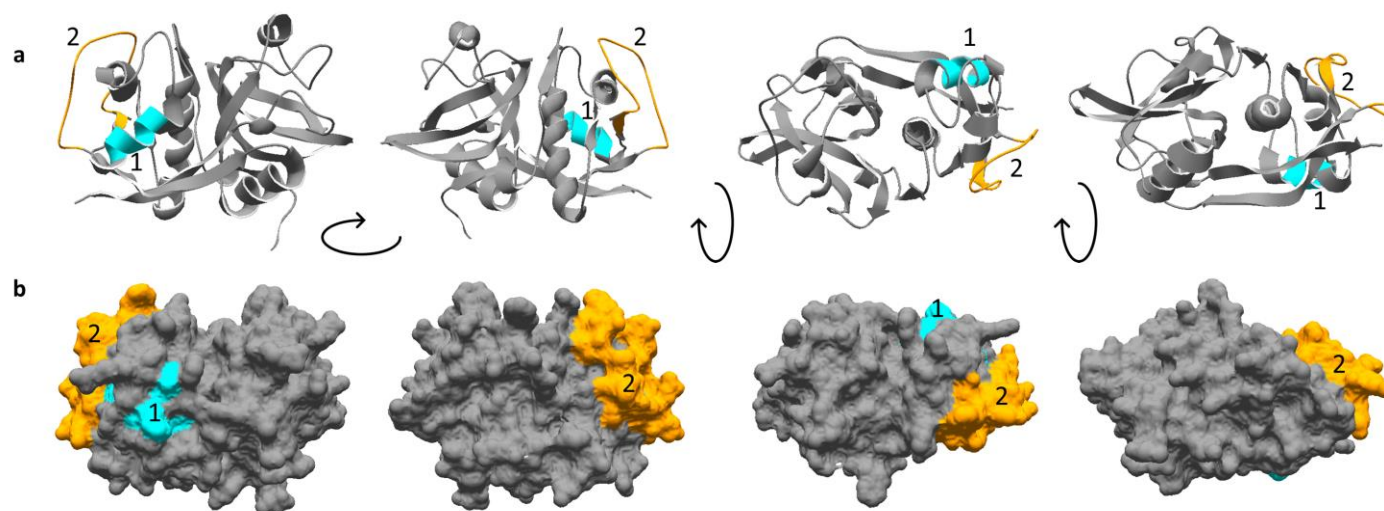


Figura 21: Mapeo de las RPIs de la mFhCL3 en el modelo tridimensional de la proteasa. Se marcan las RPIs: 1-ENAYKY (celeste), posición 72-76 y 2- ETASDYPYQGWEYQCQYRKE (naranja), posición 80-105. a) vista del esqueleto de la mFhCL3 y b) vista de la superficie calculada en Swiss PDB Viewer.

Típicamente se seleccionan como epítopes regiones de entre 6 y 11 aminoácidos, sin embargo, se ha demostrado mediante métodos cristalográficos que el parátipo de los anticuerpos se unen a regiones de entre 15-22 aminoácidos del epítipo, donde solamente 2-5 aminoácidos contribuyen de forma mayoritaria a la energía de unión antígeno-anticuerpo (Rahman et al., 2016). Por este motivo se seleccionó un péptido de 26 aminoácidos comprendido entre las posiciones 80 y 105 las cuales forman una estructura en lazo anclada entre dos hojas β del modelo de mFhCL3, la cual incluye la región potencialmente inmunogénica 2 (**Figura 22**).

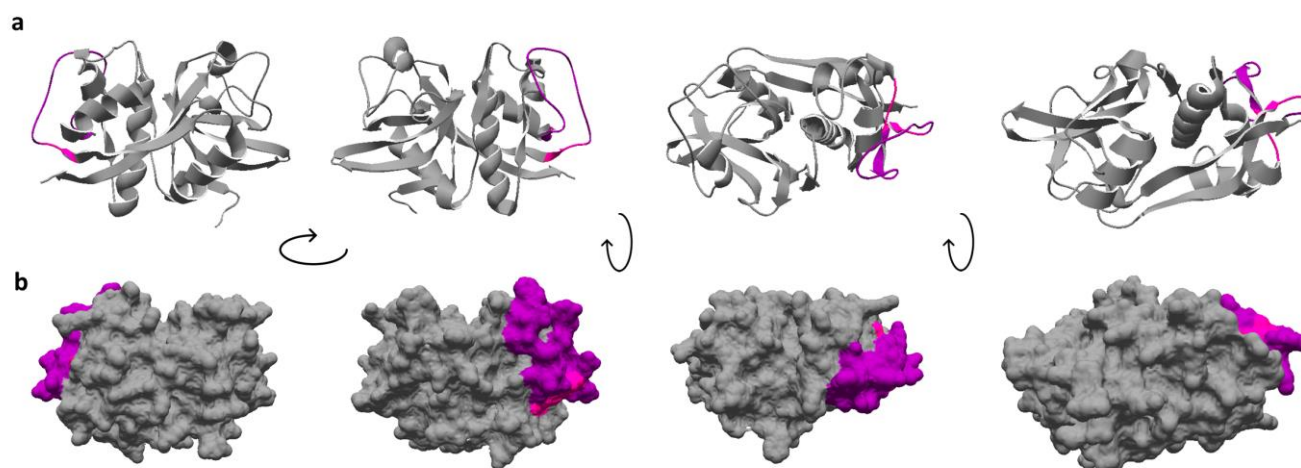


Figura 22: Mapeo de la RPI seleccionada de la *mFhCL3* en el modelo tridimensional de la proteasa para la formación de la *FheCL3-LAP*. Se marca en color la secuencia correspondiente a NH₂-SGLETASDYPYQGWEYQCQYRKELGV-COOH. a) Vista del esqueleto de *mFhCL3* y b) vista de la superficie generada con Swiss PDB Viewer.

4.4.4 Generación de una proteína quimérica *FheCL3-LAP*

Una vez seleccionada la RPI (*FheCL3*) para la expresión de la proteína de fusión *FheCL3-LAP*, se llevó a cabo la generación del modelo tridimensional y la predicción de algunas de sus propiedades físico-químicas teniendo en cuenta la sobre-expresión de la misma en el sistema de expresión pET28a (+) transformada en *E. coli*. Se realizó la unión de *FheCL3* en el mismo marco de lectura con el extremo N-terminal de la *FhLAP*, debido a que el mismo se encuentra menos conservado entre las LAPs y se cuenta con el antecedente de expresión como proteína de fusión con la Tiorredoxina de *E. coli* sin comprometer el ensamblado de la estructura hexámerica (Acosta et al., 2008). Paralelamente, a modo de minimizar la cantidad de aminoácidos añadidos por el sistema de expresión, se tuvo en cuenta la clonación de la secuencia quimérica entre los sitios Nde I y BamH I del plásmido pET28a (+) por la posibilidad de escindir la etiqueta de histidinas con trombina (**Figura 23**).

La proteína resultante es de 580 aminoácidos. A partir de esta construcción se verificó el marco de lectura de la secuencia quimérica a través de la herramienta EMBOSS Transeq

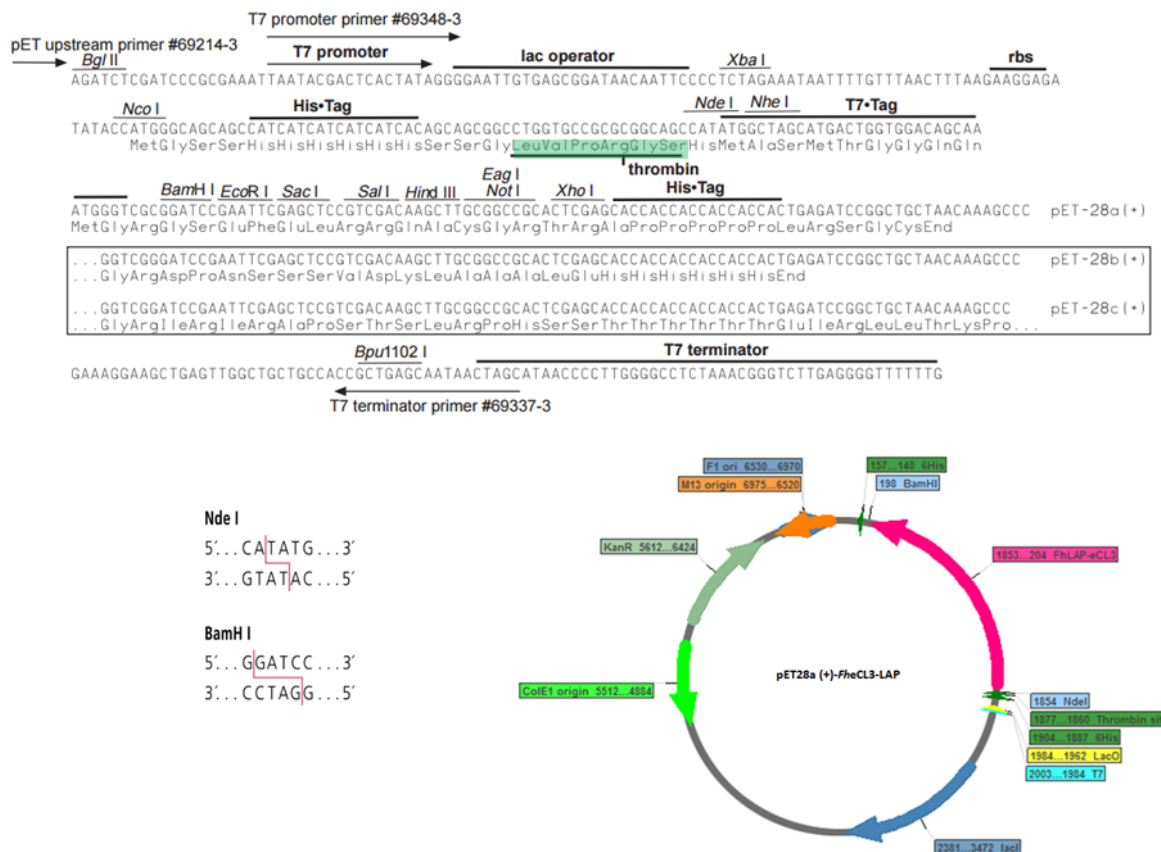


Figura 23: Esquema del vector pET28a (+) clonado con la secuencia FheCL3-LAP entre los sitios Nde I y Bam H I. Se marca en verde el sitio de clivaje preferencial de la Trombina correspondiente a la secuencia de aminoácidos Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser

utilizando el código genético Universal y se verificaron los posibles sitios de clivaje con trombina dentro de la secuencia química (**Datos suplementarios 4**). La proteína FheCL3-LAP expresada en este sistema presenta un sitio preferencial de clivaje con trombina en la posición 27 correspondiente a la secuencia Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser y 3 sitios de clivaje secundario en las posiciones 257, 555 y 576. La FheCL3-LAP presenta una pl/PM teórico de 7.76/63 KDa y presenta un 99.1% de probabilidad de solubilidad al sobre-expresarse en *E. coli*. Al escindir la etiqueta de histidinas mediante la utilización del sitio preferencial de clivaje con trombina, la FheCL3-LAP presenta una pl/PM de 6.64/59.7 y una probabilidad de solubilidad del 97.5%.

4.4.5 Generación del modelo tridimensional de *FheCL3*-LAP

A modo de determinar la conformación espacial de la *FheCL3*-LAP y la *FheCL3*-LAP clivada con trombina (*FheCL3*-LAPc), se generaron los modelos tridimensionales con MODELLER 9.14 con un paso adicional de refinamiento de la secuencia agregada por el sistema de expresión en el extremo N-Terminal de la primera a partir de la estructura homóloga YfgJ de *E. coli* (PDB ID 2JNE). Se generaron diez modelos de la proteína de fusión clivada y sin clivar utilizando como moldes las estructuras tridimensionales de *FhLAP* y *mFhCL3* obtenidas anteriormente. Dichas estructuras se evaluaron con los servidores QMEAN, RAMPAGE y ERRAT y se seleccionaron los moldes con el QMEAN más bajo (**Figura 24**). El puntaje QMEAN asignado para *FheCL3*-LAP fue

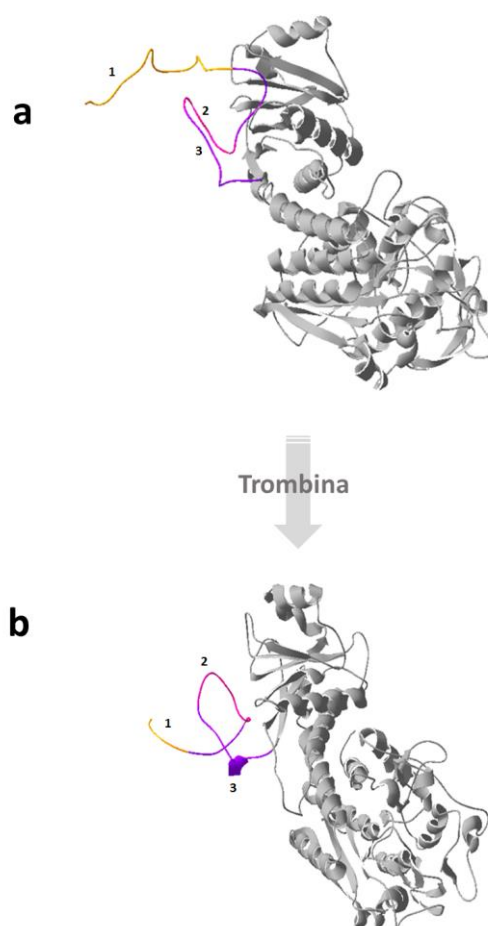


Figura 24: Modelo tridimensional del monómero de a) *FheCL3*-LAP y b) *FheCL3*-LAPc generado con el software Modeller 9.14 a partir de los moldes de *FhLAP* y *mFhCL3*. La porción N-terminal añadida por el vector de expresión fue modelada a partir de la estructura 2JNE correspondiente a YfgJ de *E. coli*. En amarillo (1) se marcan los aminoácidos añadidos por el vector, en fucsia (2) la región RPI y en violeta (3) la porción correspondiente al lazo.

de 0.562 y para *FheCL3*-LAPc 0.545. El factor de calidad general asignado por ERRAT para fue de 47% para ambas y el análisis del gráfico de Ramachandran indica que un 92.6% y 94% de los residuos se encuentran en la región favorable. Al igual que para *hFhLAP*, se generó el modelo tridimensional de la forma oligomérica de la proteína quimérica *hFheCL3*-LAP mediante el software Swiss PDB Viewer 4.1.0 utilizando como molde la *BtLAP* (PDB ID 1LAM). En la **Figura 25** se muestran los modelos tridimensionales de *hFheCL3*-LAP y *hFheCL3*-LAPc. Se observa en ambos modelos que el péptido de *FhCL3* seleccionado se expone en la superficie del modelo tanto en la forma clivada como sin clivar. Sin embargo, el péptido añadido por el vector de expresión en la versión sin clivar enmascara la estructura del *FheCL3*.

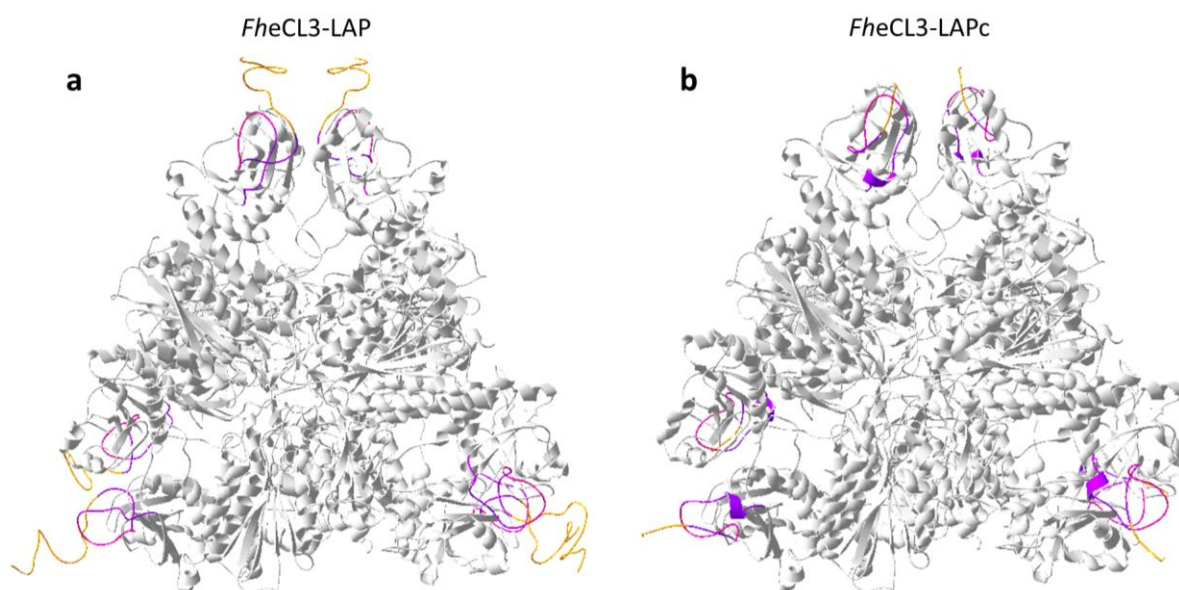


Figura 25: Modelo tridimensional del hexámero de a) la proteína sin clivar *FheCL3*-LAP y b) *FheCL3*-LAPc. Los modelos fueron generados con el software Swiss PDB Viewer a partir de la estructura 1LAM correspondiente a la LAP del cristalino de bovino. En amarillo se marcan los aminoácidos añadidos por el vector, en fucsia la región RPI y en violeta la porción correspondiente al lazo.

4.5 Producción y purificación de la *FheCL3-LAP* en el sistema de expresión *E. coli* BL21 (DE3)

La secuencia correspondiente a *FheCL3-LAP* clonada en el vector pET28a (+) fue transformada en las bacterias *E. coli* y cultivada en el medio LB/Kan obteniéndose una banda compatible con el peso molecular esperado para la proteína quimérica tras la inducción con IPTG (**Figura 26**). A modo de evaluar las condiciones óptimas de producción de *FheCL3-LAP* se ensayaron tres condiciones de temperatura (22 °C, 25 °C y 28 °C) con tres concentraciones de IPTG (0.05, 0.1 y 0.4 mM). Tras la lisis del pellet bacteriano mediante sonicación, el pellet resultante y el SND se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE a modo de visualizar la expresión de la proteína quimérica. En la **Figura 26b** se muestra que la producción a 25 °C de *FheCL3-LAP* se induce en todas las condiciones, sin embargo, tras la lisis bacteriana la proteína de fusión *FheCL3-LAP* queda retenida en la fracción insoluble. Para las temperaturas 22 °C y 28 °C se obtuvieron resultados similares (no se muestran los datos).

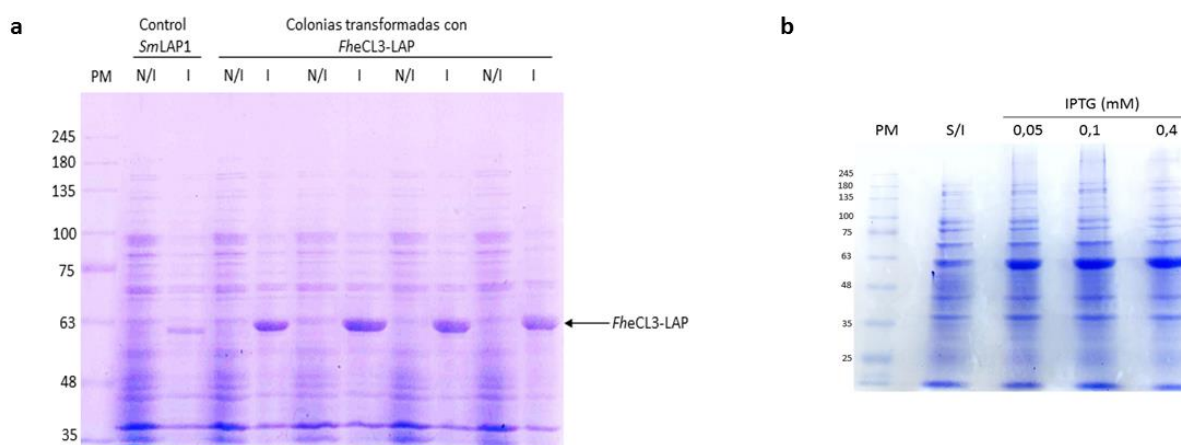


Figura 26: Expresión de la proteína de fusión *FheCL3-LAP* en *E. coli* BL21 (DE3). a) Gel de electroforesis SDS-PAGE 12% de las colonias de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con *FheCL3-LAP* inducidas (I) y no inducidas (N/I) con IPTG 0.4 mM. Se transformó paralelamente la *SmLAP1* como control positivo de la transformación. b) Determinación de las condiciones de producción de *FheCL3-LAP* a través de una electroforesis SDS-PAGE 10% de las colonias de *E. coli* BL21 (DE3) inducidas con diferentes concentraciones de IPTG.

4.5.1 Recuperación de la *FheCL3*-LAP de los cuerpos de inclusión

Luego de resuspender y sonicar el pellet en un tampón Tris 50 mM, Tritón X-100 1%, Urea 1M, pH 8.5, la suspensión fue centrifugada a alta velocidad y el pellet resultante fue incubado en un tampón Tris 50 mM, Urea 8 M, PMFS 1 mM, DTT 1 mM, pH 8.5 durante 1 hr a T.A. A continuación, el mismo fue centrifugado a alta velocidad y se recuperó el SND. El mismo fue diluido al medio e incubado a 4 °C toda la noche en agitación suave en presencia de L-Arginina 0.1 mg/ml a modo de plegar la proteína en la conformación de hexámero, con actividad Leu-AMC.

4.5.2 Purificación de *FheCL3*-LAP mediante cromatografía de afinidad

La purificación de la proteína de fusión se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad con una resina Sepharose Chelating Fast Flow cargada con sulfato de níquel. La muestra conteniendo la proteína *FheCL3*-LAP se aplicó a la columna previamente equilibrada con Tris 50 mM, Urea 4 M, pH 8.5. Luego se realizó un extenso lavado con tampón Tris 50 mM, Urea 4 M, pH 8.5 con el agregado de L-Arginina 0.1 mg/ml. A continuación, se realizó la elución de *FheCL3*-LAP de la columna con un gradiente ascendente de Imidazol desde 20 a 200 mM en buffer Tris 50 mM, Urea 4 M, pH 8.5. en presencia de L-Arginina 0.1 mg/ml. En la **Figura 27a** se muestra que la fracción con mayor recuperación de la proteína purificada corresponde a la de 100 y 200 mM de Imidazol. La identidad de las bandas fue confirmada mediante la técnica de Western Blot utilizando suero policlonal anti-*FhLAP*-Trx. El suero anti-*FhLAP*-Trx reconoce la porción *FhLAP* de la proteína de fusión *FheCL3*-LAP. En la **Figura 27b** se muestra que, en la fracción no retenida y el lavado, hay reconocimiento específico de la proteína de fusión *FheCL3*-LAP confirmando la pérdida de proteína en el proceso de purificación. Asimismo, se observa reconocimiento específico en todas las fracciones de elución con Imidazol. La fracción correspondiente al escalón 200 mM fue separada mediante SDS-PAGE 10% y la banda a la

altura de los 63 KDa fue enviada al Servicio de Proteómica del Institut Pasteur-Montevideo para su evaluación mediante Espectrometría de Masas (MS/MS). La Espectrometría de Masas muestra que efectivamente se trata de *FheCL3-LAP*, identificándose péptidos correspondientes a la porción *FhCL3* y a *FhLAP* (**Datos suplementarios 5**).

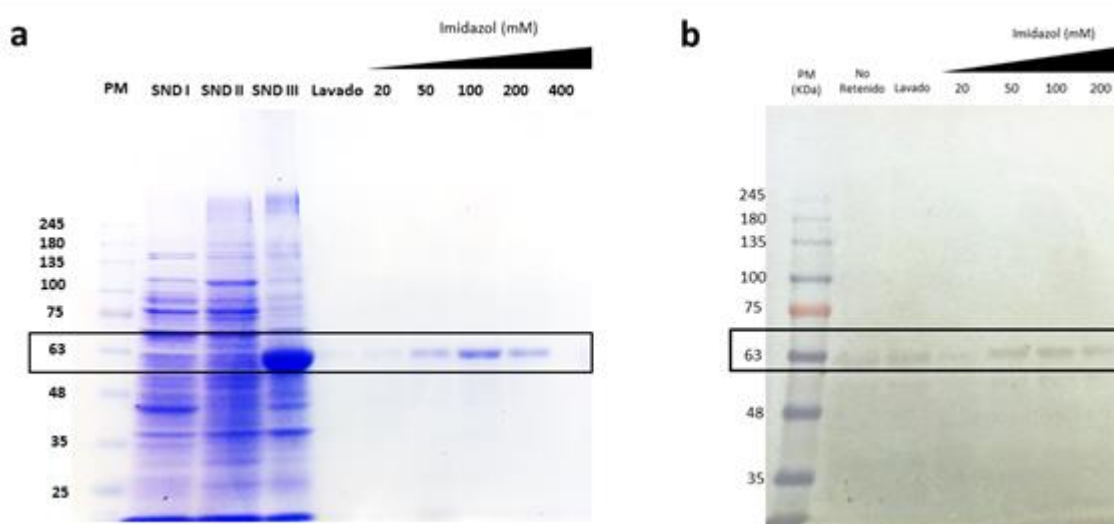


Figura 27: Purificación de la proteína de fusión *FheCL3-LAP* a partir de los cuerpos de inclusión. a) Gel de electroforesis SDS-PAGE 10% de la purificación de *FheCL3-LAP* mediante Cromatografía de Afinidad al Ni^{2+} . La mayor proporción de la proteína se obtiene en los escalones 100 y 200 mM de Imidazol. b) Seguimiento de la purificación de *FheCL3-LAP* mediante Western Blot utilizando un suero policlonal anti-*FhLAP*-Trx y revelado con 2-cloro, 4-naftol y H_2O_2 .

4.5.3 Formación del hexámero de *FheCL3-LAP*

La *FheCL3-LAP* se incubó con concentraciones crecientes de MgCl_2 en presencia de DMS a modo de determinar si la misma es capaz de ensamblarse a la forma hexámero. Tras detener la reacción del DMS luego de 1 hr con el agregado de tampón de muestra, conteniendo una concentración final de SDS 1% y β -mercaptoetanol 1%, se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 10%. En la **Figura 28** se muestra una banda por encima de los 245 KDa de las muestras tratadas con DMS en las concentraciones 0 y 1 mM de MgCl_2 , la cual podría corresponder con la forma *hFheCL3-LAP*. A su vez, se determinó la actividad específica de la enzima purificada antes y luego del clivaje con la proteasa trombina durante 2 hrs (**Figura 28b**). En la **Tabla 3** se

muestra que la *FheCL3*-LAP presenta una actividad específica similar a la obtenida con *FhLAPr* cuando se escinde la etiqueta de histidinas. En la **Figura 28b** se muestra el gel de electroforesis SDS-PAGE 10% de la proteína *FheCL3*-LAP antes y luego del clivaje con trombina. Se observa la formación de la *FheCL3*-LAPc en los tres tiempos de incubación ensayados, sin embargo, a las 12 y 24 hrs de incubación se observan productos de degradación de la digestión de la trombina resultantes de la digestión en los sitios secundarios de clivaje.

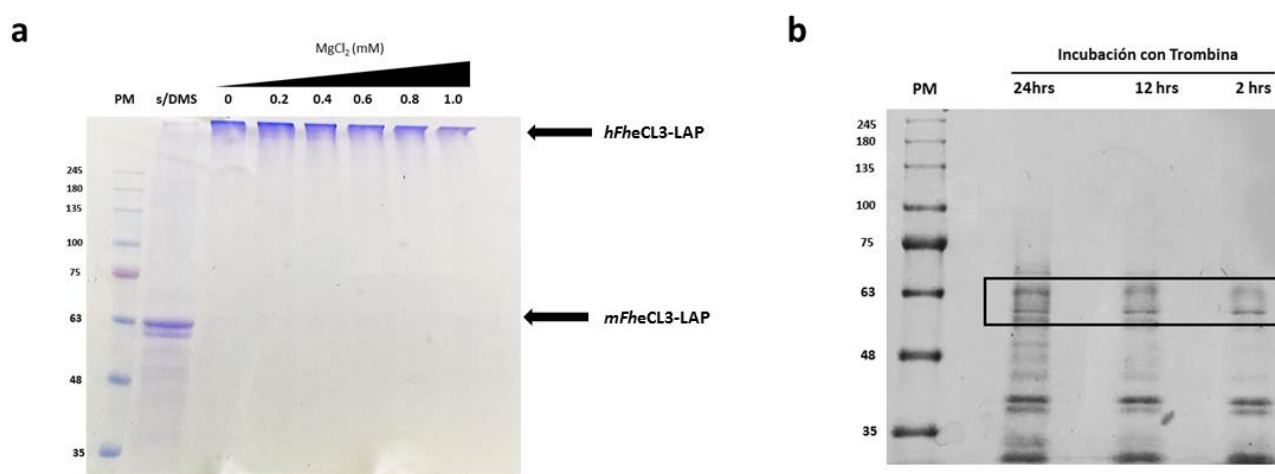


Figura 28: Formación de la estructura hexamérica de la proteína de fusión *FheCL3*-LAP. a) Gel de electroforesis SDS-PAGE 10% teñido con Coomassie Blue R-250. Las muestras de *FheCL3*-LAP fueron pre-incubadas con concentraciones crecientes de MgCl₂ (0-1 mM) y tratadas con DMS durante 1 hr a 37 °C. Las bandas por encima de los 245 KDa podrían corresponder la forma hexámera de *FheCL3*-LAP. b) Gel de electroforesis SDS-PAGE 10% teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250 del efecto de la digestión con Trombina sobre la *FheCL3*-LAP. Se observa la formación del producto de ~ 59.9 KDa correspondiente al peso molecular esperado para la proteína *FheCL3*-LAP sin la etiqueta de Histidinas.

Tabla 3: Comparación de la actividad específica Leu-AMC de *FhLAPr*, *FheCL3*-LAP y *FheCL3*-LAPc.

Actividad enzimática específica Leu-AMC (nmoles min ⁻¹ mg ⁻¹)	
<i>FhLAPr</i>	204,4± 14,6
<i>FheCL3</i> -LAP	66,16 ± 2,1
<i>FheCL3</i> -LAPc	162,2 ± 7,2

4.5.4 Evaluación de la capacidad de reconocimiento de un suero policlonal anti-*FheCL3*-LAP de *FhLAPr*, *FhCL3r* y *FheCL3*

Se generó un suero policlonal anti-*FheCL3*-LAP en conejo a modo de determinar la capacidad de reconocimiento del mismo sobre *FhLAPr*, *FheCL3*-LAP y *FhCL3* en comparación con sueros específicos para cada proteína. En la **Figura 29A** se muestra el ensayo de Western Blot (WB) de los respectivos sueros. En la misma se observa que el suero anti-*FhLAP*-Trxr, reconoce tanto la *FhLAPr* como la *FheCL3*-LAP, de igual manera el suero anti-*FheCL3*-LAP. La *FhCL3r* es una proteína que es glicosilada en el proceso de expresión en *Hansenula polymorpha*. Al no eliminar la glicosilación la misma migra como un *smear* en los geles SDS-PAGE con un peso molecular aparente de ~ 43 KDa. El suero anti-*FhCL3r* reconoce la fracción *FhCL3r*, pero no reconoce la fracción *FheCL3*-LAP. A modo de confirmar si el suero anti-*FheCL3*-LAP producido, reconoce la porción *FheCL3*, tanto sintética como en la proteína *FhCL3r*, se realizó un ensayo de ELISA a modo de visualizar la interacción. En la **Figura 29B**, se observa que el suero anti-*FheCL3*-LAP no reconoce de manera significativa la *FhCL3r*, pero reconoce de forma discreta la *FheCL3* sintética. A su vez, el suero *FheCL3*-LAP reconoce fuertemente la *FhLAPr* como se observó con el WB.

En resumen, el suero *FheCL3*-LAP reconoce tanto la porción *FhLAP*, como la porción *FheCL3*. Sin embargo, no reconoce esta última en el contexto de la proteína recombinante.

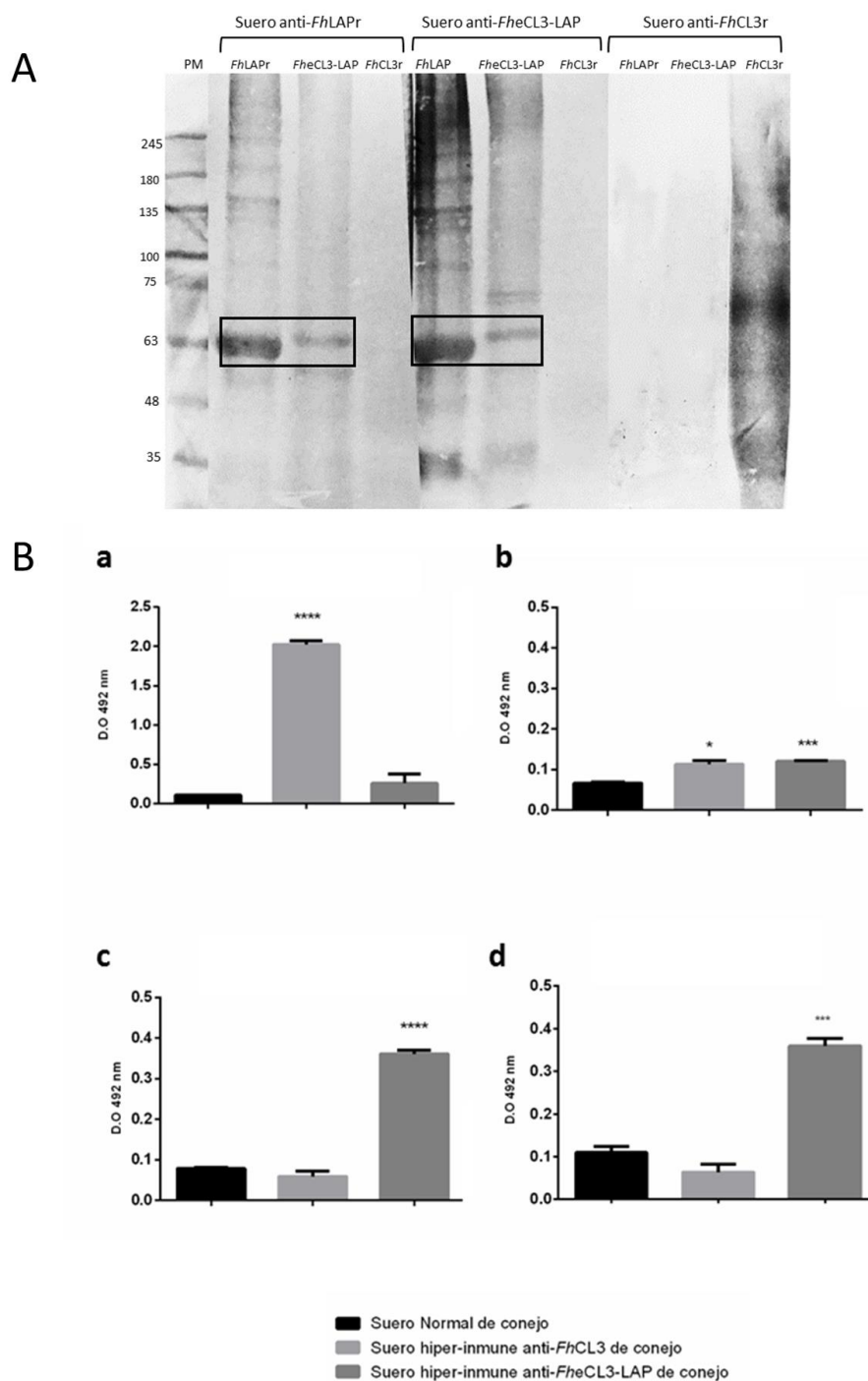


Figura 29: Evaluación del suero policlonal anti-*FheCL3-LAP* producido en conejo. A) Comparación de la inmunoreactividad de los sueros anti-*FhLAP*-Trx de oveja, anti-*FheCL3-LAP* de conejo y anti-*FhCL3r* de conejo contra las proteínas *FhLAPr*, *FheCL3-LAP* y *FhCL3r* mediante WB. B) Evaluación de la inmunoreactividad de los mismos sueros a través de la técnica ELISA frente a) *FhCL3r* (dilución de los sueros 1:800), b) *FheCL3* sintético (dilución 1:1.600), c) *FheCL3-LAP* (dilución 1:64.000) y d) *FhLAPr* (dilución 1:64.000).

4.6 Ensayo de inmunoprotección contra *F. hepatica* en un modelo murino de infección experimental

A modo de obtener datos preliminares en cuanto a la capacidad de inmunoprotección de las proteínas *FhLAPr*, *FhCL3r* y *FheCL3-LAP* se llevó a cabo un ensayo de inmunización en ratones de la cepa BALB/c utilizando un esquema de inmunización reportado previamente para un ensayo de inmunoprotección contra *F. gigantica* en ratones utilizando una *FgLAP* (Changklungmoa et al., 2013). El mismo consistió en una primo-inmunización seguido de dos refuerzos; el primero en el día 14 y el segundo en el día 28. Los animales de todos los grupos fueron desafiados con la forma infectante de *F. hepatica* al día 42. A partir de éste momento se realizó el seguimiento de la sobrevida de los animales hasta el día 45 post-infección. Asimismo, se realizó el seguimiento de la respuesta humoral antes del desafío y al momento del punto final de cada uno de los individuos. En la **Figura 30** se muestra la evolución de los anticuerpos IgG anti-*hFhLAPr*, anti-*FheCL3-LAP* y anti-*FhCL3r* previo al momento del desafío. Se observa una mayor respuesta de anticuerpos en el Grupo *FhLAPr* + Adyuvac 50 en el día 28 respecto de los demás grupos. Asimismo, se observan diferencias significativas entre IgG₁ e IgG_{2a} en este grupo a partir de la semana 4 del ensayo (**Figura 31a**). Se observa además que no hay diferencias entre las subclases IgG₁ e IgG_{2a} en el grupo administrado con *FheCL3-LAP* (**Figura 31b**), siendo IgG₁ predominante en el grupo administrado con *FhCL3r*. Adicionalmente, los sueros del grupo *FheCL3-LAP* no reconocen la *FheCL3* sintética. A su vez, los sueros del grupo que fue inmunizado con *FhCL3r* no reconoce de forma específica la porción *FheCL3* de *FheCL3-LAP* o la *FheCL3* sintética en este modelo experimental (**Figura 31c**).

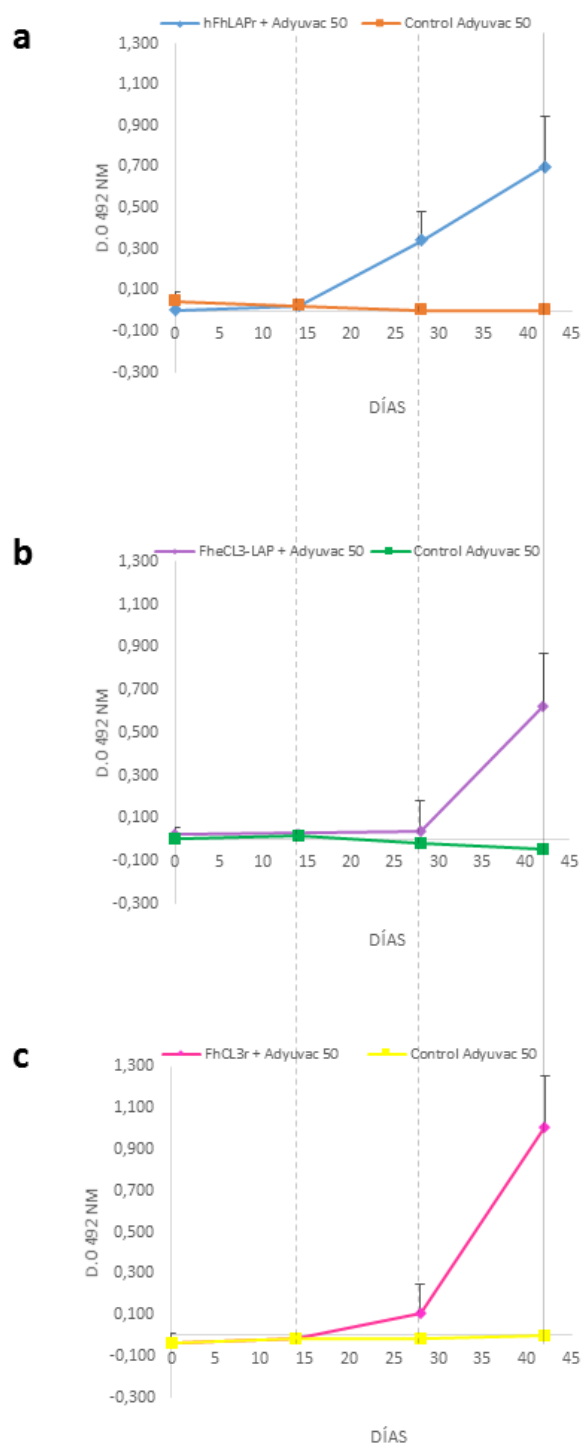


Figura 30 Evolución de la respuesta de anticuerpos del ensayo de inmunoprotección previo al desafío con *F. hepatica*. a) Respuesta humoral IgG de los sueros anti-*hFhLAPr* (dilución 1:8.000) del Grupo *hFhLAPr* + Adyuvac 50 y Control Adyuvac 50. Se observa una repuesta a la inmunización con la proteína a partir del día 28. b) Respuesta humoral IgG de los sueros anti-*FheCL3-LAP* (dilución 1:1.000) del grupo *FheCL3-LAP* + Adyuvac 50 y Control Adyuvac 50. Se observa un aumento de la respuesta de anticuerpos al día 42. c) Respuesta humoral de los sueros anti-*FhCL3r* (dilución 1:2.000) del Grupo *mFhCL3r* + Adyuvac 50 y Control Adyuvac 50. Se observa un aumento discreto a partir del día 28. Se marcan con línea punteada los días 14 y 28 correspondientes a los refuerzos y con línea continua se marca el momento del desafío.

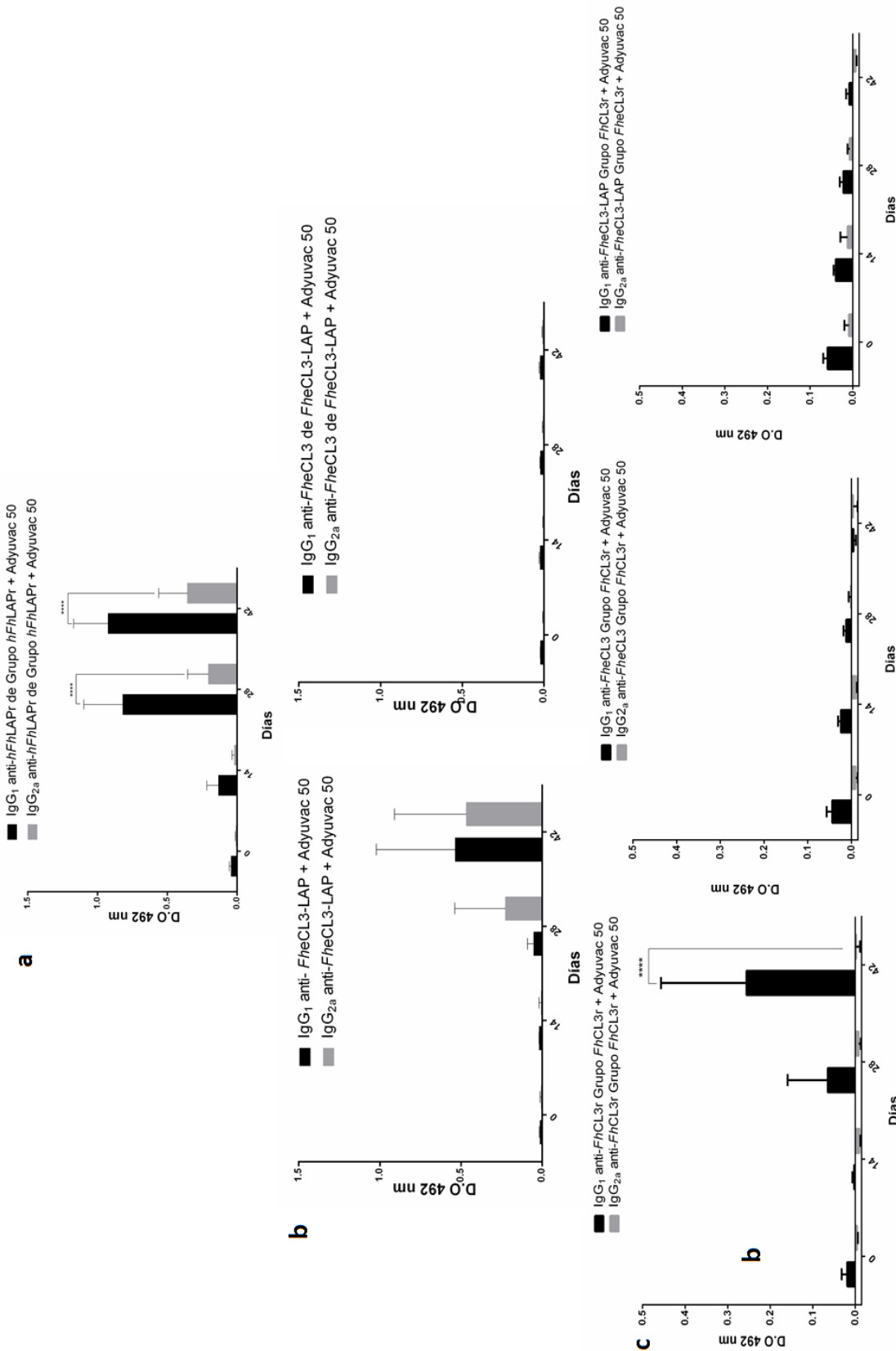


Figura 31: Evolución de la respuesta de anticuerpos IgG₁ e IgG_{2a} del ensayo de inmunoprotección previo al desafío con metacercarias de *F. hepatica*. a) Respuesta humoral de los sueros anti-*hFhLAPr* (dilución 1:16.000) del Grupo *hFhLAPr* + Aduvac 50. Existen diferencias significativas de los niveles de anticuerpos IgG₁ e IgG_{2a} en las semanas 4 y 6. b) Respuesta humoral de los sueros anti-*FheCL3-LAP* (dilución 1:2.000) del grupo *FheCL3-LAP* + Aduvac 50. No se observan diferencias significativas entre los niveles de IgG₁ e IgG_{2a} a lo largo del ensayo. y no se detecta *FheCL3* c) Respuesta humoral de los sueros anti-*FheCL3r* (dilución 1:1000) del Grupo *FheCL3r* + Aduvac 50. Se observa la predominancia de la subclase IgG_{2a} a lo largo del ensayo. No se detecta *FheCL3* y *FheCL3-LAP*.

Tras la infección con aproximadamente 12 metacercarias (56% de viabilidad *in vitro*), se realizó diariamente el seguimiento de la supervivencia de los animales hasta el día 45 post-infección y se determinó como punto final de cada individuo la aparición de distensión abdominal o cualquier signo de dolor o estrés severo en los animales. La eutanasia de los mismos se realizó mediante dislocación cervical, previo a la misma se extrajo sangre para la obtención de suero para ensayos de serología. A su vez, se recuperaron los hígados de cada uno de los animales. Si bien no se pudo constatar diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los grupos ensayados (**Figura 32**), se observó que los animales correspondientes al grupo Control Adyuvac 50 y del grupo *Fh*CL3r + Adyuvac 50 comenzaron a morir a partir del día 21 p.i, mientras que los animales de los grupos *Fh*LAPr + Adyuvac 50 y *Fhe*CL3-LAP + Adyuvac 50 comenzaron al día 23. Asimismo, solo en el grupo *Fh*CL3r + Adyuvac 50 se constató la muerte del 100% de los animales antes del día 45.

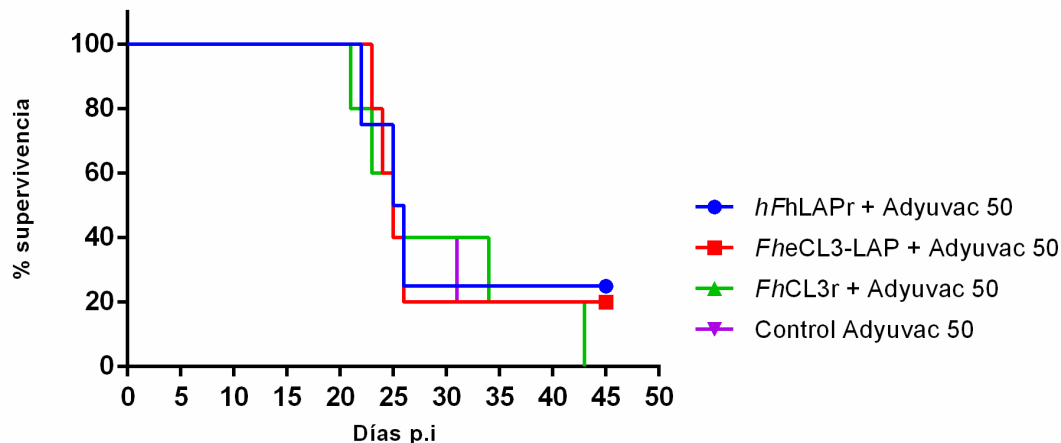


Figura 32: Evaluación de la supervivencia de los animales de los grupos inmunizados y control luego del desafío oral con metacercarias de *F. hepatica*. El punto final del ensayo se estableció en el día 45 p.i. Se realizó la comparación de las curvas de supervivencia con las pruebas de Mantel-Cox, Logrank y Gehan-Breslow-Wilcoxon mediante las cuales se determinó que no existen diferencias significativas entre las curvas.

Por otro lado, los niveles de IgG total de todos los grupos dentro del período entre el día 21 y 45 post-infección mostró una amplia variación de respuesta, particularmente en los grupos *Fh*LAPr + Adyuvac 50 y *Fhe*CL3-LAP + Adyuvac 50 (**Figura 33**).

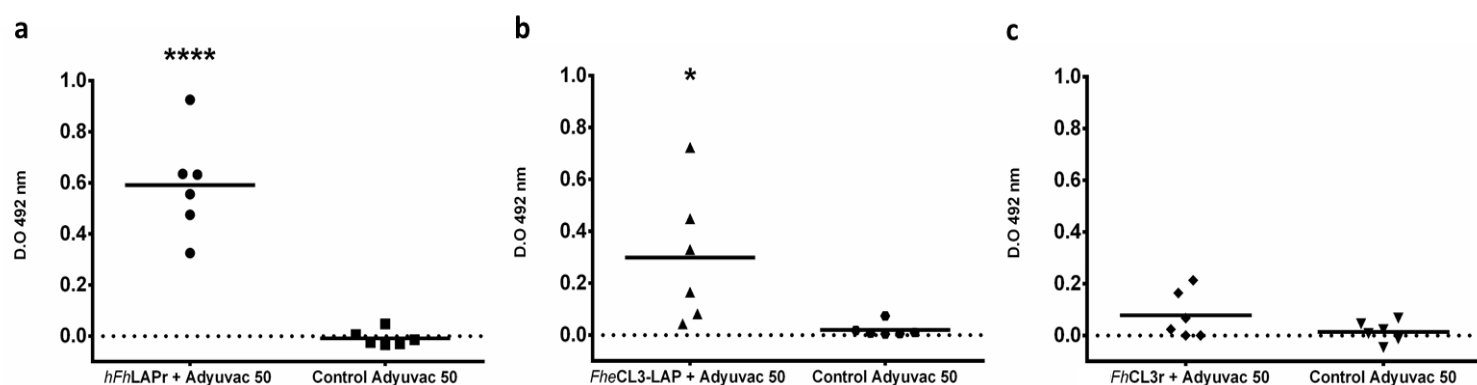


Figura 33: Nivel de respuesta IgG detectados por ELISA a partir del desafío con metacercarias de *F. hepatica*. a) *hFh*LAPr + Adyuvac 50 (dilución 1:8.000), b) *Fhe*CL3-LAP + Adyuvac 50 (dilución 1:1.000) y c) *Fh*CL3r + Adyuvac 50 (dilución 1:2.000). Las muestras fueron tomadas entre los días 21 y 45 p.i. Se observa una amplia variación de la respuesta de IgG en ese período, particularmente entre los grupos *Fh*LAPr y *Fhe*CL3-LAP.

Dentro de las subclases, se observó que el perfil de respuesta IgG₁/IgG_{2a} se mantuvo similar, respecto a momento previo al desafío. Siendo una respuesta mixta de IgG₁ e IgG_{2a} para el Grupo *Fh*LAPr + Adyuvac 50 con una tendencia de IgG₁ a predominar sobre IgG_{2a}. Mientras que para el grupo *Fhe*CL3-LAP + Adyuvac 50 se observa una respuesta mayormente balanceada entre IgG₁ e IgG₂ y para el grupo *Fh*CL3r + Adyuvac 50 se observa una respuesta predominantemente de IgG₁ (**Figura 34**). El suero anti-*Fhe*CL3-LAP no reconoce el péptido *Fhe*CL3.

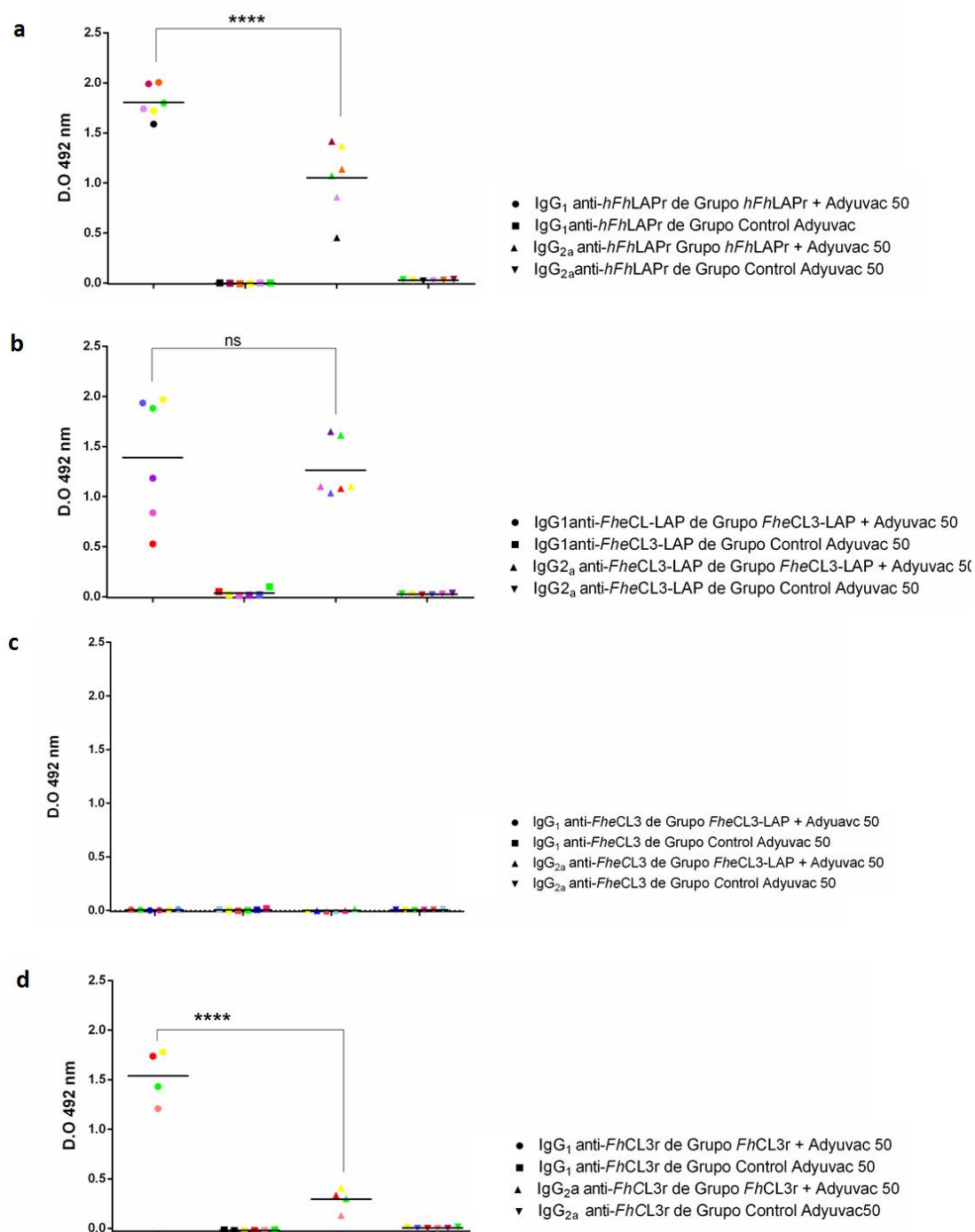


Figura 34: Niveles de anticuerpos IgG₁ e IgG_{2a} detectados por ELISA en el ensayo de inmunoprotección a partir del desafío con *F. hepatica*. a) IgG₁ e IgG_{2a} anti-*hFhLAPr* del grupo *hFhLAPr* + Adyuvac 50 (dilución 1:16.000). b) IgG₁ e IgG_{2a} anti-*FheCL3-LAP* del grupo *FheCL3-LAP* + Adyuvac 50 (dilución 1:2.000). c) IgG₁ e IgG_{2a} anti-*FheCL3* de grupo *FheCL3-LAP* + Adyuvac 50 (dilución 1:1000). d) IgG₁ e IgG_{2a} anti-*FhCL3r* del grupo *FhCL3r* + Adyuvac 50 (dilución 1:1.000). Las muestras fueron tomadas entre los días 21 y 45 p.i.

Tras la recuperación de los hígados de los animales con la sintomatología de enfermedad severa, se procedió a realizar el análisis parasitológico y evaluación del daño de los lóbulos hepáticos mediante el sistema de puntaje previamente descrito.

La mayor parte de las lesiones encontradas fueron de aspecto fibrótico y hemorrágico, con cambios en la coloración y consistencia del órgano. No se observaron diferencias significativas en el puntaje de daño entre los grupos vacunados, respecto al control Adyuvac 50 (**Figura 35**). Los niveles de daño fueron heterogéneos dentro de cada uno de los grupos habiendo mayoritariamente hígados clasificados como +++. Se constató solamente un hígado libre de lesiones compatibles con la infección en el grupo *FhCL3r* + Adyuvac 50.

Adicionalmente, el peso total de los hígados no sufrió un cambio significativo entre los grupos vacunados respecto del control Adyuvac 50. La recuperación de *F. hepatica* se dio puntualmente en un animal del grupo *FhCL3r* (2), un animal del grupo Control Adyuvac 50 (1) y un animal del Grupo *FhLAPr* + Adyuvac (3).

En resumen, si bien en todos los grupos hubo una respuesta específica de anticuerpos; no se observaron diferencias significativas en el nivel de sobrevida de los grupos vacunados respecto al control. Tampoco se observaron diferencias significativas en el nivel de daño hepático, por lo que estas formulaciones no generaron una respuesta inmunoprotectora en este modelo de infección.

Puntaje de daño	10	14	10	7	1	1	7,2 ± 5,3
Anterior							hFhLAPr + Adyuvac 50
Posterior							
Peso (gr)	1,50	1,80	1,90	1,50	1,20	0,90	1,47 ± 0,37

Puntaje de daño	14	14	7	11	14	1	10,2 ± 5,3
Anterior							FheCL3-LAP + Adyuvac 50
Posterior							
Peso (gr)	1,20	1,70	2,10	1,50	1,80	1,20	1,58 ± 0,35

Puntaje de daño	8	12	14	0	7	8	8,2 ± 4,8
Anterior							FhCL3r + Adyuvac 50
Posterior							
Peso (gr)	1,50	1,50	1,70	1,10	1,20	1,50	1,45 ± 0,25

Puntaje de daño	14	11	15	6	4	2	8,6 ± 5,4
Anterior							Control Adyuvac 50
Posterior							
Peso (gr)	1,00	1,10	1,80	1,10	1,00	1,30	1,22 ± 0,31

Hígado normal

Figura 35: Evaluación del daño hepático macroscópico del ensayo de inmunoprotección contra el desafío con *F. hepatica* en ratones de la cepa Balb/c. Se inmunizaron cuatro grupos de 6 animales con las proteínas *FhLAPr*, *FheCL3-LAP* y *FhCL3r* formuladas con Adyuvac 50 y el control Adyuvac 50. Se muestran el puntaje de daño asignado y el peso final del hígado para cada grupo (Media ± D.E).

5 Discusión

La capacidad inmunoprotectora de *FhLAPr* en ovinos, alcanzó niveles de protección en el rango de aplicación comercial para este tipo de vacunas (Maggioli et al., 2011) , sin embargo no se han logrado reproducir estos niveles en el modelo bovino, la especie más relevante desde el punto de vista comercial. Buscando alternativas para extender los resultados ovinos a otras especies, se postuló la posibilidad de analizar la contribución de la estructura cuaternaria en la generación de la respuesta humoral. Asimismo, nos planteamos explorar estrategias alternativas en la vía de vacunación ensayando la inmunización a nivel de mucosas. Por otro lado, propusimos evaluar el uso de la *FhLAPr* hexamérica como transportadora de péptidos inmunogénicos provenientes de otros antígenos parasitarios.

5.1 Evaluación del estado de oligomerización de *FhLAPr* y generación de las formas *hFhLAPr* y *mFhLAPr*

Anteriormente, se expresó y purificó la *FhLAP* en forma recombinante como proteína de fusión a la Trx de *E. coli* (Acosta et al., 2008). En el presente trabajo, se expresó la *FhLAP* en su forma recombinante a partir de la región codificante clonada en el vector pET28a (+) entre los sitios Bam H I y Sal I sin asociación a proteínas de fusión. La proteína recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad al Ni²⁺, mediante elución con 200 mM de Imidazol. Se obtuvo un rendimiento adecuado de la proteína en su forma activa, ya que presenta actividad enzimática específica Leu-AMC. Diversas LAPs tanto de helmintos como protozoarios, así como de otras especies han sido expresadas en forma recombinante tanto para fines diagnóstico como para su utilización como blanco terapéutico. Este es el caso de las LAP de *Schistosoma japonicum* (Faustina et al., 2011), *Paragonimus westermani* (Song et al., 2008), *F. gigantica* (Changklungmoa et al., 2012), *Clonorchis sinenses* (Qu et al., 2014), *Trypanosoma cruzi* (Cadavid-Restrepo et al., 2011), *Plasmodium vivax* (Lee et al., 2010), *Toxoplasma gondii* (Jia et al., 2010), entre otros.

Si bien la estructura cristalográfica de la *FhLAPr* aún no ha sido resuelta, del análisis de la secuencia surge que presenta las características típicas de la familia M17, como son el dominio Pfam de metaloproteasas del clan MF y alto grado de conservación del extremo C-terminal. Se ha demostrado que las LAPs funcionales de este grupo se ensamblan en homo-hexámeros y cada sub-unidad presenta sitios no equivalentes de unión a metales divalentes (Matsui et al., 2006). A través de ensayos de entrecruzamiento con DMS se ha realizado la descripción primaria de la estructura cuaternaria de la LAP del cristalino bovino (Carpentier et al., 1972) y la LAP de hígado humano (Kohn et al., 1986). Basándonos en ésta técnica, se llevaron a cabo ensayos de entrecruzamiento de la *FhLAPr* con DMS, separando los productos en geles SDS-PAGE al 10%. La técnica descrita originalmente por Davies & Starks, 1970 utiliza geles SDS-PAGE 4% en tubos, pero dadas las dificultades enfrentadas en el manejo de geles de tan baja concentración optamos por trabajar con una concentración mayor de acrilamida. Se observó la formación de una banda por encima de los 245 KDa, que podría corresponder a la forma hexámero (*hFhLAPr* ~ 356 KDa). A su vez se pudo detectar actividad Leu-AMC específica en condiciones basales y con concentraciones crecientes de $MgCl_2$ y $MnCl_2$. Al añadir metales divalentes resultó particularmente interesante el efecto del $ZnCl_2$, que promueve el desensamblaje del multímero y la consecuente desaparición de la actividad Leu-AMC específica. Anteriormente, el Zn^{2+} había sido identificado como un pobre activador de la actividad enzimática a concentraciones menores a 100 μM , y un fuerte inhibidor a concentraciones mayores a 1 mM tanto en la forma recombinante acoplada a Trx (Acosta et al., 2008) como en la nativa de *FhLAP* (Acosta et al., 1998).

La incubación con cantidades crecientes de $ZnCl_2$ permitió la visualización de las estructuras intermedias de *FhLAPr* en las muestras sometidas al entrecruzamiento con DMS. En conjunto, los resultados determinarían que el efecto inhibitorio del $ZnCl_2$ podría deberse al desensamblaje

de la estructura hexamérica y, por lo tanto, resultaría en la capacidad reducida de la *FhLAPr* para clivar el sustrato Leu-AMC.

La monomerización de *FhLAPr* fue realizada mediante la desnaturalización térmica de la proteína a 100 °C durante distintos tiempos, seguida de entrecruzamiento con DMS y visualización de las bandas a través de un gel SDS-PAGE 4-12%. Incubaciones mayores a 10 minutos producen agregados de proteínas que dificultan la separación, lo que resulta en la disminución de la cantidad de proteína visualizada en el gel (**Figura 11a**). En cualquier caso, el tratamiento térmico resulta en la desaparición de la actividad enzimática, indicando el desensamblaje de la forma hexamérica y la consecuente pérdida de la capacidad hidrolítica.

5.2 Evaluación de la inmunogenicidad de *mFhLAPr* y *hFhLAPr* en ratones

A modo de determinar la contribución de la estructura cuaternaria de la *FhLAPr* en la generación de la respuesta humoral de la forma monómero y hexámero de *FhLAPr*, se procedió a realizar un ensayo en ratones de la cepa BALB/c administrando con ambas formas a través de la vía sub-cutánea en el esquema de primo-inmunización seguida de dos refuerzos en las semanas 4 y 8. La evaluación por ELISA de los sueros de la semana 6 muestran señales significativamente más intensas contra la forma hexamérica, posiblemente porque permite detectar tanto los epítopes lineales como los conformacionales y discontinuos de la *hFhLAPr*. A partir de esto, se tomó como referencia la *hFhLAPr* para las determinaciones de los niveles de anticuerpos de las muestras individuales a través de ésta técnica.

La inmunización con *hFhLAPr* y *mFhLAPr* en combinación con Adyuvac 50 estimula la producción de anticuerpos específicos a lo largo de las 10 semanas del ensayo, observándose que el grupo *hFhLAPr* genera anticuerpos de forma gradual y creciente, mientras que el grupo *mFhLAPr* responde de manera más eficiente luego del refuerzo en la semana 8. Los grupos inmunizados con el antígeno sin el adyuvante, como es de esperar, presentan una pobre respuesta humoral a lo largo de todo el experimento. La inmunización con la forma *mFhLAPr*

en solución salina fue incapaz de inducir la producción significativa de anticuerpos IgG, mientras que la forma hexamérica indujo un pico de respuesta moderada únicamente en la semana 6 luego del primer refuerzo. Esto indicaría capacidad inmunoestimulante propia de la molécula funcional, aunque se requieren de estudios adicionales para determinarlo de manera definitiva.

Cuando se analiza la respuesta de las subclases IgG₁ e IgG_{2a}, se observa una fuerte respuesta de la primera a lo largo de todo el ensayo en los grupos inmunizados con el antígeno en su conformación hexamérica tanto en combinación con el adyuvante como con PBS, y en el grupo *mFhLAPr* en combinación con Adyuvac 50. Tanto *hFhLAPr* y *mFhLAPr* en combinación con Adyuvac 50 inducen una fuerte respuesta de IgG₁ a partir de la primera exposición al antígeno. Asimismo, la *hFhLAPr* en solución salina induce la producción de IgG₁ de forma más tardía (a partir de la semana 6) pero mantenida en niveles moderados a diferencia de lo observado con la respuesta IgG.

Es sabido que el cambio de clase a IgG_{2a} o IgG₁ depende de la producción de INF γ (citoquina típica de las respuestas Th₁), o de IL-4 (citoquina típica de las respuestas Th₂), respectivamente. A su vez, el INF γ tiene la capacidad de inhibir la producción de anticuerpos IgG₁, IgG_{2b}, IgG₃ e IgE. Por otra parte, la IL-4 tiene la capacidad de inhibición de la producción de IgM, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ (By et al., 1987; Finkelman et al., 1990). Estos resultados apuntan a que la vacunación con la forma hexamérica estimularía de manera más eficiente el sistema inmune induciendo la producción específica predominante de tipo IgG₁ mediada por las citoquinas del tipo 2.

A los efectos de profundizar en la contribución de la estructura cuaternaria en la inducción de la respuesta humoral sería necesaria la generación de un monómero de *FhLAPr* incapaz de ensamblarse a la forma multímero, pero que a su vez conserve la estructura terciaria de la proteína. Es posible postular que la generación de una proteína con mutaciones dirigidas a los amino ácidos que coordinan con el metal podría cumplir con este objetivo.

La formulación de *FhLAPr* en combinación con Adyuvac 50 fue previamente evaluada en el esquema de una primo-inmunización y un refuerzo en un modelo de infección experimental en ovinos. En este modelo, se observa un perfil mixto de respuesta dado por $IgG_1 > IgG_2$ previo al momento del desafío oral con la forma infectante, existiendo una correlación negativa significativa entre los niveles de anticuerpos IgG, IgG_1 e IgG_2 y la carga parasitaria en el hígado al momento de la necropsia (Maggioli et al., 2011). El desarrollo de una respuesta mixta IgG_1/IgG_2 no polarizada contra *FhLAP*, podría ser responsable por los niveles elevados de protección en este hospedador, relativizando el concepto de que la inducción de las respuestas del tipo 1 dirigidas hacia antígenos clave del parásito serían necesarias para la generación de protección contra parásitos helmintos (revisado en McNeilly & Nisbet, 2014).

A continuación, se evaluó la inmunogenicidad de la *hFhLAPr* y la *mFhLAPr* a nivel de mucosas mediante la administración intra-nasal de ambas formas en solución salina o en combinación con TC. La TC posee una estructura AB_5 , con un polipéptido A (TCA) que presenta el sitio catalítico y 5 polipéptidos B idénticos (TCB) asociados de forma no covalente (Zhang et al., 1995). Administrada de forma oral, intranasal o sublingual la TC (o TCB) ha resultado ser el mejor inmuno-estimulante de mucosas conocido hasta el momento, y ha sido utilizado no solo como adyuvante, sino que además como transportador de antígenos vacunales, mejorando la respuesta inmune contra estos en varios modelos experimentales (Bublin et al., 2007; Guan et al., 2014; Pinkhasov et al., 2010). La administración de antígenos en una mucosa, induce inmunidad hacia el mismo antígeno en mucosas distantes por la migración de los plasmocitos a los sitios efectores de la inmunidad de este compartimento. En este contexto, en el primer ensayo realizado la inmunización con la forma *hFhLAPr* sola o en combinación con TC a través de la mucosa nasal indujo una respuesta mayor IgG a lo largo del ensayo respecto a la forma *mFhLAPr*. Sin embargo, no pudo detectarse la presencia de IgA sérica específica anti-*hFhLAPr* o anti-*mFhLAPr* en ninguno de los puntos de los dos ensayos realizados. La cantidad de IgA

secretada en la mucosa respiratoria en respuesta a la inmunización ya es de por sí menor que la inducida a través de la mucosa intestinal, por lo que la ausencia de su detección en suero podría ser un indicativo de la baja estimulación de la producción de éstos anticuerpos por parte de la *FhLAP*. En un reciente estudio llevado a cabo en un modelo de infección en ratas se ha demostrado la inducción de niveles del 65% de protección a través de la inmunización vía oral de una cisteín proteinasa de *F. hepatica* (CPFhW) transportada por la proteína de núcleo del virus de la Hepatitis B (Kesik-Brodacka et al., 2017), lo que subraya la importancia de profundizar en esta línea de trabajo.

Durante el desarrollo del primer ensayo, se observó además el deterioro en la salud de los animales inmunizados con la TC determinado principalmente por conducta hiperactiva, pelaje descuidado y retaso en el crecimiento respecto del control PBS. Teniendo en cuenta este efecto adverso del adyuvante, se decidió realizar un segundo ensayo utilizando la forma *hFhLAPr* sola o en combinación con el adyuvante, disminuyendo la concentración de TC y del antígeno administrado en un esquema de primo-inmunización y refuerzos espaciados en las semanas 4 y 10, respectivamente. En este experimento se observó una respuesta mayor de anticuerpos IgG en el grupo *hFhLAPr* + CT, respecto de los demás grupos, y al igual que en el ensayo anterior, no se detectó respuesta de IgA específica en ningún punto del ensayo.

En conjunto, los estudios de inmunogenicidad de las formas *hFhLAPr* y *mFhLAPr* indican que la *hFhLAPr* induce una mayor respuesta humoral, ya sea sola o en combinación con Adyuvac 50. A su vez, se ha determinado que el tipo de anticuerpos generados a través de la inmunización subcutánea son predominantemente del tipo IgG₁ en ratones de la cepa BALB/c. En los ratones C57BL/6 inmunizados por vía nasal no pudo detectarse la presencia de IgA a nivel de suero, sin embargo, se pudo determinar la presencia de IgG anti-*hFhLAPr* a lo largo de ambos ensayos, indicando que el antígeno estimula el sistema inmune cuando es administrado a través de la mucosa. Teniendo en cuenta éstos resultados, se prevé realizar un experimento de

inmunización con *hFhLAPr* por vía oral y posterior desafío a modo de evaluar la capacidad de inducción de respuesta de tipo IgA secretoria a nivel intestinal para avanzar en la dilucidación del papel de los anticuerpos anti-*FhLAP* generados a nivel de la mucosa en la infección por *F. hepatica*.

5.3 Predicción de las regiones potencialmente inmunogénicas de la *mFhCL3* y utilización de la *FhLAP* como transportador

Diversos estudios de transcriptómica y proteómica han mostrado la participación orquestada de las *FhCL3* y *FhCBs* en el estadio JRD, disminuyendo su expresión a medida que el parásito alcanza el parénquima hepático. La *mFhCL3* presenta actividad colagenasa y dada su expresión diferencial en el estadio JRD, se cree que presenta relevancia en la penetración del intestino y la cápsula hepática por parte del parásito (Corvo et al., 2013; Robinson et al., 2011). Por lo tanto, el bloqueo por medio de anticuerpos específicos de las funciones de la *mFhCL3* en la infección temprana podría constituir un blanco interesante para el diseño de una vacuna. En este sentido, nos propusimos identificar mediante métodos de análisis inmunoinformáticos las regiones de la *mFhCL3* que presentan posibles epítopes con la finalidad de generar anticuerpos dirigidos hacia esa región a partir de la fusión de éste segmento con la *FhLAP*. La mayoría de los estudios que utilizan enfoques inmunoinformáticos se basan en un único método para la predicción de los epítopes. En este estudio, se utilizaron distintos servidores de acceso libre que utilizan abordajes de predicción distintos, identificando regiones asociadas a epítopes B o T.

La heterogeneidad de estos métodos no permitió la identificación definitiva de una única región, sino más bien, muestran que casi toda la extensión de la proteína puede ser considerada con potencial inmunogénico por al menos un predictor. Para darle mayor confiabilidad a nuestro estudio, decidimos focalizarnos en regiones consenso identificadas por

al menos la mitad de los predictores. De esta forma seleccionamos una región (NH₂-SGLETASDYPYQGWEYQCQYRKELGV-COOH, como blanco para ser fusionada al extremo N-terminal de la *FhLAP* para su posterior expresión en el sistema pET28a (+). En paralelo se generó un modelo tridimensional de la proteína quimérica *FheCL3-LAP*, que confirmó que la porción *FheCL3* quedaría expuesta en la superficie de la proteína hexamérica tras el clivaje del sitio preferencial de trombina generada con la expresión de la secuencia *FheCL3-LAP*-pET28a (+) en *E. coli* (**Figura 25**).

5.4 Expresión y purificación de la proteína *FheCL3-LAP*

A partir de los datos obtenidos a través del análisis informático de las regiones inmunogénicas de *mFhCL3* y de la conformación tridimensional de la proteína resultante de fusión *FheCL3-LAP*, se realizó el clonado de la secuencia nucleotídica de la proteína quimérica de fusión en el vector pET28a (+). La proteína recombinante *FheCL3-LAP* se produjo a partir de la inducción con distintas condiciones de IPTG (0.05-0.4 mM) y temperatura (22 °C, 25 °C y 28 °C), pero esta se expresa en los cuerpos de inclusión de *E. coli*, requiriendo la extracción de la misma mediante tratamiento con altas concentraciones de urea y replegamiento en presencia de L-Arginina. Al igual que *FhLAPr*, la *FheCL3-LAP* es eluída de la columna de afinidad al Ni² como una banda mayoritaria en el escalón 100 mM imidazol (**Figura 27a**) con un rendimiento de producción suficiente para llevar a cabo los experimentos y con actividad Leu-AMC específica antes y después del clivaje con trombina. La identidad de la banda fue confirmada tanto por Western Blot con un suero anti-*FhLAP*-Trx de oveja y mediante Espectrometría de Masas (MS/MS). Se verificó la formación del hexámero de *FheCL3-LAP* a través del entrecruzamiento con DMS, al igual que para *FhLAPr*. Los resultados muestran que la proteína se encontraría mayormente en la forma multimérica y el MgCl₂ no parece afectar la estabilidad de la estructura, ni su actividad enzimática específica hasta concentraciones de 1 mM.

Adicionalmente se generó un suero hiper-inmune anti-*FheCL3*-LAP en conejo, el cual reconoce de manera específica a *FheCL3*-LAP y *FhLAPr* por Western Blot y es útil para detectar *FheCL3*-LAP, *FhLAPr* y *FheCL3* en distintos rangos de dilución a través de la técnica ELISA (**Figura 31b**).

5.5 Evaluación del potencial inmunoprotector de *FheCL3*-LAP en comparación con *FhLAPr* y *FhCL3r* en ratones BALB/c

Se ha acumulado evidencia sobre la correlación existente entre el grado de orden molecular (multimerización) de un antígeno y la eficiencia en la inducción de la respuesta humoral (Bachmann et al., 1993). El orden espacial y la repetitividad actuarían estimulando la inmunogenicidad al promover una interacción más efectiva del antígeno con las inmunoglobulinas específicas sobre la superficie de los linfocitos B produciendo fuertes estímulos de señalización. Asimismo, la mayor estabilidad de un homopolímero incrementa la probabilidad de estimular las células B (Berguer et al., 2006; Denis et al., 2007). De éste modo, los antígenos oligoméricos como la BLS, la subunidad B de la TC serían capaces de generar una respuesta de memoria de manera más efectiva, posiblemente por la capacidad de desplegar epítopes repetidos sobre su superficie. A partir de éstos antecedentes y teniendo en cuenta la inmunogenicidad de la forma *hFhLAPr*, se expresó y purificó la *FhLAP-eCL3*, esperando que la inmunización con esta forma diera lugar a una respuesta específica de anticuerpos que reconocieran tanto la porción *FhLAP* como el epítope de *FheCL3*. El ensayo de inmunoprotección comparativo entre *FheCL3*-LAP, *hFhLAPr* y *FhCL3r* en combinación con Adyuvac 50 se realizó en un modelo de infección experimental en ratones de la cepa BALB/c. El esquema de inmunización consistió en una primo-inmunización seguida de dos refuerzos en los días 14 y 28 con el desafío oral con aproximadamente 12 metacercarias en el día 42 con el seguimiento de la sobrevivencia de los animales hasta el día 45 p.i. Al momento de la infección, todos los grupos presentaron niveles elevados de anticuerpos específicos, la que fue

particularmente importante en el grupo *hFhLAPr* + Adyuvac 50 reflejado en la dilución de las muestras requerida para la determinación de los niveles de los mismos (**Figura 30**). Asimismo, se observó una respuesta mayoritariamente de IgG₁ en este grupo a lo largo de las semanas evaluadas. Paralelamente, IgG₁ fue predominante en el grupo *mFhCL3r* + Adyuvac 50, mientras que en el grupo *FheCL3-LAP* se observó una respuesta balanceada de IgG₁/IgG_{2a} previo al desafío. El mismo perfil de subclases se observó en el período post-infección en todos los grupos. No se detectó inmunoreactividad anti-*FheCL3* en el grupo inmunizado con *FheCL3-LAP* ni en el grupo *FhCL3r* a lo largo de las semanas. Tampoco se detectó inmunoreactividad anti-*FheCL3-LAP* del grupo inmunizado con *FhCL3r*, lo que indicaría que la proteína quimérica *FheCL3-LAP* no indujo la producción de anticuerpos capaces de reconocer la porción *FheCL3*. A su vez, los anticuerpos del grupo *FhCL3r* + Adyuvac 50 no reconocen el péptido sintético o la porción *FheCL3* en el contexto de la proteína recombinante.

Es posible realizar una predicción *in silico* de la afinidad de unión de *FheCL3r* con las moléculas de MHC clase II murinas mediante la herramienta *MHC II binding prediction* del IEDB (Wang et al., 2008, 2010). La región SGLETASDYPYQGWE tiene una afinidad de unión de 22125 nM (baja afinidad) con el MHC II haplotipo H2-IAb (BALB/c) y la porción YQCQYRKELGVAKV de 3703 nM (afinidad moderada). A su vez, al evaluar el MHC II haplotipo H2-IAd (C57BL/6) se encuentra que la afinidad de unión a éste MHC clase II es de 50000 nM (baja afinidad), mientras que para la porción YQCQYRKELGVAKV es de 4722 nM (afinidad moderada) indicando variaciones en la afinidad de unión de los péptidos al MHC clase II incluso dentro de la misma especie. Esto podría indicar que al no tener un péptido de alta afinidad de unión al MHC clase II, se afectaría la presentación antigénica y por lo tanto la producción de anticuerpos. Aún no hay disponible la herramienta de predicción de unión al MHC clase II para las especies productivas. Sin embargo, se encuentra disponible un predictor de unión para distintos haplotipos de MHC clase I en bovinos.

La exposición de los animales a la infección experimental resultó en un compromiso importante de sobrevivencia en todos los grupos de tratamiento en la etapa crónica de la infección. No se observaron diferencias significativas entre los grupos, aunque el 100% de los animales del grupo *FhCL3r* + Adyuvac 50 debieron ser sacrificados antes de los 45 días p.i.

La evaluación a partir del daño macroscópico tampoco arrojó diferencias significativas entre los grupos, pudiéndose observar en promedio un daño moderado a severo entre los animales de cada uno de los grupos del ensayo. La heterogeneidad en los niveles de las lesiones pudo deberse a la baja viabilidad *in vitro* del material infeccioso, uno de los aspectos limitantes al momento del estudio de la infección con *F. hepatica* en el modelo de ratón, debido a la escasa cantidad de metacercarias administradas por dosis y al hecho de que el ratón no es un hospedero natural de *F. hepatica*, y donde la relación entre tamaño del parásito invasor y el hígado se incrementa significativamente.

Tal como fuera demostrado a partir de los resultados obtenidos por nuestro grupo en los ensayos de vacunación con *FhTGR*, los hallazgos presentados en esta tesis sobre la capacidad protectora de la proteína quimérica *FheCL3-LAP* no pueden ser extrapolados a las especies productivas, y deben ser interpretados en forma cuidadosa como un aporte al tema.

6 Perspectivas

Este trabajo se plantó como objetivo determinar la contribución en la inmunogenicidad de las formas hexámero y monómero de la *FhLAPr* con la finalidad de evaluar su potencial como transportador de pequeños péptidos inmunogénicos. Si bien se observaron diferencias en cuanto a la inmunogenicidad entre ambas formas a nivel tanto sistémico como de mucosas, no se pudo confirmar el potencial de *hFhLAPr* como transportador de péptidos en el modelo de ratón utilizando una secuencia inmunogénica de *FheCL3*. A modo de establecer esta función de manera más precisa, es necesario por un lado validar de forma experimental los epítopes B y T y evaluar la inmunogenicidad y potencial inmunoproláctico del antígeno quimérico en un modelo de infección en el hospedero natural de *F. hepatica*.

Búsqueda de epítopes B y T

Si bien los métodos inmunoinformáticos de predicción de epítopes B y T son herramientas útiles y de bajo costo para la determinación primaria las regiones inmunogénicas de una proteína, los mismos son extremadamente variables, y deben ser usados en conjunto para logran predicciones con cierto grado de confianza. Asimismo, deben ser validados mediante aproximaciones experimentales como la Espectrometría de Masas (Kwabena et al., 2016) o por medio del escaneo con anticuerpos específicos generados por medio de una librería de fagos conteniendo distintas combinaciones de péptidos de la *FhCL3r* (revisado en Rojas et al., 2014). A su vez, se requieren de ensayos *in vitro* a modo de demostrar la capacidad de los anticuerpos generados en el bloqueo de la función colagenasa de la *mFhCL3r*, la cual parecería tener un rol de relevancia en la invasión del hospedero.

El modelo murino de infección contra *F. hepatica*

Como se indicó anteriormente, existen herramientas de predicción de las respuestas T en ratones, por lo que resultan de gran utilidad al momento de la elección del modelo a utilizarse para la evaluación de la inmunogenicidad de los antígenos. Si bien en la actualidad, las

especies que pueden ser evaluadas *in silico* son limitadas, el desarrollo de esta disciplina permitirá en poco tiempo elecciones más acertadas de modelos experimentales.

En el caso particular del modelo murino de infección con *F. hepatica*, la evaluación de la sobrevida y del daño tanto macroscópico como microscópico de las lesiones hepáticas generadas resulta una tarea laboriosa y que no permite discernir de manera precisa los distintos grados de lesiones generadas por la infección tanto en animales vacunados como no vacunados. En un reciente estudio de Rojas-Caraballo et al. (2017) se compara el perfil transcriptómico inducido en el hígado en respuesta a la infección con *F. hepatica* en distintos tiempos, en comparación con distintos grupos de animales inmunizados con una combinación de epítopes B y T, previamente caracterizados. Estos datos son correlacionados con los niveles de sobrevida y el daño hepático macroscópico observado. Este abordaje resulta un punto de partida interesante para el análisis de las formulaciones vacunales en el modelo de infección de ratón y podría aportar información adicional del impacto de las mismas.

Evaluación de la respuesta celular frente a la vacunación

Si bien es sabido que la *FhLAPr* induce una respuesta mixta de IgG₁/IgG₂ en ovinos, poco se sabe si este perfil es inducido exclusivamente por la exopeptidasa recombinante, ya que la misma es producida en un vector procariota *E. coli* BL21 (DE3), el cual contribuye con una serie de contaminantes en particular el LPS. En este sentido, sería interesante la evaluación de la respuesta de citoquinas inducidas y las poblaciones celulares reclutadas en respuesta a la vacunación con *FhLAPr* libre de LPS sobre macrófagos o células dendríticas. Debido a que la eliminación del LPS por métodos cromatográficos o mediante el uso de Tritón X-114 no resulta en la completa eliminación del LPS, se propone la expresión de *FhLAPr* en una cepa de *E. coli*

donde si bien el LPS se encuentra presente, el mismo presenta una modificación que permite eliminar la señal activadora de TLR4 (Mamat et al., 2015).

7 Bibliografía

- Acosta, D., Cancela, M., Piacenza, L., Roche, L., Carmona, C., Tort, J. F. (2008). *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 158(1), 52–64.
- Acosta, D., Goni, F., Carmona, C. (1998). Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *The Journal of Parasitology*, 84(1), 1–7.
- Alfano, E. F., Lentz, E. M., Bellido, D., Dus Santos, M. J., Goldbaum, F. A., Wigdorovitz, A., Bravo-almonacid, F. (2015). Expression of the multimeric and highly immunogenic *Brucella* spp. lumazine synthase fused to bovine rotavirus VP8d as a scaffold for antigen production in tobacco chloroplasts. *Frontiers in Plant Science*, 6(December), 1170.
- Andreatta, M., & Nielsen, M. (2015). Gapped sequence alignment using artificial neural networks: Application to the MHC class I system. *Bioinformatics*, 32(4), 511–517.
- Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F., Stadercker, M. J., Gause, W. C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews. Immunology*, 7(12), 975–87.
- Bachmann, M. F., Rohrer, U. H., Kündig, T. M., Bürki, K., Bachmann, M. F., Rohrer, U. H., Zinkernagel, R. M. (1993). The Influence of Antigen Organization on B Cell Responsiveness Hans Hengartner and Rolf M. Zinkernagel Published by : American Association for the Advancement of Science Benkert, P., Tosatto, S. C. E., Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 71(1), 261–277.
- Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Dalton, J. P., Goñi, F. (2000). *Fasciola hepatica*: Parasite-Secreted Proteinases Degrade All Human IgG Subclasses: Determination of the Specific Cleavage Sites and Identification of the Immunoglobulin Fragments Produced. *Experimental Parasitology*, 94(2), 99–110.
- Berasain, P., Goñi, F., McGonigle, S., Dowd, A., John, P., Frangione, B., Carmona, C. (2017). Proteinases Secreted by *Fasciola hepatica* Degrade Extracellular Matrix and Basement Membrane Components. *Journal of Parasitology*, 83(1), 1–5.
- Berguer, P., Mundinano, J., Piazzon, I., Goldbaum, F. (2006). A Polymeric Bacterial Protein Activates Dendritic Cells via TLR4. *The Journal of Immunology*, 176(4), 2366–2372.
- Bossaert, K., Farnir, F., Leclipteux, T., Protz, M., Lonnew, J. F., Losson, B. (2000). Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 87(2–3), 103–123.
- Bublin, M., Hoflehner, E., Wagner, B., Radauer, C., Wagner, S., Hufnagl, K., Breiteneder, H. (2007). Use of a genetic cholera toxin B subunit/allergen fusion molecule as mucosal delivery system with immunosuppressive activity against Th2 immune responses. *Vaccine*, 25(50), 8395–8404.
- By, E., These, M., & Bsf, S. (1987). Interferon- γ and B Cell Stimulatory Factor-I Reciprocally Regulate Ig Isotype Production, 1(March), 4–7.
- Cadavid-Restrepo, G., Gastardelo, T. S., Faudry, E., de Almeida, H., Bastos, I. M. D., Negreiros, R. S., Santana, J. M. (2011). The major leucyl aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAPTc) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metalloproteinases. *BMC Biochemistry*, 12(1), 46.
- Cancela, M., Acosta, D., Rinaldi, G., Silva, E., Durán, R., Roche, L., Tort, J. F. (2008). A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie*, 90(10), 1461–1475.
- Cancela, M., Ruétalo, N., Dell’Oca, N., da Silva, E., Smircich, P., Rinaldi, G., Tort, J. F. (2010). Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics*, 11(1), 227.
- Carmona, C., Dowd, A. J., Smith, A. M., Dalton, J. P. (1993). Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62(1), 9–17.
- Carmona, C., McGonigle, S., Dowd, A. J., Smith, A. M., Coughlan, S., McGowran, E., Dalton, J. P. (1994). A dipeptidylpeptidase secreted by *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 109 (Pt 1), 113–118.
- Carmona, C., & Tort, J. F. (2016). Fasciolosis in South America: epidemiology and control challenges. *Journal of*

- Helminthology*, submitted, 1–11.
- Carpenter FH & Tinker K (1972). Intermolecular Probe Cross-linking of Oligomeric of Monomeric Proteins as a Proteins and of Quaternary. *Biological Chemistry*, 247, 5580–5586.
- Casanueva, P., Hillyer, G. V, Ramajo, V., Oleaga, A., Espinoza, E. Y., Muro, A. (2001). Immunoprophylaxis against *Fasciola hepatica* in Rabbits Using a Recombinant Fh15 Fatty Acid-Binding Protein. *The Journal of Parasitology* VO - 87, (3), 697.
- Cassataro, J., Pasquevich, K. A., Estein, S. M., Laplagne, D. A., Velikovsky, C. A., de la Barrera, S., Goldbaum, F. A. (2007). A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine*, 25(22), 4437–4446.
- Changklungmoa, N., Chaithirayanon, K., Kueakhai, P., Meemon, K., Riengrojpitak, S., Sobhon, P. (2012). Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase from *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology*, 131(3), 283–291.
- Changklungmoa, N., Kueakhai, P., Riengrojpitak, S., Chaithirayanon, K., Chaichanasak, P., Preyavichyapugdee, N., Sobhon, P. (2013). Immunization with recombinant leucine aminopeptidase showed protection against *Fasciola gigantica* in mice. *Parasitology Research*, 112(10), 3653–3659.
- Chou, P. Y., & Fasman, G. D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 47, 45–148.
- Clery, D. G., & Mulcahy, G. (1998). Lymphocyte and Cytokine Responses of Young Cattle During Primary Infection with *Fasciola-Hepatica*. *Research in Veterinary Science*, 65(2), 169–171.
- Clery, D., Torgerson, P., & Mulcahy, G. (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 62(1–2), 71–82.
- Correa, A. C., Escobar, J. S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., Hurtrez-Boussès, S. (2010). Bridging gaps in the molecular phylogeny of Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of fascioliasis. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 381.
- Corvo, I., Cancela, M., Cappetta, M., Pi-Denis, N., Tort, J. F., Roche, L. (2009). The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(1), 41–47.
- Corvo, I., O'Donoghue, A. J., Pastro, L., Pi-Denis, N., Eroy-Reveles, A., Roche, L., Tort, J. F. (2013). Dissecting the Active Site of the Collagenolytic Cathepsin L3 Protease of the Invasive Stage of *Fasciola hepatica*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(7), 1–11.
- Cruz-Revilla, C., Toledo, A., Rosas, G., Huerta, M., Flores-Perez, I., Pena, N., Sciotto, E. (2006). Effective protection against experimental *Taenia solium* tapeworm infection in hamsters by primo-infection and by vaccination with recombinant or synthetic heterologous antigens. *The Journal of Parasitology*, 92(4), 864–867.
- Cwiklinski, K., Neill, S. M. O., Donnelly, S., Dalton, J. P. (2016). A prospective view of animal and human Fasciolosis, (June), 558–568.
- Dalton, J. P., McGonigle, S., Rolph, T. P., Andrews, S. J. (1996). Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infection and Immunity*, 64(12), 5066–5074.
- Dalton, J. P., Neill, S. O., Stack, C., Collins, P., Walshe, A., Sekiya, M., 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.
- Davies, G. E., & Stark, G. R. (1970). Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 66(3), 651–656.
- Denis, J., Majeau, N., Acosta-Ramirez, E., Savard, C., Bedard, M. C., Simard, S., Leclerc, D. (2007).

- Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: Evidence for the critical function of multimerization. *Virology*, 363(1), 59–68.
- Di Maggio, L. S., Tirloni, L., Pinto, A. F. M., Diedrich, J. K., Yates III, J. R., Benavides, U., Berasain, P. (2016). Across intra-mammalian stages of the liver fluke *Fasciola hepatica*: a proteomic study. *Scientific Reports*, 6(August), 32796.
- Donnelly, S., Neill, S. M. O., Sekiya, M., Dalton, J. P., Mulcahy, G. (2005). Thioredoxin Peroxidase Secreted by *Fasciola hepatica* Induces the Alternative Activation of Macrophages Thioredoxin Peroxidase Secreted by *Fasciola hepatica* Induces the Alternative Activation of Macrophages. *Infection and Immunity*, 73(1), 166–173.
- Donnelly, S., Stack, C. M., O'Neill, S. M., Sayed, A. A., Williams, D. L., Dalton, J. P. (2008). Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(11), 4022–4032.
- Du, Z. Q., & Wang, J. Y. (2015). A novel lumazine synthase molecule from *Brucella* significantly promotes the immune-stimulation effects of antigenic protein. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 14(4), 13084–13095.
- Emini, E. A., Hughes, J. V., Perlow, D. S., Boger, J. (1985). Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *Journal of Virology*, 55(3), 836–9.
- Escamilla, A., Bautista, M. J., Zafra, R., Pacheco, I. L., Ruiz, M. T., Méndez, A., Pérez, J. (2015). *Fasciola hepatica* Induces Eosinophil Apoptosis in the Migratory and Biliary Stages of Infection in Sheep. *Elsevier B.V.*
- Escamilla, A., Pérez-Caballero, R., Zafra, R., Bautista, M. J., Pacheco, I. L., Ruiz, M. T., Pérez, J. (2017). Apoptosis of peritoneal leucocytes during early stages of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Veterinary Parasitology*.
- Esmaelizad, M., Ahmadian, G., Aghaiepour, K., Shamsara, M., Paykari, H., Tebianian, M. (2013a). Induction of prominent Th1 response in C57Bl/6 mice immunized with an *E. coli*-expressed multi T-cell epitope EgA31 antigen against *Echinococcus granulosus*. *Folia Parasitologica*, 60(1), 28–34.
- Esmaelizad, M., Ahmadian, G., Aghaiepour, K., Shamsara, M., Paykari, H., Tebianian, M. (2013b). Induction of protective T-helper 1 immune responses against *Echinococcus granulosus* in mice by a multi-T-cell epitope antigen based on five proteins. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(4), 408–413.
- Esteban, J. G., & Bargues, M. D. (1999). The traditional epidemiological picture of human fascioliasis has changed markedly in recent years, as outlined below., 77(4), 340–346.
- Faustina, H.-L., Luo, Q.-L., Zhong, Z.-R., Song, X.-R., Chen, Z.-W., Wang, L., Shen, J.-L. (2011). Evaluation of recombinant SjLAP and SjFBPA in detecting antibodies to *Schistosoma japonicum*. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases*, 29(5), 339–347.
- Finkelman, F. D., Holmes, J., Paul, W. E. (1990). Lymphokine control of in vivo immunoglobulin. *Annu. Rev. Immunol.*, (8), 303–33.
- Fleri, W., Paul, S., Dhanda, S. K., Mahajan, S., Xu, X., Peters, B., Sette, A. (2017). The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Frontiers in Immunology*, 8, 1–16.
- Flynn, R. J., Irwin, J. A., Olivier, M., Sekiya, M., Dalton, J. P., Mulcahy, G. (2007). Alternative activation of ruminant macrophages by *Fasciola hepatica*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 120(1–2), 31–40.
- Flynn, R. J., & Mulcahy, G. (2008). Possible role for toll-like receptors in interaction of *Fasciola hepatica* excretory/secretory products with bovine macrophages. *Infection and Immunity*, 76(2), 678–684.
- Flynn, R. J., Mulcahy, G., Elsheikha, H. M. (2010). Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: Implications for control. *Veterinary Parasitology*, 169(3–4), 235–240.
- Flynn, R. J., Mulcahy, G., Welsh, M., Cassidy, J. P., Corbett, D., Milligan, C., McNair, J. (2009). Co-Infection of

- cattle with *Fasciola hepatica* and mycobacterium bovis - Immunological consequences. *Transboundary and Emerging Diseases*, 56(6–7), 269–274.
- Guan, C., Ji, J., Jin, C., Wang, G., Li, X., Guan, W. (2014). Expression of cholera toxin B subunit-lumbrokinase in edible sunflower seeds-the use of transmucosal carrier to enhance its fusion protein's effect on protection of rats and mice against thrombosis. *Biotechnology Progress*, 30(5), 1029–1039.
- Guasconi, L., Serradell, M. C., Garro, A. P., Iacobelli, L., Masih, D. T. (2011). C-type lectins on macrophages participate in the immunomodulatory response to *Fasciola hepatica* products. *Immunology*, 133(3), 386–396.
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714–2723.
- Haroun, E. T., & Hillyer, G. V. (1986). Resistance to fascioliasis a 2review. *Veterinary Parasitology*, 20(1–3), 63–93.
- Hernández-Guzmán, K., Sahagún-Ruiz, a., Vallecillo, a. J., Cruz-Mendoza, I., Quiroz-Romero, H. (2014). Construction and evaluation of a chimeric protein made from *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase and cathepsin L1. *Journal of Helminthology*, 1, 1–7.
- Hillyer, G. V. (1987). Heterologous resistance in schistosomiasis.
- Hillyer, G. V. (1985). Induction of immunity in mice to *Fasciola hepatica* with a Fasciola/Schistosoma cross-reactive defined immunity antigen. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34(6), 1127–1131.
- Hiriart, Y., Rossi, A. H., Biedma, M. E., Errea, A. J., Moreno, G., Cayet, D., Rumbo, M. (2017). Characterization of structural and immunological properties of a fusion protein between flagellin from Salmonella and lumazine synthase from Brucella. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*.
- INAC. (2015a). Auditoría de calidad de la cadena cárnica ovina del uruguay 2013.
- INAC. (2015b). Auditoría de calidad de la cadena cárnica vacuna del uruguay 2013 – 2015.
- Janssen, R., Wauben, M. H. M., Tommassen, J. (1996). Quaternary structure of a carrier protein influences antigenicity and immunogenicity of an inserted T cell determinant. *International Immunology*, 8(6), 829–836.
- Jayaraj, R., Piedrafita, D., Dynon, K., Grams, R., Spithill, T. W., Smooker, P. M. (2009). Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Veterinary Parasitology*, 160(3–4), 230–236.
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*.
- Jia, H., Nishikawa, Y., Luo, Y., Yamagishi, J., Sugimoto, C., Xuan, X. (2010). Characterization of a leucine aminopeptidase from *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 170(1), 1–6.
- Keiser, J., & Utzinger, J. (2009). Food-borne trematodiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(3), 466–483.
- Kelley, J. M., Elliott, T. P., Beddoe, T., Anderson, G., Skuce, P., Spithill, T. W. (2016). Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends in Parasitology*, 32(6), 458–469.
- Kelly, L. A., Mezulis, S., Yates, C., Wass, M., Sternberg, M. (2015). The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858.
- Kesik-Brodacka, M., Lipiec, A., Kozak Ljunggren, M., Jedlina, L., Miedzinska, K., Mikolajczak, M., Wedrychowicz, H. (2017). Immune response of rats vaccinated orally with various plant-expressed recombinant cysteine proteinase constructs when challenged with *Fasciola hepatica* metacercariae. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3), e0005451.
- Kim, H., & Lipscomb, W. N. (1994). Structure and mechanism of bovine lens leucine aminopeptidase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 68, 153–213.

- Kohno, H., Kanda, S., Kanno, T. (1986). Immunoaffinity purification and characterization of leucine aminopeptidase from human liver. *Journal of Biological Chemistry*, 261(23), 10744–10748.
- Kolaskar, A. S., & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters*, 276(1–2), 172–174.
- Kwabena F.M. Opuni, M.-M., Yefremova, Y., El-Kased, R. F., Koy, C., Glocker, M. O. (2016). Mass Spectrometric Epitope Mapping. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(12), 987–992.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lang, B. Z. (1967). Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the white mouse. II. Studies on acquired immunity. *The Journal of Parasitology*, 53(1), 21–30.
- Lang, B. Z. (1974). Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the white mouse. V. Age of fluke responsible for the induction of acquired immunity. *The Journal of Parasitology*, 60(1), 90–92.
- Lang, B. Z. (1976). Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the white mouse. VII. effects of anti-worm incubate sera on transferred worms and successful vaccination with a crude incubate antigen. *The Journal of Parasitology*, 62(2), 232–236.
- Lang, B. Z., & Dronen, N. O. (2016). Host-Parasite Relationships of *Fasciola hepatica* in the White Mouse . IV . Studies on Worm Transfer and the Induction of Acquired Immunity by Worms of Different Ages Published by : Allen Press on behalf of American Society of Parasitologists Stable URL : , 58(1), 84–87.
- Lang, B. Z., & Hall, R. F. (1977). Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the white mouse. VIII. Successful vaccination with culture incubate antigens and antigens from sonic disruption of immature worms. *The Journal of Parasitology*, 63(6), 1046–1049.
- Lee, J.-Y., Song, S.-M., Seok, J.-W., Jha, B. K., Han, E.-T., Song, H.-O., Chung, D.-I. (2010). M17 leucine aminopeptidase of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 170(1), 45–48.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W580–W584.
- López-Abán, J., Nogal-Ruiz, J. J., Vicente, B., Morondo, P., Díez-Baños, P., Hillyer, G. V., Muro, A. (2008). The addition of a new immunomodulator with the adjuvant adaptation ADAD system using fatty acid binding proteins increases the protection against *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 153(1–2), 176–181.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Adrendall, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, D. C. (2003). Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 50(August 2002), 437–450.
- MacArthur, M. W., Laskowski, R. A., Thornton, J. M. (1994). Knowledge-based validation of protein structure coordinates derived by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(5), 731–737.
- Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basika, T., Carmona, C. (2011). The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine*, 29(48), 9057–9063.
- Maggioli, G., Bottini, G., Basika, T., Alonzo, P., Salinas, G., Carmona, C. (2016). Immunization with *Fasciola hepatica* thioredoxin glutathione reductase failed to confer protection against fasciolosis in cattle. *Veterinary Parasitology*, 224, 13–19.
- Maggioli, G., Silveira, F., Martín-Alonso, J. M., Salinas, G., Carmona, C., Parra, F. (2011). A recombinant thioredoxin-glutathione reductase from *Fasciola hepatica* induces a protective response in rabbits. *Experimental Parasitology*, 129, 323–330.
- Maizels, R. M., Balic, A., Allen, J. E., Taylor, M. D., Allen, J. E. (2004). Helminth parasites : masters of regulation . Immunol Rev Helminth parasites – masters of regulation, 201(March 2016), 89–116.

- Mamat, U., Wilke, K., Bramhill, D., Schromm, A. B., Lindner, B., Kohl, T. A., Woodard, R. W. (2015). Erratum to: Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 81.
- Martínez-Fernández, A. R., Nogal-Ruiz, J. J., López-Abán, J., Ramajo, V., Oleaga, A., Manga-González, Y., Muro, A. (2004). Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Veterinary Parasitology*, 126(3), 287–298.
- Mas-Coma, S., Valero, M., Bargues, M. (2009). Chapter 2 Fasciola, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. *Advances in Parasitology*, 69(9), 41–146.
- Matsui, M., Fowler, J. H., Walling, L. L. (2006). Leucine aminopeptidases: Diversity in structure and function. *Biological Chemistry*, 387(12), 1535–1544.
- McGonigle, L., Mousley, A., Marks, N. J., Brennan, G. P., Dalton, J. P., Spithill, T. W., 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.
- Mcneilly, T. N., & Nisbet, A. J. (2014). Immune modulation by helminth parasites of ruminants : implications for vaccine development and host immune competence.
- Meeusen, E. N. T., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P., Jungersen, G. (2007). Current Status of Veterinary Vaccines, 20(3), 489–510.
- Mejias, M. P., Cabrera, G., Fernández-Brando, R. J., Baschkier, A., Gherzi, G., Abrey-Recalde, M. J., Palermo, M. S. (2014). Protection of mice against Shiga toxin 2 (Stx2)-associated damage by maternal immunization with a Brucella lumazine synthase-Stx2 B subunit chimera. *Infection and Immunity*, 82(4), 1491–1499.
- Mejias, M. P., Gherzi, G., Craig, P. O., Panek, C. A., Bentancor, L. V., Baschkier, A., Palermo, M. S. (2013). Immunization with a chimera consisting of the B subunit of Shiga toxin type 2 and brucella lumazine synthase confers total protection against Shiga toxins in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(5), 2403–2411.
- Mendes, R. E., Pérez-Écija, R. A., Zafra, R., Buffoni, L., Martínez-Moreno, Á., Dalton, J. P., Pérez, J. (2010). Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vaccine*, 28, 2832–2840.
- Morrison, C. A., Colin, T., Sexton, J. L., Bowen, F., Wicker, J., Friedel, T., Spithill, T. W. (1996). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine*, 14(17–18), 1603–1612.
- Muro, A., Ramajo, V., Lopez, J., Simon, F., Hillyer, G. V. (1997). *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Veterinary Parasitology*, 69, (3–4), 219.
- Nozoye, T., Takaiwa, F., Tsuji, N., Yamakawa, T., Arakawa, T., Hayashi, Y., Matsumoto, Y. (2009). Production of Ascaris suum As14 protein and its fusion protein with cholera toxin B subunit in rice seeds. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 71(7), 995–1000.
- O'Neill, S. M., Brady, M. T., Callanan, J. J., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, K. H. G., Dalton, J. P. (2000). *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunology*, 22(3), 147–155.
- Oliveira, F. M., Coelho, I. E. V., Lopes, M. D., Taranto, A. G., Junior, M. C., Santos, L. L. D., Lopes, D. D. O. (2016). The Use of Reverse Vaccinology and Molecular Modeling Associated with Cell Proliferation Stimulation Approach to Select Promiscuous Epitopes from *Schistosoma mansoni*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(6), 1023–1040.
- Parker, J. M. R., Guo, D., Hodges, R. S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*, 25(19), 5425–5432.
- Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, I., Carmona, C. (1998). Vaccination against infection with *Fasciola hepatica* in sheep with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induce high levels of

- protection. *Parasitology International*, 47(4), 266.
- Pinkhasov, J., Alvarez, M. L., Pathangey, L. B., Tinder, T. L., Mason, H. S., Walmsley, A. M., Mukherjee, P. (2010). Analysis of a cholera toxin B subunit (CTB) and human mucin 1 (MUC1) conjugate protein in a MUC1-tolerant mouse model. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 59(12), 1801–1811.
- Potocnakova, L., Bhide, M., & Pulzova, L. B. (2016). An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and In Silico Epitope Prediction. *Journal of Immunology Research*, 2016, 1–11.
- Price, G. A., & Holmes, R. K. (2012). Evaluation of TcpF-A2-CTB chimera and evidence of additive protective efficacy of immunizing with TcpF and CTB in the suckling mouse model of cholera. *PLoS One*, 7(8), e42434.
- Price, G. A., & Holmes, R. K. (2014). Immunizing adult female mice with a TcpA-A2-CTB chimera provides a high level of protection for their pups in the infant mouse model of cholera. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(12), e3356.
- Qu, H., Xu, Y., Sun, H., Lin, J., Yu, J., Tang, Z., Yu, X. (2014). Systemic and local mucosal immune responses induced by orally delivered *Bacillus subtilis* spore expressing leucine aminopeptidase 2 of *Clonorchis sinensis*. *Parasitology Research*, 113(8), 3095–3103.
- Raadsma, H. W., Kingsford, N. M., Suharyanta, Spithill, T. W., & Piedrafita, D. (2007). Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep. I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. *Veterinary Parasitology*, 143(3–4), 275–286.
- Rahman, K. S., Chowdhury, E. U., Sachse, K., Kaltenboeck, B. (2016). Inadequate reference datasets biased toward short non-epitopes confound B-cell epitope prediction. *Journal of Biological Chemistry*, 291(28), 14585–14599.
- Ravidà, A., Aldridge, A. M., Driessen, N. N., Heus, F. A. H., Hokke, C. H., O'Neill, S. M. (2016). *Fasciola hepatica* Surface Coat Glycoproteins Contain Mannosylated and Phosphorylated N-glycans and Exhibit Immune Modulatory Properties Independent of the Mannose Receptor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(4), 1–21.
- Riet-Correa, F., Schild, A., Mendez, M., Lemos, R. (2001). *Doenças De Ruminantes E Equinos* (2nd ed.).
- Robinson, M. W., Corvo, I., Jones, P. M., George, A. M., Padula, M. P., To, J., Dalton, J. P. (2011). Collagenolytic activities of the major secreted cathepsin L peptidases involved in the virulence of the helminth pathogen, *Fasciola hepatica*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4), e1012.
- Robinson, M. W., Dalton, J. P., Brien, B. A. O., Donnelly, S. (2012). *Fasciola hepatica* : The therapeutic potential of a worm secretome. *International Journal of Parasitology* 43(3-4):283-91.
- Robinson, M. W., Dalton, J. P., 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., 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 hos. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(8), 1891–1907.
- Rodríguez, E., Noya, V., Cervi, L., Chiribao, M. L., Brossard, N., Chiale, C., Freire, T. (2015). Glycans from *Fasciola hepatica* Modulate the Host Immune Response and TLR-Induced Maturation of Dendritic Cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(12), 1–26.
- Rojas-Caraballo, J., López-Abán, J., Moreno-Pérez, D. A., Vicente, B., Fernández-Soto, P., del Olmo, E., Muro, A. (2017). Transcriptome profiling of gene expression during immunisation trial against *Fasciola hepatica*: identification of genes and pathways involved in conferring immunoprotection in a murine model. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 94.
- Rojas-Caraballo, J., López-Abán, J., Pérez Del Villar, L., Vizcaíno, C., Vicente, B., Fernández-Soto, P., Muro, A. (2014). In vitro and in vivo studies for assessing the immune response and protection-inducing ability conferred by *Fasciola hepatica*-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes. *PLoS ONE*,

- 9(8).
- Rojas, G., Tundidor, Y., Infante, Y. C. (2014). High throughput functional epitope mapping: Revisiting phage display platform to scan target antigen surface. *mAbs*, 6(6), 1368–1378.
- Rosas, G., Fragoso, G., Ainciart, N., Esquivel-Guadarrama, F., Santana, A., Bobes, R. J., Sciutto, E. (2006). Brucella spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. *Microbes and Infection*, 8(5), 1277–1286.
- Rossi, A. H., Farias, A., Fernández, J. E., Bonomi, H. R., Goldbaum, F. A., Berguer, P. M. (2015). Brucella spp. Lumazine Synthase induces a TLR4-mediated protective response against B16 melanoma in mice. *PLoS ONE*, 10(5), 1–17.
- Saha, S., & Raghava, G. P. S. (2006). Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins*, 65(1), 40–48.
- Sambrook, J. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd. ed., New York
- Sekiya, M., Mulcahy, G., Irwin, J. A., Stack, C. M., Donnelly, S. M., Xu, W., Dalton, J. P. (2006). Biochemical characterisation of the recombinant peroxiredoxin (FhePrx) of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *FEBS Letters*, 580(21), 5016–5022.
- Serradell, M. C., Guasconi, L., Cervi, L., Chiapello, L. S., Masih, D. T. (2007). Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117(3–4), 197–208.
- Sexton, J. L., Wilce, M. C., Colin, T., Wijffels, G. L., Salvatore, L., Feil, S., Morrison, C. A. (1994). Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a three-dimensional model of the antigen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(4), 1861–72.
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 787–795.
- Song, H., Zhou, L., Fang, W., Li, Y., Wang, X., Fang, H., Qiu, B. (2004). High-level expression of codon optimized foot-and-mouth disease virus complex epitopes and cholera toxin B subunit chimera in *Hansenula polymorpha*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(1), 235–239.
- Song, S.-M., Park, J.-H., Kim, J., Kim, S.-I., Hong, Y.-C., Kong, H.-H., Chung, D.-I. (2008). Identification and characterization of *Paragonimus westermani* leucine aminopeptidase. *Parasitology International*, 57(3), 334–341.
- Spithill, T. W., Carmona, C., Piedrafita, D., Smooker, P. M. (2012). Prospects for Immunoprophylaxis Against *Fasciola hepatica* (Liver Fluke). *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines*, 465–484.
- Spithill, T. W., & Dalton, J. P. (1998). Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitology Today*, 14(6), 224–228.
- Sträter, N., & Lipscomb, W. N. (1995). Two-metal ion mechanism of bovine lens leucine aminopeptidase: active site solvent structure and binding mode of L-leucinal, a gem-diolate transition state analogue, by X-ray crystallography. *Biochemistry*, 34(45), 14792–14800.
- Sukhdeo, M. V. K., & Sukhdeo, S. C. (2002). Fixed behaviours and migration in parasitic flatworms. *International Journal for Parasitology*, 32(3), 329–342.
- Trottein, F., Nutten, S., Papin, J. P., Leportier, C., Poulain-Godefroy, O., Capron, A., Capron, M. (1997). Role of adhesion molecules of the selectin-carbohydrate families in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to schistosome targets. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(2), 804–811.
- Turner, J., Howell, A., McCann, C., Caminade, C., Bowers, R. G., Williams, D., Baylis, M. (2016). A model to assess the efficacy of vaccines for control of liver fluke infection. *Scientific Reports*, 6(September 2015), 23345.

- Ullah, R., Rehman, A., Zafeer, M. F., Rehman, L., Khan, Y. A., Khan, M. A. H., Abidi, S. M. A. (2017). Anthelmintic Potential of Thymoquinone and Curcumin on *Fasciola gigantica*, 1–19.
- Van Montfort, T., Melchers, M., Isik, G., Menis, S., Huang, P. S., Matthews, K., Sanders, R. W. (2011). A chimeric HIV-1 envelope glycoprotein trimer with an embedded Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF) domain induces enhanced antibody and T cell responses. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22250–22261.
- Vercruysse, J., Knox, D. P., Schetters, T. P. M., Willadsen, P. (2004). Veterinary parasitic vaccines: Pitfalls and future directions. *Trends in Parasitology*, 20(10), 488–492.
- Villegas, F., Angles, R., Barrientos, R., Barrios, G., Valero, M. A., Hamed, K., Gabrielli, A. F. (2012). Administration of Triclabendazole Is Safe and Effective in Controlling Fascioliasis in an Endemic Community of the Bolivian Altiplano. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), 6–13.
- Wang, P., Sidney, J., Dow, C., Mothé, B., Sette, A., Peters, B. (2008). A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Computational Biology*, 4(4).
- Wang, P., Sidney, J., Kim, Y., Sette, A., Lund, O., Nielsen, M., Peters, B. (2010). Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 568.
- Webb, B., & Sali, A. (2014). *Comparative protein structure modeling using MODELLER*. *Current Protocols in Bioinformatics* (Vol. 2014).
- Who, W. H. O. (2013). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases*, 3.9, 67–71.
- Wijffels, G. L., Salvatore, L., Dosen, M., Waddington, J., Wilson, L., Thompson, C., Spithill, T. W. (1994). Vaccination of Sheep with Purified Cysteine Proteinases of *Fasciola hepatica* Decreases Worm Fecundity. *Experimental Parasitology*.
- Yang, Y., Wen, Y. J., Cai, Y. N., Vallée, I., Boireau, P., Liu, M. Y., Cheng, S. P. (2015). Serine proteases of parasitic helminths. *Korean Journal of Parasitology*, 53(1), 1–11.
- Yao, B., Zhang, L., Liang, S., Zhang, C. (2012). SVMTriP: A Method to Predict Antigenic Epitopes Using Support Vector Machine to Integrate Tri-Peptide Similarity and Propensity. *PLoS ONE*, 7(9), 5–9.
- Yasser, E.-M., Dobbs, D., Vasant Honavar. (2008). Predicting linear B-cell epitopes using string kernels Yasser. *J Mol Recognit*, 21(4), 243–255.
- Zafra, R., Pérez-écija, R. A., Buffoni, L., Pacheco, I. L., Martínez-Moreno, A., LaCourse, E. J., Pérez, J. (2013). Early hepatic and peritoneal changes and immune response in goats vaccinated with a recombinant glutathione transferase sigma class and challenged with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science*, 94(3), 602–609.
- Zhang, R.-G., Scott, D. L., Westbrook, M. L., Nance, S., Spangler, B. D., Shipley, G. G., Westbrook, E. M. (1995). The Three-dimensional Crystal Structure of Cholera Toxin ADP-ribosylation. *JMBMS 694 Cust. Ref. No. RH J. Mol. Biol*, 115(251), 563–573.
- Zhang, W. Y., Moreau, E., Hope, J. C., Howard, C. J., Huang, W. Y., Chauvin, A. (2005). *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Experimental Parasitology*, 111(3), 154–159.
- Zhou, B., Chen, Y., Li, W., Yang, M. (2010). [Changes of spleen cytokines in mice immunized with recombinant Bb-Eg95-EgA31 vaccine against *Echinococcus granulosus*]. *Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*, 28(4), 268–272.

Datos suplementarios 1

Inmunoreactividad de los sueros de los grupos del ensayo de "Evaluación de la respuesta humoral inducida por *Fh*LAPr en su conformación monómero y hexámero en ratones BALB/c" y determinación de la dilución de trabajo".

Se determinó mediante la técnica de ELISA el nivel de inmunoreactividad de los pools de sueros generados a partir de todos los grupos en la semana 6. En la **Figura A**, se observa la dilución de los pools de suero (1:2000 a 1:128000) de la semana 6 de todos los grupos del ensayo. En la dilución correspondiente a 1:10.000 de los sueros generados contra la forma *mFh*LAPr son reconocidos de manera similar tanto cuando el antígeno sensibilizante es *mFh*LAPr como *hFh*LAPr. Sin embargo, se observa menor reactividad de los sueros de los grupos *hFh*LAPr cuando son evaluados contra la forma *mFh*LAPr como antígeno sensibilizante, respecto de la forma *hFh*LAPr. Probablemente, los sueros generados con la forma hexamérica presentan una variedad de anticuerpos generados tanto contra los epítopes lineales de la proteína, como contra los conformacionales. En cambio, la inmunización con la forma *mFh*LAPr generaría principalmente anticuerpos contra epítopes lineales de la *Fh*LAPr. Es por esto que al

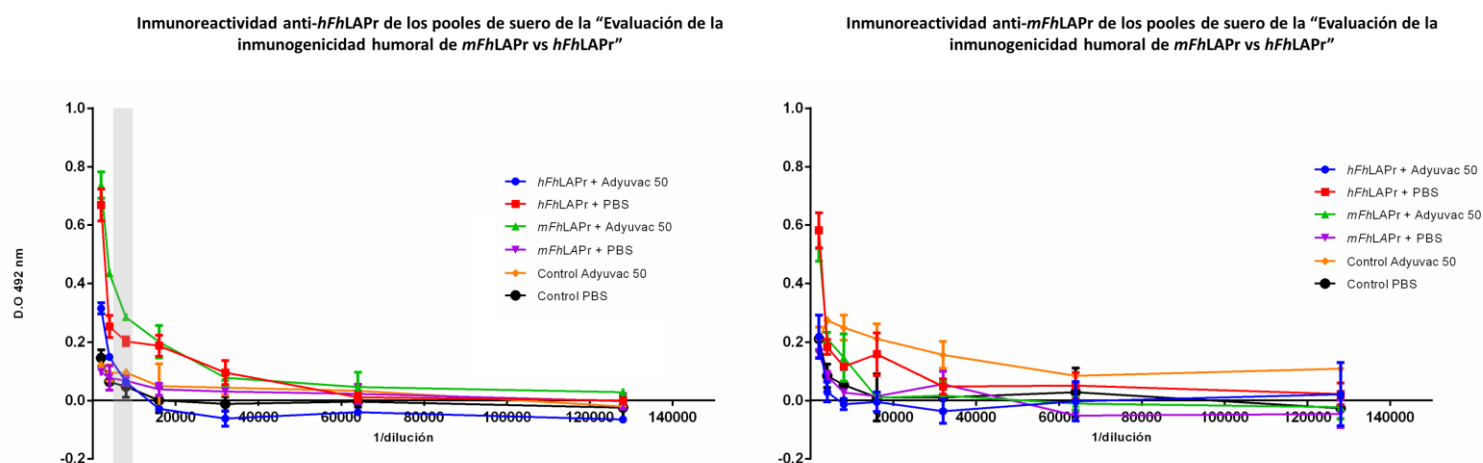


Figura A: Inmunoreactividad de la dilución de los pools de sueros de semana 6 del ensayo contra a) *mFh*LAPr y b) *hFh*LAPr. Se marca en gris la dilución de trabajo utilizada (1:10.000) para la evaluación de las muestras individuales.

momento de evaluar la serología se utiliza la *hFhLAPr* como referencia.

Se tomó la dilución 1:10.000 para la determinación de los niveles de anticuerpos de las muestras individuales, ya que se encuentra dentro del rango lineal de la dilución de los sueros y donde no se detecta inmunoreactividad de los controles. En esta dilución se verificó la reactividad de los pools de sueros frente a la forma monómero y hexámero (**Figura B**).

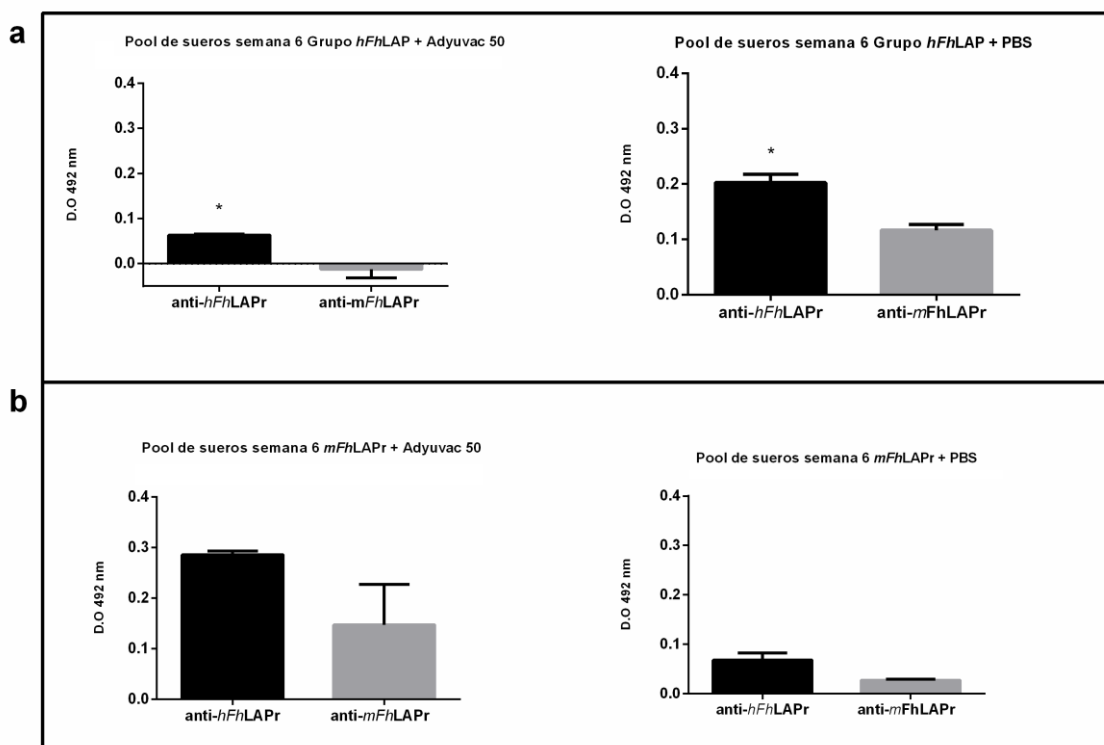


Figura B: Inmunoreactividad de los pools de sueros de semana 6 (1:10.000) del ensayo contra a) El pool de sueros anti-hexámero es reconocido significativamente con mayor intensidad respecto a la forma monómero con la técnica ELISA y b) El pool de sueros anti-monómero es reconocido tanto por la forma monómero como hexámero con la técnica ELISA.

Para la determinación de la dilución de trabajo para los niveles de IgG₁ e IgG_{2a}, se tomaron los pools de la semana 6 y se realizó la dilución seriada de los mismos (1:100 hasta 1:25.600) y se realizó la curva D.O_{492nm} ± D.E en función de la dilución del suero. Para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-*Fh*LAPr de las muestras individuales de todas las semanas se utilizó la dilución 1: 4000, la cual se encuentra dentro del rango lineal (**Figura C**).

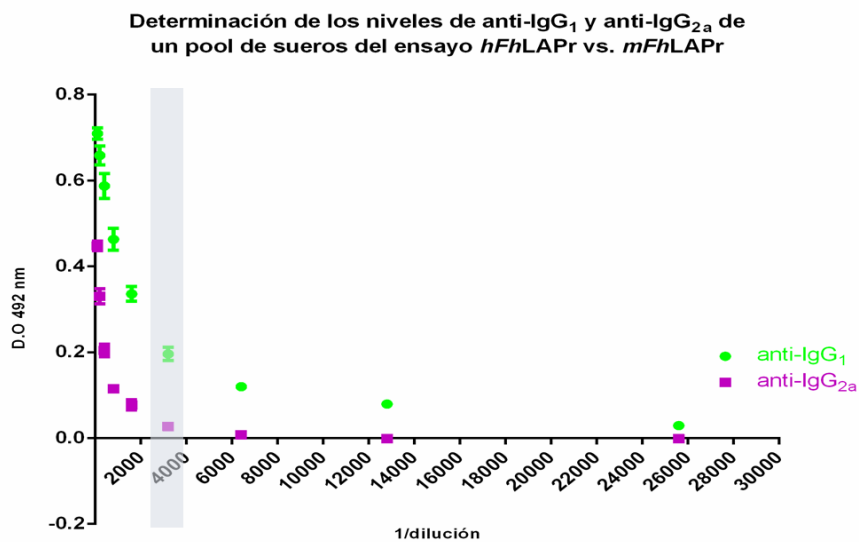


Figura C: Determinación de la dilución de trabajo para la evaluación los niveles de anticuerpos IgG₁ e IgG_{2a} del ensayo “Evaluación de la inmunogenicidad sistémica inducida por *Fh*LAPr en su conformación monómero y hexámero en ratones Balb/c” Se marca en gris la dilución de trabajo utilizada (1:4.000) para la evaluación de las muestras individuales.

Datos suplementarios 2

Determinación de la dilución de trabajo de IgG total para las muestras del 1^{er} Ensayo de Inmunogenicidad a nivel de mucosas de las formas *mFhLAPr* y *hFhLAPr* en ratones de la cepa C57CL/6.

Se realizaron diluciones seriadas (1:500 a 1:16000) de un pool de sueros correspondientes a la semana 6 del ensayo y se procedió a determinar la D.O._{492nm} a través de la técnica de ELISA descrita en Materiales y Métodos tanto contra *hFhLAPr* como *mFhLAPr*. Se tomó como referencia la forma *hFhLAPr* para la evaluación de las muestras individuales y se seleccionó la dilución de trabajo 1:800 (**Figura D**).

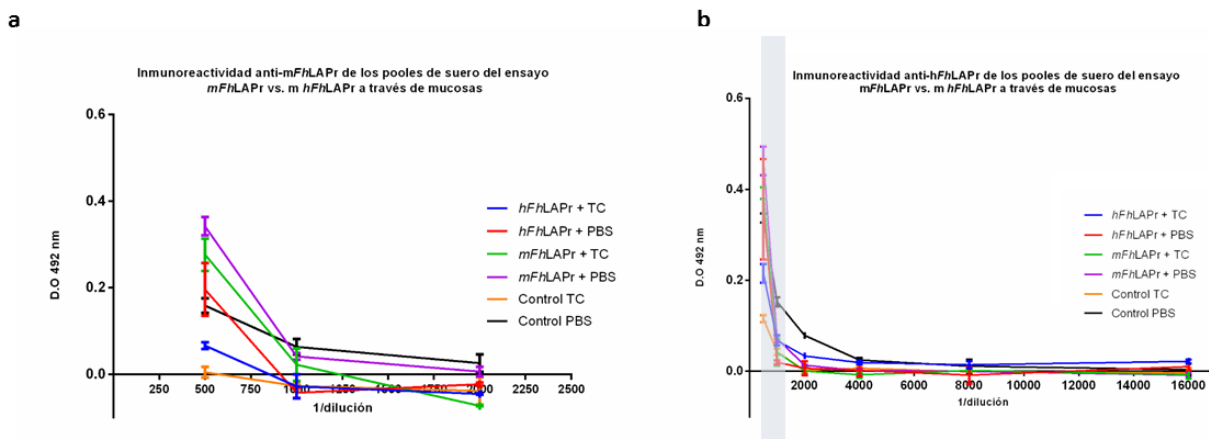


Figura D: Determinación de la dilución de trabajo de IgG total para el 1er ensayo de inmunogenicidad de *mFhLAPr* y *hFhLAPr* a nivel de mucosas en ratones de la cepa C57BL/6. Se determinó la inmunoreactividad del pool de sueros frente a la forma monómero y hexámero de *FhLAPr*.

Determinación de la dilución de trabajo de IgG total para las muestras del 2^{do} Ensayo de Inmunogenicidad a nivel de mucosas de *hFhLAPr* en ratones de la cepa C57BL/6.

Se realizó la dilución seriada (1:500 a 1:4.000) (**Figura E**) del pool de sueros correspondiente a la semana 10 del ensayo y se seleccionó la dilución correspondiente a 1:4.000 para evaluar las muestras individualmente contra la forma de referencia *hFhLAPr* según los métodos descritos en Materiales y Métodos.

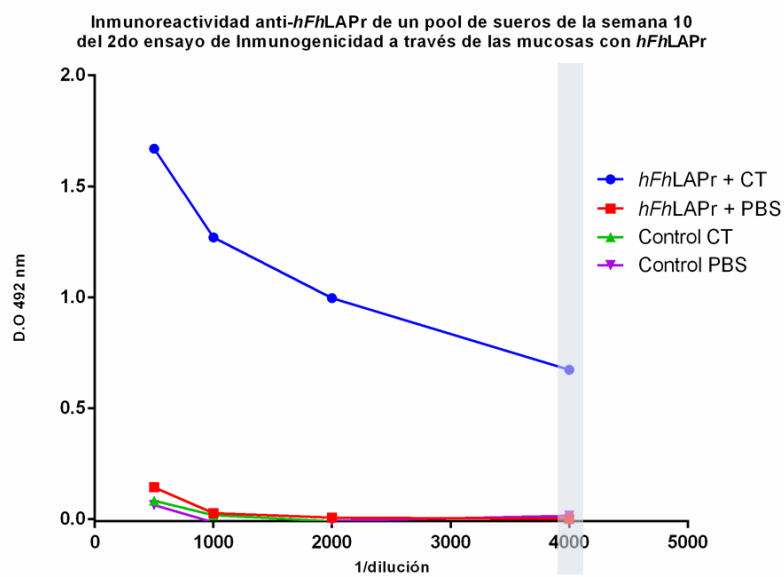


Figura E: Determinación de la dilución de trabajo para la detección de IgG total a través de la técnica de ELISA de las muestras de sueros del 2^{do} ensayo de Evaluación de la Inmunogenicidad de las formas *mFhLAPr* y *hFhLAPr* a nivel de mucosas en ratones hembra de la cepa C57BL/6. Se marca en gris la dilución de trabajo utilizada (1:4.000) para la evaluación de las muestras individuales.

Datos suplementarios 3

Se realizó la búsqueda de epítopes de *mFhCL1* y *mFhCL2* utilizando el mismo abordaje de predicción inmunoinformática utilizada para *mFhCL3*. La zona consenso generada se ubica en la misma zona que la identificada para *mFhCL3*, lo que podría indicar una zona de conservación de reconocimiento (**Figura F**).

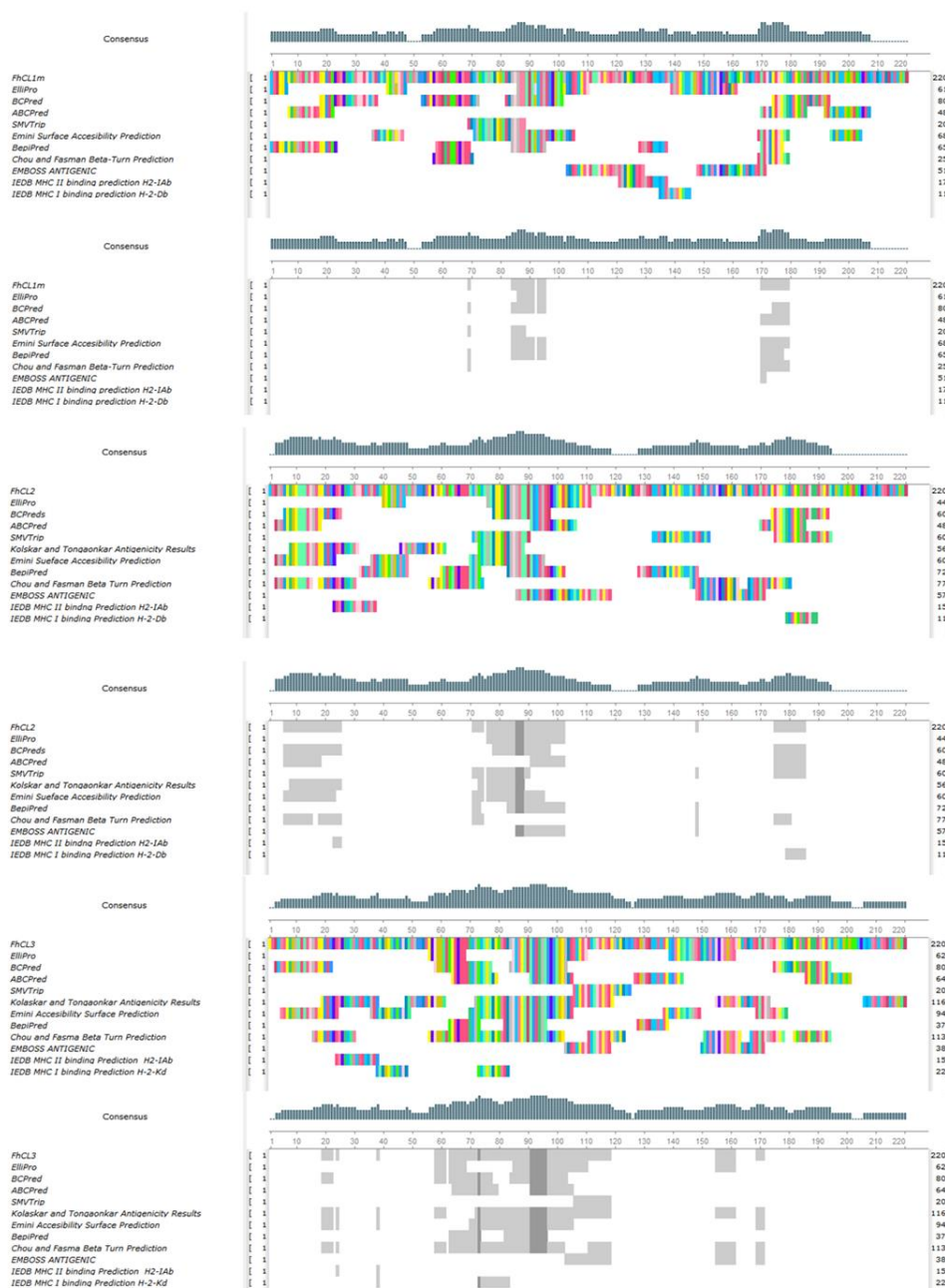
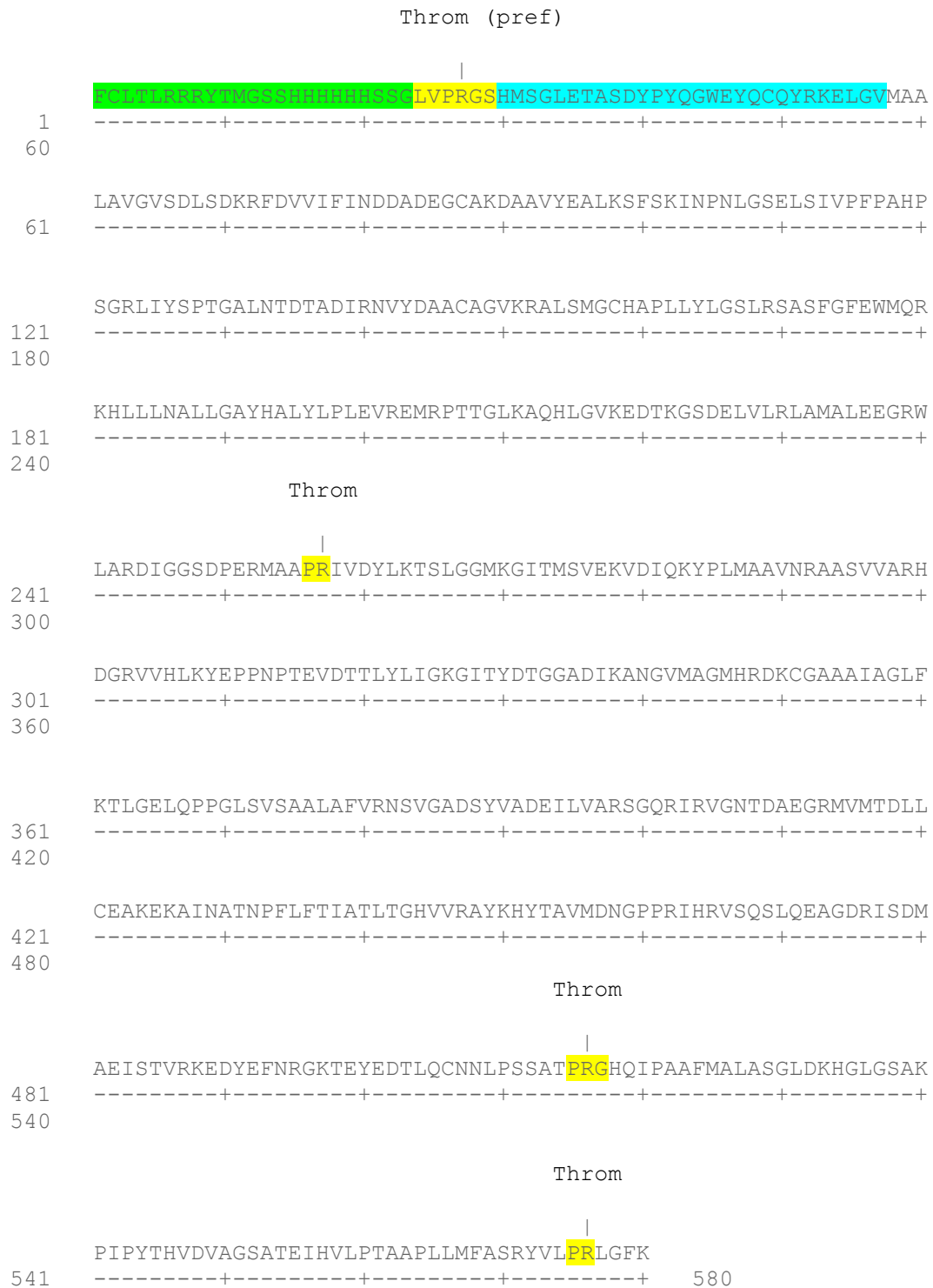


Figura F: Comparación de las RPIs de *mFhCL1*, *mFhCL2* y *mFhCL3*. Tanto *mFhCL1*, como *mFhCL2* presentan una zona consenso en la misma región que *mFhCL3*.

Proteína *FheCL3*-LAP producida por *E. coli* en el plásmido pET28a (+)
Potenciales sitios de clivaje de la Trombina:



Datos suplementarios 5

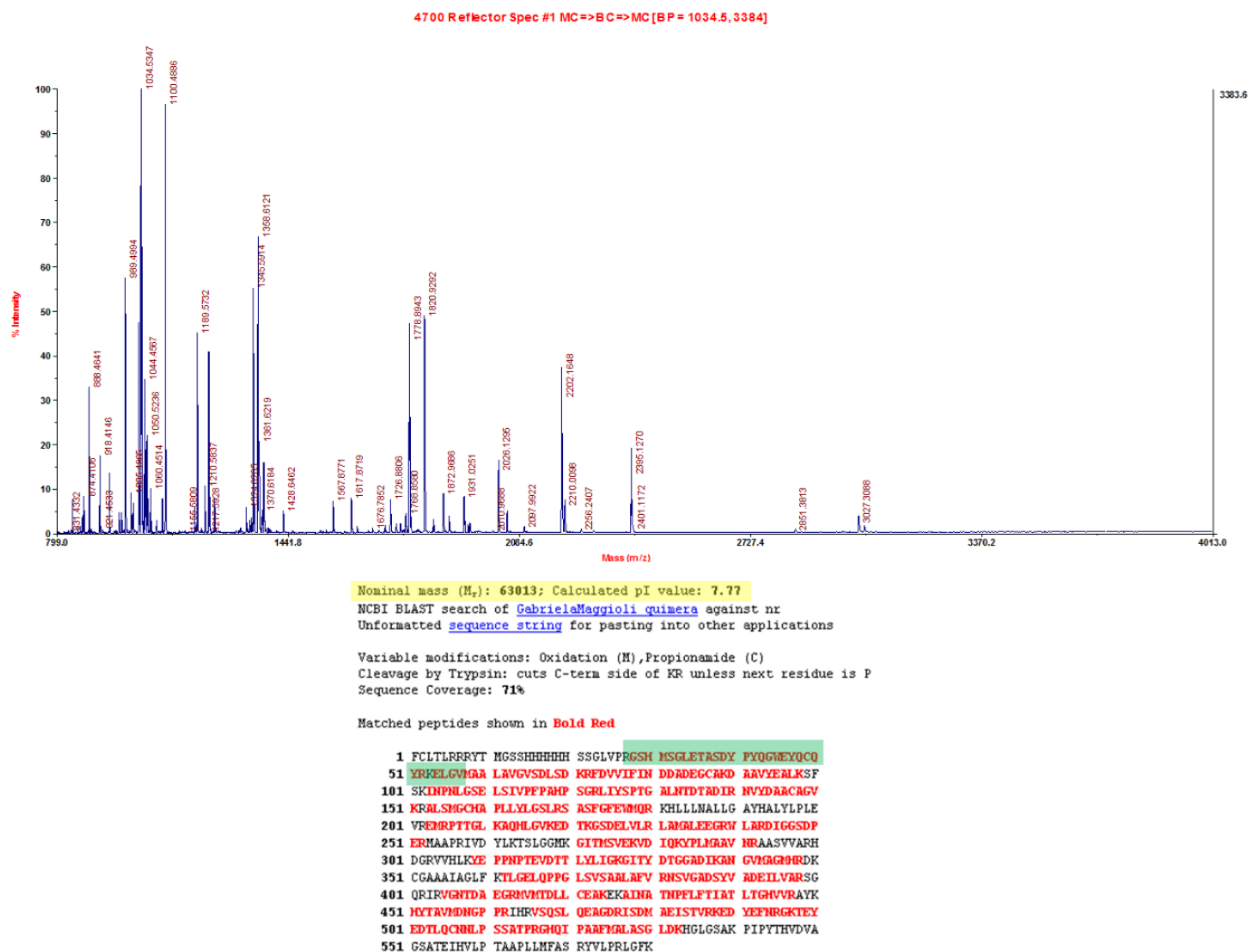


Figura G: Resultado de Espectrometría de Masas (MS/MS) realizado sobre una muestra de *FheCL3*-LAP. En amarillo se marca el peso molecular nominal de la proteína (63013 Da) y su punto isoeléctrico (pI 7.77). En rojo los péptidos analizados. En verde se muestra que uno de los péptidos registrados corresponde con la porción *FheCL3* de la *FheCL3*-LAP. La secuencia restante se corresponde a la de *FhLAP*.