



UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

TESINA DE GRADO

**Estudios bioquímicos y moleculares  
sobre la leucina aminopeptidasa de  
*Fasciola hepatica***

**Sheila Giacaman Salvo**

Orientador: Dr. Carlos Carmona  
Unidad de Biología Parasitaria, Instituto de Biología,  
Departamento de Biología Molecular, Facultad de  
Ciencias, Instituto de Higiene

---

## AGRADECIMIENTOS

Finalmente esta etapa ha culminado. Sin la ayuda de todas y de cada una de las personas que he tenido la suerte de conocer a lo largo de mi vida no hubiera sido posible.

Primero, agradecer de todo corazón a mi familia...a mi madre y a mi hermana que me acompañaron en esta aventura que significó mi carrera y que, de forma incondicional, me apoyaron y entendieron mis ausencias y mis malos momentos. A mi padre, que a pesar de la distancia siempre estuvo presente. A Galli, que ha confiado en mí y me ha dado ánimo para seguir; y a mi abuelita que a pesar que de ya no está junto a nosotros se que nos está cuidando.

Gracias también a mis compañeros de la UBP: Tatiana, Gabriela, Flaco, Patricia, Mono, Rodolfo, Pepe, por brindarme su valiosísima ayuda y amistad desde el primer momento y siempre.

A mis queridos compañeros del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche, que me acompañaron dando ánimo en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

A mis amigos de hoy y de siempre, con los que he compartido gran parte de mi vida, los que me acompañaron durante la carrera, los que me acompañan desde la distancia...les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, cariño, amistad y la fortaleza necesaria para seguir adelante.

Finalmente, agradezco a mi tutor, Dr. Carlos Carmona, por la paciencia y por haber hecho posible este trabajo.

.

---

## RESUMEN

*Fasciola hepatica* causa considerables pérdidas monetarias en la producción agropecuaria a nivel mundial, principalmente a través de la infección del ganado ovino y bovino; mientras que el parasitismo de humanos es una enfermedad emergente con focos de hiperendemia en varios continentes. A pesar de que el tratamiento antihelmíntico es efectivo, a corto plazo, la emergente resistencia a estas drogas ha llevado a la necesidad del desarrollo de una vacuna contra *F. hepatica*. Varias décadas de investigación se han invertido, sin embargo aún no existe una vacuna comercial en el mercado. Diferentes antígenos vacunales han sido aislados del parásito y caracterizados. Las proteínas son probablemente la primera opción elegida por la mayoría de los investigadores cuando se está buscando candidatos vacunales, debido a que son relativamente fáciles de identificar. Además, muchas de ellas juegan un rol clave en el metabolismo del parásito, en la interacción con el huésped y en la modulación de la respuesta inmune de éste. Mediante la utilización de herramientas de la biología molecular se pueden producir proteínas en grandes cantidades de forma económica. Nuestro laboratorio ha venido investigando a las proteasas como potenciales candidatos vacunales contra la fascioliasis. La leucin aminopeptidasa (LAP), exopeptidasa perteneciente a la familia M17 aislada de los extractos somáticos del parásito adulto ha sido el candidato que ha mostrado mayor potencial inmunoprotector. Esta proteína nativa (*FhLAPn*) se mostró capaz de generar buenos niveles de protección en ovejas. Posteriormente, se logró clonar, expresar funcionalmente, como proteína de fusión con tiorredoxina de *E. coli* que contiene una cola de histidinas, y purificar una leucin aminopeptidasa recombinante de adultos de *F. hepatica* (*FhLAPr*) que se demostró idéntica a la proteína nativa inicialmente estudiada. Ensayos de vacunación en conejos y ovejas confirmaron el gran potencial que tiene esta proteína recombinante como candidato vacinal, ya que se obtuvieron los mayores niveles de protección contra *F. hepatica* reportados hasta el presente en ovinos empleando proteínas recombinantes. El inconveniente que surgió de estos ensayos fue que la proteína se expresaba a bajos niveles, lo que comprometió su potencial producción nivel industrial.

El principal objetivo de este trabajo es investigar nuevas formas de expresar la *FhLAPr* como forma de optimizar los niveles de expresión de la proteína de forma que en un futuro pueda ser producido a nivel industrial a un costo rentable. Para ellos se probó la modificación del vector de expresión pThioHisC, por pET50b(+) que permite la autoinducción, pero el gran tamaño de la proteína de fusión que expresaba este vector provocó la precipitación de la proteína recombinante por mal plegamiento. Además, se analizó el efecto del tiempo de inducción con IPTG y extracción de la proteína recombinante del paquete celular. Al analizar estas dos variables en conjunto, se vio que el mejor tiempo de inducción son 4 hs, donde se obtiene mayores niveles de la proteína recombinante. Por otra parte, se probó realizar modificaciones en el medio de cultivo, con el agregado de glicerol y lactosa, y la forma de producción, por sustitución del matraz de vidrio por botellas de

---

polietileno tereftalato (PET), pero no se observó ningún efecto.

El segundo objetivo consistió en buscar nuevos candidatos aminopeptidasas como potenciales candidatos vaccinales contra este patógeno. Para ello se realizaron ensayos de fluorimetría utilizando el extracto somático (SOM) y el extracto soluble al deoxicolato (DOC). Los niveles de actividad obtenidos confirmaron la presencia de la *FhLAPn* y además se observó un comportamiento de la tirosín-7-amino-4-metilcumarin (Tyr-AMC), el cual habría que investigar más profundamente para confirmar su capacidad inmunogénica.

---

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Fasciola hepatica .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Generalidades .....	2
1.1.2 Ciclo biológico e infección .....	3
<b>1.2 Fascioliasis.....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Introducción .....	4
1.2.2 Distribución.....	5
1.2.3 Transmisión .....	6
1.2.4 Desarrollo de la enfermedad.....	6
1.2.5 Impacto económico .....	7
<b>1.3 Control .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Drogas antihelmínticas .....	9
1.3.2 Resistencia a los antihelmínticos .....	10
<b>1.4 Vacunas .....</b>	<b>11</b>
1.4.1 Los primeros ensayos en busca de una vacuna efectiva.....	12
1.4.1.1 Estimulación de resistencia contra <i>F. hepatica</i> por infección homóloga primaria.....	12
1.4.1.2 Estimulación de resistencia homóloga por implantación de <i>F.</i> <i>hepatica</i> .....	13
1.4.1.3 Estimulación de resistencia a <i>F. hepatica</i> mediante los extractos somáticos del gusano .....	14
1.4.1.4 Inmunización pasiva contra <i>F. hepatica</i> mediante transferencia de suero inmune y linfocitos sensibilizados.....	15
1.4.1.5 Inmunización con helmintos atenuados por irradiación.....	16
1.4.1.6 Estimulación de resistencia a <i>F. hepatica</i> mediante productos excreción/secreción .....	17
1.4.1.7 Inmunización heteróloga.....	17
1.4.2 Inmunización empleando antígenos definidos .....	18
1.4.2.1 Proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) .....	19
1.4.2.2 Glutación-S-transferasas (GST) .....	20
1.4.2.3 Proteínas tipo Saposina (SAPs) .....	21
1.4.2.4 Hemoglobina de <i>F. hepatica</i> (Hb) .....	22

1.4.2.5 Fosfoglicerato quinasas (PGK) .....	22
1.4.2.6 Peroxiredoxinas (Prx) .....	23
1.4.3 Proteasas como candidatos vacunales.....	23
1.4.3.1 Cisteín proteasas .....	24
1.4.3.2 Leucin aminopeptidasa (LAP) .....	26
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Objetivos generales .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>30</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Reactivos .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 Producción de la proteína recombinante.....</b>	<b>31</b>
3.2.1 Expresión de la <i>FhLAPr</i> .....	31
3.2.2 Lisis celular .....	31
3.2.3 Purificación de la enzima recombinante .....	31
3.2.4 Determinación de la concentración proteica .....	32
3.2.5 Análisis de la purificación de <i>FhLAP</i> por SDS-PAGE .....	32
3.2.6 Determinación de actividad enzimática de la <i>FhLAPr</i> .....	32
3.2.7 Inmunoblot .....	32
<b>3.3 Optimización de parámetros para la obtención de proteína soluble.....</b>	<b>33</b>
3.3.1 Variación en el tiempo de inducción .....	33
3.3.2 Extracción de <i>FhLAPr</i> del paquete celular .....	33
<b>3.4 Cambio de vector de expresión para la autoinducción.....</b>	<b>35</b>
3.4.1 Amplificación por PCR .....	35
3.4.2 Clonación y expresión de la <i>FhLAPr</i> en el vector pET50b(+) .....	35
<b>3.5 Ensayos autoinducción .....</b>	<b>36</b>
3.5.1 Agregado de lactosa y glicerol .....	36
3.5.2 Fermentación en botellas de polietileno tereftalato (PET) .....	37
<b>3.6 Búsqueda de otras aminopeptidasas en extractos de <i>F. hepatica</i> .....</b>	<b>37</b>
3.6.1 Extractos somáticos.....	37
3.6.2 Sustratos y condiciones de ensayo .....	37
3.6.3 Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática .....	38
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Producción y purificación de la proteína recombinante .....</b>	<b>39</b>

---

4.2 Optimización de parámetros para la obtención de proteína soluble.....	39
4.3 Modificación del vector de expresión .....	42
4.4 Ensayos autoinducción .....	43
4.5 Ensayos fluorogénicos de actividad enzimática .....	43
5. DISCUSIÓN .....	46
5.1 Búsqueda de nuevas aminopeptidasas.....	49
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	51
7. BIBLIOGRAFÍA .....	52

---

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>Fasciola hepatica</i> adulto.....	2
Figura 1.2. Ciclo biológico de <i>F. hepatica</i> .....	3
Figura 1.3. Distribución mundial del género <i>Fasciola</i> .....	5
Figura 1.4. Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i> mostrando las medidas de control.....	8
Figura 1.5. Regulación de las catepsinas en el desarrollo de <i>F. hepatica</i> .....	25
Figura 3.1. Esquema de los ensayos realizados para la obtención de <i>FhLAPr</i> . ..	34
Figura 3.2. Estrategia de clonado y mapa del vector de expresión.. ..	36
Figura 4.1. Análisis por SDS-PAGE 12,5% de la purificación de <i>FhLAPr</i> a partir del extracto libre de células por cromatografía de afinidad.....	39
Figura 4.2. Análisis de la purificación de <i>FhLAPr</i> por SDS-PAGE 12,5%. .....	41
Figura 4.3. Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% del ADNc de la <i>FhLAPr</i> amplificado por PCR y análisis de la expresión de la <i>FhLAPr</i> por SDS-PAGE 12,5% .....	42

---

## INDICE DE TABLAS

Tabla I. Comparación de las eficacias de los antihelmínticos presentes en el mercado y su aplicación .....	9
Tabla II. Resultados de los ensayos de sensibilización experimental con <i>F. hepatica</i> en la protección de los animales.....	13
Tabla III. Efectos de la implantación de diferentes estadios de <i>F. hepatica</i> en la protección de animales .....	14
Tabla IV. Resultados de la vacunación con extractos somáticos de <i>F. hepatica</i> .....	15
Tabla V. Protección frente a <i>F. hepatica</i> mediante inmunización pasiva .....	15
Tabla VI. Estimulación de resistencia mediante la utilización de metacercarias irradiadas de <i>F. hepatica</i> . .....	16
Tabla VII. Estimulación de resistencia mediante la utilización del producto excreción/secreción de <i>F. hepatica</i> . .....	17
Tabla VIII. Ensayos de vacunación en los que se ha utilizado FABP como candidato vaccinal.....	20
Tabla IX. Ensayos de vacunación en los que se ha utilizado GST como candidato vaccinal.....	21
Tabla X. Niveles de protección obtenidos, en relación al número de gusanos recuperados, utilizando catepsinas como inmunógeno .....	26
Tabla XI. Reducción del número de gusanos en animales vacunados con <i>FhLAP</i> .....	28
Tabla XII. Actividad enzimática (U/mg proteína) de la <i>FhLAPr</i> .....	40
Tabla XIII. Actividad enzimática (U/mg proteína) de la <i>FhLAPr</i> .....	42
Tabla XIV. Actividad (U/mg) específica del extracto somático (SOM) en tampones con diferentes pH utilizando diferentes sustratos fluorogénicos .....	43
Tabla XV. Actividad específica (U/mg) del extracto soluble al deoxicolato (DOC) de <i>F. hepatica</i> en tampones con diferentes pH utilizando diferentes sustratos fluorogénicos.....	44
Tabla XVI. Efecto de diferentes inhibidores en la actividad enzimática.....	45

---

## ABREVIATURAS

---

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Acido desoxirribonucleico copia
<b>Ala</b>	Alanina
<b>Alum</b>	Hidróxido de aluminio
<b>AMC</b>	7-amino-4-metilcumarin
<b>Amp</b>	Ampicilina
<b>Arg</b>	Arginina
<b>ARNi</b>	Acido ribonucleico interferencia
<b>Asp</b>	Aspartato
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>bLAP</b>	Leucin aminopeptidasa del cristalino bovino
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>Cat</b>	Catepsina
<b>Cat B</b>	Catepsina B
<b>Cat L</b>	Catepsina L
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>DEAE-D</b>	Dietilaminoetil-dextrano
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DOC</b>	Extracto soluble al deoxicolato
<b>FABP</b>	Proteínas de unión a ácidos grasos
<b>FhLAP</b>	Leucin aminopeptidasa de <i>Fasciola hepatica</i>
<b>FhLAPn</b>	Leucin aminopeptidasa nativa de <i>Fasciola hepatica</i>
<b>FhLAPr</b>	Leucin aminopeptidasa recombinante de <i>Fasciola hepatica</i>
<b>FhSAP-2</b>	Proteína tipo saposina de <i>F. hepatica</i>
<b>GST</b>	Glutati6n-S-transferasa
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>Ile</b>	Isoleucina
<b>IPTG</b>	Isopropiltiogalact6sido
<b>JRD</b>	Juveniles recientemente desenquistados
<b>Kan</b>	Kanamicina
<b>LAP</b>	Leucin aminopeptidasa
<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria Bertani
<b>Leu</b>	Leucina
<b>Met</b>	Mefionina
<b>NBT</b>	Nitrotetrazoilo
<b>nFh12</b>	Proteína FABP nativa de 12 KDa de <i>F. hepatica</i>
<b>OMS</b>	Organizaci6n Mundial de la Salud
<b>pepA</b>	Leucin aminopeptidasa de <i>Escherichia coli</i>

---

---

<b>PES</b>	Productos excreción/secreción
<b>PET</b>	Polietileno tereftalato
<b>PfA-M17</b>	Leucin aminopeptidasa de <i>Plasmodium falciparum</i>
<b>PGK</b>	Fosfoglicerato quinasa
<b>Pgp</b>	Glicoproteína-P
<b>Pro</b>	Prolina
<b>Prx</b>	Peroxirredoxina
<b>rFh15</b>	Proteína FABP recombinante de 14.7kDa de <i>Fasciola hepatica</i>
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>rSm14</b>	Proteína FABP recombinante de 14.7 kDa de <i>Schistosoma mansoni</i>
<b>SAP</b>	Proteína tipo saposina
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>Ser</b>	Serina
<b>Sj26</b>	Glutación-S-transferasa de <i>Schistosoma japonicum</i>
<b>Sm28</b>	Glutación-S-transferasa de <i>Schistosoma mansoni</i>
<b>SOM</b>	Extracto somático
<b>TCBZ</b>	Triclabendazol
<b>TCBZSO</b>	Triclabendazol sulfóxido
<b>Thr</b>	Treonina
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>Val</b>	Valina

---

## 1. INTRODUCCIÓN

La fascioliasis hepática es considerada una de las patologías que afecta a los rumiantes domésticos con mayor incidencia económica en el mundo. Su importancia radica en el impacto económico que ocasiona en productores debido no solo a la muerte de animales, sino también a los decomisos de hígado, y la disminución de parámetros productivos como leche, carne, lana y ganancia diaria de peso. Otras pérdidas ocasionadas por esta parasitosis tienen relación con la reducción en la fertilidad y los costos generados por la compra de fasciolicidas.

Asimismo, la incidencia de esta enfermedad en humanos cada vez se está haciendo más notoria; se estima que entre 2.4 millones y 17 millones de personas, a nivel mundial, están infectadas (WHO, 2007) por lo que actualmente se la considera como una zoonosis emergente (Mas-Coma *et al.*, 1999b; Parkinson *et al.*, 2007; WHO, 2007).

### 1.1 *Fasciola hepatica*

#### 1.1.1 Generalidades

La *Fasciola hepatica* es un trematodo perteneciente a la subclase Digenea, que en su estadio adulto tiene forma de hoja, mide entre 20 y 30 mm de largo por 6 a 13 mm de ancho. Es un organismo hermafrodita que reside en las vías biliares del huésped definitivo (Figura 1.1).



Figura 1.1. *Fasciola hepatica* adulto. Tomado de la biblioteca de imágenes de parásitos "Centers for Disease Control & Prevention" ([www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/body\\_ImageLibrary.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/body_ImageLibrary.htm))

### 1.1.2 Ciclo biológico e infección

El ciclo de vida de *F. hepatica* es complejo, consiste en 5 etapas, como se puede apreciar en la figura 1.2. Se caracteriza por ser heteroxeno, presentando dos tipos de huéspedes para poder llevar a cabo su desarrollo completo, un caracol del género *Lymnaea* como huésped intermediario y un mamífero como definitivo (Andrews, 1999).

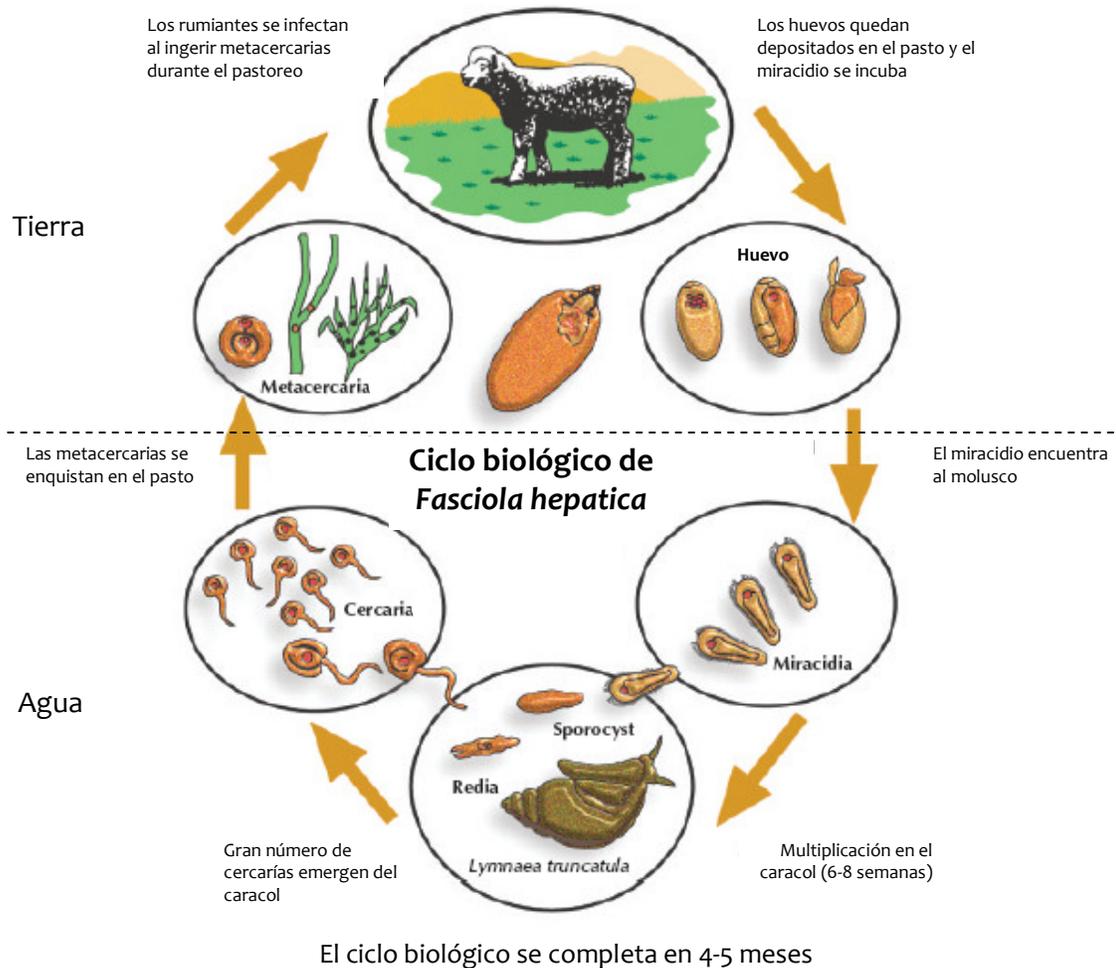


Figura 1.2. Ciclo biológico de *F. hepatica*. Modificado de Mitchell (2003)

En el huésped definitivo, cada parásito adulto puede llegar a producir entre 20.000 a 50.000 huevos por día (Boray, 1969). Estos son arrastrados por la bilis hasta el intestino y son eliminados con la materia fecal. El huevo consiste en un óvulo fertilizado, rodeado de gránulos que contienen nutrientes y lípidos.

El desarrollo embrionario ocurre en el agua, y es regulado por la temperatura, dos factores importantes que influyen en el éxito de la maduración. El huevo indiferenciado se transforma en miracidio, una larva ciliada de vida libre, en 9 a 15 días; de todas formas, el huevo puede permanecer viable en las heces de tres semanas a varios meses. El miracidio, que posee movilidad en un ambiente

acuático, debe localizar y penetrar un molusco gasterópodo, en general del género *Lymnaea*, dentro de las primeras 24 horas para que continúe su desarrollo. Cuando el miracidio entra en contacto con el caracol atraviesa la epidermis del molusco, utilizando un proceso retráctil papiliforme que posiblemente está facilitado por la secreción de enzimas proteolíticas (Smyth & Halton, 1983), y migra por los canales linfáticos alcanzando la glándula digestiva. En esta localización se multiplica mediante ciclos de reproducción asexual en forma de esporocitos y posteriormente en redias, las cuales culminan en la forma cercaria, que emerge luego de 40-60 días. La cercaria es una forma de vida libre que se enquista en la vegetación (en general pasto húmedo) dando origen a la metacercaria, forma quística, que puede sobrevivir alrededor de un año en pasturas (Andrews, 1999).

Cuando los quistes son ingeridos, por el huésped definitivo, la larva se transporta hasta el intestino delgado, donde sufre el desenquiste del cual surge la forma juvenil, llamada JRD (juvenil recientemente desenquistado). Existen básicamente dos fases de desenquiste: una de activación pasiva seguida de una fase de emergencia activa. El proceso es complejo y probablemente involucra factores extrínsecos como altas temperaturas, condiciones reductoras, altas concentraciones de anhídrido carbónico y la presencia de sales biliares, además de factores intrínsecos como secreciones del propio parásito. La fase de emergencia es probablemente disparada por la bilis, la cual puede activar una enzima secretada por la larva, induciendo movimientos musculares de éste (Andrews, 1999; Mulcahy *et al.*, 1999).

Luego del desenquiste, el JRD migra rápidamente, traspasando la mucosa intestinal, por la serosa peritoneal hasta atravesar la cápsula de Glisson e ingresar al hígado. A las 7 u 8 semanas post infección alcanza los canalículos biliares donde completa la madurez, después de 12 semanas de la infección inicial (Boray, 1969). La madurez sexual se caracteriza por la deposición de huevos. La forma adulta madura puede llegar a vivir entre 5-12 años. (Andrews, 1999).

## 1.2 Fascioliasis

### 1.2.1. Introducción

La infección por el parásito *F. hepatica* causa la enfermedad conocida como fascioliasis que se caracteriza por provocar un gran daño hepático. Tradicionalmente ha sido considerada una enfermedad veterinaria importante debido a las grandes pérdidas económicas y productivas causadas en el ganado, particularmente ovinos y bovinos (Mas-Coma *et al.*, 1999a; Mas-Coma *et al.*, 1999b).

Contrariamente, la fascioliasis humana siempre ha sido considerada como una enfermedad secundaria (Mas-Coma *et al.*, 1999a; Mas-Coma *et al.*, 1999b). Sin embargo, en los últimos años el número de personas infectadas y de casos reportados se han incrementado significativamente, por lo cual actualmente

puede ser considerada una zoonosis emergente (Mas-Coma *et al.*, 1999b; Parkinson *et al.*, 2007).

### 1.2.2 Distribución

Desde hace muchos años se sabe que la probabilidad de que un huevo se transforme en *F. hepatica* adulta es aproximadamente de 1 en  $1 \times 10^6$  (Taylor, 1965). Esto se debe al enorme número de variables que intervienen en cada una de las fases del desarrollo o de la transmisión que componen su ciclo. En un área determinada, lo esencial para que se establezca la enfermedad es la presencia del huésped definitivo e intermediario, humedad y temperatura (más de 10°C) suficientes para que evolucionen los huevos, las poblaciones de caracoles y las formas parasitarias que alberga. La compleja interdependencia de cada una de ellas va a determinar en última instancia el nivel de infección y la prevalencia de la enfermedad (Acosta, 1991).

*F. hepatica* tiene una distribución cosmopolita, la cual se puede apreciar en la figura 1.3. El parásito se encuentra ampliamente distribuido en Europa, América del Sur, América del Norte, Asia, Australia, Nueva Zelanda y algunos países de África del Norte, así como zonas frías y altas en Pakistán, Kenia y Sudáfrica (Torgerson & Claxton, 1999).

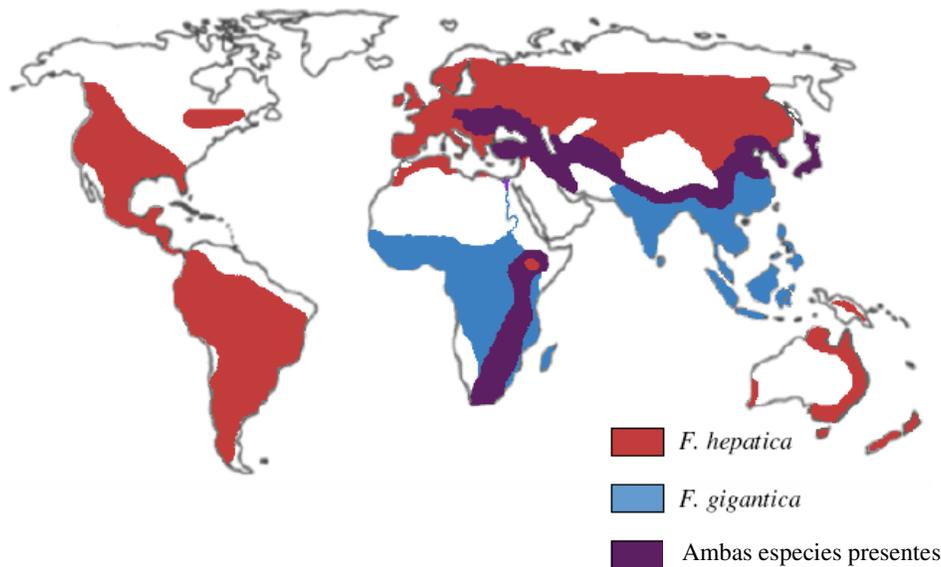


Figura 1.3. Distribución mundial del género *Fasciola* (modificado de Torgerson & Claxton, 1999)

La fascioliasis en Uruguay es una zoonosis de alta prevalencia en el ganado ovino y bovino en los 18 departamentos del interior del país, con una distribución focalizada en áreas reducidas de los establecimientos agropecuarios. En éstos la prevalencia de *F. hepatica* es siempre superior en bovinos que en ovinos (Nari & Cardozo, 1976).

Los cambios que se han producido actualmente en las prácticas agrícolas, el aumento del transporte de animales y el calentamiento global han creado ambientes que facilitan la diseminación rápida y generalizada de los parásitos que se transmiten por alimentos y agua (Gajadhar *et al.*, 2006). Es por esto que se prevé que *F. hepatica* aumente su área de distribución debido a los cambios climáticos. Recientemente, un grupo de investigadores analizó, mediante un modelo de predicción a largo plazo, el efecto del cambio climático respecto a la diseminación de este parásito en el Reino Unido. Demostraron que el cambio climático está íntimamente ligado con los cambios en la distribución de la fascioliasis, lo que predicen provocará un aumento en la distribución geográfica y la severidad de los casos (Fox *et al.*, 2011).

De acuerdo con el reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2007, en el pasado la fascioliasis humana estaba limitada a regiones específicas y definidas, pero actualmente, debido a cambios en el comportamiento del humano y a la capacidad de adaptación del parásito, se encuentra extendido alrededor del mundo; con cada vez más casos reportados en Europa, América, África, Asia y Oceanía. En la actualidad, la fascioliasis humana es un problema relevante de salud pública en varias zonas del mundo, incluyendo las regiones altas de Bolivia, y Perú, el Delta del Nilo en Egipto e Irán. Se estima que, globalmente, el número de humanos infectados va desde 2.4 millones a 17 millones; y más de 180 millones están en riesgo de infección. Como consecuencia, la fascioliasis humana debería ser considerada como una zoonosis de gran importancia a nivel global y regional (WHO, 2007).

### 1.2.3 Transmisión

En muchas áreas del mundo se producen ciclos de infección del ganado, con brotes de la enfermedad usualmente relacionadas a picos en la contaminación de las pasturas con metacercarias. Sin embargo, en Uruguay el ciclo no se interrumpe en ninguna época del año, aunque en invierno se entorpece considerablemente (López Lemes *et al.*, 1996).

Tanto los animales domésticos como los salvajes actúan como huéspedes de reserva, con un rango de huéspedes infectados que difiere considerablemente según la región. Ovejas, vacas y cabras son los predominantes. Los humanos también pueden jugar un papel importante en la transmisión del parásito, por lo menos en áreas hiperendémicas (Mas-Coma, 2005a).

La fascioliasis en humanos puede darse por ingerir verduras crudas, como berro silvestre. El agua contaminada con metacercarias también puede ser una fuente de infección, tanto al beberla como al utilizarla para cocinar o lavar (Mas-Coma, 2005a).

### 1.2.4 Desarrollo de la enfermedad

La Fascioliasis en animales ocurre en dos etapas conocidas como parenquimatosa y biliar (Behm & Sangster, 1999; Nithiuthai *et al.*, 2004). En la primera fase, la patología es causada por daño en los tejidos durante la

migración, y puede incluir daño hepático severo el cual puede llevar a la muerte. La etapa biliar coincide con la instalación del helminto en los canalículos biliares, con síntomas que resultan de la alimentación por parte del parásito o debido a la obstrucción e inflamación biliar (Behm & Sangster, 1999).

La severidad de la enfermedad puede ser clasificada como aguda o crónica. La patología de la fascioliasis aguda sucede cuando un gran número de metacercarias son ingeridas en un corto lapso de tiempo. Esto no sucede normalmente, salvo en ovejas y cabras. La forma crónica de la enfermedad es más común en todo tipo de huéspedes, a pesar de que existen considerables variaciones entre animales. Aunque esta patología raramente es fatal, es de una considerable importancia económica.

La complejidad de la fascioliasis surge de diferentes fuentes. La maduración del helminto involucra el desarrollo y crecimiento durante 12-16 semanas en las cuales la *F. hepatica* viaja entre, y a través, de órganos. A medida que el gusano en crecimiento migra, el tamaño de su camino a través del hígado aumenta y con ello también lo hacen el daño y la respuesta inflamatoria. El nivel de infección es otro factor que afecta la patología. Grandes gusanos causan una patología más severa y la posibilidad de la muerte del animal. Sin embargo, la mayoría de las infecciones tienen un curso crónico una vez que los gusanos adultos se establecen en los canalículos biliares (Behm & Sangster, 1999). La severidad de la patología también se ve afectada por el estado nutricional del animal. Asimismo existen variaciones en la susceptibilidad a la infección y en la respuesta inmune contra *F. hepatica* (Mulcahy *et al.*, 1999), con ciertos huéspedes que poseen resistencia innata contra la especie.

### 1.2.5 Impacto económico

La fascioliasis hepática, es una parasitosis mundialmente distribuida que afecta a los rumiantes de importancia económica. El ganado infectado con *F. hepatica* raramente demuestra síntomas clínicos, pero sí se observan efectos subclínicos en la eficiencia en la alimentación, crecimiento y fertilidad, los cuales pueden tener un gran impacto en la productividad (Kaplan, 2001). La fascioliasis humana también conduce a pérdidas económicas que pueden ser estimadas en términos de ausentismo, hospitalización, tratamientos y discapacidad (Rim *et al.*, 1994).

A nivel agrícola, las pérdidas incluyen costos de tratamiento, trabajo, requisa de los hígados y pérdidas en la producción. Estas, junto con el impacto en la salud pública de la fascioliasis humana, generan una pérdida económica a nivel mundial, calculada en más de 3.000 millones de dólares anuales, los cuales incluyen también a la fascioliasis causada por *F. gigantica* (Torgerson & Claxton, 1999; Saba *et al.*, 2004).

### 1.3 Control

El control más efectivo está basado en medidas complementarias destinadas a prevenir o limitar el contacto entre el parásito y el huésped definitivo o intermediario. Una estrategia integral de control debe tender a reducir el número de *F. hepatica* en el huésped definitivo, para disminuir la contaminación de los caracoles; a reducir las poblaciones de *Limnaea* spp para impedir la dispersión del parásito por su huésped intermediario y evitar la coincidencia huésped-parásito, utilizando medidas de manejo (Acosta, 1991; Vercruyssen & Claerebout, 2003; Copland & Skerratt, 2008). Complementariamente, el conocimiento del ciclo biológico del parásito y sus huéspedes son de vital importancia para aplicar eficientemente esta estrategia integral de control (Roberts & Suhardono, 1996), ya que estos, junto con los cambios climáticos, son capaces de afectar la prevalencia, intensidad y distribución geográfica (Mas-Coma *et al.*, 2008).

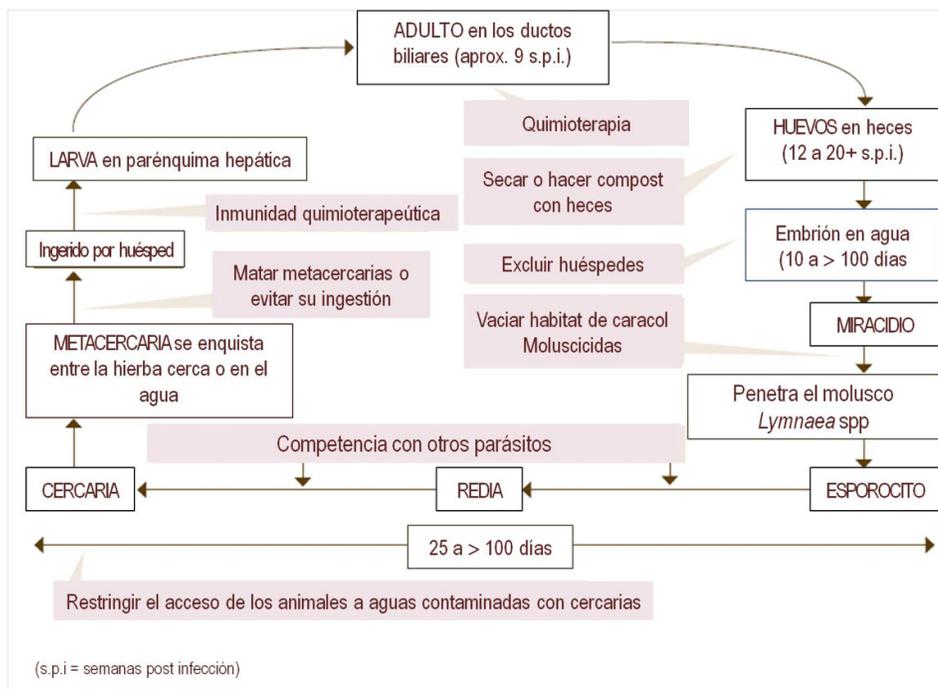


Figura 1.4. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica* mostrando las medidas de control. Modificado de (Copland & Skerratt, 2008).

Los métodos convencionales para el control de *F. hepatica* incluyen la erradicación del caracol con moluscidas, el mejoramiento de los sistemas de drenaje para limitar el hábitat de este huésped intermediario y el uso de fasciolidas para reducir la contaminación (Armour, 1975) (Figura 1.4). La sola utilización de antihelmínticos como forma de combatir a este parásito suele ser costosa para los productores debido al precio de las mismas y a la mano de obra necesaria.

A continuación se hará un resumen de las principales drogas utilizadas en la actualidad, el problema de la resistencia de *F. hepatica* hacia éstas y por último los ensayos realizados en la búsqueda una nueva alternativa para el control de este parásito.

### 1.3.1 Drogas antihelmínticas

El tratamiento con fasciolicidas es el principal método de control de fascioliasis debido a que aún es una herramienta eficaz y de gran flexibilidad en su aplicación (Acosta, 1991; Fairweather & Boray, 1999a; Fairweather & Boray, 1999b). La mayoría de estas drogas son efectivas contra los gusanos adultos, pero su actividad frente a los estadios inmaduros es variable (Mitchell, 2003). Los fasciolicidas que actualmente son de uso común se presentan en la Tabla I.

Tabla I. Comparación de las eficacias de los antihelmínticos presentes en el mercado y su aplicación. Modificado de (Mitchell, 2003; Boray, 2007; Campbell et al., 2007).

Compuesto Activo	Mecanismo de acción	Nombre Comercial	Especies	Eficacia contra <i>F. hepatica</i>
<b>Triclabendazol (Benzimidazol)</b>	Inhibe la polimerización de la tubulina para formar microtúbulos	Fasinex Tremacide Tricla Flukare	Bovinos, ovinos	Todos los estadios (juvenil, inmaduro y adulto)
<b>Closantel (Salicilanilidos)</b>	Desacopla la fosforilación oxidativa mitocondrial	Closantel Closicare Closamax Flukiver	Ovinos	inmaduro y adulto
<b>Nitroxynil (fenoles halogenados)</b>	Desacopla de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias	Trodax	Bovinos, ovinos	inmaduro y adulto
<b>Albendazol (Benzimidazol)</b>	Inhibe la polimerización de la tubulina para formar microtúbulos	Valbazen	Bovinos, ovinos	Adulto
<b>Triclabendazol + Levamisol</b>		Combinex	Bovinos, ovinos	inmaduro y adulto
<b>Triclabendazol + Ivermectin</b>		Fasimec Triclamec	Bovinos, ovinos	Todos los estadios (juvenil, inmaduro y adulto)
<b>Triclabendazol + Oxfendazol</b>		Flukazole	Bovinos, ovinos	Todos los estadios (juvenil, inmaduro y adulto)
<b>Levamisol + Oxiclozanida</b>		Nilzan	Bovinos, ovinos	Adulto
<b>Ivermectina + Clorsulon</b>		Ivomec plus	Bovinos	Adulto
<b>Closantel + oxfendazol</b>		Closicomb	Ovinos	inmaduro y adulto
<b>Closantel + albendazol</b>		Closal	Ovinos	inmaduro y adulto

El triclabendazol (TCBZ) ha sido la droga preferida para el tratamiento de infecciones de *F. hepatica* en ganado por más de veinte años (Overend & Bowen, 1995). El TCBZ es un derivado benzimidazólico que actúa uniéndose a las moléculas de  $\beta$ -tubulina del parásito interrumpiendo funciones vitales de motilidad y reproducción, ya que la droga desestabiliza el equilibrio tubulina-microtúbulo originando en el parásito una pérdida de la homeostasis celular,

con el consecuente desprendimiento y muerte. A diferencia de otros benzimidazoles, los cuales muestran solamente actividad parcial contra el género *Fasciola*, la eficacia de esta droga parece estar restringida a *F. hepatica*, *F. gigantica* y *Fascioloides magna* (Fairweather & Boray, 1999a; Brennan *et al.*, 2007). Es un fasciolicida extremadamente efectivo, siendo la única droga que tiene eficacia en los tres estadios de *F. hepatica*, juvenil, inmaduro y adulto (Mitchell *et al.*, 1998).

### 1.3.2 Resistencia a los antihelmínticos

Se considera que hay resistencia cuando la efectividad de un fármaco disminuye o cesa. Esto ocurre debido a que, luego de cada tratamiento sobrevive un pequeño número de individuos que son resistentes al fármaco utilizado, y éstos son los únicos que se reproducirán y contaminarán las pasturas con sus huevos (Jackson, 1993).

La resistencia frente al TCBZ apareció por primera vez en Australia a mediados de la década de los 90 (Overend & Bowen, 1995) y a partir de ahí se han reportado casos alrededor del mundo (Coles *et al.*, 2006; Fairweather, 2009), incluyendo una cantidad de países europeos, (revisado en Mitchell *et al.*, 1998; Moll *et al.*, 2000; Alvarez-Sanchez *et al.*, 2006; Brennan *et al.*, 2007), y también algunos países de Sudamérica (Olivera *et al.*, 2008; Mamani & Condori, 2009)

Existen varios mecanismos moleculares por los cuales se presenta resistencia de *F. hepatica* al TCBZ. Entre ellos se encuentran:

- a) la lenta reducción de la oxidación del TCBZ a triclabendazol sulfóxido (TCBZSO) que es el metabolito activo,
- b) la unión del TCBZ a proteínas no específicas restringe la habilidad del fármaco a unirse al sitio de acción,
- c) el eflujo mediado por transportadores donde se sobre-expresa la acción de la glicoproteína-P (Pgp), lo que permite la eliminación del fármaco desde las células (Alvarez *et al.*, 2007).

La resistencia a los antihelmínticos se ha transformado en un serio problema en la medicina veterinaria, y amenaza tanto los ingresos agrícolas como el bienestar animal (Wolstenholme *et al.*, 2004). Estrategias para retrasar el comienzo de la resistencia y su control generalmente incorporan quimioprofilaxis mínima, búsqueda de maximizar la eficacia de la droga y, si es posible, incluir una lenta rotación de drogas e intentar limitar el contacto huésped-parásito mediante la manipulación del ambiente de pastoreo (Jackson, 1993).

Otro método para prevenir la expansión de la resistencia es la utilización de combinaciones de fasciolicidas (Fairweather & Boray, 1999a). Actualmente ninguna nueva droga ha salido al mercado, sin embargo combinaciones de algunas drogas antiguas parecen tener alta eficacia contra *F. hepatica* madura e inmadura. La utilización de estos productos debe hacerse con mucha precaución (Boray, 2007). También se está estudiando la combinación del TCBZ junto con inhibidores de la glicoproteína-G como forma de aumentar la eficacia de esta droga (Virkel *et al.*, 2009).

Los antihelmínticos, utilizados habitualmente en zonas endémicas, no evitan que los animales se puedan reinfectar, lo que explica el fracaso de esta estrategia a largo plazo y el no descenso de las cifras de prevalencia. A pesar de que nuevas drogas y combinaciones de drogas, ya conocidas, están siendo desarrolladas, una vacuna comercial contra la fascioliasis ofrecería una mejor estrategia para controlar la infección.

## 1.4 Vacunas

La aparición de resistencia hacia las drogas existentes en el mercado hace que el desarrollo de una vacuna sea una aspiración con amplio consenso en la comunidad científica. Las vacunas tienen a su favor el hecho de que no dejan residuos químicos, eliminando así el período de retención del animal, no dañan el medioambiente y serían aceptadas por los consumidores quienes ya están familiarizados con el concepto de vacunación en la medicina humana (Dalton & Mulcahy, 2001).

La idea de formular y administrar vacunas, que aumenten los niveles de inmunidad del huésped y con ello controlar al parásito, ha sido el objetivo de investigación por más de 50 años (Hein & Harrison, 2005). La vacunación contra infecciones parasitarias sigue siendo relativamente poco exitosa a pesar de las décadas de investigación y los millones de dólares invertidos. Varios son los factores que han contribuido a este lento progreso, entre ellos, los más relevantes son: (1) la falta de una respuesta inmune altamente efectiva, por parte del huésped, luego de la infección inicial; (2) los mecanismos inmunes efectores que no están claramente definidos; (3) la variación de la respuesta inmune del huésped a los distintos parásitos y a sus diferentes estadios; (4) el hecho de que tienden a ser infecciones de naturaleza crónica, lo que en general se da debido a que los parásitos usualmente inducen respuestas inmunes, en el huésped, inapropiadas o inefectivas, previniendo de esa manera una respuesta inmune efectiva por parte del huésped; (5) a diferencia con los patógenos bacterianos o virales, el grado de dificultad asociado con el cultivo *in vitro* de los organismos; (6) la complejidad genómica y estructural de los helmintos que son metazoarios; (7) la diversidad de genes expresados en los diferentes estadios de ciclo biológico de los parásitos; (8) la dificultad de explorar en búsqueda de potenciales antígenos vacunales debido a la disponibilidad limitada de material para su caracterización y aislamiento (Lightowers, 1994; Vercruyse *et al.*, 2004; Hein & Harrison, 2005)

Las vacunas contra *F. hepatica* han sido desarrolladas utilizando un rango de estrategias que incluyen desde extractos crudos de todo el organismo hasta antígenos peptídicos sintéticos. Estos esfuerzos encuentran resumidos en varias revisiones (Haroun & Hillyer, 1986; Spithill *et al.*, 1997; Spithill & Dalton, 1998; Smith, 1999; Spithill *et al.*, 1999; McManus & Dalton, 2006). Actualmente, nuevas estrategias basadas en la biología molecular, en las que se incluyen las vacunas de ADN, han sido experimentadas (Ivory & Chadee, 2004).

Antes de 1987, en los intentos de vacunar rumiantes contra *F. hepatica* generalmente se utilizaron extractos somáticos crudos del parásito, mezcla de proteínas secretadas por el parásito o parásitos atenuados por irradiación

(Haroun & Hillyer, 1986). Posteriormente, han surgido varios reportes de la identificación y caracterización de proteínas de *F. hepatica*, algunas de las cuales han sido empleadas en ensayos de vacunación, que han obtenido resultados positivos alentadores. Estas estrategias vaccinales y candidatos antigénicos que han surgido durante esta búsqueda serán resumidos a continuación.

#### **1.4.1 Los primeros ensayos en busca de una vacuna efectiva**

En general, los diferentes abordajes para el desarrollo de vacunas contra la infección de *F. hepatica* en sus comienzos examinaron el uso de cuatro tipos de antígenos: trematodos vivos, atenuados por irradiación, extractos somáticos del parásito y antígenos metabólicos ó de excreción/secreción. Aspectos adicionales que hay que considerar a la hora de generar una vacuna incluyen el uso de varios adyuvantes como potenciadores de la respuesta inmune y los efectos de diferentes rutas de inmunización en el desarrollo de inmunidad protectora. Asimismo debe considerarse la efectividad de antígenos heterólogos como inmunógenos para poder reemplazar a aquellos antígenos homólogos inefectivos o difíciles de obtener (Lloyd, 1981).

##### **1.4.1.1 Estimulación de resistencia contra *F. hepatica* por infección homóloga primaria**

El comienzo de las investigaciones en este campo se remonta a fines de la década de los 60 cuando Lang y cols. comenzaron a sensibilizar ratones infectándolos con el propio helminto. Los ensayos consistieron en exponer al animal, con una o dos infecciones primarias, y luego de un lapso de tiempo postinfección se los desafiaba con *F. hepatica* con el fin de evaluar la capacidad del huésped de generar resistencia. Para este tipo de ensayo se utilizaron diferentes especies de hospederos mamíferos, debido a que éstos varían su habilidad de adquirir resistencia frente reinfecciones. Vacas, ratones y ratas (en general) claramente desarrollan niveles significativos de resistencia; mientras que en el caso de ovejas y conejos, que son huéspedes susceptibles, desarrollan poca resistencia (Haroun & Hillyer, 1986). Los resultados están listados en la tabla II.

Tabla II. Resultados de los ensayos de sensibilización experimental con *F. hepatica* en la protección de los animales

Huésped	Reducción máx.	Referencias
Ratón	66,7%	Lang, 1967
	33,3%	Lang <i>et al.</i> , 1967
	0%	Chapman & Mitchell, 1982
Rata	76%	Hayes <i>et al.</i> , 1973
	66%	Hayes <i>et al.</i> , 1974a
	77%	Cervi <i>et al.</i> , 2004
Conejo	n.s.	Ross, 1966
	56%	Kendall <i>et al.</i> , 1967
	sig.	Kendall & Sinclair, 1971
	45%	Bolbol <i>et al.</i> , 1978
	33% n.s.	Haroun <i>et al.</i> , 1980a
Oveja	0%	Sinclair, 1962
	n.s.	Boray, 1967
	n.s.	Sinclair, 1971a
	n.s.	Sinclair, 1973
	0%	Rushton, 1977
	32%	Knight, 1980
	n.s.	Chauvin <i>et al.</i> , 1995
Vaca	56%	Doy & Hughes, 1984
Cabra	0%	Pérez <i>et al.</i> , 2006

n.s.= no significativa; sig.= significativa

#### 1.4.1.2 Estimulación de resistencia homóloga por implantación de *F. hepatica*

La participación de factores inmunológicos en el desarrollo de resistencia a reinfecciones con *F. hepatica* fue indicada por experimentos en los cuales la migración hepática de una infección primaria, sensibilizadora, es evitada mediante la implantación de diferentes estadios del parásito antes del desafío. Este tipo de ensayo también se utilizó para estudiar la capacidad de estos diferentes estadios de generar protección (Haroun & Hillyer, 1986).

Los animales utilizados en estas pruebas fueron ratas y ratones a los cuales se les implantaba el gusano vivo, inmaduro o adulto generalmente de forma intraperitoneal o subcutánea, y que luego se los infectaba oralmente. Los resultados demostraron, en su mayoría, el desarrollo de resistencia al desafío. Estos estudios también se aplicaron en ovejas y los resultados fueron positivos Sin embargo, en los casos en que se infectó al animal por vías diferentes a la subcutánea, o intraperitoneal, o en los que se implantaba el parásito muerto no se estimuló la resistencia (Tabla III).

Tabla III. Efectos de la implantación de diferentes estadios de *F. hepatica* en la protección de animales

Huésped	Implantación	Reducción máx.	Referencias
Ratón	Intraperitoneal- NEJ	sig.	Lang & Dronen, 1972
	Intraperitoneal- NEJ	64%	Lang, 1974
Rata	Intraperitoneal- adulto	56%	Eriksen & Flagstad, 1974
	Adulto	sig.	Anderson <i>et al.</i> , 1975
	Huevo no embrionado	n.s	Burden & Hammet, 1980
	Adulto	sig.	Haroun <i>et al.</i> , 1980
	Metacercaria	sig.	Rajasekariah & Howell, 1978
	Huevo	sig.	Rajasekariah & Howell, 1978
	Estadío inmaduro	sig.	Rajasekariah & Howell, 1978
	Adulto	n.s.	Rajasekariah & Howell, 1978
	Subcutanea- gusano maduro	0%	Hughes <i>et al.</i> , 1976
	Intraperitoneal- NEJ	sig.	Hughes <i>et al.</i> , 1981b
Oveja	Intramuscular- adulto	sig.	Ross, 1967

n.s.= no significativa; sig.= significativa

#### 1.4.1.3 Estimulación de resistencia a *F. hepatica* mediante los extractos somáticos del gusano

En un intento de inmunización activa para estimular la resistencia frente a *F. hepatica* se probó la sensibilización del huésped utilizando extractos somáticos del parásito. Los resultados obtenidos mediante esta técnica fueron muy variables. La inmunización mediante la utilización de antígenos somáticos generalmente falló en estimular la resistencia frente a *F. hepatica* en conejos, ovejas y a veces también en ratones y ratas. Sin embargo, otros grupos de investigación lograron inducir una resistencia significativa al desafío tanto en ratas, ratones y vacas (Haroun & Hillyer, 1986). Los resultados están listados en la tabla IV.

El hecho de que los ensayos experimentales fueran diferentes, tanto a nivel del antígeno (dosis y preparación del extracto del gusano, adyuvante empleado) como la ruta de sensibilización generaron resultados contradictorios para el mismo modelo animal utilizado (Haroun & Hillyer, 1986).

Tabla IV. Resultados de la vacunación con extractos somáticos de *F. hepatica*

Huésped	Reducción máx.	Referencias
Conejos	37% (n.s.)	Urquhart <i>et al.</i> , 1954
	0%	Healy, 1955
	n.s.	Ross, 1967
	54-75%	Sinclair & Joyner, 1974
Oveja	n.s.	Ross, 1967
Ratón	86%	Lang & Hall, 1977
	10% (n.s.)	Chapman & Mitchell, 1982
Rata	n.s.	Hughes <i>et al.</i> , 1981a
	80%	Oldham & Hughes, 1982
	13%	Burden <i>et al.</i> , 1982
	50%	Chapman & Mitchell, 1982
	86%	Oldham, 1983
Vaca	n.s.	Ross, 1967
	99,6%	Hall & Lang, 1978
	96.8%	Guasconi <i>et al.</i> , 2011

n.s.= no significativa

#### 1.4.1.4 Inmunización pasiva contra *F. hepatica* mediante transferencia de suero inmune y linfocitos sensibilizados

Se basa en la transferencia de suero y/o células linfoides de animales expuestos al parásito a animales sanos. Evidencia de la participación de componentes humorales en la resistencia a la fascioliasis han sido obtenidos en ratas, ratones, y vacas.

Tabla V. Protección frente a *F. hepatica* mediante inmunización pasiva

Huésped	Detalle	Reducción máx.	Referencias
Rata	Linfocito donantes con infección desarrollada	sig.	Corba <i>et al.</i> , 1971
	Linfocito donantes con infección desarrollada	sig.	Amour & Dargie, 1974
	Suero inmune	70%	Hayes <i>et al.</i> , 1974b
Ratón	Suero inmune de rata	sig.	Rajasekariah & Howell, 1979
	Anticuerpo monoclonal ES-78 MoAb	47%	Chapman & Mitchell, 1982
	Anticuerpo monoclonal ES-78 MoAb	75%	Marcet <i>et al.</i> , 2002
Vaca	Linfocito donantes con infección desarrollada	sig.	Corba <i>et al.</i> , 1971

sig.= significativa

La estrategia consiste en transferir células, que pueden provenir del peritoneo u homogeneizados de nódulos linfáticos y bazo de animales donadores infectadas con *F. hepatica* (Sinclair, 1971); en el caso de linfocitos, los

donantes no necesariamente deben tener una infección desarrollada para obtener una transferencia de resistencia exitosa (Haroun & Hillyer, 1986).

La inmunización pasiva está directamente relacionada con grandes volúmenes de suero inmune. La resistencia pasiva también parece ser expresada contra juveniles durante su migración en el peritoneo, además de que puede estar influenciada tanto por la especie donadora y receptora (Haroun & Hillyer, 1986).

#### 1.4.1.5 Inmunización con helmintos atenuados por irradiación

Se ha demostrado que la radiación ionizante reduce la patogenicidad de las larvas parasitarias sin afectar su potencial antigénico (Dawes, 1964). La utilización de metacercarias atenuadas por irradiación como forma de inmunizar contra la infección de *F. hepatica* fue una de las primeras estrategias realizadas en búsqueda de antígenos protectores. Los resultados obtenidos mediante este tipo de ensayos han sido variados. La protección con estas vacunas ha sido exitosamente inducida en vacas y ratas, pero generalmente no se obtuvieron resultados alentadores en ratones, conejos u ovejas (Acosta et al., 1989). Se ha sugerido que la inmunidad generada por estas vacunas imita la protección generada por una infección natural (Boray, 1969).

Estas formas irradiadas fueron sustituidas, en gran parte, por el uso experimental de los antígenos de excreción/ secreción como forma de identificar antígenos candidatos.

Tabla VI. Estimulación de resistencia mediante la utilización de metacercarias irradiadas de *F. hepatica*.

Huésped	Dosis(krad)	Tipo	Reducción máx	Referencias
Rata	2.5	Rayos X	50%	Thorpe & Broome, 1962
	3	Rayos $\gamma$	56%	Armour & Dargie, 1974
	3.8	Rayos $\gamma$	0	Hughes et al., 1981a
Ratón	2-4	Rayos X	n.s.	Hughes, 1962
	3	Rayos X	n.s.	Dawes, 1964
	2	2	n.s.	Sokolic, 1968
	3.8	Rayos $\gamma$	39%	Harness et al., 1976
	3.8	Rayos $\gamma$	38%	Harness et al., 1977
Conejo	2-4	Rayos X	n.s.	Hughes, 1962
	3	Rayos X	100%	Movsesijan et al., 1969
Vaca	20	Rayos X	n.s.	Boray, 1967
	3.5	Rayos $\gamma$	70%	Dargie et al., 1974
	3.5	2	70%	Armour et al., 1974
	3	Rayos $\gamma$	71%	Nansen, 1975
	3	Rayos $\gamma$	72,5%	Acosta et al., 1989
Oveja	20	Rayos X	n.s.	Boray, 1967
	3	Rayos $\gamma$	64% (n.s.)	Dargie et al., 1974
	2.5	Rayos $\gamma$	n.s.	Campbell et al., 1978
	3-40	Rayos $\gamma$	n.s.	Creaney et al., 1995

n.s.= no significativa; sig.=significativa

### 1.4.1.6 Estimulación de resistencia a *F. hepatica* mediante productos excreción/secreción

Los intentos de estimular la resistencia contra *F. hepatica* mediante sensibilización con productos excreción/secreción (PES) del gusano maduro no resultaron exitosos en conejos, ovejas, ratones y ratas. Sin embargo, la estimulación de resistencia con PES de gusanos inmaduros, en algunos ensayos de ratones y ratas indujo protección significativa (Haroun & Hillyer, 1986).

Tabla VII. Estimulación de resistencia mediante la utilización del producto excreción/secreción de *F. hepatica*.

Huésped		Reducción	Referencias
Conejo	PES	n.s.	Healy, 1955
	PES	n.s.	Lalic <i>et al.</i> , 1976
	PES	n.s.	Lehner & Sewell, 1979
	PES	n.s.	Sandeman <i>et al.</i> , 1980
Oveja	PES	n.s.	Healy, 1955
	PES	n.s.	Lalic <i>et al.</i> , 1976
	PES	n.s.	Lehner & Sewell, 1979
	Complejo Ag-Ac	n.s.	Sandeman <i>et al.</i> , 1980
Ratón	PES adulto/ gusano inmaduro	n.s.	Rajasekariah <i>et al.</i> , 1979
	PES gusano inmaduro	sig.	Lang, 1976
	PES gusano inmaduro	sig.	Lang & Hall, 1977
	PES gusano inmaduro	n.s.	Lehner & Sewell, 1979
	Antígeno cultivado	0%	Burden <i>et al.</i> , 1982
	PES gusano inmaduro	n.s.	Chapman & Mitchell, 1982
Rata	PES gusano inmaduro	sig.	Rajasekariah <i>et al.</i> , 1979
	PES gusano inmaduro	n.s.	Lehner & Sewell, 1979
	PES gusano inmaduro	n.s.	Davies <i>et al.</i> , 1979
	Complejo Ag-Ac	87%	Howell, 1979
	Complejo Ag-Ac	44%	Howell & Sandeman, 1979
	PES adulto	n.s.	Burden & Hammet, 1980
	PES gusano inmaduro	51%	Burden <i>et al.</i> , 1982
	PES gusano inmaduro	54%	Chapman & Mitchell, 1982

n.s.= no significativa; sig.= significativa

### 1.4.1.7 Inmunización heteróloga

La inmunización frente a enfermedades parasitarias ha sido estudiada en principio con antígenos homólogos de parásitos, sin embargo se ha demostrado que la protección cruzada es importante en muchas infecciones de helmintos (Lloyd, 1981). La evidencia más clara de resistencia cruzada surgió de una serie de ensayos hace 30 años realizados por George Hillyer y sus cols., en los que un conjunto de antígenos de *Fasciola* podían ser purificados, en virtud a su reactividad cruzada con anticuerpos generados contra el trematodo *Schistosoma mansoni*, que tienen la capacidad de generar niveles de protección contra infecciones frente a este último (Hillyer, 1987). Esta

reducción en la infección puede manifestarse mediante una disminución en la cantidad de gusanos, la deposición de huevos (infertilidad), la disminución en la patología, o una combinación de éstas (Hillyer, 1995).

Los antígenos protectores de *F. hepatica* fueron aquellos que se unían a los anticuerpos de *S. mansoni* y su purificación, mediante cromatografía de afinidad, resultaba en un complejo antigénico al cual se lo denominó FhSmIII(M). Este complejo compuesto por múltiples polipéptidos antigénicos tienen pesos moleculares que rondan entre los 66 y los 12 kDa (Hillyer, 1987); siendo el de 12 kDa y el de 14 kDa los dos complejos más prominentes, que serán descritos más adelante. Las fracciones subcelulares de *F. hepatica* han mostrado inducir altos niveles de resistencia frente a infecciones con *S. mansoni* o con *F. hepatica* en ratones (Hillyer & Sagramoso de Ateca, 1979).

El desarrollo de inmunidad protectora mediante antígenos heterólogos como inmunógenos podrían ser de gran importancia para reemplazar antígenos homólogos ineficaces o difíciles de obtener (Lloyd, 1981).

### 1.4.2 Inmunización empleando antígenos definidos

Las vacunas a partir de antígenos definidos consisten en copias del polipéptido completo o incompleto de los antígenos proteicos, expresadas mediante la utilización de métodos de ADN recombinante o epítopes antigénicos producidos de forma sintética (Lightowers, 1994). La estrategia actual utilizada para la búsqueda de este tipo de candidatos vacunales que está obteniendo más resultados ignora, en gran parte, los mecanismos de inmunidad involucrados en la protección, pero intenta ir contra blancos secretados por el parásito, como lo son las proteasas (Smith, 1999; Smith & Zarlenga, 2006).

Una de las maneras para buscar blancos con fines terapéuticos contra *F. hepatica* consiste en examinar aquellos antígenos críticos de la sobrevivencia del parásito, como lo son las proteasas, los cuales son expresados por los estadios infectivos del parásito. En esta fase los parásitos inmaduros son más vulnerables al ataque inmunológico y más pequeños en tamaño que los adultos, y pueden no haber desarrollado los mecanismos de evasión que les permiten a estos últimos persistir en el huésped por períodos de tiempo prolongados. Una desventaja de esta aproximación es la disponibilidad limitada de material para su caracterización y aislamiento (Meeusen & Piedrafita, 2003).

Otro enfoque a la hora de buscar candidatos consiste, primero, en probar fracciones protectoras, enriquecidas con el candidato, en ensayos de protección preliminares; luego purificar los componentes tanto como sea posible y finalmente aislar y expresar los genes que los codifican de manera que, una proteína recombinante efectiva pueda llegar a ser producida como una vacuna comercializable. Esta es la estrategia que ha tenido éxito en el desarrollo de una de las pocas vacunas contra helmintos de rumiantes que ha alcanzado comercialización: la vacuna recombinante contra la hidatidosis (Lightowers, 1994; Smith, 1999; Smith & Zarlenga, 2006).

Las proteínas son probablemente la primera opción elegida por la mayoría de los investigadores cuando se está buscando candidatos vacunales. Dos son

los motivos principales: primero, son una clase de componentes relativamente fáciles de identificar, modificar y que se pueden producir en forma recombinante en grandes cantidades de forma económica; y por otro lado, muchas proteínas juegan un rol clave en el metabolismo del parásito y por ello deberían ser buenos blancos para perturbar su biología (Hein & Harrison, 2005).

Alrededor de media docena de antígenos purificados, nativos y recombinantes, han mostrado tener potencial inmunoproláctico contra fascioliasis (Spithill & Dalton, 1998; Spithill *et al.*, 1999; Hillyer, 2005; McManus & Dalton, 2006). Estos incluyen las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), glutatión-S-transferasas (GST), catepsinas L y B (Cat L, Cat B), hemoglobina (Hb), leucina aminopeptidasa (LAP), y una proteína tipo saposina llamada SAP-2.

#### 1.4.2.1 Proteínas de unión a ácidos grasos (FABP)

Las proteínas de unión a ácidos grasos pertenecen a una gran familia de pequeñas proteínas involucradas en la unión y transporte de una variedad de ligandos hidrofóbicos tales como oleato, palmitato y una variedad de ácidos grasos (Hillyer, 2005). Debido a que *Fasciola* es incapaz de sintetizar sus propios ácidos grasos utiliza las FABP para obtener ácidos grasos de la sangre del huésped, por lo que se cree que la inmunización de alguna manera bloquea este mecanismo con consecuencias fatales para el parásito (Smith & Zarlenga, 2006). Este tipo de proteínas se encuentra en el tegumento de *F. hepatica* funcionando como transportadores (Muro, 1997).

Una característica de las FABP citoplasmáticas es la conservación del tamaño: todos los miembros conocidos tienen un peso molecular de entre 14 kDa y 16 kDa y 127-133 aminoácidos de largo (Spithill *et al.*, 1999; Hillyer, 2005). Las FABP fueron las primeras fracciones antigénicas definidas y purificadas que fueron testeadas como una vacuna contra fascioliasis. Este antígeno es el principal componente del complejo *FhSmIII(M)* aislado de PES de *F. hepatica* adulta y fue identificado como una proteína de 12KDa a la cual se la denominó *Fh12* (Hillyer, 2005).

Utilizando un anticuerpo mono-específico policlonal anti-*Fh12* y un ADN copia (ADNc) de una biblioteca de expresión de ADNc de *F. hepatica* adulta se logró aislar una proteína recombinante de 14.7 KDa, denominada *rFh15*, que tenía mucha similitud respecto a la familia de las FABP (Hillyer, 1995) y alta homología con la FABP 14.8 de *S. mansoni* (Moser *et al.*, 1991).

En 2003, Timanova-Atasanova y cols. aislaron y caracterizaron una proteína de unión a ácidos grasos de 13 KDa, a la cual denominaron *Fh13*, del citosol de *F. hepatica* adulta.

La FABP nativa, *nFh12*, purificada ha resultado ser una proteína compleja que posee al menos ocho isoformas con igual peso molecular pero diferentes puntos isoeléctricos. La proteína recombinante *rFh15* parece ser una de las isoformas de *Fh12*, pero una de las menos inmunogénicas e inmunoprotectoras (Espino *et al.*, 2001).

Se han realizado estudios donde se evaluó la capacidad protectora de las FABP, tanto nativa (nFh12) como con la recombinante (rFh15), frente a infecciones experimentales con *F. hepatica* en conejos (Muro *et al.*, 1997) y en ovejas (Ramajo *et al.*, 2001). Estos estudios de inmunoprofilaxis han demostrado que nFh12 siempre induce niveles mayores de protección frente *F. hepatica*, respecto a rFh15 (Muro *et al.*, 1997; Lopez-Aban *et al.*, 1999). Actualmente, se han realizado ensayos de inmunización utilizando rSm14 como inmunoprotector en distintos animales huéspedes, en los cuales se obtuvieron resultados alentadores (Tendler *et al.*, 1996; Muro *et al.*, 1997; Almeida *et al.*, 2003) (Tabla VIII).

Por todo lo anteriormente señalado se puede sugerir que tanto las FABP nativas y recombinantes de *F. hepatica*, así como la FABP recombinante de *S. mansoni* inducen niveles significativos de protección en diferentes modelos de animales contra la infección de *F. hepatica* (Hillyer, 2005).

Tabla VIII. Ensayos de vacunación en los que se ha utilizado FABP como candidato vaccinal

Proteína	Naturaleza	Huésped	Protección	Referencias
<b>nFh12</b>	N	Vaca	55%	Hillyer, 1987
	N	Ratón	69-78%	Hillyer, 1985
	N	Conejo	93%	Tendler <i>et al.</i> , 1996
	N	Conejo	40%	Muro <i>et al.</i> , 1997
	N	Oveja	20%(n.s.)	Ramajo <i>et al.</i> , 2001
	N	Oveja	24.5%	Martinez-Fernandez <i>et al.</i> , 2004
	N	Ratón	42%	Lopez-Aban <i>et al.</i> , 2008
<b>rFh15</b>	R	Conejo	17%	Muro <i>et al.</i> , 1997
	R	Oveja	0%	Ramajo <i>et al.</i> , 2001
	R	Conejo	76%	Casanueva <i>et al.</i> , 2001
	R	Oveja	43%	Lopez-Aban <i>et al.</i> , 2007
<b>rSm14</b>	R	Ratón	100%	Tendler <i>et al.</i> , 1995
	R	Ratón	66%	Tendler <i>et al.</i> , 1996
		Conejo	89%	Tendler <i>et al.</i> , 1996
	R	Oveja	94%	Almeida <i>et al.</i> , 2003

N= nativa; R= recombinante

#### 1.4.2.2 Glutación-S-transferasas (GST)

Las GST son una familia de isoenzimas involucradas en la detoxificación de un amplio espectro de xenobióticos y compuestos tóxicos endógenos. Fueron elegidos como candidatos vaccinales contra *Fasciola* basándose en el hecho de que las GST de *S. mansoni* (Sm28) y de *S. japonicum* (Sj26) mostraron protección en animales de laboratorio. Además, están ampliamente distribuidas en los tejidos de *F. hepatica*: están presentes en la superficie del intestino, parénquima y tegumento (Smith, 1999; Smith & Zarlenga, 2006). La purificación de las GST de *F. hepatica* adultas mostró estar compuesta por una mezcla de al menos cinco isoenzimas de tamaño entre 23-26,5 kDa que muestran heterogeneidad en la secuencia N-terminal (Spithill *et al.*, 1997; Spithill & Dalton, 1998).

Se han aislado los ADNc que codifican para cuatro de las isoformas de GST (Panaccio *et al.*, 1992). Todas mostraron una identidad aminoacídica del 71-89% entre ellas. A pesar de tener altos niveles de identidad de secuencia, las cuatro isoformas expresadas en *E. coli*, mostraron especificidades de sustrato e inhibidores bastante diferentes, indicando diferencias en las funciones *in vivo* (Salvatore *et al.*, 1995). Sorprendentemente, no existen reportes de evaluaciones del potencial protector de GST recombinante de *Fasciola* en ovejas o vacas.

La vacunación con GST nativa (Tabla IX) confiere resistencia frente a *F. hepatica* tanto en ovejas como en vacas. Los niveles de protección dependen mucho del adyuvante utilizado. El grupo de Spithill en los años 90 realizó ensayos de vacunación en ovejas, en los que se les administró múltiples dosis de GST nativa de *F. hepatica* con diferentes tipos de adyuvantes. Los resultados obtenidos mostraron una reducción en la cantidad de helmintos, marcando así, la primera demostración de la capacidad inmunoprotectora de un antígeno definido contra *F. hepatica* en ovejas. Posteriormente, utilizando protocolos de vacunación comparables, no se ha obtenido una inducción de respuesta inmune consistente (Spithill *et al.*, 1999).

Tabla IX. Ensayos de vacunación en los que se ha utilizado GST como candidato vaccinal

Antígeno	Naturaleza	Huésped	Protección	Referencias
GST	N	Rata	0%	Howell <i>et al.</i> , 1988
	N	Oveja	57%	Sexton <i>et al.</i> , 1990
	N	Vaca	19-69%	Morrison <i>et al.</i> , 1996
	N	Vaca	0%	De Bont <i>et al.</i> , 2003
	N	Conejo	64%	Muro <i>et al.</i> , 2007

N=nativa

#### 1.4.2.3 Proteínas tipo Saposina (SAPs)

Las SAPs son una familia de proteínas que participan en la interacción con lípidos de membrana y cuyas funciones celulares son esenciales para el desarrollo del parásito, pero que aún están parcialmente comprendidas. Se cree que la SAP en los PES es responsable de la lisis de los eritrocitos en el intestino del gusano, primer paso necesario para que las proteasas puedan proceder a la degradación de la Hb en su interior (Bruhn, 2005).

Reed y cols. (2000) describieron una proteína, tipo lisina-NK, perteneciente a la familia de las SAPs, secretada por *F. hepatica* a la cual denominó *FhSAP-1*. Posteriormente, se logró la clonación del ADNc de *F. hepatica* que codifica para un miembro de la familia de las SAPs, su expresión en *E. coli* y la caracterización parcial y funcional de esta proteína recombinante, la cual se la identificó como *FhSAP-2* (Espino & Hillyer, 2003).

La inoculación (vía) en conejos con *FhSAP-2* indujo una reducción del 81.2% en la cantidad de gusanos presentes en el animal infectado. Además, se constató una disminución de los niveles del parásito en las heces y en la bilis, en relación con los conejos control. Estos resultados apoyan la hipótesis de que esta SAP

recombinante tiene potencial inmunoprotector contra *F. hepatica* (Espino & Hillyer, 2004).

#### 1.4.2.4 Hemoglobina de *F. hepatica* (Hb)

Otro antígeno presente en los PES de *F. hepatica* adulta fue aislado por McGonigle y Dalton (1995). La molécula de 200 kDa posee un color amarillento debido a la presencia de grupos hemo. Se sugirió que esta proteína, denominada hemoglobina (Hb) podía estar implicada en el transporte y/o almacenamiento de oxígeno en los gusanos que migran, los cuales están expuestos a un ambiente anaerobio. Se ha propuesto que la vacunación con Hb induce anticuerpos que interfieren con el rol de la molécula en el metabolismo del oxígeno en el tegumento de los gusanos que migran, así como en los órganos reproductivos, afectando de esta manera el desarrollo y la producción de huevos de *F. hepatica* (Spithill & Dalton, 1998).

Se realizó un ensayo de vacunación en ganado vacuno con Hb purificada generándose una protección de 43,8%, respecto a los animales control. Además, la cantidad de huevos recogidos de aquellos animales vacunados mostró una disminución mayor al 60% en su viabilidad. Por otra parte, en el mismo ensayo se realizaron pruebas de inmunización con una vacuna que consistía en mezclas de catepsinas y Hb, los cuales serán detallados más adelante (Dalton *et al.*, 1996).

En 2008, Dewilde y cols. caracterizaron una Hb recombinante, HbF2, y realizaron experimentos de vacunación en terneros. Los resultados no fueron exitosos, debido a que no se obtuvo protección frente a infecciones con *F. hepatica*. Entre las causas que pudieron llevar a este resultado se encuentra la elección del adyuvante y el hecho de que no se producen modificaciones post-traduccionales en la proteína recombinante debido al vector de expresión utilizado (Dewilde *et al.*, 2008). La Hb clonada y expresada por Dewilde no tiene vinculación con la proteína aislada por Dalton y llamada Hb, ya que los pesos moleculares obtenidos en las respectivas purificaciones fueron muy diferentes y los resultados obtenidos en los ensayos también. Es más, todas las globinas de invertebrados tienen pesos moleculares bajos como la obtenida por Dewilde; por lo que la protección obtenida por Dalton y cols. probablemente se deba a otra(s) proteína(s) presentes en la fracción de "Hb"

#### 1.4.2.5 Fosfoglicerato quinasas (PGK)

Las PGK parecen ser un potencial antígeno vaccinal. Son enzimas que están involucradas en el metabolismo energético del parásito, catalizando la reacción de ADP a ATP, y viceversa. Esta reacción ocurre tanto en el metabolismo anaerobio como aerobio de *F. hepatica*, siendo ésta la característica más importante de la PGK (Schulman & Valentino, 1981). Además, se estableció que esta enzima está presente en tegumento e intestino del parásito, lugares accesibles para el sistema inmune del huésped, y también en el subtegumento (Jaros *et al.*, 2010).

El primer ensayo de vacunación utilizando este nuevo candidato se efectuó inmunizando ratas con PGK nativa, recombinante y ADNc. Los resultados, de protección obtenidos fueron variables, dependiendo de la forma en la que administró la vacuna. La mejor protección se logró mediante la inmunización con la proteína recombinante donde se obtuvo una reducción promedio del 64%. No puede ignorarse que el huésped es crucial en los experimentos de vacunación, por ello los experimentos en animales de laboratorio pequeños solo pueden considerarse como estudios piloto (Jaros *et al.*, 2010).

#### 1.4.2.6 Peroxiredoxinas (Prx)

El descubrimiento de este sistema enzimático representa un gran avance para entender como el parásito maneja el stress oxidativo tanto interno como externo (Dzik, 2006). Las peroxiredoxinas son una familia de proteínas antioxidantes ubicuas que reducen el peróxido de hidrógeno y alquilhidroperoxidasa en agua y alcoholes (Hofmann *et al.*, 2002). Las Prx pueden ser divididas en tres grupos dependiendo del residuo de cisteína altamente conservado que contengan: 2-Cys Prx típico, 2-Cys Prx atípico, y el 1-Cys Prx (Wood *et al.*, 2003). En *F. hepatica* las Prx se encuentran en los PES y juegan un rol importante en la supervivencia del parásito, debido a la carencia de catalasa, participando en la defensa frente a las especies reactivas del oxígeno (ROS) generados por el huésped (McGonigle *et al.*, 1997).

En 2010, dos grupos publicaron resultados de evaluaciones del efecto inmunogénico de Prx recombinantes, expresados y purificados tal como lo describió McGonigle y cols. (1997) frente a un desafío con *F. hepatica*, utilizando Quil A como adyuvante (Sekiya *et al.*, 2006). Estos ensayos se realizaron en vacas y en cabras. En el primero se observó una reducción no significativa el número de gusanos en hígado respecto al grupo control (Mozos Mora *et al.*, 2010); y en el segundo se observó una modesta reducción de la carga parasitaria (Mendes *et al.*, 2010).

#### 1.4.3 Proteasas como candidatos vacunales

Las proteasas son enzimas que clivan las proteínas mediante hidrólisis de los enlaces peptídicos. Se clasifican, en base al sitio de corte, en endopeptidasas y exopeptidasas. Las primeras fragmentan enlaces peptídicos internos; y las segundas cortan aquellos que se encuentran en los extremos y se las denominan aminopeptidasas o carboxipeptidasas dependiendo si fragmentan el extremo N- o C-terminal, respectivamente (Barrett & McDonald, 1986). En la actualidad la base de datos sobre peptidasas MEROPS creó una estructura jerárquica basada en la división de las peptidasas en familias y clanes; y existen seis clases principales de proteasas en base al mecanismo catalítico y a los residuos fundamentales que participan; estos son aspartil (carboxil), cisteín (tiol), glutamil, metalo-, serín y treonín proteasas (Rawlings *et al.*, 2004).

Las proteasas parasitarias están implicadas en la invasión, migración y adquisición de alimentos, así como también en la evasión del sistema inmune, funciones que las hacen potenciales blancos para drogas y vacunas. Si bien las endopeptidasas han sido muy estudiadas debido a su gran participación

en estos procesos, las exopeptidasas han sido postergadas en la mayoría de los modelos estudiados (Tort *et al.*, 1999; Williamson *et al.*, 2003).

Desde la década de los setenta, se ha reportado la presencia de enzimas proteolíticas a nivel del tubo digestivo de adultos de *F. hepatica*, (revisado en Dalton y cols., 2003a). Las proteasas expresadas por este helminto incluyen una variedad de catepsinas tipo L y tipo B, así como una serín proteasa de tipo dipeptidil peptidasa (Carmona *et al.*, 1994), una leguminaína (Cancela *et al.*, 2010; Dalton *et al.*, 2009), y leucin aminopeptidasa (Acosta *et al.*, 1998); pero sólo las primeras y ésta última se han utilizado en experimentos de vacunación.

#### 1.4.3.1 Cisteín proteasas

Dentro de este grupo se destacan en los trematodos, en general, y en *F. hepatica*, en particular, las catepsinas secretadas. Son producidas en todos los estadios del ciclo biológico de *F. hepatica*, facilitando funciones tales como desenquiste, invasión de tejidos, evasión del sistema inmune y su alimentación, (revisado en Mulcahy *et al.*, 1999; Spithill *et al.*, 1999; Hillyer, 2005) siendo, estos eventos, importantes facilitadores de la virulencia en *F. hepatica* (Dalton *et al.*, 2003b). Dos clases de cisteín proteasa se encuentran en los PES de fasciola: las catepsinas L (Cat L) y las catepsinas B (Cat B) (Harmsen *et al.*, 2004; Cancela *et al.*, 2008).

Las catepsinas L fueron la primer clase de proteasas en ser descritas en *F. hepatica* (Smith *et al.*, 1993), donde son expresadas y en muchos casos secretadas, y por lo tanto son fundamentales en la interacción huésped-parásito (Dalton *et al.*, 2003b). Esta clase de catepsinas parece ser particularmente prominente en trematodos en comparación con nematodos donde las catepsinas tipo B tienden a ser expresadas en mayor cantidad (Tort *et al.*, 1999). En *F. hepatica*, las catepsinas L son expresadas tanto en JRDs como en adultos, pero en forma diferencial (Cancela *et al.*, 2008). Dalton y cols. determinaron que las dos principales moléculas secretadas por el adulto de *F. hepatica* son las catepsinas L1 y L2, diferenciadas en base a sus propiedades fisicoquímicas (peso molecular, pH óptimo) y especificidad de sustratos (Dowd *et al.*, 1994). Más adelante se determinó que las principales catepsinas secretadas en los estadios inmaduros, de metacercaria y el JRD, son la B y dentro de las catepsinas L, la catepsina L3 (Cat L3) (Cancela *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2009) (Fig. 4.2).

Varios reportes han demostrado que este tipo de proteasas pueden ser útiles como vacunas protectoras. Experimentos de vacunación utilizando FhCat L1 en vacas mostraron un descenso en la cantidad de gusanos en un rango de 42-69%, en comparación con el grupo control no vacunado, además de presentar una marcada reducción en la fecundidad y/o viabilidad de los huevos (Dalton *et al.*, 1996). Por otro lado Piacenza y cols. (1999) testaron el potencial de las proteasas Cat L1 y Cat L2, purificadas del gusano adulto, como vacunas, en ovejas. Los niveles de protección obtenidos fueron modestos, de 33% y 34% respectivamente, observándose una acentuada disminución de la viabilidad de los huevos. El aislamiento de ADNc de las Cat L y su expresión funcional en levaduras se lograron en 1997 (Dowd *et al.*, 1997; Roche *et al.*, 1997). Recientemente Golden y cols. realizaron ensayos utilizando

la Cat L1 recombinante de *F. hepatica* (rFhCat L1) como vacuna en ganado bovino, obteniendo resultados poco alentadores; no observándose una reducción significativa en la cantidad de gusanos (Golden *et al.*, 2010). En este contexto, si bien la inmunización en cabras con rFhCat L1 tampoco indujo un descenso en la carga de gusanos ni en la viabilidad de los huevos, se determinó una reducción en el daño hepático (Perez-Ecija *et al.*, 2010).

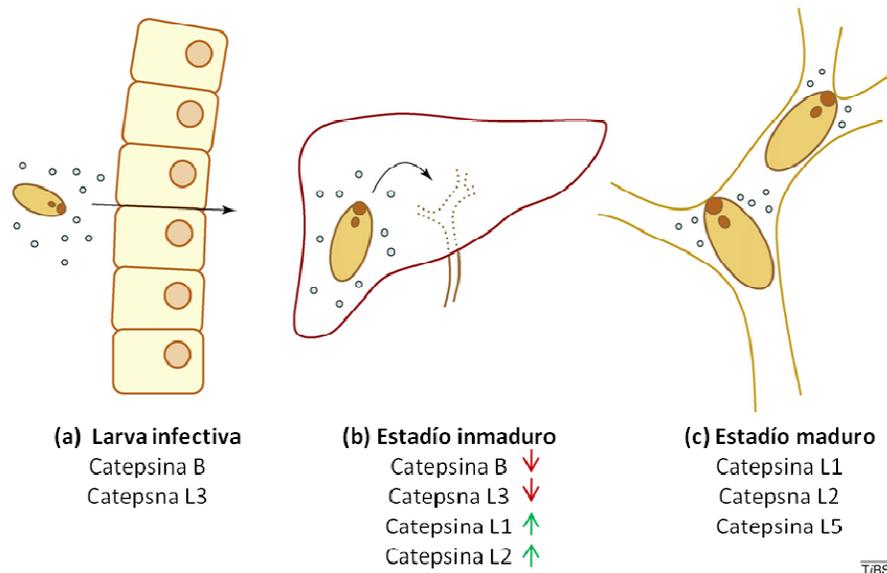


Figura 1.5. Regulación de las catepsinas en el desarrollo de *F. hepatica*, trematodo que atraviesa ciclos biológicos complejos que involucran transiciones entre tejidos y órganos del huésped. Movimientos de un sitio al otro, durante la progresión del ciclo, están asociados con la expresión diferencial de catepsinas. (a) La penetración de la pared intestinal del huésped, por el JRD, está facilitada por la secreción de enzimas proteolíticas. Este proceso involucra a las catepsinas B y catepsinas L3. (b) La migración de los gusanos inmaduros a través del tejido hepático corresponde a un período de rápido crecimiento y desarrollo del parásito. A esta altura, la degradación proteica de las proteínas del huésped se logra principalmente por las catepsinas L1 y L2, a pesar de que algunas catepsinas B, L3 y L4 pueden mantener su actividad. (c) *F. hepatica* adulta reside dentro de los ductos biliares donde se alimenta de la sangre del huésped. Análisis proteómicos mostraron que las catepsinas L1, L2 y L5 son las únicas proteasas secretadas por el gusano adulto, indicando, de esta forma, funciones cruciales de estas enzimas en la penetración de las paredes de los ductos biliares y en la digestión de la hemoglobina del huésped de (Robinson *et al.*, 2008)

Las catepsinas B en *F. hepatica* son expresadas predominantemente en los JRDs, durante el estadio invasivo temprano (Law *et al.*, 2003; Cancela *et al.*, 2008). Las funciones de esta clase de catepsinas son casi desconocidas pero se presumen similares a las definidas para las FhCat L1 y L2 de adultos. Beckham y cols., en 2009, demostraron la importancia de una de las Cat B, FhCat B1, para la supervivencia y el adecuado funcionamiento del JRD. ADNc que codifican para la Cat B han sido clonados y expresados (Cancela *et al.*, 2008; Beckham *et al.*, 2009).

Se ha realizado una prueba de inmunización inoculando con una mezcla de FhCat L1 y Hb. Esta preparación indujo niveles de protección de 52%, lo cual muestra una marcada diferencia con los valores obtenidos utilizando los antígenos por separado. Además, se observó una reducción de la viabilidad de los huevos mayor al 55%. Los mayores niveles de protección se obtuvieron al

vacunar con una mezcla de FhCat L2 y Hb, la cual indujo un 72.4% de protección (Dalton *et al.*, 1996).

Recientemente, Jarayaj y cols. (2009) realizaron inmunizaciones con una vacuna multivalente, en la que se expresaban una proteasa aislada de metacercarias (Cat L1g), otra de JRDs (Cat B) y una de adultos (Cat L5). Los resultados de los experimentos de vacunación con catepsinas se detallan en la tabla X.

Tabla X. Niveles de protección obtenidos, en relación al número de gusanos recuperados, utilizando catepsinas como inmunógeno

Antígeno	Naturaleza	Huésped	Protección	Referencias
<b>Cat L</b>	N	Oveja	0%	Wijffels <i>et al.</i> , 1994
<b>Cat L1</b>	N	Oveja	34%	Piacenza <i>et al.</i> , 1999
	N	Vaca	42-69%	Dalton <i>et al.</i> , 1996
	N	Vaca	sig.	Mozos Mora <i>et al.</i> , 2010
	R	Vaca	48.2%	Golden <i>et al.</i> , 2010
<b>Cat L2</b>	N	Oveja	33%	Piacenza <i>et al.</i> , 1999
<b>Cat B</b>	R	Cabra	n.s.	Perez-Ecija <i>et al.</i> , 2010
<b>Cat L3</b>	R	Rata	52%	Reszka <i>et al.</i> , 2005
<b>Cat B</b>	R	Rata	60%	Jayaraj <i>et al.</i> , 2009
<b>Cat L5</b>	R	Rata	51%	Jayaraj <i>et al.</i> , 2009
<b>Cat L1g</b>	R	Rata	43%	Jayaraj <i>et al.</i> , 2009
<b>Cat B+ Cat L5</b>	R	Rata	83%	Jayaraj <i>et al.</i> , 2009
<b>Cat B+ Cat L1g</b>	R	Rata	66%	Jayaraj <i>et al.</i> , 2009
<b>CatL5+ CatL1g</b>	R	Rata	60%	Jayaraj <i>et al.</i> , 2009
<b>Cat L5+ Cat L1g+ Cat B</b>	R	Rata	63%	Jayaraj <i>et al.</i> , 2009
<b>Cat L1 + Cat L2</b>	N	Oveja	60%	Piacenza <i>et al.</i> , 1999
<b>Cat L1 + Hb</b>	N	vaca	52%	Dalton <i>et al.</i> , 1996
<b>Cat L2 + Hb</b>	N	vaca	72%	Dalton <i>et al.</i> , 1996

N= nativa; R= recombinante; n.s.= no significativa; sig.= significativa

#### 1.4.3.2 Leucin aminopeptidasa (LAP)

Las aminopeptidasas constituyen un grupo de exopeptidasas muy diverso, con una amplia distribución en los tres reinos. Su denominación se debe a que catalizan la hidrólisis de los residuos aminoacídicos del extremo amino terminal de proteínas y péptidos. Juegan un rol importante en la homeostasis celular, crecimiento y desarrollo, y defensa (Matsui *et al.*, 2006).

La clasificación de este grupo es bastante compleja debido a la gran heterogeneidad de sus integrantes: se puede hacer en base al número de aminoácidos que eliminan; respecto a la especificidad con la cual remueven los residuos aminoacídicos; según la localización; por la susceptibilidad a la inhibición por la bestatina u otros inhibidores; por su pH óptimo y en base al contenido del ión metálico (Taylor, 1993).

Las LAPs pertenecientes a las familias M1 y M17 constituyen un grupo de metalopeptidasas ubicuas, dependientes del ión zinc, que catalizan la remoción de residuos de leucina de proteínas y péptidos. Además, tienen distintas especificidades de sustrato: son capaces de hidrolizar otros aminoácidos como la arginina, alanina, fenilalanina; la bestatina es su inhibidor específico (Taylor, 1993; McCarthy *et al.*, 2004; Matsui *et al.*, 2006). Los dominios catalíticos de M1 y M17 se diferencian por la presencia y ausencia del motivo metalopeptidasa HEXXH, respectivamente (Rawlings *et al.*, 2006). Asimismo, mientras las LAPs de la familia M17 son hexaméricas y unen dos cationes, las peptidasas M1 con actividad LAP no son hexaméricas y unen solo un catión. (Matsui *et al.*, 2006).

Se ha determinado la estructura tridimensional, mediante cristalografía de rayos X, para la LAP de la familia M17 del cristalino del bovino (bLAP) (Burley *et al.*, 1990), *Escherichia coli* (pepA) (Strater *et al.*, 1999) y *Plasmodium falciparum* (PfA-M17) (McGowan *et al.*, 2010). En todos los casos se observó la estructura homohexamérica característica de la enzima, organizadas en dos líneas de trímeros, donde cada monómero posee dos sitios de coordinación de metal localizados en el dominio carboxi terminal junto al sitio catalítico. Cada subunidad tiene dos sitios de unión al ión metal no equivalentes. Ambos iones participan en la unión al sustrato y la catálisis. Los iones magnesio o manganeso parecen estar presentes en las LAPs activas, debido a que estos iones son potentes activadores de las LAPs animales, vegetales y microbianas (Matsui *et al.*, 2006).

En 1998, Acosta y cols., aislaron una exopeptidasa del extracto soluble en detergente de *F. hepatica*, que de acuerdo a la caracterización ya descrita, la enzima comparte algunos requerimientos de los miembros de la familia M17, y la caracterizaron como leucin aminopeptidasa (LAP) debido a su especificidad preferencial sobre el sustrato sintético fluorogénico leucina-7-amino-4-metilcumarin (Leu-AMC). Métodos de histoquímica mostraron que la actividad LAP en este trematodo estaba asociada con las células epiteliales que cubren el tracto digestivo del parásito. Dada la muy baja actividad LAP en los PES se propuso que esta enzima participaría en el catabolismo de péptidos que son generados por la degradación de las proteínas sanguíneas y de los tejidos del hospedero dentro de la luz intestinal mediante endoproteinasas, como las catepsinas L; y que luego son absorbidos por las células epiteliales (Acosta *et al.*, 1998).

El primer ensayo de vacunación con LAP se realizó por nuestro laboratorio utilizando la proteína nativa (FhLAPn). Se inmunizaron ovejas con LAP sola o en combinación con Cat L1 y Cat L2 usando el adyuvante de Freund. Los resultados obtenidos fueron muy alentadores, ya que se logró una reducción significativa en el número de gusanos del 89.6% en el primero y 78% en el segundo, respecto al grupo control (Tabla XI). Además, se observó que el daño hepático de los animales inmunizados era mínimo (Piacenza *et al.*, 1999).

Por otra parte, a partir de una biblioteca de ADNc se logró clonar y expresar una leucin aminopeptidasa recombinante hexamérica, funcional de *F. hepatica* (FhLAPr), con características bioquímicas similares a la nativa. Asimismo, cuando se analizan por medio de espectrometría de masa MALDI-

TOF las distintas bandas en que se resuelve la proteína nativa inoculada previamente se observa que todas ellas corresponden a secuencias de la proteína recombinante expresada. Además, se determinó la expresión de la LAP no sólo en adultos sino también en huevos, metacercarias y JRDs; y por medio de inmunomicroscopía electrónica se confirmó su localización en el citosol de las células epiteliales del intestino de los gusanos adultos con especial predilección por las microvellosidades apicales (Acosta *et al.*, 2008).

Asimismo, se comprobó que la *FhLAPr* era reconocida por anticuerpos de animales inmunizados con la enzima nativa, y también se estudió el potencial inmunogénico de esta enzima recombinante en conejos en adyuvante de Freund, mostrando una fuerte respuesta de anticuerpos y una protección significativa del 78% frente al desafío con metacercarias (Tabla XI) (Acosta *et al.*, 2008).

Tabla XI. Reducción del número de gusanos en animales vacunados con *FhLAP*

Proteínas	Naturaleza	Huésped	Protección	Referencias
<b><i>FhLAPn</i></b>	N	Oveja	89.6%	Piacenza <i>et al.</i> , 1999
<b><i>FhCat L1 + FhCat L2 + FhLAPn</i></b>	N	Oveja	78%	Piacenza <i>et al.</i> , 1999
<b><i>FhLAPr</i></b>	R	Conejo	78%	Acosta <i>et al.</i> , 2008
<b><i>FhLAPr</i></b>	R	Oveja	86,9%	Maggioli <i>et al.</i> , 2011

N= nativa; R= recombinante

En función de los niveles de protección alcanzados por la LAP nativa en ovejas, y la protección inducida por la enzima recombinante en conejos, recientemente se realizó un amplio ensayo de vacunación en ovejas que fueron inmunizadas con *FhLAPr* combinada con adyuvantes de distinto tipo, algunos de uso comercial de forma subcutánea, y luego desafiadas oralmente con metacercarias (Maggioli *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos, a partir de este ensayo, fueron prometedores y concordantes con los alcanzados en ensayos anteriores. La inmunización con *FhLAPr* indujo una reducción significativa con todos los adyuvantes probados: La mayor protección lograda (86,9%) se obtuvo al administrar la *FhLAPr* con adyuvante hidróxido de aluminio (Alum). Con el adyuvante de Freund se obtuvo una reducción del 83,8%; el grupo Adyuvac 50 (adyuvante aprobado en nuestro país para el uso en rumiantes), 74,4%; en el grupo vacunado con Ribí, 49,8%; y el que obtuvo menor protección fue el grupo DEAE-D que presentó 49,5% de reducción, respecto al control. La reducción en el daño hepático y el número de gusanos no se vio acompañada con un cambio en el tamaño de éstos. Esto hace que *FhLAPr* sea, en la actualidad uno de los candidatos vacunales contra *F. hepatica* con mayor potencial comercial (Maggioli *et al.*, 2011).

Uno de los cuellos de botella que presenta el actual sistema de expresión y producción de la enzima recombinante con vistas al escalado, es la baja recuperación a la que se suman los costos asociados al uso de IPTG como inductor.

En vista del éxito obtenido en la inmunización de animales con la leucin aminopeptidasa recombinante, consideramos importante optimizar los niveles

de expresión de la proteína de forma que permita el escalado productivo a costos rentables pensando en su aplicación masiva por parte de los productores.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivos generales*

- Mejorar la productividad del sistema de expresión bacteriano de la LAP.
- Modificar el vector de expresión con vistas a desarrollar un protocolo de autoinducción.
- Profundizar en el conocimiento de otras actividades aminopeptidasas en *F. hepatica*.

### 2.2 *Objetivos específicos*

- Caracterizar actividades tipo aminopeptidasas de los extractos SOM y DOC de *F. hepatica*.
- Optimizar el protocolo de producción realizado por Acosta (2005) a diferentes niveles: tiempo de inducción, extracción de la proteína del paquete celular y autoinducción.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Reactivos

Las colonias de *E. coli* One TOP 10 se adquirieron en Invitrogen, así como la resina quelante Sepharose ProBond. El DTT fue comprado en Applichem, del mismo modo que el metanol y el Tris. El kit BCA se obtuvo de Pierce Thermo Scientific. El medio de cultivo Luria Bertani fue de BD. El detergente polisorbato de Tween 20 procedió de Biobasic Inc.. La leche descremada en polvo era de Molico. El ácido acético, etanol y el cloruro de sodio se obtuvieron de Dorwil. Los sustratos fluoróforos Met-AMC y Cys-AMC fueron adquiridos en Bachem. Los otros procedieron de Sigma, USA, de donde también se obtuvieron el resto de los reactivos.

### 3.2 Producción de la proteína recombinante

#### 3.2.1 Expresión de la FhLAPr

Se partió de una colonia de *E. coli* One hot TOP10 (Invitrogen) transformada con el plásmido recombinante pThio-FhLAP (Acosta *et al.*, 2008). Se cultivó en 5 mL de medio Luria Bertani (LB) con ampicilina (Amp), 100 µg/mL, a 37 °C en agitación a 250 rpm durante toda la noche. Luego el inóculo se trasvasó a un matraz de 250 mL conteniendo 50 mL de LB y se incubó en las mismas condiciones hasta que la densidad óptica (DO) a 600 nm fuera 0,6 medido en espectrofotómetro. Posteriormente, se indujo la expresión con el agregado de IPTG en una concentración final ( $C_i$ ) de 1 mM. El cultivo se incubó a 28 °C en agitación a 250 rpm por 2 hs.

#### 3.2.2 Lisis celular

El cultivo se centrifugó a 4000 rpm por 30 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante (SND) y el paquete celular se resuspendió en 25 mL de tampón de lisis (Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M, Imidazol 0,005 mM, pH 8,5). La lisis celular se llevó a cabo sonicando durante 1 min a intervalos de 30 seg, con pulsos de 40% poder en un homogeneizador de ultrasonido (Cole Parmer 4710). Inmediatamente se congeló rápidamente a -80 °C en baño de alcohol y se descongeló en baño a 37 °C. Luego de 3 ciclos de sonicado/ congelado/ descongelado, se centrifugó a 14000 rpm por 20 min a 4 °C y se descartó la fracción insoluble.

#### 3.2.3 Purificación de la enzima recombinante

La proteína recombinante se purificó utilizando cromatografía de afinidad. El sobrenadante obtenido de la centrifugación se aplicó a una columna de resina quelante Sepharose ProBond (Invitrogen) equilibrada con tampón de estabilización (Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 8,7). Luego se eluyó con un gradiente discontinuo de Imidazol a 20 mM y 50 mM, en tampón de estabilización, colectando fracciones de 1 mL. Previo a la aplicación de la muestra, se lavó la

columna con 10 mL de agua destilada, con el fin de eliminar el etanol; se cargó la matriz con 3 mL de sulfato de níquel 0,4 M; se lavó la columna con agua destilada y se la equilibró con tampón de estabilización.

### 3.2.4 Determinación de la concentración proteica

La concentración de proteína se midió por el método del ácido bicinonínico (BCA) con el kit comercial BCA Protein Assay Kit (Pierce) adaptado para microplaca según especificaciones del fabricante. Se realizó una curva Standard, con seroalbúmina bovina (BSA) en el rango 0,02-0,5 mg/ml.

### 3.2.5 Análisis de la purificación de *FhLAP* por SDS-PAGE

Con el fin de determinar la presencia y la pureza de las alícuotas obtenidas en la purificación de la *FhLAP* recombinante, se realizaron separaciones electroforéticas de proteínas en condiciones desnaturizantes utilizando geles al 12,5% de acrilamida (Laemmli, 1970). Las muestras se corrieron a intensidad constante. Como marcador de peso molecular se utilizó uno de amplio rango entre 205 KDa a 6,5 KDa (Sigma Marker Wide Range, Sigma). Las tinciones se realizaron con azul brillante Coomassie R 250 0,1% en solución decolorante (metanol: ácido acético: agua destilada (45:10:45 v/v)) ó por tinción con nitrato de plata al 0,1%, para el caso de muestras con menor concentración de proteínas.

### 3.2.6 Determinación de actividad enzimática de la *FhLAPr*

La actividad proteolítica de la *FhLAPr* se midió por fluorimetría utilizando amino-metilcomarina (AMC), acoplado a su sustrato, en este caso la leucina (Leu-AMC). En el ensayo lo que se determina es la cantidad de AMC liberada. Se realizó una curva estándar de AMC (0,1  $\mu$ M-1  $\mu$ M) que se corrió en paralelo durante el ensayo. Las muestras fueron incubadas durante 1 h a 37 °C con  $MnCl_2$  1 mM (cofactor) en tampón glicina 0,1 M pH 8,5, con el fin de activar la enzima. Luego se agregó Leu-AMC 20  $\mu$ M y se incubó durante 1 h a 37 °C. Se detuvo la reacción con el agregado de ácido acético 1,7M y se midió la liberación de AMC en un fluorímetro Sequoia-Turner M450 (Sequoia-Turner, Tokyo, Japan) a  $\lambda_{excitación}$  360 nm y  $\lambda_{emisión}$  430 nm. Una unidad enzimática se define, en este caso, como la liberación de 1mmol de AMC por minuto (1 U= 1 mmolAMC/min).

### 3.2.7 Inmunoblot

Para la inmunodetección de *FhLAP*, las fracciones que contenían actividad enzimática fueron sometidas a una electroforesis en gel de acrilamida 10%, SDS-PAGE, tal como fue descrito. Las proteínas separadas en función de su tamaño, se electrotransferieron en una unidad de electrotransferencia semi-húmeda (Atto, Japón) (Towbin *et al.*, 1979). Luego ésta se bloqueó en solución de bloqueo (tampón fosfato salino 1X (PBS) conteniendo detergente polisorbato 20 (Tween 20) y 5 % de leche descremada), durante 1 h a temperatura ambiente. Para detectar la proteína de interés, se incubó durante 1 h con anticuerpo anti-*FhLAPr* producido en conejo 1:2000, en solución de bloqueo. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces con solución PBS-Tween

20 por períodos de 5 min y se la incubó con anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina 1:4000 en solución de bloqueo durante 1 h. La membrana fue luego lavada como se describió anteriormente y luego se lavó 2 veces con PBS. Por último, se reveló con una solución que contenía azul de nitrotetraoilo (NBT) y 5-Bromo-4-cloro-3-indoil fosfato en tampón carbonato (pH 9,87, MgCl 1 mM). Para detener la tinción se agregó agua destilada a la membrana.

### ***3.3 Optimización de parámetros para la obtención de proteína soluble***

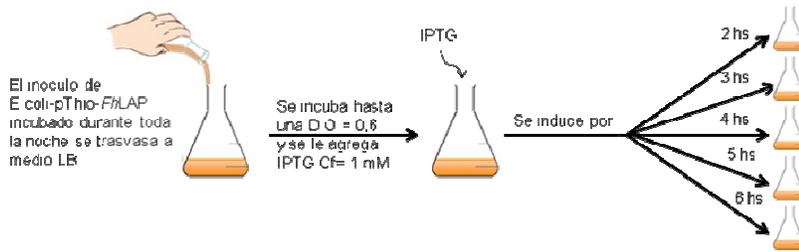
#### **3.3.1 Variación en el tiempo de inducción**

Inicialmente, se evaluó el efecto del tiempo de inducción sobre la cantidad de proteína soluble producida. Para ello se siguió el protocolo tal como se describe en 3.1.1 con la diferencia de que se varió el tiempo de inducción, luego del agregado de IPTG, de 2 hs a 6 hs, extrayendo 50 mL de cultivo cada 1 h. Una vez finalizada la etapa de inducción se separó el paquete celular por centrifugación y se lo trató como en 3.1.2 (Fig. 3.1 (a)).

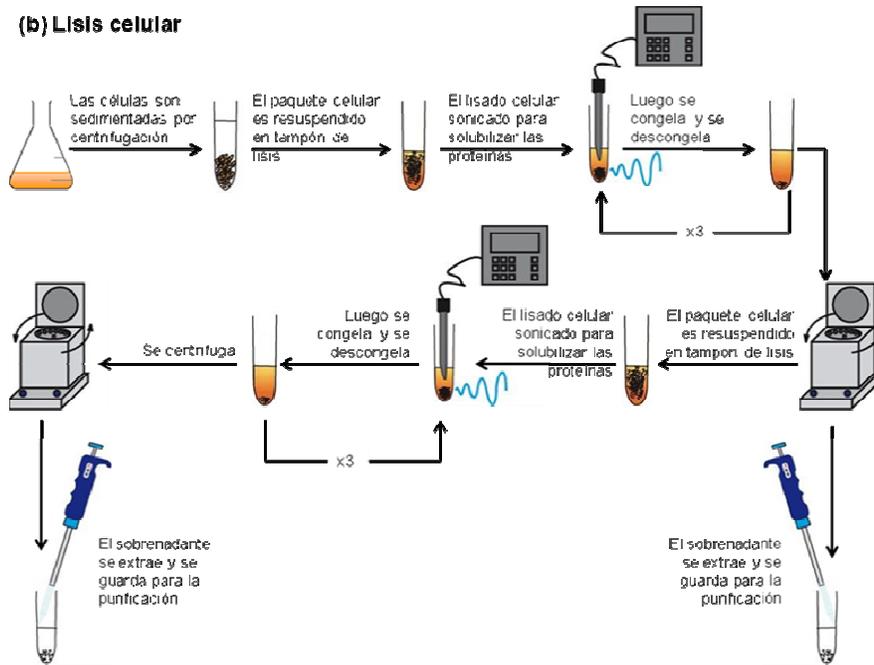
#### **3.3.2 Extracción de FhLAPr del paquete celular**

Con el fin de determinar la cantidad de proteína recombinante que se puede recuperar del material sedimentado se repitieron los pasos detallados en 3.1.2. Se realizó este tratamiento a cada uno de los paquetes celulares obtenidos para los diferentes tiempos de inducción. Luego de realizada la lisis celular, el sobrenadante obtenido de la centrifugación fue purificado como se detalla en 3.2.3 (Fig. 3.1 (b)).

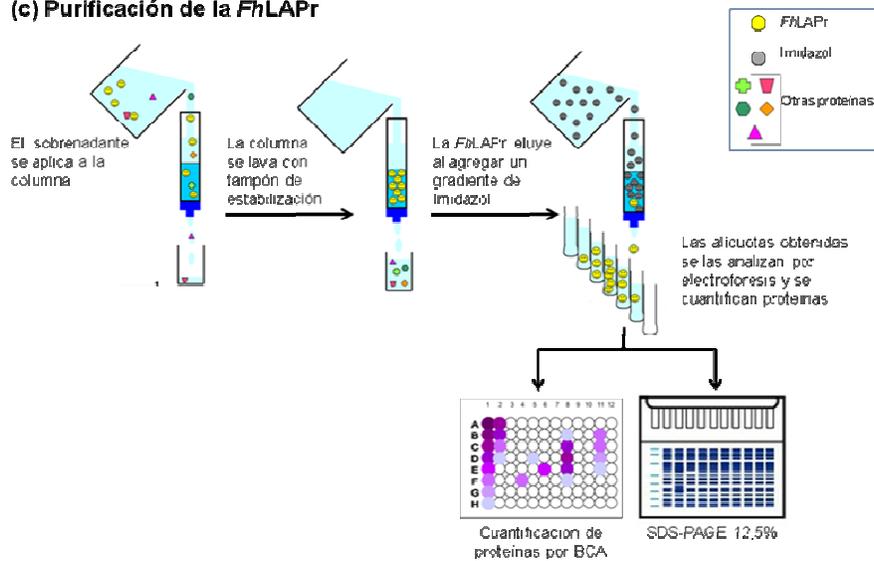
**(a) Expresión de la FhLAPr**



**(b) Lisis celular**



**(c) Purificación de la FhLAPr**



### 3.4 Cambio de vector de expresión para la autoinducción

#### 3.4.1 Amplificación por PCR

El ADNc que codifica para la *FhLAP* fue amplificado por PCR utilizando como molde el plásmido recombinante pThio-*FhLAP*. La mezcla de reacción y el programa utilizado en la PCR fue:

Reacción:

ADNc	1,0 µL
Tampón 10X	2,5 µL
DNTPs (10mM)	2,5 µL
Oligo 1 (10 µM)	1,0 µL
Oligo 2 (10 µM)	1,0 µL
Taq (5U/µL)	0,25 µL
H <sub>2</sub> O estéril c.s.p.	25 µL

Programa:

Temp(°C)	tiempo	Función
94	5 min	Desnaturalización
94	30 seg	Desnaturalización
50	1 min	Hibridación
72	2 min	Elongación
72	10 min	Elongación

X 35

Como oligonucleotidos se incluyeron:

*KpnI* (5' AATGGTACCTTATGGCGGCGTTGGCTGTGGGC 3')  
*SacI* (5' TTGAGCTCACTATTGAATCCCAGTCGTGGTA 3')

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0,7% en buffer TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH8,0). En cada gel se sembraron 5µL de producto por pocillo con 1 µL de buffer de carga 6X (0.25% xilencianol, 0.25% azul de bromofenol, 30% glicerol (v/v)). El gel se mantuvo a una diferencia de potencial de 80 V por 2 hs y las bandas se revelaron con bromuro de etidio (1 µg/mL). Dichas bandas se visualizaron utilizando un transiluminador UV. El fragmento amplificado tenía un peso molecular esperado y se purificó del gel utilizando kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 3.4.2 Clonación y expresión de la *FhLAPr* en el vector pET50b(+)

Con el objetivo de lograr que la proteína recombinante se exprese por autoinducción se clonó la *FhLAPr* en el vector de expresión pET50b(+) (Novagen) El fragmento amplificado digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* se clonó en el vector previamente digerido con las mismas enzimas de restricción (Fig. 3.2). Posteriormente, se transformaron *E. coli* XL1-Blue utilizando la mezcla de ligación. Para ello, se realizó una transformación por choque térmico, brevemente, se incubó 30 min en hielo y luego se indujo la entrada del producto de ligación por choque térmico a 42 °C por 2 min. Las células se recuperaron con la adición de 850 mL de medio LB y se incubaron 1 h a 37 °C con agitación a 250 rpm. Por último, se sembró la suspensión en medio LB agar suplementado con 50 µg/mL de kanamicina.

A partir de una colonia crecida en agar LB/Kan se realizó un cultivo de 2 mL en medio LB/Kan durante 12 hs a 37 °C y agitación a 250 rpm. Se colectaron las bacterias por centrifugación a 15.000 rpm por 5 min y se extrajo el ADN

plasmídico usando el QIAGEN Pasmid Mini kit (Qiagen). Esta extracción se basa en una lisis celular bajo condiciones básicas y posterior purificación de ácidos nucleicos por cromatografía de intercambio iónico. Para confirmar la presencia del plásmido recombinante de interés (pET-FhLAP) se realizó una digestión con las enzimas de restricción KpnI y SacI durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,7% para verificar la presencia del fragmento esperado (alrededor de 1500 pb).

Para expresar la FhLAP se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) utilizando el plásmido recombinante pET-FhLAP.

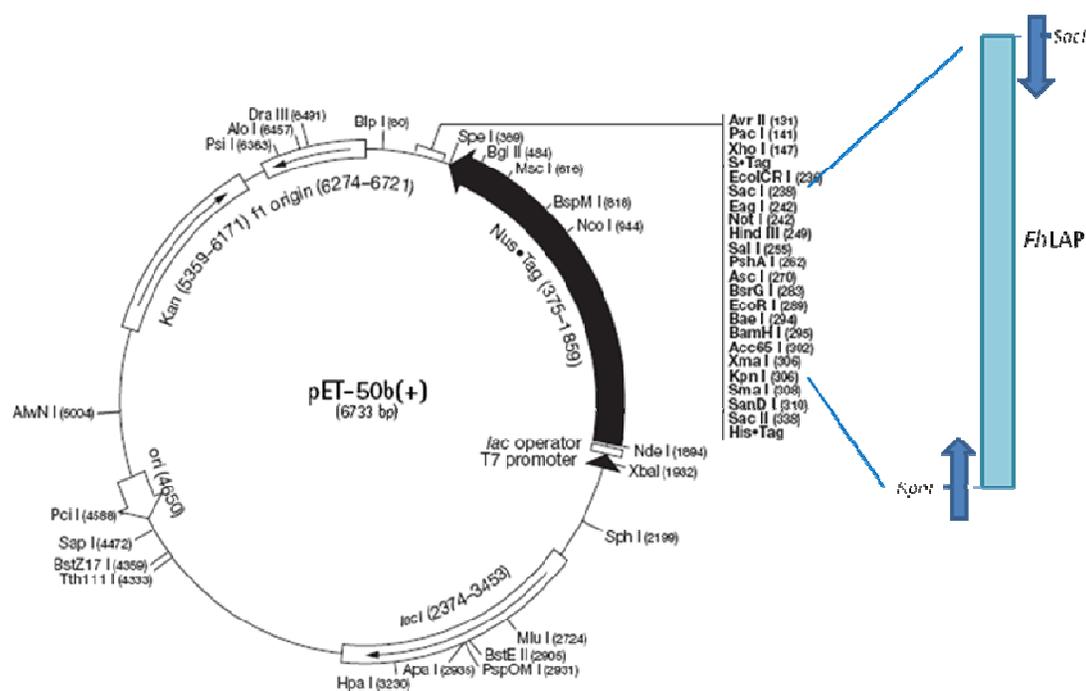


Figura 3.2. Estrategia de clonado y mapa del vector de expresión. La región codificante FhLAP fue amplificada por PCR con cebadores específicos y clonada en marco en el vector pET50b(+).

### 3.5 Ensayos autoinducción

#### 3.5.1 Agregado de lactosa y glicerol

Con el fin de conocer el efecto del agregado de lactosa y glicerol en la cantidad de FhLAPr producida, se realizaron ensayos de producción de la proteína (3.2), pero agregándole lactosa, 0,1 mM y 0,5 mM, o glicerol como detalla anteriormente Studier (2005). Posteriormente los extractos crudos fueron separados electroforéticamente por medio de electroforesis en gel de acrilamida al 12,5% de modo de observar, cualitativamente, diferencias en los niveles de expresión.

### 3.5.2 Fermentación en botellas de polietileno tereftalato (PET)

Se realizó la producción de *Fh*LAPr en iguales condiciones que en 3.1.2, con la diferencia que el cultivo se realizó en botellas de PET de 500 mL de uso comercial, previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio. Como control se utilizaron matraces tipo Erlenmeyer de 500 mL (Millard *et al.*, 2003). Para analizar la incidencia de este factor en la producción de proteína recombinante se realizaron electroforesis en gel de acrilamida al 12,5%.

## 3.6 Búsqueda de otras aminopeptidasas en extractos de *F. hepatica*

### 3.6.1 Extractos somáticos

Para la obtención del extracto somático (SOM), los gusanos adultos provenientes de hígados bovinos obtenidos en frigoríficos locales, fueron lavados varias veces con PBS y luego fueron homogenizados con PBS en un homogeneizador de vidrio. Posteriormente, el homogeneizado fue ultrasonificado en un baño de hielo por 30 min, con pulsos de 60 seg (20% poder) y pausas de 30 seg, utilizando un homogeneizador de ultrasonido (Cole Parmer 4710); luego se centrifugó a 21.000 g por 30 min a 4 °C, y el sobrenadante se conservó a -80 °C hasta su uso (Acosta *et al.*, 1998).

Para la obtención del extracto soluble en DOC se trataron los gusanos vivos y limpios con una solución de deoxicolato de sodio al 1% en glicina 0,15 M, NaCl 0,5 M, pH 9,0 a temperatura ambiente por 1 h bajo agitación suave; posteriormente se incubaron a 37 °C. y luego a 4 °C por 30 min, siempre manteniendo la agitación suave. Por último se retiraron los gusanos y el decantado se centrifugó 10.000 x g a 4 °C por 30 min. El DOC así obtenido se alícuotó y se guardó a -80 °C hasta su utilización. (Acosta *et al.*, 1998).

### 3.6.2 Sustratos y condiciones de ensayo

La presencia de actividades aminopeptidasas de los extractos SOM y DOC de *F. hepatica* fue analizada por fluorimetría utilizando sustratos comerciales compuestos por distintos aminoácidos acoplados a AMC. Los sustratos utilizados fueron Leu-AMC, Cys-AMC, Arg-AMC, Met-AMC, Tyr-AMC, Ala-AMC, Ile-AMC, Ser-AMC, Val-AMC, Pro-AMC y Asp-AMC. Los sustratos se mantuvieron en soluciones stock a 10 mM o 100 mM en dimetilformamida o agua destilada según corresponda, a -20 °C hasta su uso. Los ensayos se realizaron a una concentración final de sustrato de 20 µM utilizando 100 µg de proteínas del extracto, en tres tampones diferentes, tampón glicina 0,1 M pH 8,0, 1,0 mM MnCl<sub>2</sub>; tampón Tris-HCl 0,1 M pH 7,0; y 1,0 mM MnCl<sub>2</sub>, tampón fosfato 0,1 M pH 5,5, 1,0 mM MnCl<sub>2</sub>, en un volumen final de reacción de 1 mL. Las muestras fueron incubadas en un baño a 37 °C por 60 min en agitación y luego la reacción se detuvo con el agregado de 200 µL de ácido acético 1,7 M. Para cada ensayo se preparó una curva de calibración con el fluoróforo AMC en el rango de concentración de 0,1 µM a 1,0 µM. La cantidad de AMC liberada en la hidrólisis enzimática se midió en un fluorímetro (Sequoia-Turner, Tokyo, Japan) con longitudes de onda de excitación y emisión de 360 nm y 430 nm, respectivamente. Arbitrariamente, se definió que una unidad de actividad

enzimática como la cantidad que cataliza la liberación de 1 mmol de AMC por minuto a 37 °C.

### **3.6.3 Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática**

Se determinó el efecto de los inhibidores de proteasa sobre la *Fh*LAPr con el fin de diferenciar las eventuales inhibiciones en la actividad amidolítica observada sobre diferentes aminoácidos en los extractos DOC y somático. Para ello, se realizaron ensayos fluorimétricos a partir de una concentración de enzima de 0,0029 mM. Los inhibidores utilizados fueron bestatina 10  $\mu$ M y cisteína 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M. Los ensayos se realizaron en tampón glicina 0,1 M pH 8,0. La enzima fue pre-incubada a 37 °C por 10 min con el inhibidor y seguidamente se le agregó el sustrato y se lo dejó incubar por 60 min en baño a 37 °C en agitación. Posteriormente se procedió como en 3.6.2.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Producción y purificación de la proteína recombinante

El análisis por SDS-PAGE en geles al 12,5% de los extractos celulares totales de los cultivos inducidos con 1Mm IPTG revelaron una banda de peso molecular aparente de 67 kDa que corresponde a la *FhLAP* (56,4 kDa) conteniendo la tiorredoxina de *E. coli* (11.7 kDa) que contiene un cola de histidinas (Acosta et al., 2008). La banda se puede observar en la figura 4.1.

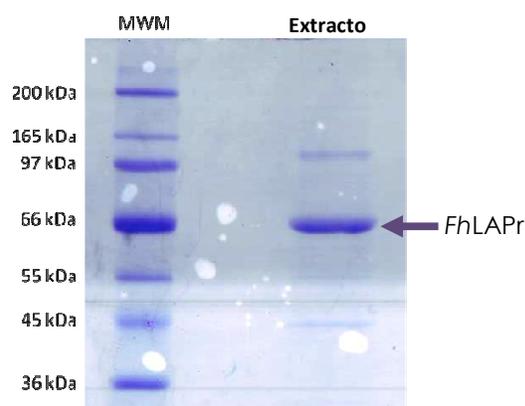


Figura 4.1. Análisis por SDS-PAGE 12,5% de la purificación de *FhLAPr* a partir del extracto libre de células por cromatografía de afinidad (Extracto). MWM: Marcador de peso molecular.

### 4.2 Optimización de parámetros para la obtención de proteína soluble

Para lograr el mejor aprovechamiento de la expresión de la *FhLAPr* se analizó la incidencia del tiempo de inducción, con IPTG 1 mM, en los niveles de expresión, y la capacidad de recuperar proteína del paquete celular obtenido luego de la lisis celular del cultivo. De los ensayos realizados se obtuvieron 10 muestras, las cuales pasaron, posteriormente, por un paso de purificación. De las 10 muestras, 5 corresponden a los sobrenadantes (S) obtenidos luego de la lisis celular de los cultivos de *E. coli* BL21 que expresan la *FhLAPr*, inducidos por IPTG 1 mM, a diferentes tiempos (2, 3, 4, 5 y 6 hs). A los paquetes celulares obtenidos luego del tratamiento de lisis se les realizó una nueva lisis celular con posterior centrifugación, constituyendo con los sobrenadantes obtenidos las otras 5 muestras (P). (Fig. 4.2(f)).

Luego de la aplicación por cromatografía de afinidad con  $Ni^{2+}$  de los sobrenadantes de los cultivos y los sobrenadantes de los paquetes celulares se midió la actividad enzimática de una alícuota eluida luego del agregado de imidazol 20 mM, para cada una de las muestras (Tabla XII). Al analizar los valores obtenidos se observa que en las primeras horas de inducción la actividad es mayor en el sobrenadante que en el paquete celular, y que a medida que se aumenta el tiempo de inducción esta tendencia se revierte y

se observa mayor actividad en el paquete celular. La inducción con IPTG por 6 hs genera un efecto negativo en la producción de *FhLAP*, ya que la actividad se ve notablemente disminuida en ambos extractos. A las 4 hs de inducción, si se suman las actividades obtenidas de los sobrenadantes de los cultivos y de los paquetes celulares se obtiene el valor más alto.

Tabla XII. Actividad enzimática (U/mg proteína) de la *FhLAPr*

Muestra	Horas de inducción	Actividad específica (U/mg)
S2	2	1170 ± 496
P2		670 ± 31
S3	3	1322 ± 71
P3		406 ± 18
S4	4	1178 ± 84
P4		1305 ± 66
S5	5	445 ± 26
P5		1466 ± 36
S6	6	243 ± 29
P6		127 ± 36

Al analizar la banda de 67 kDa, que corresponde a *FhLAPr* en los geles obtenidos luego del SDS-PAGE 12,5% (Fig. 4.2), se observa que en las primeras horas de inducción las bandas proteicas que corresponden al sobrenadante del cultivo son nítidas, mientras que aquellas que corresponden al paquete celular son borrosas. Sin embargo, a las 4 y 5 hs de inducción las bandas son similares tanto para el sobrenadante como para el paquete celular; y a las 6 hs de expresión las bandas proteicas se observan nítidas en el paquete celular y no tanto en el sobrenadante.

Si comparamos los valores de actividad enzimática obtenidos y la bandas proteicas observadas en el SDS-PAGE, salvo para la muestras de 6 hs, hay una concordancia entre la actividad y la nitidez de la banda proteica, por lo que la presencia de la proteína recombinante en los paquetes celulares de las muestras analizadas es activa.

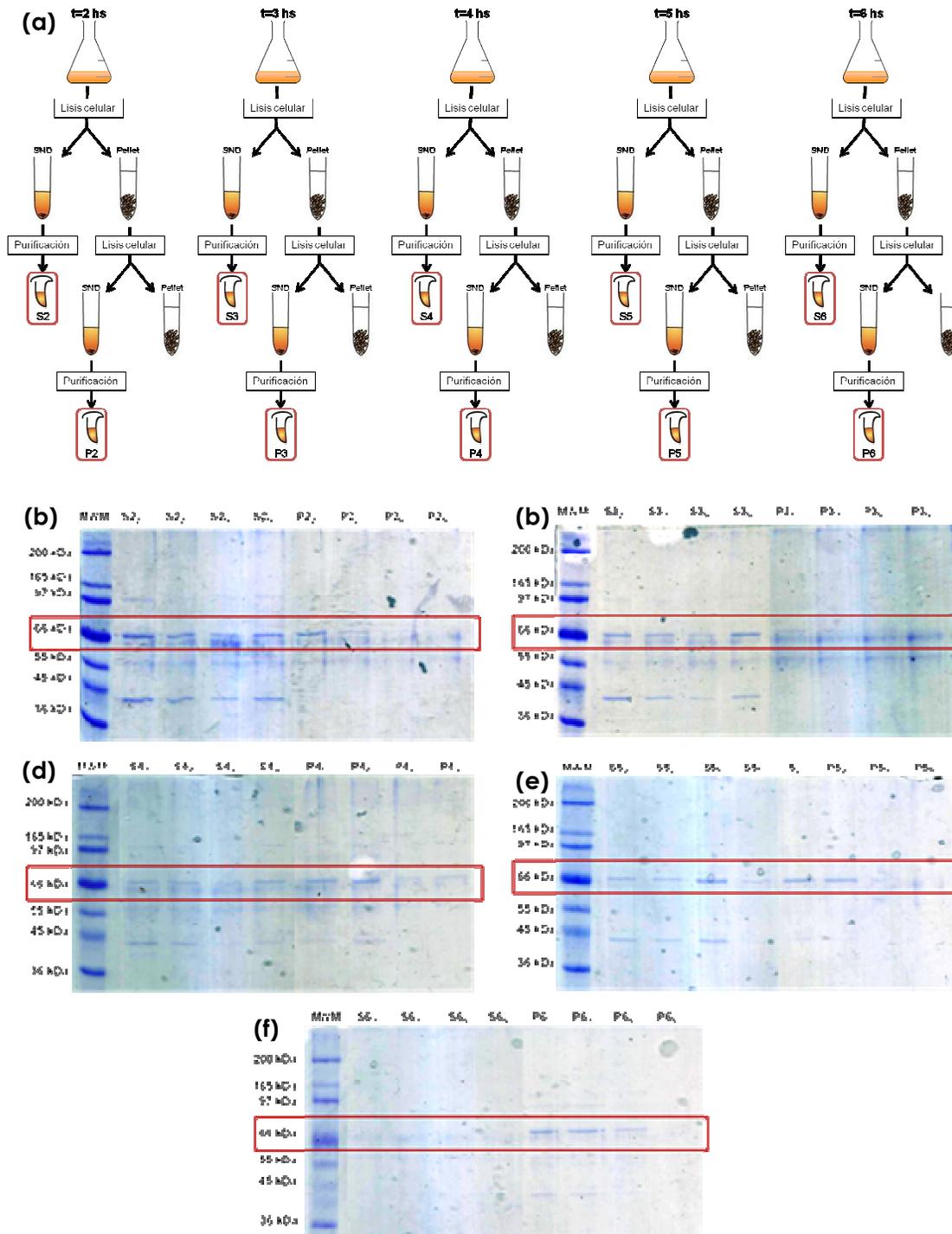


Figura 4.2. Análisis de la purificación de *FhLAPr* por SDS-PAGE 12,5%. Optimización del tiempo de inducción con IPTG 1 mM y extracción de proteína recombinante del paquete celular obtenido luego de la lisis celular. (a) Esquema del proceso de extracción de la *FhLAPr*. Las muestras recuadradas fueron aquellas que fueron sometidas al análisis de concentración de proteínas, actividad enzimática y SDS-PAGE 12,5%. (b) Ensayo de 2 hs de inducción; (c) Ensayo de 3 hs de inducción; (d) Ensayo de 4 hs de inducción; (e) Ensayo de 5 hs de inducción; (f) Ensayo de 6 hs de inducción.

### 4.3 Modificación del vector de expresión

Con el objetivo de producir la proteína de forma autoinducible para mejorar el rendimiento de producción de la proteína y reducir los costos mediante la eliminación del uso de IPTG se clonó en forma exitosa la región codificante para la *FhLAP* en el vector de expresión pET50b(+) (Fig. 4.3(a)). La proteína fue expresada a 28 °C, en presencia y ausencia de IPTG, pero al medir la actividad enzimática por fluorimetría del sobrenadante obtenido luego de la lisis celular, ésta fue menor a la esperada (Tabla XIII). Además se observó una mayor actividad en los cultivos en los cuales la expresión de la proteína recombinante fue inducida sin IPTG. Al visualizar los extractos (sobrenadante y paquete celular) en un SDS-PAGE 12,5% en condiciones reductoras se observó que la proteína se encontraba presente en el paquete celular totalmente precipitada (Fig. 4.3 (b)).

Tabla XIII. Actividad enzimática (U/mg proteína) de la *FhLAPr*

Muestra	Actividad específica (U/mg)
<i>FhLAP</i> -pET50 c/IPTG	66,0 ± 33,5
<i>FhLAP</i> -pET50 s/IPTG	122 ± 12,4

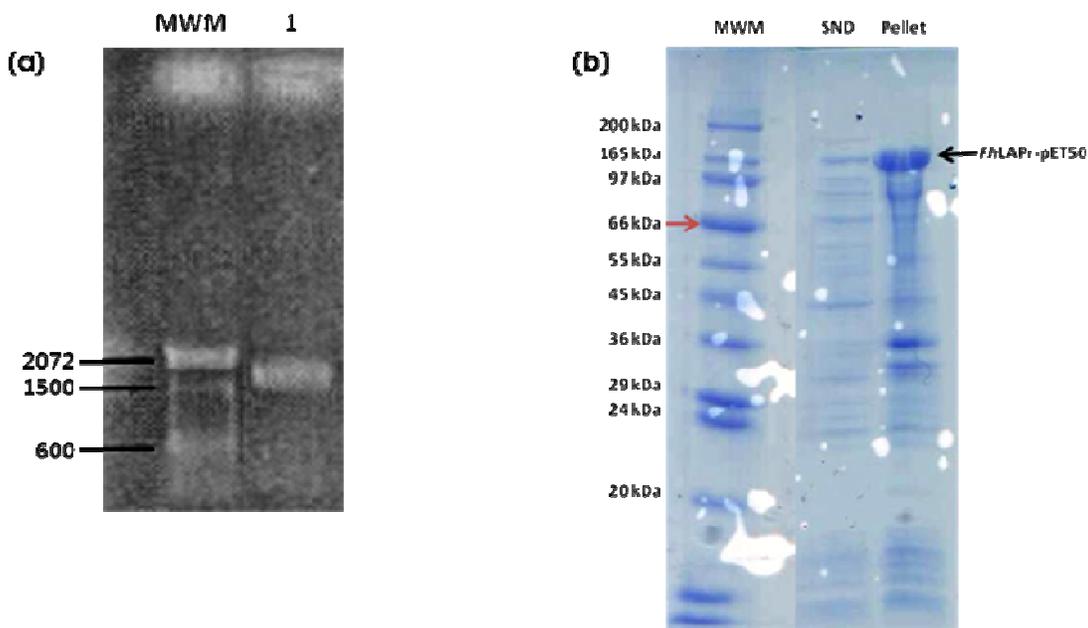


Figura 4.3. (a) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, línea 1) ADNc de la *FhLAPr* amplificado por PCR. (b) Análisis de la expresión de la *FhLAPr* por SDS-PAGE 12,5%. (SND) Extracto libre de células obtenido a partir de *E. coli* BL21 (D3) transformadas con el plásmido recombinante pET50-*FhLAP*; (Pellet) paquete celular obtenido por centrifugación luego de la lisis celular.

#### 4.4 Ensayos autoinducción

Con el propósito de reducir los costos de producción de la FhLAPr pensando en una posible producción a gran escala, se intentó expresar la proteína modificando el medio de cultivo, por el agregado de lactosa y/o glicerol, sin la adición de IPTG. Los ensayos de agregado de lactosa y glicerol, en cualquiera de sus concentraciones, no indujo la producción de la proteína recombinante obtenida; y en el caso de agregarla junto al IPTG, no se obtuvo un aumento en la cantidad de proteína obtenida, respecto al control en el que solo se indujo por el agregado de IPTG 1 mM (resultados no mostrados).

Millard y cols. (2003) demostraron que la expresión de proteínas en botellas de PET comerciales aumentaba significativamente, debido a que se produce un aumento en la aireación del cultivo durante la incubación. En nuestro caso la fermentación en botellas de PET de 500 mL no provocó un incremento en producción de FhLAPr obtenida, respecto al cultivo control realizado en matraz tipo erlenmeyer de vidrio.

#### 4.5 Ensayos fluorogénicos de actividad enzimática

Con el fin de detectar la presencia de otras aminopeptidasas en *F. hepatica*, se estudiaron los extractos SOM y DOC. La hidrólisis comparativa de los aminoácidos sintéticos acoplados a AMC a diferentes pH, para estos extractos, se muestran en las tablas XIV y XV, respectivamente.

Tabla XIV. Actividad (U/mg) específica del extracto SOM en tampones con diferentes pH utilizando diferentes sustratos fluorogénicos.\*

	<b>Glicina pH 8,5</b>	<b>Tris-HCl pH 7,0</b>	<b>Fosfato pH 5,5</b>
<b>L-Leu-AMC</b>	1904,6 ± 83,2	160,9 ± 4,9	6,4 ± 0,1
<b>L-Cys-AMC</b>	678,1 ± 59,7	245,4 ± 1,4	8,6 ± 0,6
<b>L-Arg-AMC</b>	547,0 ± 25,7	114,3 ± 2,8	5,3 ± 0,1
<b>L-Met-AMC</b>	448,9 ± 88,1	76,3 ± 5,2	7,3 ± 0,3
<b>L-Ala-AMC</b>	37,6 ± 3,7	21,7 ± 0,5	0
<b>L-Ile-AMC</b>	24,7 ± 3,4	15,9 ± 0,5	5,5 ± 0,3
<b>L-Tyr-AMC</b>	67,4 ± 1,2	26,4 ± 1,3	6,0 ± 0,1
<b>L-Pro-AMC</b>	9,8 ± 2,4	23,7 ± 1,5	5,7 ± 0,3
<b>L-Ser-AMC</b>	24,0 ± 1,3	14,3 ± 0,5	0
<b>L-Val-AMC</b>	17,9 ± 0,2	14,3 ± 0,1	7,6 ± 0,3
<b>L-Asp-AMC</b>	0	11,3 ± 0,3	0

\*Cada sustrato fue probado a una concentración de 20 µM y se utilizaron 100 µg de proteína para cada ensayo. Cada valor representa el promedio de muestras por duplicado incubadas en forma separada. Los valores están expresados en U/mg proteína.

Tabla XV. Actividad específica (U/mg) del extracto soluble al deoxicolato (DOC) de *F. hepatica* en tampones con diferentes pH utilizando diferentes sustratos fluorogénicos.\*

	<b>Glicina pH 8,5</b>	<b>Tris-HCl pH 7,0</b>	<b>Fosfato pH 5,5</b>
<b>L-Leu-AMC</b>	1401,0 ± 428,3	300,7 ± 1,4	6,7 ± 0,6
<b>L-Cys-AMC</b>	637,2 ± 5,9	328,7 ± 0,5	10,3 ± 0,3
<b>L-Arg-AMC</b>	1226,2 ± 107,7	283,4 ± 2,4	6,5 ± 0,1
<b>L-Met-AMC</b>	510,4 ± 1,5	149,3 ± 6,0	9,2 ± 0,3
<b>L-Ala-AMC</b>	49,9 ± 0,5	17,9 ± 0,2	5,5 ± 0,3
<b>L-Ile-AMC</b>	36,4 ± 2,6	19,2 ± 0,5	7,1 ± 0,6
<b>L-Tyr-AMC</b>	94,1 ± 0,2	37,0 ± 1,1	9,2 ± 0,6
<b>L-Pro-AMC</b>	13,6 ± 3,9	13,7 ± 0,1	6,2 ± 0,7
<b>L-Ser-AMC</b>	28,6 ± 1,2	18,4 ± 0,6	6,7 ± 0,6
<b>L-Val-AMC</b>	24,1 ± 9,0	16,6 ± 0,6	8,2 ± 0,3
<b>L-Asp-AMC</b>	0	15,0 ± 1,7	20,7 ± 8,8

\*Cada sustrato fue probado a una concentración de 20  $\mu$ M y se utilizaron 100  $\mu$ g de proteína para cada ensayo. Cada valor representa el promedio de muestras por duplicado incubadas en forma separada. Los valores están expresados en U/mg proteína.

En general, las actividades enzimáticas disminuyen a medida que disminuye el pH, con excepción de las Asp-AMC que tiende a aumentar al disminuir el pH. Además, a pH ácido las actividades de las amidolíticas estudiadas tienden a disminuir drásticamente. Los sustratos que mayor actividad mostraron son Leu, Cys, Arg y Met en tampón a pH 8,5 y 7,0.

La actividad sobre Tyr reveló mayor actividad que la esperada, para todos los tampones, sobre todo para el extracto DOC. Debido a que el clivaje de la Tyr-AMC por el extracto se aleja lo suficiente del perfil de hidrólisis de la FhLAP se consideró analizar la existencia de una sensibilidad diferencial a la bestatina y a la cisteína, dos compuestos que actúan como inhibidores, que pudiera confirmar la presunción de que exista una aminopeptidasa diferente a la FhLAP en este extracto. La inhibición provocada para ambos sustratos sigue un comportamiento similar. La actividad enzimática se ve inhibida casi completamente por la bestatina 10 mM. Respecto a la cisteína, a medida que se aumentó la concentración se observó un mayor efecto inhibitorio, pero el efecto que se obtuvo no fue significativo para ninguno de los dos casos. En la tabla XVI se resumen los resultados, expresados como unidades de actividad remanente frente a un control sin inhibidor.

Por último, la Cys-AMC, mostró mayor actividad que la Leu en los tampones Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0 y tampón fosfato 0,1 M, pH 5,5, para ambos extractos.

Tabla XVI. Efecto de diferentes inhibidores en la actividad enzimática (U/ mg proteína)

	Leu-AMC		Tyr-AMC	
	Act. Enz	% Act. Remanente	Act. Enz	% Act. Remanente
<b>s/inhibidor</b>	505,2 ± 85,2	100	370,2 ± 44,0	100
<b>Bestatina 10mM</b>	10,8 ± 2,0	2,1	8,9 ± 3,7	2,4
<b>Cys 10mM</b>	415,9 ± 85,2	82,3	378,5 ± 2,9	102,2
<b>Cys 100mM</b>	382,6 ± 108,7	75,7	314,1 ± 2,9	84,9

## 5. DISCUSIÓN

La fascioliasis, enfermedad provocada por el trematodo *Fasciola hepatica*, causa pérdidas económicas millonarias a nivel mundial y en las últimas décadas el aumento de casos en humanos ha ocasionado que esta patología sea considerada como una zoonosis emergente por la OMS (Mas-Coma, 2005a; Mas-Coma *et al.*, 2005b). Actualmente, la fascioliasis en rumiantes se controla principalmente mediante la administración de drogas antihelmínticas y el manejo del pastoreo. La aparición de resistencia al TCBZ y la rápida propagación de esta ineffectividad (Fairweather & Boray, 1999a) hacen que la búsqueda de una vacuna contra este parásito sea prioritaria.

A pesar de muchos años de investigación, aún no existe una vacuna comercial. Los intentos para crear un candidato alternativo comenzaron en los años 50, mediante ensayos que consistían en administrarles a modelos animales, varios extractos del gusano como el extracto somático crudo y antígenos del producto excreción/secreción (revisado en Haroun & Hillyer, 1986). Posteriormente, las investigaciones se enfocaron especialmente hacia ensayos donde se administraban vacunas atenuadas por irradiación. En la actualidad la búsqueda se centra en antígenos definidos de tipo proteico, (revisado por Spithill *et al.*, 1999). Dentro de estos candidatos se encuentran las proteasas de los parásitos, que juegan un rol principal en el desarrollo, ya que facilitan la invasión de los tejidos del huésped, colaboran en la digestión de las proteínas del huésped, ayudan al parásito a evadir la respuesta inmune del huésped, entre otros (Tort *et al.*, 1999; Dalton *et al.*, 2003a)

Los estudios de vacunas con proteasas nativas y recombinantes de varias de estas enzimas (Cat L1, L2 y L5, Cat B) estudiadas solas o en combinación, en distintos modelos, han demostrado niveles significativos de protección en algún momento. (Golden *et al.*, 2010; Mozos Mora *et al.*, 2010; Jayaraj *et al.*, 2009; Reszka *et al.*, 2005; Piacenza *et al.*, 1999; Dalton *et al.*, 1996; Wijffels *et al.*, 1994) (Spithill & Dalton, 1998). Entre estos candidatos se encuentra la LAP que induce niveles significativos de resistencia a infecciones de *F. hepatica* en oveja (nativa) y conejo (recombinante) (Piacenza *et al.*, 1999; Acosta *et al.*, 2008; Maggioli *et al.*, 2011). Su efectividad protectora involucra la reducción del daño hepático y el número de gusanos. El mecanismo de acción que protege aún no está claro, pero probablemente se relacione con el bloqueo en los últimos pasos de la degradación de péptidos que impedirían la generación de aminoácidos libres que el gusano emplea con fines anabólicos.

Los estudios de caracterización de las LAPs en helmintos han aumentado en la última década, debido a potencial efectividad como candidato vaccinal. En el trematodo *Schistosoma mansoni* se han identificado dos leucin aminopeptidasas, *SmLAP1* y *SmLAP2*; la primera fue caracterizada y clonada por el McCarthy y cols. (2004) que identificaron su participación en la emergencia del miracidio, ya que era inhibido en presencia de bestatina; además de estar involucrado en las etapas finales del catabolismo de la hemoglobina del huésped. Asimismo, *SmLAP2* fue clonada por Rinaldi y cols. (2009), quienes, mediante técnicas de ARN interferencia (ARNi), detectaron

que ambas LAPS exhiben perfiles de expresión temporal diferentes durante el ciclo biológico de *S. mansoni*; ambas se expresan en el proceso de eclosión de los huevos, sin embargo *SmLAP2* también se expresa en miracidio y en esporocito. Por otra parte, se purificó y caracterizó la LAP de *Fasciola gigantica* (Mohamed et al., 2009). En el caso de *Paragonimus westermani*, ensayos revelaron características similares a *S. mansoni* tanto en su localización como en la función que cumple (Song et al., 2008).

En los intentos de definir la presencia de exopeptidasas de tipo amino y dipeptidil peptidasas en los extractos de *F. hepatica* fue que se identificó la LAP, y desde fines de los años 90 nuestro laboratorio ha realizado estudios sobre la LAP como candidato vaccinal. Acosta y cols. (1998) lograron aislar y caracterizar el perfil amidolítico de la *FhLAP* a partir del extracto soluble en deoxicolato de gusanos adultos. Posteriormente, Piacenza y cols. (1999) realizaron un ensayo de vacunación en ovejas Corriedale empleando la *FhLAP* nativa sola o en combinación con las catepsinas L1 y L2. Los resultados obtenidos en esa oportunidad fueron muy alentadores, ya que se obtuvo un 89% de protección, respecto al control, en un modelo de animal que carece o posee muy poca resistencia natural al parásito. Posteriormente, Acosta y cols. (2008), comunicaron el clonado y expresión funcional de una leucin aminopeptidasa de *F. hepatica* y demostraron la identidad de la proteína recombinante con la *FhLAP* nativa empleada inicialmente como antígeno. Asimismo la inoculación subcutánea en conejos de la *FhLAPr* en combinación con adyuvante de Freund (completo más incompleto) indujo una intensa respuesta de tipo IgG asociada con altos niveles de protección (78%).

Con estos antecedentes es que recientemente se realizaron ensayos de vacunación en ovejas. Para evaluar el potencial protector de la *FhLAPr* frente a *F. hepatica*, ovejas fueron inmunizadas con *FhLAPr*, de forma subcutánea, y luego se las desafió oralmente con metacercarias del parásito. Simultáneamente, diversos adyuvantes fueron probados con el fin de evaluar cuál es el inmunopotenciador más adecuado (Maggioli et al., 2011). Los resultados obtenidos, a partir de este ensayo, fueron prometedores y concordantes con los alcanzados en ensayos anteriores. La inmunización con *FhLAPr* indujo una reducción significativa con todos los adyuvantes probados: La mayor protección lograda (86,9%) se obtuvo al administrar la *FhLAPr* con hidróxido de aluminio (Alum). Con el adyuvante de Freund se obtuvo una reducción del 83,8%; el grupo Adyuvac 50, 74,4%; en el grupo Ribi, 49,8%; y el que obtuvo menor inmunoprotección fue el grupo DEAE que presentó 49,5% de reducción, respecto al control. Esto hace que la vacuna basada en *FhLAPr* sea, en la actualidad uno de los candidatos con mayor potencial (Maggioli et al., 2011).

Por la efectividad comprobada de la *FhLAPr* como candidato vaccinal, el trabajo se orientó en optimizar los niveles de expresión de la proteína recombinante como forma de mejorar la productividad y por tanto disminuir los costos pensando en el posible escalado. En el protocolo original se indujo la expresión de la proteína recombinante con una concentración final de IPTG de 1,0 mM por 2 hs en agitación a 250 rpm y la *FhLAPr* se obtenía realizando solo un ciclo de lisis celular (ver 3.1.2 en materiales y métodos), alcanzándose así 3,5 mg/L de proteína (Acosta et al., 2008). Es por ello que los factores

evaluados fueron el aumento en el tiempo de inducción con IPTG y la recuperación de la *FhLAPr* del material sedimentado en el paquete celular.

Al evaluar el efecto del aumento del tiempo de inducción se observó que entre las 2 y las 3 hs se obtiene la mayor actividad en el sobrenadante. Asimismo, a las 4 hs de incubación, tiempo máximo en que se favorece la expresión de la proteína, fue el tiempo en el que se generó la mayor actividad enzimática si se recupera la proteína del paquete celular. El agregado de una etapa de lisis del paquete celular permitió obtener buenos niveles de la enzima activa y reduciría los costos de producción.

Optimizar el tiempo de inducción con IPTG es un factor de vital importancia a la hora de mantener la solubilidad de la proteína recombinante. Una limitación frecuente de la producción de proteína recombinante en bacterias es la formación de agregados proteicos insolubles conocidos como cuerpos de inclusión que habitualmente se forman durante la sobreexpresión de genes clonados. Desde el punto de vista molecular, estos cuerpos se forman debido a interacciones hidrofóbicas inespecíficas entre los polipéptidos (Ventura & Villaverde, 2006). El resultado de este fenómeno es una reducción dramática en la recuperación de la proteína. El nivel de agregación proteica está determinado por una combinación de parámetros que incluyen la composición del medio de cultivo, la temperatura de crecimiento, la velocidad de producción y el tiempo de inducción con IPTG (Strandberg & Enfors, 1991). En nuestro caso, el efecto del aumento en el tiempo de inducción, hasta 6 hs, con IPTG pudo haber provocado un incremento en los niveles de expresión proteica, lo que a su vez pudo haber ocasionado la precipitación de la proteína recombinante. Esto se vio reflejado en una marcada disminución en los valores de actividad enzimática.

Otra de las posibilidades para disminuir costos es lograr que la proteína recombinante se exprese por autoinducción, ya que de esa manera se evita el uso de IPTG, un inductor de alto costo. La clonación de genes que codifican para proteínas en vectores pET (Novagen), permite la autoinducción, debido a que la región que codifica para la proteína se encuentra bajo control de un promotor T7, el cual es reconocido específicamente por T7 ARN polimerasa. La secuencia que codifica para la T7 ARN polimerasa está presente en el cromosoma bajo el control del promotor inducible lacUV5, en huéspedes como BL21 (Studier, 2005). El vector pET50b(+) está diseñado para clonar y expresar a altos niveles proteínas fusionadas con la proteína NusA (Nus•Tag™), compuesta por 495 aminoácidos. El hecho de que la proteína expresada por el gen en el vector pET50b(+) estuviera precipitada pudo deberse al hecho de que la proteína fusionada es muy grande y se podría estar favoreciendo un plegamiento incorrecto de la *FhLAPr*. Por otra parte, el agregado de proteínas de fusión a la proteína blanco también puede afectar la solubilidad de la proteína recombinante y el plegamiento de la construcción resultante (Neubauer *et al.*, 2006). Para solucionar este problema se podría, en un futuro, realizar una nueva construcción utilizando un vector de expresión pET que incorpore en uno de los extremos de la *FhLAPr* una cola de histidinas para facilitar su purificación.

Debido a que la clonación del gen *FhLAP* en los vectores pET no ocurrió de acuerdo a lo esperado, se estudió el efecto del agregado de glicerol y lactosa en los niveles de expresión de proteína recombinante en el vector pThio-HisC. La composición nutricional del ambiente es una de los principales determinantes del tipo de enzimas catabólicas que van a ser sintetizadas por *E. coli*. Studier (2005) demostró la autoinducción de proteínas en sistemas de expresión T7 inducibles por IPTG mediante la modificación del medio de cultivo. La lactosa a concentraciones de alrededor del 0,002% genera un aumento en la inducción sin modificar la densidad del cultivo. Por otro lado, los medios de cultivo suplementados con glicerol crecen a mayores densidades antes y después de la inducción, respecto a aquellos con lactosa como fuente de carbono y energía (Studier, 2005). En nuestro caso, el hecho de que no utilizáramos un vector de expresión adecuado pudo afectar la obtención de la *FhLAPr* por autoinducción. Tampoco se observó un aumento en los niveles de inducción, al incorporar IPTG, en medios de cultivo que contuvieran glicerol. Ensayos posteriores utilizando vectores de expresión tipo pET, deberían ser evaluados en un futuro. El hecho de lograr inducir la proteína sin el uso de IPTG sería un gran avance a la hora de producirla a gran escala.

Asimismo, Millard y colaboradores (2003) comprobaron que el uso de botellas de PET de tipo comercial empleadas como frascos para cultivo generaban un aumento en la densidad celular debido a que estos envases tienen en el fondo irregularidades que provocan un aumento en la aireación de los cultivos. A diferencia de los ensayos realizados por estos autores, donde se utilizaron botellas de 2 L, se utilizaron recipientes de 500 mL. La disminución del diámetro del envase pudo haber afectado los niveles de aireación, ya que el control (matraz) de igual volumen era más ancho, lo que pudo haber dejado sin efecto el cambio.

### 5.1 Búsqueda de nuevas aminopeptidasas

La proteólisis intracelular es responsable del eficiente recambio proteico y la remoción de aquellas proteínas dañadas. Además, la vía de degradación de las proteínas citosólicas regula varios procesos celulares (Nandi *et al.*, 2006). Uno de los principales actores durante la degradación proteica intracelular son las aminopeptidasas, proteínas que se encuentran ampliamente distribuidas en los 3 reinos. Las aminopeptidasas catalizan la hidrólisis de aminoácidos del extremo amino terminal de proteínas y péptidos (Taylor, 1993).

Debido al hecho de que la *FhLAP* ha demostrado tener gran potencial como antígeno vaccinal en *F. hepatica* es que se realizaron ensayos en búsqueda de nuevos candidatos aminopeptídicos. Los resultados demuestran que el SOM y el DOC de *F. hepatica* contienen hidrolasas con diferentes especificidades que pueden jugar un rol importante en la relación huésped parásito. A pesar de que se observó actividad endopeptidasa en los tres rangos de pH, la actividad fue óptima a pH básico. De los 11 sustratos probados, Leu, Cys, Arg y Met fueron los que obtuvieron mayores valores de actividad, en ambos extractos. Acosta y cols. (2008) demostraron que la enzima purificada, tanto nativa como recombinante, mostró la óptima actividad frente a Leu y además tiene un amplio espectro de especificidades, hidrolizando otros aminoácidos alifáticos no polares (Thr), que contienen sulfuro

(Met), polares (Cys) y básicos (Arg), con una afinidad de la enzima por el sustrato ( $K_M$ ) muy baja y una alta eficiencia catalítica. El hecho de que se diera un comportamiento similar en ambas actividades no descarta que se trate de dos aminopeptidasas diferentes, ya que podrían tener similar perfil y no ser la misma *FhLAP*.

A diferencia con los resultados obtenidos para la *FhLAP*, el extracto DOC reveló mayor actividad Tyr por lo que podríamos tener en ese extracto una aminopeptidasa que libera residuos tirosina. Debido a que el clivaje de Tyr por el extracto se aleja lo suficiente del perfil de hidrólisis de la *FhLAP* fue que se analizó si existía una sensibilidad diferencial a la bestatina y la cisteína que pudiera confirmar esta presunción. La inhibición provocada para ambos sustratos sigue un comportamiento similar. La actividad enzimática se ve inhibida casi completamente por la bestatina 10 mM. Respecto a la cisteína, a medida que se aumentó la concentración se observó un mayor efecto inhibitorio, pero el efecto que se obtuvo no fue significativo para ninguno de los dos casos, lo cual se aparta del comportamiento observado previamente. Una tirosin aminopeptidasa de osteoclastomas humanos fue purificada y caracterizada, demostrando que es una metalopeptidasa compuesta por dos subunidades y que es inhibida por agentes quelantes y bestatina (Page & Warburton, 1994). Futuras investigaciones son necesarias para confirmar la presencia de esta aminopeptidasa, su participación en la interacción huésped-parásito y su efectividad como candidato vaccinal.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La proteína recombinante *FhLAP* fue expresada y purificada, mostrando altos niveles de actividad.

La recuperación de proteína del paquete celular y la inducción de la leucin aminopeptidasa con IPTG por 4 hs incrementó la cantidad de proteína obtenida.

Se logró expresar la proteína recombinante en un sistema de expresión bacteriano autoinducible, pero sin tener éxito a la hora de obtenerla activa. El cambio de vector de expresión a uno autoinducible permitirá la obtención de inmunoprotector a bajo costo, facilitando así su potencial comercialización.

La lactosa y el glicerol no provocaron efecto alguno en la expresión de la proteína recombinante en el vector de expresión pThio-HisC.

Por otra parte, la inducción de la *FhLAPr* en botella de PET de 500 mL no favoreció la expresión.

Los ensayos de fluorimetría de los extractos SOM y el DOC del gusano adulto mostraron altos niveles de actividad para Leu, Cys, Arg y Met, lo que confirmaron la presencia de la *FhLAPn* y además se observó un comportamiento de la Tyr-AMC, el cual habría que investigar en detalle para confirmar su capacidad inmunogénica.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Acosta D (1991) Epidemiología y control de *Fasciola hepatica* en el Uruguay. en *Bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay*, pp. 233-236 [A Nari and C Fiel, editors]: Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur.

Acosta D (2005) Desarrollo de una vacuna recombinante para el control de la fascioliasis en rumiantes. Tesis de Maestría; UdelaR.

Acosta D, Cancela M, Piacenza L, Roche L, Carmona C & Tort JF (2008) *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol Biochem Parasitol* **158**, 52-64.

Acosta D, Cristina J, Uriarte G, Lanzeri S & Gama S (1989) Estudio preliminar sobre la resistencia conferida a bovinos por metacercarias irradiadas de *Fasciola hepatica* en Uruguay. *Veterinaria* **25**, 12-20.

Acosta D, Goñi F & Carmona C (1998) Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *J Parasitol* **84**, 1-7.

Almeida MS, Torloni H, Lee-Ho P, Vilar MM, Thaumaturgo N, Simpson AJ & Tendler M (2003) Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. *Parasite Immunol* **25**, 135-137.

Alvarez-Sanchez MA, Mainar-Jaime RC, Perez-Garcia J & Rojo-Vazquez FA (2006) Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet Rec* **159**, 424-425.

Alvarez LI, Mottier ML & Lanusse CE (2007) Drug transfer into target helminth parasites. *Trends Parasitol* **23**, 97-104.

Anderson JC, Hughes DL & Harness E (1975) The immune response of rats to subcutaneous implantation with *Fasciola hepatica*. *Br Vet J* **131**, 509-518.

Andrews SJ (1999) The Life Cycle of *Fasciola hepatica*. In *Fasciolosis*, pp. 1-29 [JP Dalton, editor]. Wallingford: CABI Publishing.

Armour J (1975) The epidemiology and control of bovine fascioliasis. *Vet Rec* **96**, 198-201.

Armour J & Dargie JD (1974) Immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. Successful transfer of immunity by lymphoid cells and by serum. *Exp Parasitol* **35**, 381-388.

Armour J, Dargie JD, Doyle JJ, Murray M, Robinson P & Rushton B (1974) Immunization against fascioliasis. In *Proc Third Int Cong Parasitol*, pp. 494. Munich.

Barrett AJ & McDonald JK (1986) Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem J* **237**, 935.

Beckham SA, Piedrafita D, Phillips CI, Samarawickrema N, Law RH, Smooker PM, Quinsey NS, Irving JA, Greenwood D, Verhelst SH, Bogyo M, Turk B, Coetzer TH, Wijeyewickrema LC, Spithill TW & Pike RN (2009) A major cathepsin B protease from the liver fluke *Fasciola hepatica* has atypical active site features and a potential role in the digestive tract of newly excysted juvenile parasites. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1601-1612.

Behm CA & Sangster NC (1999) Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In *Fasciolosis*, pp. 185-224 [JP Dalton, editor]. Wallingford: CABI Publishing.

Bolbol AS, Hammond JA & Sewell MMH (1978) The response of rabbits to repeated infections with *Fasciola hepatica*. *Vet Sci Comm* **2**, 231-235.

Boray JC (1967) The effect of host reaction to experimental *Fasciola hepatica* infections in sheep and cattle. In *Proc Third Int Conf World Assoc Adv Vet Parasitol*, pp. 119-122 [EJL Soulsby, editor. Elwert, Marburg, Germany.

Boray JC (1969) Experimental fascioliasis in Australia. *Adv Parasitol* **7**, 95-210.

Boray JC (2007) Liver fluke disease in sheep and cattle. *Primefact* **446**.

Brennan GP, Fairweather I, Trudgett A, Hoey E, McCoy, McConville M, Meaney M, Robinson M, McFerran N, Ryan L, Lanusse C, Mottier L, Alvarez L, Solana H, Virkel G & Brophy PM (2007) Understanding triclabendazole resistance. *Exp Mol Pathol* **82**, 104-109.

Bruhn H (2005) A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem J* **389**, 249-257.

Burden DJ & Hammett NC (1980) *Fasciola hepatica*: attempts to immunize rats using fluke eggs and in vitro culture products. *Vet Parasitol* **7**, 51-57.

Burden DJ, Harness E & Hammett NC (1982) *Fasciola hepatica*: attempts to immunise rats and mice with metabolic and somatic antigens derived from juvenile flukes. *Vet Parasitol* **9**, 261-266.

Burley SK, David PR, Taylor A & Lipscomb WN (1990) Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6878-6882.

Campbell N, Miller A & Miller G (2007) Control of liver fluke. *Agriculture Notes February*.

Campbell NJ, Gregg P, Kelly JD & Dineen JK (1978) Failure to induce homologous immunity to *Fasciola hepatica* in sheep vaccinated with irradiated metacercariae. *Vet Parasitol* **4**, 143-152.

- Cancela M, Acosta D, Rinaldi G, Silva E, Duran R, Roche L, Zaha A, Carmona C & Tort JF (2008) A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie* **90**, 1461-1475.
- Cancela M, Ruetalo N, Dell'Oca N, da Silva E, Smircich P, Rinaldi G, Roche L, Carmona C, Alvarez-Valin F, Zaha A, Tort JF (2010) Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics* **11**, 227.
- Carmona C, McGonigle S, Dowd AJ, Smith AM, Coughlan S, McGowran E & Dalton JP (1994) A dipeptidylpeptidase secreted by *Fasciola hepatica*. *Parasitology* **109**, 113-118.
- Casanueva R, Hillyer GV, Ramajo V, Oleaga A, Espinoza EY & Muro A (2001) Immunoprophylaxis against *Fasciola hepatica* in rabbits using a recombinant Fh15 fatty acid-binding protein. *J Parasitol* **87**, 697-700.
- Cervi L, Borgonovo J, Egea M, Chiapello L & Masih D (2004) Immunization of rats against *Fasciola hepatica* using crude antigens conjugated with Freund's adjuvant or oligodeoxynucleotides. *Vet Immunol Immunopathol* **97**, 97-104.
- Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA & Vercruyse J (2006) The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* **136**, 167-185.
- Copland RS & Skerratt LF (2008) Options for the control of liver fluke. In *Overcoming liver fluke as a constraint to ruminant production in South-East Asia*, pp. 55-68 [GD Gray, RS Copland and DB Copeman, editors]. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).
- Corba J, Armour J, Roberts RJ & Urquhart GM (1971) Transfer of immunity to *Fasciola hepatica* infection by lymphoid cells. *Res Vet Sci* **12**, 292-295.
- Creaney J, Spithill TW, Thompson CM, Wilson LR, Sandeman RM & Parsons JC (1995) Attempted immunisation of sheep against *Fasciola hepatica* using gamma-irradiated metacercariae. *Int J Parasitol* **25**, 853-856.
- Chapman CB & Mitchell GF (1982) *Fasciola hepatica*: comparative studies on fascioliasis in rats and mice. *Int J Parasitol* **12**, 81-91.
- Chauvin A, Bouvet G & Boulard C (1995) Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Int J Parasitol* **25**, 1227-1241.
- Dalton JP, Brindley PJ, Donnelly S, Robinson MW (2009) The enigmatic asparaginyl endopeptidase of helminth parasites. *Trends Parasitol* **25**, 59-61.
- Dalton JP, Brindley PJ, Knox DP, Brady CP, Hotez PJ, Donnelly S, O'Neill SM, Mulcahy G & Loukas A (2003a) Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int J Parasitol* **33**, 621-640.

- Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP & Andrews SJ (1996) Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun* **64**, 5066-5074.
- Dalton JP & Mulcahy G (2001) Parasite vaccines--a reality? *Vet Parasitol* **98**, 149-167.
- Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moire N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG & Donnelly SM (2003b) *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol* **33**, 1173-1181.
- Dargie JD, Armour J, Rushton B & Murray M (1974) Immune mechanisms and hepatic fibrosis in fascioliasis. In *Proc Sixth Int Conf World Assoc Adv Vet Parist*, pp. 119-122 [EJL Soulsby, editor: Academic Press, NY.
- Davies C, Rickard MD, Smyth JD & Hughes DL (1979) Attempts to immunize rats against infection with *Fasciola hepatica* using in vitro culture antigens from newly excysted metacercariae. *Res Vet Sci* **26**, 259-260.
- Dawes, B., 1964, A preliminary study of the prospect of inducing immunity in fascioliasis by means of infections with X-irradiated metacercarial cysts and subsequent challenge with normal cysts of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* **54**, 369-389.
- De Bont J, Claerebout E, Riveau G, Schacht AM, Smets K, Conder G, Brake DA, Capron A & Vercruysse J (2003) Failure of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental *Fasciola hepatica* infection. *Vet Parasitol* **113**, 135-144.
- Dewilde S, Ioanitescu AI, Kiger L, Gilany K, Marden MC, Van Doorslaer S, Vercruysse J, Pesce A, Nardini M, Bolognesi M & Moens L (2008) The hemoglobins of the trematodes *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum epiclitum*: a molecular biological, physico-chemical, kinetic, and vaccination study. *Protein Sci* **17**, 1653-1662.
- Dowd AJ, Smith AM, McGonigle S & Dalton JP (1994) Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur J Biochem* **223**, 91-98.
- Dowd AJ, Tort J, Roche L, Ryan T & Dalton JP (1997) Isolation of a cDNA encoding *Fasciola hepatica* cathepsin L2 and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biochem Parasitol* **88**, 163-174.
- Doy TG & Hughes DL (1984) *Fasciola hepatica*: site of resistance to reinfection in cattle. *Exp Parasitol* **57**, 274-278.
- Dzik JM (2006) Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochim Pol* **53**, 33-64.

- Eriksen L & Flagstad T (1974) *Fasciola hepatica*: influence of extrahepatic adult flukes on infections and immunity in rats. *Exp Parasitol* **35**, 411-417.
- Espino AM & Hillyer GV (2003) Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family. *J Parasitol* **89**, 545-552.
- Espino AM & Hillyer GV (2004) A novel *Fasciola hepatica* saposinlike recombinant protein with immunoprophylactic potential. *J Parasitol* **90**, 876-879.
- Espino AM, Rodriguez Medina JR & Hillyer GV (2001) Isolation and immunological characterization of fatty acid binding protein isoforms from *Fasciola hepatica*. *J Parasitol* **87**, 1028-1033.
- Fairweather I (2009) Triclabendazole progress report, 2005-2009: an advancement of learning? *J Helminthol* **83**, 139-150.
- Fairweather I & Boray JC (1999a) Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *Vet J* **158**, 81-112.
- Fairweather I & Boray JC (1999b) Mechanisms of fasciolicide action and drug resistance in *Fasciola hepatica*. In *Fasciolosis*, pp. 225-276 [JP Dalton, editor]. Wallingford: CABI Publishing.
- Fox NJ, White PC, McClean CJ, Marion G, Evans A & Hutchings MR (2011) Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. *PLoS One* **6**, e16126.
- Gajadhar AA, Scandrett WB & Forbes LB (2006) Overview of food- and water-borne zoonotic parasites at the farm level. *Rev Sci Tech* **25**, 595-606.
- Golden O, Flynn RJ, Read C, Sekiya M, Donnelly SM, Stack C, Dalton JP & Mulcahy G (2010) Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine* **28**, 5551-5557.
- Guasconi L, Serradell MC, Borgonovo J, Garro AP, Varengo H, Caffè G & Masih DT (2011) Immunization with crude antigens plus aluminium hydroxide protects cattle from *Fasciola hepatica* infection. *J Helminthol*, 1-6.
- Hall RF & Lang BZ (1978) The development of an experimental vaccine against *Fasciola hepatica* in cattle. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*, 56-60.
- Harmsen MM, Cornelissen JB, Buijs HE, Boersma WJ, Jeurissen SH & van Milligen FJ (2004) Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *Int J Parasitol* **34**, 675-682.
- Harness E, Doy TG & Hughes DL (1977) The early migratory behaviour of young *Fasciola hepatica* in sensitized mice. *Int J Parasitol* **7**, 51-54.
- Harness E, Hughes DL & Doy TG (1976) The demonstration of pre-hepatic immune response to *Fasciola hepatica* in the mouse. *Int J Parasitol* **6**, 15-17.

Haroun EM, Hammond JA & Sewell MM (1980) Resistance to *Fasciola hepatica* in rats and rabbits following implantation of adult flukes contained in diffusion chambers. *Res Vet Sci* **29**, 310-314.

Haroun EM, Hammond JA & Sewell MMH (1980a) Resistance to *Fasciola hepatica* in rats and rabbits following sensitizing infection and treatment. *Res Vet Sci* **28**, 377-379.

Haroun ET & Hillyer GV (1986) Resistance to fascioliasis--a review. *Vet Parasitol* **20**, 63-93.

Hayes TJ, Bailer J & Mitrovic M (1973) Immunity to *Fasciola hepatica* in rats: the effect of two different levels of primary exposure on superinfection. *J Parasitol* **59**, 810-812.

Hayes TJ, Bailer J & Mitrovic M (1974a) Acquired immunity and age resistance in rats with chronic fascioliasis. *J Parasitol* **60**, 247-250.

Hayes TJ, Bailer J & Mitrovic M (1974b) Studies on the serum transfer of immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. *J Parasitol* **60**, 930-934.

Healy GR (1955) Studies on immunity to *Fasciola hepatica* in rabbits. *J Parasitol* **41**, 25.

Hein WR & Harrison GB (2005) Vaccines against veterinary helminths. *Vet Parasitol* **132**, 217-222.

Hillyer GV (1985) Induction of immunity in mice to *Fasciola hepatica* with a *Fasciola*/*Schistosoma* cross-reactive defined immunity antigen. *Am J Trop Med Hyg* **34**, 1127-1131.

Hillyer GV (1987) Heterologous resistance in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **82 Suppl 4**, 171-174.

Hillyer GV (1995) Comparison of purified 12 kDa and recombinant 15 kDa *Fasciola hepatica* antigens related to a *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **90**, 249-253.

Hillyer GV (2005) *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *Journal of Helminthology* **79**, 1-8.

Hillyer GV & Sagramoso de Ateca L (1979) Immunity in *Schistosoma mansoni* using antigens of *Fasciola hepatica* isolated by concanavalin A affinity chromatography. *Infect Immun* **26**, 802-807.

Hofmann B, Hecht HJ & Flohe L (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem* **383**, 347-364.

Howell MJ (1979) Vaccination of rats against *Fasciola hepatica*. *J Parasitol* **65**, 817-819.

Howell MJ, Board PG & Boray JC (1988) Glutathione S-transferases in *Fasciola hepatica*. *J Parasitol* **74**, 715-718.

Howell MJ & Sandeman RM (1979) *Fasciola hepatica*: some properties of a precipitate which forms when metacercariae are cultured in immune rat serum. *Int J Parasitol* **9**, 41-45.

Hughes A (1962) Observations on the immunology of *Fasciola hepatica* infections in mice and rabbits. *Parasitology* **52**, 4.

Hughes DL, Harness E & Doy TG (1976) The establishment and duration of *Fasciola hepatica* infections in two strains of rats and the development of acquired resistance. *Res Vet Sci* **20**, 207-211.

Hughes DL, Hanna RE & Symonds HW (1981a) *Fasciola hepatica*: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. *Exp Parasitol* **52**, 271-279.

Hughes DL, Harness E & Doy TG (1981b) The different stages of *Fasciola hepatica* capable of inducing immunity and the susceptibility of various stages to immunological attack in the sensitized rat. *Res Vet Sci* **30**, 93-98.

Ivory C & Chadee K (2004) DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genet Vaccines Ther* **2**, 17.

Jackson F (1993) Anthelmintic resistance--the state of play. *Br Vet J* **149**, 123-138.

Jaros S, Jaros D, Wesolowska A, Zygnier W & Wedrychowicz H (2010) Blocking *Fasciola hepatica*'s energy metabolism - a pilot study of vaccine potential of a novel gene - phosphoglycerate kinase. *Vet Parasitol* **172**, 229-237.

Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW & Smooker PM (2009) Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet Parasitol* **160**, 230-236.

Kaplan RM (2001) *Fasciola hepatica*: a review of the economic impact in cattle and considerations for control. *Vet Ther* **2**, 40-50.

Kendall SB, Hebert N, Parfitt JW & Peirce MA (1967) Resistance to reinfection with *Fasciola hepatica* in rabbits. *Exp Parasitol* **20**, 242-247.

Kendall SB & Sinclair IJ (1971) Barriers to reinfection with *Fasciola hepatica* in the rabbit. *Res Vet Sci* **12**, 74-79.

Knight RA (1980) Relationship of globule leucocytes to infections with *Fasciola hepatica* in sheep. *J Parasitol* **66**, 844-845.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lalic R, Cuperlovic K & Movsesijan M (1976) Study of the immunogenicity of the secretory/excretory antigen of *Fasciola hepatica*. *Acta Vet Beograd* **26**, 69-77.

Lang BZ (1967) Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the white mouse. II. Studies on acquired immunity. *J Parasitol* **53**, 21-30.

Lang BZ (1974) Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the white mouse. V. Age of fluke responsible for the induction of acquired immunity. *J Parasitol* **60**, 90-92.

Lang BZ (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. *J Parasitol* **62**, 232-236.

Lang BZ & Dronen NO, Jr. (1972) 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. *J Parasitol* **58**, 84-87.

Lang BZ & Hall RF (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. *J Parasitol* **63**, 1046-1049.

Law RH, Smooker PM, Irving JA, Piedrafita D, Ponting R, Kennedy NJ, Whistock JC, Pike RN & Spithill TW (2003) Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infect Immun* **71**, 6921-6932.

Lehner RP & Sewell MMH (1979) Attempted immunization of laboratory animals with metabolic antigens of *Fasciola hepatica*. *Vet Sci Comm* **2**, 337-340.

Lightowers MW (1994) Vaccination against animal parasites. *Vet Parasitol* **54**, 177-204.

Lopez-Aban J, Casanueva P, Nogal J, Arias M, Morrondo P, Diez-Banos P, Hillyer GV, Martinez-Fernandez AR & Muro A (2007) Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Vet Parasitol* **145**, 287-296.

Lopez-Aban J, Nogal-Ruiz JJ, Vicente B, Morrondo P, Diez-Banos P, Hillyer GV, Martinez-Fernandez AR, Feliciano AS & 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*. *Vet Parasitol* **153**, 176-181.

Lopez-Aban JL, Ramajo V, Arellano JL, Oleaga A, Hillyer GV & Muro A (1999) A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/BL mice from challenge infection with *Schistosoma bovis*. *Vet Parasitol* **83**, 107-121.

López Lemes MH, Hernández S, Acuña AM & Nari A (1996) Fascioliasis en la República Oriental del Uruguay. *Rev Med Uruguay* **12**, 37-43.

Lloyd S (1981) Progress in immunization against parasitic helminths. *Parasitology* **83**, 225-242.

Maggioli G, Acosta D, Silveira F, Rossi S, Giacaman S, Basika T, Gayo V, Rosadilla D, Roche L, Tort J & Carmona C (2011) rFhLAP, a recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase confers high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep using different adjuvants. *Vaccine* **29**, 9057-63.

- Mamani W & Condori R (2009) Determinación de resistencia antihelmíntica (*Fasciola hepatica*) en ovinos frente a albendazol y triclabendazol, La Paz-Bolivia. *Rev Inv Vet Perú* **20**, 254-262.
- Marcet R, Diaz A, Arteaga E, Finlay CM & Sarracent J (2002) Passive protection against fasciolosis in mice by immunization with a monoclonal antibody (ES-78 MoAb). *Parasite Immunol* **24**, 103-108.
- Martinez-Fernandez AR, Nogal-Ruiz JJ, Lopez-Aban J, Ramajo V, Oleaga A, Manga-Gonzalez Y, Hillyer GV & Muro A (2004) Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Vet Parasitol* **126**, 287-298.
- Mas-Coma MS, Esteban JG & Bargues MD (1999a) Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull World Health Organ* **77**, 340-346.
- Mas-Coma S (2005a) Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminthol* **79**, 207-216.
- Mas-Coma S, Bargues MD & Esteban JG (1999b) Human Fasciolosis. In *Fasciolosis*, pp. 411-434 [JP Dalton, editor]. Wallingford: CABI Publishing.
- Mas-Coma S, Bargues MD & Valero MA (2005b) Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol* **35**, 1255-1278.
- Mas-Coma S, Valero MA & Bargues MD (2008) Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. *Rev Sci Tech* **27**, 443-457.
- Matsui M, Fowler JH & Walling LL (2006) Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol Chem* **387**, 1535-1544.
- McCarthy E, Stack C, Donnelly SM, Doyle S, Mann VH, Brindley PJ, Stewart M, Day TA, Maule AG & Dalton JP (2004) Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol* **34**, 703-714.
- McGonigle S, Curley GP & Dalton JP (1997) Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite *Fasciola hepatica*. *Parasitology* **115**, 101-104.
- McGonigle S & Dalton JP (1995) Isolation of *Fasciola hepatica* haemoglobin. *Parasitology* **111**, 209-215.
- McGowan S, Oellig CA, Birru WA, Caradoc-Davies TT, Stack CM, Lowther J, Skinner-Adams T, Mucha A, Kafarski P, Grembecka J, Trenholme KR, Buckle AM, Gardiner DL, Dalton JP & Whisstock JC (2010) Structure of the *Plasmodium falciparum* M17 aminopeptidase and significance for the design of drugs targeting the neutral exopeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2449-2454.
- McManus DP & Dalton JP (2006) Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* **133 Suppl**, S43-61.

- Meeusen EN & Piedrafita D (2003) Exploiting natural immunity to helminth parasites for the development of veterinary vaccines. *Int J Parasitol* **33**, 1285-1290.
- Mendes RE, Perez-Ecija RA, Zafra R, Buffoni L, Martinez-Moreno A, Dalton JP, Mulcahy G & Perez 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.
- Millard CS, Stols L, Quartey P, Kim Y, Dementieva I & Donnelly MI (2003) A less laborious approach to the high-throughput production of recombinant proteins in *Escherichia coli* using 2-liter plastic bottles. *Protein Expr Purif* **29**, 311-320.
- Mitchell GB (2003) Treatment and Control of liver fluke in Sheep and Cattle. *Technical Note SAC* **TN 557**.
- Mitchell GB, Maris L & Bonniwell MA (1998) Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet Rec* **143**, 399.
- Mohamed SA, El-Badry MA, Hamdy SM, Abdel-Ghany SS, Salah HA & Fahmy AS (2009) *Fasciola gigantica*: Purification and Characterization of a Leucine Aminopeptidase. *J App Sci Res* **5**, 905-913.
- Moll L, Gaasenbeek CP, Vellema P & Borgsteede FH (2000) Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The netherlands. *Vet Parasitol* **91**, 153-158.
- Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T & Spithill TW (1996) Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* **14**, 1603-1612.
- Moser D, Tendler M, Griffiths G & Klinkert MQ (1991) A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *J Biol Chem* **266**, 8447-8454.
- Movsesijan M, MacLean JM & Sokolic A (1969) Pathophysiology of infections with normal and irradiated metacercariae of *Fasciola hepatica*. *Br Vet J* **125**, 564-567.
- Mozos Mora E, Zafra R, Ortiz P, Cabrera M, Mulcahy G & Pérez J (2010) Evaluation of Hepatic Damage in Cattle Vaccinated with Recombinant Cathepsin L1 and Peroxiredoxin and Challenged with *Fasciola hepatica*. *J Comp Pathol* **143**, 326.
- Mulcahy G, Joyce P & Dalton JP (1999) Immunology of *Fasciola hepatica* infection. In *Fasciolosis*, pp. 341-376 [J Dalton, editor]. Wallingford: CABI Publishing.
- Muro A, Casanueva P, Lopez-Aban J, Ramajo V, Martinez-Fernandez AR & Hillyer GV (2007) Identification of *Fasciola hepatica* recombinant 15-kDa fatty acid-binding protein T-cell epitopes that protect against experimental fascioliasis in rabbits and mice. *J Parasitol* **93**, 817-823.

- Muro A, Ramajo V, Lopez J, Simon F & Hillyer GV (1997) *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol* **69**, 219-229.
- Nandi D, Tahiliani P, Kumar A & Chandu D (2006) The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* **31**, 137-155.
- Nansen P (1975) Resistance in cattle to *Fasciola hepatica* induced by gamma-ray attenuated larvae: results from a controlled field trial. *Res Vet Sci* **19**, 278-283.
- Nari A & Cardozo H (1976) Prevalencia y distribución geográfica de la fascioliasis hepato biliar en bovinos de carne del Uruguay. *Veterinaria* **13**, 11-16.
- Neubauer P, Fahnert B, Lilie H & Villaverde A (2006) Protein Inclusion Bodies in Recombinant Bacteria. In *Microbiology Monographs*, pp. 237-292 [JM Shively, editor]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Nithiuthai S, Anantaphruti MT, Waikagul J & Gajadhar A (2004) Waterborne zoonotic helminthiasis. *Vet Parasitol* **126**, 167-193.
- Oldham G (1983) Protection against *Fasciola hepatica* in rats with adult fluke antigen in Freund's adjuvant: influence of antigen batch, antigen dose and number of sensitising injections. *Res Vet Sci* **34**, 240-244.
- Oldham G & Hughes DL (1982) *Fasciola hepatica*: immunisation of rats by intraperitoneal injection of adult fluke antigen in Freund's adjuvant. *Exp Parasitol* **54**, 7-11.
- Olivera DR, Ferreira DM, Stival CC, Romero F, Cavagnolli F, Kloss A, Araújo FB & Molento MB (2008) Triclabendazole resistance involving *Fasciola hepatica* in sheep and goats during an outbreak in Almirante Tamandare, Parana, Brazil. *Brazil. J. Vet. Parasitol.* **17**, 149-153.
- Overend DJ & Bowen FL (1995) Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J* **72**, 275-276.
- Page AE & Warburton MJ (1994) Purification and characterization of a novel tyrosyl-aminopeptidase from human osteoclastomas. *Int J Biochem* **26**, 139-144.
- Panaccio M, Wilson LR, Cramer SL, Wijffels GL & Spithill TW (1992) Molecular characterization of cDNA sequences encoding glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol* **74**, 232-237.
- Parkinson M, O'Neill S M & Dalton JP (2007) Controlling fasciolosis in the Bolivian Altiplano. *Trends Parasitol* **23**, 238-239.
- Perez-Ecija RA, Mendes RE, Zafra R, Buffonni L, Martinez-Moreno A & Perez J (2010) Pathological and parasitological protection in goats immunised with recombinant cathepsin L1 and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet J* **185**, 351-353.

- Pérez J, Zafra R, Perez-Ecija RA, Buffoni L, Martínez-Moreno FJ & Martínez-Moreno A (2006) Fasciolosis caprina: estudio comparativo de infecciones crónicas experimentales. *Pequeños Rumiantes* **7**, 8-17.
- Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP & Carmona C (1999) Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun* **67**, 1954-1961.
- Rajasekariah GR & Howell MJ (1978) *Fasciola hepatica*: role of developmental stages in the rat's resistance to challenge. *Exp Parasitol* **44**, 233-238.
- Rajasekariah GR & Howell MJ (1979) *Fasciola hepatica* in rats: transfer of immunity by serum and cells from infected to *F. hepatica* naive animals. *J Parasitol* **65**, 481-487.
- Ramajo V, Oleaga A, Casanueva P, Hillyer GV & Muro A (2001) Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with homologous fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol* **97**, 35-46.
- Rawlings ND, Tolle DP & Barrett AJ (2004) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **32**, D160-164.
- Rawlings, ND, Morton, FR, Barrett, AJ (2006) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **34**, D270-272.
- Reed MB, Strugnell RA, Panaccio M & Spithill TW (2000) A novel member of the NK-lysin protein family is developmentally regulated and secreted by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* **105**, 297-303.
- Reszka N, Cornelissen JB, Harmsen MM, Bienkowska-Szewczyk K, de Bree J, Boersma WJ & Rijsewijk FA (2005) *Fasciola hepatica* procathepsin L3 protein expressed by a baculovirus recombinant can partly protect rats against fasciolosis. *Vaccine* **23**, 2987-2993.
- Rim HJ, Farag HF, Sornmani S & Cross JH (1994) Food-borne trematodes: Ignored or emerging? *Parasitology Today* **10**, 207-209.
- Rinaldi G, Morales ME, Alrefaei YN, Cancela M, Castillo E, Dalton JP, Tort JF & Brindley PJ (2009) RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Mol Biochem Parasitol* **167**, 118-126.
- Roberts JA & Suhardono (1996) Approaches to the control of fasciolosis in ruminants. *Int J Parasitol* **26**, 971-981.
- Robinson MW, Dalton JP & Donnelly S (2008) Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends Biochem Sci* **33**, 601-608.
- Robinson MW, Menon R, Donnelly SM, Dalton JP & Ranganathan S (2009) An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol Cell Proteomics* **8**, 1891-1907.

Roche L, Dowd AJ, Tort J, McGonigle S, MacSweeney A, Curley GP, Ryan T & Dalton JP (1997) Functional expression of *Fasciola hepatica* cathepsin L1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **245**, 373-380.

Ross JG (1966) Studies of immunity to *Fasciola hepatica*. Mutually acquired immunity in rabbits. *Br Vet J* **122**, 209-211.

Ross JG (1967) Studies of immunity to *Fasciola hepatica*: acquired immunity in cattle, sheep and rabbits following natural infection and vaccine procedures. *J Helminthol* **41**, 393-399.

Rushton B (1977) Ovine fasciolosis following reinfection. *Res Vet Sci* **22**, 133-134.

Saba R, Korkmaz M, Inan D, Mamikoglu L, Turhan O, Gunseren F, Cevikol C & Kabaalioglu A (2004) Human fascioliasis. *Clin Microbiol Infect* **10**, 385-387.

Salvatore L, Wijffels G, Sexton JL, Panaccio M, Mailer S, McCauley I, Spithill TW (1995) Biochemical analysis of recombinant glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* **69**, 281-288.

Sandeman RM, Howell MJ & Campbell NJ (1980) An attempt to vaccinate sheep against *Fasciola hepatica* using a juvenile fluke antigen sheep antibody complex. *Res Vet Sci* **29**, 255-259.

Schulman MD & Valentino D (1981) Purification and characterization of phosphoglycerate kinase from *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* **2**, 309-321.

Sekiya M, Mulcahy G, Irwin JA, Stack CM, Donnelly SM, Xu W, Collins P & Dalton JP (2006) Biochemical characterisation of the recombinant peroxiredoxin (FhePrx) of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *FEBS Lett* **580**, 5016-5022.

Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, Thompson C, Wilson L, Spithill TW, Mitchell GF & et al. (1990) Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol* **145**, 3905-3910.

Sinclair IJ & Joyner LP (1974) The effect of the administration of a homologous antigen on the establishment of *Fasciola hepatica* in the rabbit. *Res Vet Sci* **16**, 320-327.

Sinclair KB (1962) Observations on the clinical pathology of ovine fasciolosis. *Br Vet J* **118**, 37-53.

Sinclair KB (1971) Resistance to *Fasciola hepatica* in sheep: attempts to transfer resistance with lymph node and spleen homogenates. *Br Vet J* **127**, 408-418.

Sinclair KB (1971a) Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in sheep. *Br Vet J* **127**, 125-136.

- Sinclair KB (1973) The resistance of sheep to *Fasciola hepatica*: studies on the development and pathogenicity of challenge infections. *Br Vet J* **129**, 236-250.
- Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett, A, Dalton JP (1993) Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* **62**, 1-8.
- Smith WD (1999) Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. *Int J Parasitol* **29**, 17-24.
- Smith WD & Zarlenga DS (2006) Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Vet Parasitol* **139**, 347-359.
- Smyth DJ & Halton DW (1983) Intramolluscan stages. In *The physiology of trematodes* pp. 115-153. Malta: Cambridge University Press.
- Sokolic A (1968) Preliminary studies of irradiated and normal metacercariae of *Fasciola hepatica* in mice. In *Proc Third Int Conf World Assoc Adv Vet Parasitol*, pp. 258-263. Lyons.
- Song SM, Park JH, Kim J, Kim SI, Hong YC, Kong HH & Chung DI (2008) Identification and characterization of *Paragonimus westermani* leucine aminopeptidase. *Parasitol Int* **57**, 334-341.
- Spithill T, Smooker P, Sexton J, Bozas E, Morrison C, Creaney J & Parsons J (1999) Development of Vaccines Against *Fasciola hepatica*. In *Fasciolosis*, pp. 377-410 [J Dalton, editor]. Wallingford: CABI Publishing.
- Spithill TW & Dalton JP (1998) Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitol Today* **14**, 224-228.
- Spithill TW, Piedrafita D & Smooker PM (1997) Immunological approaches for the control of fasciolosis. *Int J Parasitol* **27**, 1221-1235.
- Strandberg L & Enfors SO (1991) Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1669-1674.
- Strater N, Sherratt DJ & Colloms SD (1999) X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. *EMBO J* **18**, 4513-4522.
- Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, 207-234.
- Taylor A (1993) Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J* **7**, 290-298.
- Taylor EL (1965) La fasciolose et la douve du foie. *Etudes Agricoles de la F.A.O* **64**, 235.
- Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem AC, Da Silva JF, Savino W, Garratt RC, Katz N & Simpson AS (1996) A

*Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 269-273.

Tendler M, Vilar MM, Brito CA, Freire NM, Katz N & Simpson A (1995) Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine? *Mem Inst Oswaldo Cruz* **90**, 255-256.

Thorpe E & Broome AWJ (1962) Immunity to *Fasciola hepatica* infection in albino rats vaccinated with irradiated metacercariae. *Vet Rec* **74**, 755-756.

Timanova-Atanasova A, Jordanova R, Radoslavov G, Deevska G, Bankov I & Barrett J (2003) Fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica*: purification and binding characteristics. *Exp Pathol Parasitol* **6**, 55-66.

Torgerson PR & Claxton J (1999) Epidemiology and control. In *Fasciolosis*, pp. 113-150 [JP Dalton, editor]. Wallingford: CABI Publishing.

Tort J, Brindley PJ, Knox D, Wolfe KH & Dalton JP (1999) Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Adv Parasitol* **43**, 161-266.

Towbin H, Staehelin T & Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.

Urquhart GM, Mulligan W & Jennings FW (1954) Artificial immunity to *Fasciola hepatica* in rabbits. I. Some studies with protein antigens of *F. hepatica*. *J Infect Dis* **94**, 126-133.

Ventura S & Villaverde A (2006) Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol* **24**, 179-185.

Vercruysse J & Claerebout E (2003) Assessment of the efficacy of helminth vaccines. *J Parasitol* **89** (Suppl.), S202-S209.

Vercruysse J, Knox DP, Schetters TP & Willadsen P (2004) Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends Parasitol* **20**, 488-492.

Virkel G, Lifschitz A, Sallovitz J, Ballent M, Scarcella S & Lanusse C (2009) Inhibition of cytochrome P450 activity enhances the systemic availability of triclabendazole metabolites in sheep. *J Vet Pharmacol Ther* **32**, 79-86.

WHO (2007) Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control: WHO/CDS/NTD/PCT/2007.1.

Wijffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, Campbell N, Sexton J, Wicker J, Bowen F & et al. (1994) Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Exp Parasitol* **78**, 132-148.

Williamson AL, Brindley PJ, Knox DP, Hotez PJ & Loukas A (2003) Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends Parasitol* **19**, 417-423.

Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G & Sangster NC (2004) Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol* **20**, 469-476.

Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J & Poole LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28**, 32-40.