



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIDAD DE BIOLOGÍA PARASITARIA

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA
TESINA DE GRADO

***Estudios sobre los mecanismos humorales asociados a
protección de una vacuna recombinante contra la
fasciolosis ovina.***

María Cecilia Salazar González

Orientador: Dr. Carlos Carmona

Montevideo, Uruguay

Febrero-2013

Agradecimientos

Quiero dedicarle este trabajo a mi madre, quien me brindó su apoyo en todo momento y a Néstor, mi compañero de todas las horas.

A mi familia y amigos por el aguante.

Agradecerles a mis queridos compañeros de la UBP a Gaby, a Tati, a Anabella, a Dinorah, a Nati, a Gualberto y a Federico por el intercambio de ideas, por los mates y los buenos momentos.

Quiero agradecerle al Dr. Carlos Carmona por abrirme las puertas de la UBP y por la paciencia al transmitirme sus conocimientos, al Dr. Fernando Silveira (Mono) y a la Dra. Patricia Berasain por su colaboración en temas de su especialidad.

Por último, agradecer a la Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII) por su apoyo a través de la Beca de Iniciación a la Investigación.

Resumen

La fasciolosis es una enfermedad causada por los trematodos parásitos del género *Fasciola* (*F. hepatica* y *F. gigantica*). La infección con *F. hepatica* es una de las enfermedades parasitarias con mayor prevalencia en rumiantes domésticos en varias regiones del mundo incluyendo a Uruguay. La enfermedad se caracteriza por un cuadro sub-clínico y crónico que se traduce en la reducción de la producción de carne, lana y leche. Su tratamiento se basa en el uso de distintos tipos fármacos; el más efectivo contra todos los estadios del parásito en el huésped mamífero es el Triclabendazol (TCBZ). Sin embargo, se ha constatado la creciente aparición de resistencia frente al mismo. Dado que no han surgido en el mercado nuevas drogas fasciolicidas, la profilaxis vaccinal surge como una de las alternativas más promisorias para el control del parásito. Nuestro grupo de trabajo ha contribuido en el estudio de proteasas de *F. hepatica* como componentes de vacunas contra la fasciolosis en rumiantes. Una enzima con actividad exopeptidasa obtenida a partir de parásitos adultos y localizada histoquímicamente en el epitelio del intestino del parásito y en el tegumento fue caracterizada como una leucina aminopeptidasa (*FhLAP*). Tanto la forma nativa (*FhLAPn*) utilizada sola o en combinación con otros antígenos o la forma recombinante expresada como proteína de fusión (*FhLAP-Trxr*) alcanzaron los mayores niveles de protección reportados en ovinos hasta el momento.

En este trabajo se describe el análisis de la respuesta humoral desarrollada en el modelo ovino de una vacuna formulada a partir del antígeno *FhLAP-Trxr* con dos adyuvantes aprobados para su uso veterinario en el Uruguay: Adyuvac 50 y $\text{Al}(\text{OH})_3$, en dos esquemas de vacunación: un refuerzo y dos refuerzos. En este ensayo se obtuvieron los mayores niveles de protección con el esquema de un refuerzo (75,1% con Adyuvac 50 y 54,9% con $\text{Al}(\text{OH})_3$) en contraste con el esquema de dos refuerzos (20,1% con Adyuvac 50 y 6,10% con $\text{Al}(\text{OH})_3$) indicando que el segundo refuerzo pudo haber tenido un impacto negativo sobre la respuesta protectora. Estos resultados dispares nos promovieron a diseccionar la respuesta humoral de tipo IgG con la finalidad de echar luz sobre las notorias diferencias protectoras observadas.

Asimismo, se evaluó la reactividad por parte de los sueros del ensayo sobre los tejidos de la forma juvenil del parásito y la capacidad de estos sueros de inhibir la actividad de la *FhLAP-Trxr in vitro*.

Los resultados mostraron que en todos los casos existen diferencias significativas en los niveles de respuesta humoral específica de tipo IgG y subclases de IgG entre los grupos inmunizados y los grupos control. Asimismo, se observó para el esquema de un refuerzo tanto con Adyuvac 50 como con $\text{Al}(\text{OH})_3$ una cinética de respuesta similar, donde el pico de anticuerpos anti-*FhLAP-Trxr* se alcanza en la semana del desafío. A la vez se determinó una fuerte correlación inversa entre los niveles de anticuerpos IgG de la semana de desafío y los parásitos recuperados en la necropsia. En el caso del esquema de dos refuerzos se generaron niveles de anticuerpos anti-*FhLAP-Trxr* mayores a los obtenidos en el esquema de un refuerzo a lo largo de las semanas. En el grupo Adyuvac 50 se observaron dos picos, el primero en la semana 6 y el segundo en la semana 8. En cambio con $\text{Al}(\text{OH})_3$ se observó la inducción de un creciente nivel de anticuerpos anti-*FhLAP-Trxr* a partir de la semana 4 del ensayo llegando a un pico entre la semana 8 y 10. No se detectó correlación entre IgG total de la semana de desafío y los parásitos recuperados al final del ensayo para este esquema. Al analizar las subclases de IgG se observó una respuesta predominantemente mixta Th_2/Th_1 para el esquema de un refuerzo con una predominancia de IgG_1 sobre IgG_2 a lo largo de las semanas. Al igual que para el esquema de un refuerzo con Adyuvac 50, para el esquema de dos refuerzos se observa una respuesta mixta Th_2/Th_1 llegando al máximo de IgG_1 en la semana del desafío. Para el grupo $\text{Al}(\text{OH})_3$ se verificó una respuesta mixta Th_2/Th_1 , que sin embargo a partir de la infección se invierte pasando a predominar IgG_2 sobre IgG_1 . El análisis estadístico permitió determinar una fuerte correlación inversa entre IgG_1 y los gusanos recuperados al final del ensayo tanto para el esquema de uno como dos refuerzos.

El estudio de inmunolocalización en la forma juvenil, empleando las IgG purificadas a partir de un pool de sueros de los animales inmunizados con Adyuvac 50 en el esquema de un refuerzo, permitió visualizar un

reconocimiento diferencial los tejidos del juvenil recientemente desenquistado (JRD) respecto a las IgGs del suero pre-inmune.

En contraste con los resultados previos no se demostró capacidad inhibitoria sobre la actividad LAP *in vitro* por parte de los sueros de los grupos del ensayo.

Índice general

Agradecimientos	1
Resumen	2
Abreviaturas	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Generalidades	11
1.1.1 Ciclo biológico	12
1.1.2 Control	14
1.1.3 Drogas fasciolicidas	14
1.1.3.1 Resistencia frente al TCBZ	15
1.2 La respuesta inmune frente a la infección con <i>F. hepatica</i>.....	16
1.2.1 La primera línea de defensa.	17
1.2.2 Respuesta inmune mediada por células	18
1.2.3 Respuesta inmune mediada por anticuerpos.....	20
1.2.4 Regulación de la respuesta inmune por citoquinas.....	20
1.3 Antecedentes de vacunas contra <i>F. hepatica</i>.....	21
1.3.1 Rol de las enzimas proteolíticas de <i>F. hepatica</i>	26
1.3.2 La leucina aminopeptidasa de <i>F. hepatica</i>	29
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivos generales:	35
2.2 Objetivos específicos:	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1 Producción de (<i>Fh</i>LAP-Trxr)	37
3.1.1 Verificación de la integridad del sistema de expresión pThioHisC- <i>Fh</i> LAP-Trx en <i>E. coli</i> Topo 10.....	37
3.1.2 Expresión de <i>Fh</i> LAP-Trxr	38
3.1.3 Purificación de la proteína <i>Fh</i> LAP-Trxr soluble.....	39
3.1.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condicionesdesnaturalizantes (SDS-PAGE)	39
3.1.5 Determinación de la concentración de proteínas.....	41
3.2 Ensayo de inmunización	41
3.3 Análisis de la respuesta humoral.	42
3.3.1 IgG total	42
3.3.2 Subclases IgG ₁ e IgG ₂	43

3.3.3 Métodos estadísticos.....	44
3.4 Inmunoreactividad en la semana del desafío de los sueros del ensayo sobre una <i>Fh</i> LAPr.....	45
3.5 Inmunoreactividad sobre extractos proteicos de distintos estadios de <i>F. hepatica</i>	46
3.5.1 Desenquiste de las metacercarias.....	47
3.5.2 Cultivo de JDRs.....	48
3.6 Inmunofluorescencia.	48
3.6.1. Cortes finos de JRDs.....	48
3.6.2. JRDs enteros previamente fijados con Paraformaldehído.	49
3.7 Inmunohistoquímica.	50
3.7.1 Determinación de la inmunoreactividad de los sueros con distinto grado de protección.	50
3.8 Purificación de IgGs de suero policlonal anti- <i>Fh</i> LAPr.....	51
3.8.1 Delipidación de sueros.....	52
3.8.2 Purificación de IgGs mediante cromatografía de afinidad con proteína G.....	52
3.8.3 Seguimiento de la purificación de IgGs.....	52
3.9 Determinación de la inhibición de la actividad enzimática de <i>Fh</i> LAPr in vitro por sueros del ensayo de inmunización	53
4. RESULTADOS.....	54
4.1.1 Integridad del sistema de expresión pThioHisC en <i>E coli</i>	55
4.1.2 Purificación de <i>Fh</i> LAPr	55
4.1.3 Rendimiento de la purificación de <i>Fh</i> LAP-Trxr	56
4.1.4. Resultados de la necropsia del ensayo vaccinal	57
4.2 Análisis de la respuesta de anticuerpos anti <i>Fh</i> LAP-Trxr.	58
4.2.1 IgG total	58
4.2.2 Correlación entre IgG total y parásitos.....	61
4.2.3 Análisis de la Varianza entre los grupos de IgG total.....	63
4.3 Subclases IgG ₁ e IgG ₂	63
4.3.2 Análisis de la Varianza en los niveles de IgG ₁ e IgG ₂ entre los grupos	66
4.3 Inmunoreactividad de los sueros al momento del desafío	66
4.3.1 Western blot.....	66
4.5 Reactividad de sueros anti- <i>Fh</i> LAPr frente a juveniles recientemente desenquistados.....	68
4.5.1 Cortes finos de JRD	69

4.4 Purificación de Inmunoglobulinas de pool de sueros de animales inmunizados con <i>Fh</i> LAPr.....	73
4.6 Inmunohistoquímica	76
4.7 Determinación de la inhibición de actividad enzimática de <i>Fh</i> LAPr sueros de inmunización.	78
5. DISCUSIÓN	80
6. BIBLIOGRAFÍA	92

Abreviaturas

AAMφ	Mácrofagos alternativamente activados
ADNc	Acido desoxirribonucleico copia
Al(OH)₃	Hidróxido de aluminio
AMC	7-amino-4-metilcumarin
Amp	Ampicilina
BCA	Ácido bicinconínico
bLAP	Leucin aminopeptidasa del cristalino bovino
BSA	Seroalbúmina bovina
Cat	Catepsina
CatB	Catepsina B
CatL	Catepsina L
CD	Célula Dendrítica
COLS	Colaboradores
Da	Dalton
DAB	3,3'diaminobencidina
DEAE-D	Dietilaminoetil-dextrano
DO	Densidad óptica
DPP	Dipeptidilpeptidasa
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EROs	Especies reactivas del oxígeno
FABP	Proteínas de unión a ácidos grasos
FCA	Adyuvante Completo de Freund
FIA	Adyuvante Incompleto de Freund
FITC	Isocianato de Fluoresceína
FhLAP	Leucin aminopeptidasa de <i>Fasciola hepatica</i>
FhLAPn	Leucin aminopeptidasa nativa de <i>Fasciola hepatica</i>
FhLAPr	Leucin aminopeptidasa recombinante de <i>Fasciola hepatica</i>
GST	Glutación-S-transferasa
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorhídrico
H₂O₂	Péroxido de Hidrógeno
JRD	Juvenil Recientemente desenquistado
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleuquina
INFγ	Interferón
IPTG	Isopropiltiogalactósido
LAP	Leucin aminopeptidasa
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
Leu	Leucina
LPS	Lipopolisacárido
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO₃	Bicarbonato de Sodio
Ni(SO₄)₂	Sulfato de Níquel

nFh12	Proteína FABP nativa de 12,0 KDa de <i>F. hepatica</i>
MnCl₂	Cloruro de Manganeseo
OCT	Medio para congelamiento de tejidos
OPD	o-fenilendiamina
PAMP	Patrón Molecular asociado a Patógenos
PBS	Tampón Fosfato Salino
PBS-T	Tampón Fosfato Salino con Tween
PES	Productos excreción/secreción
Prx	Peroxirredoxina
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
rFh15	Proteína FABP recombinante de 14,7kDa de <i>Fasciola hepatica</i>
RPM	Revoluciones por minuto
rSm14	Proteína FABP recombinante de 14,7 kDa de <i>Schistosoma mansoni</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
TCBZ	Triclabendazol
TCBZSO	Triclabendazol sulfóxido
TGR	Tiorredoxina Glutiatión Reductasa
Th	Célula T colaboradora
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
Trx	Tiorredoxina
Zn	Zinc

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

La fasciolosis es una zoonosis provocada por la infección con los parásitos trematodos del género *Fasciola* (*F. hepatica* y *F. gigantica*). Esta infección se ha descrito para un amplio rango de mamíferos incluyendo animales de interés productivo (bovinos, caprinos y ovinos) e incluso el hombre (Andrews, 1999). Se estima que más de 17 millones de personas se encuentran infectadas con el parásito y alrededor de 180 millones se encuentran en riesgo de contraer la infección (Mas-Coma, 2005). El parasitismo por *F. hepatica* causa enfermedad aguda y crónica en el ganado, en especial el bovino y ovino, generando pérdidas que se estiman en más de 2000 millones de dólares anuales (Spithill, 1998) como consecuencia de la reducción de la producción de carne, lana y leche, aparición de infecciones secundarias, interferencia en la fertilidad de los animales y gastos en la aplicación del tratamiento fasciolicida (Hatschbach, 1995). En Uruguay, la fasciolosis, conocida vulgarmente como “saguaypé” o “duela hepática”, es una de las enfermedades parasitarias más relevantes, con una prevalencia que oscila entre el 50% y 60% en ganado bovino y ovino, respectivamente (Acosta, 1991). El control de la enfermedad está basado principalmente en el uso de fármacos fasciolicidas en las especies productivas, sin embargo esta estrategia se ha comprometido por la creciente aparición de focos de resistencia al Triclabendazol (TCBZ), el único fármaco autorizado por la Unión Europea para el tratamiento de la fasciolosis en rumiantes (revisado en Fairweather, 2011).

1.1.1 Ciclo biológico

F. hepatica es un platelminto trematodo hematófago de la subclase Digenea, que posee un ciclo biológico heteroxeno es decir, requiere de un huésped definitivo (mamíferos herbívoros) y un huésped intermediario (caracoles de agua dulce) para completar su ciclo (**Figura 1**). Los huevos producidos por los adultos hermafroditas del parásito localizados en los canalículos biliares del hígado son arrastrados por la bilis hasta el duodeno y luego son expulsados al exterior con las heces del huésped definitivo, formándose en su interior el embrión ciliado al cabo de 10-12 días. La eclosión de los huevos solo se produce en el agua donde el opérculo del huevo se abre para la emergencia del miracidio. Este nada libremente por medio de los cilios que recubren el cuerpo hasta encontrar al huésped intermediario adecuado; éstos son caracoles pulmonados pertenecientes a los géneros *Lymnea*, *Simlynea*, *Stagnicola* y *Physa*. En Uruguay, la única especie con relevancia epidemiológica es *Lymnea viatrix* (Nari et al, 1983).

El miracidio atraviesa los tegumentos del molusco, pierde los cilios y se localiza en la cámara pulmonar, donde se transforma en esporocisto. Este crece y en el interior del caracol a través de reproducción asexual, se forman las redias de primera generación, que migrarán a la glándula digestiva del caracol para formar también endógenamente redias hijas o de segunda generación. Estas últimas formarán las cercarias, que abandonarán el caracol para nadar en el medio acuático. A continuación, las cercarias pierden la cola y se enquistan formando la forma infectante y de resistencia llamada metacercaria que generalmente se adhiere a vegetales acuáticos. El huésped definitivo se infecta al ingerir las metacercarias junto con estos vegetales. En el estómago, las condiciones reductoras, la elevada concentración de anhídrido carbónico y la

temperatura de 39°C desencadenan el proceso de desenquistamiento (Andrews, 1999). En el duodeno, las sales biliares estimulan la emergencia de la forma juvenil de *F. hepatica*. El juvenil recientemente desenquistado (JDR), migra y atraviesa la pared del intestino delgado, llegando al peritoneo donde recorre la serosa hasta alcanzar el hígado al que atraviesa. Finalmente, la forma adulta y sexualmente madura, se instala en el interior de los conductos biliares y se fija a las paredes a través de ventosas comenzando la deposición de huevos entre 8 y 12 semanas post-infección (Sukhdeo y Sukhdeo, 2002). En su periplo migratorio, *F. hepatica* sufre importantes modificaciones en su morfología, el más evidente es el de su tamaño, pasando de la forma juvenil de 300 µm a la forma adulta de hasta 3 cm de largo.

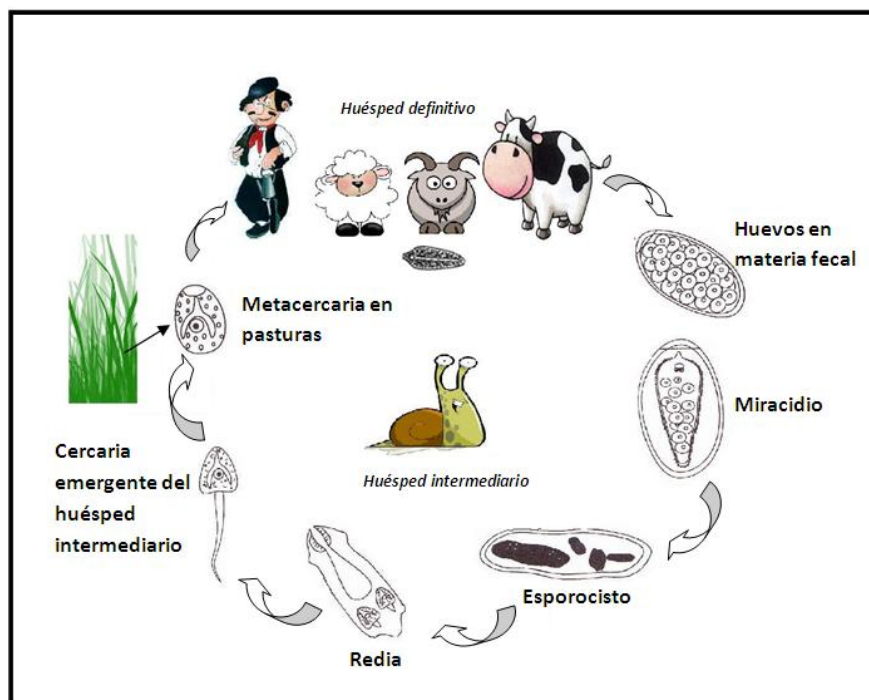


Figura 1. Ciclo biológico de *F. hepatica*. El ciclo de vida del parásito es complejo, teniendo un huésped definitivo que aloja la forma sexualmente madura del parásito y un huésped intermediario que aloja la fase larvaria.

1.1.2 Control

La infección se encuentra asociada a zonas bajas y mal drenadas, propicias para el desarrollo del ciclo biológico del parásito (Nari y Cardozo, 1976). La velocidad de desarrollo de los huevos del parásito, de las cercarias emitidas por el caracol y la viabilidad de las metacercarias enquistadas en las pasturas se encuentran relacionadas con las condiciones de temperatura y humedad. El drenado de zonas bajas, la forestación y la utilización de agentes químicos molusquicidas constituyen medidas de control del huésped intermediario. Sin embargo, la problemática en el control de la fasciolosis viene acompañada de los cambios en los patrones de la enfermedad, la creciente incidencia como consecuencia del cambio climático y la aparición de resistencia al TCBZ.

1.1.3 Drogas fasciolicidas

Existen drogas antihelmínticas altamente eficaces como el TCBZ, Closantel, Nitroxinil, Oxiclozanida, Diamfenetida y Clorsulon. Todas las drogas a excepción de la primera eliminan eficientemente el parásito en etapas tardías de su desarrollo. Sin embargo, en esta etapa ya se ha producido el daño hepático y el consecuente debilitamiento de la salud del huésped (**Figura 2**). El TCBZ, es la droga de elección para el tratamiento de animales de producción y más recientemente ha comenzado a utilizarse con éxito en casos de fasciolosis humana (Villegas *et al*, 2012). Se trata de la única droga que tiene actividad contra todos los estadios del parásito, en especial contra la forma migratoria que produce los daños más significativos a nivel hepático. Su mecanismo de acción se encuentra asociado a la unión a la β -tubulina y por lo

tanto afecta todos los procesos que involucran microtúbulos (revisado en Brennan et al, 2007).

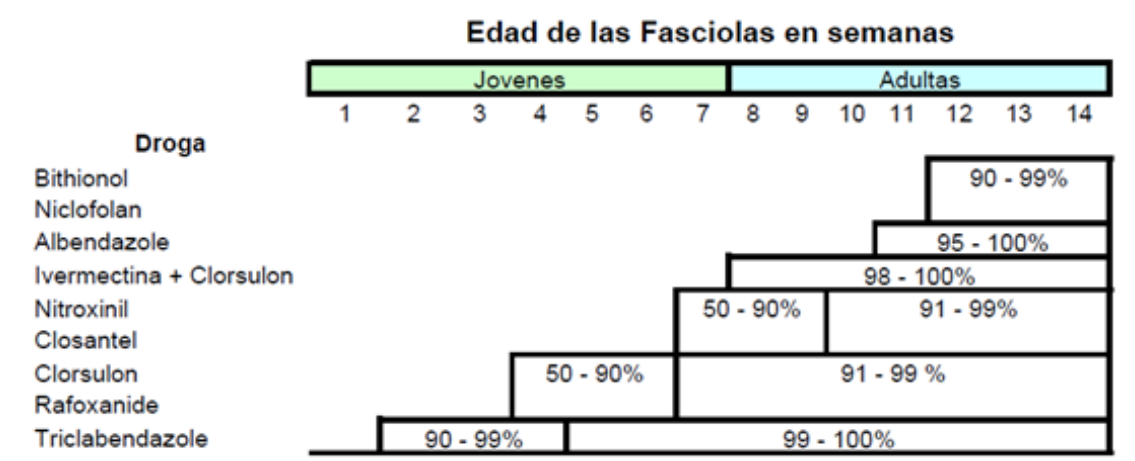


Figura 2. Antihelmínticos y su espectro de acción contra *F. hepatica* (Riet et al, 2001).

1.1.3.1 Resistencia frente al TCBZ

Se ha encontrado que en nematodos la resistencia a los bencimidazoles está ligada a la selección de variantes de β -tubulina con una sustitución de fenilalanina por tirosina en la posición 167 o 200. En forma similar, se cree que la resistencia al TCBZ en *F. hepatica*, podría estar asociada a la selección de nuevas variantes de β -tubulina, ya que las α y β -tubulinas de las formas sensibles y resistentes de la forma adulta de *F. hepatica* presentan diferencias en las mismas posiciones identificadas para la β -tubulina resistente a los bencimidazoles (revisado en Brennan et al, 2007). Otros mecanismos moleculares asociados a la resistencia al TCBZ incluyen además, la lenta reducción del TCBZ a triclabendazol sulfóxido (TCBZSO) que es el metabolito activo, la unión del TCBZ a proteínas no específicas, lo que restringe su habilidad de unirse a su sitio de acción y finalmente, la sobre-expresión de

transportador (glicoproteína-P) que permite la eliminación del fármaco desde las células del parásito (Álvarez *et al*, 2007).

La creciente aparición de resistencia al TCBZ y la falta de desarrollo de nuevas drogas fasciolicidas determinan que la estrategia farmacológica de control de la fasciolosis puede no ser sustentable a mediano plazo en muchos países, en especial países desarrollados, por lo que la profilaxis vaccinal surge como una de las alternativas más alentadoras.

Tras repetidos fracasos en el desarrollo de una vacuna eficaz contra la infección, a finales del siglo pasado se hizo evidente la necesidad de profundizar en el conocimiento de la biología del parásito y principalmente en la respuesta inmune del huésped frente al parásito, a modo de poder definir los blancos moleculares más apropiados.

1.2 La respuesta inmune frente a la infección con *F. hepatica*.

Muchas especies de mamíferos pueden infectarse con parásitos del género *Fasciola*. Sin embargo, se ha descrito una amplia variación en los niveles de susceptibilidad a la infección y en la habilidad de adquirir resistencia a la reinfección. El huésped ovino es susceptible a la infección y en muchos casos sufre la muerte en la etapa aguda de la infección. En cambio, se ha observado un alto grado de resistencia a la infección primaria y secundaria con *F. gigantica* y a la vez se ha constatado distinto grado de susceptibilidad entre algunas razas ovinas (Spithill *et al*, 1998). Estos hallazgos sugieren que *F. hepatica* y *F. gigantica* presentan diferencias biológicas significativas que permiten que los mecanismos inmunológicos efectores del huésped ovino puedan imponerse a la infección de *F. gigantica* y no a la de *F. hepatica*. Estos

mecanismos de resistencia a la infección con *F. gigantica* se asocian a la inducción temprana de una respuesta Th₁ en contraste con la respuesta Th₁/Th₂ que se induciría por *F. hepatica* (Raadsma et al, 2007). El ganado bovino presenta una resistencia mayor a la infección con *F. hepatica* que los ovinos. Sin embargo, no desarrollan una respuesta inmune capaz de evitar la re-infección (Clery, et al, 1998).

1.2.1 La primera línea de defensa.

La respuesta inmune innata jugaría un papel importante frente a la infección por *F. hepatica*, no sólo en montar una respuesta adaptativa, sino que además, tendría un rol directo en la defensa contra este parásito. El parásito secreta distintas moléculas que tienen una serie de efectos sobre el huésped. Uno de estos efectos, es la supresión de la respuesta inmune contra infecciones bacterianas como es el caso de la infección con *Bordetella pertusis*. También se ha registrado la mayor susceptibilidad del ganado infectado con *F. hepatica* a la infección por *Salmonella dublin*, posiblemente debida a la supresión de la respuesta Th₁ en el huésped. Esta inmunosupresión afecta no solo la capacidad de respuesta frente a otras infecciones, sino que además afecta la capacidad predictiva del diagnóstico de la tuberculosis bovina, que se basa en la producción específica de INFγ contra *Mycobacterium bovis* en glóbulos blancos de la sangre. Por otro lado, se ha demostrado que la infección con *F. hepatica* en el modelo murino alivia los síntomas clínicos de la encefalomiелitis autoinmune experimental, modelo para la esclerosis múltiple humana (revisado en Robinson et al, 2012).

El rol de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por *pathogen-associated molecular patterns*) en la activación del sistema inmune

recientemente ha empezado a explorarse en la infección con *F. hepatica*. Hasta la fecha, no se ha caracterizado ningún patrón molecular asociado a *F. hepatica* y tampoco se han identificado de manera definitiva receptores para este tipo de moléculas. Se ha demostrado que el TLR2 estaría involucrado en la interacción con los productos de excreción/secreción (PES) de *F. hepatica* a través de un experimento donde los PES de adultos inhiben la activación de los macrófagos por proteínas purificadas de *M. bovis*, ya sea por inhibición de la transducción de señales o competición directa por el TLR2 (Flynn y Mulcahy, 2008). Este efecto está parcialmente asociado con la presencia de residuos glucídicos, ya que al eliminarlos se compromete la activación de los macrófagos. Otro experimento indica que los receptores de manosa también podrían estar involucrados en la activación alternativa de los macrófagos (Guasconi *et al*, 2011).

1.2.2 Respuesta inmune mediada por células

Los mecanismos efectores estimulados luego de la infección incluyen una rápida y pronunciada eosinofilia (característica de la mayoría de las infecciones por helmintos hemotesiduales) y activación de macrófagos. En bovinos, se ha encontrado un elevado conteo de eosinófilos desde la cuarta semana post-infección y persistencia hasta la semana 16 (Bossaert *et al*, 2000), mientras que en ovinos se demostró la presencia bifásica de eosinofilia ocurriendo en la semana 4 post-infección y nuevamente en la semana 9-10 (Zhang *et al*, 2005). En este contexto, se ha demostrado que los PES de *F. hepatica* inducen apoptosis en eosinófilos de ratas en un proceso dependiente de la dosis y el tiempo de exposición (Serradell *et al*, 2007).

Los macrófagos pueden activarse hacia la forma M₁ (clásica) o M₂ (alternativa). Ha tenido creciente aceptación la idea según la cual la activación alternativa de los macrófagos durante la infección por helmintos tendría un rol central para comprender la respuesta frente a ellos (Sica *et al*, 2012). Los macrófagos alternativamente activados (AAMφ) se caracterizan por una elevada actividad arginasa 1 y expresión de IL-10 sumado a bajos niveles de producción de óxido nítrico. Las funciones de estas células no están totalmente claras, sin embargo se cree que están implicadas en la diferenciación de los linfocitos Th₂ o que podrían actuar como un tipo celular supresor de la producción de citoquinas pro-inflamatorias y por lo tanto de la respuesta Th₁, dado su elevada expresión de IL-10 (Flynn y Mulcahy, 2008). Se ha demostrado que la infección por *F. hepatica* es capaz de generar AAMφ tanto *in vitro* como *in vivo*. Por otro lado, existe una fuerte correlación entre la presencia de AAMφ con la capacidad de supresión y susceptibilidad a una infección secundaria (Flynn y Mulcahy, 2007). La evidencia de su rol en iniciar la diferenciación a células Th₂ proviene de un estudio donde se utilizaron macrófagos activados por *F. hepatica* para estimular un perfil de secreción de citoquinas Th₂ en células T vírgenes estimuladas a través del CD3 (Donnelly *et al*, 2008). Otros estudios indican que los macrófagos activados de forma alternativa están asociados con una respuesta de memoria protectora, fibrosis e inmunopatología (revisado en Flynn *et al*, 2010).

Respecto a las células presentadoras de antígeno, los estudios realizados sobre las células dendríticas (CD) en la infección por helmintos han fallado en demostrar de forma definitiva su rol en la diferenciación de las células T vírgenes al fenotipo Th₂ (Wynn, 2009). Las CD activadas en presencia de

antígenos provenientes de helmintos no presentan los marcadores clásicos de activación, como niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12), TNF α y óxido nítrico. Tampoco hay expresión significativa de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y CD40 (Hamilton *et al*, 2010). Asimismo, los PES del adulto de *F. hepatica* fueron capaces de estimular la proliferación de linfocitos Th₂ y T reguladores cuando las CD eran co-estimuladas a través del TLR4 *in vitro* (Falcón *et al*, 2010).

1.2.3 Respuesta inmune mediada por anticuerpos

Luego de 4 semanas post-infección en rumiantes se desarrolla una respuesta adaptativa mediada por células B con la generación de anticuerpos específicos contra antígenos del parásito. Varios estudios han mostrado que IgG₁ es dominante en bovinos que presentan una exposición previa, al igual que aquellos que nunca entraron en contacto con el parásito (Clery *et al*, 1996 ; Bossaert *et al*, 2000; Flynn *et al*, 2009) y esto ha sido confirmado a través de estudios en ovinos (Raadsma *et al*, 2007). Como es típico de las respuestas Th₂ la generación de anticuerpos IgG₁ viene mediada por IL-4 (O'Neill *et al*, 2000). Sin embargo, la vacunación con antígenos nativos derivados del gusano adulto se obtuvo correlación negativa entre protección (reducción de gusanos recuperados) y título de IgG_{2a} asociada a respuesta Th₁, y avidez (Mulcahy *et al*, 1998; Raadsma, 2007).

1.2.4 Regulación de la respuesta inmune por citoquinas

La producción temprana de INF γ en respuesta a la infección con *F. hepatica* se ha reportado en varios modelos de estudios incluyendo ovinos (Moreau *et al*, 1998). Esta expresión temprana de INF γ sugiere una respuesta Th₀/Th₁,

cambiando hacia una respuesta Th₂ a medida que la infección se establece y que explicaría el predominio de la subclase IgG₁ previamente descrito. La respuesta inmune a la infección natural en ovinos no produce una respuesta protectora y la infección crónica con la forma adulta instalada en los conductos biliares se establece luego de 12 semanas post-infección (McManus y Dalton, 2006). En estudios realizados en ovinos donde se infectó experimentalmente con *F. gigantica* se observó que la expresión de ARNm de citoquinas del tipo 1 (IL-12 e IL-2) era predominante en las células aisladas de los ganglios linfáticos cercanos al hígado 3 semanas post-infección. En cambio, en las células aisladas de animales infectados con *F. hepatica* en el mismo tiempo, se constató elevada expresión de ARNm de citoquinas de tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-13) (Pleasence et al, 2011).

En definitiva, la cronicidad de la infección con *F. hepatica* está asociada con el desarrollo de una respuesta Th₂ en el huésped a medida que la infección se establece a la vez que se compromete la capacidad en desarrollar una respuesta Th₁ protectora. Esta inmunomodulación no le permitiría al huésped montar una respuesta apropiada frente a infecciones bacterianas dejándolo expuesto a una variedad de enfermedades. Se ha acumulado evidencia que apoya la idea de que la supresión de la respuesta Th₁ estaría mediada principalmente por la activación de macrófagos alternativamente activados.

1.3 Antecedentes de vacunas contra *F. hepatica*.

Lang y colaboradores (1967, 1972 y 1974) llevaron a cabo los primeros experimentos de inmunización homóloga en ratones a modo de determinar el

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

Más adelante, los ensayos de vacunación llevados a cabo con metacercarias atenuadas por irradiación o drogas, extractos somáticos o PES de adulto demostraron la posibilidad de estimular el sistema inmune, a pesar de los niveles bajos de protección obtenidos. Por otro lado, se logró estimular inmunidad parcial en bovinos no expuestos a través de la transferencia de suero y/o células linfoides de animales infectados y además se lograron niveles significativos de protección utilizando PES de gusanos inmaduros en ratas y ratones (revisado en Haroun y Hillyer, 1986).

En este contexto, y concretamente en ovinos, que presentan elevada susceptibilidad a la infección, se llevaron a cabo ensayos de infección homóloga primaria (Sinclair, 1962 y 1973, Boray, 1967; Rushton, 1977; Knight, 1980; Sandeman y Howell, 1981), vacunación con metacercarias irradiadas (Boray, 1967; Armour *et al*, 1974; Campbell *et al*, 1978; Creaney *et al*, 1995), o con extractos del parásito ya sea somático (Ross, 1967) o PES de gusanos adultos (Sandeman *et al*, 1980). En ninguno de los casos se reportaron niveles significativos de protección.

A mediados de los 80' se realizaron los primeros ensayos de vacunación que emplearon proteínas purificadas a partir de extractos parasitarios. Estas fueron las proteínas de unión a ácidos grasos o FABPs (por *fatty acid binding protein*,) reconocidas por su potencial protector luego de una serie de experimentos en los que un conjunto de antígenos de *F. hepatica* se purificaron a partir de la reacción cruzada con anticuerpos generados contra el trematodo *Schistosoma mansoni*. Una fracción purificada del inmunoprecipitado llamada *Fh/Sm* II fue capaz de reducir la carga parasitaria en un 78% en ratones y un 55% en terneros luego del desafío con metacercarias (Hillyer, 1985, Hillyer et al, 1987). El antígeno presente en la fracción *Fh/Sm* II se identificó como una proteína de 12 KDa y se llamó *Fh12*. Utilizando un suero mono-específico anti-*Fh12* se aisló de una librería de ADNc del parásito adulto una secuencia que predijo una proteína recombinante de 14.7 KDa (*Fh15r*). Tanto la fracción nativa (*Fh12n*) como la recombinante (*Fh15r*) fueron incluidas en ensayos de vacunación obteniéndose una reducción significativa de la carga parasitaria en conejos (40%) con la fracción nativa en un esquema de una inmunización y un refuerzo en la semana 4, mientras que con la fracción recombinante no hubo protección significativa (Muro et al, 1997). Al aumentar a 20 semanas el período entre la primera inmunización y el refuerzo se obtuvo una reducción de 76% en el mismo modelo con *Fh12n* (Casanueva et al, 2001). Martínez-Fernández y cols. (2004) introdujeron un nuevo sistema de vacunación (sistema ADAD) utilizando primero la inmunización subcutánea con una micela que contiene *Quillaja saponaria*, un extracto hidroalcohólico de *Polipodium leucotomos* (Anaspos) emulsificado con el aceite no mineral Montadine (período de adaptación). En la segunda inmunización la micela contiene los mismos componentes y además

el antígeno nativo (*Fh12n*). Como resultado se obtuvieron reducciones significativas en los huevos recuperados en la vesícula biliar y heces (58.1% y 40.3% respectivamente) y una reducción en la carga parasitaria en el hígado respecto del control (24.5%). La *Fh12n* purificada a partir de adultos de *F. hepatica*, formulada con el sistema ADAD y un inmunomodulador indujo niveles altos de protección en ensayos experimentales con roedores, mientras que en ovinos se observó una marcada reducción de parásitos recuperados en la necropsia (43%), daño hepático y aumento de peso post-infección (López Abán *et al*, 2008).

Otra de las moléculas candidatas a antígeno vaccinal es la Glutación S-transferasa (*FhGST*). Las *FhGSTs* son un grupo de isoenzimas involucradas en la detoxificación de una variedad de sustratos. Las *FhGSTs* fueron elegidas en base al potencial protector observado en animales de laboratorio con las GSTs de *S. mansoni* y *S. japonicum*. Los primeros ensayos que mostraron su potencial como antígeno vaccinal fueron llevados a cabo por Sexton y cols (1994). Luego se desarrollaron experimentos de inmunización múltiple en rumiantes con una fracción de GST nativa, que mostraron una reducción de la carga parasitaria de un 57% en ovinos y en bovinos de un 69% (Spithill *et al*, 1998). Por otro lado, se han llevado a cabo ensayos de vacunación utilizando una *FhGST* de la clase Sigma recombinante (*FhGST-S1r*) en cabras, que mostraron una reducción poco significativa en el número de gusanos recuperados en el hígado y menor daño hepático asociado a la fuerte infiltración de eosinófilos en el peritoneo y alrededor de los parásitos migrantes (Zafra *et al*, 2012).

Dentro del grupo de las enzimas antioxidantes estudiadas como antígenos vacunales se encuentra la peroxiredoxina (*FhPrx*). La *FhPrx* clonada a partir del parásito es una enzima capaz de metabolizar el peróxido de hidrógeno previniendo el estrés celular (Sekiya *et al*, 2006). Su función en la infección estaría relacionado con la protección frente a las especies reactivas del oxígeno (EROs) provenientes de procesos metabólicos y en la defensa de los de las EROs liberados por las células efectoras del sistema inmune del huésped. También se ha reportado que la *FhPrx* secretada de *F. hepatica* induce la activación alternativa en macrófagos en el modelo murino, proceso íntimamente ligado a la inducción de la respuesta Th₂ que permite que el parásito se establezca en el huésped (Donnelly *et al*, 2008). En un ensayo llevado a cabo en cabras con la forma recombinante formulada con Quil A no se obtuvo un porcentaje de protección significativo. Sin embargo, se observó menor daño hepático y reducción de la infiltración por células del sistema inmune (Mendes *et al*, 2010).

Otra de las moléculas ensayadas dentro de las enzimas antioxidantes ha sido la Tiorredoxina Glutathión Reductasa (*FhTGR*), enzima involucrada en la homeostasis redox del parásito. Producida en forma recombinante, la *FhTGR* indujo una disminución de casi el 100% en la carga parasitaria en conejos infectados experimentalmente (Maggioli *et al*, 2011b). Sin embargo, la inoculación en bovinos asociada a distintos adyuvantes, fue incapaz de generar niveles de protección significativos (Maggioli *et al*, datos sin publicar).

Un tercer grupo de antígenos lo constituyen las proteasas asociadas al tubo digestivo del parásito. Las mismas cumplen funciones relevantes en la interface con el huésped dado que asisten al parásito en sus requerimientos nutricionales, su tránsito a través del huésped y en la evasión del sistema inmune. (Tort *et al*, 1999).

1.3.1 Rol de las enzimas proteolíticas de *F. hepatica*.

Las enzimas proteolíticas se clasifican según la posición de los enlaces clivados en endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas cortan enlaces peptídicos internos de la proteína, en cambio las exopeptidasas actúan únicamente cerca de los extremos, liberando uno o más aminoácidos terminales tanto en el extremo amino terminal (aminopeptidasa, dipeptidilpeptidasa, tripeptidilpeptidasa) como en el extremo carboxilo terminal (carboxipeptidasa). Las exopeptidasas no pueden completar rápidamente la digestión de proteínas, actuando en fases tardías de su catabolismo. También participan en procesos de proteólisis limitada, por lo que se encuentran involucradas en la activación de proenzimas y prohormonas (Rawlings y Barrett, 1993). Las peptidasas también se pueden clasificar en varios grupos según su mecanismo catalítico y los aminoácidos involucrados en la reacción de hidrólisis: serín proteasas, cisteín proteasas, aspártil proteasas, metaloproteasas, treonín proteasas y glutamil proteasas (Rawlings *et al*, 2004). En los gusanos adultos de *F. hepatica*, las proteasas caracterizadas como cisteín proteasas se encuentran en mayor proporción (Smith *et al*, 1993; Dowd *et al*, 1994). Dos proteasas similares a la cathepsina L, proteinasa lisosomal de vertebrados, son los componentes ampliamente mayoritarios en los PES de

adultos, denominándose catepsinas L1 y L2 (*FhCatL1* y *FhCatL2*, respectivamente). En ensayos *in vitro* con JRDs, las *FhCatL1* y *FhCatL2* bloquean la inmunotoxicidad mediada por anticuerpos (Carmona *et al*, 1993). Por otro lado, ambas catepsinas L son capaces de clivar inmunoglobulinas lo que sugiere un papel activo en mecanismos de evasión de la respuesta humoral (Berasain *et al*, 2000). También se ha postulado su participación en la degradación *in vitro* de colágeno, fibronectina y laminina, por lo que podrían estar involucradas en los procesos de degradación tisular que tienen lugar durante la invasión y migración (Berasain *et al*, 1997). Debido a que *F. hepatica* se alimenta fundamentalmente de sangre que obtiene a través de lesiones provocadas por el parásito en la pared de los canalículos biliares, se postula un efecto procoagulante de la *FhCatL2* que impediría un sangrado excesivo de estas lesiones (Dowd *et al*, 1995). Las *FhCatL1* y L2 nativas fueron incluidas en ensayos de vacunación en bovinos obteniéndose niveles de protección que llegaron al 69%. La inmunización con una mezcla de *FhCatL1* y hemoglobina del parásito (Hb), generó una reducción de parásitos adultos del 52% (Dalton *et al.*, 1996). En ovinos, la inmunización con *FhCatL1* y *FhCatL2* por separado mostró una reducción de la carga parasitaria del 33% y 34%, sin embargo, la inoculación de ambas proteasas en forma combinada generó una reducción del número de parásitos del 60% (Piacenza *et al*, 1999).

La catepsina B (*FhCatB*) es la proteasa predominante en los PES de fase juvenil JRD (Wilson *et al*, 1998) pero ausente en los PES de adultos y parece tener un rol central en la penetración inicial de los tejidos del huésped, ya que en estudios de silenciamiento de los transcritos de *FhCatB* se observó reducción en la capacidad de penetración y migración del parásito (McGonigle

et al, 2008). Se considera que la *FhCatB* es un buen candidato a antígeno vaccinal o blanco para drogas antihelmínticas debido a que el bloqueo de su actividad reduciría la habilidad del juvenil de establecer la infección incluso antes de que el JRD inicie la migración hepática, evitando así su lesión. En este contexto, se ha realizado un ensayo de vacunación en ratas con *FhCatB* recombinante y *FhCatL5*, una proteasa menor secretada por los adultos, obteniéndose un porcentaje de protección del 83% en los animales inoculados con la combinación de ambas enzimas (Jayaraj et al, 2009). Más recientemente se ha ensayado una vacuna de ADN conteniendo la secuencia de *FhCatB* (Cat B2) fusionada con cuatro vectores de vacunas de ADN en el modelo murino. Los resultados mostraron que se induce una respuesta celular y humoral significativa, indicando que una vacuna basada en ADN sería factible contra *F. hepatica* (Jayaraj et al, 2012).

Si bien las exopeptidasas de *F. hepatica* han recibido considerablemente menos atención, se ha identificado una exopeptidasa secretada, que sería capaz de continuar la digestión de proteínas del huésped iniciada por las endoproteasas. Se trata de la dipeptidil peptidasa (*FhDPP*), obtenida a partir de PES de adultos. Esta ha sido caracterizada como serín proteasa y se encuentra en diferentes estados del parásito. La DPP de *F. hepatica* presenta diferencias con las DPP de mamífero en cuanto a su comportamiento frente a sustratos e inhibidores (Carmona et al, 1994).

Asimismo, a partir de un estudio de tamizaje de actividades de tipo aminopeptidasa por medio del uso de un amplio panel de sustratos fluorogénicos sintéticos, se aisló otra actividad exopeptidasa en los tejidos del adulto de *F. hepatica*. La caracterización de la proteína indicó que corresponde

a una leucina aminopeptidasa (LAP). Por métodos histoquímicos, se observó que la actividad de esta proteína se localizaba predominantemente en el epitelio del intestino y con menor intensidad a nivel del tegumento de la forma adulta (Acosta et al, 1998).

1.3.2 La leucina aminopeptidasa de *F. hepatica*

Uno de los candidatos a antígenos vaccinales ensayados y el que ha producido los mayores niveles de protección en ovinos, es la leucina aminopeptidasa de *F. hepatica* (*FhLAP*). Las LAPs como su nombre lo indica, tienen preferencia por residuos de leucina en el extremo amino terminal de las proteínas blanco. Secundariamente, son capaces de hidrolizar arginina, alanina, fenilalanina y prolina con eficiencia variable y la bestatina es su inhibidor específico (Taylor, 1993). En concordancia con esta tendencia, *FhLAP*, tiene preferencia por residuos de leucina y en menor proporción de arginina. De acuerdo a la caracterización molecular de la enzima, la misma comparte los aspectos centrales de los miembros de la familia M17 de metalopeptidasas (Acosta et al, 2008). En esta familia, se agrupan enzimas de estructura compleja que se presentan como hexámeros en procariotas, eucariotas inferiores, plantas y mamíferos. Los aminoácidos esenciales del sitio catalítico son dos residuos de lisina, tres residuos de ácido aspártico y un residuo de arginina. Se caracterizan por presentar protómeros bi-lobulados con un dominio C-terminal mayor al N-terminal. Las subunidades se ensamblan con sus sitios activos cercanos al interior del hexámero. Cada subunidad posee dos sitios de unión no equivalentes al Zinc (Zn_1 y Zn_2). Ambos iones tienen roles en la unión al sustrato y la catálisis. El Zn_2 está sumergido en el monómero de la LAP y se

intercambia lentamente, por el contrario el Zn_1 se encuentra más accesible y se intercambia de manera más rápida (Matsui *et al*, 2006). El metal se une a la enzima a través de los grupos carboxilo de las cadenas laterales de algunos residuos de ácido aspártico y ácido glutámico. Este arreglo estructural es imprescindible para que las enzimas sean completamente activas y se encuentra muy conservado por lo que se sugiere que se trata de un plegamiento generalizado para todos los miembros de la familia.

Se cree que la función de esta enzima es la proteólisis inespecífica en la fase final post-proteosoma del catabolismo proteico. Si bien el rol de esta LAP aún no está establecido, es posible postular su participación en la degradación final de proteínas del huésped. De esta forma, se sugiere que pequeños polipéptidos o dipéptidos, producidos por la acción de otras proteasas serían hidrolizados a aminoácidos metabolizables por la acción de esta enzima (Acosta *et al*, 1998). De esta forma podrían ser absorbidos en el epitelio intestinal, ya que no se ha encontrado evidencia a nivel del transcriptoma de transportadores de pequeños péptidos en *F. hepatica*.

Inicialmente, la *FhLAP* nativa fue incluida en estudios de inmunoprotección en ovinos. Cuando se inoculó sola o en combinación con la mezcla *FhCatL1/FhCatL2*, se obtuvieron reducciones en el número de gusanos en el hígado del 89% y 78%, respectivamente. En ambos casos el daño hepático provocado por los parásitos fue mínimo, de acuerdo a los niveles del marcador de daño γ -glutamyl transferasa. Este resultado indica que las formulaciones utilizadas tienen un impacto negativo en el desarrollo de los estadios juveniles del parásito. Por otra parte, en ensayos de inhibición enzimática se observó una disminución de la actividad de la enzima al incubarla con anticuerpos IgG

provenientes de ovinos inmunizados, pero no de ovinos control (Piacenza *et al*, 1999). Posteriormente, la enzima fue clonada y expresada en *E. coli* como proteína de fusión con la Tiorredoxina de la bacteria (*FhLAP-Trxr*) con un peso molecular aparente estimado en 67,7 KDa. El estudio de su secuencia muestra que está estrechamente relacionada con la LAP descrita para *Schistosoma* y alejada de los homólogos en mamíferos. Esta pobre similitud y la ausencia de sitios de glicosilación la posicionan como un buen antígeno vaccinal contra la fasciolosis (Acosta *et al*, 2008). En función de estos antecedentes, nuestro laboratorio llevó a cabo un experimento de gran porte donde se comprobó la capacidad de la *FhLAP-Trxr* administrada con distintos adyuvantes en el modelo ovino, obteniéndose los niveles más elevados de protección hasta el momento (87% administrado con $\text{Al}(\text{OH})_3$, 83% con Adyuvante Completo /Incompleto de Freund, 74% con Adyuvac 50, 51% con DEAE-D y 50% con Ribi) (Maggioli *et al*, 2011b). El esquema de vacunación utilizado consistió en una inmunización en la semana 0, un refuerzo en la semana 4 y el desafío oral con 200 metacercarias en la semana 6. Utilizando Adyuvac 50 se obtuvieron niveles significativamente elevados de anticuerpos anti-*FhLAP-Trxr* a partir de la cuarta semana, llegando a un máximo en la semana del desafío. Sin embargo, en el grupo $\text{Al}(\text{OH})_3$ los niveles de anticuerpos en esta semana son de un orden inferior a los obtenidos con Adyuvac 50. Sorprendentemente, los porcentajes de reducción parasitaria fueron mayores con $\text{Al}(\text{OH})_3$ que con Adyuvac 50. Al analizar los niveles de subclases IgG_1 e IgG_2 a lo largo de las semanas se observó una respuesta mixta, con una leve predominancia de IgG_1 sobre IgG_2 , lo que estaría indicando una respuesta Th_2/Th_1 . Existe además, correlación inversa estadísticamente significativa entre los niveles de

anticuerpos grupos IgG total, IgG₁ e IgG₂ al momento de la infección y la carga parasitaria hepática *post-mortem*.

En función de estos resultados la *FhLAP-Trxr* aparece como un inmunógeno capaz de generar importantes niveles de protección en ovinos y la colocan como la molécula con el mejor perfil de inmunoprotección obtenido en huéspedes naturales. Por este motivo, se procedió a realizar un segundo ensayo de vacunación utilizando una vacuna con el antígeno *FhLAP-Trxr* formulado con Al(OH)₃ y Adyuvac 50 en dos esquemas de vacunación. El primer esquema tuvo como objetivo reproducir los resultados del ensayo anteriormente descrito y consistió en una inmunización en la semana 0, seguido de un refuerzo en la semana 4 y el desafío oral con metacercarias en la semana 6. El segundo esquema consistió en una inmunización, seguido de dos refuerzos, el primero en la semana 4 y el segundo en la semana 8 con el desafío en la semana 10. Su objetivo fue evaluar el impacto del segundo refuerzo sobre los niveles de anticuerpos (IgG total, IgG₁ e IgG₂) y verificar su efecto sobre la carga parasitaria al final del ensayo.

Los resultados preliminares obtenidos en cuanto a la carga parasitaria mostraron que el esquema de un refuerzo induce los mayores porcentajes de reducción de la carga parasitaria, mientras que el esquema de dos refuerzos no reduce de manera significativa los gusanos recuperados al final del ensayo respecto del control.

El presente trabajo pretende llevar a cabo el análisis de la respuesta humoral anti-*FhLAP-Trxr* (IgG total, IgG₁ e IgG₂) desencadenada en este segundo ensayo con el antígeno *FhLAP-Trxr* en el modelo ovino. Se evaluará si existen diferencias significativas entre los grupos y si hay correlación entre los niveles

de anticuerpos anti-*Fh*LAPr en la semana del desafío y la carga parasitaria. Por otro lado, se determinará si existe un patrón diferencial de reconocimiento residual de las IgG purificadas a partir de los sueros de los distintos grupos del ensayo sobre la forma juvenil del parásito utilizando técnicas de inmunohistoquímica. Finalmente, se determinará si las inmunoglobulinas presentes en los sueros de los grupos experimentales son capaces de inhibir la actividad *Fh*LAPr *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales:

Contribuir a la dilucidación de los mecanismos humorales desarrollados en respuesta a la inmunización con una leucina aminopeptidasa de *F. hepatica* recombinante formulada con dos adyuvantes aprobados para su uso en rumiantes en el Uruguay.

2.2 Objetivos específicos:

Se plantean como objetivos específicos:

1. Evaluar la respuesta humoral en ovinos frente a dos formulaciones de una vacuna contra la fasciolosis en dos esquemas de vacunación utilizando el antígeno *FhLAP-Trxr* formulado con adyuvante salino Hidróxido de Aluminio (Al(OH)_3) y el adyuvante oleoso Adyuvac 50 de Laboratorios Santa Elena-Uruguay.
2. Detectar reactividad diferencial de las IgG purificadas a partir de pools de sueros sobre los tejidos de la forma juvenil de *F. hepatica*.
3. Evaluar la capacidad de los anticuerpos inducidos por la *FhLAP-Trxr* de bloquear la actividad de la enzima *in vitro*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando dos formas de la *FhLAP* recombinante. Para el análisis de la respuesta humoral desarrollada en el ensayo de vacunación se utilizó como antígeno sensibilizante el mismo antígeno utilizado en la inmunización, o sea, la forma recombinante expresada como proteína de fusión a la Tiorredoxina (*FhLAP-Trxr*). Para los ensayos de Western blot, e inhibición *in vitro* de la actividad enzimática por los sueros de la semana del desafío se utilizó la forma recombinante sin proteína de fusión expresada en *E. coli* BL21 utilizando el sistema de expresión pET28-*FhLAP*, (Maggioli *et al*, datos sin publicar). En este caso la proteína recombinante purificada me fue entregada al inicio de este trabajo.

3.1 Producción de (*FhLAP-Trxr*)

3.1.1 Verificación de la integridad del sistema de expresión pThioHisC-FhLAP-Trx en E. coli Topo 10

La *FhLAP* recombinante fue expresada como proteína de fusión con la Trx a partir del método descrito por Acosta *et al.* (2007). Se partió de una colonia *E. coli* Topo 10 recombinante, que contiene el sistema de expresión pThioHisC inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), conteniendo la secuencia la secuencia correspondiente a *FhLAP-Trxr* (pThioHisC-*FhLAP*) y un gen de resistencia a la ampicilina. Se verificó la integridad del sistema pThioHisC-*FhLAP* mediante el plaqueo del stock de colonias recombinantes a 37 °C toda la noche y luego se picaron colonias aisladas en 2 ml de LB/ Ampicilina (100 μ g/ml) incubándolas por 3 hr a 37 °C. Se tomó 1 ml y se indujo con IPTG 1 mM durante 2 hr a 37 °C en agitación. Luego se centrifugó a 4000 rpm y se conservó el pellet a 4 °C. Se verificó la inducción mediante una

electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% en condiciones reductoras (DTT 10 mM) (**Figura 3**).

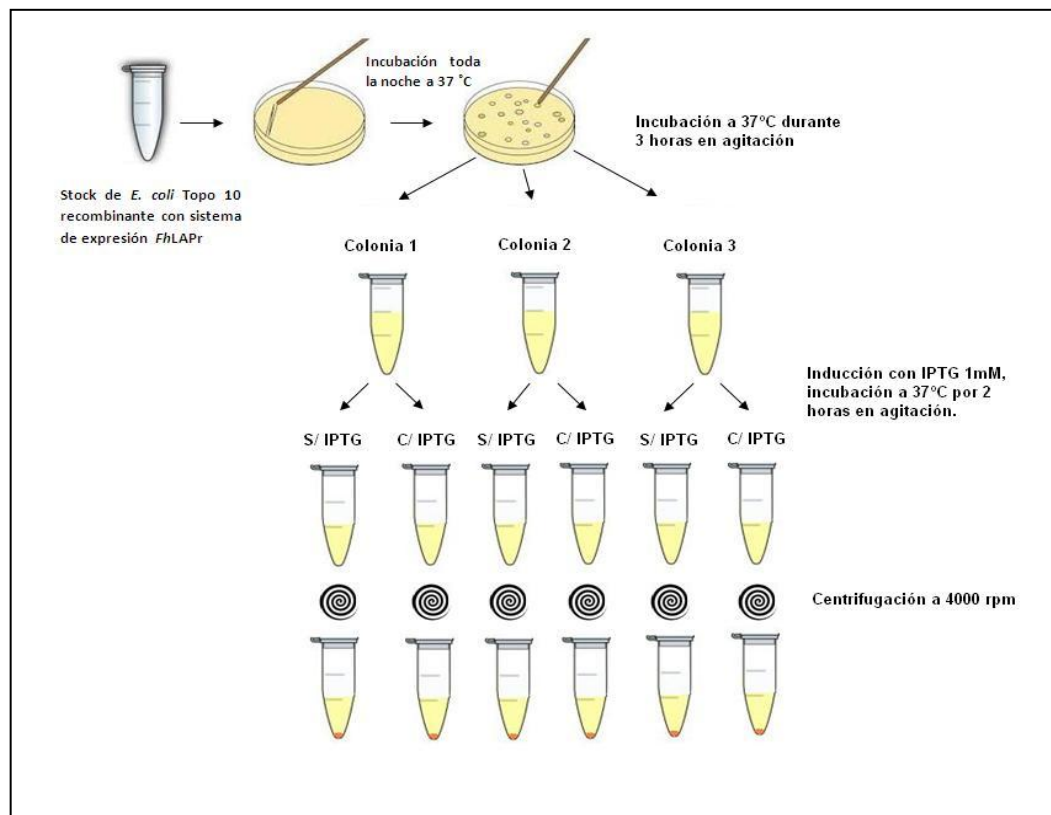


Figura 3. Esquema de la verificación de la integridad del sistema de expresión pThioHisC-*FhLAP* en *E. coli* Topo 10.

3.1.2 Expresión de *FhLAP-Trxr*

Se cultivaron las bacterias de uno de los tubos con inducción positiva en placa a 37 °C toda la noche con medio LB-Agar y Ampicilina (100 µg/ ml). Se tomó una colonia aislada y se pre-cultivó en 50 ml de medio LB/ Amp a 37 °C durante toda la noche. Se inoculó el pre-cultivo en 450 ml de medio LB/Amp, y se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ($D.O_{600}$) de 0,8-1,0, se disminuyó la temperatura a 28 °C y se indujo con IPTG 1 mM. La cosecha se realizó al día siguiente por centrifugación a

6000 rpm durante 10 min a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en 50 ml de tampón Tris 0.05M, pH 8.5, NaCl 0.1M, 0.005 mM imidazol (tampón de lisis), y se sonicó durante 2 min a intervalos de 30 seg, con pulsos de 40% de poder en un Homoginizador de Ultrasonido (Cole Parmer 4710). A continuación, se congeló rápidamente a -80 °C y se descongeló en baño a 37 °C. Luego de tres ciclos de congelado, descongelado y sonicado, se centrifugó a 13600 rpm por 30 min a 4 °C, se descartó la fracción insoluble y la fracción soluble se conservó a 4 °C.

3.1.3 Purificación de la proteína *FhLAP-Trxr* soluble

El sobrenadante obtenido se purificó mediante cromatografía quelante utilizando una región rica en Histidinas en la proteína de fusión. La muestra se aplicó a una columna conteniendo una resina quelante (Chelating Sepharose Fast Flow, Life Sciences General Electric Healthcare) cargada con $\text{Ni}(\text{SO}_4)_2$, según las recomendaciones del fabricante y equilibrada con el tampón de lisis. Para esto, se utilizó un sistema en régimen continuo. El material no retenido se lavó con el tampón de lisis por 2 hr y la elución se realizó con concentraciones escalonadas de imidazol (20 y 50 mM). El material obtenido se colectó en fracciones de 1,5 ml que fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El stock de *FhLAP-Trxr* purificado se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

3.1.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

El seguimiento de la purificación de *FhLAP-Trxr* se analizó a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. La

electroforesis de las distintas fracciones eluidas de la columna de cromatografía se llevó a cabo utilizando un método discontinuo conformado por la unión de dos geles de poliacrilamida: uno de separación de proteínas (Tris-HCl 1.5 M pH 8,8, bis-acrilamida 12,5%) y otro de concentración de proteínas (Tris-HCl 0.5 M pH 6,8, bis-acrilamida 5,0%) conteniendo los pocillos donde se siembran las muestras. Se tomaron 15 µl de cada fracción eluida en buffer de muestra (Tris-HCl 0,025 M, pH 6,8, SDS 10%, Azul de bromofenol 0,1% y Glicerol 1%). La separación se llevó a cabo durante aproximadamente 90 min a voltaje máximo y amperaje constante de 25 mA en un equipo de electroforesis (ATTO, Japón). Se utilizó como referencia el marcador de peso molecular que contiene: miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97 kDa), fructosa-6-fosfatasa (84 kDa), seroalbúmina (66 kDa), piruvato kinasa (58 kDa), glutamato deshidrogenasa (55 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa), α -lactoalbúmina (14.2 kDa) y aprotinina (6.5 kDa) (Sigma). El peso molecular aparente esperado para la forma monomérica de la proteína de fusión corresponde a 67,7 KDa, donde 56,4 KDa corresponden a *Fh*LAPr y 11.3 KDa a la Trx.

La tinción de las proteínas separadas se realizó con Coomassie Brilliant Blue (CBBR R-250) (Sigma) al 0,05% en solución de metanol: ácido acético: agua en proporción 473: 57: 520. Luego de la tinción se procedió a la decoloración del gel por incubación del mismo en una solución decolorante de metanol: ácido acético: agua en partes iguales.

3.1.5 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó con el método colorimétrico del ácido bicinquinónico (BCA Protein Assay Kit, Pearce) a una Densidad Óptica de 562 nm en microplacas usando albúmina sérica bovina como estándar. Previo a la cuantificación, se procedió a dializar la muestra conteniendo *FhLAP-Trxr* debido a los efectos de interferencia del imidazol en la absorción de la luz a 562 nm.

3.2 Ensayo de inmunización

En una etapa previa al presente trabajo, se dispuso de 48 corderos de raza Corridale de un año de edad provenientes de un área libre de *F. hepatica*. Los corderos se identificaron individualmente con caravana y se demostró la ausencia de exposición previa a la infección a través del análisis coparásitario y del estudio serológico empleando PES de adultos como antígeno de acuerdo al protocolo usado habitualmente en nuestro laboratorio (Maggioli *et al*, 2011). Los animales se dividieron en 8 grupos de 6 individuos cada uno y fueron mantenidos libremente en pastoreo sobre campo natural y con un suministro artificial de agua, por lo cual se descartó la presencia del caracol *L. viatrix*. Se llevaron a cabo dos esquemas de inmunización de *FhLAP-Trxr* con dos adyuvantes: Adyuvac 50 (Laboratorios Santa Elena) y $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Sigma). El primer esquema de vacunación consistió en una inmunización, seguida de un refuerzo en la semana 4 y el desafío en la semana 6. El segundo esquema consistió en una inmunización seguida de dos refuerzos; el primero en la semana 4 y el segundo en la semana 8 (**Figura 4**). En todos los casos la inmunización y refuerzo se llevó a cabo con 100 µg/ml de *FhLAP-Trxr* utilizando Adyuvac 50 y $\text{Al}(\text{OH})_3$. Los respectivos controles recibieron el mismo esquema

de inmunización y desafío, pero sin el antígeno. El desafío se realizó con 200 metacercarias suministradas vía oral utilizando una pistola dosificadora.

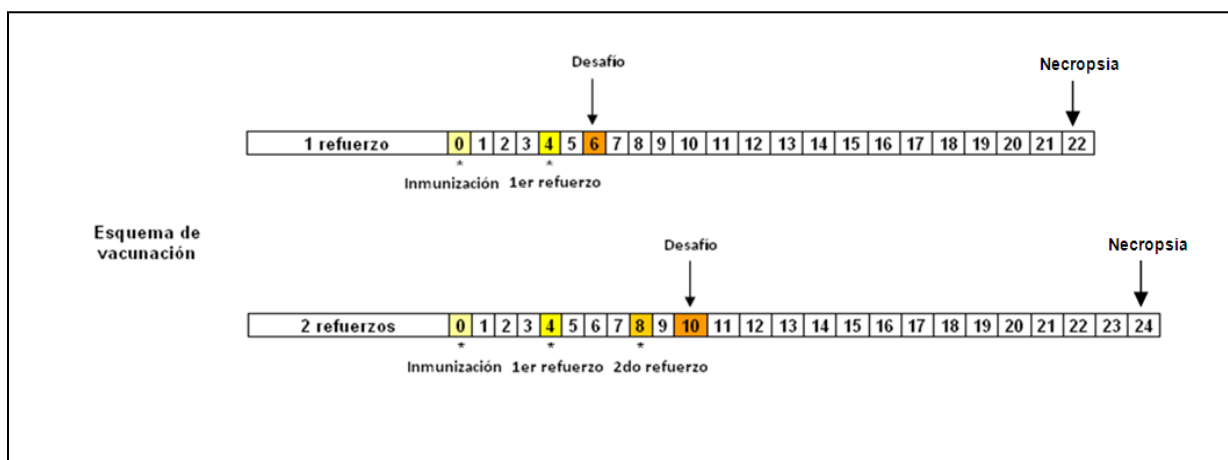


Figura 4. Esquemas de vacunación utilizado con las formulaciones *Fh*LAP-Trxr utilizando $Al(OH)_3$ y Adyuvac 50.

3.3 Análisis de la respuesta humoral.

3.3.1 IgG total

La respuesta humoral desarrollada por los animales inmunizados con las distintas preparaciones se evaluó mediante la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, por Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) según el protocolo que se describe a continuación. Las placas poliestireno de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) se sensibilizaron con la solución de *Fh*LAP-Trxr purificada (4 μ g/ml) en PBS incubando 100 μ l/pocillo de dicha solución toda la noche a 4°C. Luego se utilizó una solución de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) al 1% en PBS (200 μ l/pocillo) para bloquear los posibles sitios de unión inespecífica sobre el poliestireno, incubando durante 3 hr a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 0.05%. Las diferentes muestras se diluyeron en BSA al 0,1% en PBS y se incubaron 1 hr a 37 °C en cámara húmeda y se lavaron como se describió anteriormente. A continuación, se agregó el anticuerpo anti-IgG de oveja

conjugado a peroxidasa (dilución 1:10000, Sigma, en una solución de BSA 0,1% en PBS). Se incubó 1 hr a 37 °C en cámara húmeda y se repitió la etapa de lavado. El agregado de una solución conteniendo H₂O₂ (0,012%) como sustrato y o-fenilendiamina (OPD) (0,34 mg/ml) como cromógeno (100 µl/pocillo), evidenció la reacción antígeno-anticuerpo. El desarrollo de color se detuvo a los 15 min con el agregado de HCl 1 M (50 µl/ pocillo) y se midió la Densidad Óptica a 492 nm (D.O₄₉₂) en un lector Lab Systems Multiskan MS. La cuantificación de los anticuerpos específicos se realizó comparando un pool de sueros positivos (pool estándar), obtenido de la mezcla de volúmenes iguales de sueros de la semana 5 del esquema de inmunización de un refuerzo, más 5 y 9 del esquema de inmunización de 2 refuerzos de las ovejas inmunizadas. A este pool estándar se le asignó un título de anticuerpos específicos en unidades arbitrarias (UA). En cada placa se incluyeron diluciones apropiadas del pool a los efectos de construir una curva de calibración. A partir de las D.O₄₉₂ y las U.A del pool estándar se estimó la mejor recta por mínimos cuadrados (D.O₄₉₂ vs. U.A); las U.A para cada muestra analizada se calculan interpolando el promedio de las absorbancias obtenidas de cada muestra y multiplicando por el factor de dilución. Las UA se definieron de forma tal que al pool estándar sin diluir le corresponden 6000 UA.

3.3.2 Subclases IgG₁ e IgG₂.

La producción de IgG₁ e IgG₂ anti- *Fh*LAPr de las distintas semanas fue evaluado utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IgG₁ y anti-IgG₂ de oveja producida en ratón gentileza del Dr. Richard Kennedy de la Universidad de Sídney (Beh, 1987). Al igual que para IgG total, las placas fueron sensibilizadas con 4 µg/ml de una solución de *Fh*LAP-Trxr y bloqueadas con BSA 1% en PBS.

Luego que las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 1 hr y se lavaran 3 veces con PBS-Tween 20 0,05%, el siguiente paso consistió en la incubación del sobrenadante del cultivo de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales anti-IgG₁ o anti-IgG₂ de ovejas (1:500) a 4 °C toda la noche. Luego de lavar las placas como se describió anteriormente, se incubaron a 37 °C por 1 hr con el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) (1:10000). La reacción se evidenció a través de la incubación con H₂O₂/OPD como se describió para IgG total.

3.3.3 Métodos estadísticos.

Se determinó la media aritmética de la carga parasitaria y de los valores de las U.A tanto de los grupos inmunizados como sus respectivos controles negativos. El porcentaje de protección se calculó como $[(u-v)/u] \times 100$, donde u es la media de la carga parasitaria del grupo control negativo y v es la media de la carga parasitaria del grupo experimental. Las diferencias entre los grupos experimentales y sus controles se analizaron a través del análisis de la media de cada grupo y fueron evaluadas por un método paramétrico de análisis de la varianza (one way ANOVA, SPSS 20 para Windows) seguido de la prueba de C-Dunett. Cualquier diferencia fue considerada significativa cuando los valores de p fueron iguales o menores a 0.05. Para evaluar la correlación entre la inversa del título de anticuerpos y la carga parasitaria se realizaron dos pruebas no paramétricas: la prueba de correlación de Spearman y la prueba de correlación de Kendall.

3.4 Inmunoreactividad en la semana del desafío de los sueros del ensayo sobre una *FhLAPr*

3.4.1 Western blot

A modo de verificar si hay reconocimiento por parte de los sueros del ensayo de inmunización de la proteína recombinante *FhLAPr* obtenida más recientemente en nuestro laboratorio se realizó un Western blot utilizando la *FhLAPr* y pools de sueros de la semana del desafío de todos los grupos de experimentación y suero pre-inmune según el método que se describe a continuación. Se realizó una SDS-PAGE al 10% de *FhLAPr* en stock (10.6 mg/ml) y continuación, se realizó una transferencia semi-seca a una membrana de Inmobilon PVDF de 0,2 μm (Millipore). Se incubó la membrana con metanol 100% por algunos segundos, luego se sumergió en agua destilada para retirar el exceso de metanol y finalmente se equilibró con el buffer Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%v/v pH 8,3 (buffer de transferencia). La transferencia se realizó durante 1 hr a 1,0 mA/cm² en un equipo de transferencia (ATTO, Japón). Se tiñó la membrana con colorante Fast Green (Sigma) durante 30 segundos a modo de verificar la transferencia. Se destiñó el colorante con agua y se bloquearon los sitios inespecíficos de la membrana con la solución de bloqueo (PBS 10 mM pH 7,3, Tween-20 1%, leche descremada 1%) durante 1 hr a 37 °C en agitación suave. La membrana se lavó 3 veces durante 5 min con solución de lavado PBS-T (PBS 10 mM pH 7.3, Tween-20 0,1%) y se incubó con una dilución los distintos pools de sueros del ensayo de inmunización correspondientes a la semana del desafío. Los sueros fueron diluidos en PBS-T (1:1500) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Se prosiguió con otra serie de 3 lavados durante 5 min con PBS-T 0,1% y a

continuación se incubó con el anticuerpo anti-IgG de oveja conjugado a peroxidasa (Sigma, dilución 1:3000) diluido en PBS-T 0,1% durante 3 hr a temperatura ambiente. Una última serie de 3 lavados durante 5 min con PBS-T 0,1% dio paso a la incubación con la solución de revelado compuesta por 10 ml de Buffer Trietanolamina, 2 ml de 4-cloro, 1-naftol (Sigma) en metanol 2,8 mM y 15 µl de peróxido de hidrógeno 30%.

3.5 Inmunoreactividad sobre extractos proteicos de distintos estadios de *F. hepatica*

A modo de observar si existe reconocimiento diferencial por parte de un pool de sueros del grupo donde se obtuvo mayor protección de los extractos proteicos de juveniles y adultos de *F. hepatica* se realizó un Western blot a partir del método que se describe a continuación. Se realizó una SDS-PAGE al 12,5% en condiciones no reductoras de 15 µl de un stock de extracto proteico de adulto (concentración inicial 109 mg/ml), 15 µl de un stock de extracto proteico de juveniles (1,06 mg/ml), 10 µl del stock de *FhLAPr* (10,6 mg/ml) y 15 µl de BSA concentración final 20 mg/ml. A continuación, se realizó una transferencia semi-seca a una membrana de Immobilon PVDF de 0,2 µm (Millipore) según el método descrito anteriormente para el Western blot. Una vez bloqueados los sitios de unión inespecífica se realizó la incubación con una dilución en PBS-T 1:1500 durante 1 hr a temperatura ambiente y en agitación suave. Se realizó una serie de 3 lavados durante 5 min con PBS-T 0,1% y a continuación se incubó con el anticuerpo anti-IgG de oveja conjugado a peroxidasa dilución 1:3000 diluido en PBS-T 0,1% durante 3 hr a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces durante 5 min con PBS-T 0,1%. Finalmente, se reveló con una solución

conteniendo DAB al 50% con H₂O₂ al 2% en PBS pH 7,4 y la reacción se detuvo con varios lavados de agua destilada.

3.5.1 Desenquiste de las metacercarias

Se utilizaron metacercarias *F. hepatica* adquiridas de la Dirección de Laboratorios Veterinarios Miguel C. Rubino (DI.LA.VE). Se separaron aproximadamente 1000 metacercarias sobre un filtro con una malla de 74 µm (Costar, Netwell) montado sobre una placa de cultivo celular (NUNC, Dinamarca) se lavaron con abundante agua destilada para retirar la mayor parte de las impurezas. El desenquiste se basó en el protocolo modificado de Rinaldi *et al.* (2006). En primer lugar, las metacercarias se trataron con una solución de hipoclorito al 10% durante 5 min a temperatura ambiente, con el fin de eliminar la cubierta externa. Se hizo el seguimiento del proceso a través de la lupa estereoscópica hasta que se observó el borde traslúcido y los primordios del aparato digestivo. Se lavó con abundante agua destilada para retirar cualquier residuo de la solución de hipoclorito. A continuación, se agregó aproximadamente 5 ml de una solución HCl 50mM con L-Cisteína 1% (Sigma) y una solución NaHCO₃, pH 8, 120 mM y NaCl 140 mM con Taurocolato al 2% (Sigma) Todas las soluciones se utilizaron a una temperatura de 38,5 °C. La mezcla fue filtrada en un filtro de 0,22 µm sobre el filtro de 74 µm conteniendo las metacercarias y se incubó entre 1-2 hr a 38,5 °C. A continuación, se traspasaron los JRDs que atravesaron el filtro de 100 µm a un medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma).

3.5.2 Cultivo de JDRs

Una vez desenquistados, entre 500 y 700 JDRs fueron mantenidos en cultivo durante 48 hr. Los juveniles eclosionados se colocan en un pocillo de placas de cultivo con un medio RPMI-1640 enriquecido con lactalbúmina (1 mg/ml), glucosa (1mg/ml), hipoxantina 1 mM, serotonina 1 mM, insulina (8 mg/ml), hidrocortisona (1mg/ml), T₃ (0.2 mM), gentamicina 25 mg/ml y anfotericina 2 µmg/ml en una atmósfera de CO₂ a 37 °C (Rinaldi *et al*, 2006). El medio se renovó cada 12 hr con RPMI-1640.

3.6 Inmunofluorescencia.

A modo de detectar comprobar la reactividad de los sueros provenientes de los animales del ensayo en los tejidos de los JRDs se utilizó un pool de sueros de la semana de desafío del grupo Adyuvac 50, un refuerzo que desarrolló los mayores niveles de protección, empleando el pool de sueros de semana 0 del mismo grupo como control negativo. Para ello se ensayaron dos métodos de fijación de tejido.

3.6.1. Cortes finos de JRDs.

Los JRDs fueron fijados al sumergirlos en un bloque conteniendo O.C.T (Shandon-Cryomatrix, Thermo Scientific) y fueron enfriados rápidamente a -80 °C. Se realizaron cortes finos de 5 µm por medio de criostato (Sakura-Coldtome). Los cortes se colocaron sobre un portaobjeto previamente silanizado (Kniitel-Starfrost).

Las láminas conteniendo los cortes finos de JDRs se bloquearon con una solución de bloqueo (suero de caballo de complementado (Sigma) 0,5%, y BSA

(Sigma) 1% en PBS). Las láminas se lavaron durante 5 min, 3 veces con PBS y se incubaron toda la noche a 4 °C con una dilución 1:1000 de un pool de suero policlonal en una solución diluyente (suero de caballo de complementado 0,1% y BSA 0,1% en PBS) en cámara húmeda. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS, de 5 min para luego realizar la incubación durante 1 hr a 37 °C del anticuerpo anti-IgG de oveja acoplado a Isocianato de Fluoresceína (FITC) (Sigma) en una dilución 1:2000 en solución diluyente. Luego las láminas se lavaron con PBS durante 5 min, 3 veces y se montaron con glicerol al 60% en PBS. Los parásitos se observaron empleando un microscopio de fluorescencia NIKON ELCPSE 80I. Se utilizaron como controles negativos una lámina conteniendo los JRDs sin ningún tratamiento, una lámina de control del conjugado FITC y una lámina conteniendo a los JDRs incubados con suero pre-inmune del mismo grupo.

3.6.2. JRDs enteros previamente fijados con Paraformaldehído.

Entre 20 y 30 JDRs cultivados por 48 hr se colocaron en un tubo conteniendo paraformaldehído 4% toda la noche. A continuación, se lavaron con PBS durante 10 min y se incubaron por 4 hr a 4 °C en una solución de bloqueo y permeabilización conteniendo suero de caballo de complementado 0,1%, BSA 0,1% y Triton 100X (Sigma) 0,5%. El lavado se realizó con PBS durante 10 min y se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de oveja conjugado a FITC (1:2000) toda la noche a 4 °C. A continuación, se lavaron con abundante PBS y se colocaron sobre un portaobjeto en el menor volumen de PBS posible. Se realizó el montaje con glicerol al 60% y se observaron en el microscopio referido.

A modo de verificar si los JRDs sin ningún tipo de tratamiento de fijación mostraban autofluorescencia, los JRDs con 1 hr. post-desenquiste y colocados sobre un portaobjetos en PBS se observaron en el microscopio de fluorescencia NIKON ELCIPSE 80I. Asimismo, con el mismo objetivo, los JRDs vivos con 2 hr de cultivados y en PBS se visualizaron en un microscopio invertido de fluorescencia NIKON ELCIPSE Ti.

3.7 Inmunohistoquímica.

Se llevó a cabo el ensayo de inmunohistoquímica como método alternativo al de inmunofluorescencia sobre los JRDs enteros con 1 hr de cultivados. Los JRDs se colocaron sobre un portaobjetos previamente silanizado y se fijaron con el flameo de la llama de mechero y a continuación con el tratamiento de acetona a -20 °C por 20 min.

Para determinar presencia de actividad peroxidasa endógena en los JRDs fijados en acetona, éstos se sometieron al sustrato peroxidasa DAB 60% con peróxido de hidrógeno 3% en PBS aproximadamente por 5 min observándose la reacción a través de microscopía de campo claro.

3.71 Determinación de la inmunoreactividad de los sueros con distinto grado de protección.

Los JRDs fijados en acetona se lavaron con abundante PBS y se sometieron al bloqueo de sitios de unión inespecíficos de las inmunoglobulinas con BSA 1% en PBS. A continuación se redujo la actividad peroxidasa endógena presente

en el tejido mediante la incubación de una solución de metanol 10% con peróxido de hidrógeno 3% aproximadamente por 10 min. Posteriormente, se realizó la incubación por 1 hr a 37 °C en cámara húmeda de una dilución 1:1000 de IgGs purificadas (ver más abajo) provenientes de un pool de sueros de la semana 6 de ovejas inmunizadas con *Fh*LAP-Trxr en Adyuvac 50 con el agregado de Cloruro de Sodio (NaCl) 0,9% para disminuir la unión de IgGs de menor afinidad. Se lavaron las láminas con una solución de PBS-Tween 20 0.05% durante 5 min por 3 veces y a continuación se llevó a cabo la incubación del anticuerpo anti-IgG de oveja conjugado a peroxidasa (Sigma) (1:1000 en PBS), durante 1 hr a 37 °C. La reacción antígeno-anticuerpo se evidenció mediante el agregado del sustrato peroxidasa DAB 60% en PBS, pH 7,4 con el agregado de peróxido de hidrógeno 3% durante 5 min. La reacción se siguió mediante microscopía de campo claro. A continuación, se lavaron 3 veces las láminas con PBS-Tween 0,05% durante 5 min y se realizó una contra-tinción con hematoxilina durante 10 seg. Se lavó con agua destilada durante 10 min y se deshidrató con porcentajes crecientes de etanol (70%, 75%, 80%, 90%; por 1 min cada uno y 95% durante 2 min). Finalmente, se sumergió brevemente en xilol y se montó la lámina con Bálsamo de Canadá (Bio Pack). Las láminas se observaron en campo claro en un microscopio Nikon 80I.

3.8 Purificación de IgGs de suero policlonal anti-*Fh*LAPr.

Se purificaron las IgGs a partir de pools de sueros correspondientes a las semanas 0 y 6 (desafío) del grupo Adyuvac 50 en el esquema de un refuerzo a modo de verificar su reactividad sobre los tejidos de los JRDs.

3.8.1 Delipidación de sueros

Con el fin de retirar los lípidos de los pools de sueros se tomó 0.5 ml de cada uno de los pools estudiados, se le agregó 25 μ L de sulfato dextrano (Sigma) y se agitó suavemente durante 10 min. Luego se agregó 45 μ L de CaCl_2 y se agitó nuevamente durante 10 min. Se centrifugó a 9200g por 20 min. y se descartó el pellet. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de 0,22 μ m.

3.8.2 Purificación de IgGs mediante cromatografía de afinidad con proteína G.

Para la purificación de las IgGs del suero policlonal anti-*Fh*LAP-Trxr de ovejas se realizó una cromatografía de afinidad utilizando proteína G (Hitrap Protein G, Sigma). La columna se equilibró con aproximadamente 5 volúmenes de tampón Glicina 0,1 M, pH 8,2. Luego se aplicó la muestra, previamente delipidada por la columna en un régimen de flujo constante. A continuación, se lavó la columna con aproximadamente 4 volúmenes de tampón de equilibrio y se procedió a la elución de las IgGs. Para ello se utilizó un gradiente de pH de tampón Glicina 0.1 M con Azida de Sodio pH 2,5 y 2,7, respectivamente. El eluido se tomó en fracciones de 1 ml sobre un tampón Tris-HCl 1 M.

3.8.3 Seguimiento de la purificación de IgGs

La purificación de las IgGs fue seguida mediante la determinación de la Densidad Óptica a 280 nm (D.O_{280}) de las distintas fracciones purificadas y electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% conteniendo SDS en condiciones reductoras (5 mM de DTT) y no reductoras. La determinación de la cantidad de proteínas se llevó a cabo a través del método del ácido bicinquinónico (BCA Pierce, Kit Assay).

3.9 Determinación de la inhibición de la actividad enzimática de *FhLAPr in vitro* por sueros del ensayo de inmunización

Se realizó un ensayo fluorogénico *in vitro* para investigar los efectos de los sueros del ensayo de vacunación sobre la actividad de *FhLAPr*. Para ello se llevó a cabo la incubación de *FhLAPr* con $MnCl_2$ y el sustrato de Leucina acoplado comercialmente al fluoróforo amino metil cumarina (Leu-AMC) en tampón de glicina (0,1 M, pH 8,3).

Un total de 50 μ L de *FhLAPr* (10,6 mg/mL) se pre-incubó con 4 μ L de $MnCl_2$ (1 mM) durante 10 min a temperatura ambiente para su pre-activación. Luego se tomaron distintas alícuotas de 100 μ L de la mezcla y se incubaron a 37 °C por 30 min con una serie de diluciones seriadas de pools de sueros de cada uno de los grupos inmunizados con *FhLAP-Trxr* obtenidos en las semanas 0 y las correspondientes al desafío (6 o 10 según el caso). A continuación, se agregó 1 μ L del sustrato Leu-AMC (10 mM), se incubó la mezcla por 1 hr y se midió la liberación de AMC en un espectro fluorímetro FLUOStar OPTIMA (BMG Labtech) a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión 460 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4. RESULTADOS

4.1.1 Integridad del sistema de expresión pThioHisC en *E. coli*.

Dado que se partió de una colonia recombinante *E. coli* Topo 10 en stock, se verificó la integridad del sistema de expresión de células transformadas previo al cultivo de las mismas. Las tres colonias que se ensayaron expresaron una proteína prominente a la altura de los 67 KDa cuando se realizó la inducción con IPTG 1 mM. La misma corresponde al peso molecular aparente esperado para la proteína de fusión *FhLAP-Trxr* (**Figura 5**)

4.1.2 Purificación de *FhLAPr*

Se realizó el seguimiento de la purificación de *FhLAP-Trxr* por cromatografía quelante a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5 % en condiciones no reductoras. La **figura 6** muestra el perfil de migración de las proteínas eluidas en los escalones de 20 mM (**a**) y 50 mM (**b**) de Imidazol. La banda correspondiente a *FhLAP-Trxr* monomérica se observa a la altura de los 66 KDa. En la **figura 6a** se muestra que la elución de la proteína de fusión se da al final del gradiente de 20 mM y en menor proporción al inicio del gradiente de 50 mM (**Figura 6b**). En la **figura 6** también podemos observar que la proteína no se resuelve como una única banda en la electroforesis indicando que podría existir contaminación con proteínas del sistema de expresión de *E. coli* o se estarían produciendo versiones truncadas de la proteína recombinante. Las bandas de mayor peso molecular también podrían corresponder a asociaciones de la forma monomérica de *FhLAPr*.

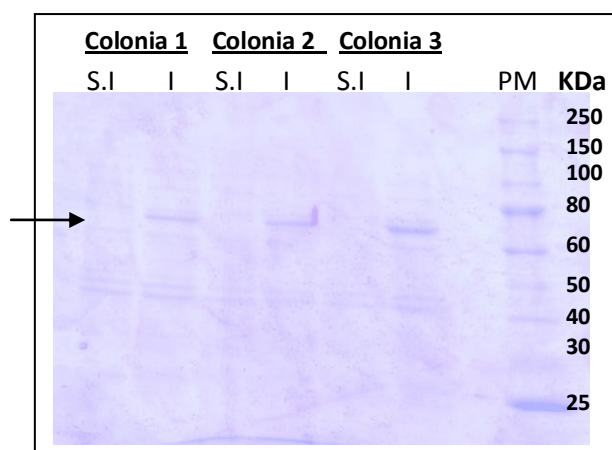


Figura 5. Verificación de la integridad del sistema de inducción del plásmido pThioHisC-*FhLAP*-Trx en las colonias recombinantes *E. coli* Topo 10. Las 3 colonias ensayadas mostraron inducción positiva (I) respecto del control sin inducir (SI). La flecha indica la banda a la altura de la proteína *FhLAP*-Trxr.

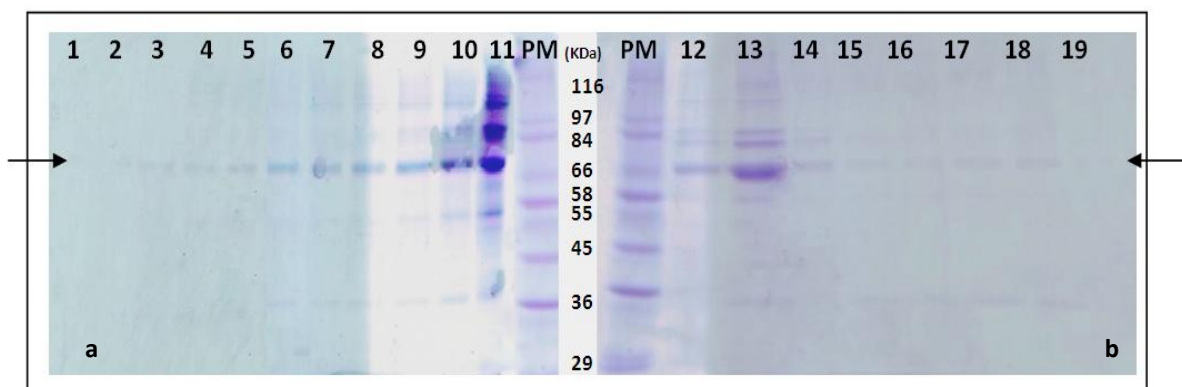


Figura 6. Seguimiento de la purificación de la *FhLAP* recombinante de *F. hepatica* a través de SDS-PAGE al 12.5% a) Purificación de las distintas fracciones en el escalón de Imidazol 20 mM. b) Purificación de las distintas fracciones en el escalón de Imidazol de 50mM. Con la flecha se indica la banda que correspondería a *FhLAP*-Trxr (67,7 KDa).

4.1.3 Rendimiento de la purificación de *FhLAP*-Trxr

Se realizó un pool de las fracciones que mostraron la banda a la altura de los 67 KDa, se dializó el pool contra el tampón de lisis sin imidazol y se cuantificó las proteínas por el método de ácido bicinequínico. El rendimiento de la cromatografía quelante con la resina Chelating Sepharose Fast Flow fue de 2.99 mg/ml de proteína a partir de 500 ml de medio de cultivo.

4.1.4. Resultados de la necropsia del ensayo vaccinal

Los porcentajes de protección obtenidos para los grupos experimentales son los que se muestran en la Tabla 1. Se observa que el mayor porcentaje de protección se da para el esquema de vacunación de 1 refuerzo en el grupo Adyuvac 50 (75,1%), siguiéndole el grupo $\text{Al}(\text{OH})_3$ 1 refuerzo (54,9%), en ambos grupos se observa una reducción significativa de parásitos respecto del control (**Figura 7**). Sorpresivamente, el esquema de inmunización con 2 refuerzos tuvo una performance deficiente en cuanto al número de gusanos recuperados en la necropsia, obteniéndose para el grupo Adyuvac 50 un porcentaje del 20,1% y para el grupo $\text{Al}(\text{OH})_3$ un porcentaje de 6,10%.

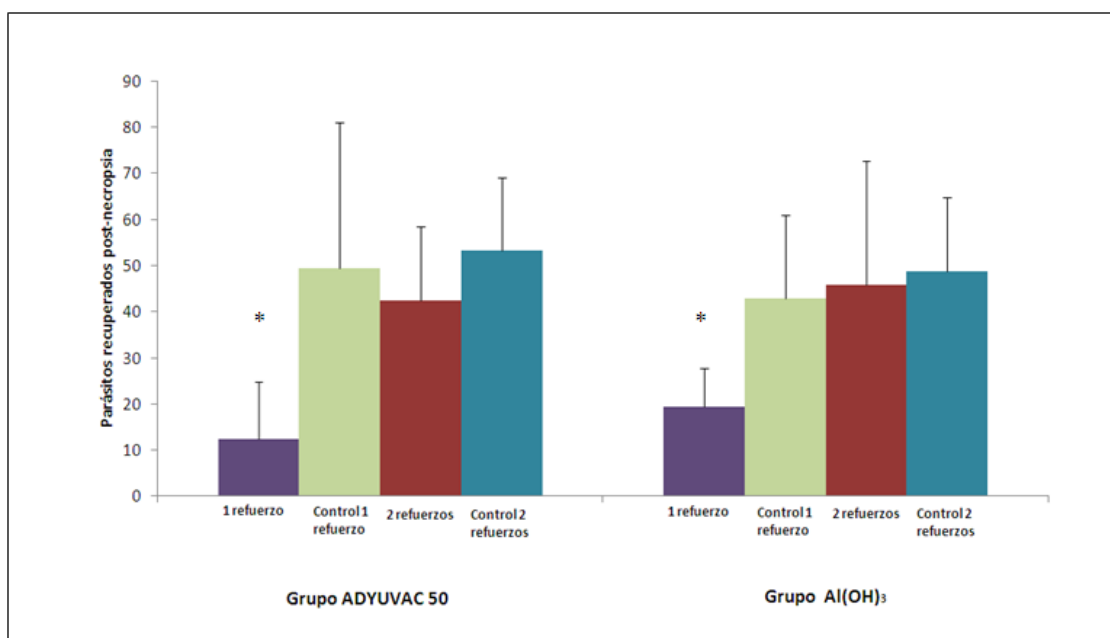


Figura 7. Gráfico comparativo de las cantidades de parásitos recuperados al final del ensayo en los distintos grupos experimentales y controles. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 1. Porcentajes de protección obtenidos en el ensayo de inmunización con *FhLAP-Trxr* formulada con Adyuvac 50 y Al(OH)₃ en los esquemas de uno y dos refuerzos.

Grupo	Número de parásitos recuperados post-necropsia		
	Parásitos/Animal	Promedio ± D.E	% Protección
<i>FhLAP-Trxr</i> en Adyuvac 50 1 refuerzo	3, 7, 37, 11, 6, 10	12, 3 ± 12,4	75,1
Control Adyuvac 50 1 refuerzo	55, 11, 105, 37, 53, 36	49, 5 ± 31,4	
<i>FhLAP-Trxr</i> en Adyuvac 50 2 refuerzos	29, 62, 26, 61, 33, 44	42, 5 ± 19,5	20,1
Control Adyuvac 50 2 refuerzos	56, 59, 54, 54, 61, 35	53, 2 ± 9,32	
<i>FhLAP-Trxr</i> en Al(OH) ₃ 1 refuerzo	16, 19, 17, 8 23, 33	19, 3 ± 8,30	54,9
Control Al(OH) ₃ 1 refuerzo	47, 58, 68, 31, 20, 33	42, 8 ± 18,1	
<i>FhLAP-Trxr</i> en Al(OH) ₃ 2 refuerzos	37, 21, 83, 57, 64, 13	45, 8 ± 26,9	6,10
Control Al(OH) ₃ 2 refuerzos	114, 58, 17, 50, 29, 25	48, 8 ± 35,5	

4.2 Análisis de la respuesta de anticuerpos anti *FhLAP-Trxr*.

4.2.1 IgG total

En todos los grupos inoculados con *FhLAP-Trxr* se observó un aumento significativo en los niveles de anticuerpos anti-*FhLAP-Trxr* respecto de los controles a partir de la cuarta semana post inmunización.

Grupos Adyuvac 50

El nivel máximo de anticuerpos anti-*FhLAP-Trxr* se alcanza en la semana del desafío tanto para el esquema de un refuerzo (semana 6) como el de dos refuerzos (semana 10). Para el esquema de un refuerzo se observa que los niveles de anticuerpos anti-*FhLAP-Trxr* a partir de la semana 6 descienden de manera significativa y se mantienen dentro de un rango aproximadamente constante hasta el final del ensayo (**Figura 8**). El esquema de dos refuerzos tuvo un comportamiento similar al esquema de un refuerzo hasta la semana 8

observándose un segundo pico en la semana 10, en el momento del desafío con metacercarias.

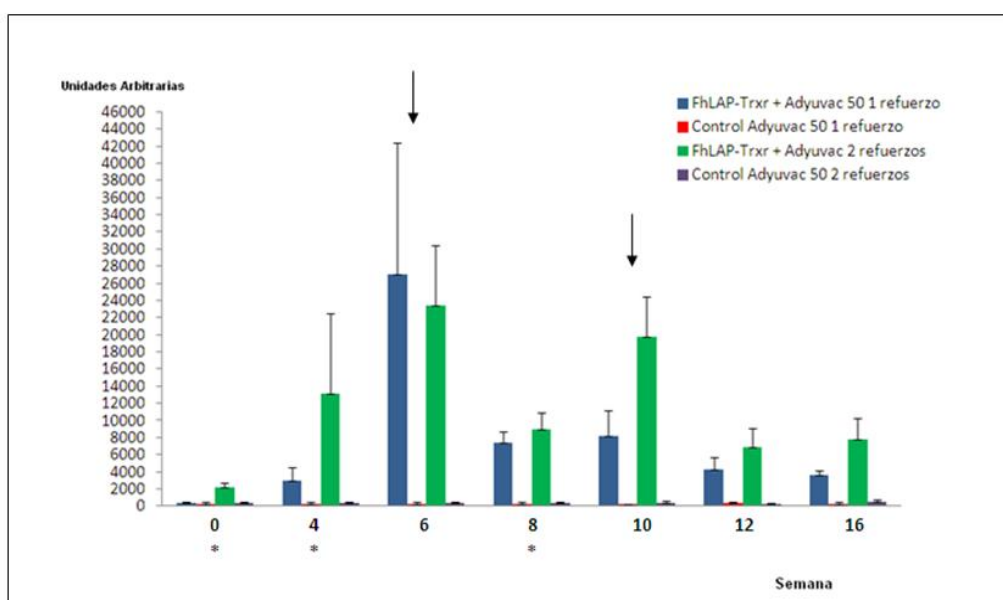


Figura 8. Niveles de anticuerpos IgG total anti-*FhLAP-Trxr* desarrollados en los esquemas de 1 y 2 refuerzos con Adyuvac 50. Los asteriscos indican las semanas de inmunización con *FhLAP-Trxr* y las flechas indican las semanas de desafío para ambos esquemas.

Grupos Al(OH)₃

Para el esquema de un refuerzo la respuesta IgG muestra un comportamiento similar al obtenido con Adyuvac 50, donde el máximo nivel de anticuerpos anti-*FhLAP-Trxr* se registra en la semana de desafío en semana 6, a partir de la cual comienza a descender y se mantiene en niveles bajos aproximadamente constantes hasta el final del ensayo. Para el esquema de dos refuerzos se observa que los niveles de anticuerpos anti-*FhLAP-Trxr* son significativamente mayores a los del esquema de un refuerzo alcanzando un máximo en la

semana de desafío (semana 10). Estos niveles son los más elevados y se mantienen hasta el final del ensayo (**Figura 9**).

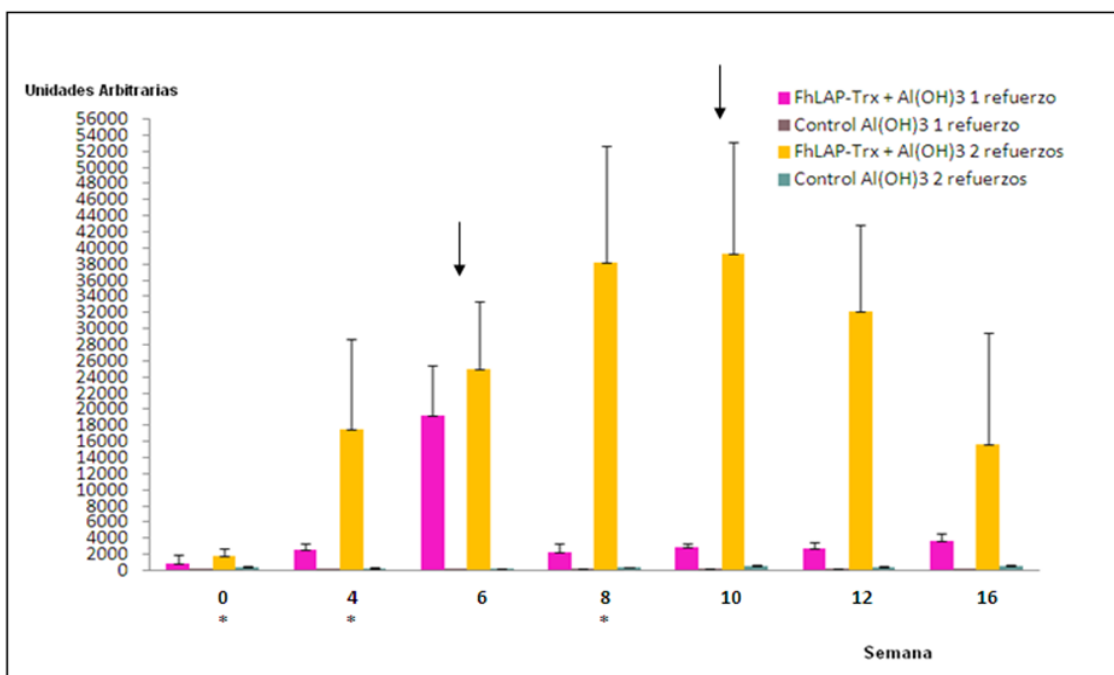


Figura 9. Niveles de anticuerpos IgG total anti-*FhLAP-Trxr* desarrollados en los esquemas de 1 y 2 refuerzos con Al(OH)₃. Los asteriscos indican las semanas de inmunización con *FhLAP-Trxr* y las flechas indican las semanas de desafío para ambos esquemas.

Para el esquema de un refuerzo, los niveles de anticuerpos anti-*FhLAP-Trxr* alcanzados son similares tanto para el grupo Adyuvac 50 como los de Al(OH)₃. Asimismo, la cinética de la respuesta fue similar con ambos adyuvantes. En cambio, para el esquema de dos refuerzos la cinética de respuesta no fue la misma y los niveles alcanzados con Al(OH)₃ son significativamente mayores a los obtenidos con Adyuvac 50, a partir de la semana 8 (**Figura 10**).

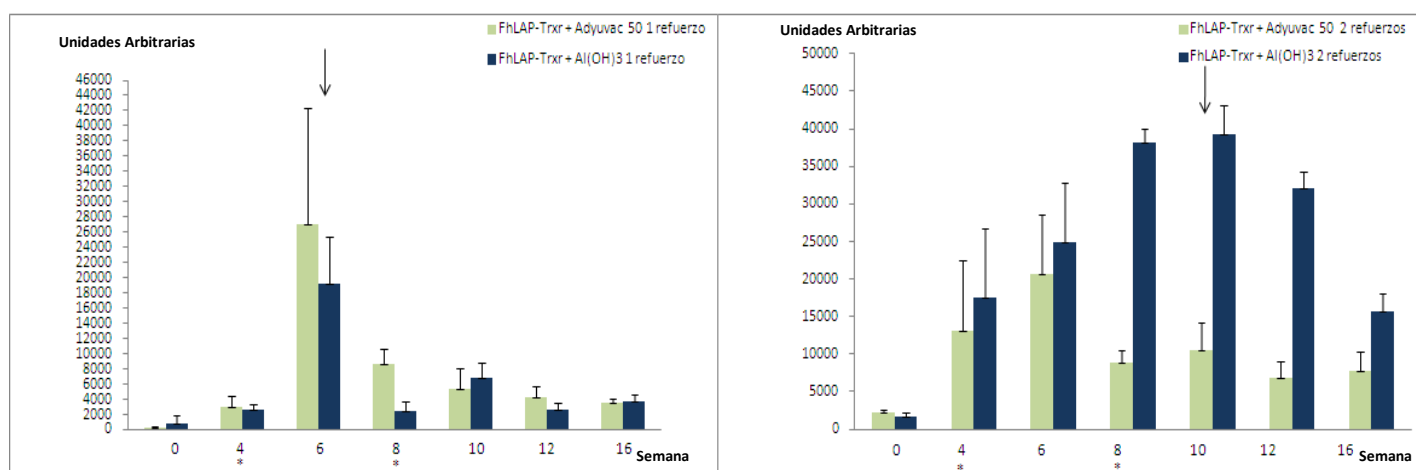
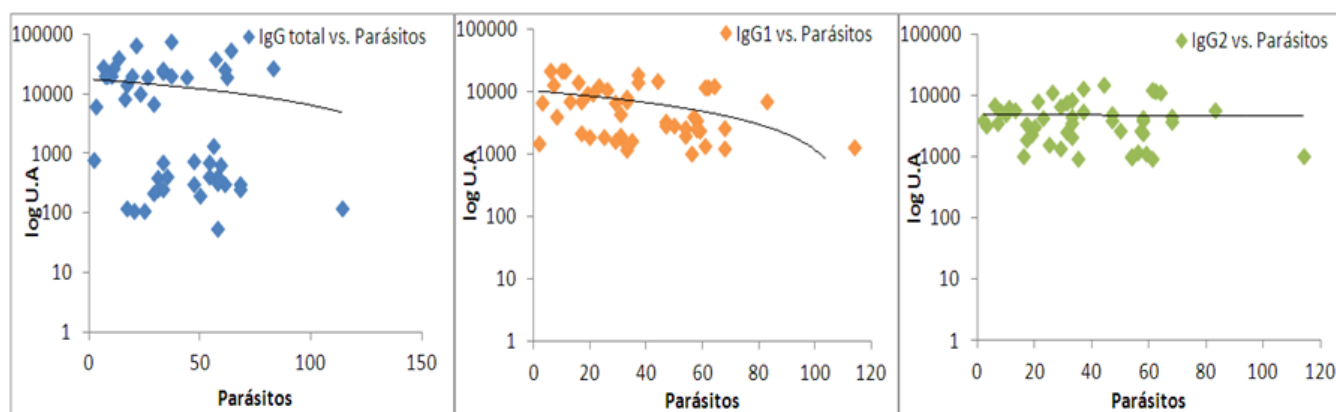


Figura 10. Comparación entre los niveles de IgG total de los esquemas de 1 y 2 refuerzos.

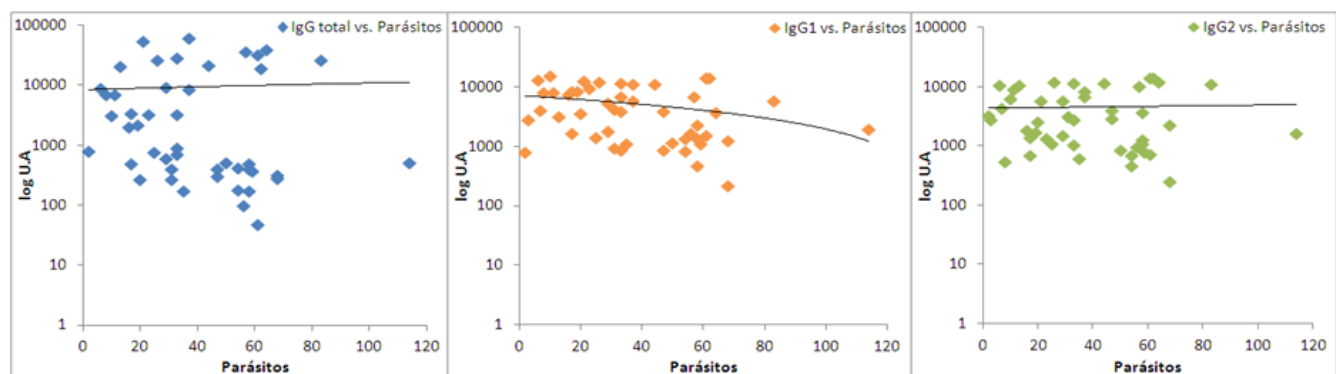
4.2.2 Correlación entre IgG total y parásitos

Se observó que en los grupos que recibieron el esquema de un refuerzo hubo una reducción significativa de la carga parasitaria respecto del grupo control. Al analizar la correlación de los niveles de anticuerpos anti-*FhLAPr* IgG totales presentes en los sueros y los parásitos recuperados en la necropsia a través del coeficiente ρ de Spearman y τ -b de Kendall se observó una correlación negativa significativa entre las U.A correspondientes a la semana 6 del esquema de un refuerzo y los gusanos recuperados en el momento de la necropsia (**Figura 11**). Sin embargo, cuando se analiza la semana 10 del desafío para el esquema de dos refuerzos no se observa correlación entre ambas variables (**Figura 12**).



Tau_b de Kendall	Parásitos	Coefficiente de correlación	IgGt	Tau_b de Kendall	Parásitos	Coefficiente de correlación	IgG1	Tau_b de Kendall	Parásitos	Coefficiente de correlación	IgG2
		Sig. (bilateral)	0,026			Sig. (bilateral)	0,022			Sig. (bilateral)	,650
		N	48			N	48			N	48
Rho de Spearman	Parásitos	Coefficiente de correlación	-,339*	Rho de Spearman	Parásitos	Coefficiente de correlación	-,313*	Rho de Spearman	Parásitos	Coefficiente de correlación	-,061
		Sig. (bilateral)	0,018			Sig. (bilateral)	0,03			Sig. (bilateral)	,679
		N	48			N	48			N	48

Figura 11. Correlación del nivel de anticuerpos en la semana 6 y el número de parásitos recuperados en la necropsia. A) IgG total vs. Parásitos. B) IgG₁ vs. Parásitos. C) IgG₂ vs. Parásitos.



Tau_b de Kendall	Parásitos	Coefficiente de correlación	-,166	Tau_b de Kendall	Parásitos	Coefficiente de correlación	-,197*	Tau_b de Kendall	Parásitos	Coefficiente de correlación	-,056
		Sig. (bilateral)	,107			Sig. (bilateral)	,049			Sig. (bilateral)	,575
		N	46			N	48			N	48
Rho de Spearman	Parásitos	Coefficiente de correlación	-,216	Rho de Spearman	Parásitos	Coefficiente de correlación	-,294*	Rho de Spearman	Parásitos	Coefficiente de correlación	-,068
		Sig. (bilateral)	,149			Sig. (bilateral)	,042			Sig. (bilateral)	,644
		N	46			N	48			N	48

Figura 12. Correlación del nivel de anticuerpos en la semana 10 y el número de parásitos recuperados en la necropsia. A) IgG total vs. Parásitos. B) IgG₁ vs. Parásitos. C) IgG₂ vs. Parásitos.

4.2.3 Análisis de la Varianza entre los grupos de IgG total

La diferencia en el nivel de los anticuerpos anti-*Fh*LAP-Trxr entre los distintos grupos en la semana de desafío (semana 6 para el esquema de un refuerzo y semana 10 para el esquema de dos refuerzos) fue evaluada a través del Análisis de la Varianza en un solo paso. Para poder llevar a cabo este tipo de análisis los datos deben ser independientes, normalmente distribuidos y deben presentar homocedasticidad. Los datos obtenidos fallan en éste último requisito, por lo que el Análisis de la Varianza debe ser seguido del test C-Dunett. A partir de los mismos, se observa en la semana del desafío tanto para el esquema de 1 refuerzo, como de 2 refuerzos una diferencia significativa en los niveles de IgG entre los grupos experimentales y los grupos control, pero no se observan diferencias significativas entre los grupos experimentales.

4.3 Subclases IgG₁ e IgG₂

Para el esquema de 1 refuerzo (**Figura 13**) se observa que la subclase predominante es el IgG₁ y que esta alcanza su máximo en la semana 6, comenzando a disminuir lentamente en las semanas posteriores a la infección. A su vez, el nivel de IgG₂ es el más bajo en el momento del desafío. Para el esquema de dos refuerzos (**Figura 14**) se observaron dos comportamientos diferentes en los grupos Adyuvac 50 y Al(OH)₃. Para el grupo Adyuvac 50 la subclase IgG₂ es ligeramente predominante, alcanzando su máximo en la semana 8, a partir de la cual comienza a disminuir progresivamente en las semanas posteriores al desafío. Por otro lado, los niveles de IgG₁ para el mismo grupo se mantienen significativamente bajos. Para el grupo Al(OH)₃ se observa que el máximo nivel de anticuerpos IgG₁ se da en la semana 6, manteniéndose hasta el momento del desafío en la semana 10. Los niveles de IgG₁ son significativamente inferiores a los de IgG₂ y su máximo se alcanza en

la semana 6, a partir de la cual comienzan a disminuir, volviendo a aumentar dos semanas post-infección.

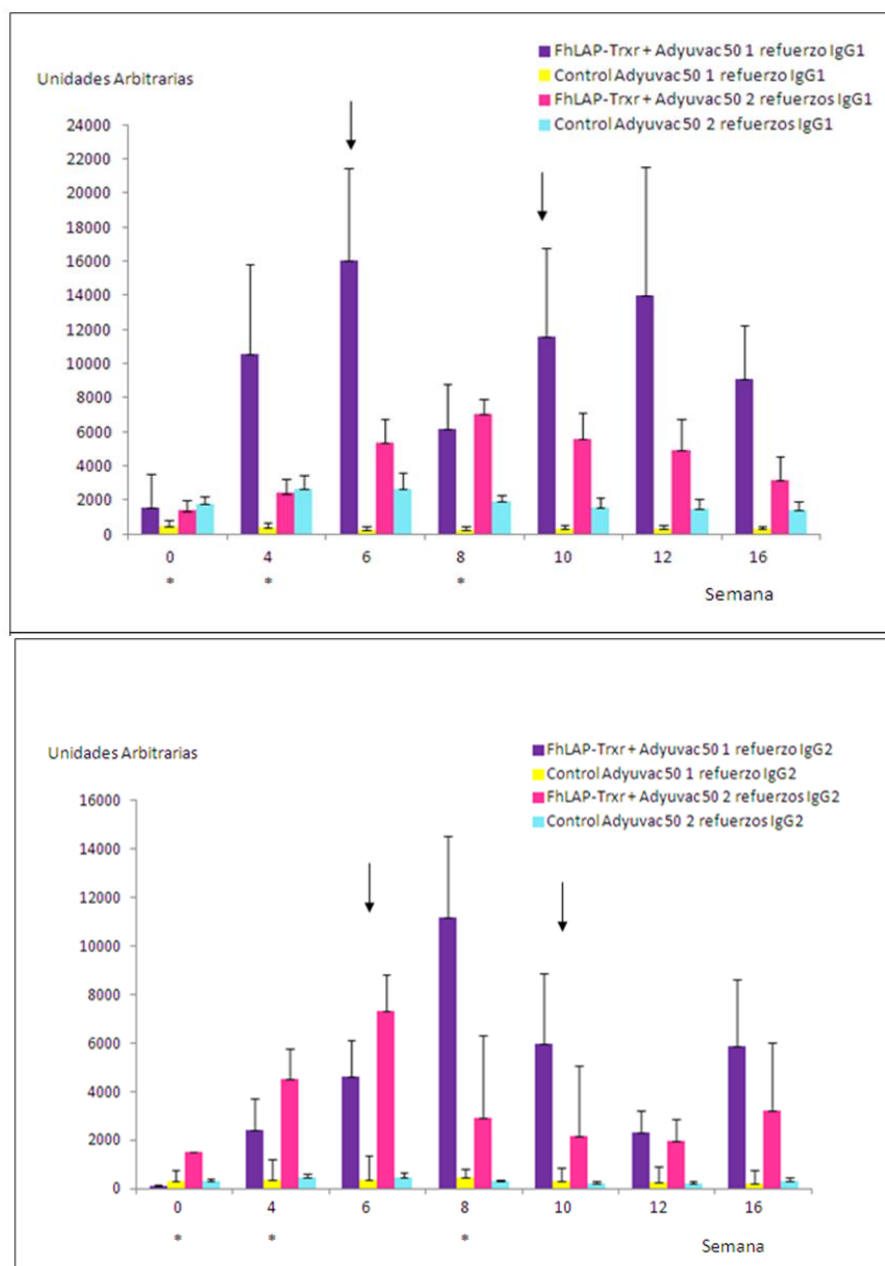


Figura 13. Niveles de anticuerpos IgG₁ e IgG₂ desarrollados a lo largo de las semanas a) Formulación *FhLAP-Trxr* administrada con Adjuvac 50 en el esquema de 1 refuerzo. b) Formulación *FhLAP-Trxr* administrada con Adjuvac 50 en el esquema de 2 refuerzos.

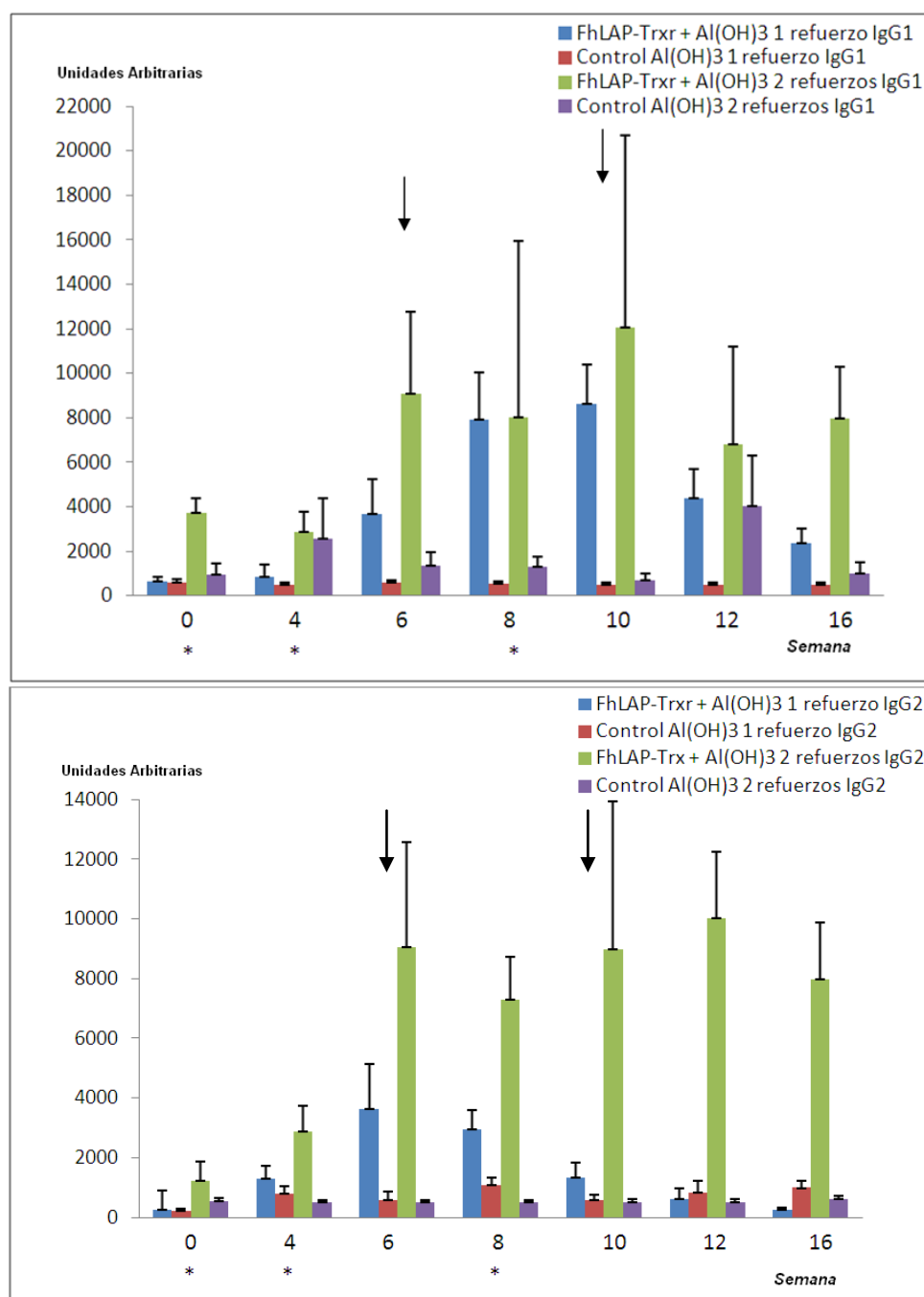


Figura 14. Niveles de anticuerpos IgG₁ e IgG₂ desarrollados a lo largo de las semanas
a) Formulación *FhLAP-Trxr* administrada con Al(OH)₃ en el esquema de 1 refuerzo. b) Formulación *FhLAP-Trxr* administrada con Al(OH)₃ en el esquema de 2 refuerzos.

A través de los tests no paramétricos de Spearman y Kendal se observó que existe correlación negativa entre el nivel de anticuerpos IgG₁ e IgG₂ anti-

FhLAP-Trxr correspondiente a la semana 6 de los grupos que recibieron el esquema de un refuerzo y la cantidad de gusanos recuperados al final del ensayo (**Figura 11**). Se observa correlación negativa significativa entre los parásitos recuperados e IgG₁ en la semana 10 los grupos de dos refuerzos, no así para IgG₂ (**Figura 12**).

4.3.2 Análisis de la Varianza en los niveles de IgG₁ e IgG₂ entre los grupos

El Análisis de la Varianza entre los grupos indica que existen diferencias significativas entre los grupos experimentales y los grupos control. Para la subclase IgG₁ existen diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos en los grupos Adyuvac 50 y Al(OH)₃ en la semana del desafío, pero no hay diferencias significativas en la semana del desafío de los grupos experimentales que recibieron el esquema de dos refuerzos. Al analizar la subclase IgG₂, se observa en la semana de desafío que no hay diferencias estadísticamente significativas para los grupos experimentales que recibieron el esquema de un refuerzo, en cambio existen diferencias significativas en la semana del desafío para los grupos que recibieron dos refuerzos.

4.3 Inmunoreactividad de los sueros al momento del desafío

4.3.1 Western blot

A modo de verificar si existe reconocimiento diferencial de los sueros de inmunización sobre una *FhLAP* recombinante sin la proteína de fusión Trx (*FhLAPr*) se realizó una SDS-PAGE de la proteína *FhLAPr* purificada a partir de una cromatografía de afinidad y se realizó la transferencia semi-seca a una membrana de PDVF. Luego del bloqueo de los sitios de unión inespecíficos y

se incubó con diluciones de los distintos sueros del ensayo y finalmente con el conjugado peroxidasa. El revelado de la reacción antígeno-anticuerpo con el sustrato 4-cloro, 1 naftol mostró que existe un patrón de reconocimiento diferencial de la *Fh*LAPr por parte de los pools de sueros de animales que recibieron el antígeno *Fh*LAPr-Trxr administrado con $\text{Al}(\text{OH})_3$ y Adyuvac 50. Esta diferencia viene dada en la intensidad de las bandas observadas a la altura de *Fh*LAPr (56 kDa) y la cantidad de bandas reconocidas por los sueros de los grupos Adyuvac 50 respecto de los grupos $\text{Al}(\text{OH})_3$ (**Figura 15**).

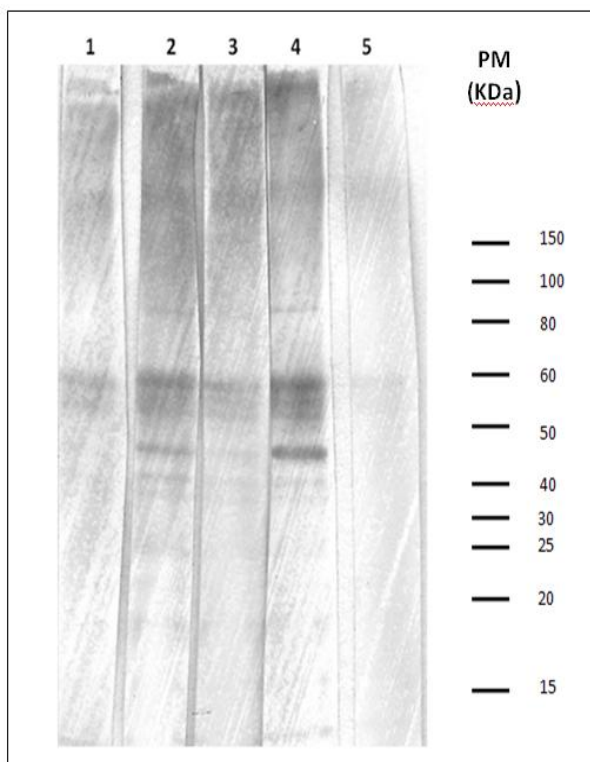


Figura 15. Western blot. Reconocimiento de *Fh*LAPr por parte de los distintos sueros generados en el ensayo de inmunización. 1) Pool de suero de semana 6 de animales inmunizados con *Fh*LAP-Trxr administrado con $\text{Al}(\text{OH})_3$ en el esquema de un refuerzo. 2) Pool de suero de semana 6 de animales inmunizados con *Fh*LAP-Trxr administrado con Adyuvac 50 en el esquema de un refuerzo. 3) Pool de suero de semana 8 de animales inmunizados con *Fh*LAP-Trxr administrado con $\text{Al}(\text{OH})_3$ en el esquema de dos refuerzos. 4) Pool de suero de semana 8 de animales inmunizados con *Fh*LAP-Trxr administrado con Adyuvac 50 en el esquema de dos refuerzos. 5) Control con el pool de sueros pre-inmune de oveja.

4.5 Reactividad de sueros anti-*Fh*LAPr frente a juveniles recientemente desenquistados.

Con el objetivo de determinar la existencia de inmunoreactividad en los sueros de los animales vacunados sobre la *Fh*LAP presente en extractos parasitarios se realizó una separación electroforética SDS-PAGE de los componentes del extracto somático de adultos y JRDS (**Figura 16**). A continuación, se realizó la transferencia a una membrada de PVDF y se incubó con una dilución de los distintos pools de sueros. El revelado de la reacción antígeno-anticuerpo con el sustrato DAB mostró que los sueros de ambos grupos inmunizados en el esquema de un refuerzo reconocen entre otras, una banda a la altura de la *Fh*LAP en el extracto adulto pero no en el juvenil. Llamativamente, el pool de sueros del grupo $Al(OH)_3$ en el esquema de dos refuerzos no reconoce la *Fh*LAPr. El pool de suero pre-inmune del grupo Adyuvac 50 no reconoce la banda correspondiente a la *Fh*LAPr y tampoco reconoce ninguna banda a la altura de *Fh*LAP en el extracto somático del adulto. En ningún caso se observa reactividad contra el extracto proteico de la forma juvenil o BSA.

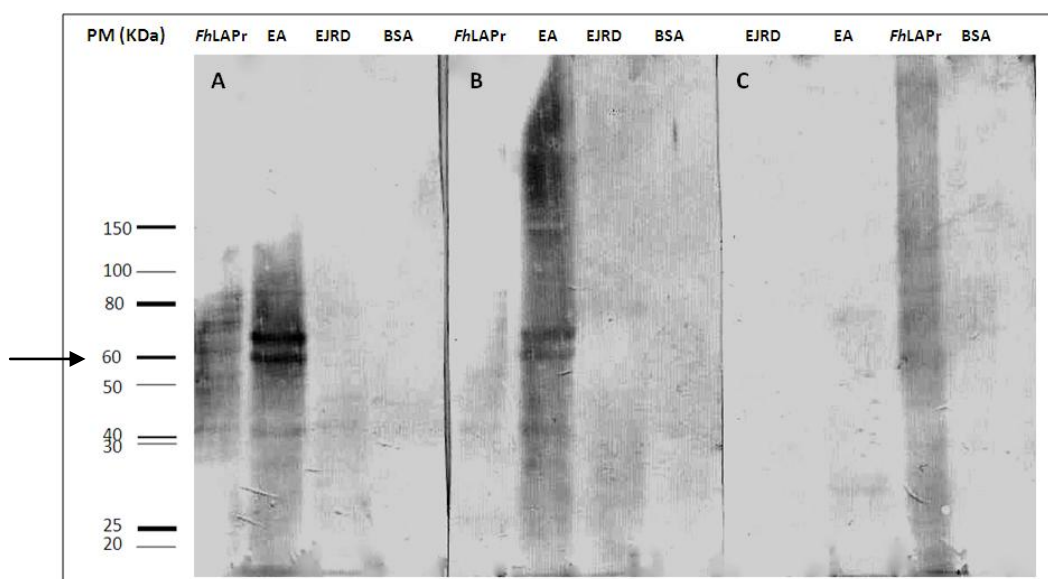


Figura 16. Western blot de extractos de *F. hepatica*. En el **panel A** se incubó con un pool de sueros de ovejas inmunizadas con *FhLAP*-Trxr en Adyuvac 50 en el esquema de un refuerzo. En el carril 1 se observa reacción con *FhLAPr*, en el carril 2 se observa reacción a la altura de de la banda correspondiente a *FhLAP* nativa entre otras bandas de distinto peso molecular. No se observa reacción en los carriles 3 (JRD) y 4 (BSA) correspondientes al extracto proteico de JRD y el control negativo con BSA. En el **panel B** se incubó con un pool de sueros de ovejas inmunizadas con *FhLAPr* con $Al(OH)_3$. No se observa reacción significativa con *FhLAPr* (carril 1), pero si se observa reacción a la altura de la banda de *FhLAP* nativa en el carril 2. Al igual que en el anterior, no se observa reacción con el extracto proteico de JRD ni BSA, carriles 3 y 4, respectivamente. En el **panel C** se incubó con un pool de suero pre-inmune de ovejas como control. No se observa reacción en ninguno de los carriles, excepto en el correspondiente al extracto proteico de adulto (carril 3) donde se observa reactividad inespecífica.

4.5.1 Cortes finos de JRD

A modo de identificar si los anticuerpos anti-*FhLAPr* generados en el ensayo de inmunización reconocen de manera diferencial las estructuras de los JRDs respecto al suero pre-inmune, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando cortes de 5 μm de tejido de JRDs embebidos en O.C.T. Para ello se incubaron los cortes con suero policlonal anti-*FhLAPr* y por otro lado como control negativo se incubaron láminas con suero pre-inmune y luego con el conjugado FITC, otra solamente con el conjugado FITC y además se

visualizaron láminas sin ningún tratamiento. Sorprendentemente, las láminas que no habían recibido ningún tratamiento revelaron intensa auto-fluorescencia (**Figura 17**). Adicionalmente, el control del conjugado FITC y el control con el suero pre-inmune desarrollaron al igual que los anteriores una intensa emisión. En la lámina correspondiente a la incubación con el suero experimental anti-*FhLAPr* no se pudo distinguir reactividad diferencial dado la intensa fluorescencia emitida (no se muestra).

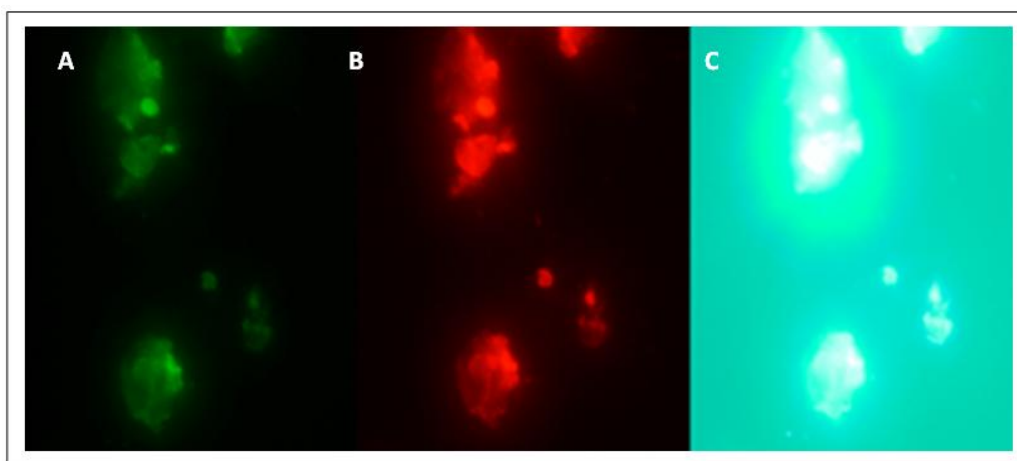


Figura 17. Perfil de auto-fluorescencia de cortes finos de JRDs sin tratamiento. **A)** Excitación a 450-490 nm, Emisión a 515 nm **B)** Excitación 515-560 nm, Emisión a 590 nm **C)** Excitación a 340-380 nm, Emisión a 425 nm. En todos los canales se observa intensa emisión de luz. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio Nikon 80I en el aumento 40x.

4.5.2 JRDs fijados con Paraformaldehído

Los controles negativos de las láminas conteniendo a los JRDs enteros fijadas con paraformaldehído, bloqueadas e incubadas con el suero pre-inmune, al igual que las láminas de control del conjugado FITC, desarrollaron un intenso perfil de auto-fluorescencia. No se observaron diferencias significativas en la

intensidad de fluorescencia cuando los JRDs fueron incubados con los pools de sueros de animales inmunizados (**Figura 18**).

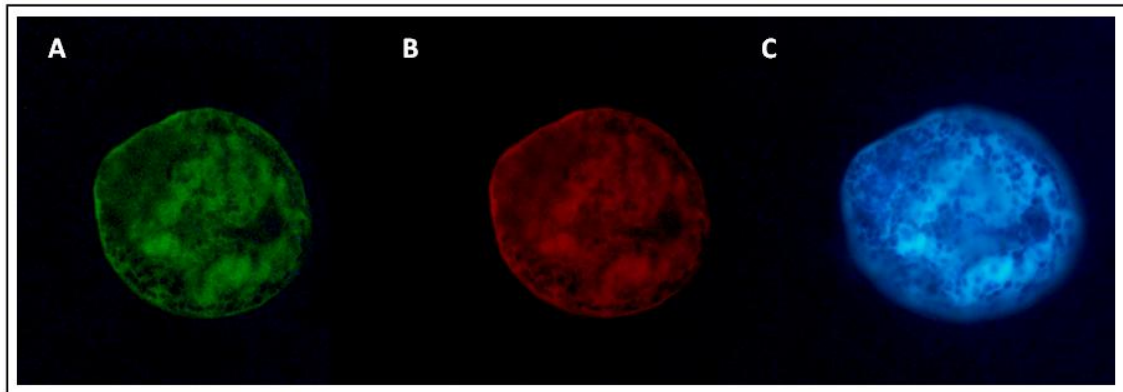


Figura 18. Perfil de autofluorescencia de los JRDs fijados con paraformaldehído 4%. **A)** Excitación 450-490, Emisión 515 nm **B)** Excitación 515-560 nm, Emisión 590 nm **C)** Excitación 340-380 nm, Emisión 425 nm. Al igual que en los cortes finos, el JRD entero fijado con acetona emite luz a distintas longitudes de onda. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio Nikon Eclipse 80I en el aumento 40x.

Para determinar si la auto-fluorescencia se vincula al proceso de fijación de los JRD, se procedió a realizar un control donde se utilizaron los JRD sin ningún tipo de tratamiento. Para ello se colocaron JRDs libres de solución de cultivo sobre un portaobjetos en una gota de buffer salino se lo cubrió con un cubreobjetos y se visualizó en el microscopio de fluorescencia. En la **Figura 19** se muestra que los JRD sin ningún tratamiento de fijación presentan emisión de luz a diferentes longitudes de onda de excitación.

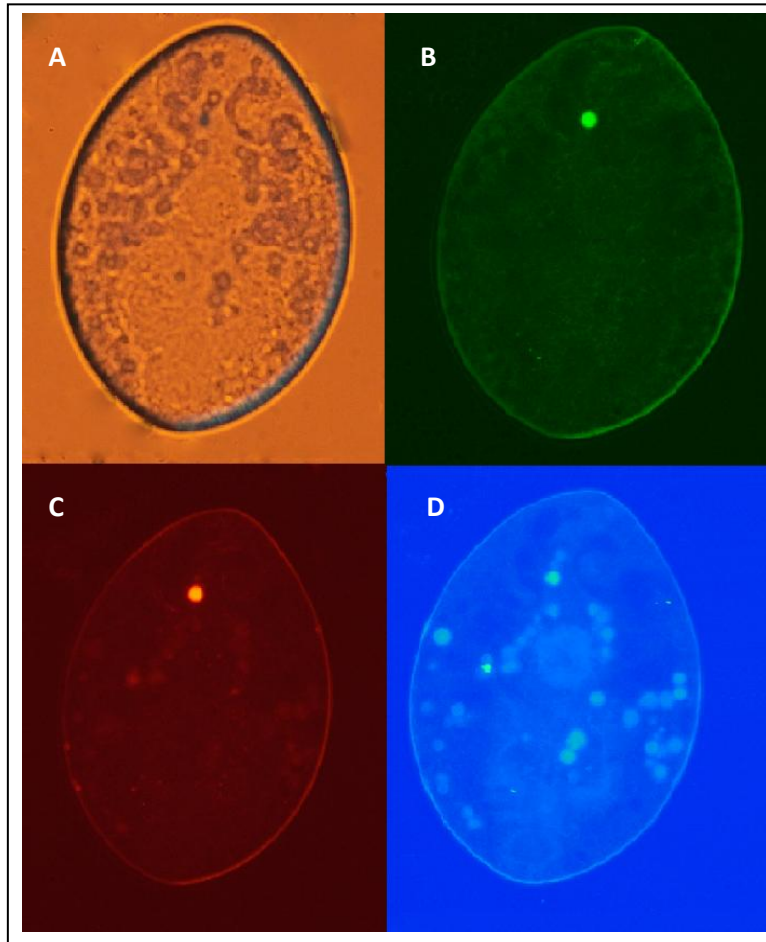


Figura 19. Imagen de JRD sin tratamiento. Los JRDs si ningún tratamiento desarrollan un perfil más tenue de auto-fluorescencia. A) Imagen en campo claro. B) Excitación a 450-490 nm. Emisión a 515 nm. C) Excitación a 515- 560 nm, Emisión a 590 nm. C) Excitación a 340-380 nm, Emisión a 425 nm. La imágenes fueron tomadas en el microscopio de fluorescencia NIKON ECLIPSE 80i en el aumento 40x.

Adicionalmente, se sometió a los JDRs vivos con 1 hr de cultivados en buffer salino a la excitación de la luz ultravioleta. Las imágenes que se obtuvieron muestran que el juvenil *in vitro* no presenta un perfil de auto-fluorescencia (Figura 20).

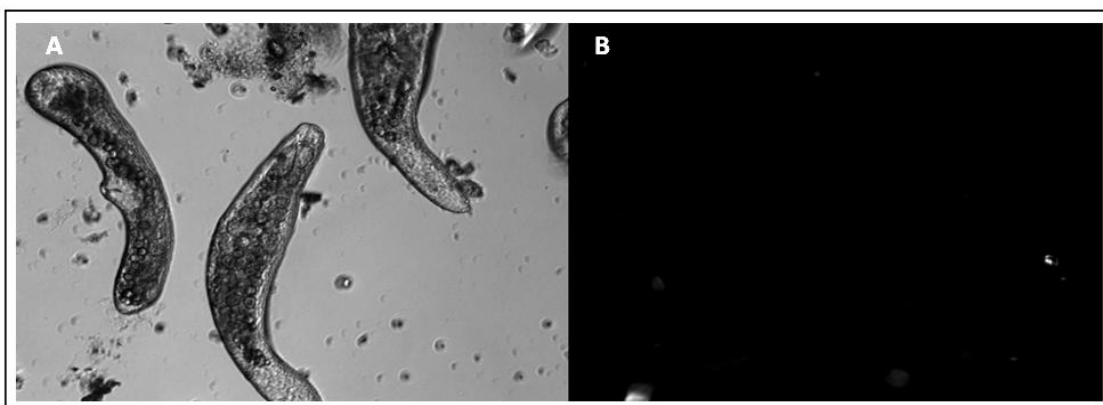


Figura 20. Imagen de JRDs vivos. **A)** Imagen de Microscopia en campo claro de JRDs con 1 hora de desenquistados. **B)** Imagen de los JRD visualizados con microscopia de fluorescencia (Excitación a 450-490 nm. Emisión a 515 nm). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia con cámara monocromática Nikon Eclipse Tí en el aumento 40x.

4.4 Purificación de Inmunoglobulinas de pool de sueros de animales inmunizados con *FhLAPr*

Las inmunoglobulinas del suero pre-inmune y suero pre-desafío de la semana 6 correspondiente al esquema de un refuerzo se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína G. En la **figura 21** se muestra el gráfico correspondiente al seguimiento de la purificación a través de la medición de la Densidad Óptica a 280 nm ($D.O_{280}$). Se observa que un pico de IgGs del suero pre-inmune eluyendo a un volumen de 11 ml de solución de elución, mientras que las del suero pre-desafío eluyen a un volumen de 10 ml y en menor concentración. A modo de evaluar si las distintas fracciones corresponden efectivamente a las IgG purificadas se realizó una electroforesis SDS-PAGE 10% en condiciones reductoras y no reductoras. En las **figuras 22A** y **22C** se observa que las inmunoglobulinas en condiciones no reductoras se encuentran entre los 150 y 250 KDa. El peso molecular aparente esperado para la molécula completa de IgG de oveja es de aproximadamente 160 KDa (Herrera *et al*, 2005). Además, las mismas se encuentran en un grado alto de pureza. En el carril

correspondiente a la fracción no retenida de la columna se observa que la banda a la altura de los 60 KDa corresponde a la albúmina, la proteína predominante del suero. En condiciones reductoras (**Figuras 22B y 22C**) se observa que las inmunoglobulinas corren en dos bandas que corresponden a dos cadenas pesadas (aproximadamente 53 KDa) y dos cadenas livianas (23-25 KDa, respectivamente). La concentración final de las IgG purificadas a partir del suero pre-inmune fue de 1,8 mg/ml y a partir del suero pre-desafío fue de 1,1 mg/ml.

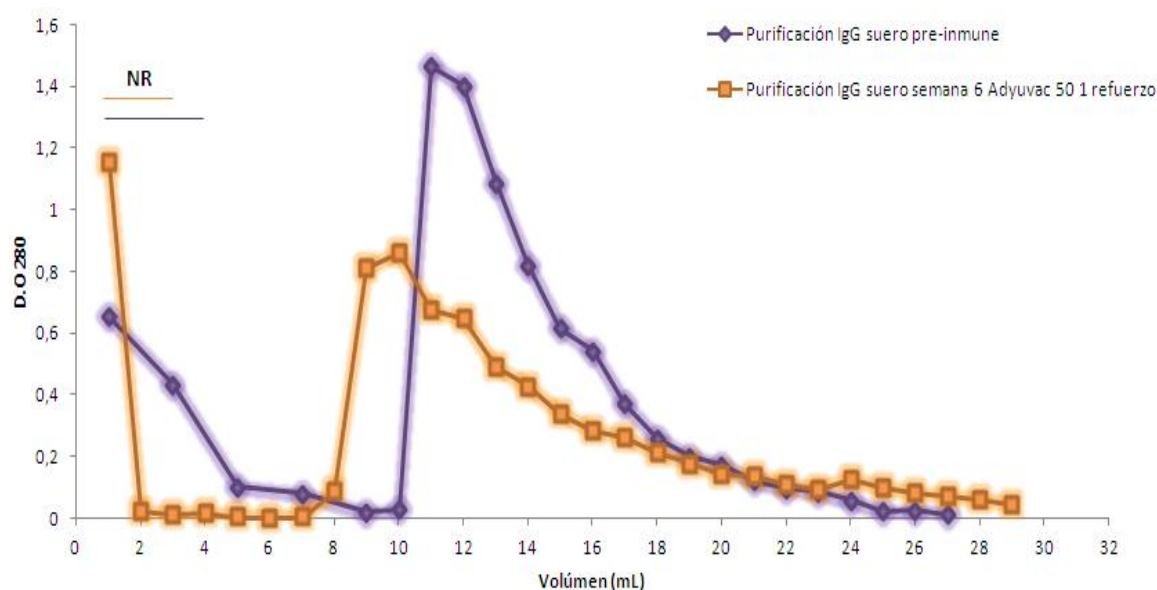


Figura 21. Cromatograma de elución de las IgG purificadas a partir del pool de sueros pre-inmunes y suero pre-desafío del grupo que mostró mayores niveles de protección (Adyuvac 50 en el esquema de un refuerzo). Se utilizó un gradiente de pH para la elución de las IgG de la columna de Hi-Trap proteína G. Se observa que la mayor fracción de las IgG purificadas eluyen al final del gradiente de 2,5 e inicio del 2,7.

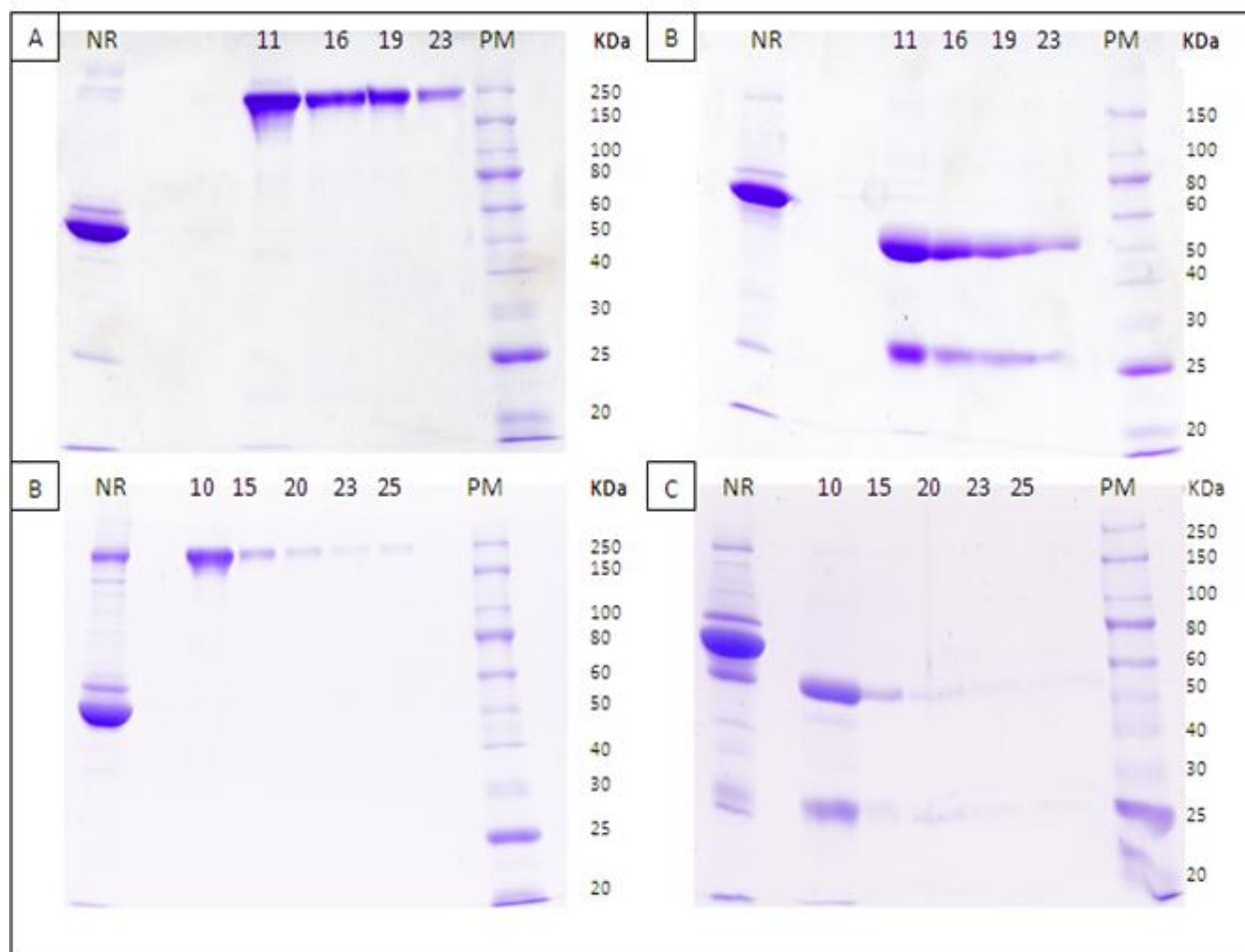


Figura 22. Seguimiento de purificación de IgG mediante SDS-PAGE al 10% de distintas fracciones de la cromatografía con proteína G **A)** Suero pre-inmune. **B)** Suero pre-inmune con DTT (5 mM). **C)** Suero pre-desafío grupo Adyuvac 50 un refuerzo. **D)** Suero pre-desafío grupo Adyuvac 50 un refuerzo con DTT (5mM).

4.6 Inmunohistoquímica

A partir de las limitantes en la visualización de reactividad de los sueros del ensayo sobre los tejidos de los JRDs con la técnica de inmunofluorescencia, se llevó a cabo la técnica de inmunohistoquímica sobre los tejidos del JRD. Se observó que los mismos fijados con el flameo de mechero y acetona presentan actividad peroxidasa endógena intensa cuando fueron sometidos al sustrato peroxidasa DAB (**Figura 23**).

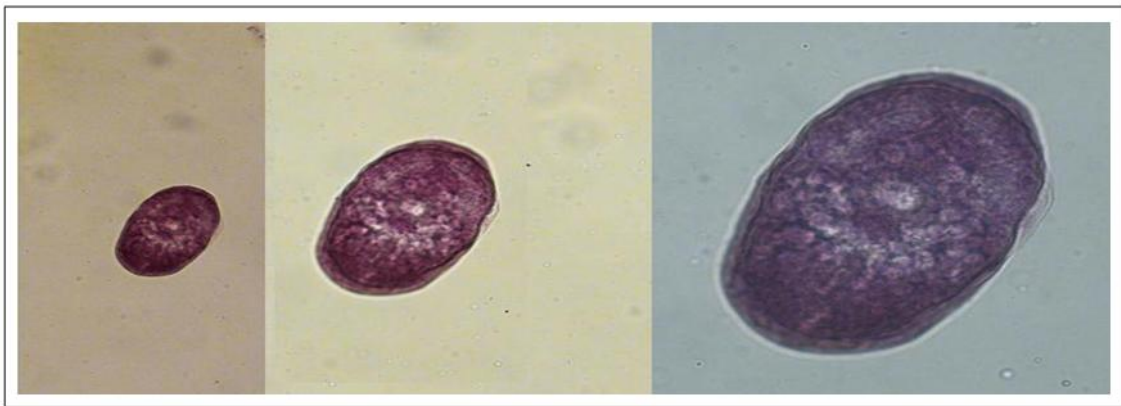


Figura 23. Actividad peroxidasa endógena de JRDs. Los preparados de JRDs fueron sometidos al sustrato DAB 50%/ H_2O_2 5% por aproximadamente 5 minutos hasta la visualización de la reacción. Se observa que los JRDs fijados con acetona a $-20^{\circ}C$ presentan intensa actividad peroxidasa endógena. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio NIKON ECLIPSE 80i en los aumentos 10x, 20x y 40x.

A modo de disminuir la actividad peroxidasa endógena, las láminas conteniendo los JRDs enteros se sometieron al tratamiento con una solución metanol/ H_2O_2 previo a la incubación con las diluciones de los sueros. Lo que resultó en una disminución significativa de la reactividad basal (**Figuras 24 y 25**).

Cuando los JRDs se incubaron con IgGs purificadas a partir de un pool de sueros provenientes del grupo de mayor protección (*Fh*LAP-Trxr administrada con Adyuvac 50 en el esquema de un refuerzo), se observó una reactividad diferencial respecto del control con IgG purificada a partir del pool de sueros pre-inmunes (**Figura 24**). La reactividad se observa principalmente en la zona anterior del parásito rodeando la zona de la ventosa oral.

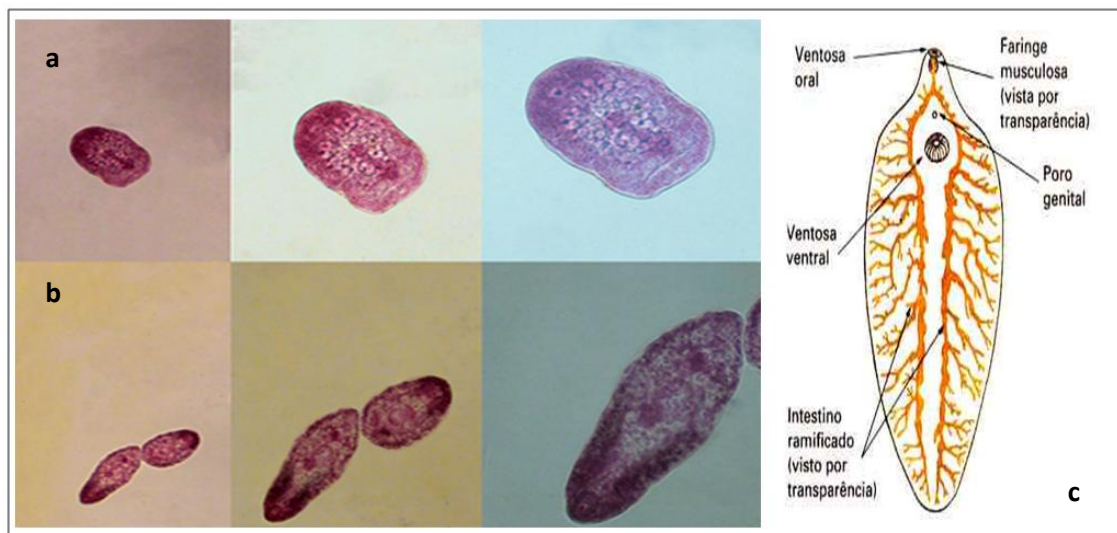


Figura 24: a) Imágenes de inmunohistoquímica con anti-IgG de oveja conjugado a peroxidasa llevado a cabo en JRDs fijados en acetona. Se observa el JRD incubado con el suero control pre-inmune. b) Se observa al JRD incubado con el suero pre-desafío. c) Esquema de estructuras observadas en la forma adulta de *F. hepatica*. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio NIKON ECLIPSE 80i en los aumentos 10x, 20x y 40x.

Para descartar que esta reactividad se debiera a la unión inespecífica del conjugado peroxidasa anti-IgG de oveja sobre los tejidos del JRD fijado, se realizó un control donde se incubaron JRDs con el tratamiento de reducción de la actividad peroxidasa endógena descrito anteriormente y se incubó con una dilución 1:1000 del conjugado a peroxidasa y se reveló la reacción con DAB/H₂O₂. En el ensayo no se observó unión inespecífica significativa del conjugado peroxidasa a la dilución de trabajo (**Figura 25**).

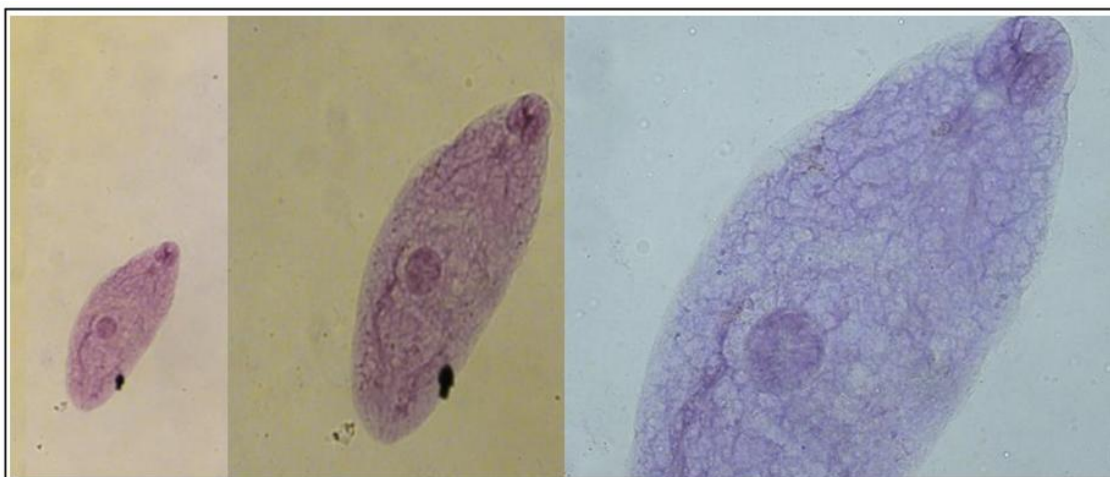


Figura 25. Control del anticuerpo peroxidasa anti-IgG de oveja conjugado a peroxidasa en la dilución 1:1000. Los tejidos fueron previamente tratados con una solución con metanol al 10% y H_2O_2 al 5% por 10 minutos para reducir la actividad peroxidasa endógena. Se incubó el conjugado durante 1 hr a 37°C. Luego de 3 lavados con PBS durante 5 minutos cada vez, se agregó el sustrato DAB 50% con H_2O_2 3%. No se observa actividad peroxidasa significativa sobre los tejidos del JRD incubados solamente con el anticuerpo anti-IgG de oveja conjugado a peroxidasa. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio NIKON ECLIPSE 80I en los aumentos 10x, 20x y 40x.

4.7 Determinación de la inhibición de actividad enzimática de FhLAPr sueros de inmunización.

A modo de identificar si los pools de sueros de oveja correspondientes a la semana 0 (suero pre-inmune) y semana de desafío (semana 6 para los grupos que recibieron el esquema de un refuerzo y semana 10 para los grupos que recibieron el esquema de dos refuerzos) tienen un efecto sobre la actividad de FhLAPr *in vitro*, se realizó un ensayo de actividad proteolítica empleando el sustrato fluorogénico Leu-AMC, incubando la enzima pre-activada con $MnCl_2$ con pools de sueros de los distintos grupos del ensayo.

No se observó disminución significativa para ninguno de los grupos estudiados, si bien se observó una leve reducción en la capacidad de clivar el sustrato en los grupos que recibieron el esquema de un refuerzo, respecto del control

positivo con *Fh*LAPr sin suero. A su vez, no se observaron diferencias entre el control positivo y el suero pre-inmune (**Figura 26**).

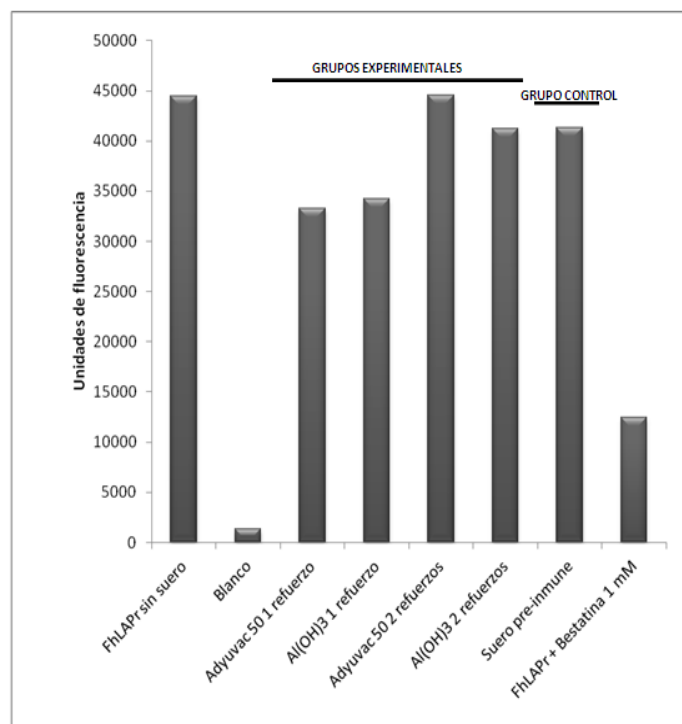


Figura 26. Ensayo de inhibición de la actividad de *Fh*LAPr incubada con pools de sueros correspondientes a la semana de desafío de los grupos que recibieron el antígeno con las distintas preparaciones de adyuvantes y esquemas de vacunación. A su vez, se incubó *Fh*LAPr con suero pre-inmune y su inhibidor específico, bestatina como control.

5. DISCUSIÓN

El desarrollo de una vacuna eficaz contra la infección causada por *F. hepatica* en rumiantes surgió como una de las alternativas de control del parásito, incluso antes de la aparición de la resistencia a las drogas utilizadas para su tratamiento. A las ventajas inherentes al estímulo del sistema inmune, se agrega en este caso, la eliminación del uso de fármacos cuya presencia ha sido cuestionada por grupos de consumidores (Jhonstone, 2000). Desde la identificación de las FABPs en la década de los 80 hasta el momento se han identificado una variedad de antígenos con capacidad de producir una respuesta protectora en distintos huéspedes experimentales y naturales. Uno de los antígenos con mejor perfil protector demostrado en rumiantes es la *FhLAP* (Piacenza, 1999; Acosta, 2008). Las LAPs han sido asociadas a procesos vitales en el ciclo de vida de otros parásitos, por ejemplo en *S. mansoni* se ha reportado que el silenciamiento de los transcritos de *SmLAP* bloquea la eclosión de sus huevos (Rinaldi, et al, 2009). En *F. hepatica* se ha postulado que su rol estaría asociado al catabolismo de péptidos en las etapas finales de la digestión de proteínas del hospedero luego del ataque de endopeptidasas inespecíficas con las *FhCat1* y *FhCat2*. La *FhLAP* ha sido expresada en su forma recombinante como proteína de fusión con la Trx de *E. coli* en este procariota y más recientemente se ha obtenido en nuestro laboratorio la *FhLAPr* sin la proteína de fusión asociada. A partir del éxito inicial obtenido en la vacunación con la *FhLAP* nativa, la forma recombinante fusionada con Trx fue evaluada en un ensayo en ovinos en combinación con diversos adyuvantes, algunos de uso comercial, siguiendo un esquema de inmunización, refuerzo en semana la 4 e infección en semana 6. Los hallazgos en la necropsia confirmaron un alto nivel protector en los grupos que recibieron

FhLAP-Trxr en combinación con adyuvante de Freund, Adyuvac 50 y $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Maggioli et al, 2011). A partir de estos resultados se desarrolló un segundo ensayo en ovinos con *FhLAP*-Trxr en combinación con estos dos últimos adyuvantes que se encuentran aprobados para su uso veterinario en Uruguay, buscando determinar el potencial protector de un esquema basado en dos refuerzos comparándolo con el esquema original. El recuento de los gusanos en el hígado mostró que los niveles de protección inducidos en los grupos inmunizados con dos refuerzos fueron francamente menores que los obtenidos con el protocolo de refuerzo único (75,1% vs 20,1% en el caso de Adyuvac 50 y 54,9% vs 6,10% en el grupo de $\text{Al}(\text{OH})_3$). A su vez, la performance protectora del grupo vacunado con *FhLAP*-Trxr en combinación con $\text{Al}(\text{OH})_3$ fue notoriamente menor a la obtenida en el ensayo previo (83% vs 54,9%). Estas diferencias nos motivaron a estudiar la respuesta específica anti-*FhLAP*-Trxr de tipo IgG total y subclases con la finalidad de detectar cambios que pudieran explicar los resultados parasitológicos y echar luz sobre los mecanismos asociados a la destrucción del parásito.

A partir de la respuesta humoral anti-*FhLAP*-Trxr desarrollada por los animales del ensayo se observó que existe una diferencia significativa en los niveles de anticuerpos anti-*FhLAP*-Trxr entre los grupos experimentales y los grupos control. Asimismo, se observó que los controles no desarrollaron una respuesta anti-*FhLAP*-Trxr significativa en ningún momento del ensayo, lo que refuerza la idea de que *FhLAP* es un antígeno escondido. El nivel de protección obtenido para el esquema de un refuerzo fue similar a los resultados obtenidos en el ensayo llevado a cabo previamente en el mismo huésped por Maggioli y cols (2011). Al igual que en el estudio del 2011, se obtuvo un máximo en el nivel de

IgG total anti-*Fh*LAP-Trxr en la semana 6 (semana de desafío con la forma infectante) para el esquema de un refuerzo, comenzando a decaer en las semanas siguientes. Con Adyuvac 50 en el esquema de un refuerzo se obtuvieron niveles de anticuerpos anti-*Fh*LAP-Trxr ligeramente mayores que los obtenidos con Al(OH)₃ que en el esquema de un refuerzo. En cambio en el esquema de dos refuerzos, donde se obtuvieron los menores porcentajes de protección, los niveles obtenidos con Al(OH)₃ fueron significativamente mayores a partir de la cuarta semana del ensayo, lo que indicaría que el incremento de anticuerpos anti-*Fh*LAP-Trxr no está necesariamente ligado a la protección. Asimismo, la cinética de respuesta en los grupos que recibieron el esquema de dos refuerzos fue distinta. Con Adyuvac 50 se obtuvo una respuesta similar a la mostrada en el esquema de un refuerzo con un ligero aumento en los niveles de anticuerpos en la semana 8. Con el adyuvante Al(OH)₃ los niveles de anticuerpos fueron crecientes a partir de la semana 4 del ensayo llegando a su pico entre la semana 8 y 10. Existe una correlación significativamente negativa entre los gusanos recuperados al final del ensayo y el nivel de anticuerpos IgG total de la semana del desafío para el esquema de un refuerzo. Sin embargo, no se observa esta misma correlación para el esquema de dos refuerzos.

Respecto a las subclases IgG₁ e IgG₂ en el presente al igual que en el ensayo anterior se obtuvo una respuesta mixta con una ligera predominancia de IgG₁ respecto a IgG₂ a partir de la semana de desafío para el esquema de un refuerzo. Este perfil de respuesta de anticuerpos vino acompañada de una menor recolección de parásitos en la necropsia respecto al control.

Para el esquema de dos refuerzos con Adyuvac 50 la subclase predominante luego del primer refuerzo fue IgG₂ hasta la semana del desafío a partir de la cual se observa una respuesta mixta IgG₂/IgG₁ y a lo largo de las semanas se observan bajos niveles de la subclase IgG₁. Por otro lado, para la formulación del antígeno *FhLAP-Trxr* y Al(OH)₃ se observa una respuesta mixta Th₂/Th₁, con predominancia de IgG₂ luego de la infección. Para éste último grupo, los niveles de anticuerpos fueron acompañados del menor porcentaje de reducción de la carga parasitaria.

Existe una correlación significativamente negativa entre IgG₁ en la semana del desafío (tanto para el esquema de un refuerzo como el de dos refuerzos) y los parásitos recuperados en la necropsia, lo que podría estar indicando que la respuesta protectora de la formulación de la vacuna estaría asociada a una respuesta Th₂. Sin embargo, existe evidencia que indica que las respuestas protectoras vienen acompañadas de la polarización hacia una respuesta Th₁, por lo que los mecanismos involucrados en el control de la infección por parte de las formulaciones administradas son de mayor complejidad y la evaluación de la respuesta humoral no sería suficiente para explicar como el huésped clarifica la infección. Una de las metodologías que podrían dar una pista es la determinación del nivel de las citoquinas expresadas por las células de los ganglios mesentéricos cercanos al hígado.

En este contexto, se observó que en los grupos experimentales existe reconocimiento de la *FhLAP* recombinante sin la proteína de fusión asociada a través del ensayo de Western blot, dado que esta forma recombinante es similar a la forma nativa, podemos inferir que los anticuerpos anti-*FhLAP-Trxr* generados con la inmunización reconocerían la forma nativa en el parásito.

Asimismo, se pudo visualizar que si bien el reconocimiento es similar entre los grupos Al(OH)_3 por un lado, los grupos Adyuvac 50 mostraron mayor reconocimiento de bandas y mayor intensidad, respecto a los grupos Al(OH)_3 . Se sabe, por medio de espectrometría de masa, que la gran mayoría de las bandas observadas corresponden a *FhLAP*.

A continuación, se estudió por medio de inmunoblot el patrón de reactividad de extractos de la forma adulta y de la forma juvenil del parásito empleando pools de los sueros del grupo de mayor y menor protección (Adyuvac 50 en el esquema de un refuerzo y Al(OH)_3 en el esquema de dos refuerzos, respectivamente) a modo de identificar si existía reactividad frente a los mismo. Los resultados que se obtuvieron indican que los sueros de los grupos experimentales reconocen una banda a la altura del monómero de *FhLAP* nativa (56 KDa) en el extracto proteico del adulto y no se observa incubando con el suero pre-inmune. Por otro lado, no hay reconocimiento por parte de los pools de sueros de los componentes del extracto proteico de los JRDs. Es postulable que esta negatividad pueda deberse a la baja concentración de proteínas del extracto, ya que la expresión de ARNm de la *FhLAP* ha sido demostrada en JRDs (Acosta, 2008).

Otros de los aspectos a tener en cuenta en el desarrollo de una vacuna, además del antígeno elegido es el adyuvante seleccionado para la formulación, ya que depende de éste en gran medida el tipo de respuesta inmune desarrollada por el huésped. La formulación de una vacuna que sea capaz de desencadenar una respuesta efectiva contra *F. hepatica* tiene diversos componentes: en primer lugar se tiene al huésped y la respuesta inmune desarrollada frente a la infección con el parásito y la susceptibilidad que

presenta ante la infección y reinfección, luego se tiene al antígeno que será responsable por la producción de anticuerpos específicos contra una actividad fundamental para el parásito que permitirá limitar el desarrollo de su ciclo de vida. Finalmente, tenemos el tipo de respuesta inmune que debe desarrollar el huésped para que la vacuna proporcione protección frente al invasor. En este sentido el adyuvante elegido, el sitio de inoculación y el esquema de vacunación tienen un rol fundamental en el diseño de la vacuna (Hecker *et al*, 2012). Los adyuvantes pueden ser distintas moléculas en las que se pueden incluir las sales minerales como el hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio utilizados ampliamente en vacunas para uso humano y veterinario. Sin embargo, son poco útiles en varias ocasiones, ya que son débiles en desencadenar una respuesta celular. Sorprendentemente, muy poco se sabe sobre los mecanismos moleculares operativos asociados al potencial adyuvante en éstos compuestos. Las emulsiones también tienen capacidad adyuvante, en esta categoría encontramos el Adyuvante Completo e Incompleto de Freund, Montanide, Lipovant y Adyuvac 50. Se trata de emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite que incluyen algún producto bacteriano. Su mecanismo de acción es generar un depósito en el sitio de inyección donde el antígeno está disponible por un largo período para que sea captado por las células de la inmunidad innata. La mayoría, posee la desventaja de causar una fuerte reacción inflamatoria, por lo que su utilización se restringe al uso veterinario (revisado en Morris *et al*, 1999). En el presente estudio, el adyuvante Adyuvac 50 de Laboratorios Santa Elena junto al antígeno *FhLAP-Trxr* utilizado en el esquema de un refuerzo mostró los mejores resultados en cuanto a protección.

Dado que la evidencia apunta a que la protección se verifica sobre los estadios invasivos tempranos del parásito, nos planteamos determinar la reactividad de los sueros vacunados sobre los tejidos de los JRDs. Uno de los objetivos planteados en este estudio fue la determinación del reconocimiento diferencial entre un suero de inmunización anti-*Fh*LAP-Trxr, respecto al suero pre-inmune mediante microscopia de fluorescencia. Los JRDs demostraron poseer una fuerte auto-fluorescencia luego del proceso que incluyó el corte por crióstato y la fijación en paraformaldehído. Incluso la ausencia de tratamiento de fijación no consiguió abolir la intensa auto-fluorescencia observada en los tejidos del organismo lo que sugiere que el estrés y muerte generados asociados a la metodología expuesta podría desencadenar la exposición de moléculas fluorescentes en regiones específicas del juvenil. La auto-fluorescencia en *F. hepatica* está caracterizada para la cubierta externa de la forma quística y en los gránulos vitelinos del adulto. En la forma quística de *Sphaeridioterma globulos* (trematodo parásito) se ha caracterizado a través de ensayos histoquímicos la presencia de una lipofuscina (Huffman, 1985) Por otro lado, se ha identificado lipofuscinas auto-fluorescentes en una variedad de células eucariotas, éstas se encuentran asociada a procesos de estrés y daño oxidativo y además constituyen un tipo de marcador asociado al envejecimiento celular (Höhn *et al*, 2012). En nematodos se ha descrito la acumulación de lipofuscinas en el intestino como resultado de la inducción de estrés oxidativo (Yu *et al*, 2011). Hasta la fecha, no hay registros de la misma para *F. hepatica*, si bien se han identificado en el transcriptoma una serie de lipoproteínas expresadas de forma diferencial asociadas a los estadios juvenil, inmaduro y adulto (Robinson *et al*, 2009).

Una de las alternativas a la inmunofluorescencia más comúnmente utilizadas es la inmunohistoquímica. Los ensayos de inmunohistoquímica llevados a cabo sobre los tejidos previamente permeabilizados de JRDs revelaron una reactividad diferencial del grupo experimental con mayor protección respecto al control. Esta reactividad se observa principalmente en la zona anterior del juvenil en regiones asociadas a la ventosa oral y región intestinal anterior del parásito. También se observa reactividad, aunque en menor grado en otras localizaciones aleatorias del juvenil. El reconocimiento de los anticuerpos generados en la inmunización contra *FhLAP* se corresponde con los datos previamente obtenidos sobre los tejidos del adulto a partir de ensayos histoquímicos, los que revelaron la presencia de actividad leucina aminopeptidasa en la zona del lumen del intestino y en menor proporción en el tegumento (Acosta et al, 1998).

El mecanismo protector propuesto generado por la inmunización con enzimas proteolíticas es la inhibición de la actividad por medio de los anticuerpos específicos inducidos (Wu et al, 2007). En el caso de *FhLAP*, durante el primer ensayo con la forma nativa se reportó la existencia de una fuerte inhibición de la actividad enzimática por incubación con IgG purificadas provenientes de los sueros hiperinmunes de los animales vacunados (Piacenza et al, 1999). Aprovechando los disímiles resultados en la protección obtenidos en el presente ensayo se llevó a cabo un ensayo similar para determinar si los pools de sueros de los animales correspondientes a los distintos grupos experimentales tenían la capacidad de bloquear la actividad de la enzima. Para ello se incubó *FhLAPr* activada con $MnCl_2$ con pools de sueros de cada uno de los grupos inmunizados con *FhLAP-Trxr* y uno de los grupos control con

suero pre-inmune. Se observó que los sueros de todos los grupos experimentales no fueron capaces de inhibir la actividad enzimática sobre el Leu-AMC y no se observaron diferencias significativas respecto al grupo pre-inmune y al control sin anticuerpos.

En definitiva, se observó que existe una correlación inversa significativa entre los niveles de anticuerpos IgG anti-*Fh*LAP-Trxr e IgG₁ con la cantidad de gusanos recuperados en la necropsia. Sin embargo, la respuesta fue predominantemente Th₂/Th₁ a lo largo de las semanas para todos los grupos. Por otro lado, hubo un aumento en los niveles de anticuerpos anti-*Fh*LAP-Trxr en el grupo Al(OH)₃ en el esquema de dos refuerzos que presentó los menores porcentajes de reducción parasitaria. En este mismo grupo se observó que luego del desafío hubo una inversión en los niveles de las subclases, pasando a predominar IgG₂ sobre IgG₁. Esto contrasta con la evidencia que se ha acumulado en distintos ensayos de vacunación de que los niveles significativos de protección frente a *F. hepatica* están asociados a una respuesta Th₁. Estos factores o la combinación de ellos pudieron haber tenido un impacto negativo sobre la protección frente al parásito. Sin embargo, no es posible basarse únicamente en la respuesta humoral para predecir la reducción de la carga parasitaria.

Finalmente, se constató que hay una reactividad diferencial sobre los tejidos del JRD por parte de los sueros del grupo de mayor protección respecto del suero pre-inmune. Sin embargo, los sueros del ensayo no fueron capaces de bloquear la actividad de la *Fh*LAPr *in vitro*.

5.1 Perspectivas.

Dado el fracaso del esquema de dos refuerzos, una de las alternativas que se plantean es la modificación del esquema de vacunación permitiendo un lapso de tiempo mayor entre el primer y segundo refuerzo. La *FhLAPr* utilizada con Adyuvac 50 en el esquema de un refuerzo mostró los mejores resultados en cuanto a protección contra la fasciolosis ovina. Debido a que ya se tiene disponible la proteína *FhLAPr* sin la proteína de fusión Trx sería conveniente llevar a cabo un nuevo ensayo de vacunación utilizando el antígeno sin la proteína fusionada. A partir del mismo sería útil el análisis de la respuesta celular (reclutamiento de eosinófilos, mastocitos y basófilos) y de las citoquinas expresadas semana a semana para tratar de dilucidar con mayor exactitud que células intervienen en el proceso de protección, en qué momento del ciclo de vida del parásito actúan y qué función desempeñarían. En cuanto a la respuesta humoral, sería interesante profundizar en el conocimiento del rol de los anticuerpos IgA e IgE en el ensayo de inmunización con un antígeno de estas características.

Otras proteínas demostraron tener un nivel interesante de protección contra *F. hepatica*, por lo que una de las perspectivas más interesantes es la inmunización con *FhLAPr* en combinación con otros antígenos. Es regla general que una ruta metabólica no depende únicamente de una actividad enzimática en especial en sus pasos clave. Por lo que sería más efectiva una vacuna que ataque distintos blancos fundamentales para la sobrevivencia del parásito.

Dada la disponibilidad de herramientas de biología molecular e Inmunología es posible la producción de un antígeno quimérico conteniendo determinantes antigénicos de distintas proteínas.

6. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, D (1991). Epidemiología y control de *Fasciola hepatica* en el Uruguay. En Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos para su prevención y control en Argentina y Uruguay. (eds) Nari, A y Fiel, C, Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur, pp 233- 236.

Acosta D, Goñi F y Carmona C (1998). Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. **84**, 1-17.

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.

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

Alvarez-Sánchez, MA, Mainar-Jaime, RC, Pérez-García, J, Rojo-Vázquez FA (2006). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. Vet Rec. **23**, 424-5.

Andrews, S (1999). The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: Fasciolosis. JP Dalton (Ed) CAB International. 1-20.

Anthony RM, Urban JF Jr, Alem F, Hamed HA, Rozo CT, Boucher JL, Van Rooijen N, Gause WC. (2006). Memory Th₂ cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites Nat Med.**12**, 955-60.

Armour, J, Dargie, JD, Doyle, JJ, Murray, M, Robinson, P and Rushton B (1974). Immunization against fasciolosis. Proc. 3rd. Int. Cong. Parasitol., Munich, 494.

Beh KJ (1987). Production and characterization of monoclonal antibodies specific for sheep IgG subclasses IgG₁ or IgG₂. Vet Immunol Immunopathol. **14(2)**:187-96

Belkaid Y (2007). Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. Nat Rev Immunol. **7**, 875-88. Revisión

Berasain P, Carmona C, Frangione JB, Dalton JP and Goñi F (2000). *Fasciola hepatica*: a secreted cathepsin L- like proteinase cleaves host immunoglobulin. Exp. Parasitol **94**, 99-110.

Berasain P, Goñi F, Mc. Gonigle F, Dowd A, Dalton JP, B. Frangione, and Carmona C (1997). Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matix and basement membrane components. J. Parasitol. **83**,1-5.

Boray, J C (1967). The effect of host reaction to experimental *Fasciola hepatica* infections in sheep and cattle. IN: E. J. L. Soulsby (Editor). The reaction of the host to parasitism. Elvert, Marburg. Germany, 119-22.

Bossaert K, Jacquinet E, Saunders J, Farnir F, Losson B (2000). Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol. **29**, 17-34.

Bossaert K, Farnir F, Leclipteux T, Protz M, Lonneux JF, Losson B. (2000). Humoral immune response in calves to single dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol. **87**, 103-23.

Brennan GP, Fairweather I, Trudgett A, Hoey E, McCoy, McConville M, Meaney M, Robinson M, McFerran N, Ryan L, Lanusse C, Mottier L, , Solana H, Virkel G, Brophy PM (2007). Understandin triclabendazole resistance. Exp Mol Pathol **82**, 104-9.

Burley SK, David PR, Taylor A and Lipscomb WN (1990). Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7-A resolution. Proc Natl Acad Sci U S A **87**, 6878-82.

Burley SK, David PR, and WN, Lipscomb (1991). Leucine aminopetidase. Bestatin inhibition and a model for enzyme-catalized peptide hydrolysis. Proc. Natl. Acad. Sci **88**, 6916-20.

Campbell, NJ, Greeg, P, Kelly, JD and JK Dincen (1978). Failure to induce homologous immunity to *Fasciola hepatica* in sheep vaccinated with irradiated metacercariae. Vet. Parasitol. **4**,13-152.

Carmona C, Smith A and Dalton JP. (1993). Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. Mol. Biochem. Parasitol. **62**, 9-18.

Carmona C, McGonigle S, Dowd AJ, Smith AM, Coughlan S, McGowran E, Dalton JP (1994). A dipeptidylpeptidase secreted by *Fasciola hepatica*. Parasitology. **109 (Pt 1)**, 113-8.

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(3)**:697-700.

Cervi L, Rossi G, Cejas H and Masih, DT (1998). *Fasciola hepatica* induced immune suppression of spleen mononuclear cell proliferation: role of nitric oxid. Clin. Immunol. Immunopathol, **87**, 145-154.

Cervi L, Rossi G, Masih DT (1999). Potential role for excretory-secretory forms of glutathione-S-transferase (GST) in *Fasciola hepatica*. Parasitology. **119**, 627-33.

Clery D, Torgerson P, Mulcahy G (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol. **62(1-2)**, 71-82. Erratum in: Vet Parasitol **65(1-2)**, 169.

Clery DG, Mulcahy G.(1998). Lymphocyte and cytokine responses of young cattle during primary infection with *Fasciola hepatica*. Res Vet Sci. **65**,169-71.

Cornelissen, A and Schetters, T (1996). Vaccines against protozoal disease of veterinary importance. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **15**, 61–72.

Creaney, J, Wijffels, G; Sexton, J, Sandeman, R, Spithill, T and Parsons, J (1995). *Fasciola hepatica*: Localization of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. Exp Parasitol, **81**,106-16.

Creaney, J., L. Wilson, M. Dosen, R. M. Sandeman, T. W. Spithill, and J. C. Parsons. (1996). *Fasciola hepatica*: irradiation-induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. *Exp. Parasitol.* **83**, 202–215.

Dalton JP, Neill S, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moire N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule A, Donnelly S (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol.* **33**, 1173-81.

Dalton, JP and Brindley PJ. (1996) Proteases of Trematodes. In *Advances in Trematode biology* (Fried, B. and T.K. Graczyk, eds.) Boca Raton (FL), CRC Press.

Dalton JP, McGonigle S, Rolph T, and 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**, 5066-74.

Dalton JP, Neill S, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moire N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule A, Donnelly S (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases:

biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol.* **33**,1173-81.

Donnelly S, Stack CM, O'Neill SM, Sayed AA, Williams DL, Dalton JP. Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages (2009). *Parasite Immunol.* **31**, 613-22.

Dowd AJ, McGonigle S, Smith A, and Dalton JP (1994). Purification and characterization of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur. J. biochem.* **223**, 91-98.

Dowd, AS, McGonigle, S, y J.P. Dalton (1995). *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase cleaves fibrinogen and produce a novel type of fibrin cot. *Eur. J. Biochem.* **232**, 241-246.

Fairweather I (2005). Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma. *J. Helminthol.* **79**, 227–234.

Fairweather I (2011). Liverfluke isolates: a question of provenance. *Vet. Parasitol.* **176**, 1–8.

Falcón C, Carranza F, Martínez FF, Knubel CP, Masih DT, Motrán CC, Cervi L (2010). Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol.* **137(1-2)**, 36-46.

Flynn RJ, Mulcahy G (2007). Possible role for Toll-like receptors in interaction of *Fasciola hepatica* excretory/secretory products with bovine macrophages Vet Immunol Immunopathol. **120**, 31-40.

Flynn RJ, Mulcahy G (2008). Possible role for Toll- like receptors in interaction of *Fasciola hepatica* excretory/ secretory products with bovine macrophages. Infec Immun. **76**, 678-84.

Flynn RJ, Mulcahy G, Welsh M, Cassidy JP, Corbett D, Milligan C, Andersen P, Strain S, McNair J (2009). *Co-Infection of cattle with Fasciola hepatica and Mycobacterium bovis*- immunological consequences. Transbound Emerg Dis. **56**, 269-74.

Flynn RJ, Mulcahy G, Elsheikha HM (2010). Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control. Vet Parasitol. **169(3-4)**, 235-40.

Flynn RJ, Irwin JA, Olivier M, Sekiya M, Dalton JP, Mulcahy G (2011). Alternative activation of ruminant macrophages by *Fasciola hepatica*. BMC Immunol. **11**;12:63.

Guasconi L, Serradell MC, Garro AP, Iacobelli L, Masih DT (2011). C-type lectins on macrophages participate in the immunomodulatory response to *Fasciola hepatica* products. Immunology. 2011 **133**, 386-96.

Gu Y and Walling L (2000) .Specificity of the wound-induced leucine aminopeptidase (LAP-A) of tomato activity on dipeptide and tripeptide substrates. Eur J Biochem. **267**, 1178-87.

Haçariz O, Sayers G, Flynn RJ, Lejeune A, Mulcahy G (2004). IL-10 and TGF-beta1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep Immunity. **20**, 623-35.

Hamilton CM, Dowling DJ, Loscher CE, Morpew RM, Brophy PM, O'Neill SM (2009). The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. Infect Immun. **77(6)**, 2488-98.

Hecker P, Venturini C , Campero M, Odeón A, Moore D. (2012) Advances in the development of vaccines for bovine neosporosis. Rev Argent Microbiol. **44(3)**, 216-30.

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

Hatschbach PJ (1995). A *Fasciola hepatica* a sua historia. A Hora Vet (Ed.Extra); **15**: 10-1.

Herbert DR, Hölscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, Claussen B, Förster I, Brombacher F (2009). Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. Nat Immunol. **10**, 679-81.

Herrera M, León G, Segura A, Meneses F, Lomonte B, Chippaux JP, Gutiérrez JM (2005). Factors associated with adverse reactions induced by caprylic acid-fractionated whole IgG preparations: comparison between horse, sheep and camel IgGs. Toxicon. **46(7)**, 775-81.

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.

Höhn A, Sittig A, Jung T, Grimm S, Grune T (2012). Lipofuscin is formed independently of macroautophagy and lysosomal activity in stress-induced prematurely senescent human fibroblasts. *Free Radic Biol* **53(9)**, 1760-9.

Huffman JE. (1985). Structure and composition of the metacercarial cyst wall of *Sphaeridioterma globules* (Trematoda). *International Journal for Parasitology* **16**, 647-653.

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.* **23**, 230-6.

Jayaraj R, Piedrafita D, Spithill T, Smooker P (2010). Evaluation of the immune responses induced by four targeted DNA vaccines encoding the juvenile liver fluke antigen, cathepsin B in a mouse model. *Genet Vaccines Ther.* **10(1)**, 7.

Jefferies JR, Turner RJ y Burnet J. (1997). Effect of *Fasciola hepatica* excretory/secretory products on the metabolic burst of sheep and human neutrophils. *Int. J. Parasitol.* **27**, 1025-29.

Johnston AM (2000). Animal health and food safety. *Br Med Bull.* **56(1)**, 51-61.

Knight, R.A. (1980). Response of lambs to challenge infections after repeated inoculations with *Fasciola hepatica* cysts. Proc. Helm. Soc. Wash. **47**, 186-191.

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.

López-Abán J, Nogal-Ruiz JJ, Vicente B, Morrono P, Díez-Baños P, Hillyer GV, Martínez-Fernández 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*. Vaccine. **14**, 1603-12.

Martínez-Fernández AR, Nogal-Ruiz JJ, López-Abán J, Ramajo V, Oleaga A, Manga-González 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(3)**, 287-98.

Matsui M, Fowler JH, Walling LL (2006) Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. Biol Chem. **387(12)**:1535-44.

Mitchell GB, Maris L, Bonniwell MA (1998). Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. Vet Rec. **143**, 399.

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

Maggioli G, Silveira F, Martín-Alonso JM, Salinas G, Carmona C, Parra F (2011);. A recombinant thioredoxin-glutathione reductase from *Fasciola hepatica* induces a protective response in rabbits. Adv Parasitol. **43**, 323-30.

Mas-Coma, S (2005). Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. J Helminthol. **79**, 207-16.

McCarthy E, Stack C, Donnelly S, Doyle S, Mann V, Bridley P, Stewart M, Day T, Maule A, Dalton J. (2004). Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. International Journal for Parasitology.

McManus DP, Dalton JP. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology*. **133** 43-61. Revision.

McGonigle L, Mousley A, Marks NJ, Brennan GP, Dalton JP, Spithill TW, Day TA, Maule AG (2008). The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *Int J Parasitol*. **38**, 149-55.

Mendes RE, Pérez-Ecija RA, Zafra R, Buffoni L, Martínez-Moreno A, Dalton JP, Mulcahy G, Pérez J (2010). Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vaccine*. **28**, 2832-40.

Moreau E, Chauvin A, Boulard C (1998). IFN gamma and IL-10 production by hepatic lymph node and peripheral blood lymphocytes in *Fasciola hepatica* infected sheep. *Parasite*. **5**, 307-15.

Morris HJ, Martínez C, Abdala R, Campos D (1999). Adyuvantes inmunológicos. *Rev Cubana Invest Biomed* **18(2)**,130-7.

Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T, Spithill TW (2011). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Exp Parasitol*. **129**, 323-30.

Morty R and Morehead J (2002). Cloning and characterization of a leucyl aminopeptidase from three pathogenic *Leishmania* species. The Journal of Biological Chemistry. **277**, 26057-65.

Moxon JV, Flynn RJ, Golden O, Hamilton JV, Mulcahy G, Brophy (2010). Immune responses directed at egg proteins during experimental infection with the liver fluke *Fasciola hepatica*. Parasite Immunol. **32**, 111-24.

Muro A, Ramajo V, Lopez J, Simon F, Hillyer G (1997). *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. Vet. Parasitol. **69**, 219-29.

Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, Dalton JP (1998). Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. Vaccine. **16**, 932-9.

Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, Dalton JP. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. Vaccine. **16**, 932-9.

Muller G. Fasciolose. En Riet Correa et al (ed). 2001. Doenças de Ruminantes e Equinos. **2**, 118 – 130.

Nari, A y H. Cardozo (1976). Prevalencia y distribución geográfica de la fascioliasis hepato biliar en bovinos de carne del Uruguay. Veterinaria. **13**, 6.

Olaechea F, Lovera V, Larroza M, Raffo F, Cabrera R. (2011). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet Parasitol* **178**, 364-6.

O'Neill SM, Brady MT, Callanan JJ, Mulcahy G, Joyce P, Mills KH, Dalton JP. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol.* **22**, 147-55.

Pautot V, Holzer FM, Reisch, and Walling LL (1993). Leucine aminopeptidase:an inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Proc. Natl. Acad. Sci* **90**, 9906-10

Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP and Carmona C (1999).Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase iduces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect. Immun.* **67**, 1954-61.

Pleasance J, Raadsma HW, Estuningsih SE, Widjajanti S, Meeusen E, Piedrafita D (2011). Innate and adaptive resistance of Indonesian Thin Tail sheep to liver fluke: a comparative analysis of *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* infection. *Vet Parasitol.* **10**, 264-72.

Raadsma HW, Kingsford NM, Suharyanta, Spithill TW, Piedrafita D (2007). Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. *Vet Parasitol.* **28**, 275-86.

Rama J, Piedrafita D, Spithill T, Smooker P (2012). Evaluation of the immune responses induced by four targeted DNA vaccines encoding the juvenile liver fluke antigen, cathepsin B in a mouse model. *Genetic Vaccines and Therapy* **10**, 7.

Rawlings ND, Barrett AJ (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.* **15**, 205-18.

Rawlings ND, Tolle DP and Barrett A J (2004) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 32, D160-4.

Rinaldi G, Morales ME, Alrefaei YN, Cancela M, Castillo E, Dalton JP, Tort JF y Brindley PJ (2009). RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Mol Biochem Parasitol* **167**, 118-126.

Robinson MW, Menon R, Donnell SM, Dalton J P, Ranganathan S (2009). An Integrated Transcriptomics and Proteomics Analysis of the Secretome of the Helminth Pathogen *Fasciola hepatica*. *Mol. Cell Proteomics.* **8**, 1891–1907.

Robinson MW, Dalton JP, O'Brien BA, Donnelly S (2012) . *Fasciola hepatica*: The therapeutic potential of a worm secretome. *Int J Parasitol.* S0020-7519(12).

Ross, JG (1967). Studies of immunity to *Fasciola hepatica*: acquired immunity in cattle, Sheep and rabbits following natural infections and vaccine procedures. *J. Helminthol.* **41**, 33-399.

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

Salvatore L, Wijffels G, Sexton J, Panaccio M, Mailer S, McCauley I and Spithill T (1995). Biochemical analysis of recombinant glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. Mol Biochem Parasitol. **69**, 281-8.

Sandeman, R.M., Howell, M.J and N. Campbel (1980). An attempt to vaccinate sheep against *Fasciola hepatica* using a juvenile fluke antigen sheep antibody complex. Res.Vet. Sci. **29**, 255-259.

Sandeman, RM and MJ Howell (1981). Response of sheep to challenge infection *Fasciola hepatica*. Res. Vet. Sci. **30**, 294-97.

Serradell MC, Guasconi L, Cervi L, Chiapello LS, Masih DT (2009). Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. Annu Rev Immunol. **27**, 451-83.

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. **18**, 5016-22.

Sexton JL, Wilce MC, Colin T, Wijffels GL, Salvatore L, Feil S, Parker MW, Spithill TW, Morrison CA. (1994). Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody

epitopes on a three-dimensional model of the antigen. J Immunol. **152**, 1861-72.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas (2007). Infect Immun. **76**, 678-84.

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

Smith, A.M., Dowd, A., McGonigle, S., Keegan, P.S., Brenna, G., Trudgett, A., and J.P Dalton (1993). Purification of cathepsin-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. Mol. and Biochem. Parasitol **62**, 1-8.

Spithill TW, Dalton JP (1998). Progress in development of liver fluke vaccines. Parasitol Today. 14(6), 224-8.

Strater N and Lipscomb (1998). Clan MF containing co-catalytic leucyl minopeptidases. In: Barret AJ, Rawling N, Woessner JF (Eds), Handbook of Proteolytic Enzymes, Academic Press, London, pp 1382-89.

Sukhdeo, MVK and Sukhdeo, SC (2002). Fixed behaviors and migration in parasitic flatworms. International Journal for Parasitology, **32**, 329-42.

Taylor A (1993). Aminopeptidases: towards a mechanism of action. TIBS **18**, 167-72.

Tort J, PJ Brindley, Knox D, Wolfe K, and Dalton JP (1999). Proteinases and associated genes of parasite helminthes. Adv. Parasitol. **43**, 161-266.

Villegas F, Angles R, Barrientos R, Barrios G, Valero MA, Hamed K, Grueninger H, Ault SK, Montresor A, Engels D, Mas-Coma S, Gabrielli AF (2012). Administration of triclabendazole is safe and effective in controlling fascioliasis in an endemic community of the Bolivian Altiplano. *Plos Negl. Trop. Dis.* **6**:e1720.

Williamson A, Lecchi P, Turk B, Choe Y, Hotez P, McKerrow J, Cantley L, Sajid M, Craik C and Loukas (2004). A. A Multi-enzyme Cascade of Hemoglobin Proteolysis in the Intestine of Blood-feeding Hookworms. *Journal of Biological Chemistry.* **279**, 35950–57.

Wilson, L. R., R. T. Good, M. Panaccio, G. L. Wijffels, R. M. Sandeman, and T. W. Spithill. (1998). *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp. Parasitol.* **88**, 85–94.

Wynn TA (1987). Basophils trump dendritic cells as APCs for TH₂ responses. *Am J Trop Med Hyg.* **37**, 363-9.

Wu Y, Eigenbort C, Liang WC, Stawicki S, Shia S, Fan B, Ganesan R, Lipari MT, Kirchhofer D. Structural insight into distinct mechanisms of protease inhibition by antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104(50)**, 19784-9.

Yu S, Rui Q, Cai T, Wu Q, Li Y, Wang D (2011). Close association of intestinal autofluorescence with the formation of severe oxidative damage in intestine of nematodes chronically exposed to Al(2)O(3)-nanoparticle. *Environ Toxicol Pharmacol.* **32**, 233-41.

Zafra R, Pérez-Écija RA, Buffoni L, Pacheco IL, Martínez-Moreno A, Lacourse EJ, Perally S, Brophy PM, Pérez J (2012). Early hepatic and peritoneal changes and immune response in goats vaccinated with a recombinant glutathione transferase sigma class and challenged with *Fasciola hepatica*. *Res Vet Sci.* **12**, 00329-3.

Zhang WY, Moreau E, Hope JC, Howard CJ, Huang WY, Chauvin A (2005). *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Exp Parasitol.* **111(3)**, 154-9.