

Título: “Ensayo de una vacuna contra *Fasciola hepatica* en ratón”

Autor: Jackeline Checa Flores*, Cecilia Salazar y Gabriela Maggioli

Unidad de Biología Parasitaria, Instituto de Higiene, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Contacto: ekcaj.line@gmail.com

Texto resumen: La fasciolosis en Sudamérica es una enfermedad causada por *F. hepatica*, un parásito cosmopolita perteneciente a la especie platelminto. Su ciclo biológico es complejo, llevado a cabo en dos hospedadores, un molusco de agua dulce (hospedero intermediario ej. Caracol de la familia *Lymnaeidae*) y una amplia variedad de mamíferos (hospederos definitivos ej. Ganado bovino, ovino y el hombre). La enfermedad en el ganado bovino y ovino, causa disminución en la producción de carne, leche y lana. Provoca problemas con la reproducción animal, así como mayor susceptibilidad a infecciones secundarias con bacterias y/o virus. Además, se considera una enfermedad re-emergente para el hombre. Actualmente, existen tratamientos con drogas antihelmínticas pero su efecto dura poco tiempo, no evitan la re-infección y existen casos de resistencia a estos fármacos. Por esta razón, nuestro equipo busca otro tipo de tratamiento a través del desarrollo de vacunas contra *F. hepatica*, capaces de brindar una eficacia a largo plazo sin generación de residuos tóxicos para el consumo ni para el ambiente.

Palabras clave del texto: *F. hepatica*, leucin aminopeptidasa, vacunas animales

Artículo:

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria, causada por los parásitos *Fasciola gigantica* y *F. hepatica* (Andrews, 1999). *F. hepatica* es un parásito cosmopolita perteneciente al reino animal, de la especie platelminto, clase trematoda y subclase Digenea. (Andrews, 1999; Spithill *et al.* 1999).

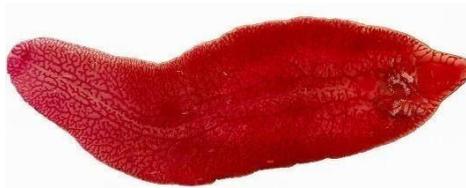


Figura 1: Forma adulta de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) 2013 000.jpg

Su ciclo biológico es complejo, llevado a cabo en dos hospedadores, primero un molusco de agua dulce (hospedero intermediario) y después una amplia variedad de mamíferos (hospederos definitivos) (Espinoza *et al.* 2010; Iturbe-Espinoza *et al.* 2013).

En Sudamérica, el principal caracol que actúa como hospedero intermediario pertenece a la familia *Lymnaeidae*, el cual se desarrolla en aguas poco profundas, como orillas de manantiales, tajamares y cañadas de corriente suave (Mas-Coma *et al.* 2009; Iturbe-Espinoza *et al.* 2013). El ganado bovino y ovino por lo general pastorean en estos

ambientes, siendo este el motivo por el cual presentan niveles tan altos de infección por *F. hepatica* (Alpízar *et al* 2013). Además, como consecuencia de proximidad, afecta al hombre.

El parásito llega a ser adulto en el huésped definitivo y se reproduce en los conductos biliares (hígado) liberando sus huevos en las heces (Bowman *et al*, 2012). Cuando se reúnen las condiciones favorables de temperatura y humedad, se desarrolla un miracidio ciliado (etapa larvaria de vida libre) dentro del huevo (Fig. 2). Este miracidio sale del huevo y nada mediante movimientos estimulados por la luz solar. Cuando el miracidio encuentra a su hospedero intermediario (caracol) ingresa dentro del mismo. Posteriormente, se desarrolla pasando por diferentes etapas del desarrollo hasta alcanzar la de cercaria (una de las etapas del desarrollo del parásito) (Fig. 2). Las cercarias dejan el caracol y nadan libremente en el agua durante pocas horas, fijándose en plantas acuáticas donde se enquistan, formando una metacercaria (Bowman *et al*, 2012; González-Morales *et al*, 2013; Iturbe-Espinoza *et al*. 2013). El hospedero definitivo (mamífero), se infecta al ingerir estas metacercarias. Cuando son ingeridas, emergen en el intestino delgado los llamados juveniles que penetran la pared del intestino desplazándose hacia la cavidad abdominal. Luego, atraviesan el peritoneo hasta llegar al hígado (Iturbe-Espinoza *et al*. 2013). Los juveniles migran por el hígado causando hemorragia, inflamación y fibrosis. Finalmente, alcanzan los ductos biliares donde se vuelven sexualmente maduros y comienzan a depositar los huevos cerrando y volviendo a comenzar un nuevo ciclo (Fig.2) (Alpízar *et al* 2013, Iturbe-Espinoza *et al*. 2013).

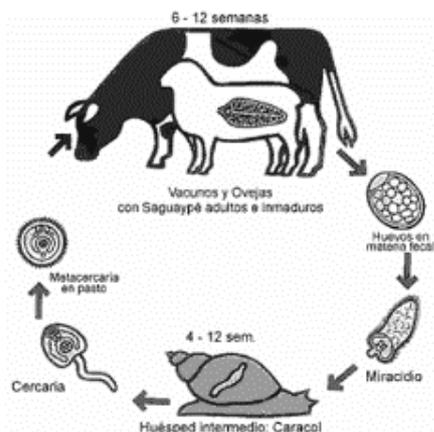


Figura 2: Ciclo de vida de *F. hepatica*
(<http://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/uedy/Publica/Cart9/Cart9.htm>)

Esta enfermedad en el ganado, causa disminución en la producción de carne, leche y lana, además causa problemas en la reproducción (abortos espontáneos e infertilidad) y vuelve a los animales más susceptibles a infecciones secundarias con bacterias y/o virus. Como consecuencia, se generan grandes pérdidas económicas estimadas en USD 3.000 millones anuales (Hatschbach *et al*, 1995; Spithill *et al*. 1999).

En el hombre, la fasciolosis puede presentar hepatomegalia dolorosa, cólicos biliares, fiebre. Hoy en día, la fasciolosis humana se considera una enfermedad re-emergente, y se estima que en el mundo 2.4 millones de personas están infectadas y 180 millones en riesgo de infección (WHO 2006; WHO 2012).

Actualmente, el control de la fasciolosis en animales se realiza antes y durante las faenas. Su prevención se basa en evitar el pastoreo en áreas donde existe el hospedero intermediario y tratamiento antihelmíntico periódico (Espinoza *et al* 2010).

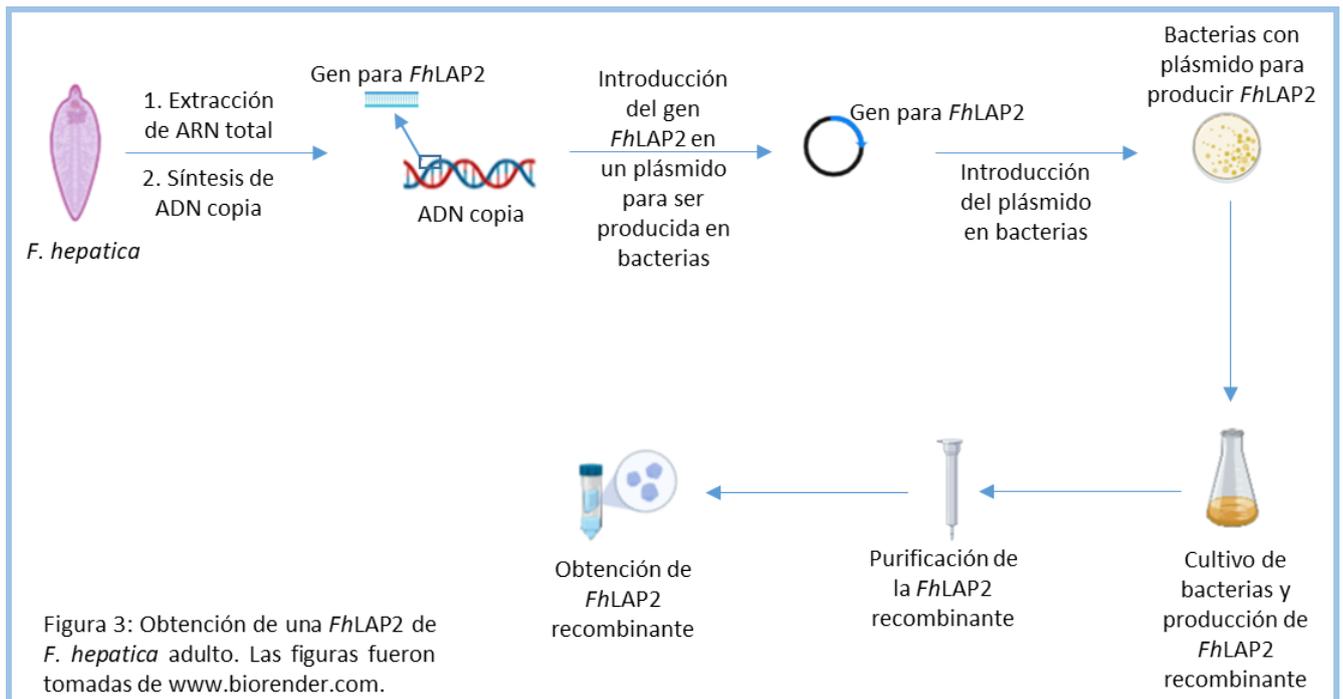
Existen tratamientos con drogas antihelmínticas, que son efectivas a corto plazo. Estos tratamientos no evitan la re-infección y presenta problemas de resistencia a estos fármacos (Fairweather, 2011). Además, se detectaron residuos tóxicos en carne y leche provenientes de animales tratados con estas drogas, trayendo como consecuencia grandes impedimentos para la utilización de estos productos para nuestro consumo (Imperiale *et al*, 2011).

Por lo tanto, necesitamos buscar otro tipo de tratamiento capaz de brindar mayor protección y sustentabilidad a largo plazo y que no genere residuos tóxicos para el consumo y tampoco para el ambiente. En este sentido, el desarrollo de una vacuna contra *F. hepática* surge como una gran alternativa (Fernández *et al* 2012).

Para esto es crucial conocer la biología de *F. hepatica*. En estos parásitos existe un grupo de proteínas, llamadas proteasas que cumplen funciones muy importantes en los procesos de invasión del parásito, obtención de nutrientes y evasión de las defensas (respuesta inmune) generadas por su hospedero. Estudiar la biología de *F. hepatica*, permitió descubrir a las Leucina aminopeptidasas (LAPs), proteasas que participan en procesos biológicos claves como la nutrición de estos parásitos. Bloqueando estas proteasas se podría comprometer seriamente la supervivencia del parásito dentro del hospedero. Esto convierte a las LAPs en blancos muy atractivos para el desarrollo de vacunas (Acosta, 2005; Basika, 2012).

Además, conocer la respuesta inmune generada por LAPs en su hospedero definitivo y su posible efecto como moléculas protectoras contra *F. hepatica* nos ayudaría a realizar un diseño más racional de preparaciones vacunales contra la fasciolosis.

En los últimos años, la Unidad de Biología Parasitaria ha utilizado la proteína *FhLAP1* en preparaciones vacunales y se ha logrado alcanzar los niveles más altos de protección contra *F. hepatica* reportados en ovinos (87%) (Maggioli *et al* 2011). Sin embargo, en bovinos todavía los niveles de protección alcanzados no llegan a los exigidos para su uso comercial. Estas diferencias en los niveles de protección podrían estar asociadas a la característica del sistema inmune de cada hospedero (ovino o bovino). Recientemente, gracias a la aplicación de técnicas de biología molecular que permiten la manipulación del ADN, hemos sido capaces de obtener proteínas recombinantes, es decir, proteínas de *F. hepatica* que producimos en bacterias. En particular, obtuvimos una *FhLAP2* recombinante la cual se produce desde etapas del desarrollo más tempranas (Fig 3).



Este resultado nos brinda nuevas herramientas para abordar el problema de la fasciolosis. Obtendremos información sobre sus características bioquímicas y su localización en diferentes estadios del parásito, con la intención de averiguar si *FhLAP2* interacciona con su hospedero y su posible función para la vida del parásito.

Por otro lado, estudiamos si *FhLAP1* y *FhLAP2* son capaces de generar una respuesta inmune eficaz que servirá para luchar contra el parásito, si somos infectados por él. Este estudio lo realizamos en un modelo de ratón para obtener información preliminar. Durante este experimento, determinamos la cantidad y el tipo de anticuerpos que se produce y los niveles de citoquinas (proteínas específicas del sistema inmune) producidos en cultivos de células aisladas de bazo de ratón (Fig. 4). Al mismo tiempo, estudiamos el posible efecto protector infectando a los ratones con *F. hepatica* y evaluando al final del ensayo si los parásitos fueron capaces de sobrevivir en ratones vacunados. Utilizando *FhLAP2* como vacuna, obtuvimos un 70% de protección.

Recientemente, nos financiaron un proyecto del Fondo María Viñas (FMV)-ANII, para reproducir estos resultados en un hospedero natural (ovinos) y obtener mayor información sobre las características de una respuesta inmune eficaz contra *F. hepatica* con la finalidad de mejorar nuestros resultados en bovinos.

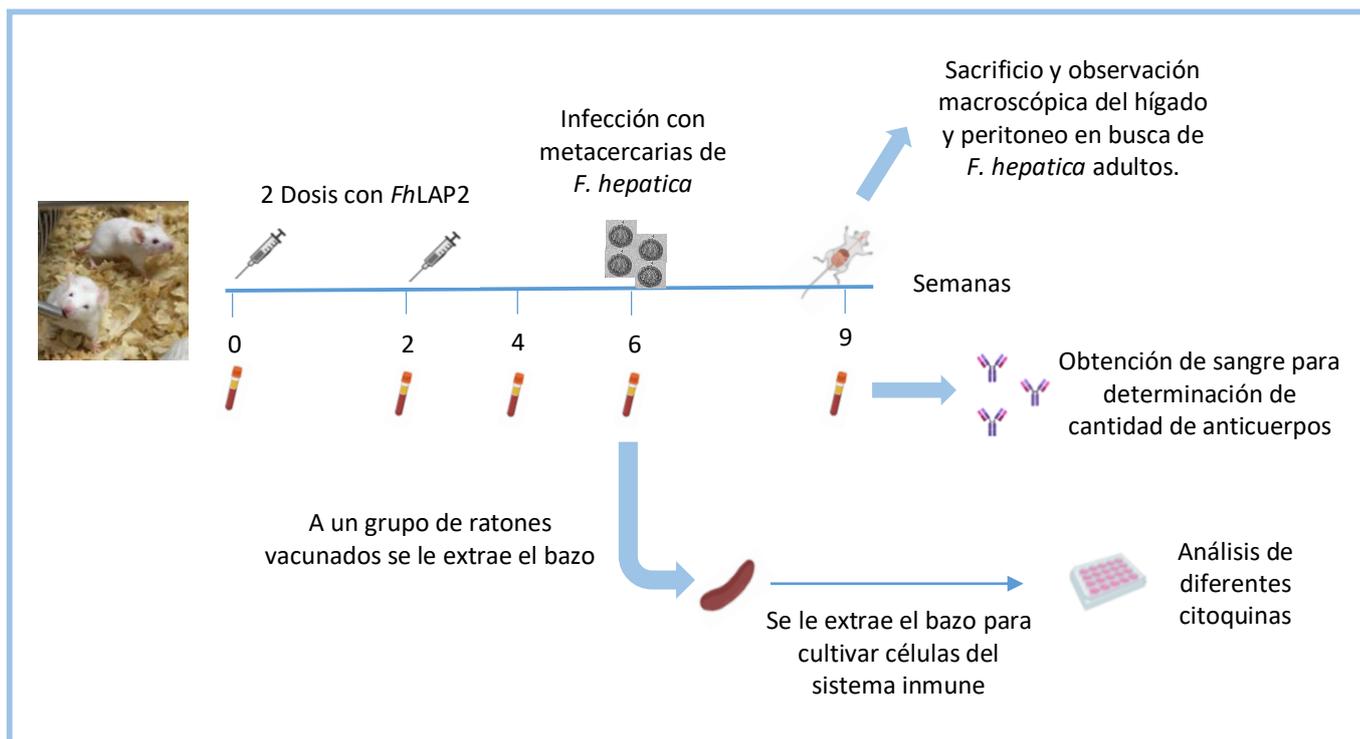


Figura 4. Esquema de vacunación con *FhLAP2* en ratones. Las figuras son extraídas de www.biorender.com.

¿Quiénes nos apoyan para seguir trabajando?

El proyecto es financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (FCE_1_2017_1_135386 y FMV_1_2019_1_155469) y el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) de la Universidad de la República, Uruguay.

Referencias:

- Acosta, D. (2005). Desarrollo de una vacuna recombinante para el control de la fascioliasis en ruminantes. Tesis de Maestría-Facultad de Ciencias.
- Alpizar, C.E., Bianque, J., Jiménez, A.E., Hernández, J., Berrocal, A., Romero, J.J. (2013). *Fasciola hepatica* en ganado bovino de carne en Siquirres y lesiones anatomo-histopatológicas de hígados bovinos decomisados en mataderos de Costa Rica. *Agron Costarricense*, 37(2), 7-16.
- Andrews, S. (1999). The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Dalton JP (Ed), *Fasciolosis*, CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, 1-20.
- Basika, T. (2012). Contribución a la dilucidación de los mecanismos proteolíticos que operan en la digestión intestinal del trematodo parásito *Fasciola hepatica*. Tesis de Maestría-Facultad de Ciencias.

- Bowman, D.D., Eberhard, M.L., Lightowers, M., Little, S., Lynn, R.C. Georgis. (2012). *Parasitología para Veterinarios* (1st ed.). New York: Elsevier, 464.
- Espinoza, J.R., Terashima, A., Herrera-Velit, P., Marcos, L.A. (2010). Fasciolosis Humana y Animal en el Perú: impacto en la Economía de las zonas endémicas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 27(4), 604-12.
- Fairweather, I. (2011). Liverfluke isolates: a question of provenance. *Vet. Parasitol*, 176, 1–8.
- Fernández, V., Solana, M.V., Estein, S.M., Solana, H. (2012). Propuestas vacunales para el tratamiento de la fasciolosis en rumiantes, un desafío aún no resuelto. *InVet*, 14(1), 47-57.
- González-Morales, C., Sánchez, G.A., Castro-Jiménez, C.C., Gómez-Carmona, C., Molina-Pérez, F., Iásquez-Trujillo, L.E. (2013). Control de *Fasciola hepatica* en el agua de consumo animal a través de filtración rápida y lenta. *Rev EIA Esc Ing Antioq*, 10(19), 133-41.
- Hatschbach, P.J. (1995). A *Fasciola hepatica* a sua historia. *A Hora Vet* (Ed.Extra), 15, 10-1.
- Imperiale, F., Ortiz, P., Cabrera, M., Farias, C., Sallovitz, J.M., Iezzi, S., Pérez, J., Alvarez, L., Lanusse, C. (2011). Residual concentrations of the flukicidal compound triclabendazole in dairy cows' milk and cheese. *J. Food Additives & Contaminants*.
<http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2010.551422>.
- Iturbe-Espinoza, P., Muñiz-Pareja, F. (2013). Ciclo biológico y potencial biótico de *Fasciola hepatica* en *Galba truncatula*. *Neotrop Helminthol*, 7(2), 243-54.
- Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basika, T., Gayo, V., Rosadilla, D., Roche, L., Tort, J., Carmona, C. (2011). rFhLAP, a recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase confers high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep using different adjuvants. *Vaccine*, 29, 9057-9063.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D. (2009). Chapter 2 *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol*, 69, 41-6.
- Spithill, T.W., Smooker, P.M., Copeman, D.B. (1999). *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: Dalton JP (Ed), *Fasciolosis*, CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, 377-410.
- WHO. (2006). Report of the WHO informal meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control
- WHO. (2012). Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases; a roadmap for implementation—executive summary