



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIDAD DE BIOLOGÍA PARASITARIA
Montevideo – Uruguay

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA
TESINA DE GRADO

**Estudios preliminares de la respuesta
inmunológica de ratones CD1 inmunizados con
exosomas de *Fasciola hepatica***

María Antonella Goyeche Ferreira

Tutora: Dra. Patricia Berasain

Diciembre, 2020.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres, por apoyarme todos estos años con la carrera y la tesis, siempre dándome para adelante y creyendo en mí.

A toda mi familia y amigos de la vida y de la facultad, por estar a lo largo de este tiempo conmigo. En especial mis abuelos por siempre estar presentes a lo largo de los años de carrera.

Agradecerle a mi tutora la Dra. Patricia Berasain por su paciencia y todos los conocimientos y momentos compartidos a lo largo de este trabajo.

A Matilde, por todo lo compartido mientras las dos realizamos nuestros trabajos, los momentos lindos y los no tan lindos.

También agradecerle a todo el equipo de UBP, Mati, Jackie, Gabriela y Mono por todos los momentos y risas compartidas, y la ayuda en el laboratorio.

Y al Frigorífico Schneck por dejarme ir en los días de faena.

RESUMEN

La fasciolosis es la enfermedad causada por los parásitos trematodos, *Fasciola hepatica* y *Fasicola gigantica*. Esta enfermedad afecta en gran medida a distintos mamíferos, entre ellos a rumiantes y al hombre. La misma conlleva en animales ganaderos a alteraciones en su desarrollo, causando tanto pérdidas económicas, como una no buena producción de carne, leche, lanas y otros.

Actualmente existen tratamientos con drogas antihelmínticas como principal mecanismo contra este parásito. Sin embargo, estas drogas tienen un efecto corto en tiempo, no evitan la re-infección, son malos para el ambiente, usados cuando ya el huésped se encuentra infectado y en gran medida se generan resistencia a estas drogas.

Por lo tanto, el control de esta parasitosis por medio de vacunas contra la *F. hepatica* podría ser tanto más efectivo y menos costoso. Esta vacuna brindaría protección a largo plazo y no generaría residuos tóxicos para el consumo y/o ambiente asociados a estos fármacos.

Hasta el día de hoy, por más de haberse estudiado diversos blancos moleculares para la creación de la vacuna, no se tiene aún una vacuna totalmente efectiva. Este trabajo, tiene como finalidad realizar estudios pre-eliminarios de inmunogenicidad de los exosomas de *F. hepatica* en el modelo murino, como base de posibles estudios para una futura vacuna nanoparticulada. Para esto es importante conocer las características biológicas del parásito y de la respuesta inmune que el mismo genera en el hospedador.

La elección de exosomas del parásito como antígenos, se realizó pensando en las funciones que éstos cumplen generalmente, su origen y composición. Los exosomas son un subtipo específico de vesículas extracelulares secretadas por el parásito (de 30-100nm de tamaño), que podrían contribuir a funciones de reparación de tejido, comunicación celular y transferencia de proteínas patógenas. Estas nanovesículas al ser liberadas en la interfase hospedero/parásito podrían ser “vistas” por el sistema inmunológico del hospedero ya que presentan algunas moléculas exclusivas del parásito. Por estas razones podrían ser considerados como multi-antígenos, tratándolas en este ensayo como nanopartículas per-se que al ser inyectadas en una solución fisiológica preservan su nanoestructura nativa; debido al poco estudio previo de éstos organelos extracelulares para el caso de *F. hepatica* como nano-antígenos, este trabajo es original.

Se obtuvieron luego de distintas idas a un frigorífico local, mediante cultivo in vitro, productos de excreción y secreción de gusanos adultos, a partir de los cuales se purificaron

los exosomas por medio de un método comercial. Con ellos se inmunizó un grupo de ratones CD1 en dos ocasiones.

Posteriormente se estudió la respuesta inmuno humoral de los mismos, en los distintos días de sangrado. Evaluando en suero los niveles de anticuerpo IgG total y sus distintas sub clases; IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 generados contra los EXO de *F. hepatica*.

Se observaron mayoritariamente diferencias no significativas en el nivel de estos anticuerpos anti EXO de *F.h*, en los sueros de los ratones inmunizados con exosomas comparados con los sueros de un grupo control. Aunque en todos los casos, se vio una tendencia al aumento del nivel del IgG y de algunas de sus sub clases, por lo que se podría pensar que este llegaría a ser un buen antígeno en mejores condiciones, como puede ser otro booster en el esquema de trabajo. O la utilización de un adyuvante que preserve la estructura vesicular de los exosomas, al saber cómo el mismo con estas vesículas.

Palabras claves: *Fasciola hepatica*, vesículas extracelulares, exosomas, inmunización, anticuerpos, vacunas animales, ELISA.

ABREVIATURAS

ABZ: albendazol

ADCC: citotoxicidad mediada por anticuerpos

AgNO₃: nitrato de plata

BCA: ácido bicinconínico

BSA: seroalbumina bovina

CBB: azul brillante de Coomasie

Células Th: células T helper

Células Treg: células T reguladoras

CHEA: Comisión Honoraria de Experimentación Animal

D.O: densidad óptica

DTH: hipersensibilidad tipo tardía

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ESCRT: complejo de clasificación endosomal

EXO: exosomas

F.h: Fasciola hepática

FhCat: Catepsina de *Fasciola hepatica*

HCl: ácido clorhídrico

Hs: horas

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

Ig: inmunoglobulina

IgG: inmunoglobulina G

IFN- γ : interferón gamma

IL: interleuquina

kDa: Kilo Dalton

LAP: leucina aminopeptidasa

Min: minutos

mm: milímetros

MV: microvesículas

NEJ: forma juvenil del parásito

nm: nanómetros

ON: over night

OPD: o-finilendiamina

OCZ: oxiclosanida

P: pellet

PBS: Buffer fosfato salino

PBS L: PBS lavado

PBS-T: PBS Tween

PES: producto de excreción y secreción

Prx: peroxirredoxina

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SND: sobrenadante

TCBZ: triclabendazol

TNF- β : factor de necrosis tumoral beta

VE: vesículas extracelulares

WB: western blot

°C: grados Celsius

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN.....	3
ABREVIATURAS.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 <i>Fasciola hepatica</i>	11
1.1.1 Generalidades	11
1.1.2 Ciclo biológico de la <i>F. hepatica</i>	12
1.1.3 Respuesta inmune frente a <i>F. hepatica</i>	15
1.1.4 Respuesta inmune del modelo murino a <i>F. hepatica</i>	17
1.2 Producto de Excreción-Secreción.....	17
1.3 Vesículas extracelulares.....	19
1.3.1 Exosomas.....	20
1.4 Generalidades de respuesta humoral, anticuerpos IgG y subclases en el modelo.....	21
1.5 Candidatos para integrar una vacuna contra parásitos helmintos.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo general.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 Determinación de la concentración de proteínas.....	28
3.2 <i>Obtención de parásitos adultos y lavado de gusanos</i>	28
3.3 Preparación del medio de mantenimiento de los gusanos de <i>F. hepatica</i>	29
3.4 Obtención de los PES de gusanos adultos en medio de mantenimiento.....	29
3.4.1 Concentración del PES de <i>F. hepatica</i>	30
3.4.2 Determinación de la concentración de proteínas del PES.....	31
3.5 Purificación de Exosomas de <i>F. hepatica</i>	31
3.6 Análisis del perfil de proteínas por electroforesis.....	33
3.6.1 Electroforesis en gel SDS-PAGE.....	33
3.6.2 Revelado de los geles de electroforesis.....	33
3.6.2.1 Tinción coloidal con CBB G de alta sensibilidad (Coloidal Coomassie)33	
3.6.2.2 Tinción neutra con plata.....	34
3.6.2.3 Validación de la tinción coloidal.....	34
3.7 Ensayo de inmunización.....	34
3.8 Corroboración de muestras de EXO <i>Fasciola hepatica</i> por Western Blot.....	37

3.9 Estudio de la respuesta inmune generada durante el ensayo de inmunización con antígeno EXO de <i>F. hepatica</i> en ratón CD1.....	38
3.9.1 Obtención de suero de ratón inmunizado.....	38
3.9.2 Purificación de EXO para sensibilización de placas de ELISA.....	38
3.9.3 Análisis de la respuesta humoral de anticuerpos IgG total anti-EXO de <i>Fasciola hepatica</i>	39
3.9.4 Análisis de la respuesta humoral de subclases del anticuerpo IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) anti-EXO de <i>Fasciola hepatica</i>	40
3.9.5 Método estadístico.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Validación de la tinción coloidal.....	43
4.2 Obtención de los PES de gusanos adultos.....	45
4.2.1 Obtención de parásitos adultos de <i>Fasciola hepatica</i>	45
4.2.2 Obtención de los PES de <i>F.h.</i> y concentración.....	45
4.3 Purificación de EXO de <i>Fasciola hepatica</i>	48
4.4 Caracterización del perfil de proteínas de EXO <i>F. hepatica</i>	51
4.4.1 Perfil proteico de purificación de PES <i>Fh</i> por electroforesis.....	51
4.4.2 Comparación de EXO <i>F. hepatica</i> purificado de lote sucio y limpio por electroforesis.....	55
4.4.3 Corroboración de muestras de EXO de <i>Fasciola hepatica</i> por Western Blot.....	57
4.5 Ensayo de inmunización.....	60
4.5.1 Seguimiento del peso de ratones CD1 de grupos 2 y 3.....	60
4.6 Estudio de la respuesta inmune humoral generada durante el ensayo de inmunización con EXO de <i>F. hepatica</i> en ratón.....	63
4.6.1 Análisis de la respuesta humoral frente antígeno EXO de <i>F. hepatica</i> , anticuerpo IgG total.....	63
4.6.1.1 Elección de la dilución de sueros del grupo 2 y grupo 3.....	63
4.6.1.2 Nivel de IgG total en ratones inmunizados con EXO de <i>F. hepatica</i>	65
4.6.2 Análisis de la respuesta humoral frente antígeno EXO de <i>F. hepatica</i> , anticuerpos anti IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 biotinilados.....	68
4.6.2.1 Elección de las diluciones del suero para los diferentes anticuerpos biotinilados.....	68
4.6.2.2 Análisis de la respuesta humoral frente antígenos IgG1 e IgG3 biotinilados.....	74
5. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	77
6. BIBLIOGRAFÍA.....	83

1) INTRODUCCIÓN

1.1 *Fasciola hepatica*

1.1.1 Generalidades

La *Fasciola hepatica* es un platelminto trematodo hematófago, de la subclase Digneia, el cual posee un ciclo biológico heteroxeno. El parásito se origina en el intestino delgado y los gusanos juveniles penetran a través de la pared intestinal y entran en la cavidad peritoneal, luego de 10-12 semanas de migración tisular, los parásitos entran en los conductos biliares (Marcilla et al., 2012).

El parásito es el agente causante de la enfermedad de trematodos hepáticos, también llamada fasciolosis (junto con otro parásito, *Fasciola gigantica*). La enfermedad posee una distribución mundial. Tradicionalmente la *Fasciola hepatica* (*F.h*) fue considerada como un parásito del ganado (sobretudo ovino y bovino), pero en el último tiempo fue reportado también como una infección humana importante y emergente en varias regiones del mundo, incluyendo América del Sur, Irán, Egipto, Asia sudoriental (Robinson et al., 2009). Estimándose que más de 17 millones de personas se encontrarían infectadas con el parásito y alrededor de 180 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la infección (Mas-Coma et al., 2005).

Por esto mismo, la fasciolosis es considerada una zoonosis emergente parasitaria. La infección resulta en una gran pérdida económica para la comunidad agrícola, de aproximadamente US\$3 billones anuales (Piedrafita et al., 2010). Esto se debe a que impacta en la productividad del ganado al afectar las tasas de crecimiento, fertilidad y la calidad de la producción de lana y leche. En temporadas de grandes brotes de infección, puede causar también muchas muertes dentro de la población de ganado (Mas-Coma et al., 2005; Molina-Hernández et al., 2015).

Los helmintos en general, tiene desarrolladas estrategias para evitar o prevenir el ataque inmunológico del huésped (Serradell et al., 2007). La *F. hepatica* en particular, secreta varias moléculas inmuno moduladoras con múltiples mecanismos de acción, que incluyen por ejemplo la catepsina-L1. La cual es una proteasa que podría por ejemplo degradar el receptor tipo toll-3 dentro del endosoma de los macrófagos (de la Torre-Escudero et al., 2019), se estima que la secreción de la catepsina también reduce el número de células efectoras inmunes que se adhieren a el parásito. Un ejemplo de esto es el prevenir que los eosinófilos se adhieran lo suficientemente cerca al parásito para permitir la desgranulación y el daño al parásito, a través de la degradación de las inmunoglobulinas por parte de la catepsina secretada por el parásito (Carmona et al., 1993).

El control de la enfermedad es crucial para la salud de los animales ovinos y bovinos. Actualmente, el control de la enfermedad en animales se realiza antes y después de las faenas. Basándose en evitar el pastoreo en áreas donde existe el hospedero intermediario del ciclo y tratamiento antihelmíntico periódico (López-Villacís et al., 2017).

Hasta la fecha el tratamiento con drogas antihelmínticas es la mayor alternativa para controlar la fasciolosis. Siendo el triclabendazol (TCBZ) la droga más estudiada (Gomez-Puerta et al., 2012) y utilizada para la enfermedad aguda causada por *F. hepatica* juvenil patógena. Su suceso se basa en la eficacia contra todo el ciclo de vida intra mamífero del parásito, pero la resistencia a la misma se ha extendido ampliamente (Fairweather et al., 2020; Wilkinson et al., 2019), generando así problemas en el uso de los antihelmínticos como tratamiento. El Comité de Medicamentos de Uso Veterinario (Comisión Europea) estableció límites máximos de TCBZ en leche de bovinos y ovinos, además de los ya establecidos en músculo, grasa, hígado y riñón. Las restricciones de licencias en antihelmínticos para vacas lecheras solo permiten el uso de albendazol (ABZ) y oxiclosanida (OCZ) para el control de trematodos. Estas dos drogas a diferencia de TCBZ (activo contra parásitos adultos e inmaduros), tienen actividad restrictiva contra los parásitos adultos y el uso de estos antihelmínticos requiere tratamientos repetidos, que no siempre logran llevarse a cabo por lo que su uso tampoco es muy recomendado (Commission et al., 2014; Molina-Hernández et al., 2015).

En general el tratamiento con antihelmínticos se realiza cuando el daño hepático ya se produjo, este tratamiento es costoso y existe la posibilidad de re infección (Mooney et al., 2009). Debido a estas características negativas de las drogas antihelmínticas utilizadas hasta el momento, existe la necesidad de desarrollar estrategias más efectivas, menos costosas y que sean aplicables antes de realizado el daño hepático. Esta estrategia puede ser una vacuna, las cuales son consideradas seguras y más aceptadas que las drogas anteriormente mencionadas por distintas características, como ser que los residuos de las vacunas no son pasados a las pasturas, por lo que son consideradas buenas para el ambiente (Parker et al., 2009).

1.1.2 Ciclo biológico de la *F. hepatica*

Como se comentó anteriormente, la *F. hepatica* posee un ciclo biológico heteroxeno, esto quiere decir que el parásito necesita de un hospedador intermediario (molusco gasterópodo anfibio, del género *Lymnea* (Correa et al., 2010) donde ocurre la multiplicación larvaria y un huésped definitivo (oveja, vaca, humano, etc) en donde se produce la reproducción de los parásitos adultos de manera sexuada o la autofecundación (ya que los parásitos son hermafroditas) Figura 1.1.

El parásito adulto consta de un gran tamaño y una estructura plana, su forma es de hoja con color marrón, mide hasta 30mm de largo por 13 mm de ancho como se observa en la

Figura 1.2. Este se encuentra en el sistema biliar (preferente en la luz de los canalículos biliares) del huésped definitivo, los huevos producidos por estos parásitos adultos son expulsados al exterior (ambiente), con las heces del huésped definitivo (Saba et al., 2005). Los huevos son de gran tamaño, color marrón-amarillento y de forma ovoide.

Luego de un corto período de maduración de los huevos (alrededor de dos semanas), se forma un embrión ciliado en su interior, el miracidio, el cual eclosiona del huevo intentando encontrar y penetrar en el huésped intermediario (caracol). Este paso se da en condiciones favorables de temperatura, humedad y tensión de oxígeno. Siendo el ambiente más favorable, el agua dulce. En Uruguay, la única especie de huésped intermediario de relevancia epidemiológica es *Lymnea viatrix* (Lopez Lemes et al, 1996).

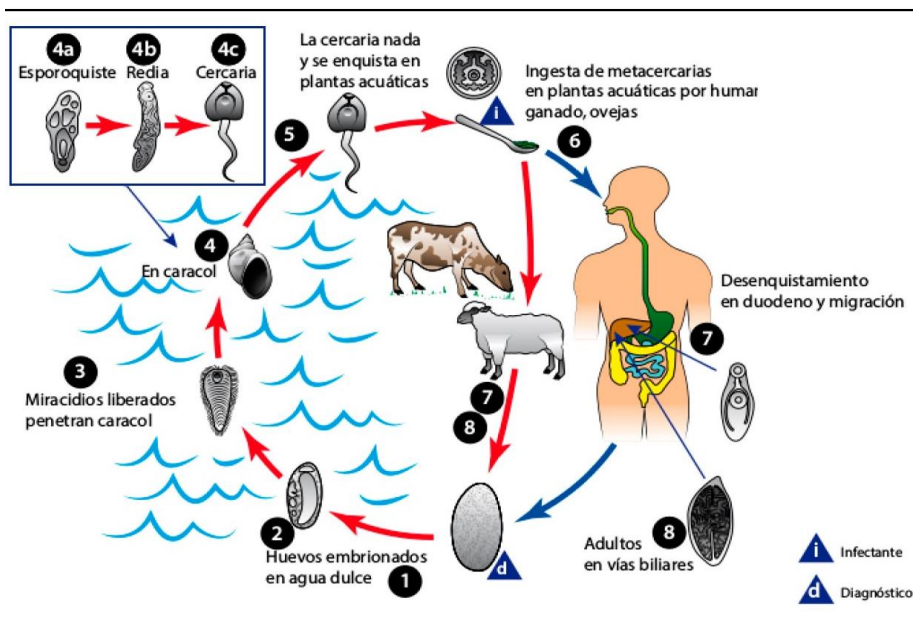


Figura 1.1: Ciclo biológico de *F. hepatica*. Se muestran en la figura todos los estadios del parásito a lo largo del ciclo, comenzando en 1, huevos eliminados en las heces del huésped definitivo, ganado o humanos, 2, huevos embrionados en agua dulce, 3, formación de miracidios liberados en el agua, 4, penetración de los miracidios en el caracol, huésped intermediario, a, esporoquiste, b, redia y c, cercaria. 5. Cercaria que nada a las plantas acuáticas para enquistarse, 6, ingestión por huésped definitivo de estas y 7, desenquistamiento en duodeno y migración del parásito a hígado. Se marcan en la figura también los pasos de diagnósticos y los infectantes del ciclo. (Tomado de https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/Frames/A-F/Fascioliasis/body_Fascioliasis_page1)

El miracidio una vez dentro del caracol pierde su cubierta ciliada y se localiza en la cámara pulmonar, creciendo y replicándose de forma asexual durante varias semanas. Se forma así el esporocisto, el cual contiene en su interior varias células germinales, dentro de las cuales cada una se multiplica, formando las redias madres. Las redias crecen hasta que rompen la pared del esporocisto, se liberan del hígado y migran a la hepatopáncreas, desarrollándose redias hijas.

Las redias producen la etapa larvaria final, la cual se denomina cercaria. El proceso de maduración hasta la cercaria es de aproximadamente cinco a siete semanas de duración en condiciones óptimas, y un solo miracidio puede desarrollarse en cientos de estas. La cercaria consta de una cola larga, la cual utiliza para nadar cuando emerge del caracol, nadando libremente en el agua, hasta adherirse a la vegetación acuática (por arriba o por debajo de la línea de flotación) y perder la cola. Al perder su cola, se enquistan y obtienen una capa protectora, formándose así la forma infectante y de resistencia del ciclo biológico, la metacercaria, que generalmente se adhiere a vegetales acuáticos.

El ganado (huésped definitivo, o el humano en algunos casos) se infecta al ingerir la forma enquistada del parásito (metacercaria), ya sea adheridas a los vegetales acuáticos, como quistes suspendidos en el suelo o en el agua que bebe el ganado. La supervivencia de las metacercarias depende en gran medida de la humedad y las condiciones de temperatura. Las metacercarias juveniles penetran en el intestino del huésped definitivo (mamífero), en presencia de los jugos gástricos y enzimas, se produce el desenquiste liberándose la forma juvenil del parásito (NEJ) y aparecen en la cavidad abdominal alrededor de las dos horas post ingestión. Luego penetran el espacio peritoneal y llegan a la cápsula hepática. Migrando durante cinco a siete semanas por el parénquima hepático, causando hemorragia extensa y fibrosis, para llegar a los conductos biliares, donde maduran, convirtiéndose en parásitos adultos. Al llegar a la madurez sexual (lo cual lleva entre tres o cuatro meses), comienza la producción de huevos, los mismos se encuentran en la bilis, y más tarde en las heces.

La finalización de todo el ciclo de vida del parásito, requiere de al menos tres a cuatro meses para que los parásitos alcancen su madurez sexual, la vida útil en humanos de la *F. hepatica* puede llegar hasta los trece años y medio, mientras que la misma es de uno o dos años en bovinos y hasta veinte años en ovinos (Kaplan, 2001; Lopez Lemes et al , 1996; Moazeni & Ahmadi, 2016; Robinson et al., 2009; Saba & Korkmaz, 2005).

En el caso de los ratones, cuando la *F. hepatica* entra en el parénquima hepático, miden alrededor de 0.2 mm. de largo, pero la longitud aumentará hasta los 6.0 mm a los 32 días después de la infección. La amplitud de los trematodos migratorios también aumentará después de la infección. El momento más temprano en que el parásito ingresa a los conductos biliares en ratones infectados experimentalmente puede variar de 24 a 32 días después de la infección. En los ratones, 28 días después de la infección, la forma típica en forma de hoja del gusano adulto y sus órganos reproductores con sus conductos son claramente distintivos en los trematodos migratorios. Durante la migración en el parénquima hepático, los parásitos se acercan a la madurez cuando están listos para ingresar a los conductos biliares. Los parásitos juveniles de *F. hepatica* se alimentan de células hepáticas, fibras musculares sin rayas, tejido conectivo, membranas serosas y células linfoides, entre las cuales las células hepáticas desempeñan un papel importante en

la nutrición. Los gusanos adultos se alimentan del epitelio hiperomorfoseado del conducto biliar infectado, pero no se alimentan de sangre. (Moazeni & Ahmadi, 2016)

Durante la migración del parásito, el mismo renueva rápidamente su glicocálix externo; evitando así, un ataque de los granulocitos debido a que los anticuerpos no pueden unirse a la superficie del parásito (Serradell et al., 2007). Esto se debe a que los parásitos en desarrollo se encuentran con diferentes tejidos y macromoléculas del huésped y tienen que lidiar con un microambiente fisiológico que está continuamente cambiando (como el pH y disponibilidad de oxígeno) y un aumento de la respuesta inmune humoral y celular del huésped.

Las dos distintas fases clínicas de la fasciolosis están directamente relacionadas con la migración de los parásitos: fasciolosis aguda, que se manifiesta como fiebre, dolor abdominal, pérdida de peso y hepatomegalia, se asocia con daño e inflamación del tejido hepático causada por el parásitos inmaduros migratorios, mientras que la fascioliasis crónica (generalmente subclínico) se combina con la presencia de trematodos adultos maduros en los conductos biliares (Robinson et al., 2009).



Figura 1.2: Parásito adulto de *F. hepatica*. Observándose su forma de hoja y su color amarronado. (Tomada de <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/tratamientos-para-prevenir-y-curar-la-fasciola-hepatica-en-bovinos>).

1.1.3 Respuesta inmune frente a *F. hepatica*

Las enfermedades crónicas causadas por helmintos en general están asociadas a fuertes respuestas del tipo Th2 y supresión de las respuestas Th1. Siendo los mecanismos efectores inducidos por la respuesta Th2 variados, dependiendo del tipo celular sobre el que actúan y el organismo en que se produce la respuesta (Allen & Maizels, 2011).

Las células T CD4 se pueden separar en dos subconjuntos principales, Th1 y Th2, debido sus diferentes patrones y en función de secreción de citoquinas en la infección. Las células Th1

producen IFN- γ , IL-2 y TNF- β y promueven la activación de macrófagos, la producción de anticuerpos opsonizantes, median reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) y respuestas inflamatorias. Por otro lado, las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 y promueven reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato que involucran IgE, eosinófilos y mastocitos. Las citoquinas de cada subtipo de linfocitos T inhiben mutuamente las funciones de diferenciación y efectoras del subconjunto recíproco, lo que da como resultado la polarización de la respuesta inmune al tipo 1 o al tipo 2. (O'Neill et al., 2000)

La interacción del gusano impulsa la diferenciación de las respuestas de las células T helper (Th) hacia la respuesta Th2 y al desarrollo de las células T regulatorias (Treg). La supervivencia de los helmintos en el hospedador está asociada a esta respuesta, que evita la respuesta protectora Th1 y controla la inflamación excesiva que podría ser peligrosa para el huésped. Esto se reporta ya que se ha estudiado que las células T periféricas y los linfocitos en ganglios linfáticos hepáticos de bovinos con infección aguda y crónica o en el hígado de ganado naturalmente infectado con *F. hepatica* poseen una regulación negativa de la expresión de IFN γ , mientras que la expresión de IL4 fue alta, lo que sugiere una respuesta Th2 predominante (Haçariz et al., 2009; Molina-Hernández et al., 2015; Mulcahy et al., 1999; Pacheco et al., 2017; Waldvogel et al., 2004).

La respuesta de tipo Th2 de los helmintos, se asocia con la secreción de las interleuquinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y IL-21, la generación de IgE, activación y expansión de células T CD4+, así como también la activación de mastocitos, eosinófilos y basófilos (Allen & Maizels, 2011; Anthony et al., 2007; Díaz & Allen, 2007). En el caso de *Fasciola hepatica* en particular, también se genera una supresión de la respuesta Th1, generándose una respuesta de tipo Th2 (O'Neill et al., 2000). Donde se ve que la respuesta Th2 es no proliferativa con eosinofilia, niveles aumentados de IL4 e IL5 y disminución de IFN γ (Flynn & Mulcahy, 2008; Flynn et al., 2010; Graham-Brown et al., 2018; Pacheco et al., 2017).

La sobrevida de los parásitos a estas respuestas inmunes de sus hospederos definitivos se da por medio de mecanismos de evasión en el recambio tegumentario como se comentó anteriormente, así como por el bloqueo de la activación de la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) y una inmuno modulación por la expresión de moléculas capaces de inducir respuestas reguladoras (Moreau & Chauvin, 2010).

En el caso de *F. hepatica* en particular, como ya se dijo, el parásito penetra en los tejidos del huésped y llega a los conductos biliares. Durante este camino, cambia su glicocálix externo, evitando ataque de granulocitos, ya que los anticuerpos no pueden unirse a la superficie del parásito. Los productos de excreción-secreción del parásito, donde se encuentran presentes los exosomas, pueden ejercer un efecto inmuno represor para prevenir la respuesta innata y así suprimir la respuesta adaptativa efectiva. La respuesta protectora contra *F. hepatica* sucede en pasos tempranos de la infección, activándose los Th2 entre los primeros siete días de ingesta del parásito, también encontrándose niveles altos de IgG1 y sin anticuerpos IgG2. También se encuentran niveles altos de IL4 e IL5 y

disminución de IFN γ (Clery et al., 1996; Falcón et al., 2010; Flynn & Mulcahy, 2008; Flynn et al., 2010; Hanna, 1980; Molina-Hernández et al., 2015).

1.1.4 Respuesta inmune del modelo murino a *F. hepatica*

En un estudio realizado con tres distintas cepas de ratones (BALB/c, C57BL/6 y 129Sv/Ev) infectados con distinta cantidad de metacercarias (5 o 15). Se examinó la producción de citoquinas específicas de antígeno por las células de los ganglios linfáticos, demostrándose que la respuesta inmune del tipo 2 es predominante, pero a qué grado la respuesta inmune de los ratones es del tipo Th2, depende del nivel de la dosis infecciosa, esto se observó en el hecho de que los ratones BALB/c y 129Sv/Ev expuestos a infección con cinco metacercarias provocaron respuesta similar a Th2 (produciendo IL-4 e IL-5), los ratones C57BL/6 mostraron respuesta mixta Th1/Th2, mientras que la infección con quince metacercarias dio como resultado la regulación negativa completa de la respuesta Th1, en las tres cepas de ratones, produciendo predominantemente un perfil de citoquinas de este tipo. Otros estudios realizados en ratones infectados con parásitos helmínticos han demostrado que la IL-4 está asociada a la secreción de IgG1 e IgGE, mientras que la IFN- γ se asocia con la secreción de IgG2a. Todos los ratones infectados con quince metacercarias tuvieron supresión completa de las citoquinas Th1 en comparación con los infectados con una dosis menor. Se estima que el parásito es capaz de suprimir la producción de citoquinas, particularmente del tipo Th1, esto puede estar mediado también por moléculas secretadas por el parásito, ya que como se comentó anteriormente el PES pareciera tener funciones de inmunosupresión también.

En general la respuesta a *F. hepatica* en ratones, es una respuesta Th2, con secreción de IL-4, IL-5 e IL-12 por células del bazo y citoquinas reguladores IL-10 y TGF- β por macrófagos y células dendríticas, al mismo tiempo que se suprime la respuesta Th1. La mayoría de los estudios para estas conclusiones habladas anteriormente, se basan en el modelo murino BALB/c, no habiendo datos para ratones CD1, por lo cual no se puede inferir su respuesta (O'Neill et al., 2000; Pearce & Sher, 1991; Rojas-Caraballo et al., 2017).

1.2 Producto de Excreción-Secreción

En el parásito *Fasciola hepatica*, al igual que en otros trematodos, se observa un intestino de terminación ciego. Por lo que las heces, así como una serie de componentes secretados, se eliminan por la boca, a través de la cual también se ingieren los alimentos. Otros componentes pueden excretarse a través del poro medio situado en la parte posterior del cuerpo, mientras que el tegumento también puede considerarse un órgano secretor ya que su superficie también se desprende activamente.

La *F. hepatica* secreta y excreta, proteínas que son cualitativa y cuantitativamente diferentes durante las distintas etapas de su ciclo biológico. Reflejando posiblemente diferentes ubicaciones dentro del huésped al momento de ser secretadas-excretadas. Estos productos que se excretan-secretan, llamados también Productos de Excreción-Secreción (PES), son el material colectivo que comprende proteínas y otros compuestos, secretados por el intestino, los poros excretores y el tegumento superficial del parásito. Los mismos son liberados por los gusanos tanto dentro del huésped, como en cultivo in vitro.

Se sabe que estos productos juegan un papel importante en la interfaz parásito-huésped, debido a que se secretan durante la infección y protegen al parásito de las respuestas defensivas del huésped. Esto puede ser por evasión o defensa contra el sistema inmune del huésped. Además de esta característica, los PES también son importantes en la invasión que realiza el parásito, en la digestión del tejido del huésped y en funciones biológicas críticas como la alimentación y reproducción del parásito (Di Maggio et al., 2016; Jefferies, Campbell, Rossum, Barrett, & Brophy, 2001; Vercauteren et al., 2003).

Al ser altamente inmunogénicos en infecciones (tanto experimentales como naturales), los PES son relevantes para el inmuno diagnóstico, siendo comúnmente propuestos como candidatos a antígenos protectores (Vercauteren et al., 2003). Los PES pueden; inducir alternativamente macrófagos activados (Donnelly et al., 2005), inducción de apoptosis de macrófagos peritoneales (Guasconi et al., 2012) y eosinófilos (Serradell et al., 2009). Características por las cuales son tomados en cuenta como blancos moleculares para ser antígenos vacunales.

En cuanto a su composición, en productos de excreción-secreción de NEJ y adultos, se identificaron 240 proteínas: 90 de NEJ, 202 de trematodos adultos y 52 proteínas presentes en ambas etapas. (Di Maggio et al., 2016)

En los PES de gusanos adultos, la clase más abundante de proteínas es la familia de las cisteín proteasas, las catepsinas L (*FhCatL*) que representan el 44% del contenido total de proteínas, seguidas de las catepsinas B (*FhCatB*) (26%) y legumains (15%). Se identificaron distintas catepsinas L; cinco catepsina L1 (*FhCatL-1*), una catepsina L2 (*FhCatL-2*), una catepsina L3 (*FhCatL-3*) y una similar a la catepsina L4 (*FhCat-L4*), identificándose al menos una proteína representativa de cada una (Di Maggio et al., 2016). Las enzimas proteolíticas, catepsina B y catepsina L de *F. hepatica* pueden por ejemplo clivar distintas clases de inmunoglobulinas en distintos sitios, lo que sugiere un papel activo en mecanismos de evasión de la respuesta inmune humoral. También realizan distintos mecanismos para evitar la respuesta inmune del huésped como se habló anteriormente. Ambas enzimas se almacenan como zimógenos dentro de las larvas infecciosas listas para ser trans-activadas por asparaginil endopeptidasas específicas y liberadas para así realizar tareas de invasión del tejido del huésped (epitelio intestinal y cápsula hepática). En el caso de la Catepsina L1, su zimógeno inactivo se representa como una banda de 37KDa en las vesículas extracelulares (siendo menos visibles en los exosomas). Por el contrario, la cisteína

proteasas se expresan durante las últimas etapas dentro del hígado y el conducto biliar y funcionan en la degradación de los tejidos (Berasain et al, 2000; Cwiklinski et al., 2015; Robinson et al., 2009).

1.3 Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (VE) son pequeñas estructuras unidas a la membrana que son eliminadas por la mayoría de los tipos celulares. Se consideraba al comienzo de su estudio que actuaban únicamente como un sistema de eliminación de desechos celulares.

Se pueden clasificar de forma diversa como exosomas, microvesículas (MV), cuerpos apoptóticos y oncosomas, dependiendo de su composición, tamaño y modo de biogénesis (Wu et al., 2019). Las VE no solo desempeñan una variedad de funciones en el mantenimiento de la fisiología normal, sino que también participan en entornos patológicos, especialmente en progresión de tumores. Un número creciente de estudios también ha demostrado que las VE derivadas de parásitos desempeñan un papel importante durante la infección y enfermedad causada por los parásitos (de la Torre-Escudero et al., 2016). En los organismos multicelulares, las células se comunican entre sí, a través de moléculas extracelulares, pero también por la liberación de estas vesículas de membrana en su entorno extracelular que pueden afectar a las células a las que encuentran estas estructuras de formas complejas como son variedad de moléculas efectoras, incluidas proteínas, lípidos, ARNm, microARN y otras especies de ARN no codificantes (de la Torre-Escudero et al., 2016; Marcilla et al., 2012; Montaner et al., 2014).

En patógenos en particular, se ha estudiado a las VE, como parte de las iniciativas clínicas más importantes debido a la función de las vesículas extracelulares para promover o inhibir la inmunidad del huésped. Ya que las vesículas poseen propiedades inmunogénicas se ha realizado estudios con VE como preparaciones de vacunas, también se estudió su propiedad en la administración de fármacos, ya que las vesículas como se ha comentado tienen la capacidad de transportar moléculas a las células receptoras. Siendo estos importantes blancos en nuevos enfoques terapéuticos ya que albergan subconjuntos específicos de proteínas, ADN, ARN y lípidos. Todos estos componentes desempeñan diversas funciones fisiológicas y patológicas (Coakley et al., 2015; Kim et al., 2015; Wilkinson et al., 2019).

Se ha descubierto que las secreciones de *F. hepatica* adulta son más complejas de lo que se pensaba y contienen al menos dos subpoblaciones de VE; exosomas y MVs. Esto se dilucidó luego de ultracentrifugar los PES del gusano adulto. Al centrifugar 120.000xg se pudo aislar un grupo homogéneo de vesículas extracelulares similares a exosomas (EXO), de 30 a 100 nm de diámetro, las cuales tienen un origen endosómico.

También se recuperó un sedimento después del paso de centrifugación de 15.000xg que no se había estudiado anteriormente. La microscopía electrónica de transmisión reveló que este sedimento contenía vesículas unidas a la membrana de 50-200 nm de diámetro, siendo estas las MV que derivan de células gastrodérmicas (Cwiklinski et al., 2015; de la Torre-Escudero et al., 2019).

1.3.1 Exosomas

Los exosomas (EXO), representan un subtipo específico de vesículas secretadas, se originan por la vía endosomática de las células eucariotas. Fueron primero identificadas como vesículas membranosas pequeñas. El procesamiento de los EXO comienza con la gemación hacia adentro de la membrana del endosoma tardío que forma cuerpos multivesiculares (MVB) que contienen una serie de vesículas intraluminales. A continuación, las vesículas se secretan desde la superficie celular (como exosomas) tras la fusión del MVB con la membrana plasmática. La principal maquinaria que impulsa este proceso es el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT). Los complejos ESCRT-0, -I y -II agrupan proteínas ubiquitinadas en la membrana endosomal, mientras que ESCRT-III forma filamentos poliméricos que dan como resultado la invaginación de la membrana, formando el ILV. Esta secreción se da en varios tipos de células (de la Torre-Escudero et al., 2016; Marcilla et al., 2012).

Los EXO desempeñan diversas funciones en distintos procesos, como son; la secreción de proteínas, la presentación de antígenos, el transporte de ARN y agentes infecciosos, reparación de tejidos, comunicación neuronal y la vigilancia inmunitaria de patógenos. Además, los exosomas pueden incluso utilizarse como candidatos a vacunas y biomarcadores para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Los exosomas liberados por un parásito, en este caso *F. hepatica* contienen información específica del parásito conservada, que incluye proteínas, ARN, ARNnc y ácidos nucleicos. Esta información se transfiere a las células del huésped que luego pueden modular el sistema inmunológico de este, participar en el escape inmunológico del parásito y, en última instancia, promover infección. Las funciones de los exosomas dependen de su origen celular. En cuanto a la inmuno regulación, sus funciones se pueden resumir como; presentación de antígenos, modulación de la respuesta inmune del huésped, expresión de algunas moléculas activadas o factores del complemento que provocan la vigilancia inmunitaria y aumentan la invasión de células tumorales y mediación de la comunicación intercelular. Los exosomas se pueden aislar tanto en los fluidos corporales como en los sobrenadantes de cultivo. (de la Torre-Escudero et al., 2016; Marcilla et al., 2012; Wu et al., 2019).

En el caso de *F. hepatica*, se estudió el contenido de los EXO de este parásito (Cwiklinski et al., 2015). Encontrándose por western blot, bandas de leucina aminopeptidasa (FhLAP de 55KDa), peroxirredoxina (FhPrx de 24 KDa), las cuales también se encontraron en las MV. La catepsina L1, sintetizada como un zímogeno de 37KDa, se observó como una banda poco visible en la muestra de EXO (siendo muy intensa en la muestra de vesículas de 15K, MV),

aunque al estudiar la actividad de la catepsina utilizando péptidos fluorogénicos se observó una alta actividad de tanto catepsina B como catepsina L. Se realizó también un análisis proteómico de los EXO de *F. hepatica*, identificándose un total de 180 proteínas diferentes, como Hsp70, varias GTPasas de Rab y miembros de la familia de las tetraspaninas (CD63), respaldando así que fueran EXO auténticos, ya que presentaban estos marcadores moleculares. En este análisis también se encontraron muy representadas las peptidasas, como se había visto anteriormente, sobre todo catepsina B y L. (de la Torre-Escudero et al., 2016; Marcilla et al., 2012).

1.4 Generalidades de respuesta humoral, anticuerpos IgG y subclases en el modelo

En la respuesta inmune humoral en ratones, en general, todos los anticuerpos pueden actuar uniéndose a los sistemas efectores disponibles y adaptándolos debido a su capacidad de reconocer y unirse al antígeno a través de las regiones V, mientras interactúan con los sistemas efectores conservados a través de las regiones C. Los anticuerpos IgG, poseen dos sitios de unión idénticos en una misma molécula, lo que le permite al mismo unirse con una mayor avidéz a los antígenos con epítomos repetidos o a agregados de antígenos. La flexibilidad de los anticuerpos, en la curva de la región Fab (entre los dominios V y C) y sobre todo dentro de la región bisagra permite a los dos sitios de unión tener una variedad de espaciamientos y orientaciones al momento de enfrentarse a epítomos antigénicos. La unión del antígeno puede resultar en la inactivación directa de agentes infecciosos mediante el bloqueo de sitios funcionales con actividad enzimática o de unión al receptor. Los anticuerpos agregados por el antígeno pueden interactuar con otros componentes del sistema inmunológico, al activar la cascada del complemento o uniéndose a receptores Fc γ en varios tipos de células. Estos procesos pueden ayudar en la opsonización del antígeno y en la activación de la inflamación y mejora de la respuesta inmunitaria contra un agente infeccioso. En varias especies, los eventos de duplicación de genes han dado lugar a múltiples isotipos de IgG (entre ellas, ratones, con 4 sub clases) y luego a través de cambios en las secuencias, algunas de estas subclases han perdido la capacidad de activar el complemento o unirse a algunos tipos de receptores.

Se han estudiado cuatro clases de IgG murinas, dependientes de como las citoquinas dirigen al sistema inmunológico hacia la producción de las diversas subclases particulares de IgG. Estas subclases incluyen IgG2a e IgG2b, las cuales fijan el complemento y se unen a todos los Fc γ R12 activadores. La subclase IgG1 murina, no fija el complemento, solo uniéndose al inhibidor Fc γ RIIb, por lo que no está muy dilucidada su función, aunque se la relaciona con la respuesta Th2, ya que pueden neutralizar toxinas y virus por impedimento estérico. La cuarta subclase es IgG3, este anticuerpo está considerado como un isotopo clave producido en respuesta a los carbohidratos y otros antígenos independientes de T. La fijación del completo por complejos que contienen IgG3 podría terminar en reclutamiento de células inflamatorias, las cuales no podrían participar en funciones efectoras mediadas por Fc γ R,

ya que los anticuerpos IgG3 no se unen al mismo, por lo cual estos anticuerpos dirigidos contra carbohidratos asociados a patógenos serían ineficaces si la IgG3 murina se produjera por sí sola.

La función de IgG1 e IgG3 está, por lo tanto, no muy definida, pero si los cuatro isotipos se co-expresaran, estas funciones estarían más resueltas.

Las subclases de IgG presentan pocos cambios entre sí, por lo que la afinidad de las mismas es relativamente baja, en consecuencia, se necesitaría un mayor número de células formadoras de anticuerpo para lograr la eliminación del antígeno (a diferencia de lo que sucede en otras, especies donde se produce una mayor afinidad, ya que las mutaciones entre las diferentes sub clases son mayores). La respuesta del ratón parecería estar dominada por el cambio directo de células B IgM a cada sub clase de IgG, activándose para esto una gran población de células B vírgenes. El cambio a IgG ocurre al principio de la respuesta, antes de la adquisición de las mutaciones, esto estaría de acuerdo con las necesidades biológicas de la especie, ya que los ratones carecen grandes reservas metabólicas, es vulnerable a la deshidratación y durante una enfermedad prolongada no tiene el apoyo social que puede sustentar a los humanos, un ratón enfermo pronto se convertirá en un ratón muerto, a menos que el sistema inmunológico adaptativo responda rápido y eficazmente.

La producción de estas cuatro sub clases de IgG se ha reportado luego de que el modelo murino ha sido expuesto a una cantidad diversa de antígenos. Estas sub clases deben activarse rápidamente para tener una buena respuesta frente al patógeno (Clark, 1997; Collins, 2016).

1.5 Candidatos para integrar una vacuna contra parásitos helmintos

Las vacunas tienen como objetivo reprogramar el sistema inmunológico del individuo infectado para reconocer mejor dianas moleculares o células inmunes deletéreas específicas.

Por lo tanto, la vacuna puede apuntar a antígenos asociados con una enfermedad infecciosa (crónica) o enfermedades no infecciosas como cáncer, alergia, adicción a fármacos (p. ej., nicotina) o auto-moléculas asociadas con situaciones autoinmunes / auto inflamatorias. Una vacuna terapéutica contiene una entidad molecular cuidadosamente elegida, el o los antígenos de la vacuna, que es el objetivo de la respuesta inmune inducida por la vacunación. Además, la vacuna terapéutica generalmente requiere un adyuvante o modulador inmune adecuado para inducir y dirigir el tipo deseado de reacción inmune terapéutica. El diseño de vacunas, tanto para vacunas profilácticas como terapéuticas, requiere primero elucidar la naturaleza de la inmunidad protectora o beneficiosa para una condición específica. Por tanto, el primer paso en el diseño racional de una vacuna terapéutica implica la identificación y selección de antígenos, que requieren el

conocimiento de la patogénesis de la enfermedad y dianas moleculares clave accesibles, e idealmente expresadas de forma estable. El siguiente desafío es cómo generar el sistema inmunológico deseado, la respuesta contra el antígeno elegido, idealmente con memoria inmunológica a largo plazo. Esto requiere la elección de un inmuno estimulador adecuado que sea capaz de inducir, prolongar, magnificar y dirigir la respuesta inmunitaria requerida. Este es el papel de los adyuvantes de vacunas (Schijns et al., 2020).

La vacunación entonces, se presenta como una alternativa sumamente interesante para luchar contra la fasciolosis. Estudios han demostrado que la inmunidad adquirida se puede estimular en rumiantes después de la infección con *F. hepatica* o *F. gigantica* en animales. Lo que sugiere que el desarrollo de una vacuna es probable. Así, durante muchos años se han aislado, purificado y obtenido nuevas moléculas de *F. hepatica* como proteínas recombinantes, y constituyeron potenciales candidatas para vacunación contra fasciolosis, entre estas se encuentran las proteínas de unión a ácidos grasos, catepsinas y glutatión S-transferasas. Se han utilizado para esta variedad de moléculas diferentes enfoques para encontrar la mejor vacuna. Como ser el análisis de una gran cantidad de antígenos que reaccionan de forma cruzada con sueros de otros trematodos, antígenos que son ortólogos de candidatos a vacunas existentes en otras especies, la selección racional de antígenos que son considerados críticos en la biología del parásito. En todos los casos se han obtenido resultados prometedores, pero ninguno de ellos ha sido concluyente. Se ha estudiado los productos de excreción-secreción como candidatos para vacuna, obteniéndose antígenos de los PES de *F. hepatica* de gusanos adultos. En un estudio realizado con ratones BALB/c, analizando los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a hepática en todos los ratones infectados, se encontró que IgG1 era el subtipo de IgG dominante al final del experimento. Utilizando como antígeno PES de *Fh*. (López Abán & Nogal Ruiz, 2005; Toet et al., 2014).

Una de las estructuras más importantes en la biología del trematodo es el tegumento, un sitio primario de interacción entre el huésped y el parásito y ha sido muy estudiado para utilizarle en una la vacuna anti helmíntica, debido a sus propiedades e interacciones con el huésped, sobre todo con la respuesta inmune del mismo, así como los PES generados por el tegumento. (Hanna, 1980; Toet et al., 2014)

Con respecto a los exosomas del parásito, estos no han sido estudiados como candidatos para vacuna en *F. hepatica*, pero si se han realizado pruebas de vacunación con EXO de otros parásitos debido a varias de sus características inmuno moduladoras; por ejemplo se ha observado que los exosomas derivados de *Toxoplasma gondii* pueden promover la activación de macrófagos con una mayor producción de IFN- γ , IL-12 y TNF- α ; además, en este proceso se estimulan tanto las respuestas inmunitarias humorales como las celulares, lo que da como resultado una inmunidad protectora contra la infección por *T. gondii* (Wu et al., 2019).

Asímismo, se realizaron estudios en ratones inmunizados con exosomas derivados de reticulocitos de sangre de ratones infectados por *Plasmodium yoelli*. Los ratones

inmunizados con este EXO, fueron luego infectados por *P. yoelii* para comprobar si estas vesículas cumplían función como antígeno. Se reportó que la inmunización con los EXO provoca la producción de anticuerpos IgG, induciendo reticulocitosis y una respuesta inmune protectora contra la malaria (Martin-Jaular et al, 2011).

2) OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Realizar un estudio preliminar de la respuesta inmuno humoral de ratones CD1 inmunizados con exosomas de *Fasciola hepatica*.

2.2 Objetivos específicos

- Preparación de Productos de Excreción-Secreción (PES). Y posterior concentración de los PES.
- Purificación de los exosomas del PES. Cuantificación de proteínas por espectrofotometría UV y micro BCA.
- Caracterizar el perfil de proteínas de exosomas, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) con tinción de las proteínas por CBB coloidal y tinción de plata; y western blot.
- Inmunización de un grupo de ratones CD1 con los exosomas obtenidos, realizando sangrados en los días 0 y siguientes durante 56 días para evaluación de anticuerpos. Se realizarán también controles del peso de los ratones todas las semanas. Se tendrá en paralelo un grupo control de ratones inmunizados solamente con PBS. Los animales se mantendrán en el bioterio del Instituto de Higiene.
- Detección de anticuerpos específicos contra exosomas de *F. hepatica* en los sueros de ratón inmunizados, utilizando el método ELISA.

3) MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de las proteínas, se utilizaron dos métodos, un método espectrofotométrico y otro colorimétrico.

En el método espectrofotométrico se midió la absorbancia a 280nm de 2 µl de muestra en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), con un blanco con PBS 10 mM filtrado 0.22µm.

Por otro lado, se realizó un método colorimétrico, el del ácido bicinconínico (Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific), en micro placas de 96 pocillos. A partir de una solución de 1mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA) se prepararon estándares diluidos de la misma (concentración de 200µg/ml a 0,5µg/ml), realizando la dilución en PBS 10 mM filtrado por 0.22µm. Se preparó el reactivo de trabajo, dependiendo del número de muestras estándares, muestras de las cuales se quería saber su concentración y la cantidad y el volumen de réplicas con las que se trabajó, en este caso se trabajó con micro placas y con rango lineal de 2-40µg/ml, por lo que se le debieron realizar las diluciones necesarias a las distintas muestras problema para que se encuentren dentro del rango lineal (a partir de la concentración obtenida a 280nm).

Se sembraron 150µl por pocillo de cada estándar y muestra problema y para finalizar 150µl del reactivo de trabajo en cada pocillo. Se incubó la placa tapada por dos horas a 37°C.

La placa se leyó a 560nm en un lector de placas (MCC/340, MultiSkan). Realizando una curva de calibración con las concentraciones de la BSA y la D.O. 560 nm, esta curva se ajustó a una ecuación polinómica de segundo grado, a partir de la cual se obtuvo luego la concentración de las muestras problema. En todos los procedimientos con este kit y para el análisis de datos se siguieron las recomendaciones del fabricante del reactivo.

3.2 Obtención de parásitos adultos y lavado de gusanos.

Se obtuvieron parásitos adultos de *Fasciola hepatica* (*Fh*) en días de faena del Frigorífico Schneck; los mismos se extrajeron de los conductos biliares de vacunos infectados directamente en la playa de faena. Los parásitos se recolectaron primero en bilis termostaticada a 37°C; la bilis se obtuvo de los hígados de los que se extrajeron los gusanos; y luego en el laboratorio se cambiaron a buffer fosfato salino (PBS) (NaCl 136 mM, Na₂HPO₄.7H₂O 8.1 mM, NaH₂PO₄ anhídrido 1.7 mM) 10 mM, pH 7.4 termostaticado a 36 °C, para lograr que los gusanos limpiaran su tubo digestivo por medio de la toma de PBS y regurgitación del contenido. Con esto se logró eliminar los componentes del hospedero no deseados (como bilis y sangre) del tubo digestivo y del tegumento de los parásitos.

Aquellos gusanos que luego de varios lavados con PBS presentaron movilidad y buena integridad física se utilizaron para obtener productos de excreción y secreción (PES) como se indica en 3.4.

3.3 Preparación del medio de mantenimiento de los gusanos de *F. hepatica*.

Para la obtención de los productos de excreción y secreción de *F. hepatica* (PES *Fh*) se trabajó con un medio de cultivo RPMI (RPMI 1640 con Glutamina, PAA labs GMBH, CAT N° E12-885) modificado de la siguiente forma: cada 500ml de RPMI 1640 se le adicionó 3.575 g Hepes, 1g de glucosa, 12.5mg Gentamicina, y se ajustó el pH del medio de mantenimiento a 7.3. El mismo fue esterilizado por filtración utilizando una membrana de 0,22 μm (Millipore) en un sistema de filtración cerrado (Thermoscientific, 47 mm) bajo cámara de flujo laminar, alicuotado en tubos tipo Falcon, estériles de 50ml, se conservaron a -20°C hasta su utilización.

3.4 Obtención de los PES de gusanos adultos en medio de mantenimiento

Los gusanos seleccionados en 3.2 se procesaron inmediatamente para obtener PES de *F. hepatica*. Se incubaron en el medio de mantenimiento preparado en 3.3 utilizando una relación gusano/medio (ml) de 1:1, a 37°C , en estufa y con agitación constante. Los tiempos de incubación en medio de cultivo de cada lote fueron variando como se muestra en la Tabla 3.1, de 2.5 hs a 16.5 hs. En algunas de las incubaciones los gusanos utilizados no estaban completamente limpios como se describió en 3.2, por lo cual los lotes de PES obtenidos se procesaron separadamente de los limpios y se los denominaron sucios como se indica en la misma tabla. Como se realizaron varias visitas al frigorífico los lotes se identificaron con números correlativos a tales efectos.

Con el fin de obtener mayor cantidad de PES en algunas incubaciones, luego de finalizada el primer tiempo de incubación se reutilizaron los gusanos vivos, cambiando el medio ya utilizado por medio de mantenimiento fresco para realizar una segunda incubación y obtener un segundo lote de PES en las mismas condiciones de trabajo. Para identificar en qué etapa de incubación se adiciono al nombre del lote, uno número final, indicando primera (1), segunda (2) o tercera (3) incubación.

Por ejemplo, en el caso del lote 3 (L3), se separaron los parásitos en limpios (L3L) y sucios (L3S), dependiendo como se dijo anteriormente de la movilidad e integridad, y de ambos lotes se realizaron distintas incubaciones, denominadas L3L1 y L3L2, dependiendo si era primera o segunda incubación respectivamente.

Lote de PES	Tiempo (hs)	Número de Fh
L1L	3	25
L1S	4	50
L2L	3	15
L2S	2.5	10
L3L1	3	37
L3L2	6	37
L3L3	10	37
L3L4	5	37
L3S2	6	40
L3S3	10	40
L3S4	5	40
L4L1	4	51
L4L2	16,5	51

Tabla 3.1: Lotes obtenidos de PES de *Fh*, su tiempo de incubación en medio de cultivo y cantidad de parásitos de *F. hepatica* en cada lote. El nombre de los lotes se refiere L (lote), seguido del número de visita al frigorífico (n) y la letra L o S dependiendo si los parásitos eran limpios o sucios respectivamente; por último la etapa de incubación.

Finalizadas las incubaciones, los medios se filtraron con papel filtro para retener los huevos que los parásitos emitieron durante la misma, seguido de un filtro de 0,45µm (Millipore) y por último otro filtro de 0,22µm (Millipore) para retener las bacterias. El papel filtro y las dos membranas utilizadas se esterilizaron previamente en autoclave conjuntamente con el sistema de filtración. Los PES se alícuotaron en Eppendorff de 2ml y se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.4.1 Concentración del PES de *F. hepatica*

A continuación, se realizó la concentración de las proteínas (entre ellas los exosomas) de los PES por centrifugación, utilizando Amicones de corte molecular 3 KDa, de 15 ml (ULTRA15, Millipore) (previamente utilizados con PES *Fh* o nuevos). Se usó para la centrifugación una centrífuga con rotor de ángulo móvil (Hettich Zentrifugen, Rotina 380R, Rotor 1754) configurada con RCF (g)= 4000 y T= 4°C.

Antes de realizar la concentración se limpiaron las membranas de los Amicones, centrifugando por 10 minutos (misma configuración para la centrífuga que la recién nombrada) con agua destilada. Luego se colocaron aproximadamente 4 ml de PES en el Amicon y se centrifugó en las condiciones mencionadas anteriormente por 30 minutos.

A continuación de la primera centrifugación se comenzó con el cambio de buffer de los PES de *Fh* obtenidos, con PBS 10 mM, pH 7.4. Se tiró el líquido que pasó el filtro, colectado en el fondo del Falcon y se colocaron los mililitros necesarios de PBS para completar 4 ml, luego se centrifugó otra vez por 30 minutos en las mismas condiciones. Se verificó después si el eluido seguía teniendo color rosado (si es así, seguía presente el rojo fenol del medio RPMI, el cual se debe eliminar ya que influye en los procesos colorimétricos posteriores). Se

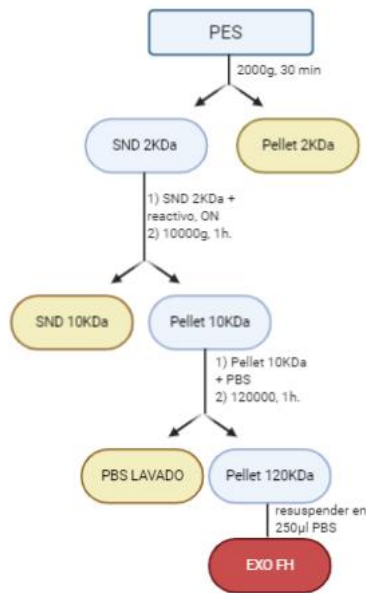
realizaron distintos cambios de buffer con PBS filtrado por 0,22µm y se centrifugaron por 30 minutos tantas veces como sea necesario para que el eluido fuera transparente. Luego de terminar la concentración y el cambio de buffer, se le colocó un inhibidor de proteasas, 20µL de inhibidor por mililitro de PES concentrado (inhibidor de proteasas: Pierce Protease Inhibitor Mini Tablets, Thermo Scientific A32953, Inhibitor Cocktail Pierce en PBS filtrado en 0.22µm), por último, se alícuotaron los PES en Eppendorf de 2ml y se guardaron a -80°C hasta ser utilizados.

3.4.2 Determinación de la concentración de proteínas del PES

Para determinar la concentración de las proteínas presentes en los distintos lotes de PES luego de la concentración, se utilizó un método espectrofotométrico y uno colorimétrico, métodos explicados en 3.1.

3.5 Purificación de Exosomas de *F. hepatica*

Para purificar los exosomas presentes en los PES obtenidos por cultivo se utilizó un método químico usando un reactivo comercial, Invitrogen- Total Exosome Isolation (from cell culture media) (Invitrogen, lote 00299875) el que se describe en la figura 3.1.



Created in BioRender.com bio

Figura 3.1: Esquema de purificación de EXO *F. hepatica* por método kit Invitrogen, a partir de PES de *F. hepatica*. La muestra de EXO y las fracciones marcadas en marrón fueron guardadas a -80°C durante el desarrollo de la purificación. Los EXO de *F. hepatica* también fueron guardados a -80°C.

Para la purificación se siguió el protocolo aconsejado por el kit comercial, el cual se le agregó un paso del protocolo descrito previamente por Marcilla (Marcilla et al., 2012).

Para comenzar se centrifugó el PES por 30 min a 2000xg (centrífuga: sigma 3-18k, RCF (g)=2000, T= 4°C, Hettich Zentrifugen, Rotina 380R, Rotor 12154-H//181/J (bucket)), para remover células y detritus. Se pasó sobrenadante (SND 2KDa) conteniendo el PES libre de posibles detritus a un nuevo Eppendorff sin distorsionar el pellet (P2 KDa) de 2ml.

El P2K se resuspendió en 400µl de PBS 10 mM (filtrado por 0,22µm) y se guardó a -80°C.

Seguidamente se le agregó al SND 2KDa, 0.5 volúmenes del reactivo Total Exosome Isolation (From cell culture media) de Invitrogen, según indicaciones del fabricante. Se obtuvo una solución homogénea utilizando el vortex y luego se dejó incubar overnight (ON) a 4°C.

Al otro día se centrifugaron las muestras (SND2KDa + reactivo) a 10.000xg (misma centrífuga que se utilizó en el paso anterior de centrifugación) durante una hora. Luego de la centrifugación se transfirió el sobrenadante (SND 10KDa) a un nuevo Eppendorff y se guardó a -80°C (esta muestra representaría todos los componentes PES de *Fh*, menos los exosomas). Mientras que el pellet 10KDa (P 10KDa) (conteniendo EXO) fue resuspendido, dentro de la cabina de flujo laminar, en 1ml de PBS 10mM filtrado 0,22µm, mezclándolo bien con vortex para lavar los EXO de *F. hepatica*.

Dentro de la cabina de flujo laminar, se pasó este volumen de 1ml a los tubos de 1ml de la ultracentrífuga, (en el caso de la ultracentrífuga era muy importante realizar una equilibración de los tubos por peso, es decir que todos los tubos de 1ml que se utilizaron tuvieran exactamente 1ml en su interior y pesaran lo mismo, para que al usar el rotor no pesara más de un lado que del otro) para proceder a la recuperación de los EXO por peleteo, como se describe a continuación.

Se ultra centrifugó la muestra durante 1 hora a 120.000xg (ultracentrífuga: Thermo Scientific, Sorwall Mx 120 Micro- Ultracentrifuge, RCF (g)=120.000, Speed(rpm)=52.000, Aceleración: 9, Desaceleración: 7, T=4°C, Rotor= n°2, S120- AT2, rotor de ángulo fijo). De esta ultracentrifugación se obtuvo un sobrenadante, siendo esto PBS lavado (PBS L) el cual se guardó a -80°C y un pellet (P 120KDa) conteniendo EXO de *Fh*, el mismo se resuspendió en 150µl en PBS 10mM filtrado 0,22µm.

Con el fin de no perder EXO de *F. hepatica* que se encontraran en el PBS L (su concentración era muy grande, por lo que se llegó a pensar que estas muestras contenían EXO), algunos lotes PES utilizados también para la inmunización de los ratones se los trató de la misma manera a la hora de la purificación, con la salvedad de que al PBS lavado (PBS L) se lo ultra centrifugó por 22 horas (en las mismas condiciones y misma ultracentrifuga). Posteriormente el paso de lavado fue modificado como se describe en 3.9.2.

Luego de la ultra centrifugación del PBS L se obtuvieron EXO de *F. hepatica*, el cual se resuspendió en 150µl de PBS 10mM filtrado 0,22µm.

Por último, se determinó la concentración de las proteínas presentes en los Eppendorffs de EXO de *F. hepatica*, utilizando para esto ambos métodos descritos en 3.1.

3.6 Análisis del perfil de proteínas por electroforesis

3.6.1 Electroforesis en gel SDS-PAGE

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. En esta técnica se emplean un gel concentrador (stacking) y un gel separador (running). El gel concentrador contenía buffer Tris-HCl 0.5M a pH 6.8, mientras que el gel separador contenía Tris-HCl 1.5M a pH 8.8.

Se utilizaron geles de poliacrilamida en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio (del inglés- sodium docecyl sulphate, SDS. SDS-PAGE). Se realizó la corrida por el método previamente descrito por Laemmli, U. K. (Laemmli, 1970), en una cuba de electroforesis vertical a temperatura ambiente.

Se ensayaron geles chicos (8.0 cm por 9.0 cm por 1mm de espesor) con una concentración de poliacrilamida para el gel separador de 12.5%, y de 5% para el concentrador.

Las muestras se sometieron al calor durante 3 minutos en agua hirviendo en presencia de buffer de muestra 4x (Tris-HCl 1.0 M pH 6.8, SDS 20%, Azul de Bromofenol 0.2% y glicerol).

Las corridas electroforéticas se realizaron en buffer de electroforesis (Tris base 25 Mm, Glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8.3) a un amperaje de 30 mA por gel, en un equipo de electroforesis (ATTO, Japón) y las mismas se llevaron a cabo hasta que el frente de corrida estuvo a 1 cm del borde inferior del gel. Se utilizó como referencia un marcador de peso molecular (MPM).

Las muestras analizadas (BSA, PES *Fh*, SND 10KDa, PBS L, EXO *Fh*, EXO CD1) por SDS-PAGE fueron en algunos casos teñidas y en otros transferidas para su análisis por western blot como se describirá más adelante.

3.6.2 Revelado de los geles de electroforesis

3.6.2.1 Tinción coloidal con CBB G de alta sensibilidad (Coloidal Coomassie)

Se preparó la solución de Coomassie, siguiendo el protocolo descrito por Dyballa (Dyballa & Metzger, 2009), el cual se basa en uno anterior publicado por Kang (Kang et al., 2002).

Para el mismo, se realizó un cambio, ya que no se disponía de Sulfato de aluminio-(14-18)-hidratado en el laboratorio por lo que se utilizó Sulfato de aluminio-(12)-hidratado al 5%. El resto del protocolo se siguió de la misma manera que en el protocolo original con 0.02% Coomassie Brilliant Blue R-250, Etanol 10% y ácido ortofosfórico 2%, se utilizó CBB G-250 para tener alta sensibilidad.

Luego de la electroforesis realizada como se describió anteriormente, se removieron los geles y se los lavó con agua 3 veces durante 10 minutos en agitación para retirar los restos de detergente SDS. Seguidamente se incubó al gel con la solución de Coomassie por 24 hr, con agitación.

Para finalizar la tinción se removió la solución y se lavó el gel con agua en agitación durante 10 min, 3 veces. Luego se procedió a la decoloración del gel por incubación del mismo en una solución decolorante de etanol 10%-ácido ortofosfórico 2% en agua.

3.6.2.2 Tinción neutra con plata

Con otros geles de electroforesis se ensayó la tinción neutra con plata, primero se dejaron los geles en una solución de etanol 30%- ácido acético 10% durante toda la noche con agitación, luego se agitó durante 30 minutos, 2 veces con etanol 30%.

Seguidamente se lavaron con agua, 3 veces con agitación por 10 minutos. En el paso siguiente se agregaron 5 volúmenes de AgNO₃ al 0,1% y se incubaron por 30 minutos en agitación a temperatura ambiente.

Para finalizar el revelado se incubó con la solución reveladora (Carbonato de Sodio 2.5%-Formaldehído 0.02%) hasta que el fondo comenzó a oscurecerse. La reacción se detuvo con ácido acético al 1% y luego se lavó con agua Mili-Q la cantidad de veces necesarias para obtener una buena visualización del gel.

3.6.2.3 Validación de la tinción coloidal

Sabiendo que la tinción de plata era adecuada para una concentración de 1-10 ng de proteína por banda mientras que la tinción con Azul de Coomassie era adecuada para revelar una concentración de 0.1-0.5 µg por banda (Harlow, 1988) y debido a que se utilizó una solución de Coomassie coloidal casera, ya que no era exactamente igual a la descrita en el protocolo se evaluó la sensibilidad de la misma, para esto se la comparo con la tinción de plata realizada.

Para esto se compararon dos geles, uno réplica del otro, en los que se sembraron las mismas cantidades crecientes de BSA, usada como proteína estándar (ng/ pocillo a µg/pocillo) y se tiñeron con plata y Coomassie coloidal respectivamente. Teniendo en cuenta la concentración proteica de las muestras ensayadas, para ver con cuál de las dos técnicas se obtenía mejor sensibilidad.

3.7 Ensayo de inmunización

Se llevó a cabo un ensayo de inmunización con EXO de *F. hepatica* con la finalidad de evaluar la respuesta inmune de los ratones al ser inmunizados con EXO *Fh*; para el mismo se utilizaron ratones de la cepa CD1 de 6 semanas de vida al momento de comenzar el ensayo.

El protocolo experimental realizado fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CHEA) de la Facultad de Medicina (formulario número 1015), el mismo recibió el nombre de “Ensayos de protección contra *Fasciola hepatica* en ratones CD1 utilizando exosomas como antígeno protector”. Este protocolo consta de más etapas experimentales de las mencionadas en este trabajo por lo cual nos referiremos solamente a la parte inicial del mismo.

Para la realización del protocolo de trabajo entregado a la CHEA y en el diseño experimental nos basamos en las normativas vigentes de uso de animales de experimentación en nuestro país y en distintos artículos (Marcilla et al., 2012; Trelis et al., 2016) realizándose algunas modificaciones para el caso del ensayo realizado para este trabajo.

Se utilizaron ratones CD1 ya que eran los disponibles en el bioterio del Instituto de Higiene; es una cepa muy usada para estudios farmacológicos por presentar mayor robustez y estabilidad que otras cepas más usadas en estudios de *F. hepatica* como BALB/c.

Para este trabajo en particular se contó con un total de 34 ratones (todos de 6 semanas al comenzar el ensayo).

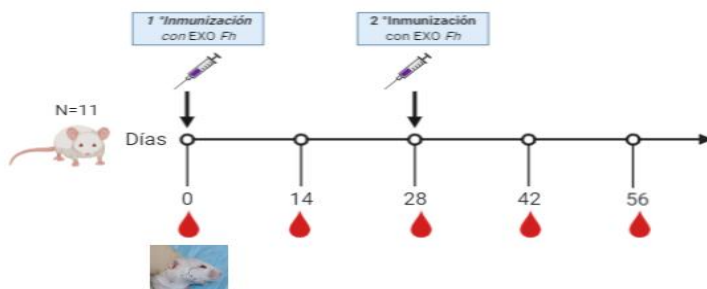
Los animales fueron distribuidos en tres grupos de la siguiente manera: *Grupo 1*: 20 ratones, 10 hembras y 10 machos, no se los inmunizó, *Grupo 2*: 3 ratones hembras, inmunizados con PBS, sin adyuvante y *Grupo 3*: 11 ratones hembras, inmunizados con EXO de *F. hepatica*, sin adyuvante. Los animales fueron alojados en el bioterio del Instituto de Higiene en condiciones de temperatura y humedad controladas con un ciclo de día/noche de 12 hs. Se controló el peso de todos los ratones en los días de sangrado, aunque no fueron numerados para el pesaje, por lo que no se pudo hacer un seguimiento individual de cada ratón en cuanto a su peso y toma de sangre. Como se comentó anteriormente, el diseño experimental con el que se trabajó y se entregó a la CHEA consta de más pasos ya que se siguió trabajando con los grupos luego de inmunizarlos con EXO.

Los ratones del *Grupo 3* (tomados como control positivo) fueron inmunizados, vía subcutánea (en el lomo, entre cabeza y torso) con los EXO de *Fasciola hepatica* previamente purificados. Mientras que los ratones del *Grupo 2* (tomados como control negativo) fueron inmunizados por la misma vía, pero con PBS.

Como se muestra en la figura 3.2, se inmunizó a los 11 ratones del *Grupo 3* dos veces a lo largo del ensayo (día 0 y día 28). La primera inmunización fue de 10µg/dosis (EXO de *Fh* purificados de lote L1L y L2L), mientras que la segunda inmunización fue de 5µg/dosis (EXO de *Fh* purificados de lote L4L1) (Trelis et al., 2016); en ambas dosis el un volumen final inoculado fue de 100µl.


Por otro lado, como se muestra en la figura 3.3 a los ratones del *Grupo 2*, se los inmunizó en los mismos dos días, pero utilizando 100µl de PBS como control, no inmunizado.

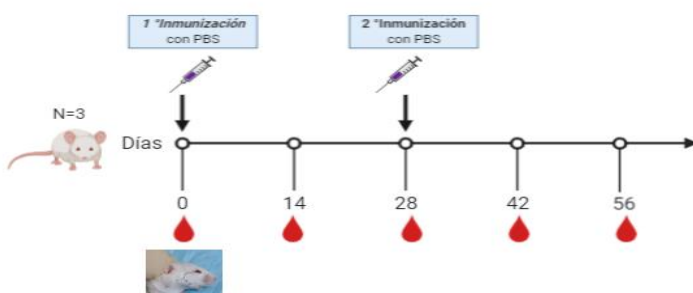
Se recolectaron muestras de sangre de todos los animales de los *Grupos 2 y 3*, vía vena del plexo maxilar en los días 0, 14, 28, 42 y 56 del ensayo para la obtención de sueros que fueron luego utilizados para la determinación de anticuerpos por la técnica de ELISA, los mismos se guardaron a -20°C hasta su procesamiento.



Created in BioRender.com bio


Figura 3.2: Esquema del ensayo de inmunización con antígeno EXO de *F. hepatica* en modelo murino. Ratones CD1 hembras de 6 semanas de edad al comenzar el ensayo. Este esquema representa el **Grupo 3** ($n=11$). 1° Inmunización= $10\mu\text{g}$ proteína/dosis de EXO y la 2° Inmunización= $5\mu\text{g}$ proteína/dosis de EXO.

 Representa la toma de sangre antes de cada procedimiento.



Created in BioRender.com bio

Figura 3.3: Esquema del ensayo de inmunización con PBS sin antígeno en modelo murino. Ratones CD1 hembras de 6 semanas de edad al comenzar el ensayo. Este esquema representa el **Grupo 2** ($n=3$). 1° y 2° Inmunización= $100\mu\text{l}$ / dosis de PBS.

 Representa la toma de sangre antes de cada procedimiento.

3.8 Corroboración de muestras de EXO *Fasciola hepatica* por Western Blot

Con el fin de corroborar que las muestras purificadas a partir de los PES de *F. hepatica* con el kit Invitrogen- Total Exosome Isolation (from cell culture media) eran efectivamente EXO de *Fh* se llevó a cabo la técnica de Western Blot utilizando un anticuerpo α -FhCL-1, ya que se sabe por bibliografía que el EXO de *F. hepatica* consta de catepsinas (Marcilla et al., 2012).

Se realizó una electroforesis en un gel SDS-PAGE 12.5% (explicado en 3.6.1) en condiciones reductoras (con DTT 1M), para las muestras de PES de *F. hepatica* y EXO de *F. hepatica*, corriendo 2 μ g por pocillo. A continuación, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μ m (Bio Rad) usando buffer de transferencia 1x (Tris base 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20%v/v, pH8.3) en un equipo de transferencia semi-húmeda (ATTO, Japón), durante 75 min a 1.2 mA/cm².

Luego se bloquearon los sitios inespecíficos de la membrana con solución de bloqueo (PBS 10mM, pH 7.3, Tween-20 0.1%, proteína 6% (3% de BSA fracción V y 3% de leche descremada)) a 4°C ON, con agitación. Al otro día, se cortó la membrana de nitrocelulosa en las tirillas correspondientes a las 6 muestras corridas en el gel de electroforesis. Se colocaron las tirillas en las canaletas y se incubaron con el anticuerpo primario (Ac 1°) en una dilución de 1/3000 (esta dilución fue realizada en solución de bloqueo) durante toda la noche a 4°C con agitación. Se utilizó como Ac 1° un suero policlonal hiperinmune de conejo, anti-FhCL-1.

Al día siguiente se descartó la solución de bloqueo con Ac 1° y se lavaron las tirillas 6 veces durante 10 minutos, con PBS-Tween 0.1% en agitación para así despegar todo el Ac 1° de las proteínas de las tirillas. A continuación, se incubaron las tirillas con el correspondiente anticuerpo secundario (Ac 2°, Anti-rabbit IgG (molécula completa) peroxidasa, AG154, Sigma) en una dilución de 1/5000 en PBS-Tween 0.1% durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Luego de esta hora de incubación, se descartó el PBS-Tween 0.1% con Ac 2° y se lavó seis veces en las mismas condiciones que en el día anterior para despegar todo el anticuerpo de las proteínas de las tirillas.

Para corroborar que lo que se purificó era EXO de *F. hepatica* a través de este método, se realizaron distintos controles; uno de estos fue el control positivo, que constó de correr el producto de excreción y secreción, ya que esta muestra contiene catepsinas. Y los otros dos controles fueron el de inespecificidad, para lo que en dos tirillas (una EXO de *Fh* y una de PES de *Fh*.) se utilizó suero normal de conejo (el mismo se obtuvo de muestras contenidas en el laboratorio) y el control de anticuerpo secundario; en dos tirillas (también una de EXO de *Fh* y una de PES de *Fh*.) se utilizó PBS 10Mm.

Para finalizar la técnica, se registró la quimioluminiscencia de las muestras con el kit BIO-RAD Clarity MaxTM Western ECL Substrate (compatible con HRP-conjugado al anticuerpo secundario). Para esto, se prepara la solución de revelado 1:1 (0.1 ml de solución cada 1

cm² de membrana), y se incubó en oscuridad con agitación durante 5 min. Se utilizó el software GeneSnap del equipo G-box (Syngene). Dejando la muestra un determinado tiempo de exposición, en este caso, 3 min.

3.9 Estudio de la respuesta inmune generada durante el ensayo de inmunización con antígeno EXO de *F. hepatica* en ratón CD1

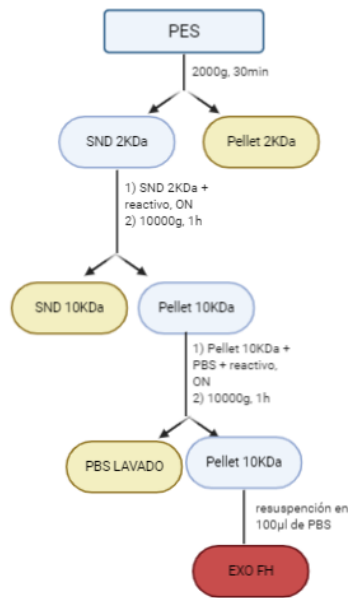
La respuesta de anticuerpos específica contra EXO de *F. hepatica* fue analizada mediante la técnica de ELISA en donde se evaluaron los títulos de IgG total, y de subclases de IgG: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, presentes en los sueros de los ratones utilizados.

3.9.1 Obtención de suero de ratón inmunizado.

Para obtener suero se siguieron los siguientes pasos; primero mediante punción con aguja en la vena del plexo maxilar se recolectaron muestras de sangre de cada ratón de ambos grupos (en los días mostrados en la Figura 3.1), las mismas se colocaron en Eppendorffs y luego se incubaron durante 20 minutos (lo suficiente para que no sufrieran hemólisis) en estufa a 37°C. Para finalizar se centrifugaron para separar el coágulo formado (centrífuga: Hermle Z 229, RCF 15.000, RPM=9000 a T= 4°C, Rotor 220.56V) por 10 min. Una vez obtenido el suero se conservó a -80°C hasta ser utilizado.

3.9.2 Purificación de EXO para sensibilización de placas de ELISA

La purificación de los lotes de PES utilizados para la sensibilización de las placas de ELISA se realizó de la misma manera que la explicada en 3.5 siguiendo el protocolo del kit comercial utilizado junto con partes del protocolo de Marcilla, con una modificación con el fin de obtener una mejor concentración de EXO como resultado final.



Created in BioRender.com bio

Figura 3.4: Esquema de purificación de EXO *Fh* por método kit Invitrogen, a partir de PES de *Fh*. Se marcaron en marrón las muestras que fueron guardadas a -80°C durante el desarrollo de la purificación. Los EXO de *F. hepatica* también fueron guardados a -80°C .

La modificación consistió en que luego de la centrifugación a $10.000\times g$ por 1 hr a 4°C , el Pellet 10KDa de la misma se resuspendió usando una solución de lavado preparada mezclando 1ml de PBS 10mM y 0.5 volumen del reactivo, Kit Invitrogen- Total Exosome Isolation (from cell culture media) (Invitrogen, lote 00299875). Esto se dejó ON a 4°C .

Al día siguiente se repitió la centrifugación a $10.000\times g$, en las mismas condiciones previamente descritas, es decir agregando otra vez 0.5 volúmenes de reactivo con 1ml de PBS 10Mm para resuspender. El sobrenadante de la misma (PBS L) fue guardado a -80°C , mientras que el Pellet (EXO de *Fasciola hepatica*) se resuspendió en $100\ \mu\text{l}$ de PBS 10Mm y luego se guardó a -80°C .

Por último, se determinó la concentración de las proteínas presentes en los Eppendorffs de EXO por los dos métodos descritos en 3.1.

3.9.3 Análisis de la respuesta humoral de anticuerpos IgG total anti-EXO de *Fasciola hepatica*

La respuesta humoral desarrollada por animales inmunizados con EXO de *Fh*, se evaluó mediante la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, por Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) según el protocolo que se describe a continuación.

Las placas de poliestrieno (96 pocillos, GreinerBio-One) se sensibilizaron con $100\ \mu\text{l}/\text{pocillo}$ de los EXO de *F. hepatica* purificados en 3.9.2. ($0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$, 50ng de EXO por pocillo) en buffer carbonato-bicarbonato 0.1M, PH 9.6 ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$), durante toda la noche a 4°C en

cámara húmeda. Luego de ser incubados ON, se lavaron tres veces con PBS conteniendo 0.01% (v/v) de Tween 20 (PBS-T). Se utilizó una solución de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma A2153) al 2.5% en PBS-T 0.001% (200 µl/pocillo) para bloquear los posibles sitios de unión inespecífica sobre el poliestireno, incubando durante 1 hr a 37°C en cámara húmeda.

Las placas se lavaron nuevamente, tres veces con PBS-T 0.01%. La dilución de trabajo fue previamente determinada a través de una dilución seriada (desde 1:250 hasta 1:2000) de un pool de sueros correspondientes al *Grupo 3* en los días de sangrado. La dilución se realizó en PBS-T 0.01% y se incubaron las placas durante 24 hrs a 4°C en cámara húmeda, sembrados por duplicado (100 µl/pocillo). Luego de la incubación se lavaron de la manera descrita previamente.

A continuación, se incubó la placa 1 hr y 20 min a 37°C en cámara húmeda con anticuerpo anti-IgG total de ratón conjugado a peroxidasa (dilución 1:20000, Sigma-Aldrich A9044). Después se lavaron las placas nuevamente. Por último, se agregaron 100 µl/pocillo de una solución conteniendo H₂O₂ como sustrato y o-finilendiamina (OPD) como cromógeno para evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo.

El desarrollo de color se detuvo a los 15 min con 50 µl/pocillo de una solución de HCl 1M y se midió la D.O_{492nm}, en un lector Lab Systems Multiskan MS.

Los sueros estudiados en este ELISA fueron los sueros de los 11 ratones del Grupo 3 en los días de sangrado (D0, D14, D28, D42 y D56). Realizándose un promedio de los once valores de D.O_{492nm} en cada día de sangrado ya que los ratones no fueron evaluados individualmente.

Para los controles se utilizaron; un pool de suero positivo total (P+t) (10µl de suero de los pooles de cada día de sangrado del G3) y un pool de suero negativo total (P-t) (10µl de suero de los pooles de cada día de sangrado del G2).

3.9.4 Análisis de la respuesta humoral de subclases del anticuerpo IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) anti-EXO de *Fasciola hepatica*

La sensibilización con EXO de *Fh* se realizó de igual manera que para la determinación de IgG total con las siguientes variaciones, los lavados se realizaron con PBS-T 0.05% y en el paso en el que se bloquearon las placas se utilizó una solución de BSA (Sigma A2153) al 1% en PBS-T 0.05% (200 µl/pocillo).

Con las placas sensibilizadas se realizaron distintos ELISAS, en el primero los sueros correspondientes a cada día de sangrado (100µl/pocillo), fueron incubados en una dilución 1:400 en BSA 0,1% en PBS-T 0,05% durante 1 hr a 37°C, en cámara húmeda.

El mismo procedimiento se siguió para los cuatro distintos anticuerpos a cuantificar ya que el objetivo de este Elisa era elegir la dilución de suero del trabajo. Lo que se logró a través

de una dilución seriada (desde 1:100 hasta 1:12800) de los pools de sueros correspondientes al *Grupo 2* y *Grupo 3* en los días de sangrado 0 y 42.

Luego del lavado con PBS-T 0.05%, las placas se incubaron durante toda la noche a 4°C con una dilución 1:2000 de los conjugados anti-IgG1 (Biolegend B128758), anti-IgG2a (Biolegend B124926), anti-IgG2b (Biolegend B120276) y anti-IgG3 (Biolegend B123268) conjugados a biotina en BSA 0.1% en PBS-T 0.05%.

A continuación, las placas se lavaron con PBS-T 0.05% y se incubaron durante 1 hr a 37°C en una dilución de 1:500 de estreptavidina conjugada a peroxidasa (Biolegend B129964), utilizando 100µl/pocillo. Finalmente, se evidenció la reacción antígeno-anticuerpo con el agregado de una solución conteniendo OPD y H₂O₂ (100µl/pocillo) durante 15 min en oscuridad. La reacción se detuvo con el agregado de 50 µl/pocillo de HCl 1 M y se procedió a la lectura de la D.O_{492nm}.

El segundo ELISA, se realizó con los conjugados que presentaron una respuesta de anticuerpos específicas contra EXO de *Fasciola hepatica* significativa al analizar las D.O. a 492nm al momento de elegir la dilución de los sueros. El método se realizó de la misma manera que el anterior, con anti-IgG1 y anti-IgG3.

3.9.5 Método estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 8 para realizar los gráficos de los resultados obtenidos de los distintos ELISAS.

Para analizar los datos graficados se utilizaron métodos no paramétricos, dependiendo de la gráfica (Mann Whitney test y Wilcoxon test). Tomándose significativas las diferencias cuando $P \leq 0,05$.

4) RESULTADOS

4.1 Validación de la tinción coloidal

Debido a que se utilizó una solución de Coomassie coloidal casera que fue preparada en el laboratorio, se validó que la misma tuviera una similar sensibilidad a la descrita en bibliografía, ya que se requería utilizar esta tinción por ser cuantitativa y muy sensible; para esto se comparó la tinción coloidal preparada con la tinción de plata neutra, corriendo en dos geles las mismas muestras de BSA con cantidades conocidas, estando la proteína a distintas concentraciones en cada carril. Uno de los geles se tiñó con la tinción coloidal con CBB G de alta sensibilidad (Coloidal Coomassie) casero y el otro con la tinción neutra con plata.

Se corrió una electroforesis SDS-PAGE al 12.5%, evaluándose en ambos geles el patrón proteico de BSA (stock de $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$), en las distintas concentraciones, yendo desde los $50\mu\text{g}$ a los $0,0001\mu\text{g}$ (carriles del 3 al 12 en figura 4.1 y figura 4.2).

Se utilizó como referencia un marcador de peso molecular (MPM) que contenía una mezcla de proteínas cubriendo un rango molecular de 9KDa a 235 KDa, con proteínas estándares de tres colores (RGB PLUS Prestained Protein Ladder, Bis-Tris 10%, MOPS buffer, Cat 02102-250, MaestroGen, carril MPM en figura 4.1 y 4.2).

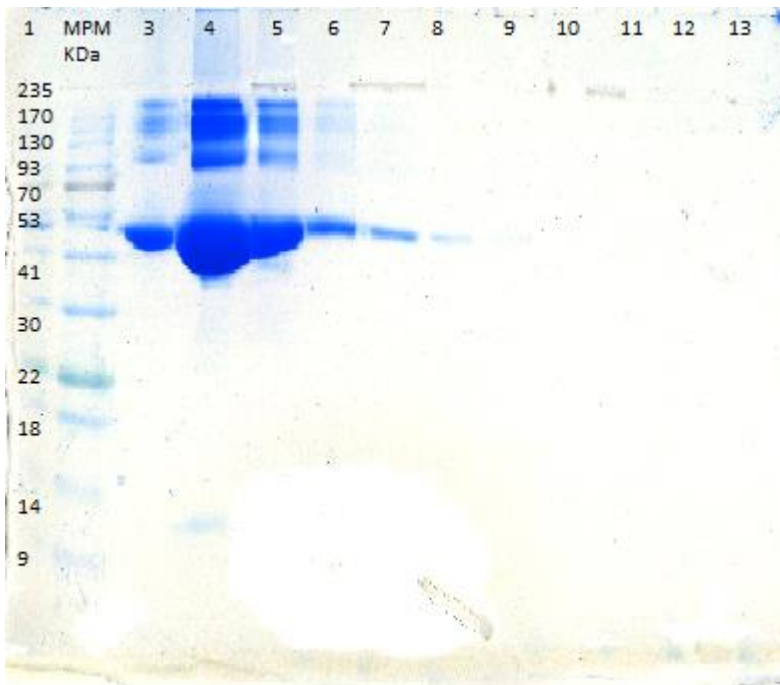


Figura 4.1: Corrida electroforética, SDS-PAGE al 12.5%, con tinción coloidal con CBB G de alta sensibilidad (Coloidal Coomassie), utilizando solución casera. Se corrió BSA desde $50\mu\text{g}$ a $0,0001\mu\text{g}$. Numeración: 3: -, 4: $50\mu\text{g}$, 5: $10\mu\text{g}$, 6: $1\mu\text{g}$, 7: $0,5\mu\text{g}$, 8: $0,1\mu\text{g}$, 9: 50ng , 10: 10ng , 11: 1ng , 12: $0,5\text{ng}$, 13: $0,1\text{ng}$.

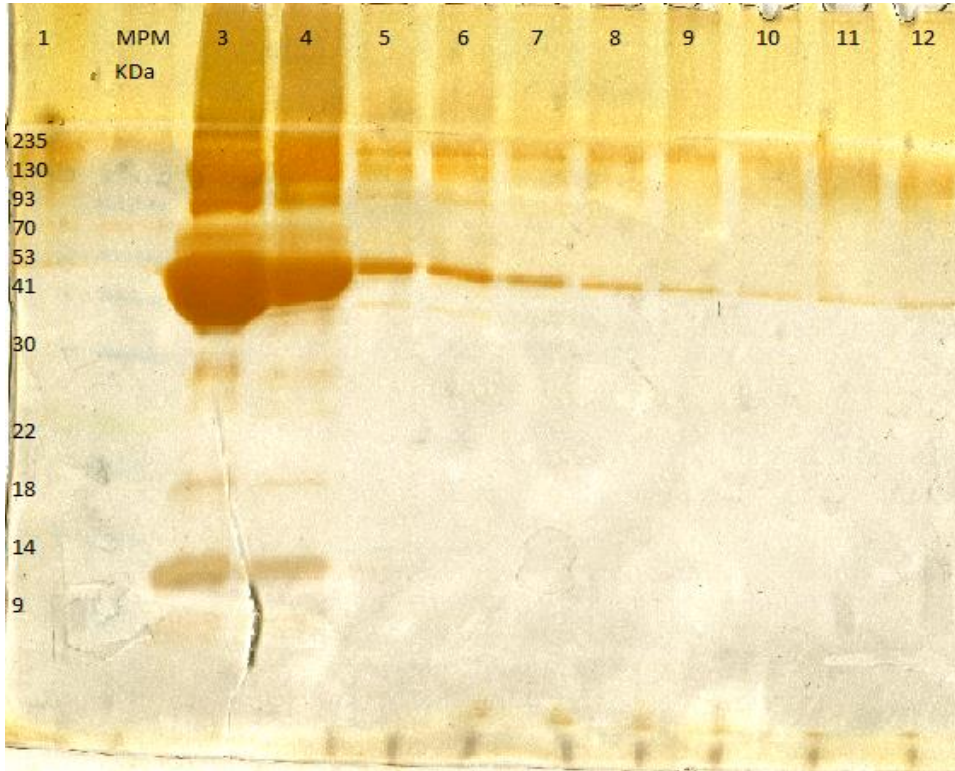


Figura 4.2: Corrida electroforética, SDS-PAGE al 12.5%, tinción neutra con plata. Se corrió BSA desde 50µg a 0,0001µg. Numeración: 3: 50µg, 4: 10µg, 5: 1µg, 6: 0,5µg, 7: 0,1µg, 8: 50ng, 9: 10ng, 10: 1ng, 11: 0,5ng, 12: 0,1ng.

Sabiendo que la tinción de plata era adecuada para una concentración de 0.001-0.01 µg de proteína por banda, mientras que la tinción de Kang era adecuada para revelar una concentración de 0.1-0.5 µg por banda (Harlow, 1988) y teniendo en cuenta que la BSA es una proteína globular con un peso molecular de 66KDa (la corridas realizadas son aparentes, es por esto que en ambas figuras la banda se encuentra alrededor de 50KDa y no los 66KDa teóricos de la proteína utilizada), se puede observar en ambas figuras que las tinciones tienen una sensibilidad acorde a la esperada de 66KDa. Se observa en la figura 4.1, utilizando la solución casera para la tinción de Coomassie, la banda de la BSA hasta el carril carril 9, correspondiendo este carril a 0.05µg. Mientras que en la figura 4.2, con la tinción neutra de plata se puede observar la banda correspondiente a la BSA con buena resolución hasta el carril 9, correspondiente a 0.01µg, pero en esta técnica se revela hasta el carril 12, correspondiendo a 0.0001µg. Esto es debido a que esta técnica es más sensible que la primera, igualmente la técnica de plata no es cuantitativa, por lo que las intensidades de las bandas no se correlacionan con las cantidades.

Por esta razón y viendo las dos figuras, se decidió utilizar también la tinción de Azul de Coomassie casera ya que la misma es cuali y cuantitativa y se logró una buena sensibilidad.

4.2 Obtención de los PES de gusanos adultos

4.2.1 Obtención de parásitos adultos de *Fasciola hepatica*

Se realizaron cuatro idas al Frigorífico Schneck para conseguir gusanos vivos, diferenciadas como distintos lotes, según la ida, en la tabla 4.1. Se obtuvo la información del sexo de las vacas de las cuales se extrajeron los distintos hígados infectados con *Fasciola hepatica* (con excepción del lote L3, la cual no se obtuvieron datos del sexo en esa visita). Se indican en la tabla también la cantidad de hígados infectados y en los que se encontraron gusanos de *F. hepatica*. En el laboratorio se separaron los gusanos en vivos y muertos. Los gusanos de *F. hepatica* vivos se dejaron PBS 10 mM, y a su vez se separaron también en limpias y sucias, mientras que los gusanos muertos fueron contados (en caso posible como L3 y L4, ya que en los otros dos lotes la cantidad era muy grande como para realizar el conteo) y masados. Luego de obtener el PES de los gusanos vivos, tanto limpias como sucias, las mismas se contabilizaron y masaron como se indica en la tabla.

Lote	Sexo vacas	Hígados	Fh vivas y limpias	Masa Fh limpias (gr)	Fh vivas y sucias	Masa Fh sucias (gr)	Fh muertas	Masa Fh muertas (gr)
L1	Machos	5	25	2.262	50	5.490	varias	4.300
L2	Hembras	8	15	1.330	10	0.890	varias	2.700
L3	Sin datos	15	37	2.900	40	2.700	15	0.900
L4	Hembras	10	51	3.730	0	0	31	3.000

Tabla 4.1: Lotes de gusanos (cada número distinto de lote es una visita al Frigorífico Schneck), en cada caso se indica el sexo de las vacas infectadas en esa visita y número de hígados trabajados en cada lote. Se indica también el número de gusanos vivos y limpios, vivos y sucios y muertos (con su respectiva masa en cada caso). En el día L3 no se tuvo información del sexo de las vacas y en el caso de los gusanos muertos del lote 1 y 2 no se contabilizaron ya que eran demasiadas.

4.2.2 Obtención de los PES de *F.h.* y concentración

Los *gusanos* vivos, tanto los limpios como los sucias, se incubaron en medio de cultivo RPMI para obtener los productos de excreción y secreción de cada lote, como se explicó en 3.4.

Observándose en la tabla 4.2, el tiempo de incubación de cada lote, su concentración por método espectrofotométrico (D.O 280nm), absorbancia por método colorimétrico (D.O 560nm) y concentración por este mismo método.

Lote PES	Tiempo incubación (hs)	Concentración (mg/ml) D.O. 280nm	D.O. 560 nm (micro BCA)	Concentración (mg/ml) microBCA	N° de gusanos de partida
L1L	3	1.8	0.300	1.00	25
L1S	4	1.2	0.272	0.58	50
L2L	3	0.34	0.217	0.31	15
L2S	2.5	0.17	0.638	0.21	10
L3L1	3	0.86	0.586	0.90	37
L3L2	6	0.59	0.452	0.51	37
L3L3	10	0.74	0.473	0.66	37
L3L4	5	0.38	0.358	0.25	37
L3S2	6	0.52	0.577	0.58	40
L3S3	10	0.62	0.558	0.63	40
L3S4	5	0.25	0.527	0.25	40
L4L1	4	0.24	0.404	0.57	51
L4L2	16.5	0.23	1.009	0.46	51

Tabla 4.2: Lotes de PES obtenidos, indicando tiempo de incubación en horas, concentración (mg/ml) a D.O. 280nm (método de Nano Drop), D.O a 560nm y la concentración (mg/ml) por método de micro BCA. Las D.O a 560nm observadas son el promedio de los duplicados realizados menos el blanco que se realizó en el micro BCA.

En el lote 3 y 4, se realizaron distintas incubaciones luego de la primera (cambiando el medio de cultivo luego de determinada cantidad de horas), ya que se quería obtener mayor cantidad de PES, la cantidad de horas de cada incubación se realizó de forma aleatoria. Como se observa en la tabla 4.2, el lote L3S1 no se encuentra en la misma, ya que el medio de cultivo de esa incubación no llegó a concentrarse debido una mala manipulación del material de trabajo.

Para la determinación de la concentración de proteínas de los distintos lotes de PES se llevaron a cabo dos técnicas, como se explicó en 3.1, una espectrofotométrica y otra colorimétrica, las concentraciones proteicas de los lotes, medidas por ambos métodos se muestran en la tabla 4.2.

Las concentraciones de la columna nombrada “Concentración (mg/ml) D.O 280nm” en la tabla corresponden al método de espectrofotométrico (utilizando el NanoDrop 1000), en el que 1Abs=1mg/ml. La columna llamada “D.O. 560 nm (micro BCA)” corresponde al método colorimétrico (método del ácido bicinónico (Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific)), en micro placas de 96 pocillos, midiendo la D.O a 560 de la BSA y de las soluciones problemas (en este caso los lotes de PES). A partir de esas densidades ópticas de la proteína BSA se realizó una curva de calibración (figura 4.3), graficando D.O 560nm en función de la concentración de BSA, la misma se ajustó a una ecuación polinómica de segundo grado (ecuación 4.1).

$$y = ax^2 + bx + c \quad \text{Ecuación 4.1}$$

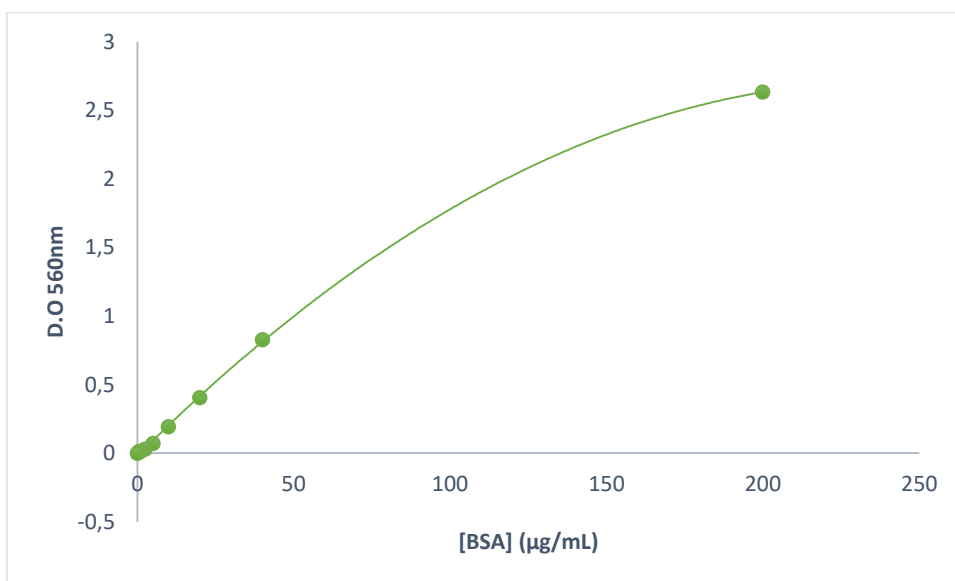


Figura 4.3: Curva de calibración micro BCA para concentración de PES. Curva de calibración del método colorimétrico (micro BCA), D.O. 560nm corregida vs concentración de la proteína BSA (µg/ml). La curva se ajustó a una ecuación polinómica de segundo grado para obtener la concentración de los distintos lotes de PES.

De la figura 4.3 y con los datos obtenidos de las densidades ópticas de las distintas concentraciones de BSA, se obtuvo la ecuación polinómica de segundo grado;

$$y = -5E - 05x^2 + 0,0227x - 0,00184 \quad \text{Ecuación 4.2}$$

con un R correspondiente de 0,9997.

Utilizando ecuación 4.2 y con la D.O 560nm de cada lote de PES medido por micro BCA, se obtuvieron los datos de la columna “Concentración (mg/ml) microBCA” mostrados en tabla 4.2.

Como se puede ver en la tabla 4.2, el hecho de un lote estar compuesto por gusanos de *F. hepatica* limpias no siempre indicó que el PES tuviera una mayor concentración que los lotes de PES provenientes de lotes de gusanos sucios, este sería el caso de los lotes L3L2 y L3S2. De la misma manera que en los lotes que tuvieron más de una incubación, las incubaciones

siguientes, no siempre corresponden a una menor concentración de PES, por lo que claramente los gusanos seguían excretando y secretando producto incluso varias horas y cambio de cultivo después, por lo que fue una buena alternativa el hacer el cambio de incubación para seguir recolectando PES de los distintos lotes de parásitos.

4.3 Purificación de EXO de *Fasciola hepatica*

Los exosomas de *Fasciola hepatica* fueron purificados por métodos distintos como se explicó 3.5 (método 1) y en 3.10.2 (método 2).

Lote	Concentración PES (mg/ml) microBCA	Concentración (mg/ml) D.O 280nm	D.O. 560 nm (micro BCA)	Concentración (mg/ml) microBCA	Método de purificación
L1L+L2L	0.650	0.150	0.224	0.040	1
L4L1	0.570	0.067	0.424	0.040	1
L3S2a	0.580	0.212	0.110	0.283	2
L3S2b	0.580	0.174	0.108	0.278	2
L3S2c	0.580	0.259	0.198	0.218	2
L3S2d	0.580	0.140	0.096	0.186	2
L3S2e	0.580	0.37	0.143	0.259	2
L3S2f	0.580	0.212	0.110	0.283	2
L4L2a	0.460	0.291	0.105	0.176	2
L4L2b	0.460	0.472	0.103	0.224	2
L4L2c	0.460	0.450	0.137	0.304	2

Tabla 4.3: Lotes de PES *F. hepatica* y su concentración por método colorimétrica y lotes de EXO *F. hepatica* y su concentración a D.O 280nm (método fotométrico) y D.O 560nm (método colorimétrico). Lotes de PES que fueron purificados a EXO con sus respectivas concentraciones de PES y sus concentraciones de EXO por D.O a 280nm (método NanoDrop), D.O a 560nm (micro BCA) y concentración por método de microBCA. Los lotes L1L y L2L se midieron en mix, ya que fueron utilizados juntos para la inmunización de los ratones. Los lotes L3S2 y L4L2 poseen distintos sub-lotes (indicados con letras a-f en el caso de L3S2 y a-c en L4L2) ya que los sub-grupos fueron purificados en distintos momentos y se utilizaron para diversas tareas. Las D.O a 560nm observadas son el promedio de los duplicados realizados menos el blanco que se realizó.

En la tabla 4.3 se muestra la concentración de PES por método colorimétrico de cada lote, la concentración del EXO por método espectrofotométrico (D.O. 280nm), la absorbancia a

560nm (método colorimétrico), la concentración de cada lote por este método y el método por el cual se purificó el EXO en cada lote. También se detalla en la tabla que método fue utilizado para cada purificación, siendo el método 1, en el cual se ultracentrifugó la muestra, y el método 2 en el cual se utilizó dos veces el kit de trabajo.

Como se explicó en 4.2.2, con el método colorimétrico (micro BCA), se midieron las D.O 560nm de BSA utilizada en cada medición, realizándose con las mismas una curva de calibración (Figura 4.4), para a partir de la misma y con las D.O a 560nm (en Tabla 4.3) de los lotes de EXO, obtener la concentración del EXO en cada caso que se muestra también en la tabla ya mencionada.

Se obtuvo de cada gráfico (1-6) de la figura 4.4 una ecuación polinómica de segundo grado del tipo de la ecuación 4.1 con sus respectivos R (ecuaciones 4.3 a 4.8).

Por medio de estas ecuaciones y con las correspondientes D.O. 560nm de cada sub lote de EXO se llegó a las concentraciones de los exosomas de *F. hepatica* en cada lote.

Como se ve en la tabla 4.3, en el caso de los EXO *F. hepatica* de los lotes L1L+L2L y L4L1, se contaba con una concentración por método colorimétrico de EXO menor a los otros lotes que fueron purificados. Incluso cuando la concentración de PES *F. hepatica* con la que se inició la purificación en comparación con los lotes L3S2 y L4L2 eran muy similares. Siendo el rendimiento en este caso 6.15% para el mix L1L+L2L y 7.02% para L4L1 (tomando como 100% la concentración de PES por el mismo método). Esta concentración de EXO de los lotes L1L+L2L y L4L1 fue igual suficiente para realizar luego la inmunización de los ratones en el debido ensayo de inmunización.

Esto puede ser debido a que la purificación en el caso de L1L+L2L y de L4L1 fue realizada por el método descrito en 3.5, en el cual se ultra centrifugaba la muestra y se utilizaba una sola vez el reactivo (se recuperó algo de la concentración de estos lotes al ultra centrifugar el PBS L).

Mientras que el resto de los lotes (que fueron luego utilizados para sensibilización de las placas de ELISA) se purificaron realizando algunos cambios al método, como se detalló en 3.10.2. En este caso no se ultra centrifugó las muestras y el reactivo de trabajo se utilizó dos veces. Como se puede ver en la tabla 4.3, estas concentraciones fueron bastante más elevadas. Los rendimientos en estos casos fueron de 48.79% para el lote L3S2a, 47.93% para L3S3b, 37.58% para L3S2c, 32.06% para L3S2d, 44.65% para L3S2e y 40.17% en el caso L3S2f. Mientras que en el lote L4L2, los rendimientos fueron de 38.26% para L4L2a, 48.69 para L4L2b y 66.08 en el caso L4L2c. En todos estos casos los rendimientos estuvieron en su gran mayoría dentro del rango de 35-48% al momento de purificar el PES para obtener EXO de *F. hepatica*, por lo cual este método de purificación tiene mayor rendimiento.

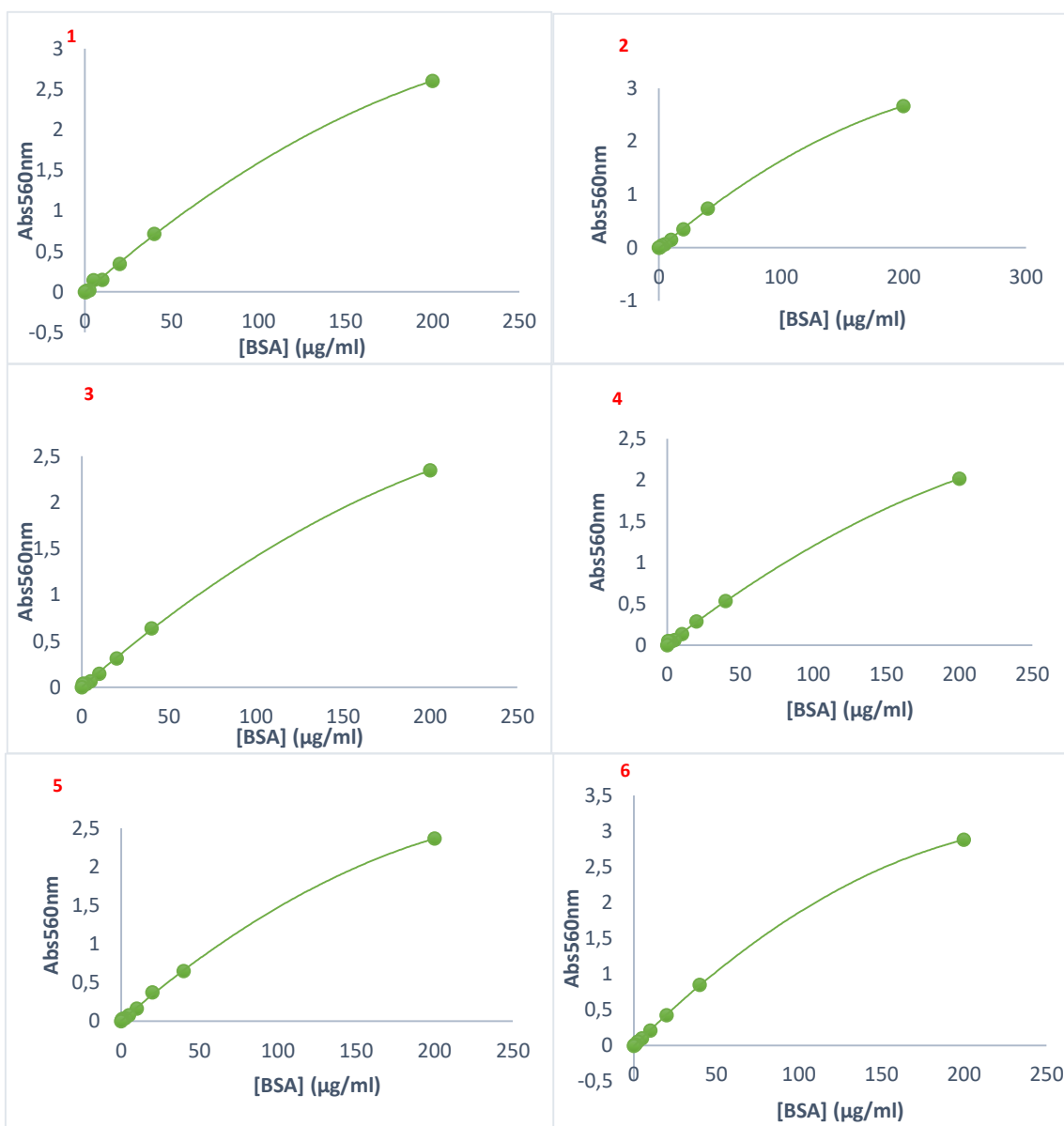


Figura 4.4: Curva de calibración micro BCA para concentración de EXO *F. hepatica*. Curva de calibración del método micro BCA, D.O 560nm corregida vs concentración de la proteína BSA (µg/ml). La curva se ajustó a una ecuación polinómica de segundo grado para obtener la concentración de los distintos lotes y sub lotes de EXO. 1) curva calibración L3S2c, 2) curva calibración L3S2d, 3) curva calibración L3S2e y L3S2f, 4) curva calibración L3S2a, 5) Curva calibración L4L2a, L4L2b y L4L2c y 6) curva calibración L1L+L2L y L4L1.

- | | |
|---|--------------|
| 1) $y = -3E - 05x^2 + 0,0189x - 0,0048$
$R^2 = 0,9991$ | Ecuación 4.3 |
| 2) $y = -3E - 05x^2 + 0,0197x - 0,0192$
$R^2 = 0,9996$ | Ecuación 4.4 |
| 3) $y = -3E - 05x^2 + 0,0165x + 0,0025$
$R^2 = 0,9995$ | Ecuación 4.5 |
| 4) $y = -2E - 05x^2 + 0,0137x + 0,0138$
$R^2 = 0,9994$ | Ecuación 4.6 |
| 5) $y = -3E - 05x^2 + 0,0176x + 0,0049$
$R^2 = 0,9996$ | Ecuación 4.7 |
| 6) $y = -4E - 05x^2 + 0,023x - 0,0097$
$R^2 = 1$ | Ecuación 4.8 |

4.4 Caracterización del perfil de proteínas de EXO *F. hepatica*

4.4.1 Perfil proteico de purificación de PES *Fh* por electroforesis

Con el fin de poder observar el perfil proteico de las distintas muestras que se obtuvieron en la purificación de PES de *F. hepatica* (utilizando el método dos. Siendo estas muestras: PES, pellet 2KDa, sobrenadante 10KDa, PBS lavado y EXO de *F. hepatica*).

Se midió la concentración de estas muestras por método espectrofotométrico primero y por método colorimétrico de las muestras dentro del rango lineal de trabajo, como se muestra en la tabla 4.4.

Se realizó el perfil proteico de los sub lotes L3S2a y L4L2a, ya que ambos lotes fueron obtenidos de una segunda incubación y proviene uno de parásitos de *F. hepatica* limpios y el otro sucios, por lo cual era buena idea comparar a los mismos.

La curva de calibración por la cual se obtuvieron las concentraciones (mg/ml) para método colorimétrico (micro BCA) se encuentran en la Figura 4.4 (gráficas 4 y 5) y su ecuación polinómica de segundo grado son la ecuación 4.6 y la ecuación 4.7.

Sub-Lote		Concentracion (mg/ml) D.O.280nm	D.O 560nm	concentración (mg/ml) microBCA
L3S2a	PES	0.52	0.577	0.58
	P		-	-
	2KDa	0.17		
	SND		-	-
	10KDa	0.293		
	PBS L	0.055	-	-
	EXO	0.212	0.110	0.283
		0.174	0.108	0.278
L4L2a	PES	0.23	1.009	0.50
	P	0.04	0.180	0.027
	2KDa			
	SND	0.477	0.263	0.453
	10KDa			
	PBSL	0.076	-	-
	EXO	0.291	0.105	0.176

Tabla 4.4: Muestras del perfil de purificación de EXO de *F. hepatica* de los lotes L3S2a y L4L2a y su concentración a D.O. 280nm, D.O. 560nm (micro BCA) y concentración (mg/ml) por método colorimétrico. Muestras colectadas de la purificación de EXO a partir de PES *F. hepatica* de dos lotes de PES obtenidos en 4.2. Se marcan, PES, pellet 2KDa (P2KDa), sobrenadante 10KDa (SND 10KDa), PBS Lavado (PBS L) y EXO *F. hepatica* y sus respectivas concentraciones por D.O. a 280nm (método, fotométrico, NanoDrop), D.O a 560nm y concentración por método de colorimétrico o microBCA. Las D.O a 560nm observadas son el promedio de los duplicados realizados menos el blanco. Las celdas con “-” son celdas en las que la concentración por método fotométrico era muy pequeña, por lo que se decidió no medir la concentración por método colorimétrico.

La figura 4.5, muestra del análisis mediante SDS-PAGE al 12.5% utilizando tinción azul de Coomassie casera, de las diferentes fracciones obtenidas al purificar PES de *F. hepatica*. En el caso de esta figura se trata del sub lote L4L2a, con un marcador de peso molecular (MPM) que contenía una mezcla de 8 proteínas recombinantes cubriendo un rango de peso molecular de 60KDa a 250 KDa (RGB PLUS Prestained Protein Ladder,26637, Thermo Scientific).

Como se ve en la figura, tanto en condiciones no reductoras como reductoras (sin DTT y con DTT (ditiotreitól, 1M)), las bandas de PES (carriles 1 y 7) son las más intensas. Ya que como era de esperar, contienen mayor concentración de todas las proteínas del producto de excreción-secreción (teniendo en cuenta que el PES del gusano adulto consta de aproximadamente 202 proteínas como se reportó anteriormente) y la tinción utilizada es cuantitativa. Debido a esto se puede ver alrededor de los 40-100KDa una gran concentración de proteínas, la cual se ve en el gel como una intensa banda. Siendo la misma más intensa cuando la fracción de PES no se encontraba reducida. Esto puede ser debido al que al reducirse se eliminan algunas interacciones que se forman entre las proteínas (marcado por flechas rojas en la figura 4.5).

En esta banda intensa en particular, alrededor de los 41KDa podría de encontrarse la pro-catepsinas (la *FhCat-L* en su forma zimógena), ya que su peso molecular teórico, es cercano a los 37KDa (Cwiklinski et al., 2015) (y teniendo en cuenta tanto, que en el gel se ven pesos moleculares aparentes como que alrededor de este peso se ve una banda o “smear”, se puede pensar que estas proteínas se encuentran ahí).

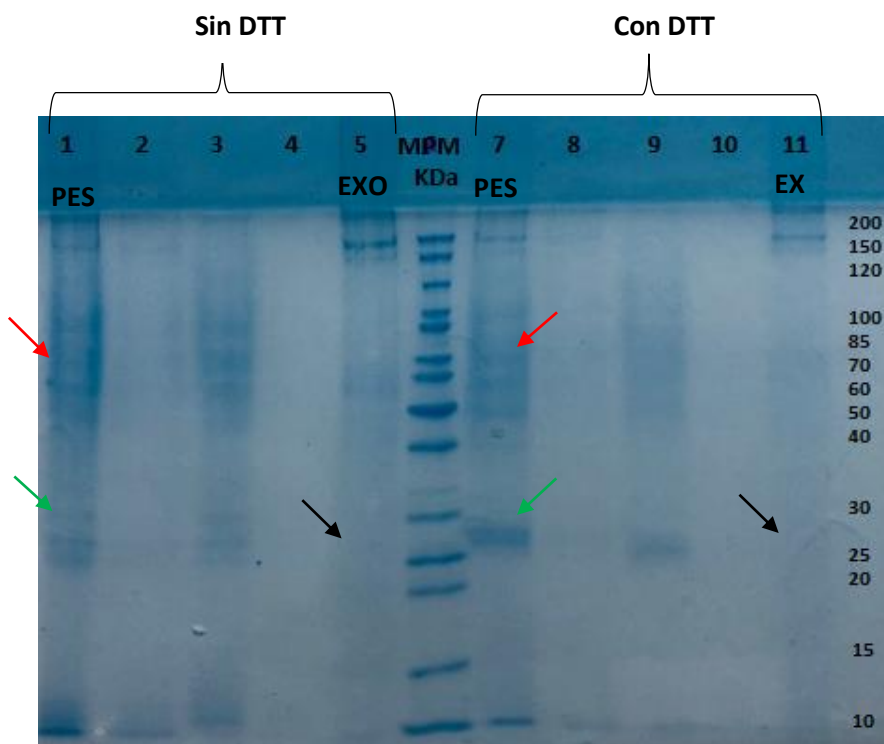


Figura 4.5: Corrida electroforética, SDS-PAGE al 12.5%, con tinción coloidal con CBB G de alta sensibilidad (Coloidal Coomassie) del perfil proteico de la purificación de EXO *F. hepatica* del lote L4L2a. De forma no reducida a la izquierda (sin DTT) y reducido a la derecha (con DTT). Muestras corridas; 1) PES *F. hepatica*, 2) Pellet 2KDa, 3) Sobrenadante 10KDa, 4) PBS lavado, 5) EXO *F. hepatica*, 7) MPM, 8) PES *F. hepatica* con DTT, 8) Pellet 2KDa con DTT, 9) Sobrenadante 10KDa con DTT, 10) PBS lavado con DTT, 11) EXO *F. hepatica* con DTT.

Se pueden ver, también, en ambos carriles correspondientes a PES de *F. hepatica*, unas bandas cercanas a 25KDa (según el MPM utilizado), las cuales podrían corresponderse a la Catepsina L (flechas verdes en la figura 4.5).

Vale aclarar que, a todos los lotes de PES al momento de ser concentrados se les agregó inhibidor de proteasas, este cocktail de inhibidores utilizado contenía inhibidores para serin proteasas (aprotinina), aminopeptidasas (bestatina), proteasas de cisteína (E64), proteasas de cisteína y serina (leupetina), proteasas de serina (AEBSF), proteasas de ácido aspártico (pepstaina B) y metaloproteasas (EDTA).

Al utilizar este cocktail de inhibidores no se permitió procesar en la magnitud que se harían comúnmente estas proteasas. Debido a esto, las bandas se ven menos intensas de lo que se verían en el caso de un perfil proteico cuando no se le incluye un inhibidor al PES.

En los carriles de EXO de *F. hepatica* (5 y 11 en la figura), la concentración de proteínas es claramente menor, esto se ve al bajar la intensidad de las bandas, tanto sin DTT como con DTT. Esto era de esperar ya que no todas las proteínas que forman parte del PES, son proteínas exosomales. Con menos intensidad, igual puede verse que hay bandas cercanas al peso de la Catepsina-L, es decir 25KDa (flecha negra en la figura 4.5) (Marcilla et al., 2012). Al igual que una banda, menos intensa, donde se veía la banda entre los 40 y 100KDa en los carriles de PES.

Los carriles 2 y 8 (correspondientes al pellet 2KDa sin y con DTT, respectivamente) y los carriles 4 y 10 (correspondientes a PBS L, sin y con DTT) casi no contienen proteínas en su corrida, por lo que no se visualizan bandas en los mismos, mientras que los carriles 3 y 9 (sobrenadante 10KDa) como se ven en la corrida de la figura, si bien tienen una corrida de bastante menor intensidad que los carriles de PES y EXO, puede verse que en el sobrenadante también se encuentran varias proteínas, sobretodo cercanas a la mancha de entre 40-100KDa hablada anteriormente.

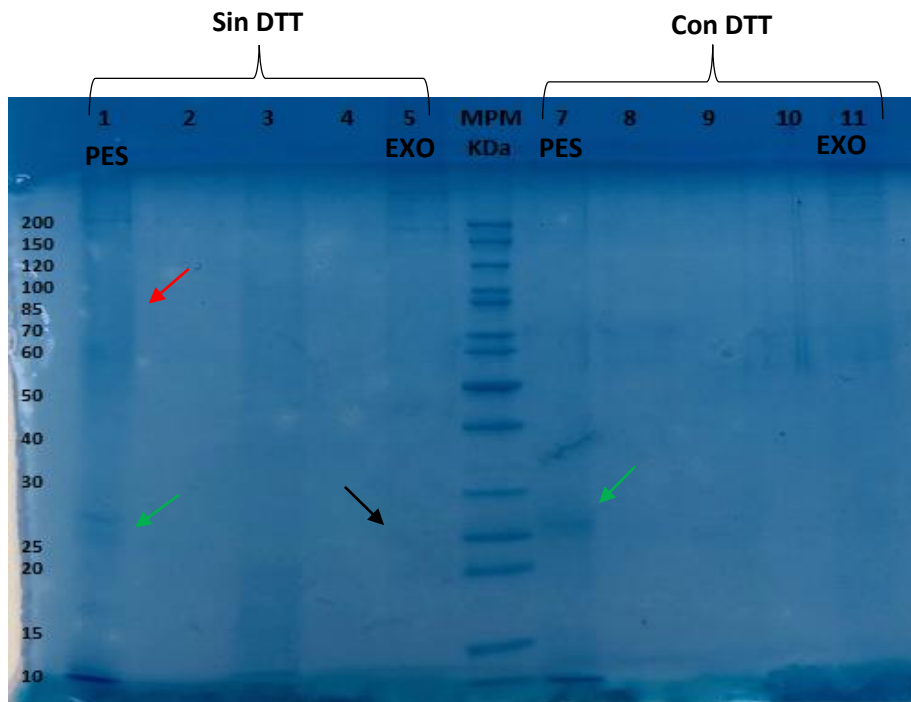


Figura 4.6: Corrida electroforética, SDS-PAGE al 12.5%, con tinción coloidal con CBB G de alta sensibilidad (Coloidal Coomassie) del perfil proteico de la purificación de EXO *F. hepatica* del lote L3S2a. En condiciones no reductoras (sin DTT) y reductoras (con DTT). Muestras corridas; 1) PES *F. hepatica*, 2) Pellet 2KDa, 3) Sobrenadante 10KDa, 4) PBS lavado, 5) EXO *F. hepatica*, 7) MPM, 8) PES *F. hepatica* con DTT, 8) Pellet 2KDa con DTT, 9) Sobrenadante 10KDa con DTT, 10) PBS lavado con DTT, 11) EXO *F. hepatica* con DTT.

En la Figura 4.6, se muestra el análisis por SDS-PAGE 12.5% en las mismas condiciones de las fracciones de purificación de PES de *F. hepática*, pero en este caso del sub lote L3S2. Se observa una corrida bastante similar a la vista para el lote L4L2a.

Pese a las similitudes entre los perfiles, se ven dos diferencias. Siendo la primera, la intensidad de las bandas previamente descritas y que en el caso de la banda entre 40-100KDa en el carril 7 (PES en condiciones reductoras), el mismo no es visible. Y la segunda diferencia es que en el carril 11 (EXO de *F. hepatica* en condiciones reductoras) no es visible la banda correspondiente a las catepsinas-L, lo cual no quiere decir que las mismas no se encuentren en la fracción.

El hecho de que las bandas en general sean similares en ambas purificaciones puede deberse a que se utilizó en ambos casos el mismo método de purificación y a que el hecho de que un lotea sea “sucio” o “limpio” no varía su perfil proteico.

Se marcaron en la Figura 4.6, con flechas rojas la banda entre 40-100KDa, en la cual podría encontrarse la pro-catepsina, con flechas verdes las catepsinas-L, un poco por encima de 25KDa y con flechas negras la catepsina-L en los carriles de EXO de *F. hepatica*.

4.4.2 Comparación de EXO *F. hepatica* purificado de lote sucio y limpio por electroforesis

Con el fin de seguir comparando ambos sub lotes de EXO de *F. hepatica* (L3S2a y L4L2a), para ver realmente, si como se habló anteriormente el perfil proteico era similar en un lote sucio que, en uno limpio, se llevaron a cabo dos análisis de estas muestras por SDS-PAGE al 12.5%.

Se corrieron en ambos geles (figura 4.7 y figura 4.8); EXO L3S2a en los carriles 1, EXO L4L2a en los carriles 2, EXO L3S2a con DTT en carriles 4 y EXO L4L2a con DTT en carriles 5, utilizando el mismo MPM que en 4.4.1.

Como se observa en la figura 4.7, se tiñó al gel con azul de Coomassie. Se ve con una mayor intensidad las bandas del carril que se sembró EXO de *F. hepatica* del sub lote L3S2a. Tanto en condiciones reductoras, como no reductoras. Siendo las bandas más intensas las dos vistas a 150-200KDa.

Mientras que en el caso del sub lote L4L2a estas bandas no son tan intensas, aunque si son visibles. Lo mismo sucede con la mancha que se observa a los 40-60KDa, es más marcado en el sub lote proveniente de un lote de PES de *F. hepatica* sucio que del lote limpio. Se encuentran marcadas en la figura con flechas, las bandas de 150-200KDa en los carriles y las bandas de alrededor 50KDa.

Para comparar con una mayor sensibilidad (pero no por un método cuantitativo), se tiñó al otro gel con la tinción de plata neutra (figura 4.8). En este caso se pueden ver las mismas bandas entre 150-200KDa en los cuatro carriles. Estas no son intensas en el caso del sub lote L4L2a, lo cual corresponde con lo visto en la figura 4.7.

La mayor diferencia entre ambas figuras es que al ser más sensible el gel teñido con tinción neutra de plata, se puede ver más marcada la banda que podría corresponder a la catepsina-L. Esto no significa que haya más proteína en esta corrida, ya que la tinción es cualitativa.

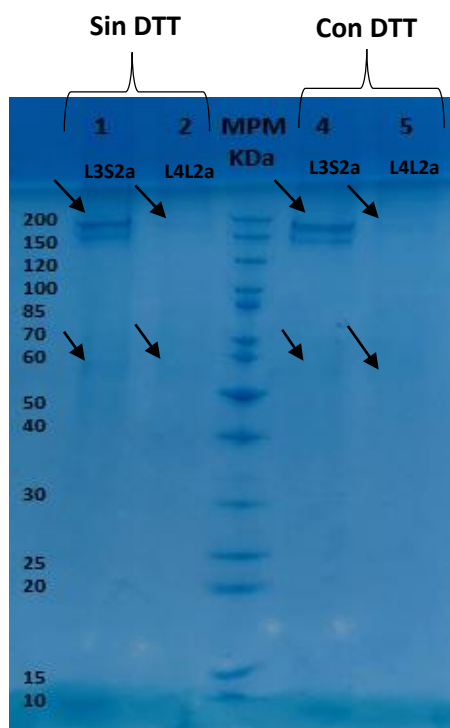


Figura 4.7: Corrida electroforética, SDS-PAGE al 12.5%, con tinción coloidal con CBB G de alta sensibilidad (Coloidal Coomassie) de las muestras de EXO *F. hepatica* de L3S2a y L4L2a en condiciones no reductoras y reductoras, para comparar ambos sub lotes. Muestras corridas; 1) EXO *F. hepatica* L3S2a, 2) EXO *F. hepatica* L4L2a, 3) MPM, 4) EXO *F. hepatica* L3S2a con DTT, 5) EXO *F. hepatica* L4L2a con DTT

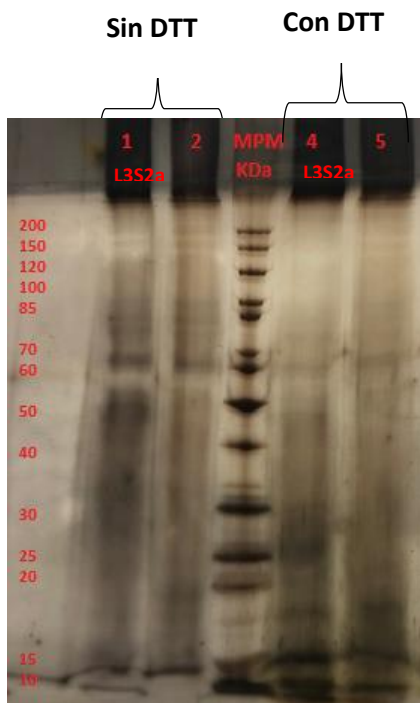


Figura 4.8: Corrida electroforética, SDS-PAGE al 12.5%, tinción neutra con plata, de las muestras de EXO *F. hepatica* de L3S2a y L4L2a en condiciones no reductoras y reductoras, para comparar ambos lotes. Muestras corridas; 1) EXO *F. hepatica* L3S2a, 2) EXO *F. hepatica* L4L2a, 3) MPM, 4) EXO *F. hepatica* L3S2a con DTT, 5) EXO *F. hepatica* L4L2a con DTT.

De estas dos figuras y habiendo visto el perfil de purificación de ambos sub lotes de PES de *F. hepatica*, se puede decir que el perfil de purificación de proteínas del PES es el mismo en el caso de un lote proveniente de gusanos “sucios”, que de gusanos “limpios”.

Y que el perfil proteico de EXO de *F. hepatica* también es similar, por lo que hay más evidencia de que los sub lotes limpios o sucios no varían las que lo constituyen, aunque si estás parecen estar en mayor medida en el sub lote L3S2a.

4.4.3 Corroboración de muestras de EXO de *Fasciola hepatica* por Western Blot

Con el fin de corroborar que las muestras purificadas con el kit Invitrogen- Total Exosome Isolation (from cell culture media), por el método detallado en 3.10.2, eran EXO de *F. hepatica*, se realizó el ensayo de western blot.

Para este experimento se utilizó un anticuerpo anti catepsina-L, la cual por bibliografía se conoce que se encuentra tanto en el PES y EXO de *F. hepatica*.

Como se muestra en la Figura 4.9 B, primero se corrió en un gel SDS-PAGE al 12.5% muestras de PES de *F. hepatica* (carril 1) y EXO de *F. hepatica* (carril 2) del sub lote L3S2a y para el mismo se usó la tinción neutra de plata y un marcador de peso molecular RGB PLUS Prestained Protein Ladder, Bis-Tris 10%, MOPS buffer (carril 4), el cual se muestra como correría en la parte C de la figura ya que no es claro en el gel. Como se observa en la figura, en el carril del PES de *F.h.* no se ve bien las bandas correspondientes a las catepsinas, que estaría cercana a los 22KDa. Esto puede deberse al uso del inhibidor que se les agregó a las

muestras de PES. El inhibidor no permite que sean visibles en la corrida los procesamientos que se verían comúnmente entre las proteasas.

De todas maneras, ya se había corrido en 4.4.1 la misma muestra de PES, por lo que en la parte A de la imagen se adjuntó la corrida de PES de *F.h.* teñida con azul de Coomassie anterior, en las que se ven un poco más claras las bandas que podrían corresponder a la catepsina.

Tanto en el carril de PES de A, como en el carril 2 (EXO de *F. hepatica*) de la parte B, se pueden observar bandas por arriba de los 22KDa del MPM, pero menores a 30KDa, estas, teniendo en cuenta la bibliografía, podrían corresponder a las catepsinas de estas muestras.

En la parte D de la figura se ven las membranas de nitrocelulosa del western blot realizado. En las membranas 1 (PES de *F. hepatica*) y 2 (EXO de *F. hepatica*), se puede ver en ambos casos una banda entre los 53 y 93KDa según el MPM utilizado, la cual correspondería a las pro-catepsinas que se encuentran en estas fracciones (como se dijo en los geles realizados del perfil proteico de PES *F. hepatica*, el peso molecular de las pro-catepsinas estaría alrededor de los 37KDa, y en el caso de los geles y las membranas del western blot se ven corridas aparentes). Lo cual era de esperar ya que se utilizó un anticuerpo anti-CL (Ac. α -CL) en estas dos membranas, por lo que se ven al momento de realizar la quimioluminiscencia las bandas donde se encuentra pro-catepsina.

También en las membranas 1 y 2 se observan marcadas por quimioluminiscencia unas bandas cercanas a los 22KDa según el marcador de peso molecular. Las cuales se corresponderían a las catepsinas-L.

Que lo que se observa en ambas membranas sean catepsinas puede comprobarse gracias a los controles realizados en este mismo ensayo, los cuales se explican a continuación.

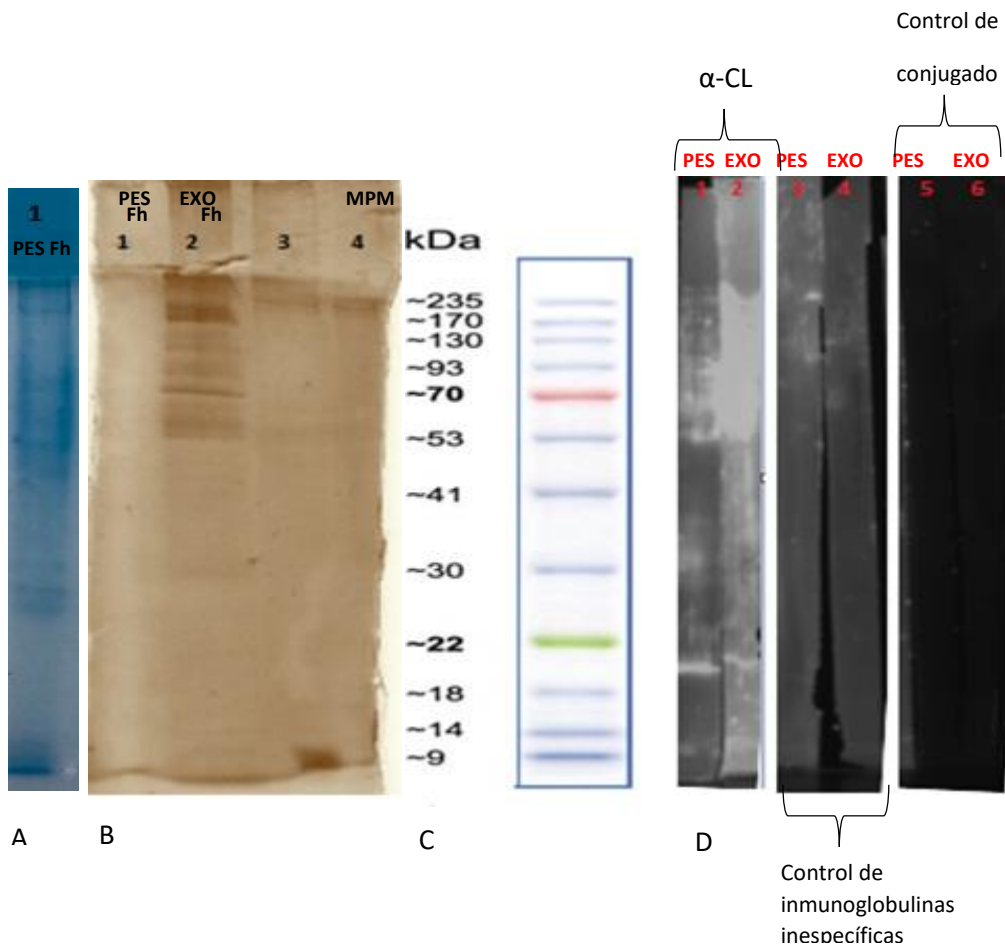


Figura 4.9: Western Blot para validación de muestras de EXO *F. hepatica*. A. PES *F. hepatica* L3S2 teñido con Azul de Coomassie B: Corrida electroforética, SDS-PAGE al 12.5%, tinción neutra con plata, 1: PES *F. hepatica* L3S2, 2: EXO *F. hepatica* L3S2a, 3: EXO CD1 sano, 4: MPM. C: Marcador de peso molecular utilizado RGB PLUS Prestained Protein Ladder, Bis-Tris 10%, MOPS buffer, Cat 02102-250, MaestroGen y los pesos moleculares del mismo D: Membranas de nitrocelulosa del ensayo de Western Blot, 1: PES *F. hepatica* L3S2, Anticuerpo primario α -FhCL dil. 1/3000, Anticuerpo secundario; anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidasa, dil. 1/5000, 2: EXO *F. hepatica* L3S2a Anticuerpo primario α -FhCL dil. 1/3000, Anticuerpo secundario; anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidasa, dil. 1/5000, 3: PES *F. hepatica* L3S2, control de inmunoglobulinas inespecíficas, suero normal de conejo como Anticuerpo primario, dil. 1/3000, Anticuerpo secundario; anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidasa, dil. 1/5000, 4: EXO *F. hepatica* L3S2a, control de inmunoglobulinas inespecíficas, suero normal de conejo como Anticuerpo primario, dil. 1/3000, Anticuerpo secundario; anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidasa, dil. 1/5000, 5: PES *F. hepatica* L3S2 control de conjugado, PBS, Anticuerpo secundario; anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidasa, dil. 1/5000 6: EXO *F. hepatica* L3S2a, control deconjugado, PBS, Anticuerpo secundario; anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidasa, dil. 1/5000.

Las membranas de nitrocelulosa 3 (PES) y 4 (EXO) corresponden al control de inmunoglobulinas inespecíficas (en este caso no se usó el Ac. α -CL, sino que se utilizó suero normal de ratón, pero si se utilizó el anticuerpo secundario), por lo cual al no haber ninguna marca similar a las que se vieron en las membranas de nitrocelulosa 1 y 2, se puede concluir que lo visto en esas mismas eran las catepsinas que se pensaban y no alguna proteína que no sea catepsina pero que el anticuerpo reconozca.

También se realizó un control de conjugado (PBS en lugar de Ac. α -CL), en este control tampoco se ve ninguna banda, por lo que las bandas de 1 y 2 son específicas del anticuerpo primario utilizado y no del secundario.

4.5 Ensayo de inmunización

Para evaluar la respuesta humoral de los ratones CD1 al ser inmunizados con EXO de *F. hepatica* como antígeno se llevó a cabo el ensayo con los dos grupos de ratones (grupo 2 y grupo 3), todas hembras y de seis semanas cuando se arrancó el trabajo.

El primer priming de inmunización se realizó, en el día 0 del ensayo con EXO de *F. hepatica* del mix L1L+L2L. Obteniéndose un volumen final de 1.2ml al juntar los dos lotes EXO *Fh.* y enrasar con PBS, se le suministro 10µg en 100µl a cada ratón del grupo 3 (n=11), siendo este el control positivo.

Por otro lado, se le suministró 100µl de PBS a los ratones del grupo 2 (n=3), el cual sería el control negativo. Todas las inmunizaciones se realizaron subcutáneamente, entre cabeza y torso.

En el día 28, se realizó el segundo priming. En los ratones del grupo 3 se utilizó el lote L4L1 de EXO de *F. hepatica*, esta inmunización fue de 5µg, también en 100µl. Mientras que a los ratones del grupo 2 se los volvió a inmunizar con PBS en las mismas cantidades. Realizándose las inmunizaciones de la misma manera.

Además de las inmunizaciones, en estos dos días se extrajeron muestras de sangre de todos los ratones de ambos grupos los días. También se extrajeron muestras de sangre los días 14, 42 y 56 del ensayo. También en esos mismos días los ratones fueron pesados para mantener un seguimiento de los mismos.

4.5.1 Seguimiento del peso de ratones CD1 de grupos 2 y 3

En la tabla 4.5 se informan los pesos de los 3 ratones del grupo 2, inmunizados con PBS en los días 0 (D0) y 28 (D28).

Días	D0	D14	D28	D42	D56
Ratones					
1	22,4	27,1	28,6	29,1	32,2
2	20,7	30,5	26,8	33,7	38,4
3	20,3	26,2	32,3	28,1	31,5
Promedio	21,1	27,9	29,2	30,3	34,0
desv estd:	1,1	2,26	2,80	2,98	3,79

Tabla 4.5: Número de ratones y pesos de los mismos en los días 0, 14, 28, 42 y 56 del ensayo de inmunización con sus respectivos promedios y desviación estándar del Grupo 2 (n=3). Este grupo corresponde a los ratones inmunizados con PBS en el D0 y D28, 1° y 2° Inmunización= 100µl/ dosis de PBS. Los ratones no estaban marcados individualmente, por lo que no se pueden tomar los pesos del ratón "1" de la tabla para analizar su desarrollo a lo largo del ensayo de inmunización.

Como se ve en la tabla el peso de los tres ratones del grupo 2 aumentan en los cincuenta y seis días del ensayo, como se comentó en materiales y métodos, los ratones no fueron

diferenciados de forma individual por lo que no se puede saber cuánto aumentó cada ratón durante el experimento. Debido a esto se realizó el promedio de los pesos de los tres ratones en cada día que se pesaron (y su desviación estándar) y con los mismos se graficó lo observado en la figura 4.10, observándose una subida de peso en el correr del ensayo.

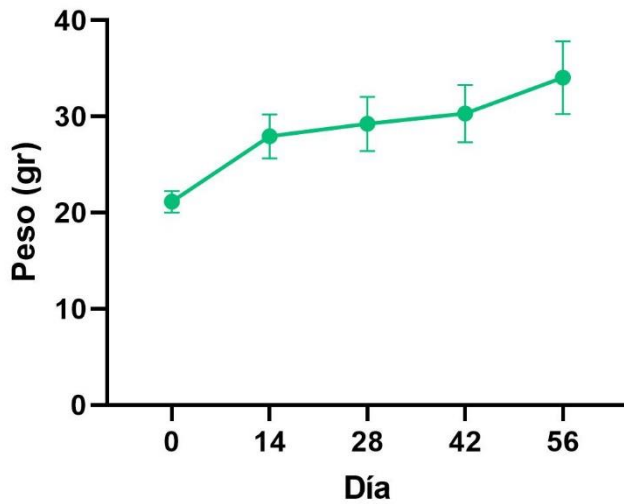


Figura 4.10: Peso promedio de los ratones en función de los días de pesaje de los ratones del Grupo 2 (PBS, n=3). Peso promedio con su correspondiente desviación estándar.

En la tabla 4.6, se observan los pesos de los ratones del grupo 3 (n=11), al igual que en el grupo 2 se puede ver una subida esperada del peso al pasar los días en general, incluso al ser inmunizados estos con EXO de *F. hepatica*. En este caso los ratones tampoco estaban marcados individualmente, por lo cual no se puede hacer un seguimiento de un ratón solo.

Días	D0	D14	D28	D42	D56
Ratón					
1	19,5	28,9	29	31,5	34,4
2	19,2	26,7	28	28,9	31,6
3	18,4	24	26	26	37,0
4	22,1	25,6	24,9	34,1	27,5
5	22,6	24,2	29,1	31,6	28,7
6	18,6	25,3	31,9	30,6	33,9
7	15,6	28,1	32,6	25,2	32,0
8	22,5	29,6	27,5	27	31,0
9	20,7	28,2	25,5	31,2	30,4
10	21,7	23,9	26,3	29,1	28,2
11	18,4	28,4	30,2	28,9	28,3
Promedio:	19,9	26,6	28,2	29,4	31,2
desv estd:	2,19	2,11	2,56	2,67	2,99

Tabla 4.6: Número de ratones y pesos de los mismos en los días 0, 14, 28, 42 y 56 del ensayo de inmunización con sus respectivos promedios y desviación estándar del Grupo 3 (n=11). Este grupo corresponde a los ratones inmunizados con EXO *F. hepatica*, en el D0 y D28, 1° Inmunización= 10µg/dosis de EXO y la 2° Inmunización=5µg/dosis de EXO. Los ratones no estaban marcados individualmente, por lo que no se pueden tomar los pesos del ratón "1" de la tabla para analizar su desarrollo a lo largo del ensayo de inmunización.

En la figura 4.11 se graficó promedio de los pesos de los once ratones del grupo (con su desviación estándar) en función de los días de pesaje. Observándose al igual que en el grupo 2, un aumento del promedio de los pesos en el correr de los días, lo cual era de esperar para los ratones al ir creciendo.

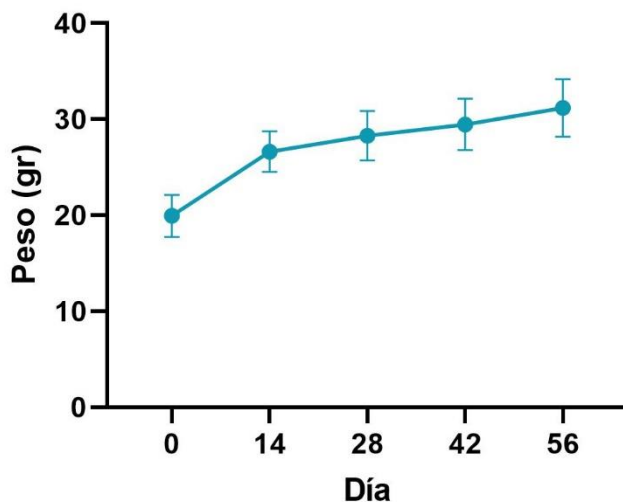


Figura 4.11: Peso promedio en los días de pesaje de los ratones del Grupo 3 (EXO *Fh*, n=11). Peso promedio con su correspondiente desviación estándar.

El promedio al D56, fue menor en el grupo 3 que en el grupo 2, como se ve en la figura 4.12. Lo cual podría relacionarse con el ser inmunizados con EXO de *F. hepatica* y no con PBS. O a que como se ve en la figura, el promedio de los ratones del grupo 2 fue mayor desde el día cero del ensayo.

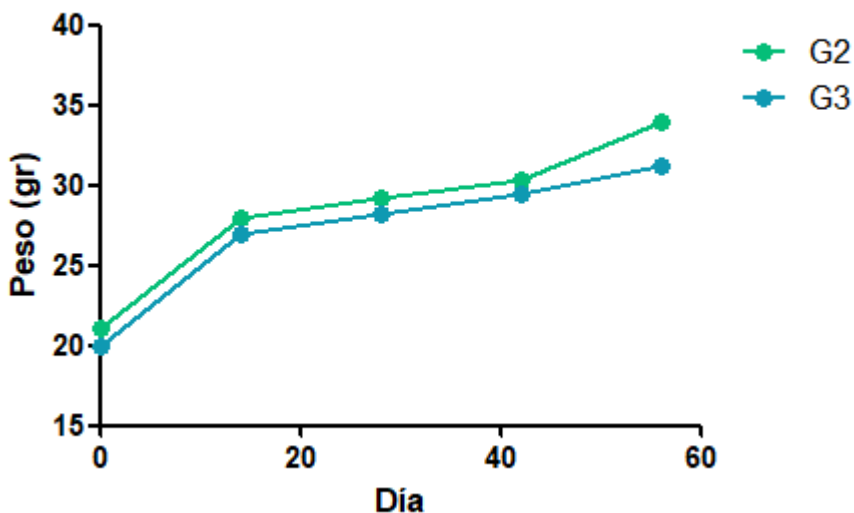


Figura 4.12: Peso promedio en los días de pesaje de los ratones del Grupo 3 (EXO *Fh*, n=11) y Grupo 2 (PBS, n=3). Peso promedio de ambos grupos del ensayo a lo largo de los días de pesaje.

4.6 Estudio de la respuesta inmune humoral generada durante el ensayo de inmunización con EXO de *F. hepatica* en ratón

4.6.1 Análisis de la respuesta humoral frente antígeno EXO de *F. hepatica*, anticuerpo IgG total

4.6.1.1 Elección de la dilución de sueros del grupo 2 y grupo 3

Con el fin de elegir cual dilución del suero era la mejor para trabajar con el anticuerpo anti-IgG total de ratón conjugado a peroxidasa (dilución 1:20000, Sigma-Aldrich A9044), se sensibilizaron las placas con 0.5 µg/ml de EXO de *F. hepatica* de la manera que se detalló previamente en 3.9.3. Luego se sembraron los pools de todos los días de sangrado, tanto del grupo 3 (G3) como del grupo 2 (G2) y se siguió el protocolo descrito en 3.9.3.

En la tabla 4.7 y tabla 4.8 se muestran las D.O. a 492nm (corregidas) de los distintos pools de cada día en diluciones 1:250, 1:500, 1:1000 y 1:2000. En las mismas se resaltaron las D.O en las que los duplicados variaban mucho entre sí, por lo que se trabajó con uno solo de los duplicados.

Día	D.O. 492nm G2	D.O. 492nm G2	D.O. 492nm G2	D.O. 492nm G2	D.O. 492nm G2	D.O. 492nm G2	D.O. 492nm G2	D.O. 492nm G2
	Dilución 1:250		Dilución 1:500		Dilución 1:1000		Dilución 1:2000	
0	0,677	0,667	0,423	0,456	0,353	0,295	0,213	0,202
14	0,507	0,455	0,303	0,382	0,264	0,319	0,151	0,209
28	0,425	0,436	0,412	0,337	0,34	0,198	0,182	0,166
42	0,399	0,441	0,306	0,305	0,235	0,231	0,146	0,146
56	0,484	0,524	0,346	0,339	0,269	0,279	0,199	0,160

Tabla 4.7: D.O a 492nm con sus duplicados del ELISA realizado con Ac IgG molécula total en distintas diluciones de los sueros en días de extracción de sangre del Grupo 2 (G2). Grupo 2 corresponde a los ratones inmunizados con PBS en D0 y D28. Las densidades ópticas están corregidas (se le restó el control -0.180- realizado en el mismo Elisa) y se muestran resaltadas las D.O que no fueron utilizadas ya que la diferencia de los duplicados en porcentaje era muy grande.

Día	D.O. 492nm G3	D.O. 492nm G3	D.O. 492nm G3	D.O. 492nm G3	D.O. 492nm G3	D.O. 492nm G3	D.O. 492nm G3	D.O. 492nm G3
	Dilución 1:250		Dilución 1:500		Dilución 1:1000		Dilución 1:2000	
0	0,519	0,487	0,393	0,425	0,307	0,279	0,181	0,162
14	0,443	4,430	0,352	0,371	0,232	0,195	0,171	0,158
28	0,433	0,416	0,316	0,3	0,2	0,262	0,166	0,156
42	0,470	0,465	0,374	0,387	0,325	0,333	0,224	0,187
56	0,487	0,497	0,419	0,416	0,335	0,354	0,267	0,261

Tabla 4.8: D.O a 492nm con sus duplicados del ELISA realizado con Ac IgG contra la molécula entera en distintas diluciones de los sueros en días de extracción de sangre del Grupo 3 (G3). Grupo 3 corresponde a los ratones inmunizados con EXO de *F. hepatica* en D0 (10µg) y D28 (5µg). Las densidades ópticas están corregidas (se le restó el control -0.177- realizado en el mismo Elisa) y se muestran resaltadas las D.O que no fueron utilizadas ya que la diferencia de los duplicados era muy grande.

Se graficaron luego los resultados de las tablas, en graficas de D.O. 492nm en función de los días de sangrado, comparando el nivel de IgG total anti EXO de *F.h.* en G2 y G3 en las distintas cuatro diluciones de los pools de suero, como se muestra en la figura 4.13.

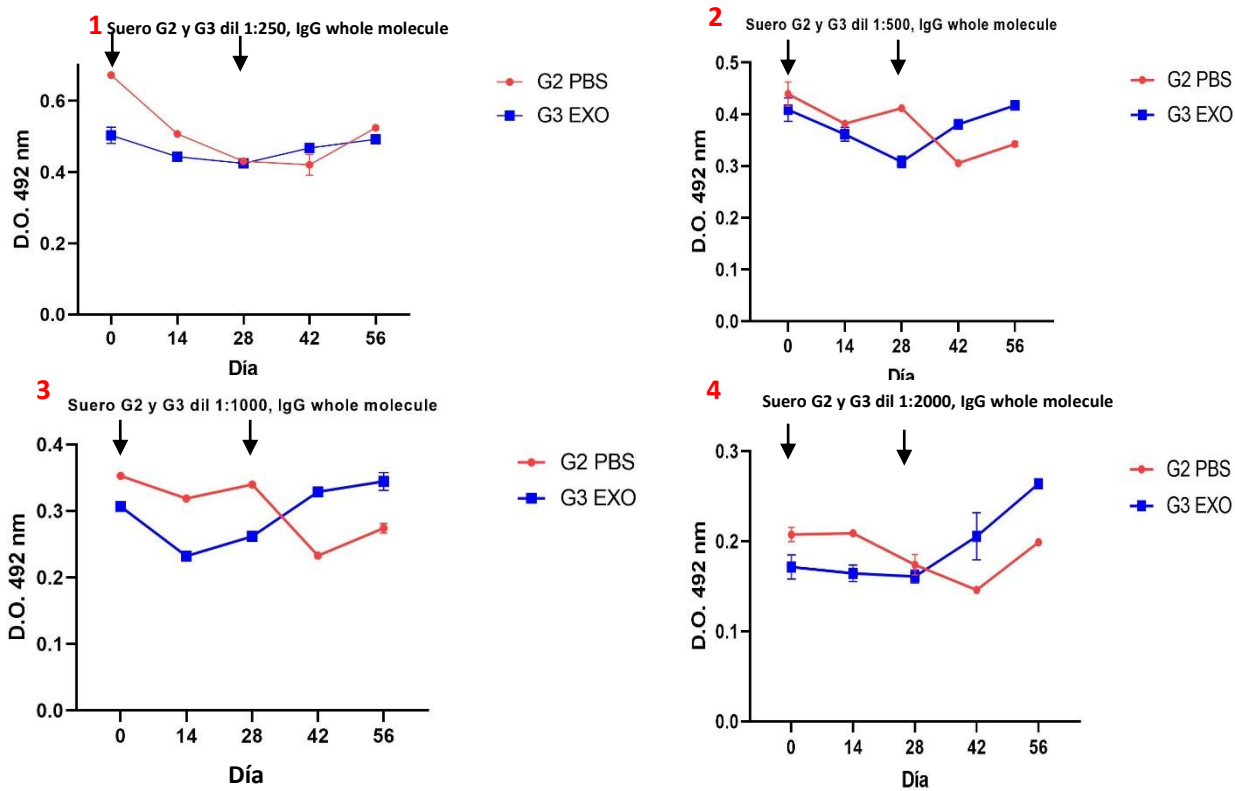


Figura 4.13: D.O. 492nm promedio \pm SD en función de días para la elección de la dilución del suero de los Grupos 2 y 3 con anticuerpo IgG whole molecule-peroxidase. 1) Dilución 1:250, 2) dilución 1:500, 3) dilución 1:1000, 4) dilución 1:2000. Las flechas indican los días de inmunización de los ratones, con PBS en el G2 y EXO de *F. hepatica* en el 3.

En la figura 4.13, se muestra la evolución de los niveles de anticuerpos IgG totales del grupo 2 y 3, en las distintas diluciones.

Se eligió la dilución 1:2000 de los sueros como la más adecuada para realizar los ELISAS con este anticuerpo. Esto se debe a que como se ve en la imagen señalada con el número 4 de la figura (que representa la dilución 1:2000), se ve una gran diferencia en las D.O. 492nm de ambos grupos en el día 56, siendo mayor la D.O. en el grupo inmunizado con EXO de *F. hepatica*. En la dilución 1:2000, el grupo 3 tiene un nivel mayor de anticuerpos anti EXO de *Fh* al terminar el ensayo, por lo cual se eligió esta dilución.

Esta diferencia se observa también en la dilución 1:1000 (imagen 3 de la figura), pero en este caso la D.O. 492nm en el día 28 del G3 es bastante más baja que en el G2, lo mismo sucede en la imagen 2 de la figura, la cual corresponde a la dilución 1:500. Por lo que se decidió no usar estas diluciones.

4.6.1.2 Nivel de IgG total en ratones inmunizados con EXO de *F. hepatica*

Luego de haber elegido la dilución de los sueros de trabajo, nuestro objetivo fue analizar el nivel de anticuerpos específicos para EXO de *F. hepatica* desarrollados por cada ratón

durante el experimento. Primeramente, se cuantificó el nivel de IgG total para el total de los sueros (n=11) de los ratones inmunizados, grupo 3. El ELISA se realizó de la misma forma detallada en 3.9.3, y se muestran en la tabla 4.9 los datos experimentales de D.O. a 492nm, expresados como promedios de duplicados.

	D0	D1	D28	D42	D56
D.O. prom 1	0.247	0.388	0.206	0.247	0.224
D.O. prom 2	0.266	0.308	0.287	0.196	0.308
D.O. prom 3	0.333	0.111	0.207	0.274	0.530
D.O. prom 4	0.125	0.210	0.291	0.378	0.202
D.O. prom 5	0.421	0.425	0.247	0.318	0.359
D.O. prom 6	0.303	0.243	0.250	0.399	0.314
D.O. prom 7	0.191	0.218	0.321	0.268	0.302
D.O. prom 8	0.313	0.238	0.276	0.351	0.320
D.O. prom 9	0.123	0.338	0.340	0.238	0.225
D.O. prom 10	0.255	0.264	0.186	0.220	0.219
D.O. prom 11	0.316	0.281	0.225	0.332	0.340
Mean	0.262	0.273	0.257	0.292	0.303
Desv. Estand.	0.072	0.047	0.091	0.157	0.063

Tabla 4.9: D.O. a 492nm obtenidas por ELISA para detección de Ac IgG específicos de EXO de *F. hepatica*, usando un anticuerpo anti IgG contra la molécula completa. Las placas fueron sensibilizadas con 50ng/pocillo de EXO de *F. h.* purificados del lote L3S2a. Los sueros de los 11 ratones del grupo 3 se analizaron individualmente (dil 1:2000). Grupo 3 corresponde a los ratones inmunizados con EXO *F. h.*, en el D0 y D28. Las densidades ópticas están corregidas, restando el valor del control (0.099 para promedios del 1 al 9 y 0.111 para promedios 10 y 11) que fue realizado en el mismo ELISA.

Para poder observar la evolución del nivel de anticuerpos IgG totales específicos de EXO de *F. hepatica* de los ratones del grupo 3, se graficó D.O. 492nm en función de los días de sangrado como se muestra en la figura 4.14.

En la misma se observa los valores obtenidos para los 5 días de sangrado, los 11 valores de D.O 492nm, señalizados diferente para cada día y con una línea azul se representa el valor medio de éstos.

Con una flecha se marcaron los días en los que los 11 ratones fueron inmunizados con el antígeno, EXO de *Fasciola hepatica*.

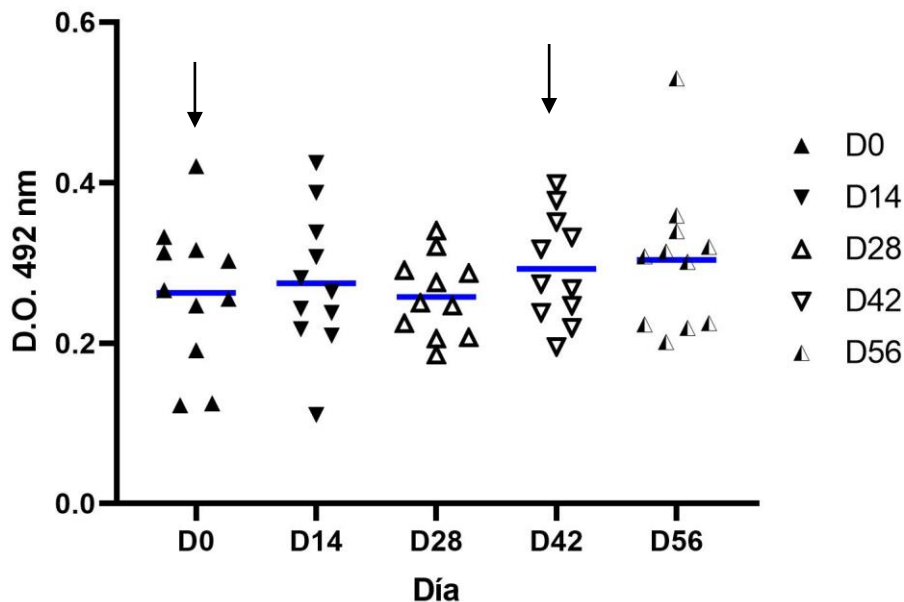


Figura 4.14: D.O 492nm en función de días de sangrado del ensayo ara detección de Ac IgG específicos de EXO de *F. hepatica*, utilizando el anticuerpo anti IgG total en el ELISA para el grupo 3. Se observan los datos de D.O. promedio de duplicados para cada ratón correspondientes a los 11 sueros de los del grupo inmunizado con EXO de *F.h.*; se marca con una línea azul el mean de D.O 492nm para cada día y con flechas los días de inmunización. Resultados generados con GraphPad Prism 8. Con método analítico no paramétrico (Mann Whitney test, tomándose significativas las diferencias cuando $P \leq 0,05$.)

En la gráfica y en la tabla se observa que luego de las inmunizaciones que el nivel de anticuerpos IgG totales específicos generados por los ratones contra los EXO de *F.h* tienen una tendencia al aumento entre día de sangrado 0 desde 0.262 a 0.303 en el día 56.

Sin embargo, el aumento del nivel de estos anticuerpos frente al antígeno EXO de *F.h* no fue significativo según el test no paramétrico realizado (Mann Whitney test). Por lo tanto, no se puede decir que los niveles de IgG totales anti EXO de *F.h* varíen de forma significativa con las dos inmunizaciones que se realizaron en los ratones inmunizados.

Se podría decir que el aumento no significativo que se ve en la figura, no es parejo, ya que como se aprecia los valores de los 11 sueros de los ratones varían mucho en el mismo día. En especial en el D28, en el cual el promedio del nivel de anticuerpos IgG anti EXO de *Fh* total, es menor que en el D14, esto puede deberse quizás a que pasaron 28 días de la primera inmunización, por lo que ya no se está generando respuesta humoral. Mientras que el promedio el D42, luego de la segunda inmunización, tiene un mayor nivel de anticuerpos IgG totales, validando así la realización de un segundo booster de antígeno para obtener mayor respuesta. Y como se observa, la misma aumenta en promedio también en el D56, por lo cual se termina el ensayo con un nivel de anticuerpos IgG totales anti EXO de *Fasciola hepatica* no significativo respecto al con que se arrancó, pero si mayor.

De igual manera, se decidió seguir estudiando la respuesta humoral de los ratones inmunizados con EXO de *F.h*, ya que se pensó que la detección utilizada en este caso (el anticuerpo IgG total conjugado a HRP) no fue lo suficientemente sensible para cuantificar la diferencia de niveles que, si hay de IgG anti EXO de *Fasciola hepatica*. Pensando que por más de no ser una diferencia de nivel significativa, la misma está en aumento por lo que sería bueno estudiar las sub clases de IgG.

Por esta razón, se utilizó como se explicó anteriormente, un sistema más sensible como son los anticuerpos biotinilados.

4.6.2 Análisis de la respuesta humoral frente antígeno EXO de *F. hepatica*, anticuerpos anti IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 biotinilados.

Profundizando el estudio de la respuesta humoral, se evaluaron también por medio de ELISA los niveles de anticuerpos de distintas sub clases de IgG (siendo estas IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti EXO de *F. hepatica*). Para saber cuáles sub tipos del IgG total fueron los que presentaron mayor nivel como respuesta a la inmunización con el antígeno EXO de *F. hepatica*.

4.6.2.1 Elección de las diluciones del suero para los diferentes anticuerpos biotinilados.

En un primer ELISA, se determinó que dilución de suero de los pools del grupo 2 y grupo 3 eran las mejores para trabajar con estos anticuerpos, y si este nivel era significativo para seguir trabajando con este anticuerpo anti EXO *F.h*.

El pool utilizado era de suero de los once ratones D42 en el caso del G3 y de suero de los tres ratones en el D0 para el grupo 2.

En la tabla 4.10 se muestran los valores de las D.O. 492nm corregidas del G2 y G3 (por duplicado), en las distintas diluciones que se realizaron.

Dilución	D.O. 492nm D42 G3	D.O. 492nm D42 G3	D.O. 492nm D0 G2
1/100	0.594	0.389	0.109
1/200	0.474	0.232	0.09
1/400	0.343	0.147	0.068
1/800	0.236	0.103	0.055
1/1600	0.160	0.070	0.054
1/3200	0.111	0.059	0.05
1/6400	0.075	0.048	0.048
1/12800	0.067	0.053	0.05

Tabla 4.10: D.O. a 492nm obtenidas por ELISA para detección de Ac IgG1 específicos de EXO de *Fasciola hepatica*, usando un anticuerpo IgG1 biotilado. Las placas fueron sensibilizadas con 50ng/pocillo de EXO de *F. h.* purificados. Los sueros del grupo 3 corresponden a los ratones inmunizados con EXO *F. hepatica*, en este caso el suero es el día 42 del ensayo y el suero del grupo 2 corresponde al día 0 del ensayo, se realizaron en los distintos sueros una variedad de diluciones para elegir con cual trabajar. Las densidades ópticas están corregidas, restando el valor del control. Los valores resaltados no fueron tratados.

Se observa en la figura 4.15, la D.O. a 492nm en función de las diluciones. Se puede ver una diferencia del nivel de anticuerpos IgG1 específicos de EXO de *F.h.* entre ambos grupos, siendo, como se esperaba, el nivel más alto en el caso del grupo 3, ya que este grupo fue inmunizado con EXO *F.h.*, mientras que el grupo 2 no fue inmunizado. En esta gráfica se aplicó el test no paramétrico de Wilcoxon, el cual indico que la diferencia del nivel de anticuerpos entre ambos grupos era significativa.

En este caso se eligió la dilución 1:400 para seguir trabajando con este anticuerpo, ya que el nivel de anticuerpos IgG1 en G3 es todavía bastante elevado (cerca de D.O de 0.400) y el nivel de anticuerpos en el caso del G2 se sigue manteniendo constante.

Luego se realizó el mismo ensayo, para analizar el nivel de anticuerpos específicos de EXO de *Fh.* Desarrollados durante el experimento en diferentes diluciones, pero con el anticuerpo IgG2a, se observan en la tabla 4.11, los resultados obtenidos en el ELISA de la cuantificación.

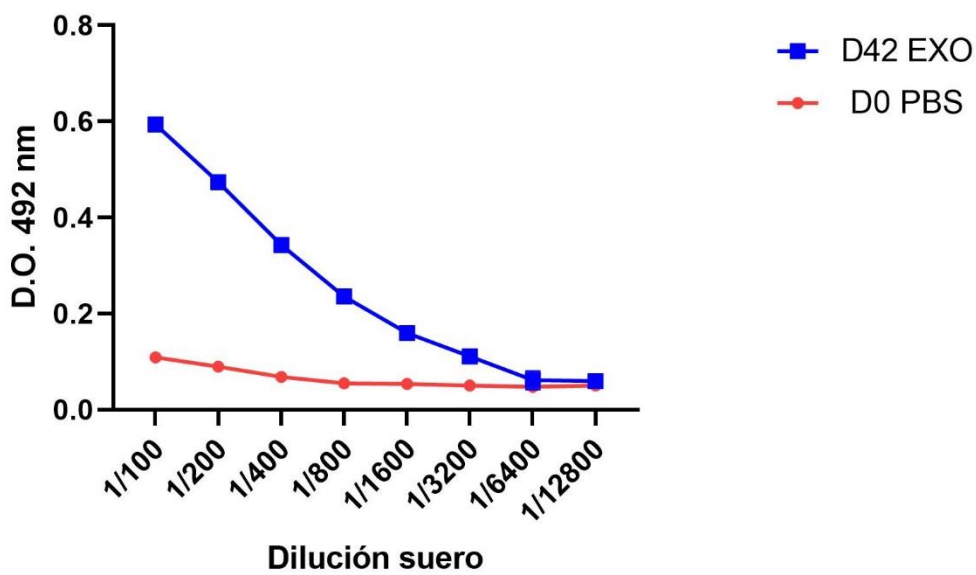


Figura 4.15: D.O 492nm en función de dilución de suero en los días de sangrado 42 del grupo 3 y 0 del grupo 2 para detección de Ac IgG1, utilizando anticuerpo IgG1 biotilado, con el respectivo SD en cada caso en los ratones del grupo 3. Resultados generados con GraphPad Prism 8. Con método analítico no paramétrico (Wilcoxon test, tomándose significativas las diferencias cuando $P \leq 0,05$.)

Dilución	D.O. 492nm D42 G3	D.O. 492nm D42 G3	D.O. 492nm D0 G2
1/100	0.092	0.119	0.074
1/200	0.078	0.072	0.053
1/400	0.068	0.064	0.046
1/800	0.058	0.054	0.049
1/1600	0.056	0.055	0.048
1/3200	0.049	0.050	0.045
1/6400	0.046	0.045	0.047
1/12800	0.055	0.051	0.05

Tabla 4.11: D.O a 492nm de los ELISA para detección de Ac IgG2a específicos de EXO de *Fasciola hepatica*, usando un anticuerpo anti IgG2a biotilado. Las placas fueron sensibilizadas con 50ng/pocillo de EXO de *F. h.* purificados. Los sueros del grupo 3 corresponden a los ratones inmunizados con EXO *F. hepatica*, en este caso el suero es el día 42 del ensayo y el suero del grupo 2 corresponde al día 0 del ensayo, se realizaron en los distintos sueros una variedad de diluciones para elegir con cual trabajar. Las densidades ópticas están corregidas, restando el valor del control. Los valores resaltados no fueron tratados.

En la figura 4.16 se observa las D.O a 492nm obtenidas en función de las distintas diluciones de trabajo.

Se puede observar que el nivel del anticuerpo IgG2a específico de EXO de *Fh*, en el grupo 3 y en el grupo control, son más bajos en valor de D.O. que para los niveles de IgG1.

Al igual que para IgG1, los niveles de anticuerpo IgG2a, son mayores en el caso del grupo 3, es decir inmunizado con EXO de *F.h* en el día cuarenta y dos, que para el grupo 2 en el día 0. Esto se debería a que los once ratones del grupo 3, han sido inmunizados con el EXO. Al realizar el test no paramétrico de Wilcoxon, se vio que las diferencias entre ambos grupos, eran significativas.

Igualmente, no se siguió trabajando con esta sub clase de IgG ya que sus niveles a pesar de tener diferencias significativas entre ambos grupos, eran muy bajos.

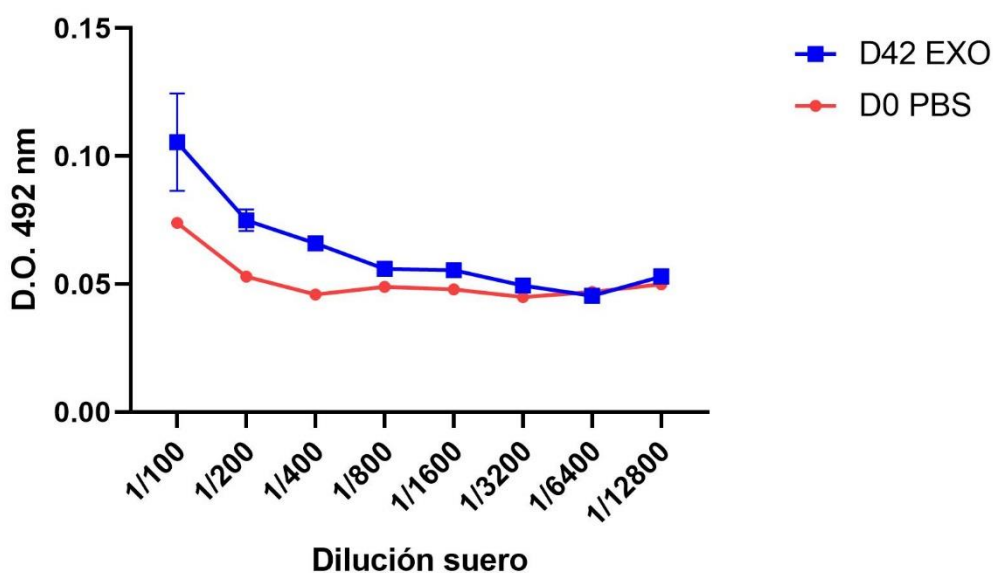


Figura 4.16: D.O 492nm en función de dilución de suero en los días de sangrado 42 del grupo 3 y 0 del grupo 2 para detección de Ac IgG2a, utilizando anticuerpo anti IgG2a biotinilado, con el respectivo SD en cada caso en los ratones del grupo 3. Resultados generados con GraphPad Prism 8. Con método analítico no paramétrico (Wilcoxon test, tomándose significativas las diferencias cuando $P \leq 0,05$).

En la tabla 4.12 se ven los resultados del mismo ensayo, pero para elegir la dilución de los sueros al evaluar los niveles anticuerpo IgG2b específicos de *F. hepatica*, en las mismas condiciones que los anteriores.

Se observa en la figura 4.17, un nivel de anticuerpo IgG2b anti EXO *F. hepatica* para el G3 muy parecido al de los ratones del G2, es decir sin inmunizar. Por lo que la respuesta de anticuerpo no sería muy significativa (realizando el test no paramétrico de Wilcoxon), el antígeno (EXO) no genera una respuesta en los niveles de este anticuerpo en particular.

Dilución	D.O. 492nm D42 G3	D.O. 492nm D42 G3	D.O. 492nm D0 G2
1/100	0.108	0.117	0.111
1/200	0.098	0.089	0.065
1/400	0.066	0.065	0.052
1/800	0.057	0.054	0.055
1/1600	0.056	0.052	0.052
1/3200	0.048	0.047	0.048
1/6400	0.045	0.044	0.049
1/12800	0.051	0.047	0.049

Tabla 4.12: D.O a 492nm de los ELISA para detección de Ac IgG2b específicos de EXO de *Fasciola hepatica*, usando un anticuerpo anti IgG2b biotinilado. Las placas fueron sensibilizadas con 50ng/pocillo de EXO de *F. h.* purificados. Los sueros del grupo 3 corresponden a los ratones inmunizados con EXO *F. hepatica*, en este caso el suero es el día 42 del ensayo y el suero del grupo 2 corresponde al día 0 del ensayo, se realizaron en los distintos sueros una variedad de diluciones para elegir con cual trabajar. Las densidades ópticas están corregidas, restando el valor del control. Los valores resaltados no fueron tratados.

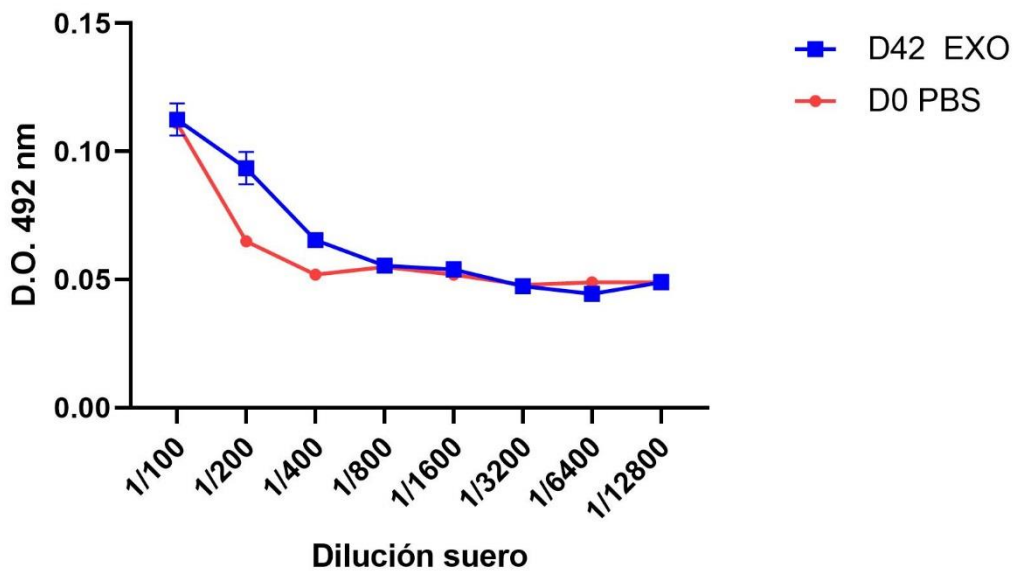


Figura 4.17: D.O 492nm en función de dilución de suero en los días de sangrado 42 del grupo 3 y 0 del grupo 2 para detección de Ac IgG2b, utilizando anticuerpo IgG2b biotinilado, con el respectivo SD en cada caso. Resultados generados con GraphPad Prism 8. Con método analítico no paramétrico (Wilcoxon test, tomándose significativas las diferencias cuando $P \leq 0,05$).

Como última sub clases de IgG, se realizó por último el ensayo con el anticuerpo IgG3. Se observan en la tabla 4.13 los valores del mismo y de la figura 4.18 se puede inferir que en este caso el nivel del anticuerpo IgG3 anti EXO de *F. hepatica* es mayor que en los ratones que no fueron inmunizados con el antígeno, en especial en las primeras diluciones, por lo que al igual que para el anticuerpo IgG1, se eligió la dilución 1:400 como la dilución de trabajo para el siguiente ensayo.

En este caso, cuando se realizó el test no paramétrico, se vio que las diferencias no eran significativas, sin embargo, se realizó otro ensayo de ELISA para seguir evaluando los niveles de IgG3 específicos de *F. hepatica*.

Dilución	D.O. 492nm D42 G3	D.O. 492nm D42 G3	D.O. 492nm D0 G2
1/100	0.256	0.254	0.139
1/200	0.233	0.229	0.58
1/400	0.180	0.173	0.129
1/800	0.118	0.115	0.102
1/1600	0.081	0.080	0.077
1/3200	0.062	0.057	0.057
1/6400	0.049	0.050	0.05
1/12800	0.048	0.049	0.053

Tabla 4.13: D.O a 492nm de los ELISA para detección de Ac IgG3 específicos de EXO de *Fasciola hepatica*, usando un anticuerpo anti IgG3 biotilnado. Las placas fueron sensibilizadas con 50ng/pocillo de EXO de *F. h.* purificados. Los sueros del grupo 3 corresponden a los ratones inmunizados con EXO *F. hepatica*, en este caso el suero es el día 42 del ensayo y el suero del grupo 2 corresponde al día 0 del ensayo, se realizaron en los distintos sueros una variedad de diluciones para elegir con cual trabajar. Las densidades ópticas están corregidas, restando el valor del control. Los valores resaltados no fueron tratados.

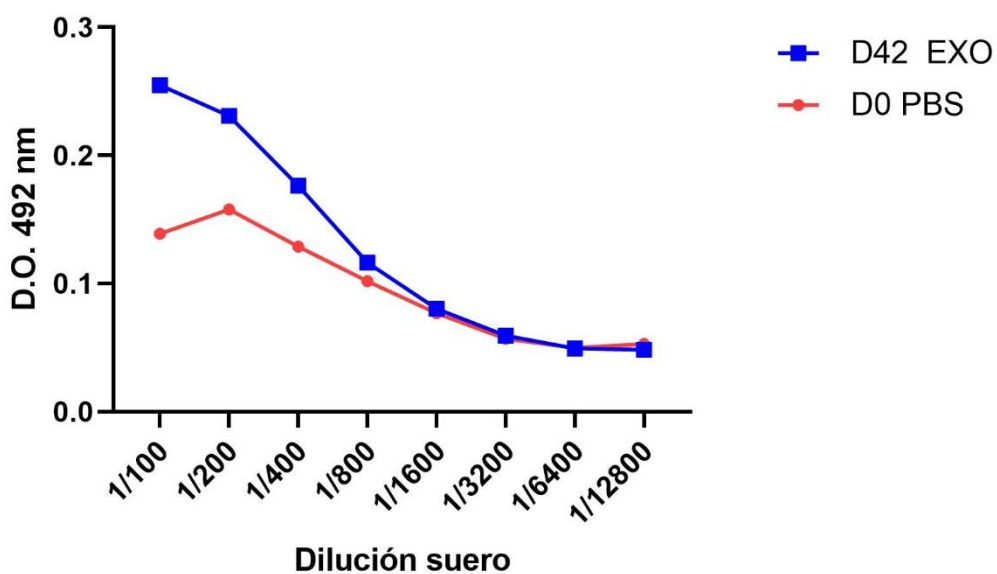


Figura 4.18: D.O 492nm en función de dilución de suero en los días de sangrado 42 del grupo 3 y 0 del grupo 2 para detección de Ac IgG3, utilizando anticuerpo IgG3 biotilnado, con el respectivo SD en cada caso. Resultados generados con GraphPad Prism 8. Con método analítico no paramétrico (Wilcoxon test, tomándose significativas las diferencias cuando $P \leq 0,05$).

4.6.2.2 Análisis de la respuesta humoral frente antígenos IgG1 e IgG3 biotinilados

Elegidas las diluciones de los sueros para seguir evaluando el nivel de los anticuerpos IgG1 e IgG3 específicos de EXO de *F. hepatica*, 1:400 para ambos anticuerpos, se llevó a cabo otro ensayo de ELISA con cada uno de ellos.

Como se muestra en las tablas 4.14 y 4.15, se obtuvieron la D.O. a 492nm de los pools de suero de cada día de sangrado del ensayo tanto del grupo 3 como del grupo 2.

Día	D.O. 492nm G3	D.O. 492nm G3	D.O. 492nm G2	D.O. 492nm G2
0	0.037	0.033	0.147	0.143
14	0.102	0.111	0.148	0.143
28	0.139	0.166	0.143	0.140
42	0.195	0.204	0.136	0.148
56	0.336	0.320	0.165	0.168

Tabla 4.14: D.O a 492nm del ELISA para detección de Ac IgG1 específicos de EXO de *F. hepatica*, usando un anticuerpo anti Ig1 biotinilado. Las placas fueron sensibilizadas con 50ng/pocillo de EXO de *F. h.* purificados. Los sueros del grupo 3 corresponden a los ratones inmunizados con EXO *F. hepatica* en los días 0 y 28 del ensayo y los del grupo 2 corresponden a los ratones inmunizados con PBS. Se trabajó en una dilución de 1:400 de todos los sueros, realizándose pools del suero de cada ratón de ambos grupos en los días de sangrado del ensayo. Las densidades ópticas están corregidas, restando el valor del control.

Día	D.O. 492nm G3	D.O. 492nm G3	D.O. 492nm G2	D.O. 492nm G2
0	0.000	0.000	0.000	0.000
14	0.039	0.041	0.001	0.000
28	0.046	0.045	0.040	0.037
42	0.050	0.046	0.040	0.034
56	0.072	0.077	0.031	0.032

Tabla 4.15: D.O a 492nm del ELISA para detección de Ac IgG3 específicos de EXO de *F. hepatica*, usando un anticuerpo anti Ig3 biotinilado. Las placas fueron sensibilizadas con 50ng/pocillo de EXO de *F. h.* purificados. Los sueros del grupo 3 corresponden a los ratones inmunizados con EXO *F. hepatica* en los días 0 y 28 del ensayo y los del grupo 2 corresponden a los ratones inmunizados con PBS. Se trabajó en una dilución de 1:400 de todos los sueros, realizándose pools del suero de cada ratón de ambos grupos en los días de sangrado del ensayo. Las densidades ópticas están corregidas, restando el valor del control.

A partir de estos resultados de los ensayos ELISA se obtuvieron las siguientes gráficas.

En la figura 4.19 se observa la D.O 492nm en función de los días de obtención del suero para evaluar en este caso los niveles de IgG1 específico contra EXO de *Fasciola hepatica* utilizando el anticuerpo anti IgG1 biotinilado, marcando en la figura los días de inmunización de ambos grupos. Se observa que claramente el G3, inmunizado con EXO de *F. hepatica*, presenta un mayor nivel de estos anticuerpos como respuesta a ser inmunizados con este posible antígeno. Mientras que el nivel de IgG1 en el caso del grupo inmunizado con PBS,

no presentó una variación a lo largo de los días del ensayo, lo cual era lo esperado ya que los ratones no estaban inmunizados.

Por lo cual se podría decir que genera una respuesta esperada al usar el EXO de *F.h* como antígeno, ya que los ratones de este grupo llegaron al día del desafío del ensayo con un nivel más alto de anticuerpos de clase IgG1 anti EXO de *Fh*. Lo cual podría servir como protección a una infección. Al realizar el test no paramétrico de Wilcoxon, esta diferencia en el nivel de anticuerpos comparando ambos grupos fue significativa, por lo que se puede pensar que los ratones llegarían con un nivel alto de IgG1 al momento del desafío, para protegerse del mismo.

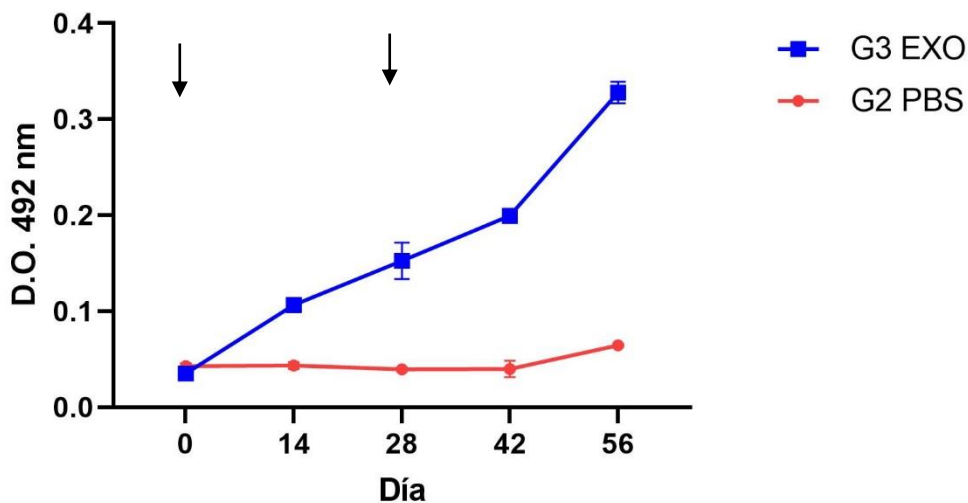


Figura 4.19: D.O 492nm con sus respectivos SD en función de días de sangrado del ensayo para detección de Ac IgG1 específicos a EXO de *F. hepatica*, utilizando el anticuerpo anti IgG1 biotinilado en el ELISA para grupos 2 y 3. Se observan los datos de D.O. promedio de duplicados de los pools correspondientes a los 11 ratones del grupo inmunizado con EXO de *F.h.*; y los pools de los 3 ratones del grupo 2 (dil 1:400), en función de los días. Se marca con flechas los días de inmunización. Resultados generados con GraphPad Prism 8. Con método analítico no paramétrico (Wilcoxon, tomándose significativas las diferencias cuando $P \leq 0,05$.)

En el caso de la figura 4.20, en la cual se cuantificaron los niveles de IgG3 específica de EXO de *F. hepatica* de ambos grupos como en caso anterior; los niveles son muy parecidos en ambos grupos.

Si bien los ratones del grupo 3 presentan un nivel de anticuerpos IgG3 específicos de EXO de *F. hepatica* un poco más alto que los ratones del grupo 2, este nivel no llega a tener una gran diferencia con el nivel de anticuerpos IgG3 vistos por los ratones que fueron inmunizados con PBS. Siendo esta diferencia no significativa cuando se realizó el mismo test no paramétrico que al caso anterior.

Además, que al comparar los valores de D.O 492nm de ambas gráficas, se ve también que el nivel de IgG3 es mucho menor, llegando a un máximo de 0.075 para el grupo 3 (siendo este el nivel más alto de este ensayo), mientras que la D.O 492nm en el ELISA con anticuerpo IgG1 fue de 0.328. Con lo que se puede pensar que el nivel de IgG3 específica contra EXO de *Fasciola hepatica*, no es significativa. Se detecta IgG3 en los sueros de estos ratones, pero no es específica en respuesta a la inmunización con los EXO de *Fh.* purificados.

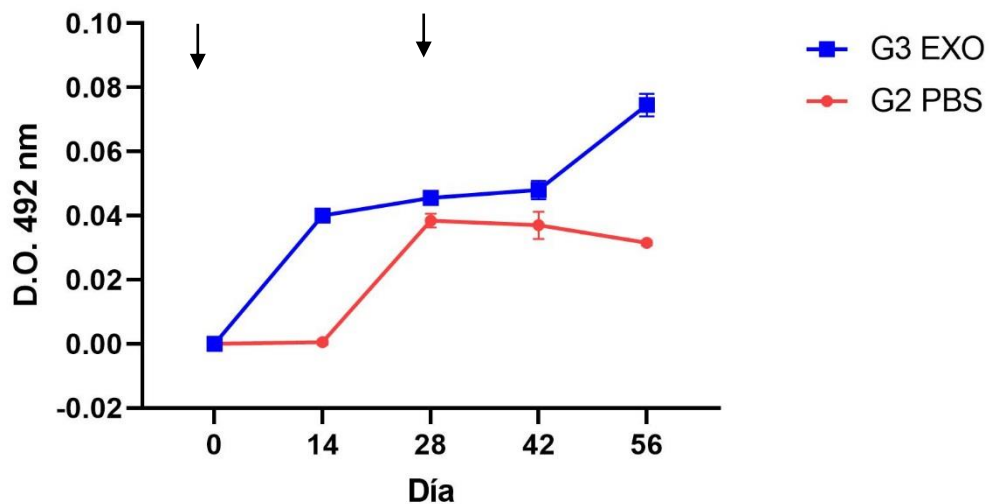


Figura 4.20: D.O 492nm con sus respectivos SD en función de días de sangrado del ensayo para detección de Ac IgG3 específicos de EXO de *F. hepatica*, utilizando el anticuerpo IgG3 en el ELISA para grupos 2 y 3. Se observan los datos de D.O. promedio de duplicados de los pools correspondientes a los 11 ratones del grupo inmunizado con EXO de *F.h.*; y los pools de los 3 ratones del grupo 2 (dil 1:400), en función de los días. Se marca con flechas los días de inmunización. Resultados generados con GraphPad Prism 8. Con método analítico no paramétrico (Wilcoxon, tomándose significativas las diferencias cuando $P \leq 0,05$).

5) DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Los estudios realizados en el marco de esta tesina buscaban conocer de forma preliminar la respuesta inmuno humoral de ratones CD1 inmunizados con EXO del parásito *Fasciola hepatica*, en su estado nativo para saber si este multi-antígeno nanoestructurado podría ser considerado un buen antígeno, sin ayuda de un agente adyuvante.

Esto se consideró importante ya que la afección causada por el parásito *F. hepatica*, induce pérdidas económicas importantes en el sector ganadero, infectando tanto al ganado como a humanos, razón por la cual la enfermedad se conoce en la actualidad como una zoonosis.

En el presente, el control de la fasciolosis en animales se realiza antes y durante las faenas. Esta prevención se basa en evitar el pastoreo en áreas donde existe el hospedero intermediario (caracol) y tratamiento antihelmíntico periódico en el huésped definitivo (López-Villacís et al., 2017). Este tratamiento antihelmíntico basado en drogas, es efectivo a corto plazo, no evita las re-infecciones y en general se presentan problemas de resistencia a estas drogas anti helmínticas (Kelley et al., 2016; Moll et al., 2000). Por lo que es de sumo interés el desarrollar un control inmunoproláctico para combatir el parásito.

Las vacunas serían la principal estrategia costo/beneficio para disminuir el riesgo de la enfermedad y su morbilidad asociada, así como la estimulación del sistema inmune por las vacunas (Clem, 2011). La idea de una vacuna contra la fasciolosis se viene estudiando hace años, aún sin tener una vacuna efectiva general contra la misma.

Para una buena formulación de una vacuna efectiva contra un parasito hay que tener en cuenta; el huésped y respuesta inmune que genera contra el parasito y su susceptibilidad a infección y re infección de este. Luego hay que pensar en el antígeno elegido, el cual será responsable de la producción de anticuerpos contra una actividad esencial para el parásito que permitirá limitar el desarrollo de su ciclo de vida.

Como se dijo, es necesario saber características de la respuesta protectora contra este parásito, para poder encontrar posibles antígenos que limiten el ciclo de vida del parásito. Se ha descrito que una respuesta protectora, en animales de producción, debería estar asociada a un fenotipo Th1, con altos títulos de IgG2 y bajos títulos de IgG1 (Mulcahy et al., 1999), también sería efectiva una respuesta mixta Th1/Th2 contando con altos niveles de anticuerpos IgG2 e IgG1 (Golden et al., 2010; Maggioli et al., 2011).

En este sentido, se han realizado estudios con diversas proteasas de la *F. hepatica* como potenciales antígenos para la fabricación de una vacuna, como ser la LAP, y las catepsinas L lográndose altos niveles de protección (Piacenza et al., 1999).

En este trabajo, se tomó como posible antígeno a los exosomas producidos por la *Fasciola hepatica* adulta en medio de cultivo in vitro.

Los EXO son nano vesículas extracelulares excretadas-secretadas en este caso por el parásito. Se ha demostrado que los exosomas de *Fasciola hepatica* contribuyen a funciones como reparación del tejido, comunicación neural, respuesta inmunológica y transferencia

de proteínas patógenas (Marcilla et al., 2012), por lo que se pensó que serían buenos candidatos para actuar como antígenos y presentar una buena respuesta protectora contra el parásito.

Para el ensayo de inmunización, se purificaron EXO del producto de excreción-secreción de los gusanos adultos obtenidos de un frigo rico local, utilizando un kit comercial junto con un método previamente descrito (Marcilla et al., 2012).

Se corroboró que lo purificado a partir de los PES de distintos lotes fuera verdaderamente EXO de *F. hepatica*, primero realizando el perfil proteico de estas purificaciones. En las cuales fue posible observar tanto en los carriles de PES como los de EXO, proteínas y proteasas que se sabía deberían encontrarse en ambas muestras, como ser el caso de la catepsina-L y su estado zimógeno, la pro-catepsina (Cwiklinski et al., 2015; Marcilla et al., 2012). Por medio de estos perfiles proteicos también se pudo visualizar que los perfiles de los lotes “sucios” y “limpios” son muy similares, por lo que al momento de la obtención del PES no variaría el contar con gusanos sucios o limpios para la purificación de los exosomas.

Seguidamente se realizó un western blot utilizando un anticuerpo anti-catepsina L, utilizándolo como una segunda prueba de que se habían purificado en este caso, EXO de *Fasciola hepatica*.

Una vez purificados y constado de que las muestras contenían EXO de *Fasciola hepatica* se realizó un ensayo de antigenicidad con ratones CD1 para evaluar preliminarmente su respuesta inmuno humoral al ser inmunizados con estas nano vesículas del parásito.

Los ratones fueron inmunizados con EXO de *F. hepatica*, sin adyuvante, dos veces a lo largo de 56 días (inmunizaciones realizadas en el día cero y día veintiocho), basándonos al esquema de inmunización usado exitosamente por otros investigadores usando exosomas de *Echinostoma caproni* (Trelis et al., 2016).

Se realizaron sangrados de los ratones inmunizados con EXO de *F. hepatica* y de un grupo control (inmunizado con PBS) en los días cero, catorce, veintiocho, cuarenta y dos y cincuenta y seis. Se obtuvo el suero de estas muestras, para así analizar el nivel de anticuerpos anti EXO de *Fasciola hepatica* en ambos grupos a lo largo del ensayo, y ver si los ratones inmunizados llegarían con una protección al desafío (el cual no se estudió en este trabajo).

La respuesta humoral obtenida en cuanto a los niveles del anticuerpo IgG total, muestra un nivel de IgG total anti EXO de *F. hepatica* bajo, pero con una tendencia de aumento de anticuerpos específicos a lo largo del experimento (cuando se estudió el promedio de las D.O. de los once ratones del grupo tres a lo largo del ensayo). Esto es debido probablemente a que el sistema de detección de IgG total utilizado no tenía la sensibilidad adecuada para detectar la diferencia, que sí se pudo observar al analizar las subclases con un sistema de mayor sensibilidad.

Dentro del grupo inmunizado, se observa que el crecimiento del nivel del anticuerpo anti EXO de *Fh* no fue significativo al día cincuenta y seis, por lo que se puede pensar que los ratones no llegarían con un nivel alto de estos anticuerpos al desafío, por lo que podría ser necesario realizar un tercer booster, para llegar al momento del desafío con un nivel mayor de anticuerpos específicos y poder analizar si presentarían una protección.

De igual manera, que se vea una tendencia a un crecimiento en los niveles de IgG total anti EXO del parásito inducida por el antígeno, sobre todo luego del segundo booster, podría indicar que estas partículas si actúan como antígenos.

Para corroborar o mejorar la detección de los anticuerpos IgG se utilizó un sistema biotinilado, siendo este más sensible. Con el cuál se pudieron monitorear los niveles de las distintas sub clases de IgG de ratón, siendo estos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti EXO de *F. hepatica*.

En el caso del anticuerpo IgG1 específico de EXO de *Fasciola hepatica* si observó una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo inmunizado a lo largo del ensayo, observándose una clara tendencia de crecimiento en los niveles del anticuerpo en el caso del grupo inmunizado, mientras que el grupo control se mantuvo cercano a cero durante todo el ensayo. Por lo que se podría llegar pensar que en este caso, los ratones si llegarían con un buen nivel de esta sub clase de anticuerpo IgG inducida por los EXO de *Fasciola hepatica*. Lo que podría sumar la hipótesis de que el EXO de *F.h* es un antígeno, generando una protección frente a una infección.

En el caso de los anticuerpos IgG2a e IgG2b anti EXO de *F.h.* se observaron niveles similares en ambos grupos, es decir tanto para el grupo inmunizado como para el grupo control, cuando se estudiaron las posibles diluciones de trabajo, razón por la cual no se siguió estudiando estas sub clases. Siendo la diferencia en los niveles de los anticuerpos no significativa, por lo cual se infiere que el grupo inmunizado no llegaría con protección y niveles altos de estos determinados anticuerpos al día del desafío en éstas subclases. Sobre todo teniendo en cuenta que un nivel alto de IgG2a estaría relacionada con una respuesta Th1 o mixta, las cuales se postula que estarían vinculadas a la protección contra la fasciolosis en modelos murinos, ovinos y bovinos, se podría pensar que los exosomas no son buenos antígenos o las inmunizaciones tendrían que realizarse de manera distinta (Garcia-Campos et al., 2019; Maggioli et al., 2011; Rojas-Caraballo et al., 2017).

Por último, se siguió los niveles del anticuerpo IgG3 anti EXO de *Fh.*, al igual que en el caso anterior, los niveles fueron mayores en el grupo inmunizado con el posible antígeno. Pero es de notar que en este caso los niveles del anticuerpo generado por el EXO fueron menores para ambos grupos, lo cual indicaría que si bien se detectan niveles de IgG3 en el suero de los ratones inmunizados con EXO de *Fasciola hepatica*, estos anticuerpos no serían específicas del EXO.

En general se podría decir entonces, que el EXO si tendría la capacidad de ser antigénico, pero que genera, por lo menos en estas condiciones de trabajo, una respuesta de un nivel moderado de estos antígenos estudiados.

Como solución a este nivel bajo de respuesta se podría realizar otro booster del antígeno, y medir otra vez los niveles del anticuerpo (ya que por ejemplo en el caso del anticuerpo IgG total anti EXO *Fh.* se ve que luego del segundo booster hay otra vez una tendencia a subir, por lo que se podría pensar que seguiría esa tendencia), también se podrían subir las concentraciones del antígeno en las dos o más inmunizaciones.

Otra solución sería la utilización de un adyuvante al momento de realizar la preparación del antígeno para inmunizar. En este caso se había elegido no utilizar adyuvante, ya que se quería estudiar los EXO de *Fh.* cómo antígenos per se. Para esto deberían de estar íntegros, y al ser vesículas no se sabe si los mismos tendrían las mismas funciones en por ejemplo en aceite oleoso o si serían lisados, razón por la cual se inmunizó a los ratones solo con EXO en PBS (que se sabe, no lisa o daña a estas partículas).

Pero, un adyuvante podría ser de gran ayuda debido a sus funciones; del mismo depende la respuesta inmune desarrollada del huésped luego de ser inmunizado y el tipo de respuesta que queremos que desarrolle la vacuna en el hospedero para proteger frente al parásito (Hecker, Venturini, Campero, Odeón, & Moore, 2012). Estos pueden ser distintas moléculas en las que se pueden incluir sales minerales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, en uso humano y veterinario. También pueden ser emulsiones, como, por ejemplo, el adyuvante completo e incompleto de Freud. Estos son emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite que incluyen algún producto bacteriano. Lo negativo de los adyuvantes es que en su mayoría causan fuerte respuesta inflamatoria. (Humberto et al., 1999).

Dada estas características de los compuestos que funcionan como adyuvantes, otra perspectiva de este estudio podría ser realizar ensayos para saber si la molécula de EXO se lisa o no en un adyuvante, lo cual podría servir, y así estudiar la respuesta inmuno humoral en estos casos. Sobre todo viendo que, si bien la inmunización EXO de *F.h.* genera un aumento de los niveles de las clases estudiadas de anticuerpos, los mismos no son significativos, con excepción de la sub clase IgG1.

El poder estudiar el uso de un adyuvante sería bueno para poder obtener la respuesta que se cree necesaria para que el hospedero sobreviva a la infección.

Otra perspectiva de trabajo puede ser que debido a que los mecanismos involucrados en el control de la infección son de más complejidad, y la evaluación inmuno humoral puede no ser suficiente, se podría desafiar y ver el nivel de citoquinas que presentan los ratones en estas instancias, estudiando así la respuesta celular de los ratones.

Esto sería importante ya que al unir la respuesta inmuno humoral y la respuesta celular se llegaría de mejor manera a saber qué tipo de respuesta general logra inducir los EXO de *Fasciola hepatica* al actuar como antígeno frente a una infección del parásito.

6) BIBLIOGRAFÍA

- Allen, J. E., & Maizels, R. M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*, 11(6), 375–388.
- Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F., Stadecker, M. J., & Gause, W. C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology*, 7(12), 975–987.
- Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Dalton, J. P., & Goñi, F. (2000). Fasciola hepatica: Parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: Determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Experimental Parasitology*, 94(2), 99–110.
- Carmona, C., Dowd, A. J., Smith, A. M., & Dalton, J. P. (1993). Cathepsin L proteinase secreted by Fasciola hepatica in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62(1), 9–17.
- Clark, M. R. (1997). IgG effector mechanisms. *Chemical Immunology*, 65(February 1997), 88–110.
- Clem, A. S. (2011). Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(1), 73–78.
- Clery, D., Torgerson, P., & Mulcahy, G. (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to Fasciola hepatica. *Veterinary Parasitology*, 62(1–2), 71–82.
- Coakley, G., Maizels, R. M., & Buck, A. H. (2015). Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends in Parasitology*, 31(10), 477–489.
- Collins, A. M. (2016). IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunology and Cell Biology*, 94(10), 949–954.
- Commission, E., Union, E., Products, M., Use, V., Commission, E., Agency, E. M., ... Commission, E. (2014). European public MRL assessment report (EPMAR) European public MRL assessment report (EPMAR) Ivermectin (establishment of a maximum residue limit for muscle) Summary of the scientific discussion for the establishment of, 44(418), 1–14.
- Correa, A. C., Escobar, J. S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., ... Hurtrez-Boussès, S. (2010). Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 381.
- Cwiklinski, K., De La Torre-Escudero, E., Trelis, M., Bernal, D., Dufresne, P. J., Brennan, G. P., ... Robinson, M. W. (2015). The extracellular vesicles of the helminth pathogen, Fasciola hepatica: Biogenesis pathways and cargo molecules involved in parasite pathogenesis. *Molecular and Cellular Proteomics*, 14(12), 3258–3273.

- de la Torre-Escudero, E., Bennett, A. P. S., Clarke, A., Brennan, G. P., & Robinson, M. W. (2016). Extracellular Vesicle Biogenesis in Helminths: More than One Route to the Surface? *Trends in Parasitology*, *32*(12), 921–929.
- de la Torre-Escudero, E., Gerlach, J. Q., Bennett, A. P. S., Cwiklinski, K., Jewhurst, H. L., Huson, K. M., ... Robinson, M. W. (2019). Surface molecules of extracellular vesicles secreted by the helminth pathogen *Fasciola hepatica* direct their internalisation by host cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(1), 1–27.
- Di Maggio, L. S., Tirloni, L., Pinto, A. F. M., Diedrich, J. K., Yates, J. R., Benavides, U., ... Berasain, P. (2016). Across intra-mammalian stages of the liver fluke *Fasciola hepatica*: A proteomic study. *Scientific Reports*, *6*(September), 1–14.
- Díaz, A., & Allen, J. E. (2007). Mapping immune response profiles: The emerging scenario from helminth immunology. *European Journal of Immunology*, *37*(12), 3319–3326.
- Donnelly, S., O'Neill, S. M., Sekiya, M., Mulcahy, G., & Dalton, J. P. (2005). Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and Immunity*, *73*(1), 166–173.
- Dyballa, N., & Metzger, S. (2009). Fast and sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Visualized Experiments*, (30), 2–5.
- Fairweather, I., Brennan, G. P., Hanna, R. E. B., Robinson, M. W., & Skuce, P. J. (2020). Drug resistance in liver flukes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *12*(November 2019), 39–59.
- Falcón, C., Carranza, F., Martínez, F. F., Knubel, C. P., Masih, D. T., Motrán, C. C., & Cervi, L. (2010). Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *137*(1–2), 36–46.
- Flynn, R. J., & Mulcahy, G. (2008). The roles of IL-10 and TGF- β in controlling IL-4 and IFN- γ production during experimental *Fasciola hepatica* infection. *International Journal for Parasitology*, *38*(14), 1673–1680.
- Flynn, R. J., Mulcahy, G., & Elsheikha, H. M. (2010). Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: Implications for control. *Veterinary Parasitology*, *169*(3–4), 235–240.
- García-Campos, A., Correia, C. N., Naranjo-Lucena, A., Garza-Cuartero, L., Farries, G., Browne, J. A., ... Mulcahy, G. (2019). *Fasciola hepatica* infection in cattle: Analyzing responses of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using a transcriptomics approach. *Frontiers in Immunology*, *10*(AUG), 1–16.
- Golden, O., Flynn, R. J., Read, C., Sekiya, M., Donnelly, S. M., Stack, C., ... Mulcahy, G. (2010). Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine*, *28*(34), 5551–5557.

- Gomez-Puerta, L. A., Gavidia, C., Lopez-Urbina, M. T., Garcia, H. H., & Gonzalez, A. E. (2012). Short Report: Efficacy of a Single Oral Dose of Oxfendazole against *Fasciola hepatica* in Naturally Infected Sheep. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *86*(3), 486–488.
- Graham-Brown, J., Hartley, C., Clough, H., Kadioglu, A., Baylis, M., & Williams, D. J. L. (2018). Dairy heifers naturally exposed to *Fasciola hepatica* develop a type 2 immune response and concomitant suppression of leukocyte proliferation. *Infection and Immunity*, *86*(1).
- Guasconi, L., Serradell, M. C., & Masih, D. T. (2012). *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *148*(3–4), 359–363.
- Haçariz, O., Sayers, G., Flynn, R. J., Lejeune, A., & Mulcahy, G. (2009). IL-10 and TGF- β 1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep. *Parasite Immunology*, *31*(10), 613–622.
- Hanna, R. E. B. (1980). *Fasciola hepatica*: Glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Experimental Parasitology*, *50*(1), 103–114.
- Hecker, Y. P., Venturini, M. C., Campero, C. M., Odeón, A. C., & Moore, D. P. (2012). Avances en el desarrollo de vacunas contra la neosporosis bovina. *Revista Argentina de Microbiología*, *44*(3), 216–230.
- Humberto, L., Morris, J., Clara, L., Manrique, M., Roberto, L., & Díaz, T. A. (1999). ADYUVANTES INMUNOLÓGICOS, *18*(2), 130–137.
- Jefferies, J. R., Campbell, A. M., Rossum, A. J. V., Barrett, J., & Brophy, P. M. (2001). Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* products. *Proteomics*, *9861*(April), 1128–1132.
- Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M., & Kang, C. (2002). Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis [5]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, *23*(11), 1511–1512.
- Kaplan, R. M. (2001). *Fasciola hepatica*: a review of the economic impact in cattle and considerations for control. *Veterinary Therapeutics : Research in Applied Veterinary Medicine*, *2*(1), 40–50.
- Kelley, J. M., Elliott, T. P., Beddoe, T., Anderson, G., Skuce, P., & Spithill, T. W. (2016). Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends in Parasitology*, *32*(6), 458–469.
- Kim, O. Y., Choi, S. J., Jang, S. C., Park, K. S., Kim, S. R., Choi, J. P., ... Gho, Y. S. (2015). Bacterial protoplast-derived nanovesicles as vaccine delivery system against bacterial infection. *Nano Letters*, *15*(1), 266–274.

- López-Villacís, I. C., Artieda-Rojas, J. R., Mera-Andrade, R. I., Muñoz-Espinoza, M. S., Rivera-Guerra, V. E., Cuadrado-Guevara, A. C., ... Montero-Recalde, M. A. (2017). Fasciola hepática : aspectos relevantes en la salud animal . *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 4(2), 137–146.
- López Abán, J., & Nogal Ruiz, J. J. (2005). Evaluation of a fasciolosis hyper-infection model in mice for vaccination trials. *Revista Ibérica de Parasitología*, 65(1–4), 71–78. Retrieved from http://bibliotecavirtual.ranf.com/i18n/catalogo_imagenes/imagen_id.cmd?idImagen=10049769%5Cnhttp://bibliotecavirtual.ranf.com/i18n/consulta/registro.cmd?id=13594
- Lopez Lemes, M. del H., Hernández, S., Acuña, A. M., & Nuri, A. (1996). Fascioliasis en la República Oriental del Uruguay. *Rev Med Uruguay*, 12(12), 37–43. Retrieved from <http://www.rmu.org.uy/revista/1996v1/art6.pdf>
- Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basika, T., ... Carmona, C. (2011). The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against Fasciola hepatica infection in sheep. *Vaccine*, 29(48), 9057–9063.
- Marcilla, A., Trelis, M., Cortés, A., Sotillo, J., Cantalapiedra, F., Minguez, M. T., ... Bernal, D. (2012). Extracellular Vesicles from Parasitic Helminths Contain Specific Excretory/Secretory Proteins and Are Internalized in Intestinal Host Cells. *PLoS ONE*, 7(9).
- Martin-Jaular, L., Nakayasu, E. S., Ferrer, M., Almeida, I. C., & del Portillo, H. A. (2011). Exosomes from Plasmodium yoelii-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. *PLoS ONE*, 6(10), 1–10.
- Mas-Coma, S., Bargues, M. D., & Valero, M. A. (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35(11–12), 1255–1278.
- Moazeni, M., & Ahmadi, A. (2016). Controversial aspects of the life cycle of Fasciola hepatica. *Experimental Parasitology*, 169, 81–89.
- Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, Á., Donnelly, S., O’Neill, S. M., ... Cwiklinski, K. (2015). Fasciola hepatica vaccine: We may not be there yet but we’re on the right road. *Veterinary Parasitology*, 208(1–2), 101–111.
- Moll, L., Gaasenbeek, C. P. H., Vellema, P., & Borgsteede, F. H. M. (2000). Resistance of Fasciola hepatica against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 91(1–2), 153–158.
- Montaner, S., Galiano, A., Trelis, M., Martin-Jaular, L., del Portillo, H. A., Bernal, D., & Marcilla, A. (2014). The role of extracellular vesicles in modulating the host immune response during parasitic infections. *Frontiers in Immunology*, 5(AUG), 1–9.

- Mooney, L., Good, B., Hanrahan, J. P., Mulcahy, G., & de Waal, T. (2009). The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. *Veterinary Parasitology*, *164*(2–4), 201–205.
- Moreau, E., & Chauvin, A. (2010). Immunity against helminths: Interactions with the host and the intercurrent infections. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2010*.
- Mulcahy, G., O'Connor, F., Clery, D., Hogan, S. F., Dowd, A. J., Andrews, S. J., & Dalton, J. P. (1999). Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Research in Veterinary Science*, *67*(1), 27–33.
- O'Halloran, T. V. (1989). Interrelations among metal ions, enzymes, and gene expression. In: *Metal Ions in Biological Systems*. Sigel, H. and Sigel, A., Eds., *17*(4), 105–146.
- O'Neill, S. M., Brady, M. T., Callanan, J. J., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, K. H. G., & Dalton, J. P. (2000). *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunology*, *22*(3), 147–155.
- Pacheco, I. L., Abril, N., Morales-Prieto, N., Bautista, M. J., Zafra, R., Escamilla, A., ... Pérez, J. (2017). Th1/Th2 balance in the liver and hepatic lymph nodes of vaccinated and unvaccinated sheep during acute stages of infection with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, *238*, 61–65.
- Parker, R., Deville, S., Dupuis, L., Bertrand, F., & Aucouturier, J. (2009). Adjuvant formulation for veterinary vaccines: Montanide™ Gel safety profile. *Procedia in Vaccinology*, *1*(1), 140–147.
- Pearce, E. J., & Sher, A. (1991). Functional dichotomy in the CD4+T cell response to *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology*, *73*(1), 110–116.
- Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, I., Dalton, J. P., & Carmona, C. (1999). Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infection and Immunity*, *67*(4), 1954–1961.
- Piedrafita, D., Spithill, T. W., Smith, R. E., & Raadsma, H. W. (2010). Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. *Parasite Immunology*, *32*(8), 572–581.
- Rasool, S. I., & De Bergh, C. (1970). © 1970 Nature Publishing Group. *Nature Publishing Group*, *228*, 726–734. Retrieved from <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>
- Robinson, M. W., Menon, R., Donnelly, S. M., Dalton, J. P., & Ranganathan, S. (2009). An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: Proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Molecular and Cellular Proteomics*, *8*(8), 1891–1907.

- Rojas-Caraballo, J., López-Abán, J., Moreno-Pérez, D. A., Vicente, B., Fernández-Soto, P., del Olmo, E., ... Muro, A. (2017). Transcriptome profiling of gene expression during immunisation trial against *Fasciola hepatica*: Identification of genes and pathways involved in conferring immunoprotection in a murine model. *BMC Infectious Diseases*, *17*(1), 1–14.
- Saba, R., & Korkmaz, M. (2005). Human fascioliasis. *Clinical Microbiology Newsletter*, *27*(4), 27–34.
- Schijns, V., Fernández-Tejada, A., Barjaktarović, Ž., Bouzalas, I., Brimnes, J., Chernysh, S., ... Lavelle, E. C. (2020). Modulation of immune responses using adjuvants to facilitate therapeutic vaccination. *Immunological Reviews*, *296*(1), 169–190.
- Serradell, M. C., Guasconi, L., Cervi, L., Chiapello, L. S., & Masih, D. T. (2007). Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *117*(3–4), 197–208.
- Serradell, M. C., Guasconi, L., & Masih, D. T. (2009). Involvement of a mitochondrial pathway and key role of hydrogen peroxide during eosinophil apoptosis induced by excretory-secretory products from *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *163*(2), 95–106.
- Toet, H., Piedrafita, D. M., & Spithill, T. W. (2014). Liver fluke vaccines in ruminants: Strategies, progress and future opportunities. *International Journal for Parasitology*, *44*(12), 915–927.
- Trelis, M., Galiano, A., Bolado, A., Toledo, R., Marcilla, A., & Bernal, D. (2016). Subcutaneous injection of exosomes reduces symptom severity and mortality induced by *Echinostoma caproni* infection in BALB/c mice. *International Journal for Parasitology*, *46*(12), 799–808.
- Vercauteren, I., Geldhof, P., Peelaers, I., Claerebout, E., Berx, G., & Vercruyse, J. (2003). Identification of excretory-secretory products of larval and adult *Ostertagia ostertagi* by immunoscreening of cDNA libraries. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *126*(2), 201–208.
- Waldvogel, A. S., Lepage, M. F., Zakher, A., Reichel, M. P., Eicher, R., & Heussler, V. T. (2004). Expression of interleukin 4, interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *97*(1–2), 53–63.
- Wilkinson, J., Brophy, P. M., & Morphew, R. M. (2019). The importance of extracellular vesicle purification for downstream analysis: A comparison of differential centrifugation and size exclusion chromatography for helminth pathogens, 1–26.

Wu, Z., Wang, L., Li, J., Wang, L., Wu, Z., & Sun, X. (2019). Extracellular vesicle-mediated communication within host-parasite interactions. *Frontiers in Immunology*, *10*(JAN).