



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**IDENTIFICACIÓN DE EPITOPOS INMUNODOMINANTES DE ESTADÍOS  
JUVENILES DE *Fasciola hepatica* COMO CANDIDATOS A INMUNÓGENOS.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:  
SAMUEL ORTEGA VARGAS**

**TUTOR PRINCIPAL**

**HÉCTOR MANELIC QUIROZ ROMERO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

**COMITÉ TUTORAL:**

**ROGELIO A LEJANDRO ALONSO MORALES  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

**ABEL EDMUNDO VILLA MANCERA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, BUAP.**

**MÉXICO, D.F. MAYO 2014.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIAS.**

A Dios por la vida prestada.

A mi abuela: Ma. Victoria Cruz M. por su  
apoyo incondicional, consejos y ejemplo a seguir.

A mi mamá: Juana Vargas C. Por  
su amor y comprensión.

A mis hermanos: Salomón y P. Victoria.

A mis tíos: Lázaro y Gabriel Vargas  
Por creer en mí y su apoyo incondicional

## AGRADECIMIENTOS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Sistema Nacional de Investigadores (SNI), por la beca otorgada.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) con el proyecto PAPIIT IT230011.

Al Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM: Dr. Juan Antonio Figueroa castillo.

Al Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Dr. Rogelio Alonso Morales.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología; Dr. José Alberto Cano por permitir usar instalaciones para mantener los animales de experimentación.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, BUAP: Dr. Carreón Luna, por el uso de Laboratorio de Investigación.

Al Dr. Héctor Quiroz Romero por las recomendaciones y su impulso continuo de seguir mejorando.

Al Dr. Abel Villa Mancera por sus sabios consejos para lograr los objetivos trazados.

A la Dra. Irene Cruz Mendoza por su apoyo e inagotable forma de enseñanza.

Al Dr. Arturo J. Munguía por las recomendaciones proporcionadas sobre el desenquistamiento de metacercarias de *Fasciola hepatica*.

Al Dr. Juan Gay Gutiérrez, Director del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) por la donación de metacercarias de *Fasciola hepatica*.

Al Dr. Enrique Pinzón Estrada, Jefe de la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM, por la donación de conejos raza Nueva Zelanda.

A Guadalupe Reyes por todo su amor, comprensión y sinceridad.

A mis amigos (as): Shuellen Elena, Karina Avelar, Gemma Ibarra, Nelyda Saldaña, Ma. Guadalupe J., Lizbeth Pérez, Iraís Granda, Carlos Solares y Edgar Zapata por su amistad.

## RESUMEN.

El principio básico de una biblioteca de péptidos producida mediante el despliegue en fagos o “*phage display*”, es proporcionar un gran número de variantes de péptidos de los que un clon con un carácter particular de interés se puede seleccionar y donde los fagos expresan dichos péptidos en su superficie. Con el objetivo de seleccionar y caracterizar clonas de epitopos inmunodominantes de adolesecarias de *Fasciola hepatica* mediante la tecnología de despliegue en fagos, se utilizaron dos bibliotecas comerciales con fagos filamentosos que exponen aleatoriamente péptidos de 12 y 7 aminoácidos fusionados a la proteína pIII del bacteriófago M13. Se infectaron caracoles *Lymnaea humilis* con miracidios de *Fasciola hepatica* para la obtención de metacercarias y su posterior uso en la infección de conejos Nueva Zelanda para la producción de anticuerpos anti-adolescarías. La purificación, cuantificación de proteínas y reactividad de los anticuerpos (IgG) anti-adolescarías de *F. hepatica* fue realizado por inmunoprecipitación, método de Bradford y ELISA Indirecto, respectivamente. Adicionalmente, antígenos de parásitos juveniles se obtuvieron a partir del desenquistamiento de metacercarias. Los péptidos expresados en el fago M13, fueron seleccionados a través de *biopanning* con anticuerpos anti-adolescarías de *F. hepatica* utilizando 15, 7.5 y 3.5 µg para cada ronda de selección. Los fagos eluidos en la última ronda de selección fueron amplificados y titulados para, posteriormente seleccionar clonas individuales a partir de un medio de cultivo sólido LB/IPTG/Xgal y caracterizadas por ELISA tipo sándwich, utilizando  $1 \times 10^{10}$  partículas fágicas. Como resultado, un total de 142 caracoles fueron infectados y a partir de la semana 7 post-infección, 794 metacercarias fueron obtenidas al final del experimento. La media del porcentaje de desenquistamiento de metacercarias fue de 34.52%. Se seleccionaron treinta y cuatro clonas individuales; dieciocho clonas fueron seleccionadas utilizando una biblioteca combinatoria de 12 aminoácidos (12-mer) y dieciséis clonas con la biblioteca combinatoria de 7 aminoácidos (7-mer). Utilizando la IgG anti-adolescaria de *F. hepatica* de conejos inoculados con metacercarias, ocho clonas mostraron mayor afinidad al anticuerpo policlonal. Éstas clonas pueden ser utilizados como candidatos a vacunación en animales domésticos.

*Fasciola hepatica*, *Phage display*, epitopos, mimotopos.

## ABSTRACT

The basic principle of a peptide library produced by the phage display, provide a large number of peptide variants of a clone with a particular trait of interest can be selected and where the phages expressing the peptide sequences on the surface. With the objective of identifying and characterizing clones adolescarias immunodominant epitopes of *Fasciola hepatica* by phage display technology, two commercial libraries filamentous phages were used for random peptides exhibiting 12 and 7 amino acids fused to the pIII protein of bacteriophage M13. *Lymnaea humilis* snails were infected with miracidia of *Fasciola hepatica* to obtain metacercariae for subsequent use in the New Zealand rabbit's infection for the production of antibodies (IgG) anti-adolascarias. Purification, quantification and reactivity of the antibodies (IgG) anti-*F.hepatica* were performed by immunoprecipitation, Bradford method and indirect ELISA, respectively. Additionally, juvenile parasites antigens were obtained from excystation of metacercariae. The peptides expressed on the phage M13, were selected through biopanning with antibodies anti-adolascarias of *F. hepatica* using 15, 7.5, and 3.5 mg for each round of selection. Eluted phages from the last round of selection were amplified and subsequently titrated to select individual clones from solid LB/IPTG/Xgal culture medium and were characterized by an sandwich ELISA using  $1 \times 10^{10}$  phage particles. A total of 142 snails were infected and beginning on week 7 post-infection, 794 metacercariae were obtained at the end of the experiment. The mean percentage of metacercariae excystation was 34.52%. Thirty-four individual clones were selected; eighteen clones were selected using the combinatorial library of 12 amino acids (12-mer) and sixteen clones through the combinatorial library of 7 amino acids (7-mer). Using the IgG anti-adolascaria of *F. hepatica* of rabbits inoculated with metacercariae, eight clones showed higher affinity polyclonal antibody. These clones can be used as vaccine candidates for domestic livestock.

*Fasciola hepatica*, phage display, epitope, mimotope.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIAS.</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN.</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IV</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
1.7 Repertorio de antígenos de <i>Fasciola hepatica</i> durante su desarrollo.	6
1.8 Respuesta inmune e inmunoevasión por <i>Fasciola hepatica</i> .	8
2.- Epitopos de <i>Fasciola hepatica</i> .	11
3.- Tecnología de despliegue en fagos	15
4.- Aplicaciones de la tecnología de despliegue en fagos.	20
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>23</b>
<b>HIPÓTESIS.</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS.</b>	<b>33</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIÓN.</b>	<b>47</b>
<b>LITERATURA CITADA.</b>	<b>48</b>

## LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.- Porcentaje de mortalidad de <i>Lymnaea humilis</i> infectados con miracidios de <i>Fasciola hepatica</i> -----	33
Figura 2.- Dinámica de eliminación de metacercarias de <i>Fasciola hepatica</i> del huésped intermediario <i>Lymnaea humilis</i> -----	34
Figura 3.- Análisis por ELISA Indirecto de IgG contra antígenos de excreción-secreción de <i>Fasciola hepatica</i> adulta en suero de conejos-----	36
Figura 4.- Reactividad de los sueros hiperinmunes por ELISA Indirecto-----	37
Figura 5.- ELISA Indirecto para la selección de clonas utilizando la biblioteca 12 aminoácidos. -----	39
Figura 6.- ELISA Indirecto para la selección de clonas utilizando la biblioteca 7 aminoácidos -----	40

## LISTA DE CUADROS.

Tabla 1 -.Desenquistamiento de metacercarias de <i>Fasciola hepatica</i> -----	35
Tabla 2-. Carga parasitaria de conejos infectados con <i>F. hepatica</i> -----	35
Tabla 3.- Enriquecimiento de fagos por cada ronda de selección o “ <i>biopanning</i> ”-----	38



## **INTRODUCCIÓN.**

### **1.1 Fasciolosis**

La enfermedad parasitaria denominada fasciolosis o distomatosis hepática, es causada por la presencia y acción del trematodo *Fasciola hepatica* (Linnaeus 1758), en el parénquima hepático y conductos biliares de animales domésticos (Quiroz, 1990). Esta parasitosis es económicamente importante en bovinos y ovinos, además de que afecta al hombre, por lo que es considerada una zoonosis (Andrews, 1999).

Se ha estimado que 2.4 millones de personas se han infectado con *F. hepatica* en el mundo (Mas-Coma *et al.*, 1999), por lo que es un grave problema de salud pública en algunos países, como Bolivia, Perú, Ecuador, Egipto e Irán. Además, es causa de grandes pérdidas económicas en la producción de ganado (Mas-Coma *et al.*, 2009).

### **1.2 Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.**

La enfermedad en el huésped definitivo se adquiere tras ingerir la fase infectante denominada metacercaria, que se encuentra enquistada en la vegetación o contaminando el agua. Las metacercarias sufren un proceso de activación en el estómago o rumen, seguido por su desenquistamiento en el intestino delgado. Posteriormente, las adolescarias o trematodos juveniles recién desenquistados denominados como NEJ (newly excysted juvenile) perforan la pared intestinal alcanzando la cavidad peritoneal, penetran al hígado donde vagan de 8 a 12 semanas, alimentándose de tejido hepático y sangre, causando extensas hemorragias y fibrosis. Finalmente se alojan en los conductos biliares, donde el parásito hermafrodita completa su desarrollo y maduración, iniciando con la producción de una gran cantidad de huevos, que posteriormente son arrastrados hacia la vesícula biliar, llegan al intestino delgado y son excretados junto con las heces. (Andrews 1999).

Los huevos excretados al medio externo requieren para su desarrollo, una temperatura de entre 10 a 30°C, humedad superior a 50%, alta tensión de oxígeno y pH de 7-7.5 para su desarrollo embrionario. La luz y la temperatura influyen en la eclosión de las larvas acuáticas denominados miracidios. Éstos nadan activamente en busca de caracoles huéspedes intermediarios de la familia Lymnaeidae (huéspedes intermediarios de algunas helmintiasis), orientados por quimiotropismo y fototropismo positivo (Graczyk y Fried 1999). El miracidio penetra el tejido del caracol por acción de una probosis muscular y la secreción de cisteína proteasas que degradan el tegumento del pie del caracol (Ortiz, 2008). Una vez que los miracidios penetran, continúan con su desarrollo en la glándula digestiva (hepatopáncreas) transformándose sucesivamente en esporocistos, redias y cercarias. Estas últimas son liberadas a través del aparato respiratorio del caracol, luego de unos minutos de ser liberadas se enquistan en la vegetación o agua transformándose en metacercarias. (Graczyk y Fried 1999).

En la actualidad se han descrito 40 especies del género *Lymnaea* a nivel mundial, la especie predominante en los cinco continentes es *L. truncatula* (Graczyk y Fried 1999). En la República Mexicana el primer reporte de la presencia de huéspedes intermediarios de *F. hepatica* lo realizó Aguirre Pequeño en 1939 que identificó a *L. attenuata*, posteriormente Mazzotti en 1955 y 1956 reporta a *L. obrusa* y *L. humilis* (Quiroz, 2010). Actualmente en México se han reportado diez especies del género *Lymnaea*: *L. humilis*, *L. cubensis*, *L. bulimoides*, *L. columella*, *L. palustris*, *L. attenuata*, *L. palmeri*, *L. obrussa*, *F. modicella* y *L. viatrix* (Cruz et al., 2000; Cruz et al., 2010).

### **1.3 Patogenia de la fasciolosis.**

El desarrollo de la infección por *F. hepatica* depende de la especie de huésped, cantidad de metacercarias ingeridas y si es primo-infección o re-infecciones. Puede ser dividida en dos fases clínicas:

**1)** La fasciolosis aguda se observa casi de forma exclusiva en ovinos, se debe a la invasión y migración masiva de trematodos juveniles emigrantes, provocando una acción traumática con destrucción generalizada del parénquima hepático y una profusa hemorragia. El cuadro se puede complicar con *Clostridium novyi* tipo B, que secreta sus toxinas mortales. Los animales permanecen inmóviles, anoréxicos y muestran distensión abdominal dolorosa al tacto. En la necropsia se aprecia la trayectoria de la perforación del intestino, el hígado aparece engrosado, pálido y friable con numerosos focos hemorrágicos sobre la superficie y el parénquima, así como depósitos de fibrina. Los ganglios linfáticos, hepáticos y mesentéricos están aumentados de tamaño y tumefactos (Behm y Sangster 1999).

**2)** La fasciolosis crónica se asocia con la presencia de trematodos adultos en los conductos biliares, los signos clínicos característicos, sobre todo en ganado bovino, incluyen una pérdida gradual de la condición corporal, debilidad progresiva, anemia e hipoproteinemia, con la aparición de edemas subcutáneos (en el espacio intermandibular y el abdomen). En la necropsia se aprecian los conductos biliares engrosados, distendidos, fibróticos y calcificados, repletos de parásitos adultos, así como fibrosis hepática (Behm y Sangster 1999).

Para el caso de la fasciolosis humana, ocurre principalmente por la ingestión de verduras conteniendo las metacercarias, los síntomas característicos son dolor abdominal, fiebre, astenia y pérdida de peso (Díaz *et al.*, 2011).

#### **1.4 Impacto económico por *F. hepatica*.**

El impacto económico por la fasciolosis en los sistemas ganaderos modernos, se ve reflejado en una disminución de 3-5% y 0.5-0.7% en la producción de leche y de peso de la canal, respectivamente (Charlier *et al.*, 2013).

En México, se estima que la prevalencia de fasciolosis bovina y ovina oscila entre el 19-25%, respectivamente. En la fasciolosis crónica, puede haber una disminución en la ganancia diaria de peso del 8-9% en infecciones leves y hasta

un 20-28% en casos graves. La producción láctea puede disminuir hasta un 14%, con una disminución en la producción de 90-300kg por lactación, un rango de 0.5 a 1.0 kg por día de los 300 días de lactación y un promedio de disminución de sólidos totales de 0.328%. Aproximadamente el 10% de bovinos sacrificados en rastro presentan hígados que son decomisados por fasciolosis (Munguía, 2010).

### **1.5 Distribución de *F. hepatica*.**

La prevalencia e intensidad de la fasciolosis está relacionada directamente con las condiciones de manejo del hato (Bennema *et al.*, 2011), así como condiciones climáticas; un ascenso del porcentaje de humedad relativa, junto con las condiciones óptimas de temperatura, aumentan la prevalencia tanto en rumiantes como en los moluscos huéspedes intermediarios (Cruz *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2011).

La fasciolosis es reportada en diferentes partes del mundo con porcentajes de prevalencia variables; en el estado de Zulia, Venezuela reportan una prevalencia promedio de 23% de 242 bovinos muestreados. (Angulo *et al.*, 2007). En la región central de Cuba, en un estudio retrospectivo de 5 años (2000-2004), la prevalencia por *F. hepatica* fue del 35.5% de un total de 273 460 animales (Brito *et al.*, 2010). La prevalencia de *F. hepatica* en caprinos machos y hembras muestreados en el sur de Punjab, Pakistán fue del 4.65% y 1.75%, respectivamente (Ayaz *et al.*, 2013).

En la República Mexicana, en una revisión bibliográfica que abarcó de 1879 a 2006, *Fasciola hepatica* ha sido reportada prácticamente en todos los estados, excepto en Yucatán, Quintan Roo, Baja California Sur y parte de Campeche (Quiroz, 2010).

Estudios posteriores al año 2006 se han realizado en el área semidesértica del noreste de México, con prevalencia moderada a la infección por *F. hepatica*. En un estudio en bovinos, caprinos y ovinos, al utilizar la técnica de sedimentación

de Benedeck's, la prevalencia fue de  $11.4\pm 0.9$ ,  $24.5\pm 1.2$  y  $19.4\pm 2.0$  y a través de ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) Indirecto se tiene  $24.4\pm 1.2$ ,  $43\pm 1.5$  y  $30.6\pm 2.7$  respectivamente. (Munguía *et al.*, 2007). En Tlapacoyan, Veracruz, se examinaron 492 hígados de bovinos de diez municipios, con una frecuencia de fasciolosis de 10.6% (Flores, 2011).

Para el caso de los humanos, recientemente en Atlixco, Puebla la prevalencia obtenida por fasciolosis en niños fue de 2.94-13.33% (Zumaquero *et al.*, 2013).

### **1.6 Quimioterapia contra *Fasciola hepatica*.**

Existen drogas efectivas contra *F. hepatica*, que aplicadas de forma simple o combinada como el albendazol junto con el clorsulon alcanzan un 95% de eficacia contra formas inmaduras y adultas (Martínez *et al.*, 2014) o el uso del compuesto alfa que afecta el tegumento de *F. hepatica* de tres semanas de edad (Rivera *et al.*, 2005), este compuesto también produce cambios en órganos reproductores y con ello la inhibición de la producción de huevos (McConville *et al.*, 2012).

El triclabendazol (TCBZ) es, por lo general, la droga de elección, debido a que afecta a trematodos inmaduros y adultos, sus metabolitos sulfóxido (TCBZ.SO) y sulfona (TCBZ.SO<sub>2</sub>) alcanzan concentraciones en plasma de  $12.8 \mu\text{g ml}^{-1}$  y  $13.0 \mu\text{g ml}^{-1}$  a las 24-36hrs y 36-48 hrs, respectivamente (Mohammed *et al.*, 1986). En el trematodo adulto, se alcanzan concentraciones de ambos metabolitos de  $6.5 \mu\text{g/mL}$  y  $13.9 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, a las 24 hrs del tratamiento (Moreno *et al.*, 2014). Su eficacia contra formas inmaduras y adultas del trematodo ha sido evaluado (Novobilský *et al.*, 2012), a dosis de 10mg/kg en ovinos ha sido efectivo en un 99% (Smeal & Hall, 1983) y en un 99.8% en ovinos y bovinos (Boray *et al.*, 1985). La mezcla de moxidectina con triclabendazol en bovinos ha confirmado su eficacia contra *F. hepatica* (Geurden *et al.*, 2012).

Sin embargo, el uso continuo e indiscriminado de este compuesto también ha ocasionado cepas resistentes de *F. hepatica*, con eficacias bajas de 31.05% y 13.63% lo cual se ha demostrado con la prueba de reducción en el conteo de huevos fecales (ECRT) en ganado lechero (Ortiz *et al.*, 2013). Los reportes de resistencia a esta droga han sido reportado en países, como Argentina (Olaechea *et al.*, 2011), Cajamarca, Perú (Ortiz *et al.*, 2013), y Australia (Brockwell *et al.*, 2014), entre otros. Sin embargo los mecanismos genéticos responsables a la resistencia aún no han sido dilucidados completamente (Hodgkinson *et al.*, 2013).

### **1.7 Repertorio de antígenos de *Fasciola hepatica* durante su desarrollo.**

*F. hepatica* contiene un vasto repertorio de antígenos tanto somáticos como de excreción-secreción (E/S). Las principales proteínas secretadas por larvas infectantes, trematodos inmaduros y parásitos adultos, son reguladas por el desarrollo y se correlacionan con su paso a través de los tejidos y el contacto con macromoléculas del huésped (Robinson *et al.*, 2009). En el parásito adulto la catepsina L1 (FhCL1), es la principal proteasa involucrada en su virulencia, en forma madura tiene un peso molecular de 24.5kDa (Collins *et al.*, 2004), también se ha reportado a la catepsina 2 (FhCL2) y estas representan el 67% y 27% de las proteínas totales en sus productos de excreción-secreción, el resto (6%) lo constituye FhCL5. En los parásitos inmaduros (de 21 días), FhCL1 es la proteasa más abundante, seguido de FhCL2, catepsina B (FhCB), FhCL5, FhCL3 y una endopeptidasa asparaginilo (FhAE). En la larva infectiva se encuentra en mayor cantidad FhCB, seguido de FhCL3, FhCL4 y FhAE. Los parásitos también liberan moléculas antioxidantes, entre ellos: peroxirredoxina, tiorredoxina, proteínas de unión a ácidos grasos (FaBP1, FaBP2, FaBP3 y Fh15) y cinco isoformas de glutatión S-transferasa (GST mu1, GST mu7, GST mu47, GST mu51 y una de la clase sigma), los niveles de expresión de estas moléculas están relacionados con el desarrollo del parásito y sus fases de migración (Robinson *et al.*, 2009; McVeigh *et al.*, 2012).

La expresión de genes de catepsinas Ls se lleva a cabo en las células epiteliales que recubren el intestino del parásito. Estas enzimas son empaquetadas en vesículas secretoras que liberan su contenido en el lumen del intestino. Las catepsinas FhCL1 y FhCL2 tienen mayor actividad y estabilidad en pH neutro, participan en la digestión de sangre y tejidos ingeridos del huésped, los aminoácidos obtenidos son utilizados en el anabolismo de proteínas y la producción de huevos (Dalton *et al.*, 2003). Las catepsinas FhCL2 y FhCL3 tienen la capacidad para escindir el colágeno del huésped (que contiene un motivo de repetición de Gly-Pro-Xaa) mientras que FhCL1 escinde solo en el dominio de no colágenos (no Gly-Pro-Xaa) (McVeigh *et al.*, 2012).

Al ser un parásito helminto con ciclo digénico en sus fases de desarrollo, *F. hepatica* puede compartir antígenos comunes con *F. gigantica* (Yoshihara y Goto, 1993), o presentar moléculas en común con otros helmintos, entre ellos se han identificado 28 proteínas antigénicas comunes entre *F. hepatica* y *Schistosoma mansoni* (Boukli *et al.*, 2011). Otras proteínas identificadas en el parásito adulto son la paramiosina y leucina aminopeptidasa (LAP). La paramiosina, se localiza dentro del músculo subtegumental y en células musculares alrededor del intestino del parásito adulto (Cancela *et al.*, 2004); mientras que LAP, se localiza en células que recubren el epitelio intestinal (Acosta *et al.*, 1998).

En los NEJ, se expresan un conjunto de proteasas de cisteína, diferentes a las del parásito adulto, que ayudan a la degradación del tejido y la inmunoevasión durante la invasión al huésped. Se han identificado dos genes de catepsinas Ls (CL3, CL4) con 69% de identidad en la secuencia de aminoácidos con un posible sitio de N-glicosilación y tres genes de catepsinas B (CB1, CB2, CB3) con un marco de lectura abierta (ORF) de 834pb que codifican para 278 residuos de aminoácidos de la proteinasa, que presentan un 62-66% de identidad en la secuencia de aminoácidos y son ortólogos putativos para tres genes de catepsina B de *F. gigantica* (Cancela *et al.*, 2008). FhCL3 y FhCB representan más del 80% de la actividad total de la peptidasa en la etapa NEJ (McVeigh *et al.*, 2012). Las

proteasas FheCB y FheCL son cruciales para la penetración al intestino, por ello una interferencia con el funcionamiento de cualquiera de estos dos provoca un severo impacto en la virulencia del trematodo (McGonigle *et al.*, 2008). La catepsina B en su forma recombinante (FhCatB1), tiene un peso molecular de 37kDa en forma de pro-enzima y en forma madura de 28kDa y son resistentes a inhibidores de la familia de cistatina de ovinos y humanos (Beckhama *et al.*, 2009). Otras proteasas, además de las catepsinas, han sido identificadas en el parásito, entre ellas las legumainas, calpaínas (cisteínas proteasas dependientes del calcio) y cistatina (inhibidores de las proteinasas) (Cancela *et al.*, 2010).

La catepsina B de los NEJ, tiene un peso molecular de 27kDa y en sus primeros 8 residuos amino terminales, comparte el 100% de identidad con la catepsina B bovina y de rata; 87% de identidad con la de ratón, humano y *Leishmania*; 50% de identidad con catepsina B de *Schistosoma mansoni* y *S. japonicum* y solo 37-50% de identidad con catepsina L de *F. hepatica*. Esta proteasa está relacionada con la invasión del tejido del huésped, evasión inmune (digiere albumina sérica bovina y cadenas pesadas de inmunoglobulinas en ovinos) y facilita el cambio de su glicocalix tegumental (Wilson *et al.*, 1998).

### **1.8 Respuesta inmune e inmunoevasión por *Fasciola hepatica*.**

La infección por *F. hepatica* desencadena una respuesta inmune que, incluye una serie de procesos que conduce a la movilización de diferentes poblaciones celulares en el huésped. Los trematodos juveniles desenquistados en el intestino delgado, penetran en la mucosa intestinal, donde las células presentadoras de antígenos como las células dendríticas y macrófagos endocitan antígenos y estimulan la respuesta inmune local. Se ha visto que durante la migración temprana de NEJs en la cavidad peritoneal de ratas susceptibles, esta ocurre sin incidentes, sin embargo, en el lumen intestinal de ratas resistentes, los trematodos son rápidamente cubiertos por anticuerpos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y mastocitos. Los eosinófilos generan altos niveles de óxido nítrico (NO) y sus productos son degranulados sobre la superficie del trematodo



causándole erosión en su tegumento (Burden *et al.*, 1983; Van Milligen *et al.*, 1999; Jedlina *et al.*, 2011). La muerte de parásitos juveniles en la cavidad peritoneal, se debe a la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, basada en la producción de radicales libres, generados en su mayoría por macrófagos y monocitos (Piedrafita *et al.*, 2000).

En la respuesta inmune humoral por infecciones de *F. hepatica*, el isotipo IgM es la primera inmunoglobulina (Ig) en ser detectada y la IgG1 es dominante durante la infección. Hay una respuesta tipo IgG2 en bovinos (asociada con la protección) mas no en ovinos; también es detectada la IgA con una respuesta bifásica. La expresión temprana de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) sugiere una respuesta Th1/Th0 y cuando se establece la infección cambia a Th2. (Phiri *et al.*, 2006; Flynn *et al.*, 2010). La respuesta humoral en animales vacunados a base de catepsina L, generan altos títulos de IgG1 e IgG2, lo que sugiere que la protección se asocia con la inducción de una respuesta Th1 o una respuesta mixta Th1/Th2 (Dalton *et al.*, 2003).

El éxito de la infección por *F. hepatica* se debe a una serie de proteasas y antioxidantes que produce el parásito, estos últimos son liberados a través de una vía trans-tegumental no clásica. Además, los parásitos producen cambios ultraestructurales en el tegumento y con ello en la constitución proteica que están asociados a la antigenicidad (Lammas *et al.*, 1985). El desprendimiento de la superficie de su tegumento y la renovación de proteínas sintetizadas por las células subtegumentales, propician una inmunidad que no es efectiva (Piedrafita *et al.*, 2010). Entre los antioxidantes están las enzimas GSTs, que han sido localizados utilizando dos antisueros (GST-1 y GST-51) en células del parénquima, tegumento, subtegumento y lámina intestinal en el parásito adulto y lo mismo para juveniles a los que se añaden los conductos excretorios (Creaney *et al.*, 1995). Estas enzimas disminuyen la respuesta proliferativa de células linfoides del bazo y la producción de óxido nítrico por los macrófagos. La peroxirredoxina también juega un papel clave en la inducción de una respuesta inmune Th2 del

huésped a través del reclutamiento y activación alternativa de los macrófagos peritoneales (Robinson *et al.*, 2010). Las enzimas eliminadoras de oxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y glutatión S- transferasa, protegen a los parásitos de las especies reactivas de oxígeno (ROI) y reactivos intermediarios de nitrógeno (RNI), liberados por células inmunes como macrófagos y neutrófilos del huésped (Piedrafita *et al.*, 2000; Piedrafita *et al.*, 2007). El SOD cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (Assady *et al.*, 2011). La acción combinada de las proteínas de unión a ácidos grasos (FaBPs), peroxirredoxina y tiorredoxina, ofrece protección a los trematodos adultos, que residen dentro de los conductos biliares inmunológicamente privilegiados (Robinson *et al.*, 2009).

Las proteasas pueden escindir inmunoglobulinas en la región de la bisagra (separando la región Fab de la Fc) y así prevenir la unión mediada por anticuerpos, de eosinófilos a la superficie del parásito. Además, las catepsinas Ls secretadas por este helminto pueden estar involucradas en la supresión y/o modulación de la respuesta inmune Th1 y la inducción de una respuesta Th2 no protectora (Tkalcevic *et al.*, 1995; Dalton *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la inhibición de las proteasas cistein causa efectos nocivos al parásito (McGonigle *et al.*, 2008). La supresión de la respuesta Th1 por *F. hepatica* ha sido demostrada en ratones infectados simultáneamente con *F. hepatica* y *Bordetella pertussis* (agente causante de la tosferina), en estos se suprimió la respuesta tipo Th1 específica para el patógeno bacteriano (evaluado mediante la medición de IFN- $\gamma$ ). Esta supresión condujo a un retraso en la depuración de la bacteria en los ratones co-infectados, en comparación con ratones infectados solo con *B. pertussis* (Brady *et al.*, 1999).

*F. hepatica* induce un gran número de efectos inmunomoduladores, que incluyen la polarización de neutrófilos en ovinos y humanos, y la inhibición de la generación de radicales libres en los neutrófilos de bovinos (Jedlina *et al.*, 2011). La activación alternativa de los macrófagos durante la infección por helmintos es una piedra angular de la respuesta inmune contra estos organismos, ya que de

ese modo se facilita la diferenciación de células Th2. Los productos de E/S de *F. hepatica* pueden inducir la apoptosis de eosinófilos (Flynn *et al.*, 2010). Al modular la respuesta inmune del huésped hacia un fenotipo anti-inflamatorio, moléculas como las proteasas de catepsina L, peroxiredoxin y catelidicinas de *F. hepatica*, podrían ser utilizadas para el tratamiento profiláctico y terapéutico de desórdenes auto y pro-inflamatorios como choque séptico, rechazo de transplantes y enfermedades autoinmunes (Robinson *et al.*, 2013).

## **2.- Epitopos de *Fasciola hepatica*.**

Los antígenos pueden presentar un gran número de epitopos que pueden ser de estructura única, repetida o variable. Los epitopos, conocidos también como determinantes antigénicos, son reconocidos por receptores de células T y B. Estos epitopos pueden ser mimetizados en su estructura nativa y reciben el nombre de mimotopos, que son capaces de inducir, cuando se utilizan como inmunógenos, anticuerpos con la misma actividad que los producidos por los epitopos de un antígeno nativo (Meloan *et al.*, 2000; Szalai *et al.*, 2008).

A través de transcripción inversa, se aislaron y secuenciaron dos cDNA (pFH22 y pFH64), que codifican para la catepsina L del parásito recién desenquistado, presentando entre sí el 93% de identidad en su secuencia de aminoácidos. La secuencia clonada en el plásmido pFH22 exhibe una identidad del 66 y 67% con las catepsinas L1 y L2 del estado adulto, por lo que se le denominó catepsina L3, pues contiene un motivo con la secuencia ERFNIN, la cual es típica de las proteasas del tipo de las catepsinas (Karrer *et al.*, 1993), en la región comprendida entre los residuos 37-56 y un sitio con potencial de N-glicosilación en la posición 151. La CL3 recombinante fue expresada en *Saccharomyces cerevisiae* obteniendo una proenzima. Posteriormente, se produjeron tres péptidos sintéticos, dos de los cuales contienen epitopos putativos para células B en las regiones N-terminal del propéptido y la porción madura de la catepsina L1 (Cornelissen *et al.*, 2001), determinado por medio del índice de antigenicidad de Jameson y Wolf (1988). Se inmunizaron ratas Wistar, y después

de desafiar a los animales con metacercarias, se obtuvo una reducción significativa del número de parásitos, concluyendo que el propéptido de la catepsina L3 induce inmunidad contra *F. hepatica* (Harmsen *et al.* 2004).

Las moléculas del parásito *F. hepatica* también han sido utilizados como antígenos para el serodiagnóstico, entre ellos la técnica de ELISA, basados en catepsina L recombinante generado por la expresión funcional de cDNA del trematodo adulto de *F. hepatica* en *Saccharomyces cerevisiae* para detectar IgG contra *F. hepatica* en bovinos y ovinos obteniendo una sensibilidad y especificidad del 99.1% y 100%, respectivamente (Cornelissen *et al.*, 2001), así como el uso de los productos de excreción-secreción de *F. hepatica* para la detección de IgG en suero de humanos, obteniéndose un 95.3% y 95.7% de sensibilidad y especificidad, respectivamente (Valero *et al.*, 2012). La proteína FhSAP2 utilizada en el serodiagnóstico, muestra un 100% de sensibilidad y 95.6% de especificidad comparado con ELISA indirecto utilizando antígenos de excreción-secreción con el 91.1% (Figueroa *et al.*, 2011).

Adicionalmente, se han sintetizado dos péptidos de las regiones antigénicas de catepsina L para el serodiagnóstico de *F. gigantica* a través de ELISA para detectar IgG en humanos: el primer péptido derivado de los aminoácidos 110-129 del dominio catalítico de Catepsina L1 de *F. hepatica* (Wijffels *et al.*, 1994) (con número de acceso en el GenBank L33771), de Catepsina L1-B de *F. gigantica* (Grams *et al.*, 2001) (con número de acceso a GenBank AF239264 ) o de los aminoácidos del 3-22 de Catepsina L1-E de *F. gigantica* (Grams *et al.*, 2001) (con número de acceso a GenBank AF239267). Estos fueron sintetizados con una carboxiamida en la región C-terminal y acetilo en el extremo N-terminal: acetilo-DKIDWRESGYVTEVKDQGNC-carboxiamida (péptido V). El otro péptido, derivado de los aminoácidos 110-129 del dominio catalítico de Catepsina L1 de *F. gigantica* (Grams *et al.*, 2001), (con número de acceso a GenBank AF112566) fue sintetizado como una carboxiamida en la región C-terminal y acetilo en la N-terminal: acetilo-DKIDWRESGYVTEVKDQGNC-carboxiamida (péptido L). La valina

en la posición 14 del péptido V fue substituido con leucina en la secuencia del péptido L. El valor diagnóstico de estos dos fue comparado con ELISA utilizando antígeno E/S crudo y antígeno FG27 de *F. gigantica*, mostrando 97.3% de especificidad y 100% de sensibilidad para los péptidos L y V (Intapan *et al.* 2005).

Por otra parte, se identificaron y construyeron dos diferentes epitopos de células T derivados de la proteína recombinante Fh15 de FABP: Fh15Ta (12 aminoácidos, secuencia aminoacídica IKMVSSLKTKIT) y Fh15Tb (10 aminoácidos, secuencia aminoacídica VKAVTTLLKA), basados en la secuencia lineal de Fh15 (GenBank M95291) y la secuencia universal para epitopos de células T. Con estos dos epitopos adicionados con el adyuvante completo de Freud, la protección obtenida en conejos fue del 13%. Sin embargo, al fusionarlo con GST (GST- Fh15Ta y GST- Fh15Tb) combinado con el sistema ADAD<sup>1</sup>, los porcentajes de protección en conejos fue de 48.2% y 59.1%. En ratones CD1 y BALB/c la protección fue de 43 y 40%. Los niveles de protección se relacionaron a una respuesta Th1, donde los niveles de IgG2a anti-FhES son elevados en animales vacunados con GST-Fh15Ta (Muro *et al.*, 2007).

El reconocimiento de epitopos de moléculas de *F. hepatica*, tanto de excreción-secreción como los de su tegumento, ha contribuido al desarrollo de candidatos vacunales. En una primera instancia se observó que después de la irradiación gama con 3,10 y 40 krad en metacercarias de *F. hepatica*, la expresión de azúcares específicos a concavalina A, disminuyeron en la superficie de las adolescarias y la expresión de azúcares específicos a la aglutinina de germen de trigo, aumentaron en el intestino y se redujeron en la superficie de la adolescaria. Así mismo, hubo una reducción significativa en la expresión de catepsina B tisular y en la actividad proteolítica de las excreciones/secreciones (Creaney *et al.*, 1996).

---

<sup>1</sup> ADAD: Incluye saponinas de *Quillaja saponaria* (Qs), Extracto de alcohol de helecho *Polypodium leucotomos* (PAL) y el antígeno en emulsión con aceite no mineral (Montanide).

Se observó una reducción del 40% en la carga parasitaria en conejos inmunizados con la proteína nativa nFh12, comparado con conejos inmunizados con la proteína recombinante rFh15, que indujo una menor protección (17%) al ser infectados cuatro semanas después de la segunda inmunización. Esto sugiere que las moléculas pueden tener diferencias menores entre sí, de tal forma que los epitopos de la proteína nativa que son reconocidas, no están presentes en la proteína recombinante. Además, los conejos vacunados desarrollaron parásitos más pequeños y tuvieron menos lesiones en hígado que los conejos testigo (Muro *et al.*, 1997). Al ampliar el periodo de desafío a las 12 y 20 semanas después de la segunda inmunización se obtuvieron 43% y 76% de reducción en la carga parasitaria utilizando la proteína recombinante (rFh15) (Casanueva *et al.*, 2001). En ovinos vacunados con rFh15 junto con un sistema ADAD, se obtuvo una reducción del 43% del total de trematodos recuperados (López *et al.*, 2007).

En bovinos vacunados con una combinación de catepsina L1/L2 se observó una reducción del 75% en la eliminación de huevos, así como reducciones en su viabilidad comparado con el grupo testigo. Además se observó una reducción del 55% de la carga parasitaria (Mulcahy *et al.*, 1999). En ovejas inmunizadas con FhCL1 y FhCL2 se obtienen niveles de protección de 33 y 34%, así como una reducción en el número de huevos en heces de 71% y 81%, respectivamente. En una segunda prueba, FhCL1 y FhCL2 indujeron una reducción de 60% en la carga parasitaria; pero cuando se combinaron con leucina aminopeptidasa (LAP) se incrementó hasta el 79%. Sin embargo, cuando se vacunó solo con LAP, se observaron niveles de protección del 89.6% (Piacenza *et al.*, 1999).

Se ha utilizado cisteína proteasas recombinantes de catepsina L1 (CPFhW) expresada en forma de cuerpos de inclusión en *E. coli* para vacunación enteral en ratas contra *F. hepatica* obteniendo una protección del 78-80% contra el desafío, junto con un aumento de CD4 y CD8 en ratas vacunadas comparado con los no vacunados. (Kesik *et al.*, 2007). Se han utilizado tres proteasas (Catepsina L5, Catepsina L1g y Catepsina B) expresadas en levaduras a partir de clonas de

cDNA del trematodo adulto, metacercaria y trematodos juveniles respectivamente, fueron utilizadas en forma simple o en combinación para vacunación en ratas, obteniendo un 83% de protección utilizando la combinación Cat B/L5 comparado con el grupo control. (Jayaraj *et al.*, 2009).

Recientemente la proteína FhSAP2 miembro de la familia de proteínas hepáticas saposinas de *F. hepatica* ha sido utilizada en la vacunación de conejos, obteniéndose un 83% de reducción en el conteo de trematodos, comparado con conejos testigos no vacunados (Espino *et al.*, 2010).

Las vacunas empleadas en animales desempeñan un rol importante en el control de enfermedades. En el caso de *F. hepatica*, el desarrollo de una vacuna eficaz, podría proteger a los animales de otros trematodos como *F. gigantica* y *S. mansoni* (McManus *et al.*, 2006). Pocas vacunas han sido desarrolladas con éxito contra parásitos de importancia veterinaria, entre ellos los gusanos pulmonares en bovinos basado en la irradiación de larva 3 (L3) de *Dictyocaulus viviparus*, en ovinos contra *Dictyocaulus filaria*, en caninos la irradiación de L3 de *Ancylostoma caninum* ha protegido a los perros (Hein y Harrison, 2005); también se han utilizado antígenos recombinantes como vacuna contra *Taenia ovis* (Dalton *et al.*, 2003).

Para el desarrollo de una vacuna contra *F. hepatica*, es necesario la identificación y caracterización de moléculas claves para su desarrollo, que sean inmunodominantes pero también inmunopotentes, así como también se requiere de una tecnología capaz de obtener grandes cantidades de inmunógenos para su uso en animales de producción.

### **3.- Tecnología de despliegue en fagos**

El despliegue de péptidos y proteínas en fagos filamentosos o “*phage display*” es una técnica de selección *in vitro* que permite la identificación y selección de polipéptidos útiles en diversos campos (Ullman *et al.*, 2011), donde un gen de interés es fusionado al gen que codifica para la proteína de cubierta del

fago, resultando en partículas fágicas que expresan proteínas y contienen su gen, proporcionando así una conexión directa entre el fenotipo y genotipo (Smith, 1985; Griffiths y Duncan 1998).

Las clonas de fagos de interés se identifican por un proceso conocido como “*biopanning*”, que consiste en la incubación de una diana inmovilizada (por ejemplo IgG), en una superficie a la que se agregan las partículas fágicas que expresan de forma aleatoria secuencias de péptidos en su superficie. Luego tras varias rondas de selección, los péptidos no unidos son lavados y los que se unen a una diana de interés son eluidos por cambios de pH, amplificadas y caracterizadas por secuenciación y ELISA, lo que garantiza clonas con alta afinidad y avidéz (Ellis *et al.*, 2012).

### **3.1 Introducción a la tecnología de despliegue en fagos.**

#### **3.1.1 El bacteriófago filamentoso.**

Los bacteriófagos filamentosos del género *Inovirus*, infectan una variedad de bacterias gram negativas. Algunos de los bacteriófagos más estudiados que infectan *E. coli* son el f1, fd, M13 y en menor medida IKe, los tres primeros tienen una identidad del 98% de su genoma y son llamados colectivamente fagos Ff (Russel *et al.*, 2004).

#### **3.1.2 Estructura del bacteriófago filamentoso.**

El tamaño del fago filamentoso M13 es de 930nm de longitud y 6.5 nm de diámetro. Tiene un genoma circular, de ADN de cadena simple (ssDNA) con aproximadamente 6400 nucleótidos que contienen 9 genes encapsulados en una cápside en forma de tubo hueco y que son rodeados por miles de copias de la proteína 8 (gen pVIII, pVIII) de 50 residuos. El extremo romo del fago contiene de 3-5 copias de las proteínas más pequeñas pVII y pIX, de 33 y 32 residuos respectivamente. En el extremo carboxilo terminal se encuentran las proteínas 3 (gen III, pIII) de 406 residuos y 6 (gen VI, pVI) con 112 residuos. La proteína III contiene tres dominios N1, N2 y CT (señalados como N a C terminal) separados



por secuencias repetidas ricas en glicina necesarios para la infección de *E. coli*. El dominio N1 tiene 68 aminoácidos, N2 de 87 a 217 y CT de 150 aminoácidos (Henry y Pratt, 1968; Russel *et al.*, 2004).

### **3.1.3 Ciclo infectivo del bacteriófago filamentoso.**

Los fagos filamentosos son producidos y secretados por bacterias infectadas, sin provocarles la muerte celular o lisis (lisogenia). La infección se inicia cuando el dominio N2 de la proteína pIII se une al extremo del pilus conjugativo F de la bacteria *E. coli*, así el dominio N1 es liberado de N2 y se une con la proteína TolA del huésped. De este modo, el proceso de infección conforma el modelo clásico que involucra un receptor (pilus F) y un co-receptor (TolA) (Riechmann y Holliger *et al.*, 1997; Karlsson *et al.*, 2003). También se ha reportado que tres proteínas de membrana citoplasmáticas de la bacteria Tol (Q, R y A), median la despolimerización de las proteínas de cubierta del fago, dentro de la membrana citoplasmática y la translocación del ADN viral dentro del citoplasma bacteriano (Russel *et al.*, 2004).

A la entrada del ADN circular de cadena sencilla (+) en el citoplasma del huésped, la cadena complementaria (-) es sintetizado por las enzimas de la bacteria, dando como resultado, una molécula de doble cadena que recibe el nombre de forma replicativa (FR) que sirve como plantilla para la expresión de genes del fago. A través del mecanismo de círculo rodante "*Rolling circle*" se genera una nueva cadena viral, con la ayuda de enzimas bacterianas y donde pII corta la hebra + de la FR en un sitio específico de la región IG no codificante del genoma del fago y el extremo 3' es alargado por la ADN polimerasa III del huésped, usando la hebra - como plantilla. Cuando la nueva hebra + es sintetizada, ésta es recircularizada por la actividad de corte y cierre de la pII y nuevamente convertida a FR. En la fase temprana de la infección, la concentración de la proteína ssDNA vinculante de fago pV es bajo, cuando FR y proteínas del fago se incrementan exponencialmente, pV se une a la cadena

sencilla recién sintetizada, previniendo así el acceso a la polimerasa y bloqueando la conversión a FR (Rakonjac *et al.*, 2011).

De las once proteínas codificadas por el fago, tres (pII, pX, pV) se requieren para generar ssDNA, tres (pI, pXI, pIV) para el ensamblaje del fago y cinco (pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX) son componentes de la partícula del fago, todas son sintetizados de manera simultánea. El inicio del ensamble de las partículas fágicas sucede en la extremidad roma con las proteínas pVII y pIX y termina en el extremo CT de la pIII en sus últimos 132 residuos, para finalizar con el ensamblaje y liberación del fago de la célula. Las ocho proteínas codificadas por el fago están directamente involucradas en el ensamblaje, tres proteínas morfogenicas pI, pXI y pIV (que interactúan a través de sus dominios periplasmáticos, N-terminal para pIV y C-terminal para pI y pXI) forman un canal para la salida de la partícula y cinco proteínas virales de cubierta que residen en la membrana citoplasmática previo a su incorporación dentro del fago. La orientación y encapsidación eficiente del genoma del fago en su interior, es determinado por la señal de empaquetamiento (PS) localizado en una región no codificante, en la región intergénica (IG) de su genoma (Russel *et al.*, 2004; Rakonjac *et al.*, 2011).

La mayoría de los vectores utilizados en la tecnología del *phage display* usan la región N-terminal de la pIII para desplegar el péptido o proteína foránea. Las bibliotecas de pIII despliegan de 3 a 5 copias de cada péptido individual y en bibliotecas que utilizan pVIII, pueden desplegar hasta 2800 copias (Kishchenko *et al.*, 1994). Sin embargo, es posible la utilización de las 5 proteínas de la cápside, para el despliegue de péptidos y proteínas en mayor o menor grado (Sidhu 2000; Russel *et al.*, 2004). Es posible el despliegue de dos diferentes péptidos de forma simultánea, esto se logra al portar dos copias del gen VIII: el gen VIII natural y el gen VIII modificado, bajo el control del promotor *tac* en la región intergénica, que dan resistencia a la ampicilina y tetraciclina, respectivamente (Malik y Perham, 1997). Los formatos en que sean sintetizados los péptidos, pueden variar su antigenicidad (Aguilar *et al.*, 2013).

### 3.1.4 Biblioteca de péptidos aleatorios expresados en fagos.

El principio básico de una biblioteca de péptidos, es proporcionar un gran número de péptidos de los que una clona con un carácter particular de interés se puede seleccionar, los fagos muestran las secuencias de péptidos en su superficie (Barbas, 1993).

El desarrollo de bibliotecas de anticuerpos, permite la selección de anticuerpos de alta afinidad contra una diana de interés con potencial terapéutico o diagnóstico (Rader y Barbas, 1997; Kretzschmar y Rüden, 2002). Los anticuerpos se despliegan como fragmentos de anticuerpos de una sola cadena en la región variable (scFv) o fragmentos Fab que se exponen en la superficie de fagos filamentosos fusionados ya sea con el producto del gen VIII o gen III. La fuente de los anticuerpos puede ser de donantes inmunes y/o no inmunes (Griffiths y Duncan, 1998).

El sistema de presentación en fagos de las bibliotecas Ph.D. 12<sup>TM</sup> y Ph.D. 7<sup>TM</sup> de *New England BioLabs*, se basa en el bacteriófago filamentosos M13KE que expone aleatoriamente péptidos de 12 y 7 aminoácidos en la región N-terminal fusionado con la proteína III (pIII) y son pentavalente. El M13KE es un derivado de M13mp19, tiene 7222 pb y ha sido diseñado para la expresión de péptidos como fusiones N-terminales de la pIII en aplicaciones de despliegue en fagos. En el M13mp19, los sitios *Acc65I/KpnI* y *EagI* se han introducido y flanquean el sitio de escisión para la peptidasa líder de pIII y el sitio *Acc65I/KpnI* en el sitio de clonación múltiple (MCS) fue eliminado. En la biblioteca de fagos se despliegan péptidos al azar que se construyeron mediante hibridación de un cebador de extensión a un oligonucleótido sintético que codifica la biblioteca de péptidos al azar y una porción de la secuencia líder pIII, se extiende con ADN polimerasa y digiriendo con *Acc65I* y *EagI*. El dúplex escindido resultante se inserta en M13KE que ha sido digerido con las mismas enzimas (Noren y Noren, 2001). La secuencia completa de nucleótidos del M13KE ha sido determinada por *New England BioLabs* ([www.neb.com](http://www.neb.com))

Este sistema ha sido utilizado en varias aplicaciones, entre ellos: la identificación de ligandos peptídicos que se unen específicamente a células endoteliales de crecimiento externo para enfoques de revascularización para enfermedades isquémicas o daños endoteliales (Veleva *et al.*, 2007), el descubrimiento de péptidos como posibles agentes terapéuticos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (Welch *et al.*, 2007), la identificación de nuevas dianas contra *Entamoeba histolytica* (Lavi *et al.*, 2008) para el desarrollo de quimioterapéuticos o vacunas, la identificación de péptidos de sulfato anti-heparan para el bloqueo ocular del herpes simple (Tiwari *et al.*, 2011), etc.

#### **4.- Aplicaciones de la tecnología de despliegue en fagos.**

La tecnología de *phage display* se ha convertido en una herramienta poderosa para estudiar el reconocimiento y la interacción entre las moléculas proteína-proteína y proteínas con otras biomoléculas (Cen *et al.*, 2006), el estudio de las interacciones entre proteínas y ADN (Choo y Klug, 1995), la identificación de epítopos conformacionales como candidatos a vacunas en nematodos (Ellis *et al.*, 2012) y el descubrimiento de fármacos (Sidhu, 2000), etc.

La construcción de bibliotecas y la implementación de esquemas de selección han llevado a la identificación de péptidos que simulan epítopos complejos, conocidos como mimotopos, capaces de reproducir las propiedades antigénicas e inmunogénicas de antígenos naturales, con esto es posible el desarrollo de vacunas que ofrezcan protección contra algún agente patógeno (Cortese *et al.*, 1995).

Los mimotopos son pequeños péptidos que imitan estructuralmente a epítopos reconocidos por anticuerpos. La inmunización activa con estos mimotopos induce anticuerpos que reconocen al epítopo imitado. Li *et al.*, (2013) utilizaron el despliegue de fagos para generar mimotopos del anticuerpo monoclonal Avastin, este anticuerpo reacciona directamente contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que es un potente factor angiogénico,

como resultado se obtuvo el péptido DHTLYTPYHTHP o 12P que mostró una alta afinidad a Avastin y fueron capaces de provocar anticuerpos específicos anti-VEGF al inmunizar ratones.

Con esta herramienta ha sido posible obtener péptidos que mimetizan epitopos (mimotopos) de catepsina L de *F. hepatica*. Entre ellos, se utilizó un fago M13 de una biblioteca de péptidos que expresan 12-mer al azar, que posteriormente fue probado en veinte ovinos conformados en cuatro grupos de cinco animales cada uno. Los animales se inmunizaron con  $1 \times 10^{14}$  partículas de fago de las clonas 1, 20, una mezcla de siete clonas y un grupo testigo al cual solo se le administró PBS. El promedio de reducción de la carga parasitaria fue de 47.61% y 33.91% para la clonas 1 y 20, una reducción en el conteo de huevos en heces (FEC) de 25.85% y 45.55% así como una disminución en la viabilidad de huevos de *F. hepatica* de 58.92% y 82.11% para la clona 1 y 20 respectivamente (Villa *et al.*, 2008).

Para evaluar la reducción de la actividad proteolítica de *F. hepatica* con la administración de mimotopos de catepsina L, se inmunizaron ratones BALB/c con  $2.5 \times 10^{11}$  partículas fágicas en tres ocasiones de las clonas 1 y 20, dando como resultado 66.67% y 45.83% de reducción en la carga parasitaria, respectivamente, así como una disminución de la proteólisis causada por catepsinas del trematodo hepático. (Villa *et al.* 2011).

Con la herramienta de *phage display* fue posible la recuperación de polipéptidos ectogénicos del tegumento de *S. japonicum* (MppZL4) con potencial para inhibir procesos de crecimiento y desarrollo, mismo que al probarlo en ratones produjo una reducción de la carga parasitaria del 25.8% y el porcentaje de reducción en número de huevos por gramo de tejido hepático fue de 59.24% (Liu *et al.*, 2011).

En otro experimento realizado por Villa & Méndez (2012), inmunizaron ovinos con mimótopos de catepsina L de *F. hepatica*, el grupo 1 se inmunizó con

YVYRWVEAECVA, al grupo 2 con FSPAYLRDAALK, el grupo 3 fue con el fago M13KE y un grupo control inyectándole PBS estéril, obteniendo una reducción en la carga parasitaria de 51.7% y 35.9% junto con un 29.7% y 45.7% de reducción en el conteo de huevos fecales para el grupo 1 y 2 respectivamente al compararlo con el grupo control. El peso húmedo por los trematodos fue significativamente bajo para G1 (P=0.0001) y G2 (P=0.003), con una reducción de la biomasa total del parásito del 44.2% observado en el G1. Dentro de los niveles de IgG1, IgG2 e IgG, resultó más alta la IgG.

Recientemente se ha reportado reducciones en cargas parasitarias de 46.91% y 79.53% con una reducción en el número de huevos en heces de 57.09% y 84.41% al vacunar caprinos con partículas fágicas de  $1 \times 10^{14}$  de mimotopos de catepsina L de *F. hepatica* (Villa *et al.*, 2013).

Con esta tecnología ha sido posible el desarrollo de anticuerpos murinos contra el parásito intracelular *Neospora caninum* con fines de diagnóstico (Dong *et al.*, 2013). También se ha utilizado en la construcción y caracterización de fragmentos de anticuerpos de una sola cadena en la región variable (scFv) contra la proteína MIC2 (proteína de gran importancia para el inicio del proceso de invasión) de *Toxoplasma gondii* con la finalidad es inhibir el papel de esa proteína (Hoe *et al.*, 2005).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fasciolosis causada por *Fasciola hepatica* es un problema de salud en animales de producción provocando pérdidas económicas en ganado bovino y ovino y actualmente es una enfermedad emergente en humanos. A pesar de que existen drogas eficaces, la resistencia a algunos quimioterapéuticos como el triclabendazol ha sido reportada. Debido a que este parásito contiene un repertorio de moléculas, que le ayudan a evadir y protegerse del sistema inmune del huésped, varias de sus moléculas sobre todo de la fase adulta, han sido probadas como candidatos vacunales. Sin embargo, las moléculas de la fase juvenil no han sido exploradas totalmente, esto en parte debido a la dificultad de obtener material suficiente y/o de identificar blancos importantes en la interacción huésped-parásito. La tecnología de despliegue en fagos es una poderosa herramienta que permite seleccionar péptidos y proteínas, incluyendo anticuerpos, con alta afinidad y especificidad a casi cualquier blanco molecular de interés, con esta tecnología es posible conocer sitios de unión de ligando que son difíciles de identificar. La identificación de blancos de interés con anticuerpos, permite la selección de mimotopos capaces de inducir, cuando se utilizan como vacuna, los anticuerpos con la misma actividad que las provocadas por los epitopos de un antígeno natural. Por tal razón se utilizó la tecnología de despliegue en fagos, con la finalidad de seleccionar clonas conteniendo epitopos inmunodominantes de la fase juvenil de *Fasciola hepatica* para su posterior uso como candidatos vacunales.

## HIPÓTESIS.

El uso de anticuerpos contra la fase juvenil de *F. hepatica* permite obtener mimotopos a partir de una biblioteca combinatoria de despliegue en bacteriófagos como candidatos a inmunógenos.

## OBJETIVOS

### Objetivo general.

Seleccionar y caracterizar clonas de epitopos inmunodominantes de adolesecarias de *Fasciola hepatica* mediante la tecnología de despliegue en fagos.

### Objetivos específicos.

- Obtener metacercarias de *F. hepatica* a partir de la infección de caracoles *L. humilis*.
- Obtener antígenos de parásitos juveniles recién desenquistados.
- Obtener anticuerpos específicos contra fases juveniles de *Fasciola hepatica* a través de infección restringida en conejos.
- Caracterizar anticuerpos obtenidos de conejos inmunizados con metacercarias de *Fasciola hepatica* a través de ELISA Indirecto.
- Tamizar una biblioteca combinatoria de *Phage Display* con anticuerpos contra adolesecarias.
- Caracterización de clonas a través de ELISA Indirecto.



## MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1.- Obtención de metacercarias de *Fasciola hepatica* a partir de la infección de *Lymnaea humilis*.

#### 1.1 Técnica de cultivo de caracol.

Se utilizaron caracoles *L. humilis* del laboratorio de Malacología del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Los caracoles se mantuvieron en cajas petri de 14 cm de diámetro y con 1 cm de grosor de tierra simulando su hábitat natural, que consiste en tierra fina enriquecida con carbonato de calcio 7.35 g/kg. Las cajas con el sustrato se colocaron en un lugar con iluminación natural constante y con un rango de temperatura de 15-25°C. A partir de caracoles adultos previamente cultivados y por medio de la técnica de crianza descrita por Cruz (2006), se recolectaron masas ovíferas y se colocaron en cajas petri de 4 cm de diámetro con agua aireada (pH 7.2). Dichas cajas se limpiaron cada tercer día hasta la eclosión de los caracoles (10-16 días). Posteriormente, se sembraron en el medio de cultivo previamente descrito y se les dio alimento comercial para peces (Tetramin®). Se mantuvieron en cultivo a una temperatura de 15-27°C, humedad relativa de 50-70% y pH de 7.2-7.8 hasta su utilización.

#### 1.2 Obtención de miracidios de *F. hepatica*.

Se recolectaron hígados de bovinos infectados con *F. hepatica* en los rastros de Atlixco, Puebla y Toluca del Estado de México. Los parásitos adultos fueron incubados a 37°C toda la noche para la obtención de productos de excreción-secreción de acuerdo al método descrito por Villa *et al.*, (2008). Los productos E/S se utilizaron en ELISA Indirecto para evaluar la respuesta inmune humoral de los conejos. Al contenido de las vesículas biliares se les aplicó la técnica de sedimentación para obtener huevos no embrionados del trematodo. Para su embrionación, los huevos se colocaron en vasos de precipitados de 100 ml cubiertos con papel oscuro y se incubaron a 26°C durante 14-16 días en una estufa de cultivo. Transcurrido ese tiempo, se observaron en un microscopio

estereoscópico a 10x para verificar su embrionación. Para la eclosión fueron expuestos a la luz con focos de 100 watts a una distancia de 30 cm por 3-5 minutos, de acuerdo con Cruz (2006).

### **1.3 Infección con miracidios y liberación de cercarias de *F. hepatica* en caracoles.**

Los caracoles juveniles de 3 mm de longitud y edad de entre 3-4 semanas, fueron infectados con aproximadamente tres miracidios de *F. hepatica*. Éstos fueron puestos en pozos de placas de ELISA por 4 horas para llevarse a cabo la infección, al término de este periodo, se revisaron para corroborar la infección del molusco y se regresaron a sus respectivos medios de cultivo. Transcurrido 35-45 días post-infección del molusco, se colocaron cada uno en bolsas de polietileno dentro de un vaso de precipitado con 80 ml de agua aereada y se sometieron a cambios de temperatura, que consistió en: colocarlos en refrigeración a 4°C por 15 a 20 minutos, luego se colocaron bajo un foco de 100 watts a 35 cm de distancia por 24 horas (Cruz, 2006). Estas condiciones se repitieron una vez por semana durante 8 semanas. Las cercarias liberadas, se enquistaron y quedaron adheridas en la bolsa de plástico, convirtiéndose en la fase de metacercaria. Estas se dejaron reposar durante 24-48 horas en la bolsa de nylon, para que maduraran adecuadamente. Se realizó un conteo y se guardaron en la misma bolsa de plástico a la que se agregó agua destilada hasta el tope de su capacidad, se sellaron y almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su uso.

## **2.- Desenquistamiento de metacercarias y obtención de antígeno somático de *Fasciola hepatica*.**

La técnica de desenquistamiento fue realizado de acuerdo a Munguía (2009) con algunas modificaciones. Para ello, las metacercarias almacenadas a 4°C, se incubaron en agua destilada a temperatura ambiente toda la noche. Posteriormente fueron removidas cuidadosamente de la pared de bolsas de polietileno donde estaban enquistadas. Luego, se colocaron en agua destilada para su conteo y la eliminación de las no viables. A continuación se colocaron en un tubo, conteniendo un medio de activación (0.040 gr de ditionato de sodio en 10

ml de agua destilada), se aplicó CO<sub>2</sub> al tubo por 3 minutos y se incubaron a 37°C por 1 hora. Luego se realizaron dos lavados con 20 ml de agua destilada a 37°C cada uno y al final fueron colocadas en medio de emergencia, compuesto por 4.5ml de solución de Hank's (HBSS) amortiguada a pH 7.4 con 30mM hepes (4-(2 Hydroxy ethyl 1-piperacina etano ácido sulfónico) y 0.5 ml de bilis de bovino e incubados a 37°C por 2 horas. Las proteínas somáticas de los NEJ, fueron obtenidas de acuerdo al método descrito por Hernández *et al.*, (2010), los NEJs fueron homogeneizados en buffer RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, con 150 mM cloruro de sodio, 1.0% IGEPAL CA-630 (NP-40), 0.5% deoxicolato de sodio y 0.1% SDS), luego se colocaron en hielo seco por 30 minutos, posteriormente se centrifugaron a 145576.6 xg durante 10 minutos. El sobrenadante fue almacenado a -20°C hasta su uso. Éste extracto somático fue utilizado para la caracterización de los sueros obtenidos de conejos inoculados con metacercarias a través de ELISA Indirecto.

### **3.- Producción de anticuerpos contra adolescencia de *Fasciola hepatica* en conejos.**

Se utilizaron 10 conejos machos adultos raza Nueva Zelanda libres de fasciolosis. Para asegurar que todos los conejos estuvieran libres de *F. hepatica* se tomaron muestras de sangre para obtener suero y realizar la técnica de ELISA Indirecto, para muestras fecales se les realizó la técnica de sedimentación, antes de comenzar el experimento. Se conformaron cinco grupos, cada uno con dos conejos, los cuales se infectaron con 30 metacercarias de *F. hepatica*, una vez, grupo 1 (G1); dos veces, grupo 2 (G2); tres veces, grupo 3 (G3), con un intervalo de veinte días entre infección. Adicionalmente, se utilizó un grupo testigo positivo a *F. hepatica* adulta, grupo 4 (G4) y un grupo negativo sin inoculación, grupo 5 (G5). Con la finalidad de detener el crecimiento del parásito a los 15 días post-infección y exponer sus antígenos ante el sistema inmunitario del conejo, estos fueron tratados con triclabendazol, una vez al G1, dos veces al G2 y tres veces al G3, en dosis de 12 mg/kg. Se obtuvieron muestras de sangre cada quince días hasta el

final del experimento y muestras fecales fueron obtenidas a partir de la semana ocho post-infección del G4 (testigo positivo). Al final del experimento todos los conejos, fueron sacrificados humanitariamente y se sangraron en blanco, para la obtención de inmunoglobulina G.

#### **4.- Purificación y cuantificación de inmunoglobulinas (IgG) anti-adolescarias de *Fasciola hepatica*.**

Para la purificación de anticuerpos anti-adolescarias de *F. hepatica* se utilizó el sistema de inmunoprecipitación, de acuerdo a las instrucciones del fabricante<sup>2</sup>. Este sistema consiste en perlas magnéticas unidas de forma covalente a la proteína G. Cada tubo eppendorf contenía 50 µL de perlas, éstas fueron lavados en PBS-Tween al 0.01% por 3 ocasiones, con intervalo de 2 minutos. Se adicionaron 100 µL de sueros seleccionados a las perlas lavadas y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se colocaron en un magneto por 2 minutos y se desechó el sobrenadante, se agregaron 500µL de PBS agitando los tubos por 2 ocasiones, los tubos se colocaron en el magneto por 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 30 µL de citrato 0.1M (pH 3) que se mezcló por basculante y rotación por 2 minutos. Posteriormente, el tubo se colocó en el magneto por 1 minuto y se transfirió el sobrenadante conteniendo IgG purificadas en un tubo nuevo, se hizo por 2 ocasiones para tener un volumen final de 60 µL. Finalmente se agregó TRIS al 0.1M pH 8.5 a una relación de 1:1.3.

También se utilizó un sistema compacto de cromatografía líquida diseñada para la purificación de proteínas en un solo paso (AKTAprime plus<sup>3</sup>), en el que se utiliza un software que permite controlar, evaluar y generar informes en tiempo real en un ordenador externo. Para la purificación de IgG de conejos anti-adolescarias de *F. hepatica*, fue utilizado el equipo con una columna de sefarosa con la proteína G. Se utilizó como buffer de unión 20mM fosfato de sodio a pH 7.0 y buffer de elución 0.1M de glicina-HCl pH 2.7. Las fracciones detectadas como IgG

---

<sup>2</sup> Dynal Invitrogen

<sup>3</sup> GE Healthcare

fueron recolectadas en tubos eppendorf de 1.5mL conteniendo 200µL de Tris-HCl pH 9.0, las muestras purificadas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso. La cuantificación de las IgG fue realizado a través un espectrofotómetro y método de Bradford (Bradford 1976).

#### **5.- Análisis de la respuesta inmune humoral contra productos de E/S de *Fasciola hepatica* adulta y reactividad de IgG anti-adolescaria por ELISA Indirecto.**

Se colectaron muestras de sangre de todos los conejos previo a su inoculación y posteriormente cada dos semana hasta el final del experimento. La técnica fue realizada de acuerdo a Villa *et al.*, (2008). Para ello, se sensibilizaron placas de 96 pozos, utilizando 100 µl/pozo con 1 µg de productos de E/S en amortiguador de carbonatos 0.1 M (pH 9.6). Posterior a la incubación toda la noche a 4°C, las placas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con 200 µl de PBS conteniendo Tween-20 al 0.05% y bloqueada con 200 µl por pozo de una solución conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS-Tween 20 al 0.05% por 30 minutos a 37°C. Después del bloqueo y lavado, fueron adicionados 1 µl de suero anti-adolescaria de *F. hepatica* en 100 µl de PBS-Tween 20 al 0.03% en cada pozo e incubados por 1 hora a 37°C. La placa fue lavada de nuevo como previamente fue descrita e incubada con 100 µl/pozo del anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-conejo, conjugada con peroxidasa de rábano), a una dilución de 1:2000 en PBS-Tween por 1.5 horas a 37°C, Posteriormente se adicionó 100 µl/pozo del substrato TMB en amortiguador citratos al 0.1M a pH 5.6, 4 µl/ml de peróxido de hidrógeno (30%, w/v) e incubado en un lugar oscuro a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se adicionó 50 µl por pozo de ácido sulfúrico 1M para detener la reacción. La absorbancia fue medida a 605 nm en un lector de ELISA (Beckman Coulter DTX 880).

Para la reactividad de IgGs anti-NEJs, el procedimiento fue similar, brevemente: Los pozos de una placa de ELISA se sensibilizaron con el extracto somático obtenido de NEJs de *F. hepatica* en 100 µl/pozo en amortiguador de carbonatos 0.1 M (pH9.6). Se adicionaron los anticuerpos primarios del grupo 2

(conejos 7 y 8) y grupo 3 (conejos 2 y 4) a una concentración de 2µg/pozo en 100 µl de PBS-Tween 20 al 0.03%. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo a una dilución 1:2500. Debido a la poca cantidad de antígeno obtenido, se realizó una sola medición en las lecturas para la obtención de los niveles de absorbancia.

## **6.- Selección de péptidos de una biblioteca de exposición en fago “*Phage display*”**

Se utilizaron dos bibliotecas combinatorias comerciales<sup>4</sup>, con fagos filamentosos M13 que exponen aleatoriamente péptidos de 12 y 7 aminoácidos en la región N-terminal fusionadas con la proteína III. Estas bibliotecas consisten en  $2.7 \times 10^9$  secuencias electroforadas y con un título de  $1.5 \times 10^{13}$  ufc/ml.

La biblioteca de fagos fue sometida a selección por afinidad como se describe en los sistemas. Los péptidos fueron seleccionados con un anticuerpo anti-adolescencia de *F. hepatica*. En la primera ronda de selección o *panning*, los pozos de una placa de ELISA, fueron cubiertos con 15 µg/pozo del anticuerpo policlonal anti-adolescencia en 100 µl/pozo de PBS e incubados toda la noche a 4°C en agitación. Luego se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween al 0.1% en un volumen de 200 µl cada uno, con intervalo de 2 minutos por lavado en campana de flujo laminar. Posteriormente, los pozos fueron bloqueados con PBS/BSA al 1% en un volumen de 300 µl cada uno durante una hora a 4°C sin agitación. Se realizó un segundo lavado por 6 ocasiones previamente descrito. Se añadieron  $1.0 \times 10^{11}$  partículas fágicas en 100 µl de PBS-T y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Los fagos que no se unieron fueron eliminados al realizar un tercer lavado por 10 ocasiones. Los fagos unidos, fueron eluidos con glicina-HCL pH 2.2, 0.2M, con 100 µl por pozo por 10 minutos a temperatura ambiente y después la solución fue neutralizada con Tris 1M pH 9.1, utilizando 8 µl por cada 100 µl de eluato. Una pequeña fracción se utilizó para la titulación y el resto fue

---

<sup>4</sup> Ph.D.-7™ y 12™, New England Biolabs, USA.

utilizado para infectar células de la cepa *E. coli* ER2738 para la amplificación del fago. Se realizaron otras dos rondas de selección por afinidad (segundo y tercer *biopanning*) utilizando 7.5 y 3.5 µg/ml del anticuerpo policlonal anti-adolescencia.

### **7.- Amplificación y titulación de fagos.**

Los fagos eluidos se incubaron con la cepa *E. coli* ER2738<sup>5</sup> en medio de cultivo 2XYT durante 4.5 horas a 37°C en agitación constante. El cultivo fue transferido a tubos estériles y centrifugados a 104229.4 x g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a otro tubo nuevo y se le adicionó una cuarta parte (v/v) de PEG 20%-NaCl 2.5 M e incubado toda la noche a 4°C para la precipitación de los fagos. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 104229.4 x g durante 12 minutos a 4°C y se decantó. El botón de fagos fue re-suspendido en PBS estéril y se agregó una cuarta parte (v/v) de PEG 20%-NaCl 2.5 M manteniéndose toda la noche a 4°C. Luego, se centrifugó a 104229.4 x g por 12 minutos, el sobrenadante se desechó y el botón fue re-suspendido con PBS que fue centrifugado a 104229.4 x g por 2 minutos, con el objetivo de eliminar materia insoluble (Villa *et al.*, 2008).

Los fagos amplificados fueron diluidos 1:1000 en medio *Luria-Bertani* (LB) para obtener una serie de títulos diferentes. Se tomó 1 µl de cada dilución que fue adicionada a 200 µl del cultivo *E. coli* ER2738 e incubados por 3-5 minutos. Las células infectadas fueron transferidas a un tubo con agarosa a 45°C, se mezclaron y fueron vertidas a una caja con LB e incubadas durante 16 horas a 37°C. Las placas formadas en cada caja, fueron contadas y expresadas como unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml). Para la selección de clones individuales, se realizó este mismo procedimiento, con la diferencia de utilizar cajas con X-gal para inducir el color. Posteriormente, cada clona seleccionada fue amplificada, purificada y titulada de acuerdo al procedimiento descrito.

---

<sup>5</sup> New England Biolabs, Inc

## 8.- ELISA de fagos.

Para identificar las clonas reactivas, los pozos de una placa de ELISA fueron cubiertos con IgG de conejo como anticuerpo de captura anti-adolescencia (0.5 µg/pozo) en PBS, conteniendo 0.2% de BSA y de Tween 20, incubados toda la noche a 4°C en agitación constante. Posteriormente, los pozos fueron lavados en cinco ocasiones con PBS/Tween-20 al 0.2% por 5 minutos y posteriormente fueron bloqueados con PBS conteniendo BSA al 1% por 1 hora a 37°C sin agitación. 10<sup>10</sup> partículas de fagos fueron diluidos en PBS/BSA 0.2%-Tween 0.2% e incubados a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación constante. Se lavaron nuevamente los pozos con PBS-T al 0.2% por 5 ocasiones. Luego se adicionó el anti-M13-HRP<sup>6</sup> como segundo anticuerpo, en el amortiguador de bloqueo (PBS/BSA 1%) en un volumen de 200 µl por pozo (dilución 1:5000) y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente sin agitación. La detección de fagos por el anticuerpo anti-M13-HRP fue visualizada utilizando tetrametil bencidina (TMB) en amortiguador de citratos, en un volumen de 100 µl por pozo. Se empleó como control negativo al fago silvestre M13KE. La absorbancia fue determinada con una de 605 nm.

---

<sup>6</sup> Amersham Biosciences, USA



## RESULTADOS.

### 1.- Obtención de metacercarias de *Fasciola hepatica* a partir de *Lymnaea humilis*.

Se inocularon un total de 142 caracoles juveniles con miracidios de *F. hepatica*., durante la primera semana se observó una mortalidad elevada del 17.61%, disminuyendo en las semanas subsiguientes y un aumento gradual a partir de la semana 9 post-infección (Ver figura 1).

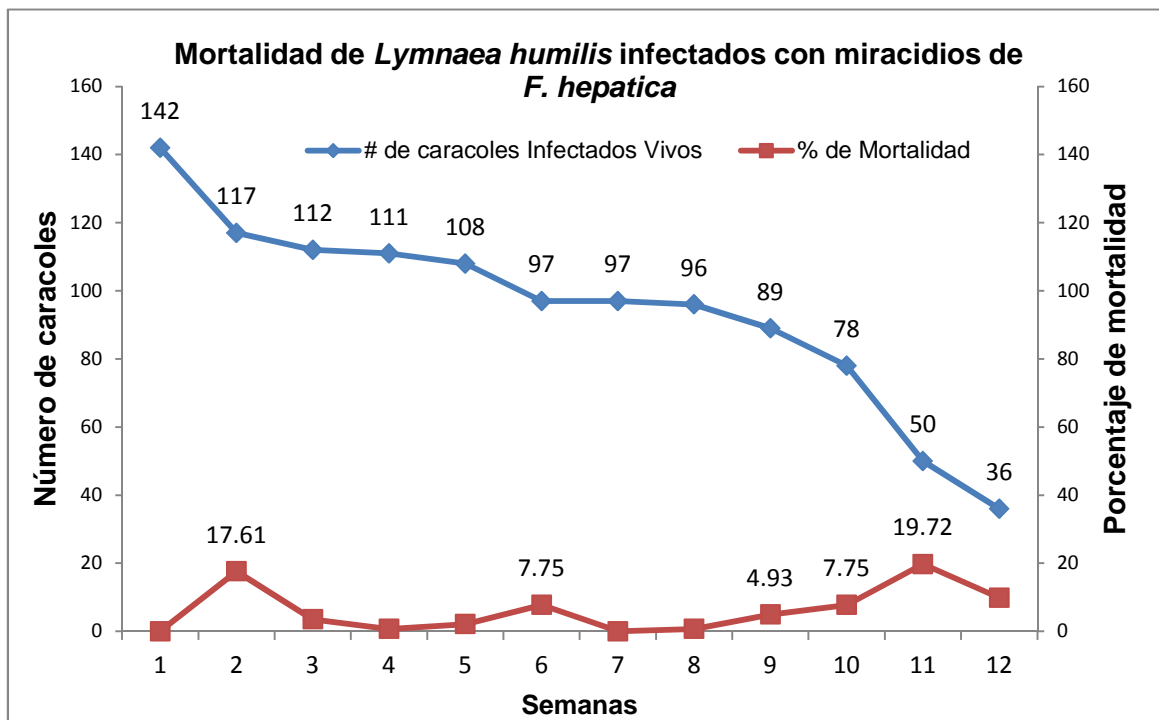


Figura 1.- Porcentaje de mortalidad de *Lymnaea humilis* infectados con miracidios de *Fasciola hepatica*. La mortalidad mínima fue de 4.93% y una máxima de 19.72%. El mantenimiento de cultivos se realizó con un rango de temperatura de 15-27°C, humedad relativa de 50-70% y pH de 7.2-7.8

La liberación de cercarias de *F. hepatica* a partir de *L. humilis* ocurrió a partir de la semana siete post-infección, donde se obtuvieron cuatro metacercarias. Posteriormente hubo un aumento gradual de liberación de cercarias en las semanas siguientes, con un pico en la semana once post-infección, donde se obtuvieron 449 metacercarias. El total de metacercarias obtenidas al final del experimento fue de 794 (Figura 2).

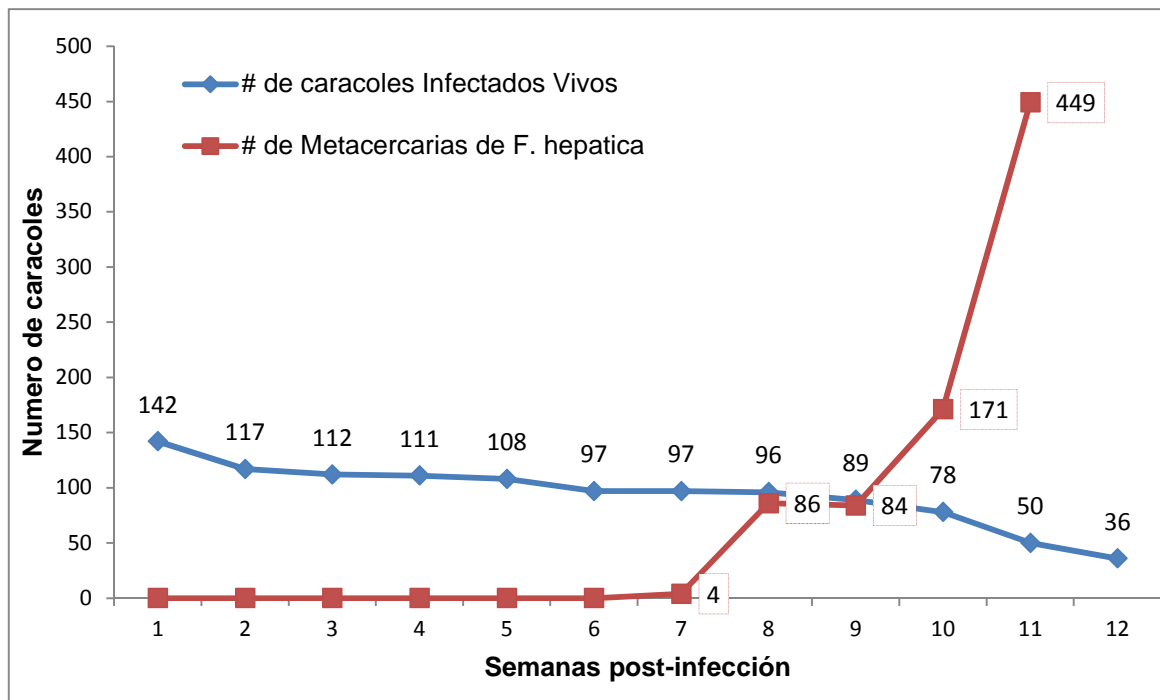


Figura 2.- Dinámica de eliminación de metacercarias de *Fasciola hepatica* del huésped intermediario *Lymnaea humilis* después de la infección. El inicio de liberación de cercarias inició a partir de la semana 7, con un pico en la semana 11.

## 2.- Desenquistamiento de metacercarias de *Fasciola hepatica*.

Se utilizaron 2563 metacercarias de *F. hepatica* a desenquistar, de las cuales se utilizaron 794 metacercarias obtenidas de los caracoles infectados y el resto fueron adquiridas en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA). El desenquistamiento fue realizado de acuerdo al procedimiento recomendado por Munguía (2009). Se obtuvo un promedio de desenquistamiento del 33% (846 NEJ desenquistados) (Tabla 1). La obtención de antígenos somáticos de NEJs se realizó de acuerdo a Hernández *et al.*, 2010 y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

**Tabla 1 -. Desenquistamiento de metacercarias de *Fasciola hepatica*.**

Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Total
a) Metacercarias	263	22	36	21	35	104	724	30	141	1065	122	2563
b) NEJs	10	1	2	2	4	26	225	11	59	448	58	846

## 3.- Infección del grupo de conejos testigo positivo a *Fasciola hepatica* adulta.

Se infectaron dos conejos para mantenerlos como control positivo a *F. hepatica*, con una sola infección por vía oral con 30 metacercarias y sin tratamiento con triclabendazol. Fueron recuperados 9 y 6 trematodos adultos del hígado de cada conejo, lo que representa un 30% y 20% en la tasa de infección. La eliminación de huevos fue detectado a partir de la semana 15 post-infección, con una media en la eliminación de huevos por gramo de heces de  $30.68 \pm 17.57$  y  $25.65 \pm 10.97$  en los conejos 1 y 3, respectivamente (Tabla 2).

**Tabla 2.- Carga parasitaria del testigo positivo a la infección por *F. hepatica*.**

Grupo 4 (Testigo positivo)	N° metacercarias (VO)	N° de trematodos recuperados.	Porcentaje de infección.	Media de hpgh/Desv Est
Conejo 1	30	9	30	$30.68 \pm 17.57$
Conejo 3	30	6	20	$25.65 \pm 10.97$

VO: Vía oral.

Hpgh: Huevos por gramo de heces.

#### 4.- Evaluación de la respuesta inmune humoral a productos de E/S de *Fasciola hepatica* adulta por ELISA Indirecto.

Con el objetivo de conocer la respuesta humoral de los conejos infectados por *F. hepatica*, se realizó un ELISA Indirecto. Como resultado, se observó que en el G1 los niveles de anticuerpos contra productos de E/S del parásito adulto fueron mínimos, en el G2 se detectaron solamente en la semana 11 y en el G3 fueron detectados entre la semana 9 y 13. En el G4 se encontraron anticuerpos a partir de la semana 9 y de ahí hasta el final del experimento y el G5 permaneció con niveles de absorbancia mínimos. (Figura 3).

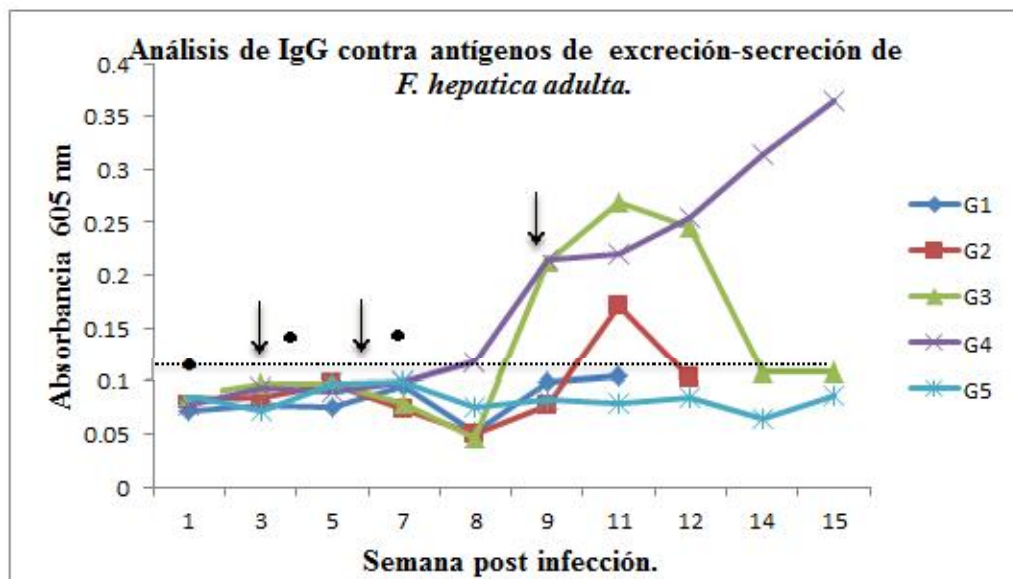
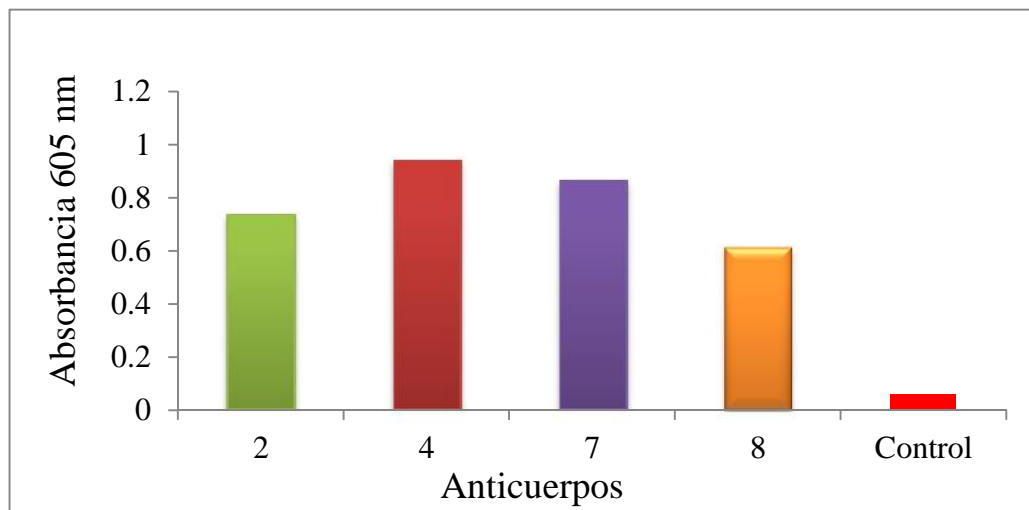


Figura 3.- Análisis por ELISA Indirecto de IgG contra antígenos de excreción secreción de *Fasciola hepatica* adulta en suero de conejos infectados ( ) y tratados (↓) con triclabendazol, una vez (G1), dos veces (G2), tres veces (G3), un control positivo a *F. hepatica* adulta (G4) y un testigo negativo (G5). Cada punto representa la media aritmética de los valores de absorbancia de dos conejos. La línea horizontal indica el valor de punto de corte ( $OD > 0.11$ ), que fue calculado como la media  $OD \pm 2DE$  del suero negativo (G5).

## 5.- ELISA Indirecto para determinar la reactividad de IgG anti-adolescencia de *Fasciola hepatica*.

A partir de los sueros obtenidos del grupo dos (sueros 7, 8) y tres (sueros 2, 4), se determinaron los títulos de IgG contra antígenos de NEJ de *F. hepatica* contenidos en el extracto somático de los NEJ desenquistados. Se evaluaron cuatro sueros hiperinmunes; como resultado, el suero número cuatro tuvo mayor título contra el antígeno, seguido del anticuerpo 7, 2 y 8. Se consideró como control negativo suero pre-inmune. (Figura 5).



**Figura 4.-** Análisis por ELISA Indirecto de reactividad de sueros hiper-inmunes contra el antígeno de trematodos juveniles recién desenquistados (NEJs) de *Fasciola hepatica*. El suero cuatro mostró mayor reactividad.

## 6.- Enriquecimiento de fagos.

Se utilizó un anticuerpo anti-adolescencia de *F. hepatica* del grupo tres (G3), para la identificación de péptidos que pueden ser inmunodominantes de esta fase, a través de las bibliotecas de 12 y 7 aminoácidos en los fagos filamentosos. Después de la tercera ronda de selección en ambas bibliotecas utilizadas, se observó un enriquecimiento de fagos con afinidad por la IgG purificada anti-adolescencia.

**Tabla 3.- Enriquecimiento de fagos por selección “*biopanning*”.**

Ronda de selección “ <i>Biopanning</i> ”	Fagos adicionados (ufc)	Fagos eluidos (ufc)	Fagos recuperados (Ufc)
1 <sup>a</sup>	$1 \times 10^{11}$	$7.6 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$
2 <sup>a</sup>	$1 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^6$	$3.3 \times 10^4$
3 <sup>a</sup>	$1 \times 10^{11}$	$3.7 \times 10^7$	$2.7 \times 10^3$

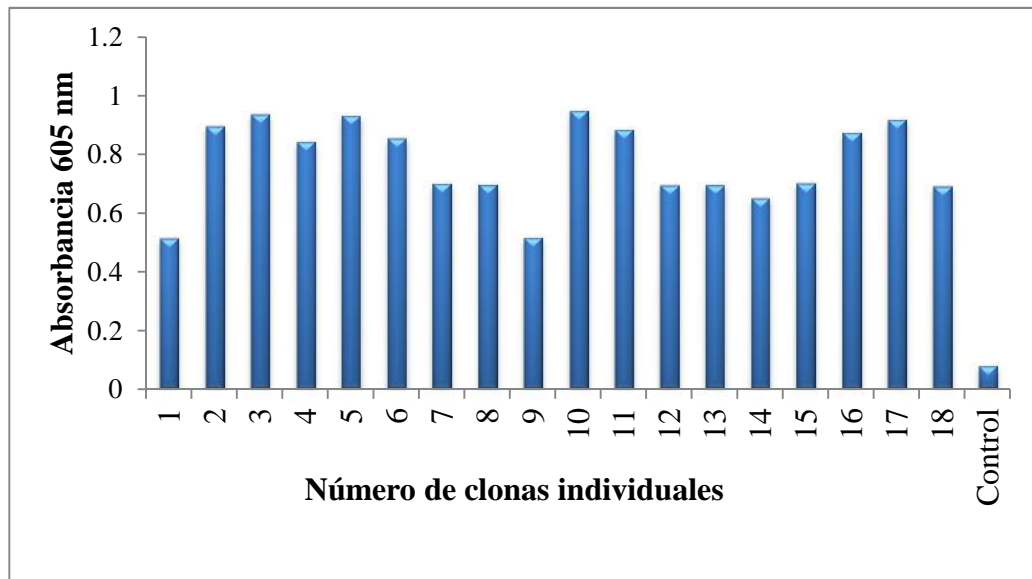
<sup>a</sup> Suero 4, 12 aminoácidos.

Ronda de selección “ <i>Biopanning</i> ”	Fagos adicionados (ufc)	Fagos eluidos (ufc)	Fagos recuperados (Ufc)
1 <sup>b</sup>	$1 \times 10^{11}$	$3.2 \times 10^6$	$3.1 \times 10^4$
2 <sup>b</sup>	$1 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^7$	$2.5 \times 10^3$
3 <sup>b</sup>	$1 \times 10^{11}$	$2.4 \times 10^8$	$4.2 \times 10^2$

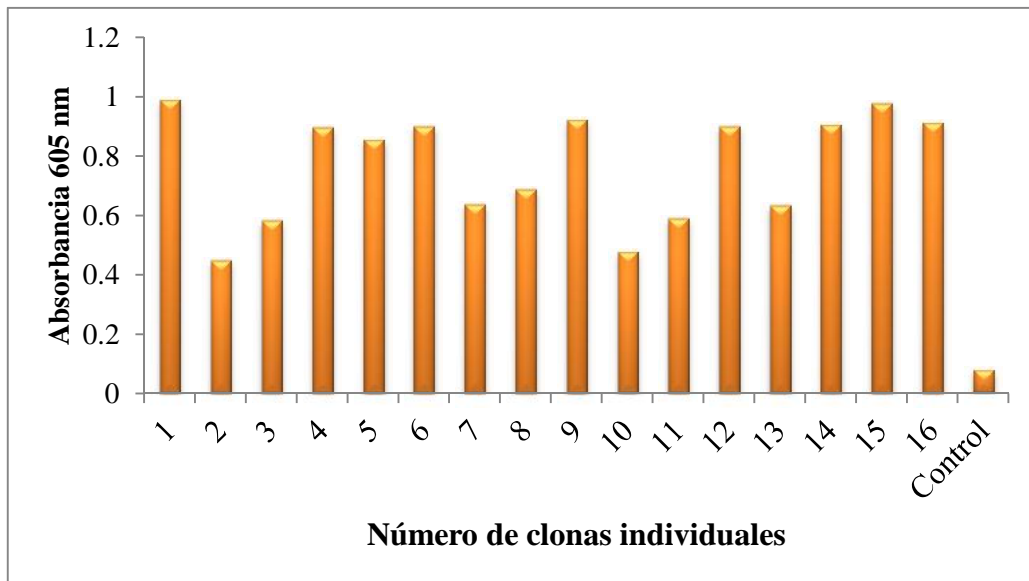
<sup>b</sup> Suero 4, 7 aminoácidos.

## 7.- Unión específica de clonas individuales de fagos con la IgG anti-adolescárica de *F. hepática*.

Se seleccionaron treinta y cuatro clonas aisladas individualmente para ser evaluadas a través de ELISA tipo sándwich empleando como anticuerpo de captura a la IgG anti-adolescárica de *F. hepática* purificada y comparar la afinidad de las diferentes clonas seleccionadas. Dieciocho clonas fueron seleccionados utilizando una biblioteca combinatoria con fagos filamentosos (M13), que expone aleatoriamente péptidos de 12 aminoácidos (12-mer) en la región N-terminal, fusionado con la proteína III (Figura 5). Dieciséis clonas fueron seleccionadas al utilizar una biblioteca combinatoria de fagos filamentosos que exponen péptidos aleatorios de 7-mer. (Figura 6).



**Figura 5.-** ELISA sándwich para la selección de clonas con 0.5µg de anticuerpo de conejo anti-adolescárica de *Fasciola hepática* utilizando la biblioteca 12-mer. Se empleó como control negativo al fago silvestre M13KE. Cada clona representa datos de una sola lectura, debido a la poca cantidad de antígeno obtenido.



**Figura 6.-** ELISA sándwich para la selección de clonas con 0.5µg de anticuerpo de conejo anti-adolescencia de *Fasciola hepatica* utilizando la biblioteca 7-mer. Se empleó como control negativo al fago silvestre M13KE. Cada clona representa datos de una sola lectura, debido a la poca cantidad de antígeno obtenido.



## DISCUSION

En este trabajo se infectaron caracoles *L. humilis* con miracidios de *F. hepatica* que fueron mantenidos en agua a pH 7.2 y una temperatura de 20-22°C. El pH del agua y temperatura deben ser constantes durante la infección, ya que a pH menor a 5 o superiores a 10 la muerte de los caracoles sucede 24 horas después de su infección (Cruz *et al.*, 2006). El promedio de infección por caracol fue de 3 miracidios., un aumento del número de miracidios causa la muerte de los mismos (Cruz-Reyes y Malek, 1987). En este trabajo, la mortalidad de caracoles registrado, pudo haber sido debido al estrés que sufrieron durante el proceso de infección, así como los cambios de temperatura abruptos registrados durante todo el periodo de la infección.

La liberación de cercarias inició a partir del día 35 post-infección, similar a los resultados obtenidos por Terasaki *et al.*, (2003). Para la liberación de cercarias, los caracoles fueron sometidos a cambios bruscos de temperatura de acuerdo a lo realizado por Cruz *et al.*, (2005). Para la obtención de antígeno juvenil o el extracto somático de NEJ, se realizó el desenquistamiento de metacercarias, obteniendo 846 metacercarias desenquistadas de un total de 2563 (33%), ese porcentaje de desenquistamiento coincide con los obtenidos por Munguía (2009), el rango de desenquistamiento fue de 15-40%. El porcentaje de desenquistamiento es relacionado con la longevidad de las metacercarias y temperatura, es decir; a 2°C las metacercarias pueden permanecer viables por 1 año, sin embargo a 12-14°C es reducida a seis meses (Andrew, 1999).

Las metacercarias obtenidas se inocularon a los conejos con la finalidad de obtener suero hiperinmune. Para confirmar la infección se utilizó la técnica de sedimentación para la detección de huevos por gramo de heces (hpgh) en el grupo control positivo. A la necropsia la carga parasitaria fue de 9 y 6 duelas adultas obtenidas del hígado de cada conejo, la tasa de infección fue de 30% y 20%, similar a lo reportado por Silva *et al.*, (2004), que al infectar 3 conejos con 30

metacercarias obtuvo 4, 6 y 8 parásitos adultos con una tasa de infección del 13.33%, 20% y 26.66% respectivamente.

También se utilizó la técnica de ELISA Indirecto utilizando como antígeno productos ES del parásito adulto (1µg/pozo), se observó que en el G1 el título de anticuerpos contra productos de E/S de *F. hepatica* adulta fueron mínimos, en el G2 se detectaron solamente en la semana 11, en el G3 fueron detectados entre la semana 9 y 13, en el G4 se encontraron anticuerpos a partir de la semana 8 hasta el final del experimento y el G5 permaneció con niveles de absorbancia mínimos. La detección de anticuerpos a partir de la semana 8 post-infección contra productos E/S en el grupo cuatro sugiere el establecimiento de la enfermedad, ya que se incrementan los niveles de anticuerpos conforme transcurre el periodo de infección.

Resultados similares fueron obtenidos contra productos de E/S en conejos infectados con *F. hepatica*, en los cuales los niveles de anticuerpos ya eran elevados en la semana 8 post-infección y permanecieron así hasta el final del experimento (Casanueva *et al.*, 2001). En otro estudio, la cinética de producción de anticuerpos anti-E/S de *F. hepatica* adulta en conejos, fue detectada a partir de la semana 4 post-infección permaneciendo elevada también hasta el final del experimento (Espino *et al.*, 2012). La detección de anticuerpos contra E/S en ovinos infectados con *F. hepatica* se incrementó significativamente a partir de la semana 4 p.i y permaneció elevada hasta el final del experimento (Phiri *et al.*, 2006; López *et al.*, 2007). En ratas la detección de IgG1 contra productos de E/S fue a partir de la semana 5 después del desafío (Kesik *et al.*, 2007).

La variabilidad en la detección de anticuerpos respecto a los tiempo entre los distintos reportes, puede ser influido por la cantidad de metacercarias proporcionadas a los huéspedes, la concentración de antígeno utilizado en la sensibilización de las placas de ELISA, así como la dilución de suero. La detección de anticuerpos contra E/S del antígeno adulto en los grupos G2 y G3 puede ser

debido a que en sus productos de E/S del parásito juvenil y del adulto comparten antígenos de catepsina Ls (Cancela *et al.*, 2008) y catepsina Bs, donde han demostrado que en los primeros 8 residuos aminoterminales comparte de 37-50% de identidad con catepsina L de *F. hepatica* adulta (Wilson *et al.*, 1998).

El desarrollo de una vacuna contra *F. hepatica* debe ser dirigida contra la fase recién desenquistada o juvenil, debido a que en este estadio es donde se produce la respuesta inmune protectora (Jedlina *et al.*, 2011). Una herramienta poderosa para seleccionar péptidos y proteínas (incluyendo anticuerpos) es el uso del “*phage display*” o despliegue de fagos filamentosos, que permite la identificación y selección de polipéptidos con propiedades novedosas (Ullman *et al.*, 2011). La tecnología de *phage display* se ha convertido en una herramienta poderosa para estudiar el reconocimiento y la interacción entre las moléculas proteína-proteína y proteína con otras biomoléculas (Cen *et al.*, 2006), el estudio de las interacciones entre proteínas y ADN (Choo y Klug, 1995), para la identificación de epitopos conformacionales como candidatos a vacunas con nematodos (Ellis *et al.*, 2012) o el descubrimiento de fármacos (Sidhu, 2000). Para el desarrollo de una vacuna, una biblioteca de fagos permite la selección de anticuerpos de alta afinidad contra una diana de interés (Rader y Barbas, 1997; Kretzschmar y Rüden, 2002).

Como resultado de esta investigación, en primera instancia el anticuerpo policlonal obtenido contra la fase juvenil recién desenquistada del parásito fue positivo al confirmar a través de ELISA indirecto. Esto dio pauta para continuar con la selección de clonas utilizando las dos bibliotecas comerciales a través de *biopanning* al realizar tres rondas de selección. Un indicativo de afinidad de los fagos contenidos en la biblioteca al anticuerpo purificado, es a través de los títulos de los fagos por cada ronda de selección. Utilizando la biblioteca de 12 aminoácidos, se obtuvieron títulos de fagos de  $7.5 \times 10^5$  y  $3.7 \times 10^7$  para el primer y tercer panning, respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por Villa *et al.*, (2008), al utilizar la misma biblioteca comercial y realizar los panning con la

IgG anti-catepsina de *F. hepatica* adulta, que obtuvieron en primera y tercera ronda de selección de  $2.0 \times 10^4$  y  $5.2 \times 10^6$  fagos específicos. Para el caso de la biblioteca de 7 aminoácidos, durante la primera y tercera ronda de selección se obtuvo  $3.2 \times 10^6$  y  $2.4 \times 10^8$  fagos específicos a la IgG anti-NEJ, estos resultados concuerdan con los títulos obtenidos por Villa *et al.*, (2014) al utilizar la misma biblioteca con un suero policlonal anti-catepsina L, donde los títulos de fagos específicos en la primera y tercera ronda de selección fueron de  $1.4 \times 10^6$  y  $4.6 \times 10^8$ , respectivamente.

Posteriormente, se realizó la selección de clonas individuales a partir de un medio de cultivo sólido LB/IPTG/Xgal, de los cuales se obtuvo un total de 34 clonas individuales, dieciocho clonas fueron seleccionadas utilizando la biblioteca de 12 aminoácidos y dieciséis clonas seleccionadas a través de la biblioteca de 7 aminoácidos. Estas clonas, posteriormente fueron caracterizadas a través de ELISA sándwich utilizando como anticuerpo de captura la IgG purificada, como resultado, siete clonas mostraron mayor reactividad. Debido a que estas clonas fueron obtenidas utilizando un anticuerpo policlonal que fue específico contra la fase juvenil en conejos, podríamos suponer que el mimotopo contenido en los fagos sea de catepsina B o L del parásito recién desenquistado, del juvenil o de ambos. Este supuesto se apoya en base a lo reportado por Robinson *et al.*, (2009) el cual identifica en el parásito juvenil de 21 días a catepsinas Ls y Bs como los mayores componentes en sus productos de excreción-secreción. Similares trabajos como los de Cancela *et al.*, 2008; McGonigle *et al.*, 2008 y Beckhama *et al.*, 2009, donde enfatizan que la mayor parte de las cisteína proteasas en las fases juveniles son de la clase de cisteína proteasas de B y L. También es posible que las clonas más reactivas obtenidas en este estudio tengan secuencias de péptidos de algunas de las 52 proteínas identificadas en el parásito juvenil recién desenquistado por Hernandez *et al.*, (2010) o de proteínas del tegumento (Wilson *et al.*, 2010).

Estas clonas son objeto para posteriores estudios en la caracterización de las mismas a través de Western Blot y secuenciación que, posteriormente serían buenos candidatos como inmunógenos para probarlos en animales de laboratorio y domésticos. Los resultados esperados al probarlos como inmunógenos son reducción en la carga parasitaria y disminución en la liberación de huevos y la fertilidad de los mismos. Esta conjetura es basada en los trabajos previos realizados por Villa *et al.*, (2008), el cual utilizaron clonas obtenidas a partir de catepsina L1 de la fase adulta de *F. hepatica*, donde en un primer experimento probaron las clonas más reactivas (clona 1, 20 y un pool de las clonas 1, 2, 3, 5, 17, 19 y 20), como resultado obtuvieron una reducción en la carga parasitaria del 47.61% y 33.91% para las primeras 2 clonas, con reducciones en la eliminación de huevos del 25.85% y 45.55% y disminución en la viabilidad de huevos del 58.92% y 82.11%, respectivamente. En otro estudio realizado en ovinos, al utilizar dos mimotopos de catepsina L, en el grupo 1 (G1 [YVYRWVEAECVA]) y el G2 (FSPAYLRDAALK), se obtuvo una reducción en la carga parasitaria de 51.7% y 35.9%, así como el 29.7% y 45.7% de reducción en el conteo de huevos fecales para el grupo 1 y 2 (Villa y Mendez, 2012). Recientemente han reportado reducciones en cargas parasitarias de 46.91% y 79.53% con una reducción en el número de huevos en heces de 57.09% y 84.41% al vacunar caprinos con partículas fágicas de  $1 \times 10^{14}$  de mimotopos de catepsina L de *F. hepatica* (Villa *et al.*, 2013).

De las siete clonas más reactivas, presumiblemente al tener una secuencia de catepsina B o L de la fase juvenil, podría ser posible la utilización de estos en pruebas de inmunización conjuntándolo con las clonas obtenidas por Villa *et al.*, (2008), los cuales son mimotopos específicos contra catepsina L1 de la fase adulta del parásito. Como resultado esperado, se obtendrían una mayor reducción en las cargas parasitarias, disminución en la eliminación y viabilidad de los huevos, así como menores lesiones en hígados de animales inmunizados. Esto es apoyado de acuerdo con Ramamoorth *et al.*, (2009), el cual utilizaron una vacuna

multivalente compuesto por catepsina L1g, catepsina B y catepsina L5 de las fases de metacercarias, trematodos juveniles recién desenquistados y estadio adulto, respectivamente. Como resultado, obtuvieron una protección del 83% en el grupo de ratas vacunadas con la combinación de catepsina B/L5, comparado con los grupos de ratas vacunadas con las proteínas en forma sola. Aunque este nivel de protección es elevado, es bien conocido que los roedores, en especial las ratas adquieren resistencia a la infección por *F. hepatica* (Van Milligen *et al.*, 1999), sin embargo cuando se llevan a cabo inmunizaciones con animales de producción, este nivel de protección disminuye drásticamente, como los realizados en ovinos al ser inmunizados con catepsina L2, la reducción en la carga parasitaria fue del 34% (Piacenza *et al.*, 1999), esto es apoyado por trabajos realizados por Dalton *et al.*, (1996), al inmunizar bovinos con catepsina L1, las reducciones en las cargas parasitarias fueron del 38 y 42% utilizando tres dosis.

La obtención de clonas a través de procesos de selección por afinidad utilizando bibliotecas de fagos que expresan péptidos aleatorios, son una alternativa para su uso en el área de parasitología, en particular la utilización de mimotopos contra dianas específicas de *F. hepatica* como los trabajos realizados por Villa *et al.*, (2008, 2012 y 2014). Cabe resaltar, que el uso de bacteriófagos se pueden utilizar como alternativa a los antibióticos para muchas cepas bacterianas resistentes a los antibióticos y como agentes de biocontrol en la agricultura (Haq *et al.*, 2012). En los últimos años se ha reconocido a los bacteriófagos como vehículos para vacunas de proteínas y de ADN, así como su administración en terapias génicas y como herramienta para la selección de bibliotecas de proteínas, péptidos o anticuerpos (Clark *et al.*, 2006).

## CONCLUSIÓN.

Utilizando la tecnología de despliegue en fagos a base de dos bibliotecas comerciales, se reconocieron epitopos inmunodominantes de la fase juvenil de *F. hepatica*. Para ello, se seleccionaron treinta y cuatro clonas; dieciocho clonas fueron seleccionados utilizando la biblioteca combinatoria de 12 aminoácidos (12-mer) y dieciséis clonas a través de la biblioteca combinatoria de 7 aminoácidos (7-mer). A través de afinidad con IgG anti-adolescencia de *F. hepatica*, ocho clonas mostraron ser más reactivas. Estas clonas requieren ser caracterizadas a través de Western Blot y secuenciación para posteriormente ser utilizadas como antígenos candidatos vacunales en animales.

## LITERATURA CITADA.

1. Acosta D, Goñi F, Carmona C. Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. J Parasitol 1998; 84(1):1-7.
2. Aguilar A, Camacho F, Amin N, Prieto LJ, Garay H, Reyes O, Acosta A. Comparación de la antigenicidad de dos construcciones peptídicas de mimotopos del virus de la hepatitis A mediante suero de ratones. VaccinMonitor 2013, 22 (3): 43-46.
3. Andrews SJ. The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 1999:1-29.
4. Angulo CF, Molero M, Escalona F, Muñoz J, Ramírez BR. Prevalencia y dinámica de hpg mensual de *Fasciola hepatica* y otros helmintos en un rebaño bovino de una zona inundable tropical. Revista Científica, FCV-LUZ, 2007, Vol XVII, N° 2:111-116.
5. Assady M, Farahnak A, Golestani A, Esharghian MR. Superoxide dismutase (SOD) enzyme activity assay en *Fasciola* spp. Parasites and liver tissue extract. Iran J Parasitol 2011, 6(4); 17-22.
6. Ayaz MM, Raza MA, Murtaza S, Akhtar S. Epidemiological survey of helminths of goats in southern Punjab, Pakistan. Trop Biomed 2013, 30(1): 62-71.
7. Barbas FC. Recent advances in phage display. Curr Opin Biotechnol 1993, 4(5): 526-530.
8. Beckhama SA, Piedrafita D, Phillips CI, Samarawickrema N, Law RH, *et al.* A major cathepsin B protease from the liver fluke *Fasciola hepatica* has atypical active site features and a potential role in the digestive tract of newly excysted juvenile parasites. Int J Biochem Cell Biol 2009, 41(7):1601-1612.
9. Behm CA, Sangster NC. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: Fasciolosis. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 1999:185-224.
10. Bennema SC, Ducheyne E, Vercruyssen J, Claerebout E, Hendrickx G, Charlier J. Relative importance of management, meteorological and



- environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climate zone. *Int J Parasitol* 2011, 41(2):225–233.
11. Boray J.C, Jackson R y Strong M.B. Chemoprophylaxis of fascioliasis with triclabendazole. *N Z Vet J* 1985; 33(11):182-185.
  12. Boukli NM, Delgado B, Ricaurte M, Espino AM. *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*: identification of common proteins by comparative proteomic analysis. *J Parasitol* 2011,97(5): 852-861.
  13. Brady MT, O'Neill SM, Dalton JP, Mills KH. *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1999,67(10):5372-8.
  14. Brito BE, Hernández BM, De la Fé RP, Silveira PE. Prevalencia, decomisos de hígado y pérdidas económicas por *Fasciola hepatica* en mataderos bovinos de tres provincias de la región central de Cuba. *REDVET* 2010, Vol XI, N° 4: 1-7.
  15. Brockwell YM, Elliott TP, Anderson GR, Stanton R, Spithill TW, Sangter NC. Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. *Int J Parasitol: Drugs and Drugs Resistance* 2004 (4):48-54.
  16. Burden JD, Bland PA, Hemmet CN, Hughes LD. *Fasciola hepatica*: Migration of newly excysted juveniles in resistant rats. *Exp Parasitol* 1983, 56(2): 277-288.
  17. Cancela M, Acosta D, Rinaldi G, Silva E, Durán R, Roche L, Zaha A, Carmona C, Tort JF. A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie* 2008, 90(10):1461-1475.
  18. Cancela M, Carmona C, Rossi S, Frangione B, Goñi F, Berasain P. Purification, characterization, and immunolocalization of paramyosin from the adult stage of *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res* 2004, 92(6):441.8.
  19. Cancela M, Ruétalo N, Dell'Oca N, da Silva E, Smircich P, Rinaldi G, Roche L, Carmona C, Alvarez-Valín F, Zaha A, Tort JF. Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics*. 2010; 11:227.
  20. Casanueva R, Hillyer GV, Ramajo V, Oleaga A, Espinoza EY, Muro A. Immunoprophylaxis against *Fasciola hepatica* in rabbits using a

- recombinant Fh15 fatty acid-binding protein. *J Parasitol* 2001, 87 (3):697-700.
21. Cen X, Bi Q, Zhu S. Construction of a large phage display antibody library by in vitro package and in vivo recombination. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, 71(5):767-772.
  22. Charlier J, Vercruyse J, Morgan E, Van Dijk J, Williams DJL. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitology* 2013: 1-10.
  23. Choo Y, Klug A. Designing DNA-binding proteins on the surface of filamentous phage. *Curr Opin Biotechnol* 1995, 6(4):431-436.
  24. Clark JR, March JB. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends Biotechnol* 2006, 24 (5):212-218.
  25. Collins PR, Stack CM, O'Neill SM, Doyle S, Ryan T, Brennan GP, Mousley A, Stewart M, Maule AG, Dalton JP, Donnelly S. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *J Biol Chem* 2004, 279(17):17038-46.
  26. Cornelissen JB, Gaasenbeek HP, Borgsteede MH, Holland GW, Harmsen MM, Boersma AJ. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *Int J Parasitol* 2001, 31(7): 728-37.
  27. Cortese R, Monaci P, Nicosia A, Luzzago A, Felici F, Galfre G, Pessi A, Tramontano A, Sollazzo M. Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. *Curr Opin Biotechnol* 1995, 6(1): 73-80.
  28. Creaney J, Wijffels GL, Sexton JL, Sandeman RM, Spithill TW, Parsons JC. *Fasciola hepatica*: localisation of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. *Exp Parasitol* 1995, 81(1):106-16
  29. Creaney J, Wilson L, Dosen M, Sanderman RM, Spithill TW and Parsons JC. *Fasciola hepatica*: Irradiation-induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol* 1996, 83(2): 202-15.

30. Cruz MI, Ibarra VF, Quintero MF, Naranjo GMT, Lecumberri LJ, Correa D. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in cattle and *Lymnaea (Fossaria) humilis* snails in Central México. *Parasitol Res* 2005,95(4):283-6.
31. Cruz MI, Naranjo GE, Quintero MMT, Dolores C, Quiróz RH. Primeras aportaciones al conocimiento de los hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en México. Capítulo VII. En *Fasciolosis*. Editada por Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, primera edición, 2010; 163-180.
32. Cruz MI, Naranjo GE, Quintero MMT, Ibarra VF, Correa D. Exposure to *Fasciola hepatica* miracidia increases the sensitivity of *Lymnaea (Fossaria) humilis* to high and low pH. *J Parasitol* 2006,92(3):650-2
33. Cruz MI, Quintero M, Ibarra V, Naranjo G. Algunos aspectos malacológicos y de distribución geográfica de huéspedes intermediarios de *Fasciola hepatica*. En *Temas selectos de Parasitología, México (D.F): UNAM, Fac de Med. Vet y Zoot., 2000; 1:111-122.*
34. Cruz MI, Quiroz RH, Correa D, Gómez EG. Transmission dynamics of *Fasciola hepatica* in the Plateau Region of Mexico. Effect of weather and treatment of mammals under current farm management. *Vet Parasitol* 2011, 175(1-2):73-9.
35. Dalton JP, Brindley PJ, Knox DP, Brady CP, Hotez PJ, Donnelly S, O'Neill SM, Mulcahy G, Loukas A. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int J Parasitol* 2003,33(5-6):621-40.
36. Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moiré N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG, Donnelly SM. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol* 2003,33(11):1173–1181.
37. Díaz FR, Garcés MM, Millán AL, Pérez LJ, Millán MJ. Comportamiento clínico- terapéutico de *Fasciola hepatica* en una serie de 87 pacientes. *Rev Cubana Med Trop* 2011; 63 (3): 268-74.
38. Dong J, Otsuki T, Kato T, Kohsaka T, Ike K, Park YE. Development of two murine antibodies against *Neospora caninum* using phage display

- technology and application on the detection on *N. caninum*. PLOS ONE 2013, 8(1): e53264.
39. Ellis ES, Newlands JF, Nisbet JA, Matthews BJ. Phage-display library biopanning as a novel approach to identifying nematode vaccine antigens. *Parasite Immunol* 2012, 34(5): 285-295.
  40. Espino AM, Rivera F. Quantitation of cytokine mRNA by real-time RT-PCR during a vaccination trial in a rabbit model of fascioliasis. *Vet Parasitol* 2010, 169(1-2):82-92.
  41. Figueroa SO, Delgado B, Espino AM. *Fasciola hepatica* saposin-like-2 protein based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. *Diagn Microbiol Infec Dis* 2011, 70(3):355-61.
  42. Flores Paz CA. Frecuencia e intensidad de *Fasciola hepatica* adultas e inmaduras en bovinos sacrificados en el municipio de Tlapacoyan, Veracruz, México. Informe de Trabajo Profesional en modalidad bovinos de trópico. FMVZ, UNAM, 2011, 1-61.
  43. Flynn RJ, Mulcahy G, Elsheikha HM. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control. *Vet Parasitol* 2010,169(3-4):235-40.
  44. Geurden T, Bartram D, Van Brussel L, Bo L, Scott-Baird E, Rugg D. Evaluation of the comparative efficacy of a moxidectin plus triclabendazole pour-on solution against adult and immature liver fluke, *Fasciola hepatica*, in cattle. *Vet Parasitol* 2012,189(2-4): 227–32.
  45. Graczyk TK y Fried B. Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. In: Fasciolosis. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 1999: 31-45.
  46. Griffiths DA Duncan RA. Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr Opin Biotechnol* 1998, 9(1):102-108.
  47. Haq IU, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol J* 2012, 9:9
  48. Harmsen MM, Cornelissen JB, Buijs HE, Boersma WJ, Jeurissen SH, van Milligen FJ. Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *Int J Parasitol* 2004,34(6): 675–682

49. Hein WR, Harrison GBL. Vaccines against veterinary helminths. *Vet Parasitol* 2005, 132(3-4):217-222
50. Henry JT, Pratt D. The proteins of bacteriophage M13. *Genetics*, 1968, 62: 800-807.
51. Hernández GA, Valero ML, Sánchez PM, Oleaga A, Siles LM. Proteomic analysis of in vitro newly excysted juveniles from *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 2010, 172(2):121–128.
52. Hodgkinson J, Cwiklinski K, Beesley NJ, Paterson S, Williams JL. Identification of putative markers of triclabendazole resistance by a genome-wide analysis of genetically recombinant *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 2013; 1-11.
53. Hoe NL, Wan LK, Nathan S. Construction and characterization of recombinant single-chain variable fragment antibodies against *Toxoplasma gondii* MIC2 protein. *Parasitology* 2005, 131: 759-768.
54. Intapan MP, Tantrawatpan C, Maleewong W, Wongkham S, Wongkham C, Nakashima K. Potent epitopes derived from *Fasciola gigantica* cathepsin L1 in peptide-based immunoassay for the serodiagnosis of human fasciolosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005, 53(2):125-129.
55. Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci* 1988;4:181-186.
56. Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill T, Smooker P. Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet Parasitol* 2009, 160(3-4): 230–236.
57. Jedlina L, Kozak-Ljunggren M, Wedrychowicz H. In vivo studies of the early, peritoneal, cellular and free radical response in rats infected with *Fasciola hepatica* by flow cytometric analysis. *Exp Parasitol* 2011,128(3):291-7.
58. Karlsson F, Borrebaeck CA, Nilsson N, Malmberg-Hager AC. The mechanism of bacterial infection by filamentous phages involves molecular interactions between TolA and phage protein 3 domains. *J Bacteriol* 2003,185(8):2628-34.
59. Karrer KM, Peiffer SL, DiTomas ME. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993(90):3063-3067

60. Kesik M, Panasiuk LJ, Cieszczyk MK, Płucienniczak A, Wedrychowicz H. Enteral vaccination of rats against *Fasciola hepatica* using recombinant cysteine proteinase (cathepsin L1). *Vaccine* 2007, 25(18): 3619–3628.
61. Kishchenko G, Batliwala H, Makowski L. Structure of a foreign peptide displayed on the Surface of bacteriophage M13. *J Mol Biol* 1994, 241(2): 208-13.
62. Kretzschmar T, Rüdén VT. Antibody Discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol* 2002, 13: 598-602.
63. Lammas D.A y Duffus W .P. Identification of surface proteins of juvenile stages of *Fasciola hepatica*. *Res Vet Sci* 1985, 38(2),248-249.
64. Lavi T, Siman TR, Ankri S. EhMLBP is an essential constituent of the *Entamoeba histolytica* epigenetic machinery and a potential drug target. *Mol Microbiol* 2008, 69(1): 51-56.
65. Li W, Ran Y, Li M, Zhang K, Qin X, Xue X, Zhang C, Hao Q, Zhang W, Zhang Y. Mimotope vaccination for epitope-specific induction of anti-VEGF antibodies. *BMC Biotechnol* 2013,13:77: 3-10.
66. Liu Y, Brindley JP, Zeng Q, Li Y, Zhou J, Chen Y, Yang S, Zhang Z, Liu L, Cai L, McManus PD. Identification of phage display peptides with affinity for the tegument of *Schistosoma japonicum* schistosomula. *Mol Biochem Parasitol* 2011, 180(2): 86-97.
67. López AJ, Casanueva P, Nogal J, Arias M, Morrondo P, Diez BP, Hillyer GV, Martínez FAR, Muro A. Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Vet Parasitol* 2007, 145(3-4):287-296.
68. Malik P y Perham NH. Simultaneous display of different peptides on the Surface of filamentous bacteriophage. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (4): 915-16.
69. Martínez-Valladares M, Cordero-Pérez C, Rojo-Vázquez FA. Efficacy of an anthelmintic combination in sheep infected with *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and clorsulon. *Exp Parasitol* 2014, 136:59-62.
70. Mas-Coma S, Burgues MD, Esteban JG. Human fasciolosis. In: Fasciolosis. Ed. Dalton JP. Wallingford:CABI, 1999: 411-434.

71. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol* 2009, 69:41-146.
72. McConville M, Hanna REB, Brennan GP, Edgar HWJ, McConnell S, McCoy M, Castillo R, Hernández CA, Fairweather I. Impact of compound alpha treatment *in vivo* on egg production by the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 2012, 187(1-2):183-95.
73. McGonigle L, Mousley A, Marks NJ, Brennan GP, Dalton JP, Spithill TW, Day TA, Maule AG. The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *Int J Parasitol* 2008, 38(2): 149-55.
74. McManus DP, Dalton JP. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 2006, 133: S43-S61.
75. McVeigh P, Maule AG, Dalton JP, Robinson MW. *Fasciola hepatica* virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes Infect* 2012,14(4):301-310.
76. Meloen RH, Puijk WC, Sloodstra JW. Mimotopes: realization of an unlikely concept. *J Mol Recognit* 2000,13(6):352-9
77. Mohammed Ali N.A.K, Bogan J.A, Marriner S.E y Richards R.J. Pharmacokinetics of triclabendazole alone or in combination with fenbendazole in sheep. *J Vet Pharmacol Ther* 1986; 9(4): 442-445.
78. Moreno L, Ceballos L, Fairweather I, Lanusse C, Alvarez L. Time-course and accumulation of triclabendazole and its metabolites in bile, liver tissues and flukes collected from treated sheep. *Exp Parasitol* 2014, 136: 14-19.
79. Mulcahy G, O'Connor F, Clery D, Hogan SF, Dowd AJ, Andrews SJ, Dalton JP. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Res Vet Sci* 1999, 67(1): 27-33.
80. Munguía XJA. Impacto económico de la fasciolosis en México. Capítulo VIII. En *Fasciolosis*. Editorial Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, primera edición 2010; 181-200.

81. Munguía Xochihua JA. (2009). Evaluación *in vitro* de fasciolida experimental solubilizado con ciclodextrinas. Tesis Doctorado en FMVZ, UNAM.
82. Munguía-Xóchihua JA, Ibarra VF, Ducoing WA, Montenegro CN, Quiroz RH. Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and fecal analysis) in ruminants from a semi-desert area in the northwest of Mexico. *Parasitol Res* 2007, 101(1): 127-30
83. Muro A, Casanueva P, López AJ, Ramajo V, Martínez FRA, Hillyer VG. Identification of *Fasciola hepatica* recombinant 15-kDa fatty acid-binding protein T-cell epitopes that protect against experimental fasciolosis in rabbits and mice. *J Parasitol* 2007, 93 (4): 817-23.
84. Muro A, Ramajo V, López J, Simón F, Hillyer GV. *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol* 1997,69(3-4):219-229.
85. Noren KA, Noren CJ. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods* 2001 (23):169-178.
86. Novobilský A, Averpil HB, Höglund J. The field evaluation of albendazole and triclabendazole efficacy against *Fasciola hepatica* by coproantigen ELISA in naturally infected sheep. *Vet Parasitol* 2012, 190(1-2):272– 276.
87. Olaechea F, Lovera V, Larroza M, Raffo F, Cabrera R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet Parasitol* 2011, 178(3-4): 364–366
88. Ortiz Alegría LB. Identificación de proteasas liberadas por el miracidio de *Fasciola hepatica* durante el proceso de invasión a caracoles del género *Lymnae*. Tesis Maestría en FMVZ, UNAM, 2008, 1-75.
89. Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C , Cabrera M , Guzmán M, Lamenza P, Solana H. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an *in vivo* efficacy test in sheep. *Vet. Parasitol* 2013,195(1-2):1-13.
90. Phiri IK, Phiri AM, Harrison LJ. Serum antibody isotype responses of *Fasciola*-infected sheep and cattle to excretory and secretory products of *Fasciola* species. *Vet Parasitol* 2006,141(3-4):234-42.



91. Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun* 1999;67(4):1954-1961.
92. Piedrafita D, Estuningsih E, Pleasance J, Prowse R, Raadsma HW, Meeusen EN, Spithill TW. Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity in vitro against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infect Immun* 2007, 75(4):1954-1963.
93. Piedrafita D, Spithill TW, Dalton JP, Brindley PJ, Sandeman MR, Wood PR, Parsons JC. Juvenile *Fasciola hepatica* are resistant to killing in vitro by free radicals compared with larvae of *Schistosoma mansoni*. *Parasite immunol* 2000,22(6): 287-295.
94. Piedrafita D, Spithill TW, Smith RE, Raadsma HW. Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. *Parasite Immunol* 2010,32(8):572-581.
95. Quiroz RH. Fasciolosis, dicroceliasis y paramfistomosis. Capítulo 10. En *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Editorial LIMUSA, 1990; 231-259.
96. Quiroz RH<sup>a</sup>. Historia de la Fasciolosis y su huésped intermediario en México de 1879 a 2006. Capítulo I, en *Fasciolosis*. Editorial Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, primera edición 2010; 11-83.
97. Quiroz RH<sup>b</sup>. 2010. Estudios de la fasciolosis en México de 1879 a 2006. Editada por Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1<sup>ra</sup> Edic, México.
98. Rader C, Barbas FC. Phage display of combinatorial antibody libraries. *Curr Opin Biotechnol* 1997, 8: 503-508.
99. Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M. Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. *Curr Issues Mol Biol*. 2011;13(2):51-76
100. Riechmann y Holliger. The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell*, 1997, 90(2):351-360

101. Rivera N, Ibarra F, Zepeda A, Fortoul T, Cantó G, Hernández A, Castillo R. The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in their natural host. *Parasitol Res* 2005, 95(6): 379-382.
102. Robinson MW, Dalton JP, O'Brien BA, Donnelly S. *Fasciola hepatica*: the therapeutic potential of a worm secretome. *Int J Parasitol* 2013, 43(3-4):283-291.
103. Robinson MW, Hutchinson AT, Dalton JP, Donnelly S. Peroxiredoxin: a central player in immune modulation. *Parasite immunology* 2010, 32:305-313.
104. Robinson MW, Menon R, Donnelly SM, Dalton JP, Ranganathan S. An Integrated Transcriptomics and Proteomics Analysis of the Secretome of the Helminth Pathogen *Fasciola hepatica*. *Mol Cell Proteomics* 2009,8(8): 1891-1907.
105. Russel M, Lowman H.B, Clackson T. Introduction to phage biology and phage display. *Practical approach to phage display*, 2004: 1-26.
106. Sidhu SS. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2000 (11): 610-616.
107. Smeal M.G & Hall C.A. The activity of triclabendazole against immature and adult *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Aust Vet J* 1983, 60 (11): 329-331.
108. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion Surface. *Science* 1985,228(4705):1315-17.
109. Szalai K, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I. Vaccination strategies based on the mimotope concept. *G. Ital Dermatol Venereol.* 2008, 143(2):95-104.
110. Tiwari V, Liu J, Valyi NT, Shukla D. Anti-heparan sulfate peptides that block herpes simplex virus infection in vivo. *J Biol Chem* 2011, 286(28): 25406-25415.
111. Tkalcevic J, Ashman K y Meeusen E. *Fasciola hepatica*: Rapid identification of newly excysted juvenile proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 213 (1): 169-74.

112. Ullman GC, Frigotto L, Cooley RN. *In vitro* methods for peptide display and their applications. Briefings in functional genomics, 2011; 10 (3): 125-134.
113. Valero MA, Periago MV, Pérez CI, Rodríguez E, Perteguer JM, Gárate T, González BEM, Mas-Coma S. Assessing the validity of an ELISA test for the serological diagnosis of human fascioliasis in different epidemiological situations. Trop Med Int Health 2012, 17(5): 630-636.
114. Van Milligen FJ, Cornelissen JB, Bokhout BA. Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. Parasite Immunol 1999, 21(5):243-251.
115. Veleva AN, Cooper SL, Patterson C. Selection and initial characterization of novel peptide ligands that bind specifically to human blood outgrowth endothelial cells. Biotechnol Bioeng 2007, 98(1): 306-312.
116. Villa MA & Mendez MM. Protection and antibody isotype responses against *Fasciola hepatica* with specific antibody to pIII-displayed peptide mimotopes of cathepsin L1 in sheep. Vet J 2012, 194(1):108-112.
117. Villa MA, Quiroz RH, Correa D, Ibarra F, Reyes PM, Reyes VH, López VG, Gazarian K, Gazarian T, Alonson AR. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. Parasitology 2008, 135(12): 1437-1445.
118. Villa MA, Romero QH, Correa D, Alonso RA. Proteolytic activity in *Fasciola hepatica* is reduced by the administration of cathepsin L mimotopes. J Helminthol 2011, 85(1): 51-55.
119. Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A, Utrera-Quintana F, Carreón-Luna L. Cathepsin L1 mimotopes with adjuvant Quil A induces a Th1/Th2 immune response and confers significant protection against *Fasciola hepatica* infection in goats . Parasitology Res 2014, 113(1):243-50.
120. Welch BD, VanDemark AP, Heroux A, Hill CP, Kay MS. Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry, Proc Natl Acad Sci U S A 2007,104(43): 16828-16833.
121. Wijffels GL, Panaccio M, Salvatore L, Wilson L, Walker ID, Spithill TW. The secreted cathepsin L-like proteinases on the trematode, *Fasciola*

hepatica, contain 3-hydroxyproline residues. Biochemical J 1994a; 299:781-790.

- 122.** Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM, Spithill TW. *Fasciola hepatica*: Characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. Exp Parasitol 1998, 88(2): 85-94.
- 123.** Yoshihara S, Goto N. Distribution of antigens of *Fasciola gigantica* at various stages of development. Res Vet Sci 1993, 54(2): 252-255.
- 124.** Zumaquero RJL, Sarracent PJ, Rojas GR, Rojas RL, Martínez TY, Valero MA, Mas-Coma S. Fascioliasis and intestinal parasitoses affecting schoolchildren in Atlixco, Puebla State, Mexico: epidemiology and treatment with nitazoxanide. PLOS Negl Trop Dis 2013, 7(11):e2553.