



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

**DESARROLLO DE UN INMUNÓGENO QUIMÉRICO DE  
LEUCIN AMINOPEPTIDASA Y CATEPSINA L1 DE *Fasciola hepatica***

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

**KARINA HERNÁNDEZ GUZMÁN**

**TUTORES PRINCIPALES:**

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

**ALFREDO SAHAGÚN RUIZ  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

**MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN  
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**México, D.F.**

**Septiembre del 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.

## **JURADO DE EXAMEN:**

**Presidente:** Dr. Fernando Alba Hurtado

**Vocal:** Dra. Guillermina Ávila Ramírez

**Vocal:** Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

**Vocal:** Dr. Froylan Ibarra Velarde

**Secretario:** Dr. Héctor Manelic Quiroz Romero

**México, D.F., 2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Programa de Posgrado de Ciencias de la Salud y Producción Animal por permitirme continuar con mi proceso de aprendizaje.

Al CONACyT por las becas otorgadas 162799 y EXP. 5565 (8308), así como el apoyo recibido por el programa DGAPA-PAPIIT IN 219006, 219708, IT 230011.

Mi más sinceros agradecimientos al Dr. Héctor Quiroz Romero por la confianza y apoyo a lo largo del proyecto, además de los sabios consejos en los momentos críticos.

A mi comité tutorial: Dr. Alfredo Sahagún Ruiz y Dra. María Dolores Correa Beltrán, gracias por su tiempo, por sus oportunos comentarios y atenciones recibidas.

A mi jurado: Dr. Fernando Alba Hurtado (Presidente), Dr. Héctor Manelic Quiroz Romero (Secretario), Dra. Guillermina Ávila Ramírez (Vocal), Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito (Vocal), Dr. Froylan Ibarra Verlarde (Vocal) por las observaciones realizadas.

A mis compañeros del laboratorio Raúl Hernández, Karla Mollinedo y en especial a la QFB. Elvia Lazo por la orientación, la motivación y la amistad que creció en el grupo.

Al Biol. Alfonso Reyes, la Biol. Amanda Gayosso, MC Uziel Castillo, Dr. Armando Rodríguez, por las asesorías recibidas, las ideas sugeridas para resolver los problemas que se presentaban a cada paso.

MC Susana Flores por el apoyo recibido, al abrirme las puertas de tu casa y brindarme su amistad.

Al Dr. Antonio Vallecillo por la paciencia al explicarme, las enseñanzas que me compartiste y que me motivaron a hacer mejor las cosas, las pláticas interesantes que daban apertura al debate y a analizar las diferentes situaciones, por la amistad que nació en un momento crítico.

Al personal del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ por el apoyo en el uso de los diferentes equipos, el apoyo técnico y humanitario además del cobijo que me dieron durante mi estancia, en especial al Dr. José Ángel Gutiérrez, Dra. Rosa Elena Miranda, Dra. Beatriz Arellano, Dra. Rosa Elena Sarmiento, Dra. Carolina Segundo, Dr. Alfredo Castañeda, Dr. José Cano, MVZ. Antonia Mojica, Lupita Patiño, Rosalba Rincón, Mario Cruz, Pablo Vera, Eduardo Miranda, Uriel González, mis compañeros y amigos con los que compartí

agradables pláticas, angustias y risas: Uziel Castillo, Susana Flores, Yuliett Méndez, Jorge Alva, Ariel Sánchez, Ramón Torres, Yanela, David Vallejo, Jesús Camarillo, Cecilia Quiroga, Andira Hernández Susana Jaimes, Verónica Rojas, Martha Juárez, Marlene Maya, Fabiola Ávila, Ulises Nader, Anaid Maciel, Mario Palma, Marina Orozco, Carlos Carmona, Olivia Castillo, Ninnet.

Al Departamento de Parasitología de la FMVZ por las facilidades durante el doctorado al Dr. Antonio Figueroa, Dra. Irene Cruz, Dr. Froylán Ibarra, MVZ. Alberto Ramírez, Irma Hernández, Mario Valencia y mis compañeras del camino Perla Acevedo y María Cervantes.

Al Dr. Javier Munguía Xochihua por las palabras de apoyo y sus consejos, así como a la Biol. Edith Medina Escutia por las asesorías y amistad.

A la Dra. Clara Espitia y la MC. Cristina Parada del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su valioso aporte técnico, apoyo en equipo de laboratorio, instalaciones y material biológico, además de la amistad que empezamos a cultivar, así como a las compañeras del laboratorio Gabriela, Lucero, Edén y Pedro.

A la Dra. Guillermina Ávila y el Dr. Joel Mosqueda por las asesorías técnicas así como los consejos que me brindaron durante el desarrollo del proyecto, gracias.

Al MVZ. Luis Miguel Flores del Departamento de Patología por el apoyo con el procesamiento de las muestras, así como la MVZ Grisel Anaya y su equipo, a los estudiantes .Areli Azcatl y Jesús Guzmán por el apoyo durante los muestreos.

Al IAZ. Abner Fraga por permitirme muestrear los bovinos del rancho Chacuaro en Chiquimitio Michoacan.

A los amigos que me han acompañado, desde la infancia, la familia de Chapingo y las nuevas amistades (Velia, Paty) por las palabras de apoyo y el cariño que se ha mantenido a pesar de las distancias y las dificultades, gracias.

# Dedicatorias

A mis padres que no han dejado de apoyarme y tiene las palabras justas para seguir motivandome a ser un mejor humano, Alfredo y Sara.

A mis hermanos que me procuran con su cariño Luis y Jorge.

Constanza y Valeria

A tí que has caminado a mi lado, me has ayudado a levantarme cuando he tropezado y  
endulzas los momentos difíciles que hemos superado  
Pedro

Tosca

## RESUMEN

Leucina aminopeptidasa (LAP) es una exopeptidasa que se localiza en las células epiteliales en el tracto digestivo de *Fasciola hepatica*, ayuda a catabolizar los péptidos generados por la degradación de proteínas, mientras que la Catepsina L1 (CL1) es una endoproteasa involucrada en la evasión del sistema inmunológico, ayuda al parásito a migrar y le permite obtener alimento. Debido a la importancia de estas enzimas en la biología del trematodo, se seleccionaron sus regiones más antigénicas *in silico*, la cual incluye los epitopos DGRVVHLKY en la posición 54-62, VTGYTVHSGSEVELKNLV en la posición 119-137 y YQSQTCLPF en la posición 161-169; el análisis de estructuras secundarias mostró 3 hélices alfa, 8 plegamientos beta y 11 torsiones, además los dominios catalíticos están incompletos, por lo que no se espera actividad enzimática. La unión de las secuencias se realizó mediante un PCR sobrepuesto y se subclonó en el sistema pET15b/Rosetta para expresar una proteína quimérica de ~25 kDa, a la que se le denominó rFhLAP-CL1. Se demostró la antigenicidad de la proteína quimérica rFhLAP-CL1, al ser reconocida por los anticuerpos de bovinos con infección natural del trematodo en un *western blot*. También se comprobó la inmunogenicidad de rFhLAP-CL1 al producir anticuerpos específicos en un modelo de conejos donde se obtuvo un título final de 1:10,000. La proteína quimérica rFhLAP-CL1 puede ser utilizada para el diagnóstico de la fasciolosis, y dada su capacidad inmunogénica, podría evaluarse como vacuna subunitaria.

**Palabras clave:** Leucina aminopeptidasa, Catepsina L1, *Fasciola hepatica*, inmunogénico, antigénico.

## ABSTRACT

Leucine aminopeptidase (LAP) is an exopeptidase localized to the epithelial cells lining the gut of the adult fluke, it was postulated that this enzyme participates in the final breakdown of small polypeptides and dipeptides previously generated by cathepsin L, whereas cathepsin L1 (CL1) is an endoprotease involved in the evasion of the immune system, helps parasites migrate and obtain food. Due to the importance of these enzymes were analysed *in silico* to design a chimeric protein containing the most antigenic sequences of LAP (GenBank AAV59016.1; amino acids 192-281) and CL1 (GenBank CAC12806.1; amino acids 173-309). The cloned 681-bp chimeric fragment contains 270 bp from LAP and 411 bp from CL1, comprising three epitopes: DGRVVHLKY (amino acids 54-62) from LAP, VTGYTIVHSGSEVELKNLV (amino acids 119-137) and YQSQTCLPF (amino acids 161-169) from CL1. Secondary structure analysis showed three alpha helices, eight beta-pleated sheets, and eleven twists. The catalytic domains are incomplete therefore, no enzyme activity is expected. The sequences were joined by overlapping PCR, and the product was subcloned into the pET15b/Rosetta system to express a chimeric protein of ~25 kDa, which was called rFhLAP-CL1. The chimeric protein showed antigenic and immunogenic properties, was recognized in *Western blot* assay using *F. hepatica*-positive bovine sera and induced strong specific antibody responses following immunization in rabbits. The newly generated chimeric protein may be used as a diagnostic tool for detection of antibodies against *F. hepatica* in bovine sera and as immunogen to induce protection against bovine fasciolosis.

**Keywords:** Leucine aminopeptidase, Cathepsin L1, *Fasciola hepatica*, immunogenic, antigenic.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>JURADO DE EXAMEN</b> .....	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIAS</b> .....	<b>v</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. Antecedentes</b> .....	<b>1</b>
1.1. Descubrimiento del ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i> .....	1
1.1.1. Ciclo de vida de <i>F. hepatica</i> .....	3
1.2. Epidemiología de la fasciolosis en México .....	6
1.2.1. Frecuencia de la fasciolosis en México.....	6
1.2.3. Impacto económico de <i>F. hepatica</i> .....	9
1.2.4. Control de la fasciolosis .....	11
1.3. Fisiopatología de la fasciolosis en mamíferos .....	15
1.4. Inmunoparasitología de la fasciolosis.....	18
1.4.1. Respuesta inmune contra <i>F. hepatica</i> .....	18
1.4.2. Mecanismos de evasión de los parásitos .....	20
1.4.3. Inmunomodulación de <i>F. hepatica</i> en el hospedador .....	200
1.4.4. Inducción de inmunidad contra <i>F. hepatica</i> .....	23
1.4.5. Importancia de LAP y CL1 .....	26
1.5. Vacunas recombinantes .....	29
1.6. Proteínas quiméricas recombinantes .....	30
1.7. Justificación .....	32
1.8. Hipótesis.....	33
1.9. Objetivo general .....	33
1.9.1. Objetivos específicos .....	33
<b>2. Material y Métodos</b> .....	<b>34</b>
2.1. Diseño de la proteína quimérica .....	34
2.1.1. Análisis bioinformático .....	34
2.1.2. Diseño de los iniciadores para Leucina aminopeptidasa y Catepsina L1 .....	35
2.2. Construcción de la proteína quimérica .....	38

2.2.1. Procesamiento del material biológico .....	38
2.2.2. Extracción de RNA.....	38
2.2.3. Síntesis de cDNA (DNA complementario) .....	39
2.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	41
2.2.5. Proceso de clonación.....	43
2.2.5.1. Clonación en el vector de amplificación.....	43
2.2.5.2. Extracción del plásmido para su secuenciación.....	44
2.2.5.3. Subclonación en el vector de expresión.....	46
2.3. Expresión y purificación de la proteína quimérica rFhLAP-CL1.....	47
2.3.1. Condiciones óptimas de expresión .....	47
2.3.2. Purificación de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 .....	49
2.3.2.1. Preparación de las muestras.....	49
2.3.2.2. Purificación de las muestras con la proteína rFhLAP-CL1.....	50
2.3.3. Diálisis de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 .....	50
2.3.4. Gel de acrilamida y <i>western blot</i> para evaluar a la proteína quimérica rFhLAP-CL1 .....	51
2.4. Funcionalidad de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 .....	52
2.4.1. Producción de anticuerpos contra rFhLAP-CL1.....	52
2.4.2. Reconocimiento de rFhLAP-CL1 por anticuerpos de bovinos en pastoreo infectados con <i>F. hepatica</i> .....	55
<b>3. Resultados.....</b>	<b>56</b>
3.1. Diseño de la proteína quimérica.....	56
3.2. Construcción de la proteína quimérica .....	60
3.2.1. Extracción de RNA por TRIzol .....	60
3.2.2. Síntesis de cDNA.....	61
3.2.3.....	62
3.2.4.....	62
3.3. Condiciones de expresión de la proteína quimérica rFLAP-CL1 .....	67
3.4. Funcionalidad de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 .....	71
3.4.1. Producción de anticuerpos contra rFhLAP-CL1.....	71
3.4.2. Reconocimiento de rFhLAP-CL1 por anticuerpos de bovinos en pastoreo infectados con <i>F. hepatica</i> . .....	71
<b>4. Discusión.....</b>	<b>74</b>
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>80</b>
<b>6. Referencias.....</b>	<b>81</b>

**ANEXO 1 .....97**  
**ANEXO 2.....101**  
**ANEXO 3.....102**

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Frecuencia de fasciolosis bovina en la república mexicana. ....	7
Cuadro 2. Frecuencia de fasciolosis en ovinos y caprinos en la república mexicana. ....	8
Cuadro 3. Eficacia de compuestos químicos contra <i>F. hepatica</i> en bovinos y ovinos .....	14
Cuadro 4. Proteínas de <i>F. hepatica</i> evaluadas como vacunas. ....	28
Cuadro 5. Iniciadores para amplificar las regiones de leucina aminopeptidasa y catepsina L1 de <i>F. hepatica</i> . ....	37
Cuadro 6. Componentes de la reacción transcripción inversa (1ra parte). ....	40
Cuadro 7. Componentes de la reacción transcripción inversa (2da parte). ....	40
Cuadro 8. Componentes de las reacciones de las PCR independientes de LAP y CL1. ....	42
Cuadro 9. Condiciones del termociclador para amplificar los fragmentos de leucina aminopeptidasa, catepsina L1 y la secuencia quimérica LAP-CL1. ....	42
Cuadro 10. Material utilizado en el proceso de clonación y expresión de la proteína quimérica rFhLAP-CL1. ....	45
Cuadro 11. Concentración de RNA total de muestras de <i>F. hepatica</i> adulto. ....	60
Cuadro 12. Eliminación de huevos de <i>F. hepatica</i> de los bovinos muestreados en Chiquimitio Michoacán. ....	73

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>F. hepatica</i> .....	5
Figura 2. <i>F. hepatica</i> modula la respuesta inmune del hospedador.....	22
Figura 3. Diseño de la secuencia quimérica de leucina aminopeptidasa y catepsina L1 de <i>F. hepatica</i> .....	36
Figura 4. Esquema de inoculación con la proteína quimérica rFhLAP-CL1 en conejos para la producción de anticuerpos.....	54
Figura 5. Predicción antigénica con el programa de kolaskar y tongaonkar.....	57
Figura 6. Predicción de las estructuras secundarias de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 con el programa PSIPRED.....	58
Figura 7. Análisis de los dominios enzimáticos con el programa Pfam.....	59
Figura 8. Integridad de las muestras de RNA total y de DNA complementario de <i>F. hepatica</i> en un gel de agarosa al 1.5%.....	61
Figura 9. Amplificación de los productos de LAP, CL1 y rFhLAP-CL1 por PCR en un gel de agarosa al 1.5%.....	63
Figura 10. Diagrama de la secuencia quimérica de leucina aminopeptidasa y catepsina L1 de <i>F. hepatica</i> .....	64
Figura 11. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica rFhLAP-CL1.....	65
Figura 12. Mapa de sitios de restricción de la secuencia quimérica LAP-CL1 con base en el programa NEB cutter.....	66
Figura 13. Cinética de crecimiento de las cepas recombinantes BL21 y Rosetta..	68
Figura 14. Expresión de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 utilizando el sistema de pET15b/Rosetta (DE3).....	70
Figura 15. Reconocimiento de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 por el suero de conejos inmunizados con 100 µg de la proteína purificada en <i>Western blot</i> ..	72
Figura 16. Reconocimiento de rFhLAP-CL1 por los anticuerpos de bovinos en pastoreo infectados con <i>F. hepatica</i> .....	74

## ABREVIATURAS

LAP	Leucina aminopeptidasa
CL1	Catepsina L1
CL2	Catepsina L2
CL3	Catepsina L3
CL5	Catepsina L5
CB	Catepsina B
GST	Glutación-S-transferasa
Pgp	P-glicoproteína-ligando
ADCC	Citotoxicidad dependiente de anticuerpos
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
C3	Complemento
INF $\gamma$	Interferón gama
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral
Th1	Linfocito T cooperador 1
Th2	Linfocito T cooperador 2
Treg	Linfocitos T reguladores
FABP	Fatty-acid-binding proteins; proteínas de union a ácidos grasos
Fh/SMIII	<i>Fasciola hepatica/Schistosoma mansoni</i> III
Fh15	<i>Fasciola hepatica</i> 15
ADAD	sistema de vacunación Adyuvante Adaptación
Fh12	<i>Fasciola hepatica</i> 12
SM	<i>Schistosoma mansoni</i>
ACF	adyuvante completo de Freund
Hb	Hemoglobina
SAP	saposin-like protein; saponinas
Prx	Peroxirredoxina
TGR	Tiorredoxina-glutación reductasa
PGK	Fosfoglicerato quinasa
PI	Pos-infección
fw	forward
rv	reversa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

TAE	Amortiguador de Tris-Acetato-EDTA
RT	Transcriptasa reversa
<i>Xho</i> I	Enzima de restricción aislada de <i>Xanthomonas holcicola</i>
<i>Hind</i> III	Enzima de restricción aislada de <i>Haemophilus influenzae</i>
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
RNA	Ácido ribonucleico
DNAc	Acido desoxirribonucleico complementario
<i>Bgl</i> II	Enzima de restricción aislada de <i>Bacillus globigii</i>
<i>Nde</i> I	Enzima de restricción aislada de <i>Neisseria denitrificans</i>
dNTPS	deoxiribonucleotidos-trifosfato
g	gravedad
rpm	revoluciones por minuto
h	horas
mm	milímetros
μL	micro litros
ng	nano gramos
μg	micro gramos
kg	kilogramos
mM	mili Molar
M	Molar
V	Volts
IFA	Adyuvante incompleto de Freund
MM	marcador molecular
kDa	kilo Daltons
pb	Pares de bases
LB	Medio de cultivo Luria-Bertoni
TB	Medio de cultivo Terrific Broth
SOB	Medio de cultivo Super Optimal Broth
DO	Densidades ópticas
TEC	Tasa específica de crecimiento
TD	Tasa de duplicación
AST	Aspartatoaminotransferasa
GGT	γ-Glutamil transferasa
GLDH	Glutamato deshidrogenasa
FABP	Proteínas de unión a ácidos grasos
Aa	Aminoácidos
Hb	Hemoglobina
E-S	excreción-secreción



## **1. Antecedentes**

La fasciolosis es ocasionada por los trematodos *Fasciola hepatica* y *F. gigantica*; en México sólo se encuentra la primer especie y afecta a animales en pastoreo como bovinos, ovinos, y caprinos, esporádicamente infecta animales silvestres como liebres, ciervos, conejos, nutrias, cerdos, caballos y ocasionalmente infecta al humano (Soulsby, 1987).

La importancia de esta parasitosis se debe a la repercusión económica en los sistemas de producción pecuaria, los decomisos de hígados así como la afectación de los parámetros productivos, por otra parte en el área de salud humana, la fasciolosis es reconocida como una zoonosis emergente. En el reporte de la Organización Mundial de la Salud (WHO 2007), se estimó que existen entre 2.4 y 17.0 millones de personas infectadas, principalmente en Bolivia, Perú, Egipto, Vietnam y Cuba. En México aunque existen pocos estudios, se detectó una seroprevalencia entre 0.13 y 1.9% en poblaciones infantiles en el Distrito Federal (Fernández *et al.*, 1999, Gutiérrez *et al.*, 2000, Martínez-Barbabosa *et al.*, 2006).

### **1.1. Descubrimiento del ciclo de vida de *Fasciola hepatica***

Demostrar el ciclo biológico de fasciola fue un gran reto, la primera vez que se mencionó la infección por *F. hepatica* fue en 1379 por Jean de Brie, quien por encargo del rey Carlos V de Francia, escribió un tratado sobre el manejo de los rebaños de ovinos y la producción de lana. En 1523, el abogado inglés Sir Anthony Fitzherber utilizó el término “flokcs” que después se modificaría por “flukes”; el nombre de “fluke” deriva del antiguo vocablo anglosajón “floc”, que significa “flounder” (un tipo de pez). Por otra parte, los antiguos tratados españoles describieron al trematodo con nombres como “coscojo, caracolillo o palomita”. La aportación de Francesco Redi en 1668 fue puntualizar que la forma del trematodo era semejante al del pez llamado lenguado y enfatizó su localización en los ductos

biliares, mientras que Godefridus Bidloo en 1698, describió el tamaño, forma, color así como algunos órganos internos y reconoció que la fasciola es hermafrodita (Rojo–Vázquez *et al.*, 2012).

En 1800 Zeder observó la incubación y eclosión de un huevo de trematodo, y siete años más tarde, Nitzsch observaría una cercaria en el momento que perdió la cola y quedaba cubierta por una sustancia gelatinosa. Debido a que se creía que los huevos eran la fase infectante, en 1862 Simonds intentó infectar una oveja con varios miles de huevos, seis meses más tarde sacrificó al ovino pero no encontró algún parásito en el hígado. Entonces Von Siebold empleó la teoría de Steenstrup (Principio de alternación de generaciones) y llegó a una nueva conjetura: la fase que se encuentra en los animales invertebrados es la fase infectante de los vertebrados, y es en éstos donde se encuentra la fasciola sexualmente madura. Teóricamente el ciclo biológico de los trematodos se fue entendiendo, así en 1855 Valette publicó los resultados del ciclo de otro trematodo: infectó aves con cercarias enquistadas procedentes de caracoles y éstas alcanzaron la madurez sexual dentro de las aves (Flores 1986).

Otra aportación importante la realizó Weinlard en 1875 cuando describió la cercaria que corresponde a *F. hepatica* y sugiere que dicha fase se desarrolla en *Lymnaea truncatula*. Más adelante, en 1857 Wagener observó la penetración del miracidio en el caracol así como su desarrollo en redia; a finales de 1882 y principios de 1883 Leuckart y Thomas trabajando de forma separada dan a conocer que *Lymnaea truncatula* es el hospedador intermedio de fasciola, logrando describir el ciclo completo de *F. hepatica* (Andrews 1999).

### 1.1.1. Ciclo de vida de *F. hepatica*

Los huevos de *F. hepatica* son ovalados, de color dorado debido a la proteína quinona y tienen un opérculo en un extremo, éstos pasan de la vesícula biliar al intestino y salen con las heces (Dunn 1983). Un trematodo adulto puede producir de 2000-2500 huevos por día de manera inconstante, con variación estacional en primavera y otoño (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

Cuando el huevo eclosiona, una larva ciliada llamada miracidio sale por el opérculo y nada hasta encontrar un molusco de los géneros *Lymnaea*, *Fossaria* o *Pseudosuccinea*; antes de las 24 horas, penetra en él y continua su desarrollo. Dentro del molusco el miracidio da lugar al esporocisto joven que llega a medir 1 mm de largo; éste puede formar hasta tres generaciones de redias hijas, que llegarán a la fase de cercarías (Dunn 1983, Soulsby 1987).

En seguida las cercarias que ya tienen un sistema digestivo no funcional, un sistema excretor y dos ventosas, son expulsadas al exterior, nadan un par de horas hasta encontrar una superficie firme y se fijan a las plantas acuáticas, incluso debajo del nivel del agua. Inmediatamente pierden la cola y se enquistan, transformándose en metacercarias, para ser infectantes deben transcurrir de 2 a 3 días (Dunn 1983).

Finalmente la infección del hospedador definitivo tiene lugar durante el pastoreo al ingerir la fase infectante en las plantas, el agua contaminada, en el heno o silos mal preparados. Es importante mencionar que no todas las metacercarias logran implantarse en el hígado, algunas se pierden en las heces o durante la migración, aproximadamente el 40% llegan a implantarse. La infectividad de la metacercaria está influenciada por la temperatura ambiental durante su desarrollo dentro del molusco y al momento de enquistarse (Rojo-Vazquez *et al.*, 2012).

Cuando la metacercaria atraviesa el tracto digestivo y llega al rumen, empieza el proceso de desenquistamiento; el parásito detecta la temperatura de 39°C así como las concentraciones elevadas de dióxido de carbono; el ambiente reductor más el estímulo de la bilis ocasionan que la adolescaria emerja en el intestino. En las siguientes 2 horas, el trematodo recién desenquistado penetra la mucosa intestinal y después de 9 horas se encuentra en la cavidad abdominal. Comúnmente el parásito inmaduro cruza el peritoneo, pero en ocasiones extraordinarias viaja por los vasos sanguíneos y llega a otros órganos como el pulmón, los nódulos linfáticos, el tejido subcutáneo o el útero. El periodo errante en cavidad abdominal es de 6 días, mientras que el tiempo que tarda en migrar a través del parénquima es de aproximadamente 7 semanas. Al llegar a los conductos biliares en la octava semana posinfección en ovinos y en la décima semana en bovinos alcanza la madurez sexual, y enseguida aparecen los primeros huevos en la bilis y después en heces (Dunn 1983, Soulsby 1987, Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez 1999).

Los parásitos adultos tienen forma de hoja y su tamaño varía dependiendo del tipo de hospedador (ratón, conejo, bovino o caballo); de forma general se menciona que miden aproximadamente 5 cm de largo por 1.5 cm de ancho; son de color gris y tienen una cutícula cubierta de espinas dispuestas en dirección posterior (Dunn 1983), ver Figura 1.

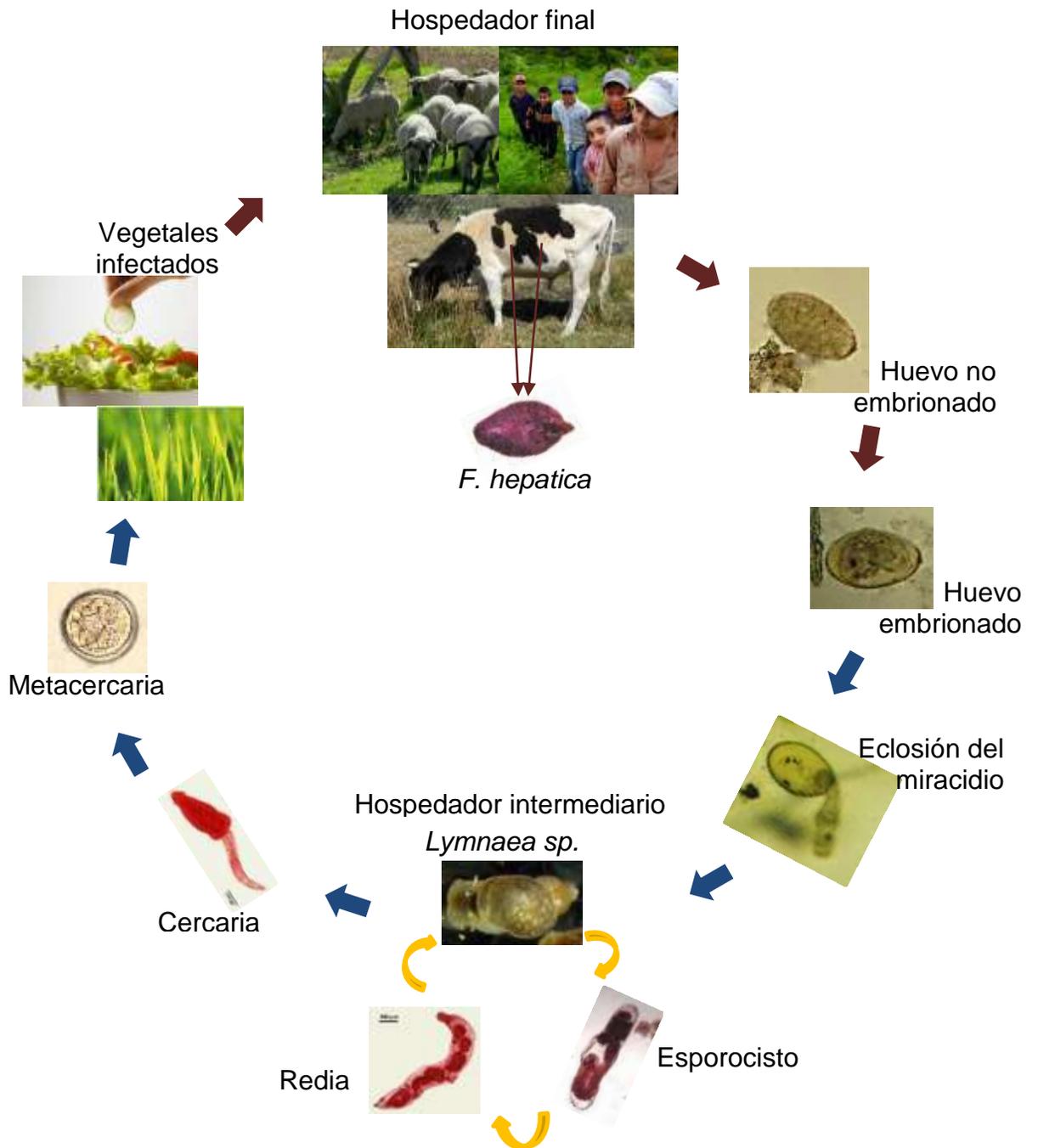


Figura 1. Ciclo de vida de *F. hepatica*.

## **1.2. Epidemiología de la fasciolosis en México**

La epidemiología de la fasciolosis en ganado, además de estudiar la enfermedad en la población y los factores que determinan la presencia de ésta, abarca el estudio de la prevalencia e intensidad de la infección, así como su impacto clínico, económico y control en los animales.

### **1.2.1. Frecuencia de la fasciolosis en México**

En el Cuadro 1 se muestran los datos de frecuencia de la fasciolosis bovina en los estados de la República Mexicana (Quiroz 2010). A pesar de que se han realizados algunos estudios en México, éstos no son suficientes o no son recientes; adicionalmente la frecuencia de la fasciolosis varía con la precipitación pluvial anual, humedad y temperatura, factores que afectan al hospedador intermediario.

Los datos muestran una frecuencia muy baja en las penínsulas de Baja California y en la de Yucatán; las condiciones geográficas no son adecuadas para el desarrollo de la fasciolosis, es probable que los casos reportados se debieran a animales infectados que provenían de otros estados. En los estados de Sonora, Chihuahua, Nuevo León, Zacatecas y Durango se observaron tanto frecuencias bajas hasta del 100%; la explicación es que a pesar de las condiciones semidesérticas, existen microclimas favorables para el desarrollo de la fasciolosis en algunos de sus municipios. Mientras que los estados con una frecuencia moderada son Guanajuato, Tlaxcala, Morelos, Puebla y Oaxaca; por último los estados con una frecuencia alta fueron Hidalgo, Tabasco, Estado de México, Michoacán y Veracruz (Quiroz 2000; 2010).

En los estudios realizados en ovinos y caprinos, aunque existe un menor número de estudios, se observa una semejanza con la frecuencia de la fasciolosis en bovinos; finalmente es necesario realizar más estudios en cada zona productiva que permitan realizar programas de manejo en el ganado (Figuroa, 2010) ver Cuadro 2.

Cuadro 1. Frecuencia de fasciolosis bovina en la república Mexicana.

<b>Rastro</b>	<b>Diagnóstico en</b>	<b>Periodo de estudio</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
Aguascalientes	Hígado	1955 a 1987	2.86 – 6.98
Baja California	Hígado	1979 a 1987	0.15 – 26
Campeche	Hígado	1956	0.65
Chiapas	Hígado, heces	1955 a 1999	0.08 – 100
Chihuahua	Hígado	1956 a 1987	0.68 – 1.73
Durango	Hígado, heces, ELISA	1956 a 1992	3.75 – 100
Ferrería, Lab. de Palo alto, Coapa, D.F.	Hígado	1965 a 1987	3.40 – 65
Estado de México	Hígado, heces, ELISA, pulmón, intradermo	1966 a 1989	1.2 – 100
Guanajuato	Hígado, heces	1956 a 1994	4.5 – 68.42
Guerrero	Hígado	1982 a 1987	0.30 – 10.11
Hidalgo	Hígado, heces, ELISA	1956 a 1995	2.2 – 100
Jalisco	Hígado, heces	1964 a 1993	0.29 – 70
Michoacán	Hígado, heces, intradermo	1970 a 1982	9 – 89
Morelos	Hígado, heces	1956 a 1989	0 – 90
Nayarit	Hígado, heces, Elisa	1997	29 – 94
Nuevo León	Hígado, heces	1979 a 1987	0.34 – 1.59
Oaxaca	Hígado, heces	1956	21
Puebla	Heces	1992	31.04
Querétaro	Hígado	1956	5.4
San Luis Potosí	Hígado	1956 a 1992	2.02 – 21
Sinaloa	Hígado, heces	1956 y 1974	1.35 – 19
Sonora	Hígado, heces, suero	1956 a 1999	0.01 – 26
Tabasco	Hígado, heces	1956 a 1992	0.44 – 100
Tamaulipas	Hígado, heces	1956 y 1984	0.84 – 2.5
Tlaxcala	Heces	1956, 1987, 1989	0 -100
Veracruz	Hígado, heces, pulmones, intradermo	1956 a 2002	0 – 99
Zacatecas	Hígado, heces	1979 a 1982	2.38 – 48.59

Adaptado de Quiroz, 2010.

Cuadro 2. Frecuencia de fasciolosis en ovinos y caprinos en la república Mexicana.

Estado	Especie	Diagnóstico en:	Período	Frecuencia (%)
Chiapas	Ovino	Heces	1990	Lluvia 26 Sequía 9.5
	Ovino		1970 a 1974, 1978 a 1979	0.06 – 0.017 0.83
Distrito Federal		Hígado		
	Caprinos		1978 a 1979	3.11
Estado de México	Ovinos/ Caprinos	Hígado, heces	1965 a 1968 1973 1980 a 1987	88 – 100 Presencia 1.57 – 100
Guerrero	Caprinos	Hígado	1987	4
	Ovinos		1974	100
Hidalgo	Caprinos	Heces	1987	Presencia
Jalisco	Caprinos	Heces	1984 a 1985	0
	Ovinos		1994	14.28 – 38.10
Morelos	Caprinos	Heces	1995	96.6
Puebla	Ovinos	Heces	1968, 1989, 1995	6.25 – 100
Sinaloa	Caprinos	Hígado, heces	2006	22.8
	Ovinos	Heces suero	1999	25 -35 19.4
Sonora	Caprinos	Hígado	1991, 1993, 1996	18.6, 13.16, 17.8
Tlaxcala	Ovinos	Heces	1968 1990 - 1993	0 – 5 19.37 – 100

Adaptado de Figueroa, 2010.

### 1.2.3. Impacto económico de *F. hepatica*

Evaluar el impacto económico de las parasitosis en los sistemas de producción pecuario no es sencillo, ya que es común encontrar multiparasitosis lo cual dificulta la evaluación de su impacto por separado.

En el caso de *F. hepatica*, las pérdidas económicas se clasifican en directas: muertes y decomisos de hígados en los rastros; e indirectas, con mayor dificultad para evaluarlas, debido a que en ocasiones la infección es asintomática y produce pérdidas en la productividad: mala conversión alimenticia, baja producción de leche, mala calidad de la lana, problemas reproductivos por citar algunos ejemplos.

Existen algunas estimaciones económicas como la de Bennett *et al.*, 1999 en Gran Bretaña, quienes señalaron que dependiendo de la prevalencia las pérdidas oscilaron entre 10.5 y 77.0 millones de euros; en otro estudio realizado por Schweizer *et al.*, (2005) en Suiza se estimó que las pérdidas fluctuaron entre 22.0 a 92.0 millones de Euros por año, lo cual representa una media de 299.0 Euros por animal infectado, también concluyeron que las pérdidas se incrementan cuando se reduce la producción de leche y la fertilidad, mientras que las pérdidas menores se observaron en la producción de carne y el decomiso de hígados.

En un estudio realizado en Irán, detectaron que el decomiso de hígados por parásitos en un rastro representó el 54.1% (*F. hepatica*, *Echinococcus granulosus*, *Dicrocoelium dendriticum* o la combinación de éstos) y el 18.6% fue por causa de *F. hepatica* (Borji *et al.*, 2012). En el caso de México se han estimado pérdidas de 218.8 millones de dólares en Tabasco (Rangel y Martínez, 1994), de 124.3 a 138.0 millones de dólares en Sinaloa, y más de 53.7 millones de dólares en Puebla mientras que fue de 13.7 y 14.5 millones de dólares en Tampico, Tamaulipas y en el Estado de México respectivamente (Caicedo *et al.*, 2011).

Adicionalmente se ha estudiado el efecto de la fasciolosis en los parámetros productivos, así se encontró que la reducción de la ganancia de peso en rumiantes tiene dos causas aparentes; una es la disminución de la conversión del alimento y otra la anorexia, que en ovejas se acentúa entre la semana 8 y 14 posinfección, momento en que se ocasiona un daño en el parénquima hepático como resultado de la migración del trematodo (Ferre *et al.*, 1994); mientras que en ganado vacuno coincide con la llegada de los parásitos a los conductos biliares en la semanas 6 a 7 posinfección (Behm y Sangster, 1999). También el trematodo disminuye la ganancia de peso diaria entre 8 y 9% en infecciones leves sin presencia de signos clínicos y de 20 a 28% en casos graves. Otro punto importante, es la calidad de la dieta, se observó que en dietas deficientes de proteína, las pérdidas de peso fueron mayores (Ross, 1970; Dargie, 1987).

En la calidad y crecimiento de la lana, en la raza Merino el trematodo causó una reducción del 20 al 30% en la producción, desde la semana 6 posinfección aun cuando los animales no mostraron signos aparentes de enfermedad, las características de la lana afectadas son: el diámetro de la fibra, la longitud y la elasticidad. Este fenómeno es consecuencia de la alteración hepática, con una baja tasa de hidrogenación y conjugación del cortisol, elementos que influyen de forma negativa en la producción de lana (Roseby, 1970).

La producción de leche en bovinos se ve perjudicada cuando la prevalencia de la fasciolosis es >25%; también se observó que animales infectados con el trematodo, dejan de producir de 1.5 a 2.1 kg de leche por vaca por día (Mezo *et al.*, 2011); en otro estudio se examinó el efecto del tratamiento de closantel en vacas con fasciolosis, éstas incrementaron su producción en 0.99 kg/día, pero no se encontraron diferencias con el grupo no infectado en cuanto a la cantidad de proteína, grasa ni en el conteo de células somáticas en leche (Charlier *et al.*, 2012).

Se ha planteado que hembras con fasciolosis pueden tener problemas de concepción, preñez y la tasa de parto debido a un estrés nutricional (Dargie, 1987); además se altera la edad a la pubertad, como resultado de una reducción en el metabolismo de las hormonas esteroides por el hígado (Paczkowski, 2004). López-Díaz *et al.*, 1998 observaron un retraso de 39 días en la presencia de su primer estro en vaquilla prepúberes infectadas, también presentaron altos niveles de estrógeno y bajos niveles de progesterona, por otra parte Martínez-Olvera *et al.*, 2013, evaluaron ovejas bajo condiciones de infección natural y no observaron alteración en la presentación, inicio y duración del estro, sin embargo detectaron concentraciones elevadas de estradiol durante la fase de estro. La conclusión de Kaplan (2001) fue que la fasciolosis afecta el balance y metabolismo de las hormonas sexuales.

#### **1.2.4. Control de la fasciolosis**

Para controlar la fasciolosis se deberá considerar el tipo de terreno agrícola, las condiciones climáticas así como los factores socio-económicos del productor, además se sugiere trabajar más en prevenir la infección. Se recomienda mejorar el drenaje de los suelos y la limpieza de los canales de riego para evitar la presencia de los hospedadores intermediarios; otra recomendación es cercar las áreas contaminadas con caracoles y evitarlas; pero si se pastorean las áreas contaminadas deberá ser en menor tiempo, otra opción es la rotación de potreros postratamiento (Boray, 2007). También se considera el control del caracol por métodos químicos, aunque es poco viable y dañino para el ambiente; recientemente se está evaluando el control biológico con hongos como *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium chlamydosporium* o *Pochonia chlamydosporia* (De *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2013).

El método más efectivo es el tratamiento con antihelmínticos para reducir el número de parásitos dentro del hospedador final y de huevos en los pastos; a

continuación se describen brevemente los fasciolicidas (Ibarra, 2010), ver Cuadro 3:

1. Fenoles halogenados: nitroxinil (Trodax). Son efectivos contra las formas maduras, pero no contra las formas larvarias inmaduras, se sugiere que el modo de acción se debe a una inhibición de algunos iones, lo que conlleva a cambios en la permeabilidad de la membrana muscular de las células para ciertos iones, en particular el potasio.
2. Salicilaníidas: closantel (Flukiver), oxiclosanida y rafoxanida (Ranizole); este grupo de fasciolicidas tienen actividad contra los trematodos adultos e inmaduros (6-8 semanas de edad), pero no contra las formas larvarias tempranas. Afecta a nivel neuromuscular, así como en el metabolismo energético, lo cual conduce a la desnutrición del parásito.
3. Sulfonamidas: clorsulon (Ivomec F, Curarem e Ivomec plus); su mecanismo de acción consiste en la interrupción de la glucólisis, al inhibir la enzima glucolítica 3-fosfoglicerato quinasa y la fosfoglicerol mutasa, lo cual reduce la producción de energía.
4. Bencimidazoles, albendazol, mebendazol, triclabendazol, estos inhiben la polimerización de la tubulina, la hipótesis es que la despolimerización de los micro túbulos ocasionan la inhibición del transporte celular y el metabolismo energético, por lo tanto disminuye progresivamente las reservas energéticas e inhiben la excreción de desechos (Márquez, 2007).

El triclabendazol ha sido el compuesto químico de elección para los tratamientos contra la fasciolosis por más de 20 años. Pero debido al uso excesivo, un manejo inapropiado, la selección y mutación en los trematodos se ha desarrollado resistencia; los primeros reportes fueron en Australia a mediados de los 90's, y desde entonces ha sido notificado en numerosos países europeos como

Irlanda, el Reino Unido, Holanda, España (Brennan, 2007) y recientemente en Perú (Ortiz *et al.*, 2013); también se ha registrado resistencia al albendazol en Perú (Mamani y Condori, 2009).

Actualmente se está investigando cuales son los mecanismos de resistencia, en el caso del triclabendazol se encuentra: a) la lenta reducción de la oxidación del triclabendazol (TCBZ) a triclabendazol sulfoxido (TCBZSO) que es el metabolito activo, b) la unión del TCBZ a proteínas no específicas restringe la habilidad del fármaco a unirse al sitio de acción, y c) el eflujo mediado por transportadores donde se sobreexpresa la acción de la glicoproteína-P (Pgp) permite la eliminación del fármaco desde las células (Mamani y Condori, 2009).

Cuadro 3. Eficacia de compuestos químicos contra *F. hepatica* en bovinos y ovinos

Ingrediente activo	Índice de seguridad en la dosis recomendada	>90% de eficacia en la dosis recomendada						
		Edad del trematodo (semanas)						
		2	4	6	8	10	12	14
Triclabendazol <sup>2</sup> (oral; pour on)	20	+	+	+	+	+	+	+
Closantel <sup>†</sup>	5.3	-	-	-	+	+	+	+
Closantel más Oxfendazol <sup>2</sup>	5.3	-	-	+	+	+	+	+
Closantel más Albendazol <sup>2</sup>	5.3	-	-	-	+	+	+	+
Nitroxinil <sup>§</sup>	4.0	-	-	-	-	+	+	+
Albendazol	6.0	-	-	-	-	-	±	+
Oxiclozanida <sup>**</sup> más levamisol	4.0	-	-	-	-	-	±	+
Clorsulon más <sup>**</sup> ivermectina	2.0	-	-	-	-	-	+	+

Tomado de Boray JC, 2007.

Índice de seguridad= dosis máxima tolerada dividida entre la dosis recomendada

<sup>2</sup> En ovinos y bovinos

<sup>†</sup> En ovinos

<sup>§</sup> registrada como inyección subcutánea para bovinos

<sup>\*\*</sup> registrado para vacas lactando

± a las 12 semanas es menos efectivo en bovinos que en ovinos

### 1.3. Fisiopatología de la fasciolosis en mamíferos

El hígado tiene un papel importante en la fisiología del cuerpo, es el responsable de metabolizar los aminoácidos, los carbohidratos y mantener el balance de lípidos, la síntesis de urea, albumina y glutatión, detoxificar productos del metabolismo, evitar la cetogénesis; así que no es de sorprender que este balance se altere debido a la infección por el trematodo. Comúnmente el trematodo migra a través del parénquima hepático, pero en ocasiones excepcionales llega a penetrar el diafragma y los pulmones, lo cual ocasiona neumonía, pleuritis fibrosa y fluido pleural (Behm and Sangster, 1999).

Después de que la adolescaria atraviesa la pared intestinal, aunque se ocasionan algunos daños temporales localizados en el intestino, no parece tener un efecto significativo (Behm *et al.*, 1994). Algunas horas después, cuando los parásitos penetran el parénquima hepático, ocasionan abrasiones debido a las espinas localizadas en el tegumento del parásito y el efecto de succión de las ventosas; la ventosa oral es capaz de macerar células hepáticas, es la que mayor daño ocasiona en el tejido hepático, mientras que la ventosa ventral puede llegar a formar úlceras debido a la acción de sujeción (Behm y Sangster, 1999).

A continuación se describen la patología y los signos clínicos de la fasciolosis en ovinos y bovinos:

1. De la primera a la tercera semana posinfección, los parásitos miden entre 1.0 y 2.5 mm, atraviesan la cápsula de Glisson y penetran el parénquima hepático; se inicia la respuesta inflamatoria, donde participan neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y macrófagos; aparecen los primeros daños como hemorragias subcapsulares, células hepáticas degeneradas y eosinofilia en las trayectorias de paso de los trematodos; los parámetros en sangre son normales (Behm y Sangster, 1999; Candanosa, 2010).

2. Entre la cuarta y la quinta semana posinfección tiene lugar la migración en el parénquima y las fasciolas miden de 4 a 5 mm; se observan trayectos amarillos rodeados de hemorragias, principalmente en el lóbulo izquierdo, peri-hepatitis fibrinosa y en ocasiones peritonitis. Los estudios histopatológicos revelan viejos trayectos con células contraídas, fibrosis e infiltrado de células gigantes, predominando macrófagos y linfocitos; mientras que los eosinófilos aparecen en la región portal adyacente a las trayectorias. Puede haber regiones infartadas y hemorragias frescas; aunque se aprecian pocos signos clínicos, en sangre empieza a aparecer la eosinofilia y la hiperglobulinemia (Behm y Sangster, 1999).
  
3. A partir de la sexta-octava semanas posinfección, los parásitos llegan a medir de 6 a 10 mm, se localizan en el lóbulo izquierdo y comienzan a llegar a los conductos biliares. Los trayectos son rojos (2-3 mm) debido a las hemorragias y por ende, la presencia de plaquetas en la superficie del lóbulo izquierdo (principalmente). También se observan adhesiones fibrinosas, agrandamiento de los nódulos linfáticos hepáticos y congestión; los estudios histopatológicos demuestran hiperplasia hepática y fibrosis como respuesta de recuperación de los trayectos realizados por los parásitos, también existe infiltración de linfocitos, mientras que los eosinófilos están restringidos al área portal. Se observa acumulación de pigmentos de hierro, fibrosis periférica y trombosis en venas; se empieza a detectar hiperplasia en los conductos biliares debido a la presencia de los parásitos. En sangre se detecta anemia, hipoalbuminemia y eosinofilia; en esta etapa se desarrolla la "Fasciolosis aguda tipo I"; los signos clínicos en los animales son ascitis, hemorragias abdominales, ictericia, palidez de la membrana y debilidad (Behm y Sangster, 1999).

4. De la octava a la décima semana posinfección, el trematodo mide entre 10 y 12 mm (dependiendo del hospedero), la mayoría se encuentran en los conductos biliares; se observan hemorragias subcapsulares en la superficie visceral y ésta adquiere una textura fibrinosa/gelatinosa. También se observa tejido de granulación con células necróticas, células gigantes, y linfocitos formando anillos concéntricos. Los conductos se observan dilatados, con hiperplasia y fibrosis e infiltración de células inflamatorias; empiezan a detectarse huevos en heces. En este momento tiene lugar la “Fasciolosis aguda tipo II”, los animales pueden mostrar palidez, pérdida de condición física y ascitis; este síndrome agudo es más frecuente en ovinos que en bovinos (Behm y Sangster, 1999).
  
5. Entre la duodécima y cuadragésima semana posinfección, los parásitos miden de 12 a 30 mm y residen en los conductos biliares; se observa el agrandamiento del hígado, cirrosis difusa; los conductos biliares están dilatados por lo que se observan proyectados hacia la superficie, en los conductos biliares principales se observan las paredes engrosadas pero flexibles, recubierto por cicatrices, por otra parte los conductos biliares secundarios presentan colangitis hiperplásica y fibrosis leve. En la mucosa de los conductos se aprecia necrosis como resultado de la presencia de parásitos adultos, huevos, detritus marrón, manchas de bilis y hemorragias. Los nódulos linfáticos en la vesícula hepática están agrandados, mientras que los trayectos con tejido fibroso debido a la pérdida de parénquima hepático, granulomas conteniendo huevos del parásito en el parénquima. En estas semanas se desarrolla la “Fasciolosis subaguda”; el animal muestra letargo, anemia, pérdida de peso y en el caso de ovinos puede morir; en la sangre se observa anemia, hipoalbuminemia, una elevada actividad de  $\gamma$  glutamil transferasa así como eosinofilia. Las señales del avance de la “Fasciolosis crónica” en el animal son un desarrollo gradual del edema en la mandíbula, ascitis y adelgazamiento (Behm y Sangster, 1999).

Finalmente, cabe resaltar que la severidad de las lesiones dependerá de la cantidad de metacercarias que penetren en el organismo, la infección con bacterias, así como de la especie del hospedador (Caicedo *et al.*, 2011).

#### **1.4. Inmunoparasitología de la fasciolosis**

##### **1.4.1. Respuesta inmune contra *F. hepatica***

Durante el proceso de infección por *F. hepatica*, la primera reacción del hospedador es en la pared intestinal, donde se observó una reacción eosinofílica (Dawes y Hughes, 1964).

Después de que el trematodo penetra el parénquima hepático, se inicia la respuesta inflamatoria con la participación de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y macrófagos; los neutrófilos son los primeros en llegar al sitio de la inflamación, pero los eosinófilos son los más abundantes en una infección aguda y pueden reconocer a los parásitos, después de que éstos son cubiertos con el complemento (C3), o anticuerpos de clase IgG o IgE (Candonosa, 2010). Los eosinófilos se adhieren al parásito y degranulan algunas enzimas como colagenasa (MMP-1, -8), elastasa leucocítica, proteína básica mayor y proteína catiónica eosinofílica, las cuales pueden dañar su estructura; por otra parte, pueden reducir el tiempo de coagulación, alterar la fibrinólisis y dañar el tejido, éste daño también está asociado a la producción de radicales libres de oxígeno y de leucotrienos.

Cuando el trematodo llega al parénquima hepático, se desarrollan principalmente dos mecanismos:

- a. Durante la fasciolosis aguda, el interferón gama (INF $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) estimulan la activación clásica de macrófagos, la cual induce la producción de óxido nítrico, tóxico para el parásito; esta respuesta puede ser aumentada por citocinas del tipo T<sub>H</sub>1 y disminuida por la IL-10

producida por las células T reguladoras (Moreau y Chauvin, 2010). Por parte del parásito, éste modifica los antígenos expresados en su tegumento, de esta forma estimula la producción de interleucina (IL) -4, 5 y 10, como resultado disminuye la expresión de INF $\gamma$ , lo que le permite al trematodo desarrollarse y mantener la infección (Mendes *et al.*, 2013). En el ganado bovino se ha observado que en la etapa temprana de fasciolosis existe una respuesta mezclada de T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub>, pero en el progreso de la infección predomina la respuesta T<sub>H2</sub> (Mulcahy *et al.*, 1999).

- b. En la fasciolosis crónica, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) necesita de eosinófilos, neutrófilos y macrófagos como células efectoras, además de los anticuerpos IgE, IgG e IgA. Las estructuras del parásito que son cubierto por los anticuerpos, son destruidas por las células que tienen receptores para el fragmento Fc (RFC); cuando estas células se activan por la fijación de los anticuerpos contra el RFC, liberan la proteína básica mayor, la proteína catiónica producida por los eosinófilos, neurotoxinas derivadas de eosinófilos y algunos productos intermedios de nitrógeno (Moreau y Chauvin, 2010). En esta etapa también se ha detectado IL-4, que es una citocina anti-inflamatoria que estimula los linfocitos a diferenciación celular T<sub>H2</sub>, contribuye al desarrollo de la fibrosis y consecuente reparación de lesiones (Mendes *et al.*, 2013).

En cuanto a la respuesta humoral en ovinos y bovinos con infección crónica por *F. hepatica* se observó lo siguiente: ambas especies mostraron un incremento en los niveles de IgG total desde la tercera y cuarta semana posinfección (PI), mientras que el isotipo dominante fue la IgG1, pero la IgM fue la que se detectó de forma temprana (segunda semana PI). En ovejas se detectó una respuesta IgG2 desde la segunda semana PI aunque en bovinos la respuesta fue tardía pero más fuerte; por otra parte, la respuesta de IgA en ovinos fue temprana y bifásica.

El dominio del isotipo IgG1 en ovinos y bovinos infectados sugiere la asociación a la respuesta T<sub>H</sub>2, mientras que el isotipo IgG2 en bovinos se relacionó con la resistencia a la infección a diferencia de los ovinos, que son más susceptibles. El isotipo de IgG2 en bovinos sugiere una respuesta T<sub>H</sub>1 como consecuencia de una respuesta celular contra los productos de excreción-secreción (Phiri *et al.*, 2006). Mulcahy *et al.*, (1998) ya habían observado que en bovinos no inmunizados la inmunoglobulina predominante fue IgG1, pero ésta es una respuesta no protectora, mientras que el ganado inmunizado presentó elevados niveles de IgG2, lo cual lo relacionaron con protección.

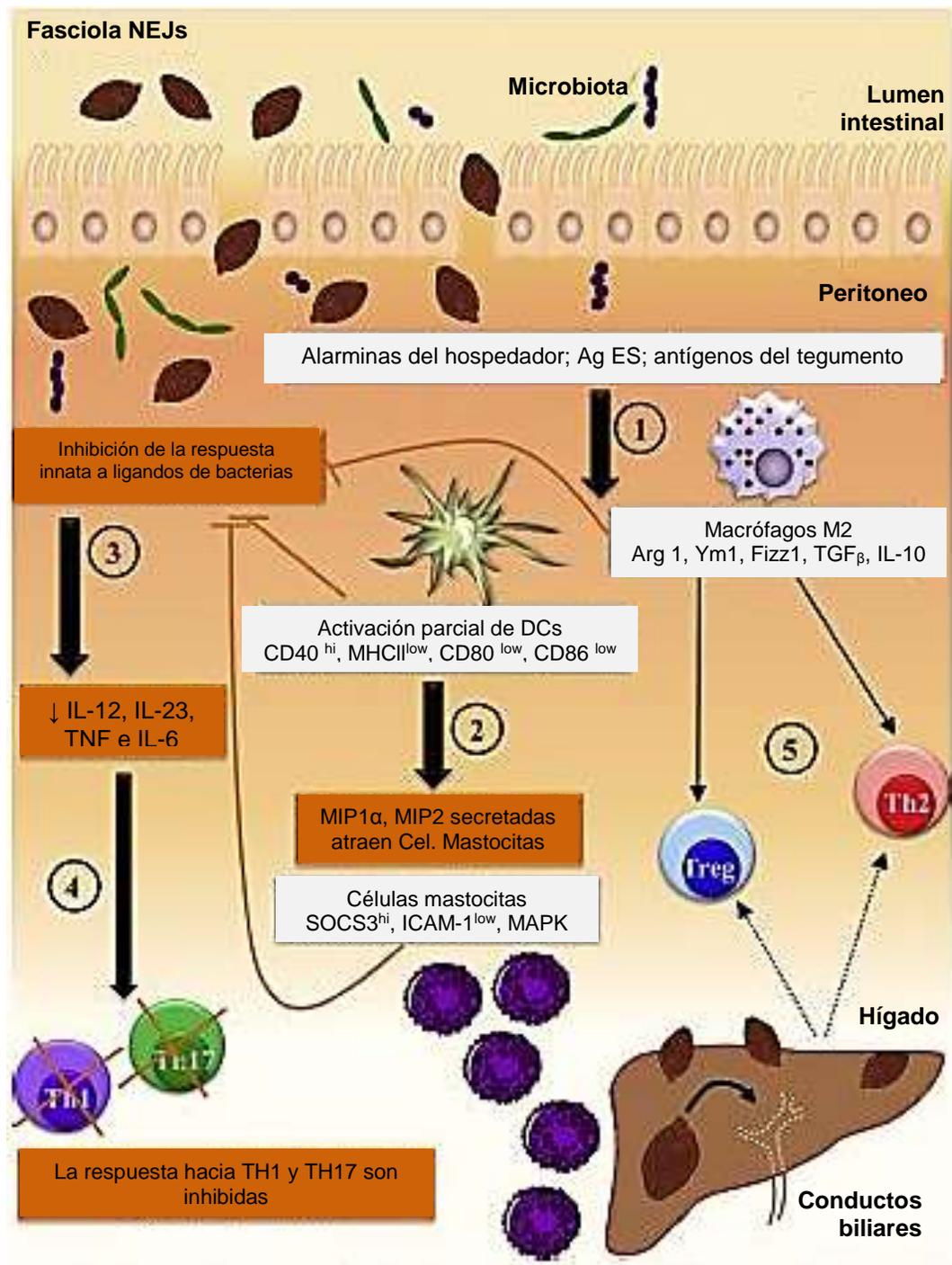
#### **1.4.2. Mecanismos de evasión de los parásitos**

Los parásitos evaden o manipulan al sistema inmune para su propio beneficio; este fenómeno fue descubierto hace más de 100 años por Paul Ehrlich y sus colaboradores en 1908, quienes reportaron “la desaparición de receptores” en tripanosomas africanos, un mecanismo ahora conocido como variación antigénica; muchos de los procesos de evasión inmune se basan en la manipulación de los mecanismos moleculares de la respuesta inmune del hospedador por parte del parásito; además éstos organismos utilizan varios mecanismos en el transcurso de la infección (Schmid-Hempel, 2008).

#### **1.4.3. Inmunomodulación de *F. hepatica* en el hospedador**

A las 24 h posteriores a la infección de ratones con metacercarias, se observó que los macrófagos del peritoneo expresan un fenotipo M2 y muestran una reducida habilidad para responder a estímulos de T<sub>H</sub>1 (Donnelly *et al.*, 2008). Ésto implica que la adolescencia cuando atraviesa la pared intestinal, secreta moléculas inmunomoduladoras que influyen en las células de la inmunidad innata (células dendríticas (DCs), macrófagos, neutrófilos, mastocitos, etc.). A los siete días posinfección se ha establecido una respuesta T<sub>H</sub>2 caracterizada por la secreción de IL-4, 5 y 13 por parte de los esplenocitos; entonces los macrófagos reguladores y

las células dendríticas son reclutadas en el peritoneo y es inhibida la maduración de DCs. Además las células T CD4+ en el peritoneo secretan IL-10 pero no IL-4 o INF $\gamma$ . La IL-10 ejerce un efecto supresor de ambas células T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub>, como resultado no se observó una respuesta a los antígenos específicos del parásito, además en los nódulos linfáticos mesentéricos también se produce IL-10 y IL-5, en respuesta al estímulo de los antígenos del trematodo (Walsh *et al.*, 2009). El parásito induce una inmunomodulación/inmunosupresión desde el momento de la invasión y la mantiene durante la infección crónica; la potencia de la inmunosupresión parece depender de la dosis infectante mientras que la persistencia podría deberse a la frecuencia de la infección (Dalton *et al.*, 2013), ver Figura 2.



Modificado de Dalton *et al.*, 2013

**Figura 1. *F. hepatica* modula la respuesta inmune del hospedador.** La fasciola recién desenquistada (NEJs) secreta catepsina B y L para atravesar las células epiteliales del intestino y llegar a la cavidad peritoneal. (1) La combinación de alarminas liberadas por el epitelio

intestinal dañado, proteínas de excreción-secreción (FhCL1, FhPrx, FhHDM-1) y antígenos del tegumento, promueven el desarrollo de macrófagos con fenotipo M2 y activan parcialmente a las células dendríticas DCs. (2) Quimiocinas secretadas por las DCs atraen mastocitos a la cavidad peritoneal. (3) La habilidad de las células de la inmunidad innata para responder al estímulo de ligandos de bacterias es dañada (4) como resultado éstas son incapaces de promover una respuesta  $T_H1$  y  $T_H17$ . (5) Al mismo tiempo, la población de macrófagos M2 aumentan la diferenciación de  $T_H2$  y Treg. En un período de días, el parásito llega al hígado y penetra el parénquima; el tejido dañado causado por la penetración y migración del trematodo, inicia una respuesta hacia el daño. En esta etapa de infección, la población de macrófagos M2 en el peritoneo y las células Treg incrementan exponencialmente y su función es limitar la magnitud de la patología.

#### **1.4.4. Inducción de inmunidad contra *F. hepatica***

Para estudiar los antígenos de *F. hepatica* se han clasificado en antígenos sómicos, que por lo regular son extractos crudos del parásito y antígenos de excreción/secreción, resultado de la actividad fisiológica del parásito. La importancia de estudiar los antígenos de este trematodo es la de determinar cuáles antígenos son relevantes para establecer pruebas de diagnóstico o para producción de vacunas (Bautista, 2010).

El desarrollo de vacunas contra parásitos se ha visto limitado en parte por los ciclos de vida complejos, además de la falta de conocimiento en el área de inmunología. Existen varios trabajos de investigación cuyo objetivo fue conferir protección a los hospedadores definitivos, por ejemplo mediante la inmunidad pasiva, como Armour y Dargie (1974), quienes al inocular ratas susceptibles por vía peritoneal con suero de ratas, bovinos o borregos parasitados, observaron protección del suero inmune relacionado con el volumen transferido. En otro estudio Corba *et al.*, (1971) utilizaron células linfoides sensibilizadas y observaron protección en ratas con infección primaria, sin embargo, estos resultados contrastan con los reportados por Rajasekariah y Howell (1979), Amour y Dargie (1974), quienes concluyen que la inmunidad celular tiene un papel secundario en la protección de las ratas contra la infección por el trematodo. En otra investigación, Mitchell *et al.*, (1981) administraron el factor de transferencia obtenido a partir de leucocitos lisados de ratas parasitadas a ratas susceptibles, y cuantificaron un

55.6% de reducción de parásitos en hígado pero no obtuvieron un resultado significativo cuando utilizaron el factor de transferencia de bovino u ovino parasitado en ratas.

Anderson *et al.*, (1975) implantaron subcutáneamente fasciolas extraídas de ovinos en ratas y observaron inmunidad protectora contra el parásito. Más adelante Lang y Hall (1977) inmunizaron ratones con antígenos de excreción-secreción y con antígenos somáticos obtenidos por sonicación y observaron una reducción del 86% de parásitos. Otro método empleado fue el de metacercarias irradiadas donde se obtuvieron resultados muy variables debido a los diferentes hospedadores que se evaluaron y la cantidad de unidades experimentales (Hughes *et al.*, 1982; Creaney *et al.*, 1995).

Algunos investigadores observaron inmunidad cruzada de la larva de *Taenia hydatigea* (antes *Cysticercus tenuicollis*; Campbell *et al.*, 1977), *Taenia taeniformis* (Campbell *et al.*, 1979), *Nippostrongylus brasiliensis* (Doy *et al.*, 1981) con *F. hepatica*; pero fue Hillyer (1981), quien observó los mejores resultados con *Schistosoma mansoni* y *S. bovis*, este investigador encontró una reducción de la carga parasitaria en ratas y ratones, posteriormente identificó el antígeno homólogo llamado FhSmIII (Hillyer *et al.*, 1985).

En los años 90's se empezaron a identificar las moléculas en los productos de excreción/secreción, y es en la siguiente década cuando empezaron a diseñarse las primeras vacunas recombinantes. En la actualidad, con el uso de la ingeniería molecular, además de construir vacunas subunitarias, es posible construir proteínas quiméricas, seleccionando las partes más inmunogénicas de dos o más proteínas y fusionarlas en una sola proteína. Estas proteínas pueden utilizarse para diagnóstico y en la búsqueda de protección inmunológica, dicha tecnología se ha empleado en la búsqueda de inmunógenos para *Toxoplasma gondii* (Chung-Dar *et al.*, 2004), *Plasmodium falciparum* (Shi *et al.*, 2007), y *Brucella ovis* (Cassataro *et al.*, 2007).

Grupos de proteínas candidatos a vacunas:

- a. Proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), son un grupo de proteínas involucradas en la unión y transporte de una variedad de ligandos hidrofóbicos como oleato, palmitato y una variedad de ácidos grasos (Hillyer, 2005). *F. hepatica* utiliza estas FABP que se encuentran en su tegumento para obtener los ácidos grasos de la sangre del hospedador, ya que dicho trematodo no puede sintetizar sus propios ácidos grasos (Muro, 1997), ver Cuadro 4.
- b. Glutación -S-transferasa (GST), son isoenzimas involucradas en la detoxificación de xenobióticos, compuestos tóxicos endógenos, transporte de compuestos aniónicos; dichas isoenzimas se encuentran distribuidas en la superficie del intestino, parénquima y tegumento. Fueron seleccionadas como antígeno candidato con base en la proteína homóloga de GST de *Schistosoma mansoni* (Sm28) y *S. japonicum* (Sj26), los cuales mostraron inducir una reducción significativa de la carga parasitaria en animales vacunados en laboratorio (Spithill y Morrison 1994), ver Cuadro 4.
- c. La Hemoglobina (Hb) fue aislada de los productos de excreción-secreción (E-S) por McGonigle y Dalton en 1995; esta proteína podría estar implicada en el transporte y almacenamiento de oxígeno en los trematodos que migran, los cuales están expuestos en un ambiente anaerobio (Dalton *et al.*, 1996).
- d. Las proteasas son enzimas que fraccionan las proteínas mediante hidrólisis de los enlaces peptídicos, se clasifican con base en el sitio de corte: endopeptidasas y exopeptidasas. Las proteasas expresadas por este helminto incluye una variedad de catepsinas L y B, así como una serina proteasa de tipo dipeptidil peptidasa (Carmona *et al.*, 1994), una legumina (Cancela *et al.*, 2010) y leucina aminopeptidasa (Acosta *et al.*, 1998), ver Cuadro 4.
- e. Otras proteínas que se comenzaron a evaluar son las saposinas (SAP-2; Espino *et al.*, 2004), Hemoglobina (HbF2; Dewilde *et al.*, 2008), Peroxirredoxina (Prx; Mendes *et al.*, 2010), Tiorredoxina-glutación reductasa

(TGR; Maggioli *et al.*, 2011a) y Fosfoglicerato quinasa (FhPGK; Wesolowska *et al.*, 2013), ver Cuadro 4.

#### **1.4.5. Importancia de LAP y CL1**

En 1989 Dalton y Heffernan reportaron que los estadios juveniles, inmaduros y adultos de *F. hepatica*, expresan un número considerable de proteasas, principalmente de la familia de las cisteína-proteasas; en otro estudio realizado por Robinson *et al.*, (2008a) se observó que los trematodos patógenos expresan cuatro clases de catepsinas (C): L, B, F y C. Mencionan que la CL y CF tienen actividad endopeptidasa, la CB presenta tanto actividad exo y endopeptidasa mientras que la CC tiene una actividad dipeptidilpeptidasa; *F. hepatica* no secreta CF. Este grupo de investigadores señalan que la producción de cisteína-proteasas está regulada durante el desarrollo del parásito en su huésped también correlaciona con su migración y maduración, por consiguiente los trematodos maduros secretan una mayor cantidad de CL (Heussler *et al.*, 1994, Villa *et al.*, 2008), mientras que los estadios juveniles secretan en mayor cantidad CB, CL1 y CL2 para invadir y degradar los colágenos tipo I, III y IV así como la fibronectina de la lámina del hígado. Las actividades líticas facilitan la penetración y migración del trematodo a través de la pared intestinal y de la masa hepática (Berasain *et al.*, 1997).

En el 2008 McGonigle *et al.*, demostraron que al bloquear con RNA de interferencia los genes de CB y CL se reducen los niveles de estas enzimas en las larvas juveniles infectantes, lo cual repercute en su habilidad de penetrar el intestino del huésped. Lo que sugiere que el desarrollo de las diferentes clases de catepsinas tuvo un papel importante en la evolución exitosa del parasitismo, reflejando una adaptación a una nueva forma de vida, en el cual los parásitos deben tener los nutrientes rápidamente disponibles y al mismo tiempo requieren mayor gasto de energía para protegerse en contra de la respuesta inmune del huésped.

Otro antígeno esencial es la leucina aminopeptidasa (LAP), se trata de una exopeptidasa, que comparte algunos requerimientos de los miembros de la familia M17 de metalopeptidasas. Su importancia se debe a que la actividad de LAP está asociada con las células epiteliales que cubren el tracto digestivo del parásito. Se sugiere que esta enzima interviene en la etapa final del catabolismo de péptidos que son generados por la degradación de las proteínas sanguíneas y de los tejidos del hospedador dentro de la luz intestinal mediante endoproteasas como las catepsinas L, y después son absorbidos por las células epiteliales del intestino (Acosta *et al.*, 2008). Mientras tanto, Piacenza *et al.*, (1999) informaron que LAP se encuentra en el trematodo adulto y posiblemente en el estadio juvenil.

Cuadro 4. Proteínas de *F. hepatica* evaluadas como vacunas.

Antígeno	Naturaleza de la proteína	Hospedador	Protección %	Referencia
<b>Proteínas de unión a ácidos grasos (FABP)</b>				
▪ Fh/SMIII	n	Bovinos	55 <sup>1</sup>	Hillyer <i>et al.</i> , 1987
▪ Fh15+ADAD	r	Ovinos	43 <sup>1</sup>	López-Abán <i>et al.</i> , 2007
▪ Fh12	n	Ovinos	42 <sup>1</sup>	López-Abán <i>et al.</i> , 2008
<b>Glutación S-transferasa</b>				
▪ GST+Quil A/SM	n	Bovinos	49-69 <sup>1</sup>	Morrison <i>et al.</i> , 1996
▪ GST+ACF	n	Ovinos	57 <sup>1</sup>	Sexton <i>et al.</i> , 1990
▪ FhGST	n	Caprinos	9.3 <sup>1</sup>	Buffoni <i>et al.</i> , 2010
<b>Cisteín proteinasas</b>				
▪ CL1	n	Bovinos	42-69 <sup>1</sup>	Dalton <i>et al.</i> , 1996
▪ CL1	n	Ovinos	34	Piacenza <i>et al.</i> , 1999
▪ CL1	r	Bovinos	48.2	Golden <i>et al.</i> , 2010
▪ CL1	r	Ovinos	47.61	Villa <i>et al.</i> , 2008
▪ CL1+ Hb	n	Bovinos	51.9 <sup>1</sup>	Dalton <i>et al.</i> , 1996
▪ CL2	n	Ovino	33	Piacenza <i>et al.</i> , 1999
▪ CL2+ Hb	n	Bovinos	72.4 <sup>1</sup>	Dalton <i>et al.</i> , 1996
▪ CL3	r	Ratas	52 <sup>1</sup>	Reszka <i>et al.</i> , 2005
▪ CL5	r	Rata	51 <sup>1</sup>	Jayaraj <i>et al.</i> , 2009
▪ Cat B	r	Caprino	NP	Perez-Ecija <i>et al.</i> , 2010
▪ Cat B	r	Rata	60 <sup>1</sup>	Jayaraj <i>et al.</i> , 2009
▪ Cat B+ CL5	r	Rata	83 <sup>1</sup>	Jayaraj <i>et al.</i> , 2009
<b>Leucina aminopeptidasa (LAP)</b>				
▪ FhLAPn	n	Ovinos	89.6 <sup>1</sup>	Piacenza <i>et al.</i> , 1999
▪ FhLAPr	r	Conejo	78 <sup>1</sup>	Acosta <i>et al.</i> , 2008
<b>Saponinas (SAP)</b>				
▪ FhSAP-2	r	Conejos	81.2	Espino <i>et al.</i> , 2004
<b>Hemoglobina (Hb)</b>				
▪ HbF2	r	Bovinos	NP	Dewilde <i>et al.</i> , 2008
<b>Peroxirredoxina (Prx)</b>				
▪ Prx	r	Caprinos	33.04	Mendes <i>et al.</i> , 2010
Tiorredoxina-glutación reductasa (TGR)	r	Conejos	96.7	Maggioli <i>et al.</i> , 2011
Fosfoglicerato quinasa FhPGK	n	Ratas	Se midió citocinas	Wesolowska <i>et al.</i> , 2013

n=nativa; r=recombinante; 1= disminución de parásitos; NP= no protegió.

## 1.5. Vacunas recombinantes

Desde los años 80's se empezaron a producir proteínas recombinantes de parásitos con el objetivo de desarrollar una vacuna para proteger las especies de interés zootécnico y de compañía, actualmente son pocas las vacunas comerciales (Knox, 2010). Las primeras vacunas recombinantes antiparasitarias fueron contra *Leishmania donovani* (Leish-Tec, Hertape Calier) y *Rhipicephalus microplus*; en 1994 en Australia se introdujo la vacuna TickGUARD de Fort Dodge, más tarde en Cuba y algunos países Sudamericanos contaron con la vacuna Gavac de Heber Biotec S.A. (Meeusen *et al.*, 2007; Lightowlers). Recientemente la vacuna S3Pvac contra cisticercos de *Taenia solium* ha sido evaluada en localidades de Puebla y Morelos, aunque demostró un porcentaje elevado de protección (97-100% de protección en cerdos), actualmente el grupo de investigadores trabaja en la producción masiva del antígeno (Sciutto *et al.*, 2013).

Desarrollar una vacuna contra parásitos no es sencillo, pero los diferentes grupos de investigadores siguen caracterizando moléculas con el fin de entender la respuesta inmune en el hospedador y el papel de la molécula dentro del parásito, por otra parte la complejidad de los ciclos biológicos hace que el reto sea mayor. Se ha planteado que una vacuna subunitaria no es suficiente, una alternativa es el uso de cócteles de proteínas así se emplearían diferentes proteínas de las diferentes etapas de los parásitos o varias proteínas importantes en el funcionamiento del parásito; algunos ejemplos son los trabajos realizados por Shrivastava *et al.*, (2013), este grupo de investigadores evaluó tres proteínas de *Brugia malayi*, pero combinándolas de diferente forma Miosina+TPP (Fosfatasa-trehalosa-6-fosfato) y TPP+iPGM (Fosfoglicerato mutasa independiente); la primera combinación no tuvo éxito, mientras que la segunda combinación redujo un 70% el establecimiento de los parásitos adultos. Por otra parte, Kaur *et al.*, (2011) utilizaron como cóctel una metaloproteasa de 63 kDa (gp63) y una proteína de shock térmico (Hsp70), ambos de *Leishmania donovani*, ellos observaron en el modelo murino, niveles elevados de IFN $\gamma$  e Interleucina IL-2, lo cual sugiere una respuesta Th1 protectora. En el

estudio realizado por Cachat *et al.*, (2010) a pesar de haber utilizado un cóctel con varias proteínas recombinantes (rMEP1, rMEP3, rMEP4 y rPep1) de *Haemonchus contortus*, no observaron protección en los ovinos infectados.

En los ejemplos antes citados, no todos logran mejoría en la protección al hospedador, Willadsen (2008) explica que la necesidad de mejorar la eficacia nos ha llevado a emplear cocteles de proteínas, pero los resultados podrían ser sinergia, aumento de la eficacia pero impredecible, aumento de la efectividad pero menos que la aditiva o reducción de la eficacia. Otra opción por explorar son las proteínas quiméricas o fusionadas que a continuación se mencionan.

### **1.6. Proteínas quiméricas recombinantes**

El empleo de una proteína quimérica se debe a la necesidad de mejorar la respuesta inmune, una vertiente es fusionar proteínas buscando un efecto de adyuvante, un ejemplo es el antígeno central (core) (HBcAg), que es una proteína viral de la hepatitis B, con un péptido derivado de la proteína VP2 del rinovirus tipo 2 del humano (Francis *et al.*, 1989). Otra construcción quimérica que buscó un efecto de adyuvante, fue la fusión de la subunidad B del gen de la toxina del cólera (CTB) con el péptido sintético de la enzima glucosiltransferasa de *Streptococcus* mutante GS-5, concluyeron que el péptido no interfirió con las propiedades de la CTB (Dertzbaugh *et al.*, 1990). Recientemente Qiu *et al.*, 2012 utilizaron la proteína calreticulina como un adyuvante hidrofílico unido a un fragmento de la proteína “spike (S)” del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS-CoV), y observaron un aumento de IgG.

Otra vertiente es aprovechar las regiones más antigénicas o inmunogénicas para emplear las construcciones en técnicas diagnósticas o como vacunas; en el caso de las vacunas se tiene el ejemplo de Minor *et al.*, 1990, quienes construyeron virus quiméricos basados en la cepa Sabin tipo 1, en el que porciones de la

secuencia que codifica el sitio 1 fueron sustituidos con regiones correspondientes de la cepa de tipo Sabin 3; la funcionalidad se analizó serológicamente utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales contra el poliovirus, así como la inducción de anticuerpos en conejos. Aunque los resultados mostraron antigenicidad parcial, también se obtuvieron resultados sobre las propiedades antigénicas e inmunogénicas del virus nativo. Otra proteína quimérica es la rPyMSP-1/8 de *Plasmodium yoelii*, construida por Shi *et al.*, 2007, la cual contiene fragmentos de proteínas de superficie de la etapa del merozoito, pero en este estudio la proteína quimérica no protegió a los ratones infectados. Mientras tanto, Peng *et al.*, 2010, construyeron una proteína quimérica con dos dominios ricos en cisteínas: el dominio III del antígeno 1 (AMA-1) de la membrana apical y la región C-terminal de la proteína 1 (MSP-19) de la superficie del merozoito de *Plasmodium falciparum*, la fusión de éstos dos antígenos aumentó su inmunogenicidad e inhibió el crecimiento del parásito *in vitro*. En cuanto a la aplicación de una proteína quimérica en diagnóstico, Holec-Gaşior *et al.*, 2012, describieron un ensayo inmunoenzimático que se basa en un antígeno quimérico conteniendo regiones inmunodominantes de MIC1, MAG1 y SAG1, proteínas de *Toxoplasma gondii*; mostraron que este inmunoensayo puede ser viable para propósitos clínicos. El objetivo de construir proteínas quiméricas es hacer más eficiente una vacuna, el diagnóstico o utilizar el efecto de adyuvante de ciertas proteínas; esta herramienta no se ha generalizado, son todavía pocos los estudios que emplean esta técnica, aún no se ha reportado alguna proteína quimérica acerca de *F. hepatica*.

## 1.7. Justificación

Con la finalidad de conferir protección al hospedador final, diversos grupos de investigación han venido estudiando tanto los antígenos somáticos como los de excreción-secreción. Se han aislado diversas proteínas que han sido caracterizadas para entender su función en el trematodo (ferritina, hemoglobina, glutatión S-transferasa, miosina, tiorredoxina, catepsinas, leucina aminopeptidasa, legumaina, etc.) y con base en estos estudios se han seleccionado proteínas candidatas para vacunas (glutatión S-transferasa, catepsina L y B, leucina aminopeptidasa, proteínas de unión a ácidos grasos, etc.), mejoramiento del diagnóstico de la parasitosis (catepsina L, saposina 2) y para tratamiento inmunoterapéutico (FhHDM-1, Moléculas de defensa de helmintos).

Debido a la importancia de las enzimas Leucina aminopeptidasa y Catepsina L1 en los procesos de invasión, migración, obtención de nutrientes y evasión del sistema inmunológico del hospedador definitivo se eligieron estas enzimas para analizar sus secuencias *in silico* (predicción de epitopos, estructuras secundarias y conocer los dominios de la enzimas); con los epitopos seleccionados se diseñó una proteína recombinante quimérica (herramienta poco utilizada en helmintos), que exprese dichos epitopos con la finalidad de ser utilizada en el diagnóstico de la fasciolosis o con posibilidades de ser evaluada como vacuna.

## **1.8. Hipótesis**

La secuencia quimérica conserva los epitopos predichos con los programas de bioinformática, en consecuencia la proteína quimérica muestra la capacidad antigénica e inmunogénica.

## **1.9. Objetivo general**

Diseñar, construir y expresar una proteína quimérica a partir de leucina aminopeptidasa (LAP) y la catepsina L1 (CL1) de *Fasciola hepatica*.

### **1.9.1. Objetivos específicos**

Seleccionar los epitopos antigénicos de LAP y CL1 mediante los programas de bioinformática para construir una proteína quimérica.

Demostrar la capacidad antigénica de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 a través del reconocimiento de dicha proteína por los anticuerpos de bovinos con infección natural de fasciolosis en un *Western blot*.

Comprobar la capacidad inmunogénica de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 mediante la producción de anticuerpos específicos en conejos inoculados.

## 2. Material y Métodos

En el diseño de la proteína quimérica se utilizaron herramientas de bioinformática, posteriormente se construyó y expresó la proteína mediante ingeniería genética en el laboratorio de Inmunología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM; mientras que la purificación de rFhLAP-CL1, así como la funcionalidad de la proteína al producir anticuerpos en conejos Nueva Zelanda se realizó en el Departamento de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

### 2.1. Diseño de la proteína quimérica

#### 2.1.1. Análisis bioinformático

Se seleccionaron las secuencias de leucina aminopetidasa (LAP, *GenBank* AY644459.1) y catepsina L1 (CL1, *GenBank* AJ279092.1) de *F. hepatica*, enseguida se realizó la traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos con el programa Translation (<http://bio.lundberg.gu.se/edu/translat.html>) para realizar los siguientes análisis; primero se compararon las secuencias de LAP y CL1 con el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) para determinar si tenían alguna semejanza entre ellas. Posteriormente se seleccionaron las regiones más antigénicas con el programa de predicción del índice antigénico de Kolaskar y Tongaonkar (1990) (<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl>), así como con los programas BCEPRED (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>) y ABCPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>).

Después de seleccionar las regiones antigénicas, se estimó el peso molecular a la proteína quimérica LAP-CL1 diseñada con el programa disponible en <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>, mientras que la predicción de estructuras secundarias se realizó con el programa PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/>); la predicción de hidrofobicidad se llevó a cabo con el programa ProtScale

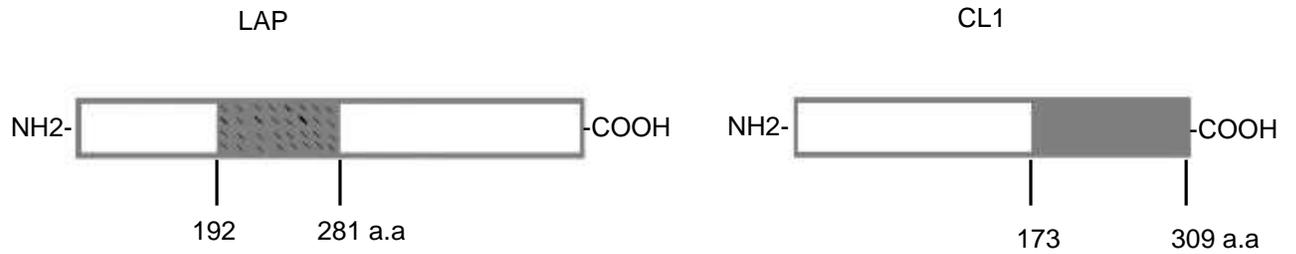
(<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>), con base en el algoritmo Kyte Doolittle; los valores superiores a 1.6 indican posibles regiones hidrofóbicas. Con el programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) se analizó la secuencia para determinar si contenía hélices transmembranales, mientras que los epítomos lineales y las regiones antigénicas fueron predichos usando los programas ABCPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), BCEPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>) y el método de predicción antigénica de Kolaskar y Tongaonkar (1990) (<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl>). Los dominios de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 fueron determinados con el programa Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Finalmente se modeló la proteína quimérica con el programa I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).

### **2.1.2. Diseño de los iniciadores para Leucina aminopeptidasa y Catepsina L1**

Se diseñaron dos pares de iniciadores para amplificar las regiones seleccionadas para construir la secuencia quimérica LAP-CL1. En los extremos de los iniciadores sentido (Fw) de LAP y antisentido (Rv) de CL1 se añadieron sitios de restricción mientras que en los iniciadores Rv de LAP y Fw de CL1, se añadieron 10 bases complementarias de ambas secuencias para permitir la unión de los productos amplificados individuales por PCR sobrepuesto (Grandori *et al.*, 1997; Wurch *et al.*, 1998), ver Figura 3.

Los primeros iniciadores fueron flanqueados con las enzimas de restricción *XhoI* y *HindIII*, mientras que el segundo juego de iniciadores fue flanqueado por *NdeI* y *BglII*, ver Cuadro 5.

### PCRs independientes



+

### PCR sobrepuesto



Figura 2. Diseño de la secuencia quimérica de Leucina aminopeptidasa y Catepsina L1 de *F. hepatica*.

Cuadro 5. Iniciadores para amplificar las regiones de Leucina aminopeptidasa y Catepsina L1 de *F. hepatica*.

Iniciador	Leucina aminopeptidasa
LAP fw <i>Xho</i> I	gatatc <u>ctcgag</u> ATGGATCCGGAACGAATGGCTGC
LAP rv	ttccaatccCTTGATGTCTGCTCCACCGGT
LAP fw <i>Nde</i> II	cgcatATG <u>gatc</u> CGGAACGAATGGCTGC
LAP rv	cgagatctaCTTGATGTCTGCTCCACCGGT
	Catepsina L1
CL1 fw	AGACATCAAGGGATTGGAAACCGAGTCTTCT
CL1 rv <i>Hind</i> III	cagcgaa <u>agctt</u> TCGTGCCACCATCGGGAG
CL1 fw	cgcatATGGGATTGGAAACCGAGTCTTCT
CL1 rv <i>Bgl</i> II	cgagat <u>cta</u> TCGTGCCACCATCGGGAG

Las bases subrayadas representan los sitios de restricción de *Xho*I, *Hind*III, *Nde*I y *Bgl*II respectivamente; letras en minúscula son bases extras que se agregaron.

## **2.2. Construcción de la proteína quimérica**

### **2.2.1. Procesamiento del material biológico**

Se colectaron hígados de bovinos infectados con *F. hepatica* en el Rastro Municipal de Toluca en el Estado de México y se extrajeron los trematodos. Cada parásito fue lavado en tres ocasiones con amortiguador de fosfatos (PBS) estéril (NaCl 137 mM, KCl 2.69 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.77 mM, pH 7.4) a 4°C para quitar la sangre y bilis, en seguida se colocó cada fasciola en un tubo de 2 mL con 1.0 mL de *TRIzol* (Invitrogen, CA USA), el cual se metió en un baño de alcohol isopropílico en hielo seco.

En el laboratorio se procedió a tomar cada parásito y se cortó con una hoja de bisturí en una caja de Petri sobre escamas de hielo, posteriormente el tejido se regresó al tubo tipo Eppendorf con *TRIzol* (Invitrogen, CA USA) y las muestras se guardaron a -70°C.

### **2.2.2. Extracción de RNA**

Para la extracción de RNA cada tubo contenía 1.5 mL de *TRIzol* (Invitrogen, CA USA) más el parásito finamente cortado. Después de descongelar el material a temperatura ambiente se tomó solo 1 mL del *TRIzol* (Invitrogen, CA USA) de cada tubo y se colocó en un tubo limpio, evitando tomar los sedimentos del tejido. Las muestras se incubaron de 1 a 5 min a temperatura ambiente y enseguida se les añadió 0.2 mL de cloroformo frío por cada mL de *TRIzol* (Invitrogen, CA USA).

El siguiente paso fue mezclar las muestras cada 20 seg, durante 15 seg, en 8 ocasiones; posteriormente se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Después de incubar los tubos, éstos se centrifugaron a 10,700 x g durante 15 min a 4°C y se separó la fase sólida de la líquida; se transfirió 0.7 mL de la fase acuosa a un tubo nuevo. A la fase acuosa se le añadieron 0.5 mL de isopropanol frío, se

mezcló cuidadosamente, invirtiendo el tubo un par de veces y se incubaron los tubos durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la precipitación.

Enseguida se centrifugaron las muestras a 10,700 x g durante 10 min a 4°C, se observó una pastilla pequeña blanquecina. Después se decantó el sobrenadante y se lavó la muestra con etanol al 75% frío; se invirtió el tubo en repetidas ocasiones, y se centrifugaron nuevamente las muestras a 7500 x g durante 5 min a 4°C decantando el sobrenadante. El exceso de etanol se removió con una micropipeta y la muestra se dejó secar en una cabina de flujo laminar durante 20 min.

Finalmente la pastilla fue resuspendida en agua dietil pirocarbonato (DEPC) para ser incubada en baño María a 55-60°C durante 10 min, una vez disuelta completamente la pastilla se midió la concentración del RNA en un espectrofotómetro (Nanodrop®), mientras que la integridad del material se evaluó en un gel de agarosa al 1.5%.

### **2.2.3. Síntesis de cDNA (DNA complementario)**

Para la síntesis de cDNA se utilizó el paquete *First-strand cDNA synthesis* (Invitrogen CA USA). La mezcla de los reactivos se realizó en tubos de 0.2 mL estériles de la siguiente manera, ver Cuadro 6.

Inmediatamente se incubó la reacción a 65°C durante 5 min y luego en hielo durante un minuto. A continuación se preparó la siguiente reacción, ver Cuadro 7:

Cuadro 6. Componentes de la reacción transcripción inversa (1ra parte).

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
RNA total	3 $\mu$ L (5 $\mu$ g/ $\mu$ L)
Mezcla de dNTP (10 mM)	1 $\mu$ L
Oligo (dT) <sub>18</sub> (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Agua tratada DEPC	5 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

Cuadro 7. Componentes de la reacción transcripción inversa (2da parte).

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
Amortiguador RT 10x	2 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 $\mu$ L
DTT 0.1 M	2 $\mu$ L
RNaseOUT	1 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	<b>9 <math>\mu</math>L</b>

La reacción nueva fue combinada con la mezcla previa de componentes de la reacción de transcriptasa inversa e incubada a 42°C durante 2 min. Posteriormente se añadió 1 µL (50 unidades) de la transcriptasa inversa *SuperScript*<sup>TM</sup> II RT (Invitrogen CA USA) al tubo con la reacción, se mezcló e incubó a 42°C durante 50 min. En seguida se incubó la reacción a 70°C durante 15 min, se enfrió la reacción en hielo durante un minuto, se centrifugó brevemente y se le agregó 1 µL de RNasa H. Finalmente la reacción se incubó a 37°C durante 20 min.

#### **2.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

El protocolo para la elaboración de la proteína quimérica se basó en los artículos de Grandori *et al.*, (1997) y Wurch *et al.*, (1998). En el primer paso se amplificaron las regiones de LAP y CL1 en reacciones de PCR independientes a partir del cDNA de *F. hepatica*, ver Cuadro 8.

La segunda reacción de PCR se llevó a cabo en dos pasos: el primero consistió en colocar todos los elementos mencionados en el cuadro anterior, pero el DNA blanco consistió en 1 µL del producto de PCR purificado de LAP y 1 µL de CL1. El tubo se colocó en el termociclador durante 5 ciclos a una temperatura de alineamiento de 56°C; en el segundo paso se le adicionaron los oligos extremos de LAPfw y CL1rv más Taq polimerasa durante 20 ciclos en el termociclador. En el Cuadro 9 se describen las condiciones que se utilizaron para la amplificación de los productos.

Después de realizar las reacciones que corresponden al primer PCR y verificar que amplificaban el producto de 270 y 411pb respectivamente, se procedió a purificar las reacciones con el paquete de *QIAquick*<sup>®</sup> *Spin* (QIAGEN Hilden, Alemania). Se siguió el protocolo del proveedor con la excepción que LAP se centrifugó durante 40 segundos mientras que la reacción de CL1 se centrifugó durante 60 segundos en todos los pasos.

Cuadro 8. Componentes de las reacciones de las PCR independientes de LAP y CL1.

Componente	LAP/CL1
10x amortiguador*	5.0 µL
dNTP	1.0 µL
Iniciador fw**	1.0 µL
Iniciador rv**	1.0 µL
cDNA	2.0 µL
H <sub>2</sub> O destilada	40.0 µL
Taq polimerasa	0.1 µL
<b>Vol. Total</b>	<b>50 µL</b>

\*15 mM MgCl<sub>2</sub>; \*\* 20 pmol de cada oligo para LAP y CL1.

Cuadro 9. Condiciones del termociclador para amplificar los fragmentos de Leucina aminopeptidasa, Catepsina L1 y la secuencia quimérica LAP-CL1.

Condiciones del termociclador						
Programa	Desnat. inicial	Ciclos	Desnat.	Alineamiento	Extensión	Extensión final
LAP	95°C x 4'	25	94°C x 1'	56°C x 45"	72°C x 1'	72°C x 10'
CL1	95°C x 4'	25	94°C x 1'	61°C x 45"	72°C x 1'	72°C x 10'
LAP-CL1	95°C x 4'	25	94°C x 1'	64.9°C x 45"	72°C x 1'	72°C x 5'

Desnat. Desnaturalización

El producto de la PCR sobrepuesta se purificó a partir de un gel de agarosa al 2%, las condiciones de la electroforesis fueron: 80 Volts, 100 mA durante 40 minutos, en amortiguador Tris-acetato-EDTA (TAE) frío. El proceso de purificación se realizó como lo recomienda el protocolo de *QIAquick® Gel Extration* (QIAGEN Hilden, Alemania). Finalmente para verificar la pureza del producto se preparó un gel de agarosa al 1% con 2 µL de la reacción y el marcador de 123 pb molecular (Sigma-Aldrich).

### **2.2.5. Proceso de clonación**

Se utilizaron diferentes plásmidos y cepas de *Escherichia coli* para llevar a cabo la amplificación del DNA y para la expresión de la proteína, ver cuadro 10.

#### **2.2.5.1. Clonación en el vector de amplificación**

Después de obtener el producto de PCR de la construcción quimérica, se secuenció en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM; luego la secuencia corroborada con Sequencher® 4.2 software (Gene Codes Corporation), se clonó el inserto en el sistema de pJET1.2 y pGEM. El producto que se clonó en el sistema pJET1.2 se le cortaron las terminaciones cohesivas salientes, para insertarlo en el plásmido de acuerdo al protocolo de pJET1.2/blunt *Cloning Vector* Fermentas®. En el caso de pGEM®-T no fue necesario eliminar las terminaciones del inserto, también se siguieron las instrucciones del fabricante Promega.

El siguiente paso fue transformar las células DH5α y TOP10 con la construcción LAP-CL1/pJET1.2 y con LAP-CL1/pGEM respectivamente. Brevemente, el vial de las células competentes se descongeló en hielo triturado durante 3 min, enseguida se agregaron 100 ng de la reacción de ligado, se mezcló suavemente y se incubó el vial durante 30 min a 4°C. Posteriormente las células se expusieron al calor durante 1 min a 42°C en un Baño María, y se incubaron durante

2 min a 4°C (hielo triturado) y se agregaron 750 µL de medio LB (Luria-Bertoni) sin antibiótico. El vial sellado con parafilm se incubó durante 60 min a 37°C en agitación a 150 rpm en posición horizontal. Finalmente se sembraron 30 µL de las bacterias infectadas en placas con LB/agar con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C. De las colonias que se observaron en la placa se seleccionaron al azar 9 clonas, a las cuales se les realizó una PCR utilizando los oligos LAPfw y CL1rv para verificar la identidad del plásmido y se sembraron en otra placa para mantener las clonas aisladas e identificadas.

#### **2.2.5.2. Extracción del plásmido para su secuenciación**

Se sembró una clona positiva por PCR en 10 mL de medio líquido LB con ampicilina (100 µg/mL); los tubos con el inóculo se incubaron durante 16 h a 37°C a 150 rpm. Al siguiente día se realizó la extracción del plásmido siguiendo el protocolo del kit *QIAprep Spin Miniprep* mientras que el producto se observó en un gel de agarosa al 1%. Después se midió la concentración de la muestra en un espectrofotómetro (NanoDrop ND1000, Thermo scientific). Se enviaron 3 µL (30 ng/µL) en 10 µL de agua destilada con los oligos LAPfw y CL1rv para secuenciar con el sistema *Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing* en el IBT–UNAM.

La interpretación de los resultados de secuenciación se realizó con el programa *Sequencher 5.0*, mientras que con el programa *NEB cutter* se corroboró que no fuese digerida la secuencia por las enzimas seleccionadas como sitios de restricción. También se compararon la secuencia diseñada y la obtenida experimentalmente con el programa ClustalW2. Derivado de estos resultados, se comparó la secuencia de CL1 con otras secuencias reportadas en el *Gen Bank*, ver Anexo 4.

Cuadro 10. Material utilizado en el proceso de clonación y expresión de la proteína quimérica rFhLAP-CL1.

<b>Plásmido</b>	<b>Característica</b>	<b>Resistencia</b>
pJET1.2	Tiene un sitio múltiple de clonación expandido, así como un promotor T7 para transcripción <i>in vitro</i>	Ampicilina
pGEM	Tiene los promotores T7 y SP6 para la polimerasa RNA adyacentes al sitio de múltiple clonación	Ampicilina
pRSET A	Tiene un promotor T7, un sitio de unión al ribosoma, una etiqueta de 6 histidinas en la posición N-terminal, además del sitio múltiple de clonación.	Ampicilina
pET15b	Tiene un promotor T7/ <i>lac</i> , un sitio de unión al ribosoma, una etiqueta de 6 histidinas en la posición N-terminal, además del sitio múltiple de clonación.	
<b>Cepas de <i>E. coli</i></b>	<b>Característica</b>	<b>Resistencia</b>
DH5 $\alpha$	Permite la replicación de plásmidos	Ninguna
TOP 10	Permite la replicación del plásmido	Ninguna
BL21 (DE3) pLysS	Favorece la expresión de proteínas que pudieran ser tóxicas debido a que posee un gen que codifica para la T7 lisozima	Cloramfenicol
Rosetta	Se pueden obtener mejores rendimientos de la proteína expresada	Cloramfenicol

### 2.2.5.3. Subclonación en el vector de expresión

Para este procedimiento se amplificaron los plásmidos de expresión pRSETA y pET15b al transformar células DH5 $\alpha$  para incrementar el material, la metodología utilizada se describió previamente. Después se realizó la extracción de los plásmidos con la metodología mencionada en el punto anterior. Se midió la concentración del DNA de los plásmidos y se procedió a preparar una reacción de doble digestión para linearizar los plásmidos.

En la reacción de doble digestión para linearizar los plásmidos se utilizaron las enzimas *XhoI* y *HindIII* (Invitrogen) para el plásmido pRSETA, mientras que para el plásmido pET15b se usaron las enzimas *NdeI* y *BglII* (Fermentas) y se siguió el protocolo sugerido por los fabricantes. Los plásmidos linearizados se almacenaron a -20°C hasta su empleo.

De forma simultánea se amplificaron las construcciones LAP-CL1/pJET1.2 y LAP-CL1/pGEM como se describió anteriormente; también se realizó una doble digestión de las construcciones antes citadas para extraer el inserto. Para el plásmido pJET1.2 se utilizaron las enzimas *XhoI* y *HindIII*, mientras que para el plásmido pGEM-T se usaron las enzimas *NdeI* y *BglII*.

El producto de la doble digestión se colocó en un gel de agarosa al 3%, después de ubicar la banda correspondiente al peso del inserto, se cortó la banda de agarosa, se purificó con el sistema comercial *QIAquick Gel Extraction* y el DNA extraído fue evaluado en un gel de agarosa al 1% (90 V, 100 mA, 40 min).

Con el DNA purificado y los plásmidos linearizados, se procedió a preparar la reacción de ligado con una relación inserto-vector de 3:1 (300ng:100ng) con 2 U de T4 ligasa (Invitrogen), las reacciones se mantuvieron a 4°C durante 24 h. Posteriormente se transformaron las bacterias BL21 (DE3) pLysS y Rosseta (DE3)

con 100 ng del plásmido pRSETA/rFhLAP-CL1 y pET15b/rFhLAP-CL1 respectivamente, como se describió anteriormente. Se sembraron 30 y 50 uL del cultivo de bacterias en placas con medio SOB (Super Optimal Broth) con ampicilina (100 µL/mL), además se adicionaron 30 µL de glucosa en las placas sembradas con BL21 (DE3) pLysS.

Después de observar el crecimiento de algunas colonias en la placa, se seleccionaron cuatro clones para inocular cada una en un tubo con 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (35 µg/mL), también se sembraron en otra placa las colonias seleccionadas para mantenerlas aisladas e identificadas. Los cultivos de la BL21 (DE3) pLysS y Rosseta (DE3) se incubaron a 37°C durante 16 h en agitación constante (200 rpm). Posteriormente se realizó la extracción del DNA del plásmido siguiendo el protocolo del kit *QIAprep Spin Miniprep*. Para corroborar la presencia del inserto en el plásmido, se preparó una reacción de doble digestión como se describió anteriormente. Para evaluar el producto de la digestión, se preparó un gel de agarosa al 1% que se corrió a 90V y 100mA durante 40 min, por último se tiñó el gel con bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989).

### **2.3. Expresión y purificación de la proteína quimérica rFhLAP-CL1**

#### **2.3.1. Condiciones óptimas de expresión**

Inicialmente se realizó una cinética de crecimiento para la BL21 (DE3) pLysS y Rosseta (DE3) con la construcción quimérica y el respectivo plásmido; se preparó un cultivo con las cepas antes mencionadas, de 16 h de crecimiento a 37°C, en agitación constante a 200 rpm, con 3 clones por tubo, de cada una de las cepas recombinantes en 3 mL de medio LB, adicionando ampicilina (100 µg/mL), 0.5% de glucosa en el cultivo de BL21 (DE3) pLysS; al siguiente día se subcultivó en un matraz con medio LB en una proporción 1:100. En un periodo de 10 horas, durante cada hora, se tomó una alícuota de 1 mL y se realizó la lectura de la densidad del cultivo de las bacterias a 600 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf).

Con los datos obtenidos de la cinética de crecimiento de la bacteria se calculó la Tasa específica de crecimiento (TEC), con la siguiente fórmula:

$$\text{TEC} = \text{LN}(\text{DO}_1/\text{DO}_0)/(\text{T}_1-\text{T}_0) \text{ (Neidhardt, et al., 1990)}$$

donde  $\text{DO}_0$ = densidad óptica inicial

$\text{DO}_1$ = densidad óptica siguiente

$\text{T}_0$ = tiempo inicial

$\text{T}_1$ = tiempo siguiente

LN= logaritmo natural

También se calculó el tiempo de duplicación con la siguiente fórmula:

$$\text{TD} = \text{LN}(2)/\text{TEC}; \text{ expresado en } \text{h}^{-1} \text{ (Neidhardt, et al., 1990)}$$

donde TD= tiempo de duplicación

LN= logaritmo natural

2= tras la división celular, se tienen 2 células.

TEC= tasa específica de crecimiento

Estos datos fueron utilizados para determinar el tiempo óptimo para inducir el cultivo con isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma St. Louis MO, USA). Posteriormente se determinó la concentración adecuada de IPTG para los cultivos; para lo cual se preparó un cultivo de bacterias BL21 (DE3) pLysS y Rosseta (DE3) como se describió anteriormente, solo que en ésta ocasión se subcultivó en 3 matraces, y cuando el cultivo cumplió con el tiempo óptimo, se tomó una alícuota que tuvo la función de testigo en el experimento; después se adicionó una concentración diferente de IPTG a cada matraz: 0.25, 0.5 y 1 mM, dicho cultivo se mantuvo durante 5 h más a 37°C, en agitación constante (200rpm). Las fracciones fueron resueltas en un SDS-PAGE.

También se probaron tres condiciones diferentes de temperatura: 25, 30 y 37°C. Para este experimento, se prepararon nuevamente los cultivos como se

describió anteriormente, en esta ocasión cada matraz con el cultivo se mantuvo a la temperatura señalada.

Otra variable que se probó fue el tiempo óptimo de la cosecha de las bacterias, probando 5, 12 y 16 h pos-inducción. Tanto las fracciones solubles, como las insolubles fueron analizadas en un gel de acrilamida al 12% y en un *western blot* usando un anticuerpo anti-Histidina (Invitrogen) para corroborar que se trataba de la proteína quimérica rFhLAP-CL1.

### **2.3.2. Purificación de la proteína quimérica rFhLAP-CL1**

#### **2.3.2.1. Preparación de la muestra**

Con las condiciones determinadas para la expresión de la proteína, se preparó un litro del cultivo de Rosetta (DE3)/rFhLAP-CL1, se subcultivó en medio Terrific broth (TB). El cultivo se cosechó y se colocó en tubos de 50 mL (35 mL por tubo) y se centrifugó a 12490 *xg* durante 25 min a 4°C; se eliminó el sobrenadante y se lavó el botón bacteriano con PBS (pH 7.4) frío en 2 ocasiones; enseguida se pesó el tubo para conocer la cantidad de biomasa que se obtuvo. Después del segundo lavado, se resuspendió el botón bacteriano en una proporción de 3 mL de PBS (pH 7.4) frío por cada gramo de biomasa. Se colocó 1 mL de la muestra en tubos de 1.5 mL para sonicar una vez durante 45 s a 4 °C en un sonicador Virsonic 550, con 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma St. Louis MO, USA). Después las muestras se centrifugaron a 12490 *xg* durante 10 min a 4°C con el fin de separar la fase soluble de la insoluble.

El botón de la fase insoluble se lavó con 1 mL de PBS (pH 7.4) 1x-Triton X100 al 2% frío, se resuspendió completamente. Las muestras se centrifugaron a 12490 *xg* durante 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se repitió el lavado. El siguiente lavado se realizó con PBS (pH 7.4) frío, se centrifugó bajo las condiciones ya mencionadas y se eliminó el sobrenadante. Por último, el botón fue resuspendido

en el amortiguador para unión a la columna de níquel con urea 8 M, la muestra permaneció en agitación constante durante 18 horas a 4°C.

### **2.3.2.2. Purificación de la muestra con la proteína rFhLAP-CL1**

La proteína recombinante rFhLAP-CL1 fue purificada bajo condiciones no desnaturalizantes con cromatografía de afinidad Ni-NTA (QIAGEN Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empacó la columna con 2 mL de Ni-NTA Agarosa (Qiagen) y se lavó la matriz con 5 volúmenes (10 mL) de agua destilada para retirar el etanol; enseguida se equilibró la matriz con 2 volúmenes (4 mL) del amortiguador de unión. Previamente la muestra se centrifugó a 12490  $xg$  durante 10 min a 4°C antes de colocarla en la columna. Se colectaron las primeras fracciones que corresponden a material “no unido”; enseguida se lavó 5 veces la columna con 2 volúmenes (4 mL) del amortiguador de lavado y se colectaron las fracciones. Después la columna se eluyó con 3 mL del amortiguador de elución, en esta fracción se colectó la proteína. Después se lavó la columna con 2 volúmenes (4 mL) del amortiguador de unión. Las muestras se analizaron en SDS-PAGE al 15%, siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970), las condiciones de electroforesis fueron de 60 V en el gel concentrador y de 120 V en el gel separador; un gel fue teñido con azul de Coomassie durante 5 min, posteriormente se colocó en una solución decolorante durante 12 h y se lavó con agua destilada.

### **2.3.3. Diálisis de la proteína quimérica rFhLAP-CL1**

Se eliminó de forma gradual la urea de la fracción de elución obtenida en el procedimiento de purificación. Se empleó una membrana Spectra/Por (Daigger) para realizar la diálisis, también se utilizó un amortiguador de unión sin el imidazol y en concentraciones decrecientes de urea: 6, 4, 3, 2, 1 y 0 M de urea. La proporción es de 10 mL de la fracción de elución en un litro del amortiguador, se cambió el amortiguador cada 12 h y la muestra se mantuvo en agitación constante a 4°C.

### **2.3.4. Gel de acrilamida y *western blot* para evaluar a la proteína quimérica rFhLAP-CL1**

Se prepararon las muestras para electroforesis en gel de acrilamida, cada fracción soluble e insoluble se mezcló con el amortiguador de lisis (SDS 10%, 2 $\beta$  Mercaptoetanol 10mM, glicerol 20%, 0.2 M Tris-HCl 6.8, azul de bromofenol 0.05%) en una proporción de 1:1, después se mantuvieron las muestras a 90°C durante 10 min. Las muestras se analizaron en 2 SDS-PAGE al 15%, siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970), las condiciones de electroforesis fueron de 60 V en el gel concentrador y de 120 V en el gel separador; un gel fue teñido con azul de Coomasie durante 2 min, posteriormente se colocó en una solución decolorante durante 12 h y se lavó con agua destilada.

El segundo gel desnaturalizante se utilizó para transferir la proteína en una membrana de nitrocelulosa (BioRad Hercules, CA0.45  $\mu$ M; Towin *et al.*, 1979,). El gel se mantuvo 5 min en la solución de transferencia al igual que la membrana, también se humedecieron las esponjas y el papel filtro con la solución antes de ensamblar la cámara. Posteriormente la cámara fue colocada en hielo y la transferencia se realizó a 60 V durante 1.30 h, al término de la transferencia la membrana se lavó con PBS (pH 7.4) durante 5 min. Inmediatamente se bloqueó la membrana durante 30 min con 2% de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma St. Louis MO, USA) en PBS (pH 7.4) más 0.05% de Tween-20 (Sigma St. Louis MO, USA) con agitación constante a 23°C. Posteriormente, la membrana fue incubada con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-histidinas conjugado a peroxidasa (Roche) en una dilución de 1:500 en PBS (pH=7.4) con 2% BSA durante 16 h a 4°C.

Después de la incubación con el anticuerpo, la membrana se lavó 3 veces con PBS (pH=7.4) con 0.05% de Tween 20 (Sigma St. Louis MO, USA), durante 5 min y 2 veces con solo PBS frío (pH=7.4) durante 5 min con agitación constante. Para el revelado se utilizó 0.1 g de 3,3'-diaminobencidina 99% (Sigma St. Louis MO, USA) y 10  $\mu$ L de peróxido de hidrogeno 30% (J.T. Baker Phillipsburg, NJ) en 10 mL

de PBS (pH= 7.4). Al inicio en el *western blot* se utilizó como testigo positivo la proteína recombinante ESAT-6 de *Mycobacterium bovis*, la proteína recombinante tiene una etiqueta de histidinas para su detección en el *western blot*, la cual fue donada por el Laboratorio de Tuberculosis del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

## **2.4. Funcionalidad de la proteína quimérica rFhLAP-CL1**

### **2.4.1. Producción de anticuerpos contra rFhLAP-CL1**

Para este procedimiento se emplearon 100 µg de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 en un SDS-PAGE y se transfirió en una membrana de nitrocelulosa, la proteína se obtuvo a partir de la pulverización dicha membrana. A continuación se describe el procedimiento: se humedeció ligeramente la tira de nitrocelulosa de 1.0 x 0.5 cm y con una navaja se cortó la membrana en fragmentos pequeños, que se colocaron en un tubo de 1.5 mL y se les añadió 0.5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO J.T. Baker), se mezcló con un agitador tipo vortex hasta que la membrana se dispersó; la preparación reposó durante una hora a temperatura ambiente, el DMSO permitió la estabilidad de la proteína en la nitrocelulosa. Enseguida se añadió el amortiguador de carbonatos lentamente y en gotas muy pequeñas de 0.5 mL, esto evitó la formación de grumos, también se agitó de forma constante en el vortex, hasta que la nitrocelulosa se convirtió en polvo fino. Después se lavó la muestra 4 veces en 1 mL de PBS, la muestra se centrifugó a 7392 *xg* durante 1 min, el volumen de la nitrocelulosa disminuyó. Finalmente, la nitrocelulosa se resuspendió en 0.5 mL de PBS más 0.5 mL de adyuvante incompleto de Freund (IFA) y se colocó en una jeringa de 5 mL; a la jeringa se le quitó el émbolo para introducir la mezcla y se le quitó la aguja porque se selló la punta con parafilm.

Para garantizar una mezcla homogénea, se sonicó mediante 3 pulsos de 45 seg a una intensidad de 15% con descansos de un minuto y medio entre cada pulso,

el proceso se realizó en hielo para evitar la desnaturalización de la proteína quimérica por efecto del calor.

Con la proteína recombinante preparada se inocularon 2 conejos hembras de 8 semanas de edad de la raza Nueva Zelanda para probar su capacidad inmunogénica mediante la producción de anticuerpos. A cada animal se le administro 100  $\mu$ g de la proteína recombinante rFhLAP-CL1 emulsificado en IFA vía intradérmica durante 4 ocasiones, repitiendo la misma dosis, con un intervalo de 4 semanas, ver Figura 4. Además se tomaron muestras de sangre 2 semanas después de cada inoculación para obtener el suero y medir el título de anticuerpos; para obtener el suero, la muestra se mantuvo durante 4 h a temperatura ambiente para permitir la coagulación y separación de la fase líquida, enseguida el tubo se centrifugó a 1000 xg durante 25 min a 4°C y se colectó el suero en tubos de 1.5 mL que posteriormente fueron almacenados a -20° hasta su uso.

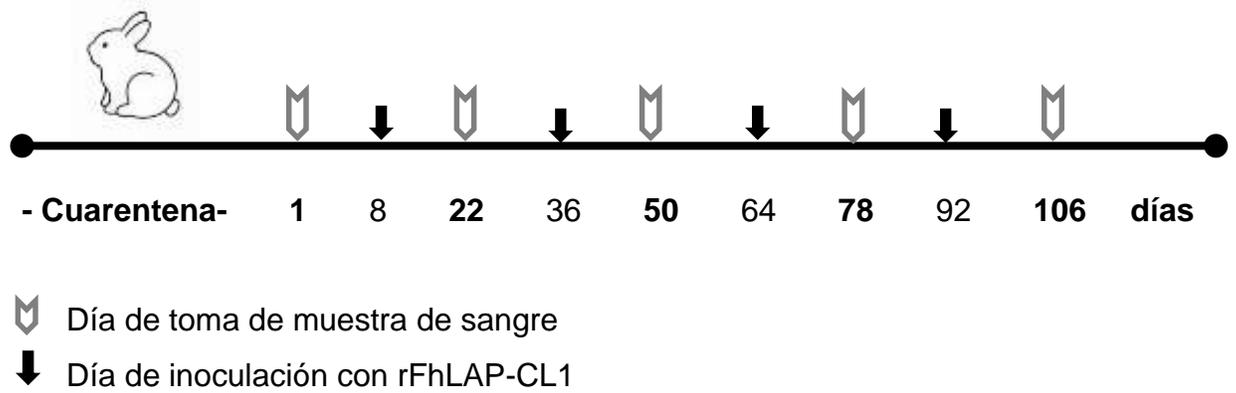


Figura 3. Esquema de inoculación con la proteína quimérica rFhLAP-CL1 en conejos para la producción de anticuerpos.

#### **2.4.2. Reconocimiento de rFhLAP-CL1 por anticuerpos de bovinos en pastoreo infectados con *F. hepatica***

Se tomó una muestra de sangre y heces a 15 bovinos en pastoreo en el rancho Chacuaro en Chiquimitio, Michoacán, México para obtener el suero y realizar las pruebas coproparasitoscópicas de sedimentación. Los bovinos eran de raza Holstein y pastoreaban en una región endémica de fasciolosis. Como antecedente, los animales tenían 7 meses sin desparasitación. En el laboratorio se realizó la técnica de sedimentación, para corroborar que estuvieran infectados con *F. hepatica* y de McMaster para detectar nematodos. Por otra parte, se obtuvieron 8 muestras de suero de bovinos bajo condiciones de estabulación en Tizimin, Yucatán (zona libre de fasciolosis) donadas por la Dra. Clara Espitia del Instituto de Investigaciones Biomédicas, este último grupo de animales sirvió como grupo control negativo.

Debido a que la proteína recombinante rFhLAP-CL1 se mantiene en un amortiguador con urea, se decidió emplear la técnica de *western blot*. Dicha proteína fue colocada en SDS-PAGE y transferida a una membrana de polivinilideno de difluorido (PVDF, Bio-Rad) como se describió anteriormente. La membrana con la proteína transferida se cortó en tiras de 3 mm de ancho, cada una de las cuales se incubó con una muestra de suero de bovino en PBS (pH=7.4) a una dilución de 1:200 durante 4 h a 23°C con agitación constante. La unión de anticuerpos a la proteína rFhLAP-CL1 fue detectada con proteína G conjugada a peroxidasa (HRPO), la cual se utilizó a una dilución 1:2000 en PBS (pH 7.4) más 0.05% Tween 20 más 1% BSA y se incubó durante 1 h a 23°C en agitación constante.

### **3. Resultados**

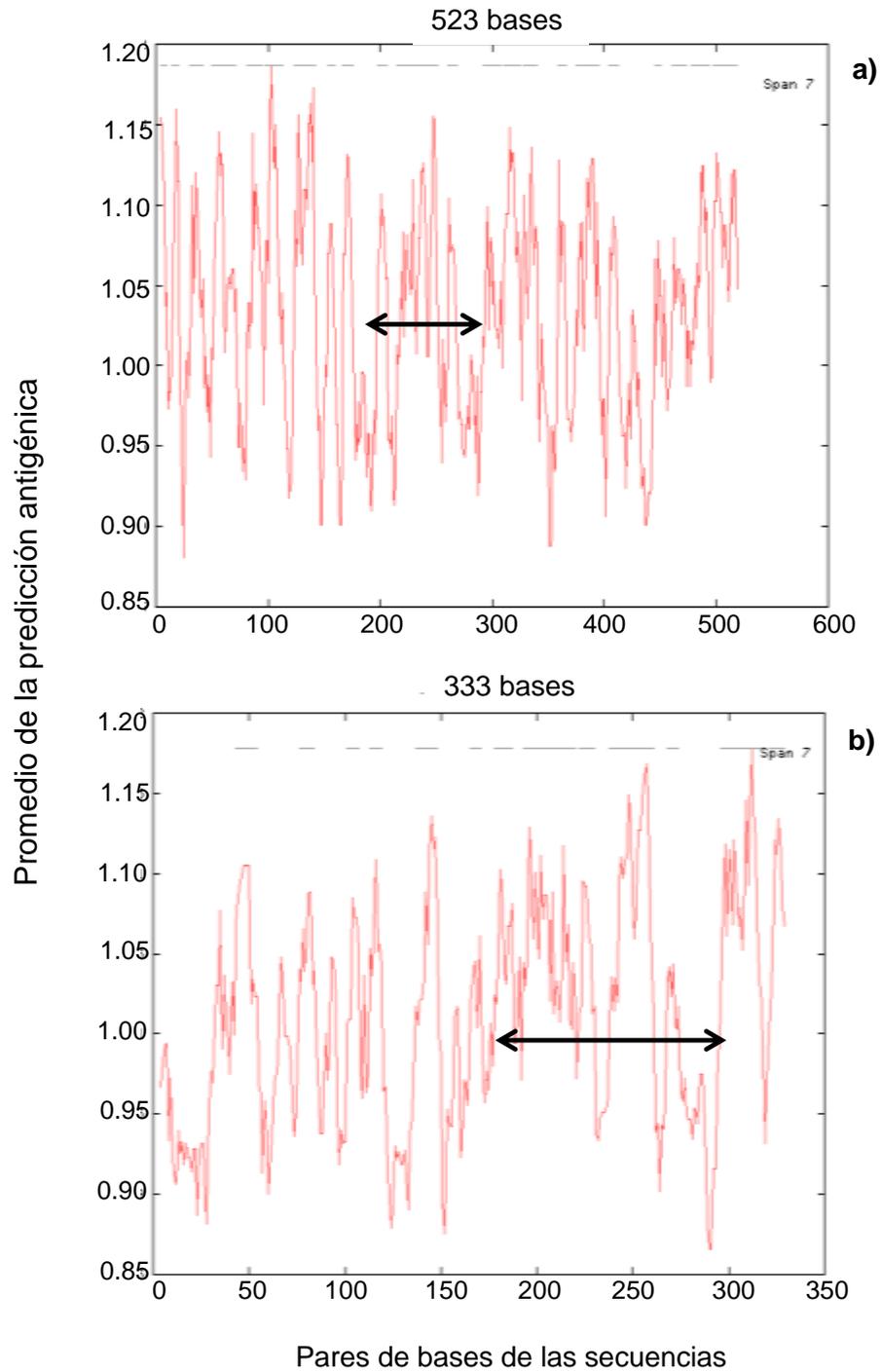
#### **3.1. Diseño de la proteína quimérica**

Después de analizar las secuencias de LAP y CL1 con tres programas diferentes de predicción antigénica (Anexo 1 y 1.2), se seleccionó una secuencia de los aminoácidos 196 al 287 (91 aa) de la región amino terminal de LAP (Figura 3), que incluyó cuatro determinantes antigénicos que fueron identificados por cada uno de los tres programas. También se seleccionó una secuencia de 136 aa (173-309 aa) de la región carboxilo de CL1, ver Figura 5, que incluyó seis determinantes antigénicos (Anexo 1.3).

Con la secuencia predicha se estimó un peso molecular de ~25 kDa para la futura proteína *rFhLAP-CL1*; por otra parte, el análisis de estructuras secundarias mostró 3 hélices alfa, 8 plegamientos beta y 11 torsiones, ver Figura 6.

No se encontraron valores superiores a 1.6 que indicaran regiones hidrofóbicas, ni se encontraron dominios transmembranales en la secuencia quimérica LAP-CL1.

Por otra parte, el análisis con el programa Pfam, mostró que la proteína quimérica tiene solo parte del dominio catalítico de LAP y de CL1, pero estos sitios activos están incompletos, por lo que no se espera que la *rFhLAP-CL1* muestre actividad enzimática. La LAP pertenece a la Familia de Peptidasas M17 mientras que la CL1 pertenece a la familia Peptidasa C1, ver Figura 7.



**Figura 4. Predicción antigénica con el programa de Kolaskar y Tongaonkar.** a) región amino terminal de 91 aa de Leucina aminopeptidasa, b) región carboxilo de 136 aa de Catepsina L1.



**Sequence search results**  
[Show](#) the detailed description of this results page.  
 We found **1** Pfam-A match to your search sequence (**all** significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.  
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

A)

**Significant Pfam-A Matches**  
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
<a href="#">Peptidase_M17</a>	Cytosol aminopeptidase family, catalytic domain	Domain	<a href="#">CL0035</a>	183	503	186	425	5	237	311	150.7	4.1e-44	281,356	<a href="#">Show</a>

**Sequence search results**  
[Show](#) the detailed description of this results page.  
 We found **2** Pfam-A matches to your search sequence (**all** significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



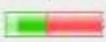
[Show](#) the search options and sequence that you submitted.  
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

B)

**Significant Pfam-A Matches**  
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
<a href="#">Inhibitor_I29</a>	Cathepsin propeptide inhibitor domain (I_2)	Domain	n/a	6	65	6	65	1	58	58	58.8	4.7e-16	n/a	<a href="#">Show</a>
<a href="#">Peptidase_C1</a>	Papain family cysteine protease	Domain	<a href="#">CL0125</a>	93	306	93	305	1	218	219	268.1	6.2e-80	254,274,117	<a href="#">Show</a>

**Sequence search results**  
[Show](#) the detailed description of this results page.  
 We found **2** Pfam-A matches to your search sequence (**all** significant) but we did not find any Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.  
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

C)

**Significant Pfam-A Matches**  
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
<a href="#">Peptidase_M17</a>	Cytosol aminopeptidase family, catalytic domain	Domain	<a href="#">CL0035</a>	2	104	32	96	39	98	37.9	7.3e-10	n/a	<a href="#">Show</a>
<a href="#">Peptidase_C1</a>	Papain family cysteine protease	Domain	<a href="#">CL0125</a>	90	229	95	227	82	218	151.2	3e-44	n/a	<a href="#">Show</a>

**Figura 6. Análisis de los dominios enzimáticos con el programa Pfam. A) Leucina aminopeptidasa; B) Cathepsina L1; C) Dominios enzimáticos incompletos de la proteína quimérica rFhLAP-CL1.**

## 3.2. Construcción de la proteína quimérica

### 3.2.1. Extracción de RNA por TRIzol

En el Cuadro 11 se describieron las concentraciones de las muestras procesadas con el TRIzol, mientras que en la Figura 8 se muestra la integridad del RNA y el cDNA.

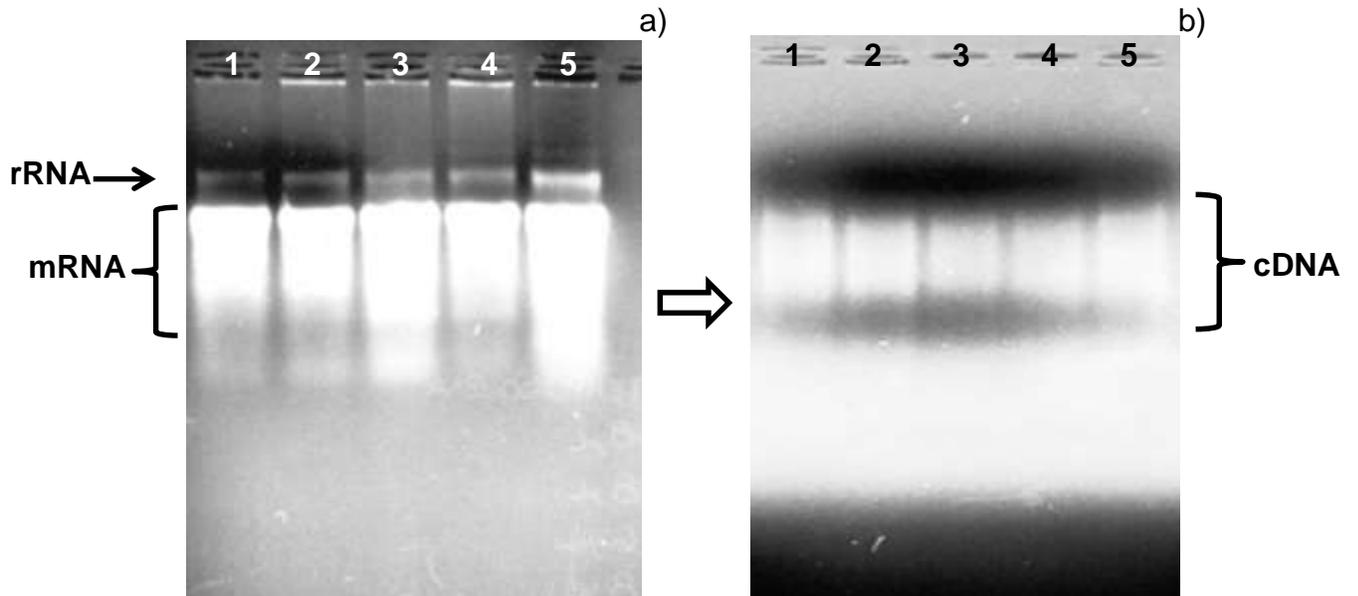
Cuadro 11. Concentración de RNA total de muestras de *F. hepatica* adulto.

Muestra	TRIzol				
	1	2	3	4	5
Concentración ng/ $\mu$ L	635.9	658.9	842.3	620.6	1361.45
Pureza*	2.10	2.07	2.11	2.06	2.15

ng/ $\mu$ L, nanogramos por microlitro

\*Los valores de pureza están dados por la relación de absorbancia de 260/280, una proporción de  $\sim$ 2.0 es aceptable como “puro” para valores de RNA, si la proporción es más baja, puede indicar la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes.

### 3.2.2. Síntesis de cDNA



rRNA= RNA ribosomal

mRNA= RNA mensajero

cDNA= DNA complementario

Figura 7. Integridad de las muestras de RNA total y de DNA complementario de *F. hepatica* en un gel de agarosa al 1.5%. a) Cinco muestras de RNA total de *F. hepatica*; b) Muestras transformadas de tRNA en cDNA de *F. hepatica*.

### 3.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

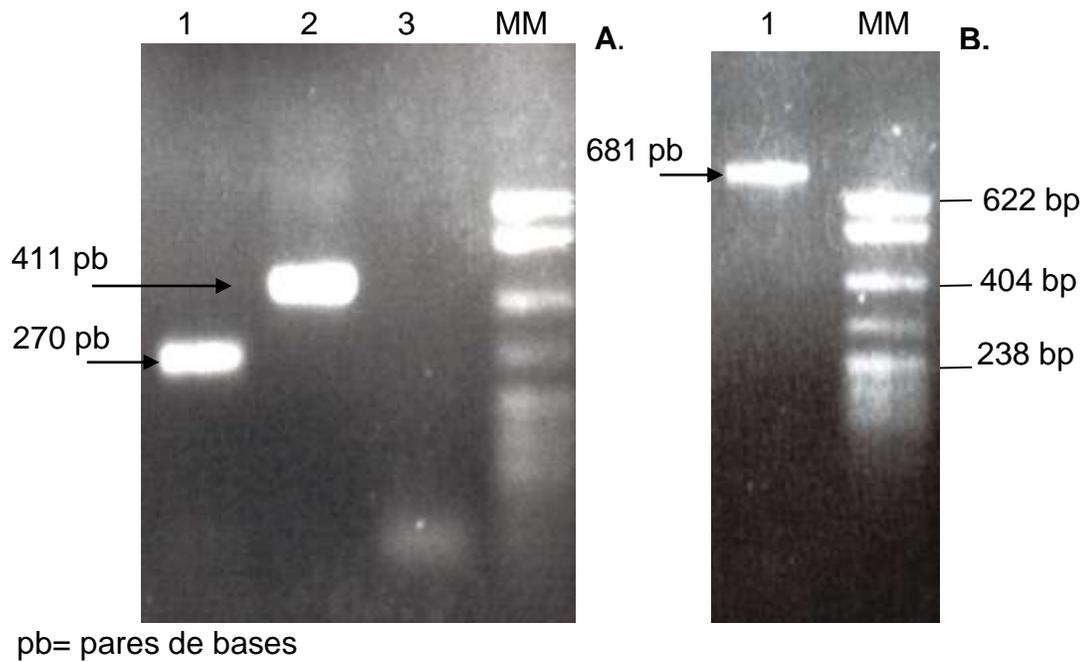
En la primera reacción de PCR se amplificaron por separado las secuencias seleccionados de LAP y CL1; en la Figura 9 se observan los productos amplificados.

### 3.2.4. Secuenciación de la secuencia quimérica de DNA de LAP-CL1

El producto quimérico se secuenció en ambas direcciones por duplicado, la secuencia completa se esquematiza en una de las barras verdes, mientras que los iniciadores externos LAPfw y CL1rv se muestran en color azul y los iniciadores con las bases sobrepuestas de LAPrv y CL1fw se muestran en color rosa, ver Figura 10.

Enseguida, se comparó la secuencia diseñada con la obtenida, con el programa ClustalW2 y se encontró una similitud del 97%, mientras que al comparar las secuencias traducidas en aminoácidos con el mismo programa se observó una similitud del 96%, ver Figura 11.

En la secuencia quimérica LAP-CL1 se observaron 16 mutaciones (ocho de transiciones y ocho de transversiones), de las cuales seis son sinónimas y 10 no sinónimas. Cabe señalar que la secuencia de aminoácidos del fragmento de LAP en la quimera obtenida presentó una identidad del 100% con la reportada (AAV59016.1), mientras que la secuencia del fragmento de CL1 presentó 91% de identidad con la reportada (CAC12806.1); éste mismo fragmento de CL1 fue comparada con otras secuencias de CL1 de *F. hepatica* reportadas en el *GenBank* y mostró una identidad del 91 al 98%. En contraste presentó una identidad menor al 80% al compararla con otro tipo de CL (L2, L3, L4, L6), ver Anexo 1.4.



**Figura 8. Amplificación de los productos de LAP, CL1 y rFhLAP-CL1 por PCR en un gel de agarosa al 1.5%** A) Secuencias amplificadas: (1) LAP, (2) CL1, (3) control negativo, (MM) marcador molecular. B) Fusión de secuencias: (1) LAP y CL1, (MM) marcador molecular 147 pb ladder.



Barras en color azul: son los iniciadores de los extremos para amplificar la secuencia química.

Barra en color rosa: son los iniciadores con las bases extras que permitieron la unión de las secuencias de LAP y CL1.

**Figura 9. Diagrama de la secuencia química de Leucina aminopeptidasa y Catepsina L1 de *F. hepatica*.**

```

Dis      DPERMAAPRIVDYLKTSLGGMKGITMSVEKVDIQKYPLMAAVNRAASVVARHDGRVVHLK 60
Exp      DPERMAAPRIVDYLKTSLGGMKGITMSVEKVDIQKYPLMAAVNRAASVVARHDGRVVHLK 60
          *****

Dis      YEPPNPTEVDTTLYLIGKITYDTGGADIKGLETESSYPYRAVEGQCRYNEQLGVAKVTG 120
Exp      YEPPNPTEVDTTLYLIGKITYDTGGADIKGLETESSYPYTAVEGQCRYNKQLGVAKVTG 120
          *****

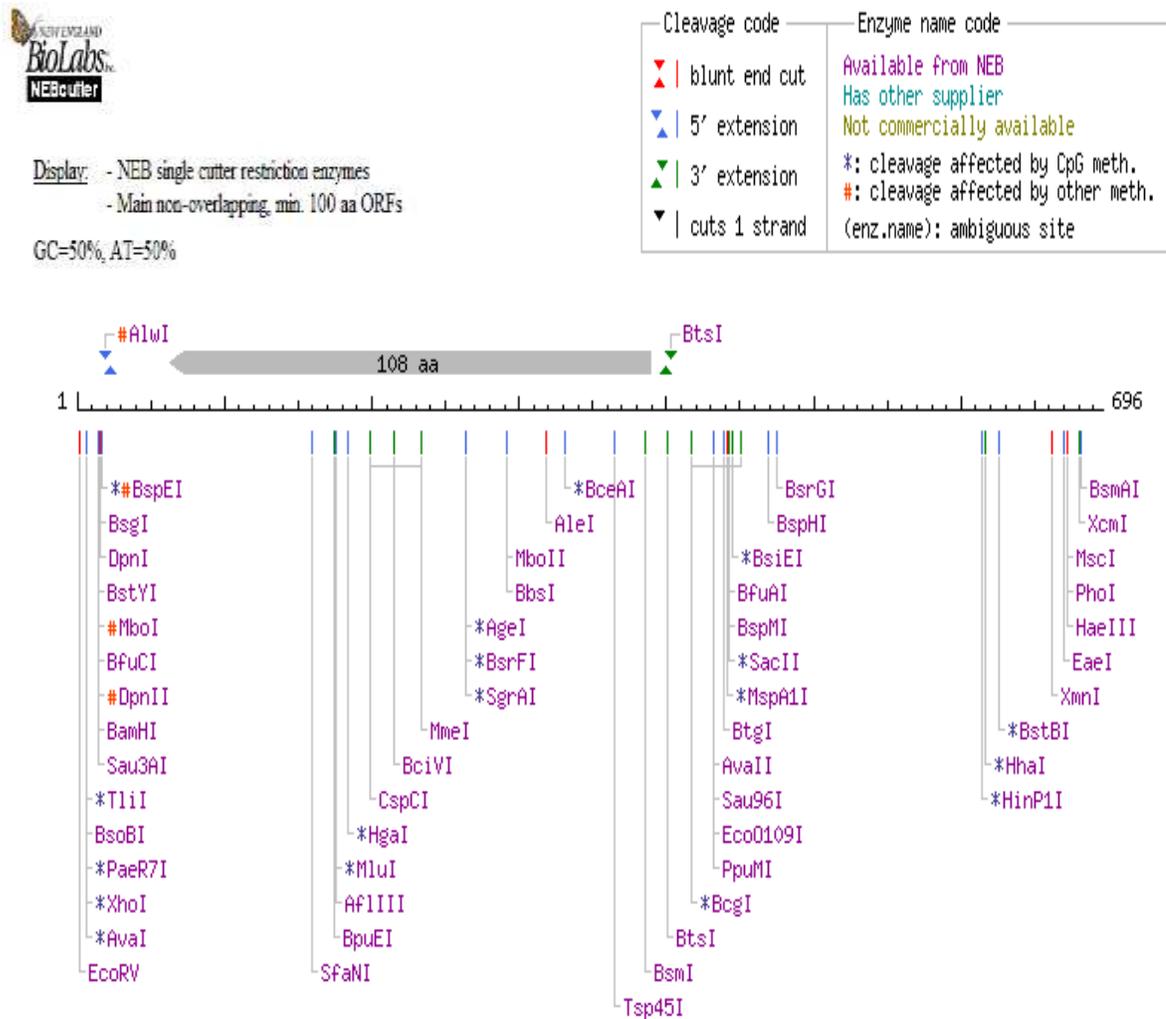
Dis      YYTVHSGSEVELKKNLVGSEGPAAIAVEAESDFMMYRSGIYQSQTCLPFALNHAVLAVGYG 180
Exp      YYTVHSGSEVELKKNLVGSEGPAAVAVDVESDFMMYRSGIYQSQTCSPEFGLNHAVLAVGYG 180
          *****

Dis      TQDGTDYWIVKNSWGLSWGGERGYIRMARNRGNMCGIASLASLPMVAR 227
Exp      TQGGTDYWIVKNSWGLSWGGERGYIRMARNRGNMGGIASLASLPMVAR 227
          **

```

**Figura 10. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica rFhLAP-CL1.** Dis= Diseñada; Exp= Experimental; (\*) los residuos en la columna son idénticos en toda la secuencia en el alineamiento, (:) sustituciones conservadas, (.) sustituciones semi-conservadas. Los epítomos consenso predichos con los programas BCepred, ABCPred y el método de predicción antigénica de Kolaskar y Tongaonkar (1990), están subrayados.

También se corroboró que el producto quimérico no fuera cortado por las enzimas de restricción, ver Figura 12.

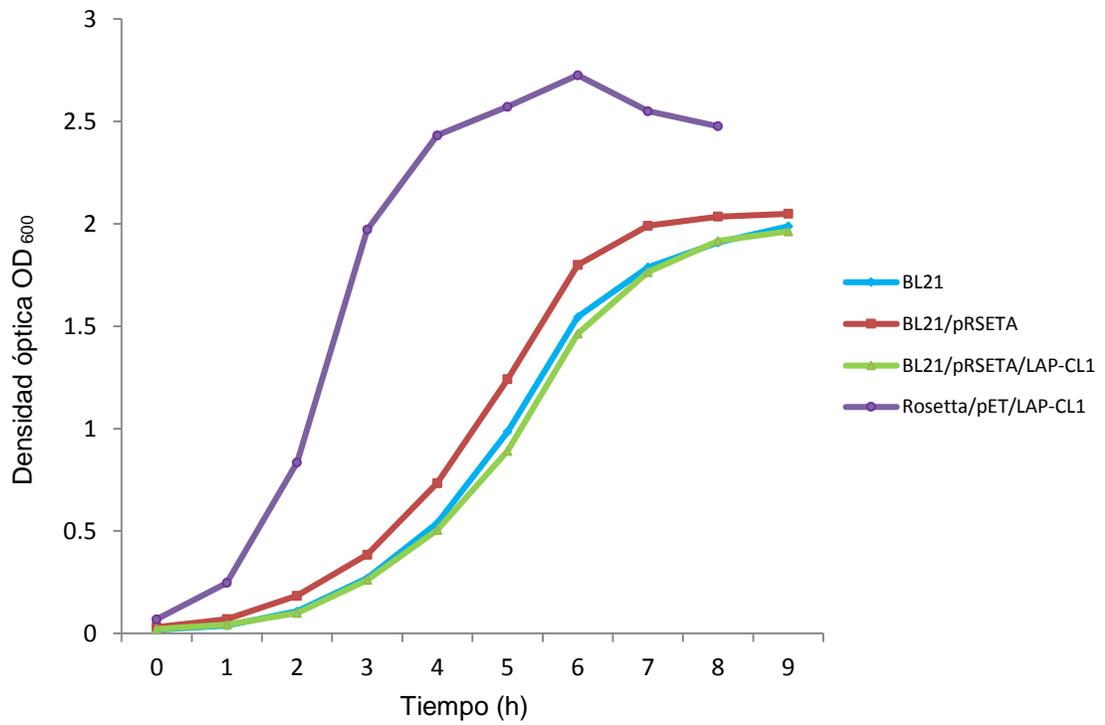


**Figura 11. Mapa de sitios de restricción de la secuencia quimérica LAP-CL1 con base en el programa NEB cutter.**

### **3.3. Condiciones de expresión de la proteína quimérica rFLAP-CL1**

En la Figura 13 se observa la cinética de crecimiento de las bacterias BL21 y Rosetta. Las cinéticas de crecimiento de ambas cepas de *E. coli* fueron diferentes aún bajo las mismas condiciones de temperatura, agitación y medio de cultivo. En lo que se refiere a la cepa BL21, no se observó diferencia entre las cinéticas de crecimiento de las bacterias sin plásmido, con el plásmido pRSETA y con la construcción pRSETA/LAP-CL1.

Se compararon las cinéticas de crecimiento de ambas cepas con la construcción quimérica; el crecimiento de la cepa Rosetta fue constante las primeras 3 h, y en ese tiempo presentó una tasa específica de crecimiento alta que superó al de la cepa BL21. Se observaron las siguientes ventajas de la cepa Rosetta sobre BL21: la fase lag fue corta (menos de una hora), lo que indica que Rosetta se adaptó más rápido al nuevo cultivo, mientras que la BL21 tardó en adaptarse y en alcanzar la fase exponencial; la fase exponencial de la cepa Roseta tuvo una duración de 5 h, y la fase estacionaria desciende rápidamente, ver Figura 13.



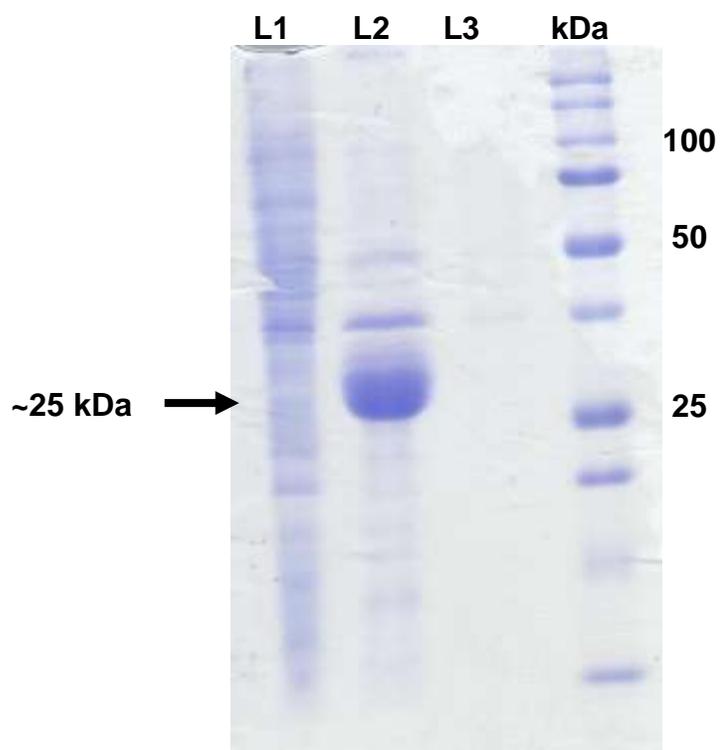
**Figura 12. Cinética de crecimiento de las cepas recombinantes BL21 y Rosetta.**

Después de calcular la tasa de crecimiento, se determinó que el momento óptimo para hacer la inducción con IPTG fue a las cinco horas del cultivo para la cepa BL21, mientras que para la cepa Rosetta fue a las cuatro horas.

En cuanto a la concentración óptima de IPTG para inducir la expresión de la proteína, al evaluar las fracciones solubles e insolubles de la cepa BL21/pRSETA/LAP-CL1 en el gel de poliacrilamida, no se advirtió una clara diferencia entre la muestra inducida con el IPTG y la no inducida. Mientras que en la evaluación de la fracción insoluble por *western blot* se observó una expresión variable de la proteína recombinante (~25 kDa). Por estos motivos se continuó trabajando con la construcción en la cepa Rosetta y se determinó que la mejor concentración para la inducción fue de 0.250 mM de IPTG.

Se determinó que la temperatura óptima del cultivo para la expresión de la proteína quimérica rFhLAP-CL1, fuese de 30°C debido a que se observaron mejores rendimientos de producción; además la temperatura ambiente fue difícil de controlar y no se garantizó mantener una temperatura constante, ni la solubilización de la proteína quimérica.

A las 16 h pos-inducción del cultivo, se observó una mayor expresión de la proteína rFhLAP-CL1 recombinante en comparación con los cultivos de 5 y 12 h pos-inducción. En la Figura 14 se observa la expresión de la proteína quimérica de ~25 kDa en el sistema pET15b/ rFhLAP-CL1; en resumen, las condiciones óptimas de expresión fueron: 0.250 mM de IPTG mientras el cultivo se mantuvo durante 16 h pos-inducción a 30°C.



**Figura 13. Expresión de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 utilizando el sistema de pET15b/Rosetta (DE3).** L1: bacteria no inducida; L2: expresión de la proteína rFhLAP-CL1 bajo las condiciones determinadas; L3: carril vacío; L4: marcador de proteína (kDa)

Se purificó la proteína quimérica rFhLAP-CL1 en una columna de níquel y ésta se encontró tanto en la fracción soluble como la insoluble, no obstante se encontró en mayor cantidad en la fracción insoluble. Se logró la purificación de la proteína, sin embargo, al momento de dializarla, no se logró eliminar por completo la urea, así que la proteína rFhLAP-CL1 se mantuvo estable en el amortiguador de unión a la columna de níquel con una concentración 2 M de urea (de lo contrario la proteína se precipitaba y formaba nuevamente los agregados).

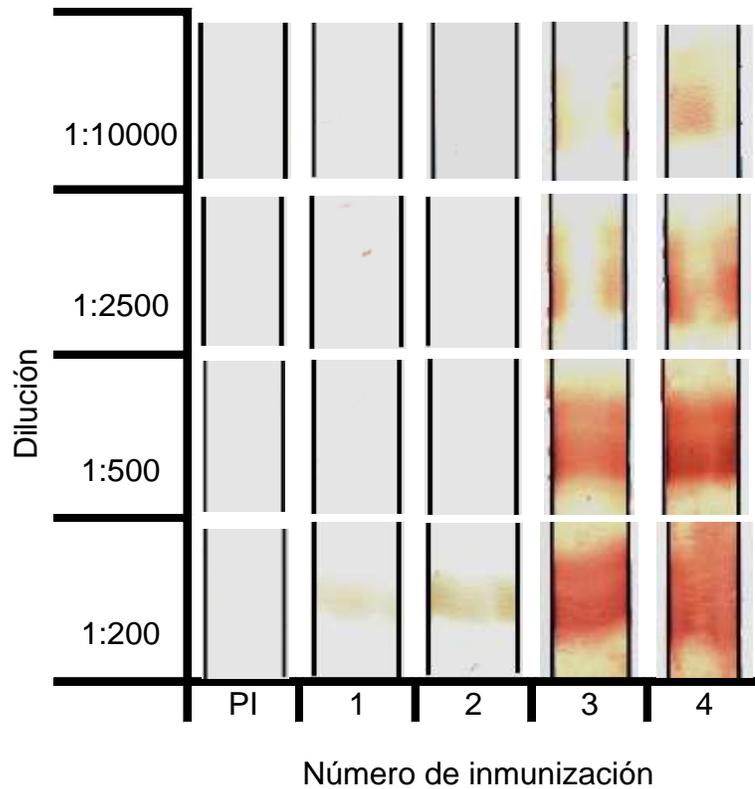
### **3.4. Funcionalidad de la proteína quimérica rFhLAP-CL1**

#### **3.4.1. Producción de anticuerpos contra rFhLAP-CL1.**

Los dos conejos inmunizados fueron capaces de producir anticuerpos contra la proteína rFhLAP-CL1; éstos fueron detectados a través de un *Western blot* desde el primer muestreo (15 días después de la primera inoculación), el título de anticuerpos fue de 1:200 (carril del 1-4), ver Figura 15. Al final de la cuarta inoculación con la proteína rFhLAP-CL1 se detectó el título de 1:10,000 (carril 3-4), ver Figura 15.

#### **3.4.2. Reconocimiento de rFhLAP-CL1 por anticuerpos de bovinos en pastoreo infectados con *F. hepatica*.**

Se seleccionaron 12 sueros de los animales muestreados en un rancho situado en Chiquimitio, Michoacán, en el cuadro 12 se muestran los resultados de las muestras analizadas con la técnica de sedimentación. Con los sueros de estos animales se realizó el *western blot*, y se observó el reconocimiento de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 de ~25 kDa por los anticuerpos en suero (carriles 12-23), ver Figura 16; mientras que el suero de los bovinos libres de fasciolosis (carriles 3-10), no presentaron ninguna reacción con la proteína quimérica rFhLAP-CL1, ver Figura 16.

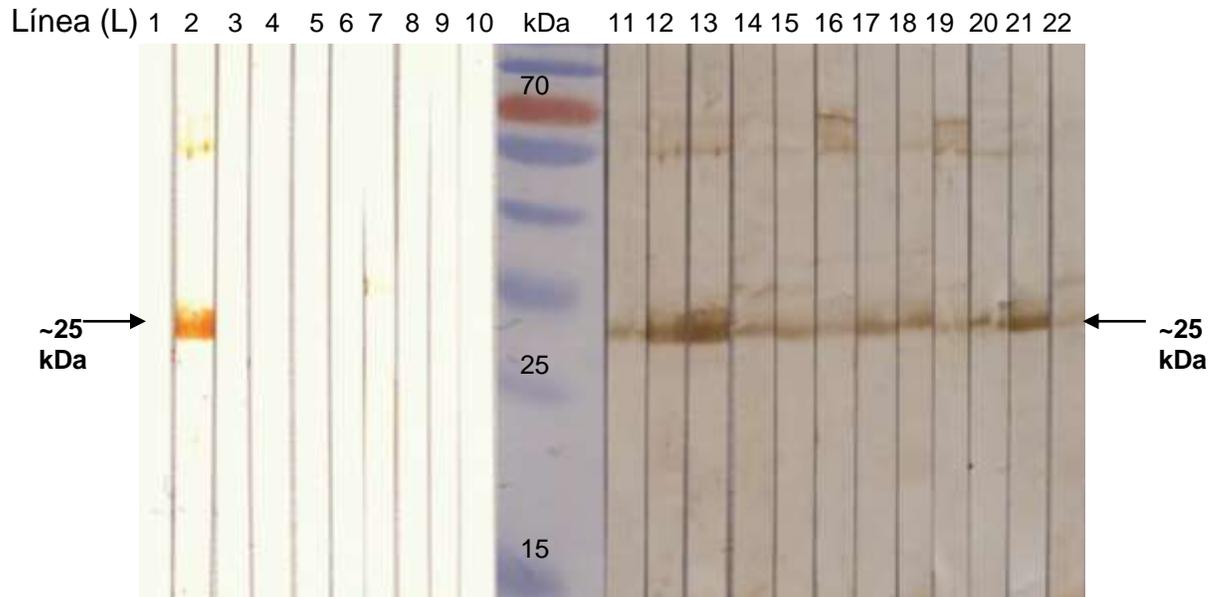


**Figura 14. Reconocimiento de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 por el suero de conejos inmunizados con 100 µg de la proteína purificada en western blot.** En el eje de las Y se observan las diluciones, mientras que en el eje de las X corresponde a las muestras de suero pre-inmune (PI), y las muestras post-inmunización en los carriles del 1-4.

Cuadro 12. Eliminación de huevos de *F. hepatica* de los bovinos muestreados en Chiquimitio Michoacán.

No. animal	Sedimentación hp5g			Observación
	1	2	3	
1	5	-	-	Muestras empleadas en el <i>western blot</i>
2	3	0	-	
3	1	2	-	
4	0	5	-	
5	1	9	-	
6	0	1	-	
7	1	-	-	
8	0	1	-	
9	0	2	-	
10	7	-	-	
11	0	5	-	
12	1	9	-	
13	7	2	-	Poca muestra de suero
14	0	0	2	Sin muestra de suero
15	0	0	-	Pocas contenido

hp5g=huevos en 5 gramos de heces



**Figura 15. Reconocimiento de rFhLAP-CL1 por los anticuerpos de bovinos en pastoreo infectados con *F. hepatica*.** L1: control negativo, suero de bovino negativo al trematodo; L2: control positivo, suero de conejo inmunizado; L3-10: sueros de bovinos de Yucatán, negativos a *F. hepatica* por la técnica de sedimentación; kDa: marcador de peso molecular; L11-22: sueros de bovinos de Michoacán, positivos al parásito por la técnica de sedimentación. Las flechas señalan el reconocimiento de la proteína rFhLAP-CL1 de ~25 kDa.

#### 4. Discusión

El propósito de este proyecto fue construir la proteína quimérica rFhLAP-CL1, utilizando las regiones más antigénicas de LAP y CL1 de *F. hepatica*. El primer paso fue realizar una revisión de literatura para recabar la siguiente información: conocer cuáles eran las proteínas de *F. hepatica* candidatas a vacunas, comparar el porcentaje de protección de las diferentes proteínas empleadas como vacunas, además de identificar si eran proteínas nativas o recombinantes. Con base en la revisión se determinó que la proteína más estudiada es la enzima CL1 (ver Cuadro 4), con resultados prometedores en experimentos de protección y en diagnóstico, mientras que la segunda proteína seleccionada fue la enzima LAP debido a los resultados en los experimentos de protección en ganado ovino (ver Cuadro 4).

Los avances en las técnicas moleculares, la secuenciación de genes de patógenos y los análisis bioinformáticos han permitido la selección *in silico* de proteínas o epitopos con aplicación en vacunas, diagnóstico o con fines terapéuticos (He *et al.*, 2010). En internet se pueden encontrar diferentes programas de bioinformática, para elegirlos se debe considerar la eficiencia en la velocidad computacional, la precisión de los algoritmos para realizar los análisis así como el tipo de lenguaje de los programas; dentro de los más utilizados están los de compañías de bioinformática o instituciones públicas como los de *expasy*, *Pfam*, *ClustalW (EMBL-EBI)*, *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*, *NEB* por citar algunos ejemplos. Otro punto importante es que aunque se han desarrollado programas para predecir epitopos, son necesarios los estudios experimentales para constatar la capacidad inmunoprotectora de la proteína (He *et al.*, 2010).

En el presente estudio se analizaron las secuencias de LAP y CL1 obtenidas del *GenBank* con diversas herramientas de bioinformática, principalmente de predicción de epitopos B, para seleccionar las regiones antigénicas también se diseñaron los iniciadores para amplificar las regiones de interés así como los iniciadores que permitieron la unión de ambas secuencias. En cuanto a la fusión de las secuencias de los genes se puede realizar con una enzima ligasa, sin embargo

en el proyecto se decidió hacer la unión de las secuencias a través del diseño de los iniciadores, empleando bases complementarias que permitieron la unión (Grandori *et al.*, 1997, Wurch *et al.*, 1998).

Para la construcción de la proteína quimérica primero se obtuvo el RNA, éste fue un paso crítico en la realización del proyecto, ya que los trematodos adultos se colectaron de hígados de bovinos en un rastro de Toluca Estado de México, tenían que llegar en óptimas condiciones al laboratorio de parasitología en la FMVZ-UNAM. Esta situación se solucionó al congelar a los trematodos (un recipiente con PBS dentro de un baño de alcohol isopropílico con hielo seco), previamente se enjuagaron con PBS estéril para eliminar sangre y bilis, de esta forma se garantizó una buena calidad del cDNA.

Para seleccionar los plásmidos, cepas de amplificación y expresión, primero se llevó a cabo una consulta bibliográfica además de verificar la disponibilidad del material en el país, otro punto importante fue consultar investigadores que trabajan con las técnicas de clonación y subclonación. El primer sistema de expresión formado por el plásmido pRSETA/BL21(DE3) no fue apropiado para una construcción compleja (la construcción quimérica presenta estructuras secundarias: hélices alfa, plegamientos beta y torsiones) aunque se probaron diferentes condiciones de temperatura, concentraciones de IPTG, tiempos pos-inducción, no se obtuvo una expresión constante de la proteína quimérica recombinante, sin embargo cuando se cambió la construcción quimérica LAP-CL1 al sistema de expresión pET-15b/Rosetta se obtuvo una expresión constante de la proteína. El plásmido pRSETA tiene un promotor T7 mientras que el pET-15b tiene un promotor T7/*lac*. El promotor *lac* controla la expresión basal, pET-15b tiene una secuencia del operador *lac* corriente abajo del promotor T7 además de un promotor natural y una secuencia que codifica para el represor *lac* (*lacI*); cuando este vector se utiliza con lisógenos DE3, el represor *lac* actúa tanto en el promotor *lacUV5* en el cromosoma del huésped para reprimir la transcripción de la T7 RNA polimerasa del huésped y

en el promotor T7lac del vector para bloquear la transcripción del gen diana por cualquier polimerasa RNA T7 (Manual pET). La ventaja de pET-15b es que su promotor tiene un mayor control sobre la RNA polimerasa T7, y como resultado se evita la producción basal. Es probable que la producción basal de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 en pRSETA sea tóxica para la bacteria BL21 (DE3) y por este motivo observamos un crecimiento lento en comparación con el sistema pET15b/Rosetta.

La expresión de proteínas recombinantes en bacterias como *E. coli* puede presentar el inconveniente de tener una producción alta, pero la proteína puede tener un plegamiento incompleto, que resulta en agregados insolubles llamados cuerpos de inclusión (Alibolandi y Mirzahoseini, 2011). Éste es el caso de la proteína rFhLAP-CL1, para resolver este problema la proteína quimérica fue solubilizada en altas concentraciones de urea, pero es necesario quitarle la urea para las evaluaciones posteriores, entonces será necesario probar algunos aditivos (aniones cosmotropos, el sulfato de amonio, el azúcar, polioles, betaínas o polímeros hidrófilos) además de evaluar diferentes concentraciones de los mismos para estabilizar el plegamiento de la proteína (Yamaguchi *et al.*, 2012). El hidrocloreuro de arginina y tiol-disulfuro se han utilizado como aditivo para mejorar el plegamiento de fragmentos de anticuerpos (Kudou *et al.*, 2011), mientras que el Triton X-100 al 1% y  $\beta$ -mercaptoetanol 20 mM mejoraron el plegamiento de la proteína recombinante Omp28 de *Brucella melitensis* (Kumar *et al.*, 2012).

En lo referente a los análisis de las secuencias de la construcción quimérica rFhLAP-CL1, no se encontraron diferencias en la secuencia parcial de nucleótidos de la LAP, lo cual sugiere que es una secuencia conservada; en contraste, se detectaron varios cambios en la secuencia parcial de nucleótidos de la CL1 en relación a la reportada en el *GenBank*. Esto sugiere que el gen de CL1 tiene más plasticidad, probablemente el gen se ha diversificado dando por resultado subclados (Morphew *et al.*, 2011). Otra posibilidad es que éstas diferencias podrían ser

mutaciones que le darían una ventaja al parásito para evadir el sistema inmunológico o podrían deberse a la capacidad para invadir diferentes tipos de hospedadores como lo sugieren Sajid y McKerrow, (2002), Irving y colaboradores (2003), Robinson y colaboradores (2008).

Tomando en cuenta la definición de antígeno de Kindt y colaboradores (2007), ellos mencionaron que la mayoría son estructuralmente complejos y contienen varios epitopos; entonces la proteína quimérica rFhLAP-CL1 cumple con esta característica al contener dos secuencias de enzimas y presentar tres epitopos consenso. Otra característica de ésta proteína es su antigenicidad y quedó demostrada esta propiedad cuando se reconocieron los anticuerpos de los bovinos en pastoreo con infección de *F. hepatica* de todas las muestras con la proteína rFhLAP-CL1 mediante un *western blot*, al detectar el 100% de las muestras positivas en comparación con el 33% cuando se empleó la técnica parasitológica de sedimentación, resulta alentador el uso de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 en el área de inmunodiagnóstico de la fasciolosis, pues es tan buena como lo reportado para la CL1; se logró detectar el 100% de bovinos y el 99.1% de ovinos con fasciolosis a través de muestras de suero al utilizar una CL1 recombinante con una ELISA (Cornelissen *et al.*, 1999; Kuerpick *et al.*, 2013); aunque la LAP no ha sido evaluada en alguna técnica de diagnóstico en ganado, en sueros de humanos mostró una sensibilidad del 100% (Marcilla *et al.*, 2008).

Otra característica que mostró la proteína rFhLAP-CL1 es la inmunogenicidad, que es la capacidad de un antígeno para inducir la respuesta inmune específica humoral y/o celular; por una parte, los linfocitos B al replicarse y diferenciarse después una estimulación antigénica pueden producir anticuerpos de diferentes isotipos, mientras que los linfocitos T están involucrados en la respuesta inmunológica mediada por células (Kindt *et al.*, 2007). En este caso, la proteína quimérica rFhLAP-CL1 fue capaz de estimular las células B para la producción de anticuerpos específicos contra dicha proteína, con la posibilidad de que tenga un

efecto inmunoprotector; es necesario comprobar si los anticuerpos secretados y que circulan en la sangre, podrían actuar como anticuerpos efectores para marcar y eliminar las fasciolas juveniles. Tanto la CL1 como LAP han sido probadas como candidatas a vacuna (Golden *et al.*, 2010, Maggioli *et al.*, 2011b, Raina *et al.*, 2011). Así que la proteína quimérica rFhLAP-CL1 fue construida para incrementar la capacidad inmunogénica y de detección al reunir en una sola proteína las regiones más antigénicas e inmunogénicas de las proteínas LAP y CL1.

Finalmente la construcción de una proteína quimérica es una alternativa viable por tener las ventajas de las propiedades antigénicas e inmunogénicas de dos o más proteínas que de forma natural no se encuentran unidas. La proteína quimérica rFhLAP-CL1 construida en este estudio podría ser una herramienta en el diagnóstico serológico de la fasciolosis, así como la base de un inmunógeno para inducir protección en el hospedador final.

## 5. Conclusiones

Se seleccionaron 3 epítomos consenso de LAP y CL1 después de analizar las secuencias con los programas de bioinformática, dichos epítomos fueron incluidos en el diseño de la proteína quimérica; también se logró la expresión de la proteína quimérica rFhLAP-CL1 en el sistema de *E. coli* Rosetta/pET15b.

La proteína quimérica rFhLAP-CL1 tiene las características de ser antigénica, al ser reconocida la proteína por los anticuerpos de bovinos en pastoreo infectados con *F. hepatica*, como se logró demostrar en el *Western blot*.

La proteína quimérica rFhLAP-CL1 es inmunogénica, ya que fue capaz de estimular fuertemente el sistema inmunológico de los conejos inmunizados, por lo que se sugiere que pueda tener un efecto inmunoprotector contra el trematodo.

## 6. Referencias

- Acosta, D., Cancela, M., Piacenza, L., Roche, L., Carmona, C. & Tort, J.F.** (2008) *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Molecular and Biochemical Parasitology* **158**, 52-64
- Acosta, D., Goñi, F. & Carmona C.** (1998). Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* **84**, 1-7.
- Alibolandi, M. & Mirzahoseini, H.** (2011). Review article: Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. *Biochemistry Research International* 1-6. doi: 10.1155/2011/631607.
- Anderson, J.C., Hughes, D.L. & Harness, E.** (1975) The immune response of rats to subcutaneous implantation with *Fasciola hepatica*. *The British Veterinary Journal* **131**, 509-18.
- Andrews, S.J.** (1999) The life cycle of *Fasciola hepatica*. pp. 1-29. in Dalton J.P. (Eds) Fasciolosis. CABI Publishing.
- Armour, J. & Dargie, J.D.** (1974) Immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. Successful transfer of immunity by lymphoid cells and by serum. *Experimental Parasitology* **35**, 381-8
- Bautista, C.R.** (2010) Reacción inmunitaria a las enfermedades infecciosas: parásitos y hongos. En: Curso de actualización "Inmunología básica veterinaria y su aplicación en la vacunación. Realizado del 20 al 23 de octubre del 2010. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Behm, C.A. & Sangster N.C.** (1999) Pathology, Pathophysiology and clinical aspects. pp. 185-217 in Dalton J.P. (Eds) Fasciolosis. CABI Publishing.
- Behm, C.A.** (1994) Pathophysiology of *Fasciola hepatica* infection in mammals. pp. 37-53 in Boray J.C. (Ed) Immunology, pathobiology and control of fasciolosis. ICOPA VIII, Izmir.
- Bennett, R., Christiansen, K. & Hadley, R.** (1999) Preliminary estimates of the direct costs associated with endemic diseases of livestock in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine* **39**, 155-171

- Berasain, P., Goni, F., McGonigle, S., Dowd, A., Dalton, J.P., Frangione, B., Carmona, C.** (1997) Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *Journal of Parasitology* **83**, 1-5.
- Boray, J.C.** (2007) Liver fluke disease in sheep and cattle. PRIMEFACT 446, NSW Department of Primary Industries. <http://www.dpi.nsw.gov.au>.
- Borji, H., Azizzadeh, M. & Kamelli, M.** (2012) A retrospective study of abattoir condemnation due to parasitic infections: economic importance in Ahwaz, southwestern Iran. *Journal of Parasitology* **98**, 954-7
- Brennan, G.P., Fairweather, I., Trudgett, A., Hoey, E., McCoy, McConville, M., Meaney, M., Robinson, M., McFerran, N., Ryan, L., Lanusse, C., Mottier, L., Alvarez, L., Solana, H., Virkel, G. & Brophy, P.M.** (2007) Understanding triclabendazole resistance. *Experimental and Molecular Pathology* **82**, 104-9.
- Buffoni, L., Zafra, R., Pérez-Ecija, A., Martínez-Moreno, F.J., Martínez-Galisteo, E., Moreno, T., Pérez, J. & Martínez-Moreno, A.** (2010) Immune response of goats immunised with glutathione S-transferase and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitology International* **59**, 147-53
- Cachat, E., Newlands, G.F., Ekoja, S.E., McAllister, H. & Smith, W.D.** (2010) Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. *Parasite immunology* **32**, 414-9
- Caicedo, R.R.E., Paz-Calderon, N.M. & Badillo, M.S.V.** (2011) Physiopathology effects in bovines (*Bos taurus* x *Bos indicus*) with fascioliasis in México. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal* 332-5
- Campbell, N.J., Kelly, J.D. & Martin, I.C.A.** (1979) Stimulation of resistance to *Taenia taeniaeformis* in the rat by infection with *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology* **9**, 469-74
- Campbell, N.J., Kelly, J.D., Townsend, R.B. & Dineen, J.K.** (1977) The stimulation of resistance in sheep to *Fasciola hepatica* by infection with *Cysticercus tenuicollis*. *International Journal for Parasitology* **7**, 347-51

- Cancela, M., Ruétalo, N., Dell'Oca, N., da Silva, E., Smircich, P., Rinaldi, G., Roche, L., Carmona, C., Alvarez-Valín, F., Zaha, A. & Tort J.F.** (2010) Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BioMed Central Genomics* **11**, 227
- Candanosa, A.I.E.** (2010) Fisiopatología de la *Fasciola hepatica*. pp. 201-215 en Quiroz R.H. y Figueroa C.J.A. (Eds) Estudios de la Fasciolosis en México de 1879 a 2006. FMVZ-UNAM.
- Carmona, C., McGonigle, S., Dowd, A.J., Smith, A.M., Coughlan, S., McGowran, E. & Dalton JP.** (1994) A dipeptidylpeptidase secreted by *Fasciola hepatica*. *Parasitology* **109**, 113-8
- Cassataro, J., Pasquevich, K.A., Estein, S.M., Laplagne, D.A., Zwerdling, A., Barrera, S., Bowden, R., Fossati, C.A., Giambartolomei, G.H. & Goldbaum.** (2007) A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine* **25**, 5958- 67
- Charlier, J., Hostens, M., Jacobs, J., Van, R.B., Duchateau, L. & Vercruyssen, J.** (2012) Integrating fasciolosis control in the dry cow management: the effect of closantel treatment on milk production. *Public Library of Science ONE* **7**(8), e43216. doi:10.1371/journal.pone.0043216.
- Chung-Dar, Y., Gan-Nan, C. & Chao, D.** (2004) Protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice induced by chimeric protein Rsag1/2. *Parasitology Research* **92**, 58 - 64
- Compute pi/Mw.** [web en línea]. Disponible desde internet: [http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) [con acceso el día 10 de noviembre del 2009].
- Corba, J., Armour, J., Roberts, R.J. & Urquhart, G.M.** (1971) Transfer of immunity to *Fasciola hepatica* infection by lymphoid cells. *Research in Veterinary Science* **12**, 292-5
- Cornelissen, J.B., Gaasenbeek, C.P., Boersma, W., Borgsteede, F.H., & Van Milligen, F.J.** (1999) Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a high specific peptide-

- based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *International Journal for Parasitology* **29**, 685-96
- Creaney, J., Spithill, T.W., Thompson, C.M., Wilson, L.R., Sandeman, R.M. & Parsons, J.C.** (1995) Attempted immunisation of sheep against *Fasciola hepatica* using gamma-irradiated metacercariae. *International Journal for Parasitology* **25**, 853-6
- Dalton, J.P. & Heffernan, M.** (1989) Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **35**, 161-6
- Dalton, J.P., McGonigle, S., Rolph, T.P. & Andrews, S.J.** (1996) Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infection and Immunity* **64**, 5066-74
- Dalton, J.P., Robinson, M.W., Mulcahy, G., O'Neill, S.M. & Donnelly, S.** (2013) Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Veterinary Parasitology* **195**, 272-85
- Dargie, J.D.** (1987) The impact on production and mechanism of pathogenesis of trematode infection in cattle and sheep. *International Journal for Parasitology* **17**, 453-63
- Dawes, B. & Hughes, D.L.** (1964) Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. *Advances in Parasitology* **2**, 97-168
- De, S., Sanyal, P.K., Sarkar, A.K., Patel, N.K., Pal, S. & Mandal, S.C.** (2008) Screening for Indian isolates of egg-parasitic fungi for use in biological control of fascioliasis and amphistomiasis in ruminant livestock. *Journal of Helminthology* **82**, 271-7
- Dertzbaugh, M.T., Peterson, D.L. & Macrina, F.L.** (1990) Cholera toxin B-subunit gene fusion: structural and functional analysis of the chimeric protein. *Infection and Immunity* **58**, 70-9
- Dewilde, S., Ioanimescu, A.I., Kiger, L., Gilany, K., Marden, M.C., Van Doorslaer, S., Vercruyse, J., Pesce, A., Nardini, M., Bolognesi, M. & Moens, L.** (2008) The hemoglobins of the trematodes *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum epiclitum*: a molecular biological, physico-chemical, kinetic, and vaccination study. *Protein science* **17**, 1653-62

- Dias, A.S., Araújo, J.V., Braga, F.R., Puppim, A.C. & Perboni, W.R.** (2013) *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. *Parasitology research* **112**, 2131-6
- Donnelly, S., Stack, C.M., O'Neill, S.M., Sayed, A.A., Williams, D.L. & Dalton, J.P.** (2008) Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**, 4022-32
- Doy, T.G., Hughes, D.L. & Harness, E.** (1981) The heterologous protection of rats against a challenge with *Fasciola hepatica* by prior infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasite immunology* **3**, 171-80
- Dunn, A.M.** (1983) *Helmintología veterinaria*. Traducción de la Segunda edición. 390 pp. Editorial El Manual Moderno.
- Espino, A.M. & Hillyer, G.V.** (2004) A novel *Fasciola hepatica* saposinlike recombinant protein with immunoprophylactic potential. *Journal of Parasitology* **90**, 876-9
- Fernández, P.A.M., Martínez-Barbosa, I., Gutiérrez, Q.M., Vázquez, T.O., Pérez, L.M.J. & García, Y.Y.** (1999) Serología para detección de helmintos extraintestinales en niños con alteración neurológica. *Revista Mexicana de Patología Clínica* **46**, 217-221
- Ferre, I., Barrio, J.P., Gonzalez-Gallego, J. & Rojo-Vazquez, F.A.** (1994) Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* L. *Veterinary Parasitology* **55**, 71-9
- Figueroa, C.J.A.** (2010) Frecuencia de *Fasciola hepatica* en Ganado ovino, caprino y venados en México. pp. 125-135 en Quiroz R.H. y Figueroa C.J.A. (Eds) Estudios de la Fasciolosis en México de 1879 a 2006. FMVZ-UNAM.
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., & Bateman, A.** (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **38**, D211-222.
- Flores, C.R.** (1986) Antecedentes históricos y clasificación. pp. 10-30 en Flores, C.R., Quiroz, R.H. and Ibarra, V.F. (Eds) Fasciolosis. INIFAP.

- Francis, M.J., Hastings, G.Z., Brown, A.L., Grace, K.G., Rowlands, D.J., Brown, F. & Clarke, B.E.** (1990) Immunological properties of hepatitis B core antigen fusion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **87**, 2545-9
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., & Bairoch, A.** (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. pp. 571-607 in Walker, J.M. (Ed.) *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press.
- Genbank.** [web en línea]. Disponible desde internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> [con acceso el día 19 de octubre del 2007].
- Golden, O., Flynn, R.J., Read, C., Sekiya, M., Donnelly, S.M., Stack, C., Dalton, J.P. & Mulcahy, G.** (2010) Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine* **28**, 5551-7
- Grandori, R., Struck, K., Giovanielli, K. & Carey, J.** (1997) A three-step PCR protocol for construction of chimeric proteins. *Protein Engineering* **10**, 1099-100
- Gutiérrez, Q.M., Martínez-Barbosa, I., Alonso, G.T., Fernández, P.A.M., Ruiz, G.L.A. & García, Y.Y.** (2000) Reactividad serológica a cinco antígenos de parásitos en adolescentes escolares. *Revista Mexicana de Patología Clínica* **47**, 32-7
- He, Y., Rappuoli, R., De Groot, A.S. & Chen, R.T.** (2010) Emerging vaccine informatics. *Journal of biomedical & biotechnology* 1-26
- Heussler, V.T. & Dobbelaere, D.A.E.** (1994) Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* **64**, 11-23
- Hillyer, G.V.** (1981) Efectos *Schistosoma mansoni* infections on challenge infections with *Fasciola hepatica* in mice. *Journal of Parasitology* **67**, 731-3
- Hillyer, G.V.** (1985) Induction of immunity in mice to *Fasciola hepatica* with a *Fasciola/Schistosoma* cross-reactive defined immunity antigen. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **34**, 1127-31
- Hillyer, G.V.** (2005) *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. Review. *Journal of Helminthology* **79**, 241-7

- Hillyer, G.V., Haroun, E.T., Hernandez, A. & de Galanes, M.S.** (1987) Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **37**, 363-9
- Holec-Gasior, L., Ferra, B. & Drapala, D.** (2012) MIC1-MAG1-SAG1 chimeric protein, a most effective antigen for detection of human toxoplasmosis. *Clinical and vaccine immunology* **19**, 1977-9
- Hughes, D.L., Hanna, R.E. & Doy, T.G.** (1982) Antibody response in cattle, sheep and rats to infection with gamma-irradiated metacercariae of *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science* **32**, 354-8
- Ibarra, V.F.** (2010) Quimioterapia y estudios terapeuticos sobre fasciolosis en México. pp. 253-272 en Quiroz R.H. y Figueroa C.J.A. (Eds) Estudios de la Fasciolosis en México de 1879 a 2006. FMVZ-UNAM.
- Irving, J.A., Spithill, T.W., Pike, R.N., Whisstock, J.C. & Smooker, P.M.** (2003) The evolution of enzyme specificity in *Fasciola* spp. *Journal of Molecular Evolution* **57**, 1-15
- Jayaraj, R., Piedrafita, D., Dynon, K., Grams, R., Spithill, T.W. & Smooker, P.M.** (2009) Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Veterinary Parasitology* **160**, 230-6
- Kaplan, R.M.** (2001) *Fasciola hepatica*: a review of the economic impact in cattle and considerations for control. *Veterinary Therapeutics* **2**, 40-50
- Kaur, T., Sobti, R.C. & Kaur, S.** (2011) Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *Parasite immunology* **33**, 95-103
- Kindt, T.J., Golsby, R.A. & Osborne B.A.** (2007) Inmunología de Kuby. Sexta edición. 574 pp. McGraw Hill.
- Knox, D.P.** (2010) Parasite vaccines: recent progress in, and problems associated with their development. *The open Infectious Diseases Journal* **4**, 63-73
- Kolaskar, A.S. & Tongaonkar, P.C.** (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *Federation of European Biochemical Societies* **276**, 172-4

- Kudou, M., Ejima, D., Sato, H., Yumioka, R., Arakawa, T. & Tsumoto, K.** (2011) Refolding single-chain antibody (scFv) using lauroyl-L-glutamate as a solubilization detergent and arginine as a refolding additive. *Protein expression and purification* **77**, 68-74
- Kuerpick, B., Schnieder, T. & Strube, C.** (2013). Evaluation of a recombinant cathepsin L1 ELISA and comparison with the Pourquier and ES ELISA for the detection of antibodies against *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* **193**, 206-13
- Kumar, A., Tiwari, S., Thavaselvam, D., Sathyaseelan, K., Prakash, A., Barua, A., Arora, S. & Kameswara R.M.** (2012) Optimization and efficient purification of recombinant Omp28 protein of *Brucella melitensis* using Triton X-100 and  $\beta$ -mercaptoethanol. *Protein expression and purification* **83**, 226-32
- Kyte, J. & Doolittle, R.F.** (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **157**, 105-32
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5
- Lang, B.Z. & Hall, R.F.** (1977) Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the White mouse. VIII. Successful vaccination with culture incubate antigens and antigens from sonic disruption of immature worms. *The Journal of Parasitology* **63**, 1046-9
- Larkin, M.A, Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G.** (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **23**, 2947-8
- Lightowers M.W.** (2014) Vaccinations pp 432-446. In Bowman D.D. (Ed). *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. Elsevier.
- López-Abán, J., Casanueva, P., Nogal, J., Arias, M., Morrondo, P., Diez-Baños, P., Hillyer, G.V., Martínez-Fernández, A.R. & Muro, A.** (2007) Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Veterinary Parasitology* **145**, 287-96
- López-Abán, J., Nogal-Ruiz, J.J., Vicente, B., Morrondo, P., Diez-Baños, P., Hillyer, G.V., Martínez-Fernández, A.R., Feliciano, A.S. & Muro, A.** (2008) The addition

- of a new immunomodulator with the adjuvant adaptation ADAD system using fatty acid binding proteins increases the protection against *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* **153**, 176-81
- López-Díaz, M.C., Carro, M.C., Cadorniga, C., Diez-Baños, P. & Mezo, M.** (1998) Puberty and serum concentrations of ovarian steroids during prepubertal period in Friesian heifers artificially infected with *Fasciola hepatica*. *Theriogenology* **50**, 587-93
- Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basika, T., Gayo, V., Rosadilla, D., Roche, L., Tort, J., & Carmona, C.** (2011b) The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine* **29**, 9057-63
- Maggioli, G., Silveira, F., Martín-Alonso, J.M., Salinas, G., Carmona, C. & Parra, F.** (2011a). A recombinant thioredoxin-glutathione reductase from *Fasciola hepatica* induces a protective response in rabbits. *Experimental parasitology* **129**, 323-330.
- Mamani, L.W. & Condori, Q.R.** (2009) Determinación de resistencia antihelmíntica (*Fasciola hepatica*) en ovinos frente a albendazol y triclabendazol, *Revista de investigaciones veterinarias del Perú* **20**, 254-62. ISSN 1609-9117.
- Marcilla, A., De la Rubia, J.E., Sotillo, J., Bernal, D., Carmona, C., Villavicencio, Z., Acosta, D., Tort, J., Bornay F.J., Esteban J.G. & Toledo R.** (2008) Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections. *Clinical and vaccine immunology* **15**, 95-100
- Márquez, L.D.** (2007) Resistencia a los antihelmínticos en nematodos de rumiantes y estrategias para su control. 168 pp. Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias, CORPOICA y COLciencias. <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/archivos/publicaciones/antihelmnticos.pdf>
- Martínez-Barbosa, I., Gutiérrez, M., Romero-Cabello, R., Ruiz-González, L., Gutiérrez-Cárdenas, E.M., Alpizar-Sosa, A. & Pimienta-Lastra, R.J.** (2006) Seroepidemiology of fascioliasis in school children in Mexico city. *Revista Biomédica* **17**, 251-7

- Martínez-Olvera, R.J., Peralta-Ortíz, J.J., Hernández-González, J.C., Ávila-Castillo, B.R., Del Razo-Rodríguez, O.E., Olave-Leyva, I., Hernández-Guzmán, K. & Molina-Mendoza, P.** (2013) Influencia de *Fasciola hepatica* en las principales variables reproductivas y concentraciones séricas de progesterona y estradiol. En: XLIX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Realizada del 10-13 de septiembre. INIFAP. ISBN 978-607-37-0062-7.
- McGonigle, L., Mousley, A., Marks, N.J., Brennan, G.P., Dalton, J.P., Spithill, T.W., Day, T.A. & Maule, A.G.** (2008) The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *International Journal for Parasitology* **38**, 149-55
- McGonigle, S. & Dalton, J.P.** (1995) Isolation of *Fasciola hepatica* haemoglobin. *Parasitology* **111**, 209-15
- Meeusen, E.N.T., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.P. & Jungersen G.** (2007) Current status of veterinary vaccines. *Clinical, microbiology reviews* **20**, 489-510
- Mendes, E.A, Mendes, T.A., dos Santos, S.L., Menezes-Souza, D., Bartholomeu, D.C., Martins, I.V., Silva, L.M. Lima & Wdos, S.** (2013) Expression of IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$  in the liver tissue of cattle that are naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* **195**, 177-82
- Mendes, R.E., Pérez-Ecija, R.A., Zafra, R., Buffoni, L., Martínez-Moreno, A., Dalton, J.P., Mulcahy, G. & Pérez, J.** (2010) Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vaccine* **28**, 2832-40
- Mezo, M., González-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Muiño, L. & Ubeira, F.M.** (2011) Association between anti-*F. hepatica* antibody levels in milk and production losses in dairy cows. *Veterinary Parasitology* **180**, 237-42
- Minor, P.D., Ferguson, M., Katrak, K., Wood, D., John, A., Howlett, J., Dunn, G., Burke, K. & Almond, J.W.** (1990) Antigenic structure of chimeras of type 1 and type 3 poliovirus involving antigenic site 1. *The Journal of general virology* **71**, 2543-51

- Mitchell, G.B.B., Armour, J., Ross, J.G. & Halliday, W.G.** (1981). Successful transfer of resistance to *Fasciola hepatica* infection in rats by immune serum and transfer factor. *Research in Veterinary Science* **30**, 246-7
- Moreau, E. & Chauvin, A.** (2010) Review Article. Immunity against helminthes: interactions with the host and the intercurrent infections. *Journal of Biomedicine and biotechnology*, 428593. doi: 10.1155/2010/428593.
- Morphew, R.M., Wright, H.A., Lacourse, E.J., Porter, J., Barrett, J., Woods, D.J. and Brophy, P.M.** (2011) Towards delineating functions within the *Fasciola* secreted cathepsin L protease family by integrating in vivo based sub-proteomics and phylogenetics. *Public Library of Science Neglected Tropical Diseases* **5**, e937. doi: 10.1371/journal.pntd.0000937.
- Morrison, C.A., Colin, T., Sexton, J.L., Bowen, F., Wicker, J., Friedel, T. & Spithill, T.W.** (1996) Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* **14**, 1603-12
- Mulcahy, G., Joyce, P. & Dalton, J.P.** (1999) Immunology of *Fasciola hepatica* infection. pp. 341–376. In Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*. CAB International, Wallingford, U.K.
- Mulcahy, G., O'Connor, F., McGonigle, S., Dowd, A., Clery, D.G., Andrews, S.J. & Dalton J.P.** (1998) Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* **16**, 932- 9
- Muro, A., Ramajo, V., López, J., Simón, F. & Hillyer, G.V.** (1997) *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Veterinary Parasitology* **69**, 219-29
- Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., & Schaechter, M.** (1990) *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*. Sunderland, Mass, Sinauer Associates.
- Ortiz, P., Scarcella, S., Cerna, C., Rosales, C., Cabrera, M., Guzmán, M., Lamenza, P. & Solana, H.** (2013) Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology* **195**, 118-121
- Paczkowski, M.J.** (2004) Effects of experimental fascioliasis on puberty and comparison of mounting activity by radiotelemetry in pubertal and gestating beef heifers. 114 pp.

- (Tesis). Texas A&M University. <http://repository.tamu.edu/bitstream/handle/1969.1/2796/etd-tamu-2004B-PREP-Paczkowski.pdf?sequence=1>
- Peng, H., Hu, Y., Zhou, A., Jin, C. & Pan, W.** (2010) Solution structure of a Plasmodium falciparum AMA-1/MSP 1 chimeric protein vaccine candidate (PfCP-2.9) for malaria. *Malaria journal* **9**,76 doi: 10.1186/1475-2875-9-76.
- Pérez-Ecija, R.A., Mendes, R.E., Zafra, R., Buffonni, L., Martínez-Moreno, A. & Pérez, J.** (2010) Pathological and parasitological protection in goats immunised with recombinant cathepsin L1 and challenged with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Journal* **185**, 351-3
- Phiri, I.K., Phiri, A.M. & Harrison, L.J.S.** (2006) Serum antibody isotype response of *Fasciola*-infected sheep and cattle to excretory and secretory products of *Fasciola* species. *Veterinary Parasitology* **141**, 234-42
- Piacenza, O., Acosta, D., Basmadjian, I., Dalton, J.P. & Carmona, C.** (1999) Vaccination with cathepsin L proteinases with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infection and Immunity* **67**, 1954-61
- ProtScale.** [web en línea]. Disponible desde internet: <http://www.expasy.ch/tools/protscale.html> [con acceso el día 10 de noviembre del 2009].
- Qiu, X., Hong, C., Li, Y., Bao, W. & Gao, X.M.** (2012) Calreticulin as a hydrophilic chimeric molecular adjuvant enhances IgG responses to the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and Immunology* **56**, 554-61
- Quiroz, R.H.** (2000) Epidemiología de la fasciolosis: Frecuencia en animales domésticos en México. pp. 130-151 en Quiroz, R.H. & Ibarra V.F. (Eds). Temas selectos de Parasitología, Vol. 1, año 2000. FMVZ-UNAM.
- Quiroz, R.H.** (2010) Estudios sobre prevalencia, frecuencia y distribución geográfica de *Fasciola hepatica* en ganado bovino de México. pp. 85-116 en Quiroz R.H. y Figueroa C.J.A. (Eds) Estudios de la Fasciolosis en México de 1879 a 2006. FMVZ-UNAM.
- Raina, O.K., Nagar, G., Varghese, A., Prajitha, G., Alex, A., Maharana, B.R., & Joshi, P.** (2011) Lack of protective efficacy in buffaloes vaccinated with *Fasciola gigantica*

- leucine aminopeptidase and peroxiredoxin recombinant proteins. *Acta Tropica* **118**, 217-22.
- Rajasekariah, G.R. & Howell, M.J.** (1979) *Fasciola hepatica* in rats: transfer of immunity by serum and cells from infected to *F. hepatica* naive animals. *Journal of Parasitology* **65**, 481-7
- Rangel, R.L.J. & Martínez, D.E.** (1994) Pérdidas por decomiso de hígado y distribución geográfica de la fasciolosis bovina en el Estado de Tabasco, México. *Veterinaria México* **25**, 327-31.
- Reszka, N., Cornelissen, J.B., Harmsen, M.M., Bieńkowska-Szewczyk, K., de Bree, J., Boersma, W.J. & Rijsewijk, F.A.** (2005) *Fasciola hepatica* procathepsin L3 protein expressed by a baculovirus recombinant can partly protect rats against fasciolosis. *Vaccine* **23**, 2987-93
- Robinson, M.W., Dalton, J.P., Donnelly, S.** (2008b) Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends in Biochemical Sciences* **33**, 601-8
- Robinson, M.W., Tort, J.F., Lowther, J., Donnelly, S.M., Wong, E., Xu, W., Stack, C.M., Padula, M., Hebert, B., & Dalton, J.P.** (2008a) Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*. *Molecular and Cellular Proteomics* **7**, 1111-23
- Rojo-Vázquez, F. & Ferre-Pérez, I.** (1999) Fasciolosis. pp. 260-282. En Cordero, del C. & Rojo, V.F. (Eds.) Parasitología veterinaria. McGraw-Hill Interamericana.
- Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F. & Martínez-Valladares, M.** (2012) Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology* **189**, 15-38.
- Roseby, F.B.** (1970) The effect of fasciolosis on the wool production of Merino sheep. *The Journal of the Australian Veterinary Association* **46**, 361-5
- Ross, J.G.** (1970) The economics of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *The British Veterinary Journal* **126**, xiii-xv
- Saha, S. & Raghava, G.P.S.** (2004) BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes. pp. 197-204. in Nicosia, G., Cutello, V., Bentley P.J. & Timis J. (Eds.) Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. ICARIS, LNCS 3239, Springer. PSIPRED. [web en línea]. Disponible desde internet:

<http://bioinf4.cs.ucl.ac.uk:3000/psipred/> [con acceso el día 10 de noviembre del 2009].

- Saha, S. & Raghava, G.P.S.** (2006) Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins* **65**, 40-8
- Sajid, M. & McKerrow, J.H.** (2002) Review: Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology* **120**, 1-21
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. 545 pp. Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N.Y.). ISBN 0879691360.
- Schmid-Hempel, P.** (2008) Parasite immune evasion: a momentous molecular war. *Trends in ecology and evolution* **23**, 318-326
- Schweizer, G., Braun, U., Deplazes, P. & Torgerson, P.R.** (2005) Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record* **157**, 188-93.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Hernández, M., Rosas, G., Martínez, J.J., Fleury, A., Cervantes, J., Aluja, A. & Larralde, C.** (2013) Development of the S3Pvac vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis: a historical review. *Journal of Parasitology* **99**, 686-92
- Sexton, J.L., Milner, A.R., Panaccio, M., Waddington, J., Wijffels, G., Chandler, D., Thompson, C., Wilson, L., Spithill, T.W. & Mitchell, G.F.** (1990) Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Journal of Immunology* **145**, 3905-10
- Shi, Q., Lynch, M.M., Romero, M. & Burns, J.M. Jr.** (2007) Enhanced protection against malaria by a chimeric merozoite surface protein vaccine. *Infection and immunity* **75**, 1349-58
- Shrivastava, N., Singh, P.K., Nag, J.K., Kushwaha, S. & Misra-Bhattacharya, S.** (2013) Immunization with a multisubunit vaccine considerably reduces establishment of infective larvae in a rodent model of *Brugia malayi*. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* **36**, 507-19
- Soulsby, E.J.L.** (1987) Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Séptima edición. 823 pp. Interamericana, México.

- Spithill, T.W. & Morrison, C.A.** (1994) Molecular vaccines for control of *Fasciola hepatica* infection ruminants. pp. 29-35. In Boray, J.C. (Ed). Immunology, Pathobiology and Control of Fasciolosis. ICOPA VIII, Izmir.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson, T.J.** (1994) Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequences weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-80
- TMPred.** [web en línea]. Disponible desde internet: [http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) [con acceso el día 10 de noviembre del 2009].
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **76**, 4350-4
- Traslacion.** [web en línea]. Disponible desde internet: <http://bio.lundberg.gu.se/edu/translat.html> [con acceso el día 20 de octubre del 2007].
- Villa, M.A., Quiroz, R.H., Correa, D., Ibarra, F., Reyes, P.M., Reyes, V.H., López, V.G., Gazarian, K., Gazarian, T. & Alonso, R.A.** (2008) Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology* **135**, 1437-45
- Vincze, T., Posfai, J. & Roberts, R.J.** (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* **31**, 3688-91
- Walsh, K.P., Brady, M.T., Finlay, C.M., Boon, L. & Mills, K.H.** (2009) Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *Journal of immunology* **183**, 1577-86
- Wesołowska, A., Jaros, S., Norbury, L.J., Jaros, D., Zygner, W. & Wędrychowicz, H.** (2013) Microarray analysis of rat immune responses to liver fluke infection following vaccination with *Fasciola hepatica* phosphoglycerate kinase. *Experimental parasitology* **134**, 33-8

- Willadsen, P.** (2008) Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope?. *Trends in parasitology* **24**, 164-7
- World Health Organization.** (2007) Report of the WHO informal meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. pp. 33. WHO headquarters, Geneva Switzerland. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/preventive\\_chemotherapy/WHO\\_CDS\\_NTD\\_PCT\\_2007.1.pdf](http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/WHO_CDS_NTD_PCT_2007.1.pdf)
- Wurch, T., Lestienne, F. & Pauwels, P.J.** (1998) A modified overlap extension PCR method to create chimeric genes in the absence of restriction enzymes. *Biotechnology Techniques* **12**, 653–7
- Yamaguchi, S., Yamamoto, E., Mannen, T. & Nagamune, T.** (2012) Review: Protein refolding using chemical refolding additives. *Biotechnology journal* **8**, 17-31

## ANEXO 1. Análisis de LAP, CL1 y LAP-CL1.

Cuadro 1. Predicción de epitopos de la proteína LAP.

	<b>Kolaskar y Tongaonkar</b>	<b>BCpred</b>	<b>ABCpred</b>
1	5 AMAALVGVSD 15	11 VGVSDLS 17	432 STVRKEDYEFNRGKTE 447
2	19 KRFDVVIF 26	19 KRFDVVIFIND 29	482 HGLGSAKPIPYTHVDV 497
3	35 CAKDAAVYEALKS 47	57 SELSIVPFP 65	22 DVVIFINDDADEGCAK 37
4	55 LGSELSIVPFPAPHSGRLIYSP 76	109 PLLYLGLSLR 117	269 LYLIGKGITYDTGGAD 284
5	86 DIRNVYDAACAGVKR 100	127 QRKHL 133	197 DPERMAAPRIVDYLKT 212
6	102 LSMGCHAPLLYLGLSLRSA 119	143 LYLPLEVR 150	391 GHVVRAYKHYTAVMDN 406
7	128 RKHLLNALLGAYHALYLP 148	173 DELVLR 179	187 RWLARDIGGSDPERMA 202
8	158 LKAQHLGV 165	204 PRIVDYLKT 212	383 LFTIATLTGHVVRAYK 398
9	172 SDELVLR 181	249 DGRVVHLKYEP 259	82 TDTADIRNVYDAACAG 97
10	203 APRIVDYLKT 212	265 VDTTLYL 271	401 TAVMDNGPPRIHRV 416
11	220 ITMSVEKVDIQYPLMAAVNRAASVVARHDGRVVHLKY 257	315 QPPGLSVS 322	33 EGCAKDAAVYEALKSF 48
12	265 VDTTLYLIGK 274	363 VMTDLLC 369	61 IVPFPAHPSGRLIYSP 76
13	297 DKCGAAAAGLFLKTLGE 313	388 TLTGHVVR 395	275 GITYDTGGADIKANGV 290
14	315 QPPGLSVSAALAFVRN 330	412 HRVSQL 418	69 SGRIYSPTGALNTDT 84
15	333 GADSYVADEILVAR 346	489 PIPYTHVDV 497	476 ASGLDKHGLGSAKPIP 491
16	364 MTDLLCEA 371	502 TEIHLVPT 509	444 GKTEYEDTLQCNNLPS 459
17	380 NPFLFTIATLTGHVVRAYKHYT 401	518 SRYVLR 527	253 VHLKYEPNPTEVDTT 268
18	PRIHRVSQL 418		226 KVDIQYPLMAAVNRA 241
19	450 DTLQCNN 456		
20	465 GHQIPAAFALASG		
21	483 GLGSAKPIPYTHVDVAG 499		
22	502 TEIHLVPTAAPLLMFASRYVLP 524		

Cuadro 1.2. Predicción de epítomos de la proteína CL1.

	<b>Kolaskar y Tongaonkar</b>	<b>BCpred</b>	<b>ABCpred</b>
1	43 HDLGLVITYTLGL 54	43 HDLGLVITYTLGL 54	261 YGTQDGTDYWIVKNSW 276
2	76 ASDILSHGI 84	79 ILSHGIPY 86	283 RGYIRMARNRGNMCGI 298
3	101 ESGYVTG 107	140 FSEQQLVDCSGP 151	98 DWRESGYVTGVKDQGN 113
4	113 NCGSCWA 119	200 VTGYTVHSGSEVELKNLV 218	7 HQWKRMYNKEYNGADD 22
5	137 SISFSEQQLVDC 148	241 IYQSQTCLPF 250	34 KHIQEHNLRHDLGLVT 49
6	165 AYEYLKR 171		119 AFSTTGTMEGQYMKNE 134
7	178 SSYPYRAVEG 187		85 PYEANNRAVPDKIDWR 200
8	193 EQLGVAKVTGYTVHSGSEVELKNLVGS 220		56 QFTDMTFEEFKAKYLT 71
9	222 GPAAIAVEA 230		219 GSEGPAAIAVEAESDF 235
10	238 RSGIYQSQTCLPFALNHAVLAVGY 261		15 KEYNGADDEHRRNIWE 30
11	268 DYWIVKN 274		199 KVTGYTVHSGSEVEL 215
12	296 CGIASLASLPMV 307		143 QQLVDCSGPWGNGCS 158
13			175 ETESSYPYRAVEGQCR 190
14			255 AVLAVGYGTQDGTDYW 270

Cuadro 1.3. Predicción de epítomos de la proteína quimérica LAP-CL1.

	<b>Kolaskar y Tongaonkar</b>	<b>BCpred</b>	<b>ABCpred</b>
1	8 PRIVDYLKTS 17	8 PRIVDYLKTSLGGMKGITMS 27	1 DPERMAAPRIVDYLKT 16
2	25 TMSVEKVDIQKYPLMAAVNRAASVVARHDGRVVHLKYE 62	56 VVHLKYEPNPTEVDTTLYL 75	57 VHLKYEPNPTEVDTT 72
3	70 DTTLYLIGKG 79	77 GKGITYDTGGADIKLETES 96	73 LYLIGKGITYDTGGAD 88
4	97 SYPYRAVEGQ 106	183 DGTDYWIVKNSWGLSWGGERG 202	79 GITYDTGGADIKLET 94
5	112 QLGVAKVTGYTVHSGSEVELKNLVGSE 139		93 ETESSYPYRAVEGQCR 108
6	141 PAAIAVEAE 149		117 KVTGYTVHSGSEVEL 132
7	157 SGIYQSQTCLPFALNHAVLAVGYG 180		137 GSEGPAIAVEAESDF 152
8	187 YWIVKNS 193		179 YGTQDGTDYWIVKNSW 194
9			201 RGYIRMARNRGNMCGI 216



**ANEXO 2. Comparación de las diferentes secuencias de Catepsina L1 en el GenBank.**

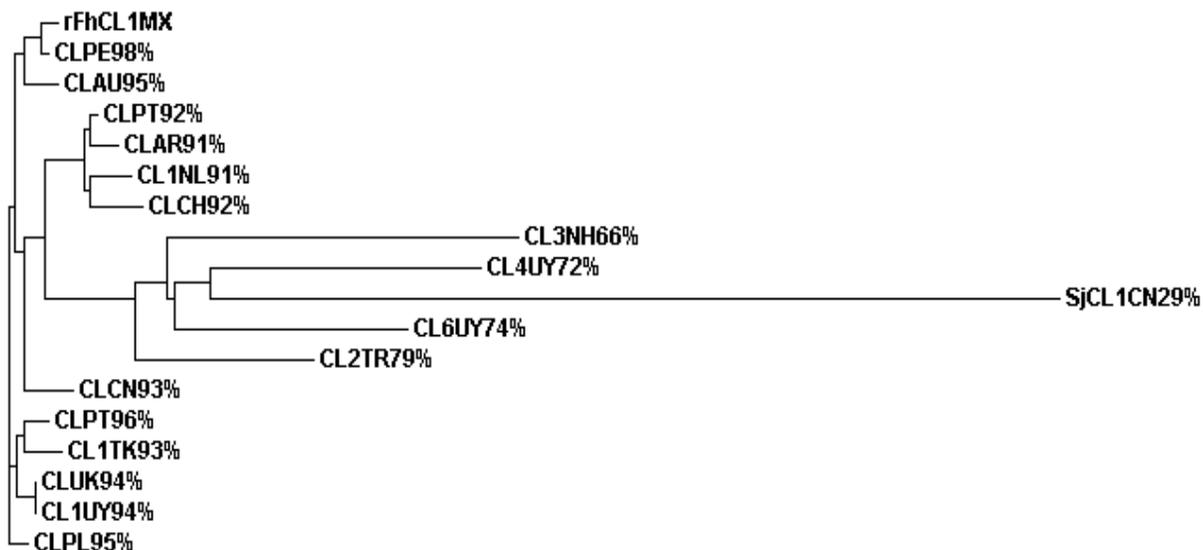


Figura 1. Comparación de la secuencia rFhCL1 con las secuencias reportadas de CL de *F. hepatica* en el *GenBank* con el programa CLUSTALW2. rFhCL1MX, secuencia amplificada en el presente estudio; CLPE98% Catepsina L de Perú (AAM11647.1), CLPT96% Catepsina L de Portugal (AAR99518.1), CLAU95% Catepsina L de Australia (Q24940.1), CLPL95% Catepsina L de Polonia (AAP49831.1), CLUK94% Catepsina L del Reino Unido (2O6X\_A), CL1UY94% Catepsina L1 de Uruguay (AAB41670.2), CLCN93% Catepsina L de China (ADP09371.1), CL1TK93% Catepsina L1 de Turquía ( AAT76664.1), CLPT92% Catepsina L de Portugal (AAR99519.1), CLCH92% Catepsina L de Suiza (CAA80450.1); CL1AR91% Catepsina L1 de Argentina (AAK38169.1), CL1NL91% Catepsina L1 de Holanda (CAC12806.1), CL2TR79% Catepsina L2 de Turquía (ABQ95351.1), CL3NH66% Catepsina L3 de Holanda (CAC12807.1), CL4UY72% Catepsina L4 de Uruguay (ABZ80400.1), CL6UY% Catepsina L6 de Uruguay (ABZ80402.1), SjCL1CN29% Catepsina L1 de *Schistosoma japonicum* de China (AF510740\_1).

### **ANEXO 3. Amortiguadores, soluciones utilizadas en el presente estudio.**

#### **Amortiguador de fosfatos**

#### **Medios de cultivo**

#### **Soluciones para geles de acrilamida**

- Acrilamida/bis-acrilamida 30:08

Acrilamida	300 g
Bis-acrilamida	8 g
Agua Mili Q	1 l

Nota: filtrar por 0.45  $\mu$ m, almacenar a 4°C en botellas oscuras.

- Amortiguador Resolving 4x

Tris base 1.5 M	45.42 g
SDS (0.4%)	1 g
Agua Mili Q	250 ml

Nota: Ajustar a pH= 8.8, almacenar a 4°C en botellas oscuras.

- Amortiguador Stacking 4x

Tris base 0.5 M	6.057 g
SDS (0.4%)	0.4 g
Agua Mili Q	100 ml

Nota: Ajustar a pH= 6.8, almacenar a 4°C en botellas oscuras.

- Persulfato de amonio al 10% (APS)

Pesar 0.1 g de APS y disolver en 1 ml de agua Mili Q; una vez disuelto almacenar a -20°C.

- Amortiguador de corrida SDS 10x

Glicina	1.91 M (144 g)
Tris base	250 mM (30 g)
SDS	1 % (10 g)

Se disuelve primero la glicina y el tris, al final adicionar el SDS porque hace espuma y se afora a un litro de agua Mili Q.

Para diluir a 1x, se toma 100 ml de la solución de 10x y se agrega 900 ml de agua bidestilada, almacenar a 4°C.

- Amortiguador de transferencia 10x
  - Glicina 1.91 M (144 g)
  - Tris base 250 mM (30 g)

Para diluir a 1x, se toma 100 ml de la solución de 10x y se agrega 100ml de metanol absoluto frío y 800 ml de agua bidestilada, almacenar a 4°C.

- Azul de Coomasie para teñir geles de acrilamida

Metanol	20 ml
Ácido acético	40 ml
Coomasie R250	0.1 g
Agua bidestilada	40 ml

- Solución desteñidora

Metanol	40 %
Ácido acético	10 %
Agua bidestilada	50 %

- Solución de lisis 2x

Amortiguador stacking 4x	25 %
SDS 10%	0.2 %
B-mercaptoetanol	5 %
Glicerol	20 %
Azul de bromofenol	0.05 g
Rojo de pironina	0.05 g
Agua mili Q	q.b.p. 50 ml

### **Amortiguadores utilizados para purificar la proteína recombinante**

- Amortiguador de Unión pH 8.

Fosfato de sodio monobásico 50 mM

Cloruro de sodio 50 mM

Urea 8 M

Imidazol 10 mM

- Amortiguador de Lavado pH 8.

Fosfato de sodio monobásico 50 mM

Cloruro de sodio 500 mM

Urea 8 M

Imidazol 10 mM

- Amortiguador de Elución pH 8.

Fosfato de sodio monobásico 50 mM

Cloruro de sodio 50 mM

Urea 8 M

Imidazol 500 mM

### **Solución de carbonatos utilizado en la pulverización de la nitrocelulosa**

Carbonato de sodio 1.92 g

Bicarbonato de sodio 3.8 g

Disolver primero el carbonato de sodio, enseguida disolver el bicarbonato de sodio y calentar ligeramente para disolver por completo. Una vez disueltos los dos carbonatos se deberá aforar a 63.5 ml con agua, la mezcla deberá tener un pH=9.6.