



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA QUIMÉRICA DE LEUCINA  
AMINOPEPTIDASA Y CATEPSINA L1 DE *Fasciola hepatica* Y SU  
EVALUACIÓN INMUNOGENICA EN OVINOS.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. en. C. SAMUEL ORTEGA VARGAS**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. HÉCTOR MANELIC QUIROZ ROMERO**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**Dra. CLARA I. ESPITIA PINZÓN**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

**Dr. ABEL E. VILLA MANCERA**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, BUAP

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2019.**



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.

## DEDICATORIA

*Para ti abuela*

*Por estar siempre conmigo, por tu amor, paciencia, bondad y apoyo incondicional en mis proyectos de superación.*

*Victoria C.M<sup>†</sup> 2017*

*Para el nuevo sol en nuestro camino*

*Gracias Max SOB*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Doctorado (# beca 401,769).

Al Dr. Héctor M. Quiroz Romero del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), UNAM, por su incansable energía en la investigación, por orientarme al pensamiento crítico y por su apoyo incondicional en los diferentes proyectos de investigación.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM, por financiar el presente estudio de investigación con el proyecto: IN214915.

Al Programa de Ayudantes de Investigador Nacional nivel III del Sistema Nacional de Investigadores por el estímulo económico otorgado (# 10944).

Al instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM: La Dra. Clara I. Espitia, por abrir las puertas de su laboratorio para realizar los ensayos de expresión y purificación de la proteína quimérica y formar parte de mi comité tutor; así mismo, por sus sugerencias acertadas durante la fase experimental y revisión del artículo publicado. A la M. en C. Cristina Parada Colín, por su apoyo técnico en la obtención de la proteína quimérica.

Al Dr. Alfredo Sahagún Ruiz, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ- UNAM, por permitir el uso de su laboratorio, por su crítica, sugerencia y revisión del artículo publicado.

A la M. C. Adriana V. Balderas de la FMVZ-UNAM, por el apoyo técnico en los ensayos de secuenciación, además, de su entusiasmo por enseñar técnicas de Biología Molecular.

A la Dra. Irene Cruz Mendoza, del Departamento de Parasitología de la FMVZ-UNAM, por el apoyo en los ensayos de viabilidad de huevos de *F. hepatica*.

Al jurado del examen de candidatura: Dra. Clara I. Espitia (IIB-UNAM), Dr. Marco Antonio Muñoz (Fes-Cuautitlán, UNAM), Dr. Juan J. Mosqueda Güalito (Universidad Autónoma de Querétaro), Dra. Guillermina Ávila Ramírez (Fac. de Medicina, UNAM) y la Dra. Olivia Rodríguez Morales (Instituto Nacional de Cardiología), por los comentarios y sugerencias acertadas.

Al jurado del examen de grado: Dra. Gabriela Bárcenas Morales (Fes-Cuautitlán, UNAM), Dr. Héctor Quiroz Romero (FMVZ, UNAM), Dra. Ma. Eugenia López Arellano (CENID-SAI, INIFAP) y Dra. Clara I. Espitia Pinzón (IIB, UNAM), por las recomendaciones realizadas para mejorar el escrito de la tesis.

## RESUMEN

Leucina Aminopeptidasa (FhLAP) y catepsina L1 (FhCL1) de *Fasciola hepatica* juegan un papel crítico en la nutrición del parásito, migración a través de los tejidos del huésped y en la evasión inmune. Estos antígenos han sido evaluados en ensayos de inmunoprotección en rumiantes como componentes unitarios, obteniendo resultados variables de protección. El enfoque del uso de proteínas quiméricas que expresan epitopos antigénicos e inmunogénicos de proteínas cruciales del parásito puede aumentar el nivel de protección contra la fasciolosis. Previamente, nuestro grupo de investigación diseñó y construyó un gen quimérico compuesto de secuencias antigénicas de FhLAP y FhCL1. El objetivo de este estudio fue expresar la proteína quimérica (rFhLAP-CL1) y evaluar su capacidad inmunoprotectora contra *F. hepatica* en ovinos. La proteína rFhLAP-CL1 se expresó en un sistema procariota y purificó por cromatografía de afinidad a níquel, posteriormente se emulsionó con el adyuvante Quil A. Veinticinco ovinos fueron agrupados al azar en cinco grupos (G, n=5), los ovinos de los grupos 1-3 fueron inmunizados en dos ocasiones con 100µg, 200µg y 400µg de la proteína quimérica, respectivamente; los grupos 4 (Quil A) y 5 (no inmunizados) fueron grupos control. Dos semanas post-segunda inmunización todos los animales fueron desafiados con 200 metacercarias por vía oral. Los ovinos inmunizados con la proteína quimérica tuvieron una reducción significativa en la carga parasitaria del 25% al 46% comparados con el grupo control de infección. Así mismo, las tasas más bajas de implantación del parásito fueron observadas en ovinos inmunizados con la rFhLAP-CL1 (20-28%) que en el grupo control de la infección, junto con una reducción significativa en la producción de huevos del parásito. Además, los títulos más altos de IgG1 e IgG2 anti-rFhLAP-CL1 fueron detectados en ovinos inmunizados con la proteína quimérica, sugiriendo una mezcla de respuesta inmune Th1/Th2 que se asocia con protección contra fasciolosis en ovinos. Este es el primer reporte a nivel mundial del uso de una proteína quimérica como inmunógeno contra *F. hepatica* evaluada en ovinos.

**Palabras clave:** *Fasciola hepatica*, proteína quimérica, inmunización, ovinos.

## ABSTRACT

Leucine aminopeptidase (FhLAP) and cathepsin L1 (FhCL1) of *Fasciola hepatica* play a critical role in parasite feeding, migration through host tissue, and immune evasion. These antigens have been tested for immune protection in ruminants as single components, obtaining variable protection results. The chimeric-protein approach expressing antigenic and immunogenic epitopes of crucial proteins of parasite could improve protection levels against fasciolosis. Previously, our research group designed and constructed a chimeric gene composed of antigenic fragments of FhLAP and FhCL1 of *F. hepatica*. The goal of present study was to express the chimeric protein and evaluate the immune-protective capacity against *F. hepatica* in sheep. The rFhLAP-CL1 protein was produced in *E. coli* Rosetta (DE3) and purified by nickel affinity chromatography, after that, the chimeric protein was emulsified with Quil A adjuvant. Twenty-five sheep were randomly grouped into five groups (G, n= 5); the groups 1-3 were immunized twice with 100µg, 200µg y 400µg of rFhLAP-CL1, respectively; whereas the groups 4 (Quil A) and 5 (nonimmunized) were control groups. The animals were then challenged with 200 metacercariae two weeks after the rFhLAP-CL1 booster. There was a significant reduction in fluke burden from 25% to 46% for immunized sheep compared to the infection control group (G5). Likewise, lower rates of parasite implantation were obtained in immunized sheep (20-28%) than the infection control group (38%), along with significant reduction in egg output (from 22-24%). Moreover, the highest IgG1 and IgG2 anti-rFhLAP-CL1 levels were seen in animals immunized with chimeric protein, suggesting a mixed Th1/Th2 response associated with protection against fasciolosis in sheep. This is the first worldwide report of the use of a chimeric protein for immunization against *F. hepatica* in sheep.

**Keywords:** *Fasciola hepatica*, chimeric protein, immunization, sheep.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i> .....	1
1.2 Patología de la fasciolosis en ovinos.....	3
1.3 Diagnóstico de <i>F. hepatica</i> en animales domésticos .....	3
1.4 Distribución geográfica de <i>F. hepatica</i> .....	5
1.5 Importancia económica de <i>F. hepatica</i> en la ganadería .....	7
1.6 Control de <i>F. hepatica</i> por uso de antihelmínticos .....	8
1.7 Respuesta inmune del huésped e inmunoevasión por <i>F. hepatica</i> .....	9
1.8 Antígenos de <i>F. hepatica</i> evaluados como posibles inmunógenos.....	12
1.8.1 Proteínas de unión a ácidos grasos .....	13
1.8.2 Glutación S- transferasa .....	14
1.8.3 Paramiosina.....	14
1.9 Principales blancos a vacuna contra <i>F. hepatica</i> : Catepsina L y Leucina Aminopeptidasa .....	15
1.9.1 Leucina Aminopeptidasa.....	15
1.9.2 Cisteína- proteasas: Catepsina L .....	17
1.10 Combinación de antígenos vacunales contra <i>F. hepatica</i> .....	23
1.11 Uso de proteínas quiméricas contra parásitos .....	25
1.12 Proteínas quiméricas en <i>F. hepatica</i> .....	28
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	30
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	31
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	31
<b>4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	31
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	32
<b>5.1 Caracterización del gen quimérico y del plásmido recombinante</b> .....	32
5.1.1 Secuenciación del plásmido recombinante a nivel de nucleótidos .....	32
5.1.2 Preparación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y <i>E. coli</i> Rosetta competentes por calcio	32
5.1.3 Transformación de células DH5 $\alpha$ con el plásmido quimérico .....	33
5.1.4 Purificación del plásmido quimérico de diferentes colonias.....	33
5.1.5 Construcción <i>in silico</i> de la secuencia quimérica LAP-CL1 .....	34
<b>5.2 Expresión y purificación de la proteína quimérica</b> .....	35
5.2.1 Transformación de <i>E. coli</i> Rosetta con el plásmido quimérico .....	35
5.2.2 Expresión de la proteína quimérica por <i>E. coli</i> Rosetta .....	35
5.2.3 Purificación de la proteína quimérica.....	36
5.2.4 Renaturalización de la proteína quimérica purificada .....	37
5.2.5 Identificación de la proteína quimérica dializada por SDS-PAGE .....	38
5.2.6 Reconocimiento de la proteína quimérica por <i>Western blot</i> .....	38

<b>5.3 Evaluación de la capacidad inmunoprotectora de la proteína quimérica contra <i>F. hepatica</i> en ovinos</b> .....	39
5.3.1 Animales de experimentación.....	39
5.3.2 Formulación de la vacuna con adyuvante Quil A.....	40
5.3.3 Obtención de la fase infectante de <i>F. hepatica</i> .....	40
5.3.4 Vacunación e infección experimental.....	40
5.3.5 Reducción de la carga parasitaria en ovinos vacunados con la proteína quimérica.....	41
5.3.6 Conteo de huevos de <i>F. hepatica</i> en muestras fecales.....	41
5.3.7 Evaluación de la viabilidad de huevos de <i>F. hepatica</i> .....	41
5.3.8 Obtención de antígenos de excreción-secreción de <i>F. hepatica</i> (FhES).....	42
5.3.9 Respuesta inmune humoral inducida por la vacunación en ovinos.....	43
<b>5.4 Análisis estadístico</b> .....	44
<b>6. RESULTADOS</b> .....	45
6.1 Secuenciación de nucleótidos del plásmido quimérico.....	45
6.2 Transformación de <i>E. coli</i> Rosetta con el plásmido quimérico.....	47
6.3 Expresión de la proteína quimérica e identificación por western blot.....	48
6.4 Purificación de la proteína quimérica por cromatografía de afinidad a níquel.....	50
6.5 Renaturalización de la proteína quimérica e identificación por Western blot.....	51
6.6 Reducción de la carga parasitaria en ovinos vacunados con la proteína quimérica ...	53
6.7 Reducción de huevos de <i>F. hepatica</i> en ovinos de experimentación.....	56
6.8 Reducción de la viabilidad de huevos de <i>F. hepatica</i> de ovinos en experimentación .	57
6.9 Títulos de IgG1 e IgG2 anti-FhLAP-CL1 en sueros de ovinos de experimentación ....	60
6.10 Títulos de IgG, IgG1 e IgG2 anti-FhES en sueros de ovinos de experimentación ....	63
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	67
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	79
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	80
<b>10. LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	81
<b>11. REFERENCIAS</b> .....	83
<b>ANEXO I. Material suplementario</b> .....	95
<b>ANEXO II. Publicación de artículo</b> .....	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i> .....	2
Figura 2. Principales mecanismos de evasión inmune de <i>F. hepatica</i> contra ADCC montadas por el huésped.....	12
Figura 3. Detección de FhLAP en el intestino de <i>F. hepatica</i> adulta por microscopía inmunoeléctrica.....	16
Figura 4. Regulación de peptidasas de catepsinas de <i>F. hepatica</i> durante su desarrollo.....	19
Figura 5. Alineamiento a nivel de aminoácidos de la secuencia quimérica predicha con la experimental obtenida. ....	47
Figura 6. Transformación de <i>E. coli rosetta</i> con el vector recombinante .....	48
Figura 7. Expresión e identificación de la proteína quimérica en cultivo <i>E. coli</i> Rosetta. .	49
Figura 8. Expresión temporal de la proteína quimérica de la fracción insoluble en <i>E. coli Rossetta</i> analizada por SDS-PAGE.....	50
Figura 9. Identificación de la proteína quimérica en la fracción soluble e insoluble por SDS-PAGE y <i>Western blot</i> .....	50
Figura 10. Purificación de la proteína quimérica a través de cromatografía de afinidad a Ni-NTA .....	52
Figura 11. Identificación de la proteína quimérica por <i>Western blot</i> usando anticuerpo: monoclonal y policlonal. ....	53
Figura 12. Análisis de correlación de <i>Spearman</i> entre carga parasitaria y peso vivo de ovinos de experimentación.....	55
Figura 13. Dinámica del conteo de huevos de <i>F. hepatica</i> en heces de ovinos vacunados y controles desafiados con metacercarias.....	57
Figura 14. Viabilidad de huevos de <i>F. hepatica</i> en heces de ovinos inmunizados y controles. ....	58
Figura 15. Viabilidad de huevos de <i>F. hepatica</i> colectado de vesícula biliar de ovinos vacunados y controles al final del experimento. ....	59
Figura 16. Correlación de la viabilidad de huevos de <i>F. hepatica</i> de muestras fecales y de vesícula biliar con la carga parasitaria. ....	60
Figura 17. Títulos de anticuerpos IgG1 e IgG2 anti-rFhLAP-CL1 de sueros de ovinos vacunados y controles.....	62
Figura 18. Correlación entre títulos de IgG1 e IgG2 anti-rFhLAP-CL1 con la carga parasitaria. ....	63
Figura 19. Títulos de IgG anti-FhES en suero de ovinos vacunados y controles. ....	64
Figura 20. Títulos de IgG1 e IgG2 anti-FhES en suero de ovinos vacunados y controles.....	65
Figura 21. Correlación de <i>Spearman</i> de títulos de IgG1 e IgG2 anti-FhES y carga parasitaria. ....	66

## LISTA DE CUADROS

Tabla 1. Porcentajes de protección contra <i>F. hepatica</i> en rumiantes empleando antígenos unitarios como inmunógenos .....	22
Tabla 2. Niveles de protección contra <i>F. hepatica</i> en rumiantes empleando una combinación de antígenos como inmunógenos.....	24
Tabla 3. Carga parasitaria de ovinos vacunados con la proteína quimérica y grupos controles, infectados con metacercarias de <i>F. hepatica</i> . ....	55
Tabla 4. Cuantificación del plásmido quimérico pET-15b-LAPCL1 .....	95

## 1. INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una infección parasitaria causada por el trematodo digénico *Fasciola hepatica* (Linnaeus 1758), es económicamente importante en animales domésticos (bovinos, ovinos y caprinos), además, afecta al humano, por lo que es considerada como una zoonosis[1].

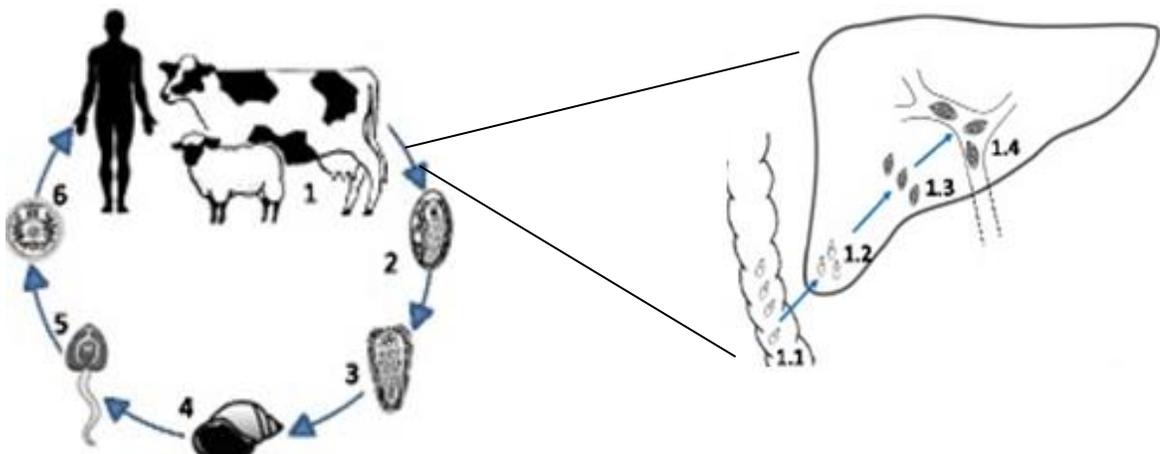
La Organización Mundial de la Salud ha reconocido a la fasciolosis como una enfermedad parasitaria desatendida, con un estimado de 17 millones de personas infectadas y más de 180 millones de personas con riesgo de adquirir la infección[2]. Las pérdidas económicas ocasionadas por *F. hepatica* en los animales domésticos a nivel global se estiman en más de tres billones de dólares anuales, debido a disminución de los parámetros productivos (carne, leche, lana), reproductivos (fertilidad) y costos en los tratamientos antihelmínticos[2,3]. A pesar de los esfuerzos por desarrollar una vacuna contra *F. hepatica*, actualmente no existe una vacuna comercial contra este parásito, su control se basa principalmente en el uso de fasciolicidas, el triclabendazol es el más utilizado. Sin embargo, poblaciones de *F. hepatica* resistentes a éste y a otros fasciolicidas han sido reportadas en varias partes del mundo en ruminantes y el hombre, por lo que nuevos enfoques de control son necesarios[4]. El desarrollo de una vacuna contra *F. hepatica*, es una estrategia de control viable[5].

### 1.1 Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*

El ciclo de vida de *F. hepatica* involucra a dos huéspedes: un intermediario y un definitivo. El huésped intermediario incluye a caracoles del género *Lymnaea* spp., donde el parásito experimenta una expansión clonal. En el huésped definitivo (mamíferos), el parásito se convierte en adulto sexualmente maduro (**Figura 1**).

El huésped definitivo adquiere la infección tras el consumo de agua o vegetación contaminada con la fase infectante o metacercaria. Luego de la ingestión de las metacercarias, se libera un parásito juvenil recién desenquistado

(NEJs, del inglés *newly excysted juvenile*) en el intestino delgado, éstos penetran rápidamente la mucosa intestinal, atraviesan la cavidad peritoneal y alcanzan el parénquima hepático, donde los parásitos juveniles permanecen alimentándose de tejido hepático y sangre entre 8 a 12 semanas (ovinos y bovinos). Finalmente, los parásitos se alojan en los conductos biliares, para completar su desarrollo y maduración, iniciando con la producción de una gran cantidad de huevos (~20,000 huevos/día/parásito) que posteriormente, son arrastrados hacia la vesícula biliar, llegan al intestino delgado y son excretados junto con las heces [1,6]. Los huevos de *F. hepatica* continúan su desarrollo en la pastura cuando las condiciones de humedad (>50%), temperatura (10-30°C), pH (7-7.5) y tensión de oxígeno son favorables para desarrollar una larva ciliada (miracidio). El miracidio eclosiona del huevo y busca activamente a caracoles del género *Lymnaea* spp., por quimiotropismo y fototropismo positivo para continuar con su desarrollo. En el interior del caracol, *F. hepatica* se transforma en esporocisto, redia y finalmente en cercarias. Las cercarias son liberadas al exterior del caracol para enquistarse en la vegetación y/o el agua, transformándose en metacercaria [6,7].



**Figura 1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica***

1) Huéspedes definitivos de *F. hepatica* incluyen bovinos, ovinos y humanos: 1.1 El parásito se desenquista en el intestino delgado del huésped definitivo, 1.2 NEJs migran a través del parénquima hepático, se alimentan de tejido hepático y sangre, 1.3 Juveniles entran a los conductos biliares, 1.4 Los parásitos juveniles se desarrollan en adultos. 2) Huevos son liberados junto con las heces, su embrionación ocurre en el agua. 3) Eclosiona un miracidio que infecta al caracol. 4) El parásito dentro del caracol, se desarrolla en esporocisto, redia y cercaria. 5) Las cercarias son liberadas del caracol. 6) Metacercaria enquistada en pasto y/o agua (Tomado de Cwiklinski *et al.*, 2015, *Genome biology* 16(1):71 [8].

## **1.2 Patología de la fasciolosis en ovinos**

En los animales infectados por *F. hepatica*, los daños patológicos y signos clínicos dependen del grado de infección, estado nutricional, edad y si es primo-infección o reinfección[6].

Los ovinos son la especie doméstica más susceptible a la infección por *F. hepatica*, presentan una fase aguda y crónica de la enfermedad. La fase aguda se debe a la invasión y migración de trematodos juveniles que se dirigen hacia el parénquima hepático. Las espinas del tegumento y ventosas del parásito provocan lesiones traumáticas junto con hemorragia profusa en el intestino delgado, cavidad abdominal y parénquima hepático. El parénquima hepático presenta cicatrices fibrosas, tractos blanquecinos y parches en el lóbulo hepático izquierdo[6,9]. Los ganglios linfáticos hepáticos y mesentéricos están aumentados de tamaño y tumefactos. Los animales presentan ictericia, palidez de las mucosas, debilidad, pérdida de la condición corporal, distensión abdominal dolorosa al tacto y eosinofilia. La fase crónica o fase biliar de la enfermedad, se asocia con la presencia de los trematodos en los conductos biliares[6]. Los conductos biliares están engrosados, distendidos, fibróticos y calcificados, repletos de parásitos hepáticos, además hay infiltración inflamatoria de eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas[10,11]. Los animales presentan pérdida gradual de la condición corporal, debilidad progresiva, anemia, hipoproteinemia, edema subcutáneo en el espacio inter-mandibular (mandíbula de botella). Los ovinos infectados con 200 y 1000 metacercarias, las tasas de recuperación de parásitos adultos varían entre 50% y 30%, respectivamente[6].

## **1.3 Diagnóstico de *F. hepatica* en animales domésticos**

El diagnóstico de fasciolosis depende de la historia clínica, signos clínicos de la enfermedad, prevalencia de *F. hepatica* y resultados de laboratorio en animales vivos. Diferentes métodos coproparasitológicos (CPS), inmunológicos y moleculares se ha empleado para el diagnóstico de *F. hepatica*, su elección depende de la disponibilidad de las mismas y tipo de estudio a realizar.

Los métodos CPS son los más utilizados de forma rutinaria en laboratorios de diagnóstico convencionales, debido a que no requieren el uso de equipos sofisticados, son fáciles de realizar y son de bajo costo. Estos métodos se basan en la detección de huevos del parásito durante la fase crónica de la enfermedad (10 semanas post-infección, p.i). dichos métodos son adecuados para detectar infecciones con moderada y alta intensidad, pero tienen baja sensibilidad en infecciones leves[12]. Además, su sensibilidad se ve reducida por la eliminación intermitente de huevos en las heces y el número de muestras analizadas, dando resultados falsos negativos. La **técnica de sedimentación** ha sido la más empleada para el diagnóstico de fasciolosis en animales y el hombre, se basa en la densidad de los huevos del trematodo, al ser más densos descienden por gravedad en una solución acuosa; además, la adición de un colorante de contraste al sedimento, permite distinguir el color amarillo dorado de los huevos de *F. hepatica*[13,14]. En ovinos, la detección de huevos de *F. hepatica* a través de la técnica de sedimentación ha sido reportado a partir de la semana 10 post-infección[6]. La fasciolosis puede ser confirmada en la necropsia al identificar el parásito adulto en el hígado de los animales[15].

Por otra parte, las técnicas inmunológicas como son las pruebas serológicas presentan alta sensibilidad, reproducibilidad y a menudo son rentables. El desarrollo de técnicas de ELISA basados en antígenos de excreción-secreción de *F. hepatica* (FhES) han sido ampliamente usadas para la detección de anticuerpos del isotipo IgG en los animales infectados desde la segunda semana post-infección[16]. Sin embargo, debido a que los FhES son una mezcla compleja de proteínas, podría haber reacciones cruzadas entre antígenos comunes de *F. hepatica* con otros parásitos, reduciendo su sensibilidad y especificidad[17,18]. Por lo anterior, el empleo de antígenos recombinantes de *F. hepatica* como Catepsina L1 (FhCL1)[19,20], Saponsin 2 (Fh-SAP2)[21], Leucina Aminopeptidasa y ferritina[22] han aumentado la sensibilidad (>99%) y especificidad (100%); no obstante, la detección de anticuerpos contra antígenos

del parásito a través del suero de animales infectados puede permanecer por varios meses, por lo que hace difícil diferenciar entre animales con infección activa o crónica, así como diferencias animales sanos previamente tratados con un fasciolicida. El desarrollo de ELISA-sándwich utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos hacia FhES, FhCL1, FhSAP2 han sido empleados para la detección de antígenos circulantes en suero o heces de animales infectados mostrando alta especificidad (100%); además, esta técnica permite evaluar la efectividad de tratamientos antihelmínticos[14,23,24].

Los métodos de diagnóstico moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han sido empleados para la detección de *F. hepatica* al amplificar los genes: espaciador transcrito interno (ITS, 292pb) y el gen del citocromo C oxidasa 1 (423pb, COX1), como resultado, se ha logrado detectar animales positivos a *F. hepatica* desde la segunda semana de infección[12]; sin embargo, uno de los inconvenientes de estas pruebas, es la disponibilidad de laboratorios con equipo adecuado y personal especializado, además del aumento en los costos de las pruebas. La amplificación isotérmica mediada por *Loop* de ácidos nucleicos ha surgido como una alternativa a la PCR, mostrando alta especificidad (97.1%), pero baja sensibilidad (17.9%)[25].

#### **1.4 Distribución geográfica de *F. hepatica***

*F. hepatica* está ampliamente distribuida en todos los continentes, en especial en zonas con clima templado. La prevalencia de *F. hepatica* en rumiantes y el hombre está relacionado con la distribución geográfica de caracoles del género *Lymnaea* que fungen como huéspedes intermediarios, así como las condiciones de temperatura, humedad, vegetación y tipo de suelo. La información disponible de la prevalencia actual de *F. hepatica* a nivel mundial está subestimada debido a la falta de encuestas epidemiológicas, sensibilidad y especificidad del método de diagnóstico usado y por ser asintomática en infecciones leves a moderadas[2,12].

En rumiantes y humanos, *F. hepatica* ha sido reportada en más de 50 países, incluyendo a los cinco continentes[26,27]. El rango de prevalencia de fasciolosis en el continente Americano en ganado ovino va de 8.87% a 100%, en caprinos de 24.5% a 100% y en bovinos de 3% a 66.7%. Los porcentajes de prevalencia de fasciolosis en ovinos y caprinos de América fueron más altos que en Europa, Oceanía, Asia y África [27].

En una recopilación bibliográfica que abarcó de 1879 a 2006 en la República Mexicana sobre *F. hepatica*, el parásito ha sido reportado en todos los estados de la República, excepto en Yucatán y Quintana Roo, debido a sus características climatológicas y tipo de suelo que no permiten el desarrollo de los huéspedes intermediarios[28,29]. Estudios sobre prevalencia de *F. hepatica* se han reportado posterior al 2006; en la región noreste de México (municipios de Guaymas y Cajeme, Sonora) se evaluó la prevalencia de *F. hepatica* en ganado bovino, caprino y ovino por conteo de huevos fecales y detección de IgG anti-*F. hepatica*; la prevalencia de fasciolosis en bovinos, ovinos y caprinos fue de 8-27% por conteo de huevos fecales y de 23-45% por detección de IgG anti-*F. hepatica*[13]. Posteriormente, en 2015 se determinó la prevalencia de *F. hepatica* en ganado lechero de los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz a través de la detección de IgG1 anti-*F. hepatica* a partir de muestras de leche a granel (717 muestras), la prevalencia global fue de 62.76%[30]. Dos años más tarde (2017), en los mismo estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz se analizó la prevalencia de fasciolosis en ganado lechero confirmando prevalencias elevadas (63.56%)[31]. En otro estudio realizado en caprinos de la región Mixteca de México, se determinó la prevalencia de fasciolosis por la detección de IgG anti-FhES (ELISA) y detección de antígenos del parásito (ELISA sándwich); la prevalencia de *F. hepatica* fue del 73% y 77%, respectivamente[32].

La fasciolosis humana en México ha sido poco reportada, debido a que la enfermedad no es de declaración obligatoria, por las técnicas CPS empleadas de forma inadecuada o por el desconocimiento de la enfermedad. En un estudio

realizado por Zumaquero y Col. (2013), muestras fecales de niños de 10 localidades del municipio de Atlixco, Puebla fueron analizados para la detección de huevos y antígenos de *F. hepatica* utilizando las técnicas de sedimentación, Kato-Katz y ELISA sándwich, los resultados de prevalencia en las diferentes localidades variaron de 2.94% a 13.3% y fue clasificada como un área mesoendémica con focos hiperendémicos de la enfermedad[33].

### **1.5 Importancia económica de *F. hepatica* en la ganadería**

Desde el punto de vista económico, *F. hepatica* causa enormes pérdidas financieras a la ganadería mundial, que varían de acuerdo a los diferentes entornos epidemiológicos. Las pérdidas económicas pueden ser de forma directa (muerte de animales) o indirecta. Las pérdidas indirectas se deben a disminución en la producción de carne, leche, lana, disminución en la ganancia de peso, fertilidad, gastos en los tratamientos con fasciolidas y decomiso de hígados en el rastro. A nivel mundial se ha estimado pérdidas anuales en la productividad por fasciolosis por más de tres billones de dólares[2,3]. En bovinos infectados por *F. hepatica* bajo sistemas ganaderos modernos, se ha reportado una reducción en la ganancia de peso (9%), disminución de la producción láctea (10%), prolongación del periodo de servicio (13 días), aumento en el número de servicios por concepción (0.75) y reducción del peso de la canal (0.5-0.7%)[34].

En México, se estima que la prevalencia de fasciolosis bovina y ovina oscila entre el 19 y 25%, respectivamente; en la fase crónica de la enfermedad, se ha reportado 8-9% de reducción en la ganancia diaria de peso por infecciones leves y hasta un 20-28% en casos graves; en ganado lechero la producción láctea puede disminuir hasta un 14%, con un rango de 0.5 a 1.0kg por día en los 305 días de lactación, además de 0.328% de disminución de sólidos totales; aproximadamente el 10% de bovinos sacrificados en rastros presentan hígados infectados por *F. hepatica*[35]. En ganado ovino, se han reportado pérdidas de peso desde 30gr hasta 500gr por semana cuando están infectados con 45 y 500 trematodos,

respectivamente. En un estudio realizado en 2019, Villa-Mancera y Col. estimaron las pérdidas de la producción láctea en ganado lechero a nivel de granja mayor a 5 mil dólares; además, los gastos en tratamientos contra *F. hepatica* en ganado joven y adulto por granja fue de 67.68 y 209.47 dólares, respectivamente[31].

### **1.6 Control de *F. hepatica* por uso de antihelmínticos**

Existen diferentes estrategias de control para *F. hepatica* que incluyen: métodos físicos (drenaje de suelos, pastoreo restringido), químicos (fasciolicidas, molusquicidas) y biológicos (uso de patos, pájaros, etc).

En la práctica, los compuestos antihelmínticos son los más utilizadas contra *F. hepatica*, como el albendazol, clorsulon, closantel, nitroxinil, oxiclozanida y tricabendazol (TCBZ)[36]. El TCBZ es eficaz contra las fases juveniles y adultas del parásito por lo cual ha sido el fasciolicida de elección para el tratamiento de la fasciolosis en bovinos y ovinos [37,38]. Sin embargo, debido al uso continuo e indiscriminado del TCBZ, poblaciones de *F. hepatica* resistentes (TCBZ-R) han sido reportadas en rumiantes de varias partes del mundo[4]. El primer caso de resistencia al TCBZ fue reportado en ovinos de Australia que al recibir el tratamiento, el conteo de huevos fecales solo se redujo en un 21%[39]. Reportes posteriores de resistencia al TCBZ-R han sido señalados en ganado ovino y bovino de Escocia, Países bajos, España, Nueva Zelanda, Argentina, Perú, Chile, entre otros [4,39–41]. Además, recientemente poblaciones de *F. hepatica* resistentes al albendazol, clorsulon, closantel y nitroxinil han sido reportados[4,42]. Para el caso de la fasciolosis humana, el fluquicida de elección es el TCBZ, sin embargo, reportes de resistencia al compuesto han sido señalados en los Países bajos, Chile, Turquía y Perú[4,26], confirmando la urgente necesidad por métodos de control alternativos. La inducción de una respuesta inmune protectora a través de la vacunación de los animales contra *F. hepatica*, es una alternativa viable ya que son seguras, no dejan residuos químicos en los alimentos y son amigables

con el medio ambiente; además, las vacunas son bien aceptados tanto por productores y consumidores de alimentos de origen animal[3,5].

### **1.7 Respuesta inmune del huésped e inmunoevasión por *F. hepatica***

El estudio de la respuesta inmune contra la infección por *F. hepatica* en animales de laboratorio ha sido analizada ampliamente; en ratas infectadas naturalmente por *F. hepatica*, el parásito es cubierto rápidamente por IgG1 e IgG2, tras ser rodeados por eosinófilos durante su migración intestinal, los parásitos son eliminados por el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de forma eficiente[43]; sin embargo, este mecanismo de inmunidad contra el parásito no se extrapola de manera eficiente en los rumiantes.

Los ovinos son muy susceptibles a la infección por *F. hepatica*, llegando a sufrir muerte súbita por destrucción de tejido hepático por cargas parasitarias elevadas (especialmente corderos). Por el contrario, los bovinos muestran cierto nivel de resistencia a la infección, relacionado por su capacidad de restringir y reparar el daño hepático, al desarrollar fibrosis y calcificación de los conductos biliares. El sistema inmune innato juega un papel importante en la defensa contra la infección, que incluyen una rápida activación de eosinófilos y macrófagos (MΦ). En bovinos infectados, a las 4 semanas post-infección (SPI) el conteo de eosinófilos es elevado y persiste hasta las 16 SPI. En ovinos, ocurre una respuesta bifásica de eosinófilos, el primer pico se detecta a las 4 SPI y el siguiente pico entre la 9-10 SPI. El parásito juvenil de *F. hepatica* es susceptible a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), a través de IgG2a mediado por óxido nítrico (ON) liberado por los macrófagos peritoneales de ratas[43]. En ovejas indonesas de cola delgada (ITT), se ha demostrado que son resistentes a la infección contra *F. gigantica* a través de la ADCC, donde los macrófagos y eosinófilos liberan radicales superóxido. Contrario a lo ocurrido en ovejas ITT protegidos contra *F. gigantica*, en ovinos y caprinos vacunados que mostraron cierto grado de protección contra *F. hepatica* tuvieron un conteo

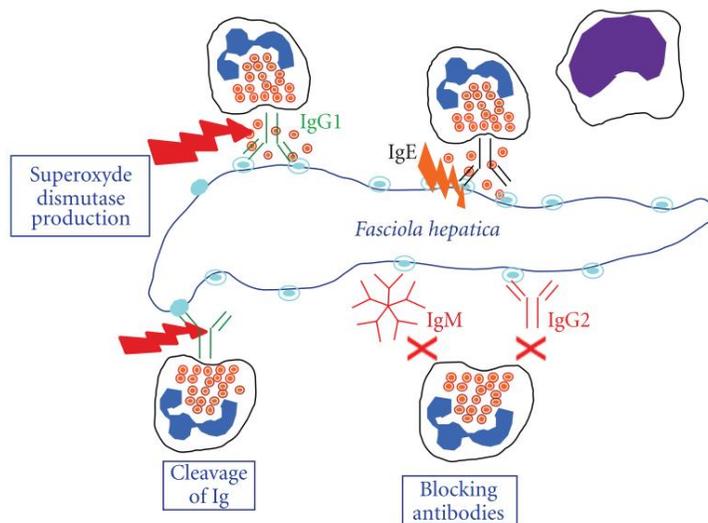
reducido de eosinófilos. En bovinos, los macrófagos también median la ADCC contra *F. hepatica*, una reducción en la activación de macrófagos activados de forma alternativa (AAMΦ) se ha vinculado con protección en terneros vacunados de forma experimental, mediada por MΦ que liberan ON, además de un entorno de citocinas Th1, altamente dependiente de IgG2[2,44–46].

Una respuesta inmune tipo Th1 con una proporción elevada de IgG2 sobre IgG1 ha sido relacionada con resistencia a *F. hepatica* en bovinos inmunizados con nFhCL1[47]. Del mismo modo, en ovinos inmunizados con rFhLAP hubo una asociación entre niveles de IgG2 con reducción en la carga parasitaria. Por el contrario, una respuesta tipo Th2 con niveles de expresión de IL-4 > IFN-γ en linfonodos y niveles de IgG1>IgG2, se correlacionaron con patología en el huésped definitivo. Durante la fase aguda de la infección, los bovinos muestran una respuesta inmune mixta con niveles elevados de IL-4, IFN-γ, IL-10 y TGF-β. Sin embargo, conforme la infección progresa, la respuesta inmune Th2/Treg llega a ser dominante. Durante los estados crónicos de la enfermedad, las células Tregs liberan citosinas que median la respuesta Th1/Th2. En ovinos infectados con *F. hepatica* (a las 3 SPI) ocurren eventos similares, presentan un perfil mixto de citosinas Th1/Th2 en el bazo, conforme la infección progresa hay un aumento en la expresión de citosinas anti-inflamatorias por células Th2[45,46]. La respuesta inmune humoral en animales vacunados a base de catepsina L, generan altos títulos de IgG1 e IgG2, lo que sugiere que la protección se asocia con la inducción de una respuesta Th1 o una respuesta mixta Th1/Th2[45,46].

El éxito de la infección por *F. hepatica* sobre su huésped se debe a una serie de antígenos del tegumento, antígenos de excreción secreción y vesículas extracelulares que le permiten modular la respuesta inmune del huésped hacia un fenotipo no protector tipo Th2. El desprendimiento de la superficie de su tegumento junto con la renovación de proteínas sintetizadas por las células subtegumentales del parásito, propician una inmunidad que no es efectiva; además, *F. hepatica* posee enzimas antioxidantes (Glutati6n-S transferasa, GST,

superóxido dismutasa, SOD) que lo protegen de las especies reactivas al oxígeno, óxido nítrico y reactivos intermediarios del nitrógeno (RNI) liberadas por los macrófagos y eosinófilos; así mismo, el parásito expresa la peroxirredoxina, una proteína que induce una potente respuesta inmune Th2 al activar los macrófagos de forma alternativa[46]. A través de las proteasas secretadas, *F. hepatica* es capaz de escindir inmunoglobulinas en la región de la bisagra y así prevenir la unión mediada por anticuerpos de eosinófilos a la superficie del parásito (**Figura 2**)[48,49].

De los efectos inmunomoduladores que realiza *F. hepatica* incluyen: la inhibición de la generación de radicales libres en los neutrófilos de bovinos y la activación alternativa de los macrófagos, piedra angular de la respuesta inmune contra helmintos, facilitando la diferenciación de células Th2; además, los productos de E/S de *F. hepatica* pueden inducir la apoptosis de eosinófilos [46]. Al modular la respuesta inmune del huésped hacia un fenotipo anti-inflamatorio gracias al repertorio de moléculas que el parásito posee (catepsina L, B, peroxirredoxina, catelicidina), éstas se han utilizado como blancos vacunales en ensayos de inmunoprotección en rumiantes[5].



**Figura 2. Principales mecanismos de evasión inmune de *F. hepatica* contra ADCC montadas por el huésped.**

Los mecanismos de evasión inmune por *F. hepatica* en el huésped definitivo involucran: la producción de superóxido dismutasa y glutatión S-transferasa que neutralizan los radicales superóxido, la escisión de inmunoglobulinas involucradas en la ADCC y la producción de anticuerpos bloqueantes que pueden inhibir la adhesión de eosinófilos a los trematodos. Tomado de Chauvin y Col. (2010), *Journal of Biomedicine & Biotechnology* (2010): PMC2817558[49].

### 1.8 Antígenos de *F. hepatica* evaluados como posibles inmunógenos

Se han empleado diferentes enfoques para identificar antígenos candidatos vacunales para *F. hepatica*, incluyendo el análisis de antígenos que reaccionan de forma cruzada con sueros de otros trematodos, antígenos que son codificados por genes ortólogos de candidatos vacunales existentes en otros parásitos y la selección racional de antígenos que son considerados como críticos para la biología del parásito [5,45].

Un considerable número de ensayos de vacunación se han realizado utilizando antígenos purificados directamente del parásito (nativo) o expresados en sistemas heterólogos (recombinantes) como posibles antígenos candidatos contra *F. hepatica* evaluados en animales de laboratorio y rumiantes de importancia económica (bovinos, ovinos, caprinos), con resultados de protección elevados en el primer caso, pero variables en rumiantes (**Tabla 1**). Entre los antígenos

propuestos como candidatos vacunales contra *F. hepatica* se encuentran: proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), glutatión S-transferasa (GST), paramiosina, peroxirredoxina (Prx), hemoglobina (Hb), catepsina B (FhCB), catepsina L (FhCL) y leucina aminopeptidasa (FhLAP).

### **1.8.1 Proteínas de unión a ácidos grasos**

Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) son una familia de proteínas de ~14-15kDa, se han localizado en el tegumento del parásito adulto y han sido detectados en los exosomas liberadas por *F. hepatica*[50]. Estas proteínas se encuentran en mayor abundancia en los parásitos adultos que en los juveniles. Debido a que *F. hepatica* es incapaz de sintetizar sus propios ácidos grasos, los obtiene directamente de la sangre de su huésped a través de los FABP[51]. Además, los parásitos emplean a los FABP como un mecanismo de resistencia antihelmíntica, al regular su exposición al TCBZ por el secuestro y expulsión del fármaco[52]. Los FABP modulan el sistema inmune del huésped, al inducir la activación alternativa de macrófagos hay un aumento de la expresión y actividad de la arginasa, con reducción de la producción de óxido nítrico y regulación a la baja de la secreción de citocinas pro-inflamatorias; además, los FABP estimulan la sobreexpresión de IL-10 en macrófagos[52,53].

Estudios previos han demostrado que los FABP son entre los candidatos vacunales promisorios contra *F. hepatica* ya que inducen niveles significativos de protección (reducción de la carga parasitaria), efectos anti-fecundidad (reducción en la producción de huevos) y efectos anti-patología en el hígado del huésped[54]. En bovinos inmunizados con FABP nativo se obtuvo un 55% de protección comparado con el grupo control de la infección[55]. En ovinos inmunizados con el mismo antígeno, los niveles de protección inducido fueron del 24-42%, aunque este nivel de protección no fue reproducible en otro ensayo de vacunación. Tras obtener la forma recombinante de FABP (Fh15) y ser usado como inmunógenos en ovinos, una reducción del 43% fue obtenido, sin embargo, este nivel de

protección no fue consistente en otro ensayo de vacunación empleando la misma especie. Al utilizar un ortólogo de FABP de *Schistosoma mansoni* (rSm14) como antígeno vacunal en ovinos contra la infección por *F. hepatica*, los niveles de protección superaron el 98%, sin embargo, este ensayo involucró a 4 ovinos, por lo que requiere un mayor número de animales y repeticiones para validar este resultado[45,56].

### **1.8.2 Glutación S- transferasa**

Los Glutación S-transferasa (GST) de *F. hepatica* tienen un peso de ~23-26.5kDa, son isoenzimas implicadas en las interacciones huésped-parásito y se encuentran distribuidos en todo el tejido del parásito. Estas isoenzimas constituyen aproximadamente el 4% de la proteína soluble total de *F. hepatica* y han sido propuestos como dianas de fármacos, ya que se ha relacionado con la resistencia al TCBZ[57]. Además, los GSTs realizan actividades de desintoxicación general de toxinas xenobióticas, modulación del sistema inmune del huésped y están implicadas en el desarrollo de huevos del parásito[58,59].

La GST nativa de *F. hepatica* ha sido ampliamente evaluado en bovinos, ovinos y caprinos como antígeno vacunal. En ovinos vacunados con GST nativo se logró un 57% de protección tras la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica*[60]. Sin embargo, en ocho ensayos vacunación independientes con GST nativo en ovinos, se obtuvo en promedio 29% de protección (rango 0-69%); así mismo, en bovinos inmunizados con GST, los niveles de protección fueron variables de 0-69%. Contrario a los resultados de protección en ovinos y bovinos, en caprinos tras ser inmunizados con GST nativo o recombinante fallo en inducir protección contra la infección[45,51].

### **1.8.3 Paramiosina**

La paramiosina (FhPrm) es una proteína de membrana fibrilar distribuida ampliamente en invertebrados, pero ausente en vertebrados. La FhPrm tiene un

peso molecular de ~97kDa y se ha localizado en la superficie del tegumento, músculo subtegumental, testículos y en fibras musculares rodeando el intestino del parásito adulto. La FhPrm constituye un componente estructural del aparato contráctil del parásito, además de modular el sistema inmune del huésped; esta proteína se expresa en la superficie del parásito y puede estar implicada en estrategias de inmunoevasión debido a sus actividades de unión a inmunoglobulinas, colágeno y proteínas del complemento[61,62]. Al utilizar a FhPrm nativo como inmunógeno contra el trematodo hepático en bovinos, un 47% de protección fue obtenido. Sin embargo, en ovinos inmunizados con el mismo antígeno no logró reducir de forma significativa los trematodos comparados con el grupo control de la infección[45].

## **1.9 Principales blancos a vacuna contra *F. hepatica*: Catepsina L y Leucina Aminopeptidasa**

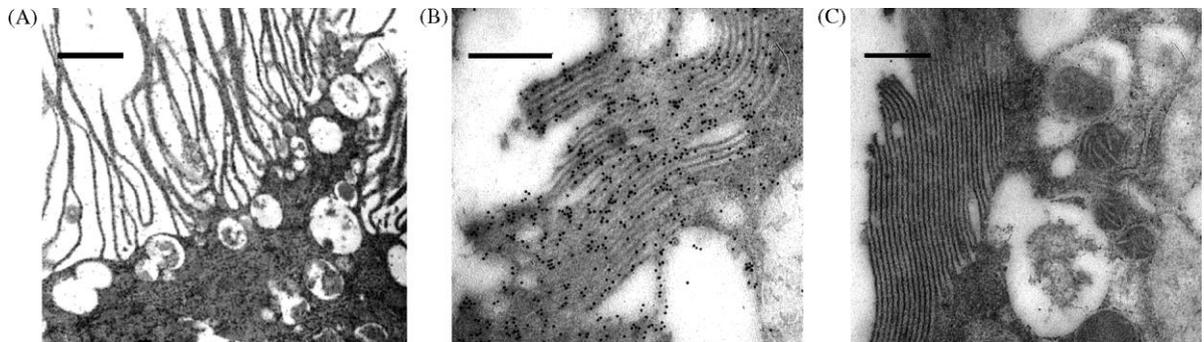
*F. hepatica* contiene endopeptidasas (FhCL1) que participan en la interrupción de los mecanismos de defensa inmune del huésped dirigidos contra los tejidos del parásito. Además, FhCL1 y FhLAP facilitan la migración del parásito a través de los tejidos del huésped y la adquisición de nutrientes, por ello se han propuesto como candidatos promisorios para el desarrollo de una vacuna comercial contra *F. hepatica*.

### **1.9.1 Leucina Aminopeptidasa**

Las aminopeptidasas son una familia de exopeptidasas dependientes de zinc que hidrolizan residuos de aminoácidos en el extremo amino de sustratos peptídicos. En helmintos parásitos, la leucina Aminopeptidasa (LAP) participa en diferentes procesos de sus ciclos de vida; en *Schistosoma mansoni*, se ha demostrado a través de ensayos de RNA de interferencia (RNAi) hacia LAP, que están involucradas en la eclosión de miracidios[63], en *Haemonchus contortus* se ha relacionado a LAP en los procesos de eclosión de huevos y muda de la cutícula[64]; además, mutantes nulos de LAP en *C. elegans* tuvieron una tasa de

crecimiento más lenta y un inicio tardío en la puesta de huevos[65]. Debido a lo anterior, estas aminopeptidasas son consideradas como blancos farmacológicos y candidatos a vacuna contra la infección parasitaria.

La leucina Aminopeptidasa de *F. hepatica* (FhLAP) se expresa en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito: se ha detectado en miracidios, metacercarias, juveniles recién desenquistados y en parásitos adultos[66]. Este antígeno fue inicialmente aislado, purificado y caracterizado a partir de un extracto soluble en detergente (DOC) del parásito adulto (nFhLAP), con un peso molecular de ~65kDa. Por estudios histoquímicos y de microscopía electrónica, nFhLAP se detectó en las células epiteliales que recubren el tracto digestivo del parásito adulto (**Figura 3**), por lo que se cree que participa en las etapas finales del catabolismo de péptidos que son generados por la degradación de tejidos y sangre del huésped por acción de otras endopeptidasas (catepsina Ls) y ser empleadas el anabolismo proteico del parásito[67].



**Figura 3. Detección de FhLAP en el intestino de *F. hepatica* adulta por microscopía inmunoeléctronica.**

**(A)** Localización de FhLAP en la célula secretora intestinal; se observan las vesículas secretoras y microvellosidades que forman las láminas superficiales de las células secretoras intestinales de *F. hepatica*. **(B)** Localización de FhLAP en las microvellosidades y el citoplasma de la célula epitelial. **(C)** Control sin anticuerpo primario en una vista similar a B. Barra de escala A: 2  $\mu$ m, B y C: 500nm. Tomado de Acosta *et al.*, 2008, *Molecular & Biochemical Parasitology* (158):52-62[66].

El potencial inmunogénico de nFhLAP fue analizado en ovinos, para ello, ovinos de raza Corriedale fueron inmunizados en dos ocasiones con 100 $\mu$ g de FhLAP emulsionado con el adyuvante completo e incompleto de Freund (ACF,

AIF) y luego se desafiaron con 300 metacercarias de *F. hepatica*. Los ovinos inmunizados con nFhLAP tuvieron 89.6% de protección comparado con el grupo control; además, 4 de 6 ovinos inmunizados no presentaron trematodos en el hígado y el suero de estos animales contenían anticuerpos neutralizantes hacia FhLAP[68].

Posteriormente en el año 2008, Acosta y Col. describen la producción funcional de una FhLAP recombinante de *F. hepatica* (rFhLAP), con las propiedades similares a la nFhLAP. Al evaluar la capacidad inmunogénica de rFhLAP en conejos, indujo una protección significativa del 78% junto con una robusta respuesta de anticuerpos de IgG anti-rFhLAP en suero de animales inmunizados[66]. En un segundo ensayo de inmunización con rFhLAP realizado por Maggioli y Col. (2011) emplearon 60 ovinos divididos en 6 grupos (n=10); se mezclaron 100µg de rFhLAP con diferentes tipos de adyuvantes: ACF/AIF, hidróxido de aluminio, adyuvac 50, DEAE-D o RiBi, y se inyectaron en dos ocasiones por vía subcutánea; tras la infección, los animales mostraron reducciones significativas en la carga parasitaria en un rango de 49.5% a 86.9%, siendo este el mejor nivel de protección logrado hasta la fecha empleando un solo antígeno contra *F. hepatica*[69]. Sin embargo, la eficacia de LAP no ha sido evaluada aun en bovinos, además de que es necesario realizar más ensayos de vacunación para validar el alto nivel de protección.

### **1.9.2 Cisteína- proteasas: Catepsina L**

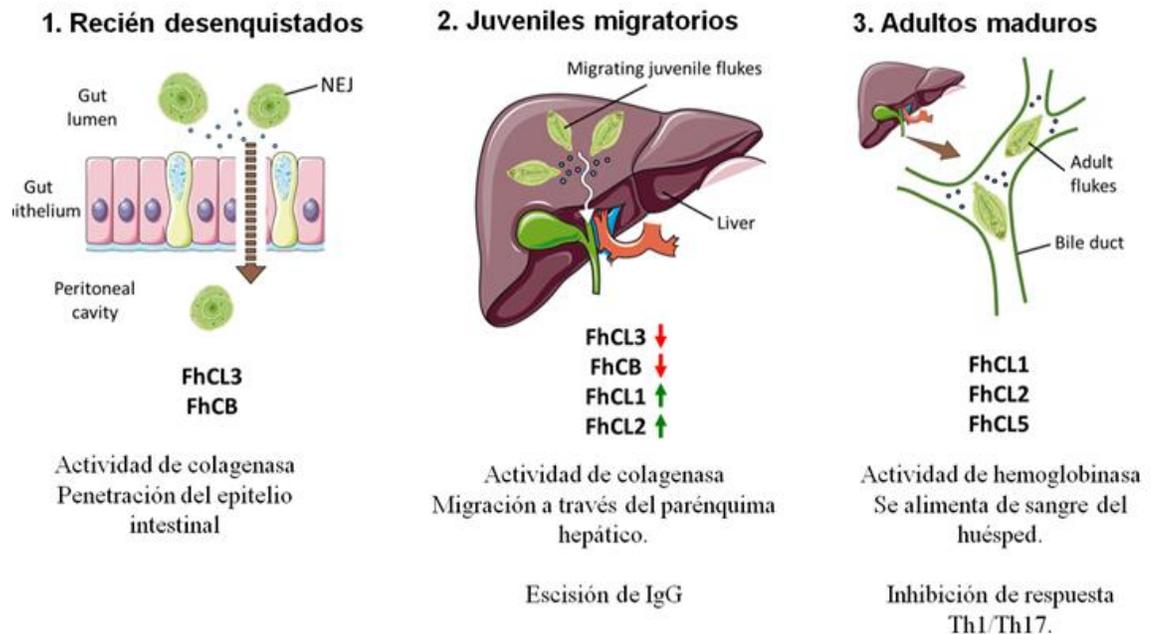
Las cisteín-proteasas, entre ellas catepsina L (FhCL) son producidas por todos los estados del ciclo de vida de *F. hepatica* y están involucradas en funciones cruciales del parásito entre ellas: el desenquistamiento de los NEJs, nutrición, invasión de tejidos y evasión del sistema inmunológico del huésped (**Figura 4**). Estudios filogenéticos revelan que *F. hepatica* expresa dos tipos de endopeptidasas denominadas: catepsina B (FhCB, 11 clados) y catepsina L (FhCL1-FhCL5, 5 clados), los diferentes clados de ambas peptidasas surgieron

por divergencia del sitio activo que muestran solapamiento pero con diferente especificidad de sustrato. Las peptidasas FhCB y FhCL se expresan en vesículas dentro de las células epiteliales intestinales del parásito en forma de zimógenos inactivos. La proteasa FhCB se expresa particularmente en los estados juveniles del parásito, mientras que las proteasas de FhCL se expresan en todos los estados del parásito. Los diferentes niveles de expresión de FhCB y FhCL se correlacionan con el paso de los parásitos a través de los diferentes tejidos y contacto con macromoléculas del huésped[70].

Los principales componentes de los productos de excreción-secreción de *F. hepatica* adulta incluyen a FhCL1, FhCL2 y FhCL5, siendo FhCL1 el componente principal representando más del 60% del secretoma del parásito. La FhCL1 tiene 326 aminoácidos (aa), 17aa corresponden a la secuencia señal, 90aa la secuencia de activación y 219aa conforman a la proteína madura. La FhCL1 se localiza en las células epiteliales gastrodermales en todo el intestino del parásito adulto, empaquetadas en vesículas secretoras como zimógenos inactivos (proFhCL1), al ser secretados al lumen intestinal ácido del parásito, se activan por escisión autocatalítica en la FhCL1 madura, con un peso molecular de ~27 kDa. Se ha demostrado que *F. hepatica* segrega pequeñas vesículas similar a los exosomas (~30-100nm) que transportan FABP, tioredoxina, peroxirredoxina y FhCL1 en forma inactiva (proFhCL1), sugiriendo un papel importante en las estrategias inmunomoduladoras del parásito[70,71].

La FhCL1 está involucrada en varios aspectos de la patogenicidad del trematodo, (1) facilita la migración del parásito a través del intestino y el hígado del huésped, al escindir las proteínas de la matriz intersticial como la fibronectina, laminina y colágeno, (2) participa en la adquisición de nutrientes al catabolizar las proteínas del huésped (sangre y tejido) a péptidos absorbibles para su anabolismo, (3) participa en la defensa del parásito contra el sistema inmune del huésped, al escindir la región de la bisagra de las inmunoglobulinas previniendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y (4) Suprime la

respuesta inmune Th1 del huésped haciéndolos más susceptibles a infecciones bacterianas concurrentes[46,70]. La adquisición de nutrientes del parásito adulto a través de FhCL1 se debe a que esta proteasa acomoda preferentemente aminoácidos hidrofóbicos como Leu, Ala, Phe y Val que son los más comunes de la hemoglobina, convirtiéndolos a pequeños péptidos de 3-14 aminoácidos en un ambiente ácido (pH 4.0)[48].



**Figura 4. Regulación de peptidasas de catepsinas de *F. hepatica* durante su desarrollo.**

(1) Los parásitos recién desenquistados penetran la pared duodenal y atraviesan la cavidad peritoneal del huésped a través de FhCL3 y FhCB. (2) Los trematodos inmaduros migran por el parénquima hepático, digiriendo proteínas y degradando colágeno por FhCL1 y FhCL2. (3) Los parásitos llegan a los conductos biliares, maduran y obtienen nutrientes a través de la digestión de hemoglobina de su huésped. Las peptidasas FhCL1, FhCL2 y FhCL5 son las únicas liberadas por el parásito adulto. Tomado y modificado de Cwiklinski *et al.*, 2019. *Advances in Parasitology* (104): 113-164[70].

Debido a la importancia de FhCL1 en la biología del trematodo, se ha propuesto como potencial candidato vacunal contra la fasciolosis en rumiantes. Durante los primeros ensayos de vacunación utilizando FhCL nativa, Wijffels y Col. (1994), demostraron que ovinos inmunizados con la proteasa alcanzaron títulos elevados de anticuerpos anti-FhCL, con una reducción significativa en el conteo de huevos fecales mayor al 69%, sin embargo, no se redujo la carga parasitaria con

la vacunación[72]. Luego en 1996, Dalton y Col. evaluaron la eficacia de FhCL emulsionada con adyuvante completo/incompleto de Freund's (ACF/AIF) como vacuna contra fasciolosis en bovinos, logrando reducir la carga parasitaria en un rango de 38.2-69.5%, además de disminuir significativamente la eliminación de huevos en 40.6-65%[73]. En otro ensayo de inmunización usando FhCL1, ovinos Corriedale fueron inmunizados con 100µg del antígeno en dos ocasiones, tras el desafío con la fase infectante, los ovinos inmunizados lograron reducir la carga parasitaria en un 34%, junto con un 70% de reducción en el conteo de huevos fecales[68].

Para realizar estudios físico-químicos, bioquímicos y ensayos de inmunogenicidad con FhCL1 nativo a menudo era necesario purificar grandes cantidades de la proteína directamente del parásito, por lo que es un trabajo tedioso, además, la concentración proteica obtenida varía entre cada lote. Para resolver este inconveniente, investigadores clonaron y expresaron a FhCL1 en forma recombinante en dos sistemas de expresión: *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, logrando obtener a la proteasa funcional[48,74]. Por otra parte, utilizando la tecnología de despliegue de fagos (*phage display*), se han seleccionado y utilizado mimotopos de FhCL como inmunógenos para ensayos de inmunización en rumiantes; como resultado, los porcentajes de protección en ovinos han sido del 47-51% y en ganado caprino del 46-79%, así como altos títulos de anticuerpos IgG1/IgG2 anti- mimotopos FhCL, indicando una respuesta mixta Th1/Th2[75–78].

La eficacia de rFhCL1 como antígeno vacunal contra *F. hepatica* ha sido evaluada en diferentes ensayos de vacunación empleando bovinos, ovinos y caprinos. En bovinos inmunizados con 200µg de rFhCL1 emulsionado con los adyuvantes Montanide ISA 70VG o ISA 206VG por vía subcutánea, indujeron 47.2 y 49.2% de reducción en la carga parasitaria comparado con el grupo control, además, los niveles de arginasa de macrófagos en animales inmunizados fueron más bajos, indicando que la activación alternativa de los macrófagos inducida por

el parásito fue alterado por la inmunización[44]. Posteriormente, Garza-Cuartero y Col. (2018), realizaron dos ensayos de vacunación en bovinos utilizando la rFhCL1 en diferentes países (ensayo I y II). La reducción de la carga parasitaria en bovinos inmunizados con el antígeno fue del 43% para el ensayo I, pero no se logró protección en el segundo ensayo[79]. Otros ensayos de inmunización empleando a rFhCL1 se han realizado en ovinos y caprinos, sin embargo, no se logró protección significativa[45]. Los cuerpos de inclusión de *Escherichia coli* conteniendo la cisteína proteasa W recombinante (rCPFhW) como antígeno vacunal, han logrado inducir 54-56% de protección en bovinos, sin embargo, en ovinos el nivel de protección ha sido nulo o bajo (35%)[45], por lo que se requieren más ensayos de vacunación utilizando este inmunógeno para validar su grado de protección.

Otras proteínas nativas evaluadas como antígenos vacunales contra *F. hepatica* incluyen a la: peroxirredoxina (FhPrx), hemoglobina (FHb), un inhibidor de tripsina tipo *Kunitz*; en bovinos inmunizados con FhPrx nativa, se logró una protección del 43% comparado con el grupo control de la infección[45,51]. Recientemente, dos proteínas recombinantes fueron evaluadas como posibles inmunógenos contra *F. hepatica* en rumiantes: la tiorredoxina y la proteína 14-3-3z; sin embargo, no lograron inducir protección tras la vacunación[45].

**Tabla 1. Porcentajes de protección contra *F. hepatica* en rumiantes empleando antígenos unitarios como inmunógenos**

Antígeno	Forma	Huésped	Protección (%)	Referencia
FABP	Nativo	Bovinos	55%	Hillyer <i>et al.</i> , 1987
	Nativo Fh12	Ovinos	NS	Ramajo <i>et al.</i> , 2001
	Nativo	Ovinos	24%	Martínez-Fernández <i>et al.</i> , 2004
	Nativo Fh12	Ovinos	42%	Lopez-Aban <i>et al.</i> , 2008
	rFh15	Ovinos	NS	Ramajo <i>et al.</i> , 2001
	rSm14	Ovinos	98.5% (n=4)	Almeida <i>et al.</i> , 2003
	rFh15	Ovinos	43%	Lopez-Abán <i>et al.</i> , 2007
Paramiosina	Nativo	Ovinos	NS	Spithill <i>et al.</i> , 1999b
	Nativo	Bovinos	47%	Spithill <i>et al.</i> , 1999b
GST	Nativo	Ovinos	57%	Sexton <i>et al.</i> , 1990
	Nativo	Bovinos	0-69%	Morrison <i>et al.</i> , 1996
	Nativo	Ovinos	29%	Datos de 8 ensayos citados en Spithill <i>et al.</i> , 1999b
	Nativo	Bovinos	43%	Datos de 4 ensayos, citados en Spithill <i>et al.</i> , 1999b
	Nativo	Caprinos	NS	Buffoni <i>et al.</i> , 2010
	Péptido Sm14	Caprinos	NS	Zafra <i>et al.</i> , 2008
	rSm14	Caprinos	NS	Buffoni <i>et al.</i> , 2012; Mendes <i>et al.</i> , 2010a
rFhGST-S1	Caprinos	NS	LaCourse <i>et al.</i> , 2012	
Molécula tipo Kunitz	Nativo	Ovinos/ Bovinos	NS	Spithill <i>et al.</i> , 1999b
Peroxirredoxina	rPrx	Caprinos	NS	Mendes <i>et al.</i> , 2010b
	rPrx	Caprinos	NS	Buffoni <i>et al.</i> , 2012
Catepsina L	Nativo	Ovinos	69% (en FEC)	Wijffels <i>et al.</i> , 1994
	CL1 nativo	Bovinos	42-69%	Dalton <i>et al.</i> , 1996
	CL1 nativo	Ovinos	34%	Piacenza <i>et al.</i> , 1999
	CL2 nativo	Ovinos	NS	Piacenza <i>et al.</i> , 1999
	M-CL1/CL2	Ovinos	47%	Villa-Mancera <i>et al.</i> , 2008
	rCL1	Bovinos	48%	Golden <i>et al.</i> , 2010
	rCL1	Caprinos	NS	Pérez-Ecija <i>et al.</i> , 2010
	M-CL1	Ovinos	51%	Villa-Mancera (2012)
	rCL1	Caprinos	NS	Buffoni <i>et al.</i> , 2012
	rCL1	Caprinos	NS	Zafra <i>et al.</i> , 2013
	M-CL1	Caprinos	46-79%	Villa-Mancera <i>et al.</i> , 2014
	rCL1	Bovinos	37.6%	Garza-Cuartero <i>et al.</i> , 2018
rCL1	Bovinos	NS	Garza-Cuartero <i>et al.</i> , 2018	
rCL1	Ovinos	NS	Pacheco <i>et al.</i> , 2017	
Hemoglobina (Hb)	Nativo	Bovinos	43%	Dalton <i>et al.</i> , 1996
	rHbF2	Bovinos	NS	Dewilde <i>et al.</i> , 2008
Catepsina CPFhW	C.I	Bovinos	54% (n=3)	Wedrychowicz <i>et al.</i> , 2007
	C.I	Ovinos	NS	Wedrychowicz <i>et al.</i> , 2007
	rCPFhW	Bovinos	56.2%	Wesołowska <i>et al.</i> , 2018
	rCPFhW	Ovinos	35.5%	Wesołowska <i>et al.</i> , 2018
LAP	Nativo	Ovinos	89%	Piacenza <i>et al.</i> , 1998
	rFhLAP	Ovinos	49-86%	Maggioli <i>et al.</i> , 2011
Tioredoxina	rTGR	Bovinos	NS	Maggioli <i>et al.</i> , 2016
Proteína 14-3-3z	rFh14-3-3z	Ovinos	NS	Pérez-Caballero <i>et al.</i> , 2018

**r:** recombinante; **M:** mimotopos; **C.I:** Cuerpos de inclusión; **FABP:** Proteína de unión a ácidos grasos; **rFh12:** proteína de 12kDa; **GST:** Glutation S-transferasa; **CL1/CL2:** Catepsina L1 o L2; **CPFhW:** Cistein proteasa de *F. hepatica* W; **LAP:** leucina aminopeptidasa; **Hb:** Hemoglobina; **rHbF2:** Hemoglobina F2 recombinante; **Prx:** Peroxirredoxina recombinante; **rSm14:** FABP recombinante de *Schistosoma mansoni*; **NS:** no significativo; **FEC:** Conteo de huevos fecales; **FIA:** Adyuvante incompleto de Freund; **TGR:** Tiorredoxin Glutation Reductasa; **rTGR:** Tiorredoxin Glutation reductasas recombinante; **rFh14-3-3z:** Proteina 14-3-3z de *F. hepatica*. Modificado y actualizado de Toet *et al.*, 2014. *International Journal of Parasitology* (44):915-927[45].

### **1.10 Combinación de antígenos vacunales contra *F. hepatica***

La mayoría de los ensayos de vacunas experimentales contra *F. hepatica* se han realizado utilizando antígenos nativos o recombinantes en forma individual, con resultados variables de protección en rumiantes. Probablemente, estos resultados variables de protección reflejen la importancia de usar dos o más antígenos como vacunas multivalentes que induzcan mejor respuesta inmune protectora contra la infección (**Tabla 2**).

Se ha demostrado que la combinación de dos o más antígenos nativos como inmunógenos contra *F. hepatica* inducen altos niveles de protección significativos en ganado vacuno, al inmunizar bovinos Holstein con FhCL1/Hb (G1) o FhCL2/Hb (G2) empleando el adyuvante de Freund's en tres ocasiones y tras el desafío con 600 metacercarias de *F. hepatica*, hubo una reducción de la carga parasitaria del 51.9% y 72.4%, respectivamente[47,73]; además de una reducción en la viabilidad de huevos del parásito mayor al 98%, indicando que la vacunación tuvo efecto anti-embrión[73]. En otro ensayo de inmunización utilizando una combinación de FhCL1/Hb y FhCL1/FhCL2, lograron inducir un 29-55% de protección en ganado bovino[80]. En el caso de ovinos, la vacunación con FhCL1/FhCL2 mostraron una eficacia no significativa del 60% y en ovinos inmunizados con FhCL1/FhCL2/FhLAP indujo 79% de protección, sin embargo, en otro grupo de ovinos inmunizados solo con FhLAP se logró un 89% de protección[68].

El uso de antígenos recombinantes como vacunas multivalentes ha sido poco evaluada. Buffoni y Col. (2012), inmunizaron caprinos con una combinación de antígenos FhCL1/FhPrx/Sm14, sin embargo, la inmunización en animales no logró reducir la carga parasitaria[81]. Posteriormente, en 2018 Norbury y Col. utilizaron la combinación de dos proteasas: FhCB2 (fase inmadura) y FhCL5 (fase adulta) de *F. hepatica* como candidatos vacunales contra el parásito evaluado en ovinos; los animales fueron inmunizados por vía intramuscular o nasal, logrando niveles de protección significativa del 20.9% y 40.5%, respectivamente. Además, una reducción en la viabilidad de huevos del parásito mayor al 90% fue obtenido en animales inmunizados por vía nasal[82]. Las vacunas multivalentes que incluyen dos o más proteínas completas del trematodo pueden mejorar el nivel de protección, pero también pueden provocar un efecto negativo sobre la inducción de una respuesta inmune protectora contra la infección en los animales, probablemente este efecto negativo se deba a la combinación inadecuada de antígenos que produzcan competición antigénica. Un enfoque poco empleado en el desarrollo de vacunas contra parásitos son las proteínas quiméricas, las cuales pueden contener secuencias antigénicas de diferentes antígenos importantes para el parásito en una sola molécula que sea capaz de inducir una potente respuesta inmune contra la infección.

**Tabla 2. Niveles de protección contra *F. hepatica* en rumiantes empleando una combinación de antígenos como inmunógenos**

Antígeno	Forma	Huésped	Protección	Referencia
CL1+Hb	Nativo	Bovinos	51% FCA/FIA	Dalton <i>et al.</i> , 1996
CL2+Hb	Nativo	Bovinos	72% FCA/FIA	Dalton <i>et al.</i> , 1996; Mulcahy <i>et al.</i> , 1998
CL2+Hb	Nativo	Bovinos	11% FIA	Mulcahy <i>et al.</i> , 1998
CL2+Hb	Nativo	Bovinos	29% FCA/FIA	Mulcahy <i>et al.</i> , 1999
CL1/CL2	Nativo	Bovinos	55%	Mulcahy <i>et al.</i> , 1999
CL1/CL2	Nativo	Ovinos	NS	Piacenza <i>et al.</i> ; 1999
CL1/CL2/LAP	Nativo	Ovinos	79%	Piacenza <i>et al.</i> ; 1999
CB2/CL5	Recombinante	Ovinos	20.9-40.5%	Norbury <i>et al.</i> ; 2018
FhCL1/FhPrx/Sm14	Recombinante	Caprinos	10.1%	Buffoni <i>et al.</i> , 2012

**CL1/CL2:** Catepsina L1 o L2; **LAP:** leucina aminopeptidasa; **Hb:** Hemoglobina. **Prx:** Peroxirredoxina; **rSm14:** FABP recombinante de *Schistosoma mansoni*; **CB2/CL5;**

Catepsina B2/ Catepsina L5. Modificado y actualizado de Toet *et al.*, 2014. *International Journal of Parasitology* (44):915-927[45].

### 1.11 Uso de proteínas quiméricas contra parásitos

El enfoque de proteínas quiméricas que incluye epitopes de células B o T presentes en la secuencia de aminoácidos de proteínas candidatas a vacunas, podría aumentar la inmunogenicidad y con ello el nivel de protección contra la infección. En el campo de la parasitología, el desarrollo y evaluación de proteínas quiméricas como vacunas contra enfermedades parasitarias ha ido en aumento. Las proteínas quiméricas tienen la ventaja de incluir epitopes antigénicos e inmunogénicos de dos o más proteínas expresados en los diferentes estados del ciclo de vida del parásito, con ello inducir mayor protección contra la infección.

En parásitos protozoarios, Días y Col. (2018), construyeron un gen quimérico basado en epitopes de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> de tres proteínas inmunogénicas de *Leishmania infantum*, para evaluar su capacidad inmunogénica y eficacia protectora en ratones tras la infección; como resultado, la proteína quimérica indujo altos niveles de IFN- $\gamma$  y bajos niveles de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica de humanos (PBMCs); además, los ratones inmunizados presentaron menor carga parasitaria comparado con los animales control[83]. Para *Plasmodium vivax* (agente causal de la malaria), se reportó la construcción de dos genes quiméricos sintéticos del antígeno de circunsporozoito (PvCSP), basados en las dos formas variantes (VK210 y Vk247); ambos genes consistían de las regiones N-terminal y C-terminal conservadas de la proteína PvCSP nativa que flanquean una región truncada repetida de VK210/VK247 (quimera CS127) y VK247/VK210 (quimera CS217); estas proteínas fueron reconocidas por anticuerpos monoclonales anti-CS127 y anti-CS217 por ensayos de ELISA, confirmando la presencia de epitopes comunes entre las formas recombinantes y la proteína nativa[84]. Otras proteínas quiméricas recombinantes para *P. falciparum* y *P. yoelii* han sido construidas y evaluadas como candidatos promisorios a vacunas, logrando alta inmunogenicidad en roedores[85,86]. En el

caso de *Babesia bovis*, han empleado el virus vaccinia modificado que expresa un antígeno quimérico (rMVA) conteniendo epitopes de células B y T de tres proteínas antigénicas: MSA-2c, RAP-1 y HSP20. La rMVA junto con las tres proteínas recombinantes expresadas en forma unitaria (MSA-2c, RAP-1 y HSP20) se emplearon en ensayos de inmunizaciones homólogas y heterólogas de sensibilidad-refuerzo en ratones. El esquema de sensibilidad-refuerzo con el coctel de las tres proteínas y rMVA inyectado en ratones indujo una fuerte respuesta inmune humoral y celular, caracterizada por altos títulos de anticuerpos IgG2a y concentraciones elevadas de IFN $\gamma$ (ng/ml) secretado por células T CD4+ y CD8+[87].

El uso de proteínas quiméricas también puede emplearse para el diagnóstico de enfermedades parasitarias, mejorando su sensibilidad y especificidad comparado con los métodos de diagnóstico tradicionales. En *Babesia bovis*, se empleó una proteína quimérica recombinante (rMABbo) para la detección de anticuerpos en bovinos sospechosos de la infección por este parásito por ELISA indirecta; el ensayo de ELISA mostró una sensibilidad y especificidad del 95.2% y 94.3%, respectivamente, resultado similar que cuando se utiliza el lisado crudo de merozoitos en ensayos de ELISA[88]. De manera similar, Holec y Col. (2012), desarrollaron una proteína quimérica que contiene tres regiones de las proteínas MIC1, MAG1 y SAG1, para evaluar su utilidad serodiagnóstica de *Toxoplasma gondii* en sueros de humanos; el ensayo de ELISA utilizando la proteína quimérica mostró un 96.9% de sensibilidad y 100% de especificidad[89]. En otro estudio de serodiagnóstico para *T. gondii*, desarrollaron y evaluaron una proteína quimérica que contiene tres regiones inmunodominantes de las proteínas SAG2, GRA1 y ROP1 para detectar IgG anti-*T. gondii* en sueros de humanos; como resultado, se mejoró la sensibilidad (100%) y especificidad (100%) comparado con inmunoensayos basados en la mezcla de proteínas unitarias o usando el extracto completo de taquizoitos del parásito[90].

En parásitos helmintos el desarrollo y uso de proteínas quiméricas como antígeno vacunal o para serodiagnóstico es escaso.

En el trematodo *Schistosoma mansoni*, se ha descrito la construcción y evaluación de antígenos multivalentes y multi-epitopes contra la infección en ratones; su diseño incluye una variedad de estructuras covalentes únicas, incluyendo: una vacuna de ADN construida a partir de un gen sintético que codifica para una proteína poliepitopo artificial, esta comprende ocho secuencias de *S. mansoni* conteniendo epitopes para células B y T unidos en tándem; una vacuna constituida por una proteína poliepitopo obtenida a partir de la expresión de la vacuna de ADN y otra vacuna compuesta de polímeros basados en epitopes de péptidos sintéticos ramificados en el que los epitopes individuales son colgantes de una columna vertebral inerte. Como resultado, ninguna construcción protegió a los animales tras el desafío, indicando que la respuesta inmune inducida fue inadecuada o inapropiada para eliminar el parásito *in vivo*[91].

En otro estudio realizado por Pinheiro y Col. (2014), obtuvieron dos proteínas quiméricas constituidas por los antígenos del tegumento SmTSP-2 y Sm29 de *S. mansoni*; la quimera A constituida por el gen SmTSP-2 fusionado a la región N-terminal del gen Sm29 y la quimera B conformada por Sm-TSP-2 mas la región C-terminal de Sm29 fueron evaluados en ratones como posibles vacunas candidatas contra la infección por *S. mansoni*; los ratones inmunizados con ambas quimeras indujeron reducción en la carga parasitaria y menor daño hepático comparado con los grupos control; además, se detectaron altos niveles de IgG, IgG1 e IgG2 específico de ratón contra ambas quimeras y cantidades significativas de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ [92].

Recientemente, se diseñó una vacuna subunitaria multiepitope de diferentes antígenos importantes del trematodo *Fasciola gigantica* a través de enfoques inmunoinformáticos. Este antígeno multiepitope contiene epitopes de linfocitos de células B, células T (CTL) y células T cooperadoras (Th) de siete

antígenos del parásito: FhTGR, FgFABP-1, FgLAP, FgSAP-2, FgCathL, FgCathB y FhEpsilon, que ha mostrado inducir la producción de anticuerpos neutralizantes contra la infección. Las propiedades de inmunogenicidad, alergenicidad y antigenicidad fueron examinadas en el antígeno multi-epitope, además, de realizar la clonación *in silico*. La evaluación experimental de la vacuna multiepitope diseñada en un modelo animal podría conferir protección contra la infección por *F. gigantica*, sin embargo, aun no se ha evaluado[93].

### **1.12 Proteínas quiméricas en *F. hepatica***

Hasta la fecha, en *Fasciola hepatica* el uso de proteínas quiméricas como antígeno vacunal contra la infección en rumiantes aun no ha sido reportado a nivel mundial. Por ello, nuestro grupo de investigación diseñó y construyó un gen quimérico que contiene epitopes de células B predichas *in silico* a través de herramientas inmunoinformáticas de dos antígenos inmunogénicos importantes del parásito: catepsina L1 (FhCL1) y leucina Aminopeptidasa (FhLAP)[94]. Los antígenos FhLAP y FhCL1 en su forma nativa o recombinante han logrado inducir los mejores niveles de protección contra la infección en rumiantes y han sido propuestos como antígenos promisorios para la primera vacuna comercial contra *F. hepatica*. La proteína quimérica recombinante (rFhLAP-CL1), contiene cuatro determinantes antigénicos de FhLAP (GenBank; AAV59016.1; 192–281 aa) y seis determinantes antigénicos de FhCL1 (GenBank CAC12806.1; 173–309 aa)[94].

La región de FhCL1 de la proteína quimérica comprende epitopes de células B previamente identificados por otros investigadores: La región 181-191aa y 283-289aa contenidas dentro de la secuencia quimérica fueron usados previamente en ensayos de inmunización en ovinos y caprinos contra la infección por *F. hepatica*, logrando un 47.6% y 30% de protección, respectivamente[75,76]. La región 245-264aa de FhCL1 identificados como péptidos B7 y B8 que sobrelapan con la secuencia quimérica fueron utilizados para inmunizar ratones; como resultado, los ratones inmunizados indujeron altos niveles de IgG, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17[95]. Además, la región 288-296aa de FhCL1 ha sido reconocida por

sueros de bovinos inmunizados con las proteínas recombinantes FhCL1/FhCL3[79].

En un estudio previo en nuestro laboratorio se demostró que la proteína quimérica tiene propiedades antigénicas e inmunogénicas analizado a través de sueros de bovinos positivos a la infección y por inducir altos niveles de anticuerpos en conejos inmunizados con la proteína quimérica, respectivamente[94]. Por lo tanto, el propósito del presente estudio fue mejorar la expresión de la proteína quimérica y evaluar su capacidad inmunogénica y protectora en ovinos contra la infección por *F. hepatica*.

## 2. JUSTIFICACIÓN

*Fasciola hepatica* es una enfermedad parasitaria que afecta a la ganadería mundial y la salud humana. Actualmente no existe una vacuna comercial contra este parásito, su control principal se basa en el uso de fasciolicidas, el triclabendazol es el más utilizado por afectar formas inmaduras y adultas del parásito. Sin embargo, la resistencia contra este fármaco y otros fasciolicidas ha sido reportada en varias partes del mundo. Además, el empleo de fasciolicidas no previene reinfecciones futuras en los animales, por lo que nuevas estrategias de control son necesarias. El enfoque basado en vacunas para el control de la fasciolosis es una estrategia promisorio. De forma unitaria, se han utilizado antígenos (nativos/recombinantes) de *F. hepatica* en ensayos de vacunación, logrando niveles de protección elevados en animales de laboratorio (ratas), pero de moderados a nulos en rumiantes. A pesar de que los ovinos son la especie más susceptible a la infección por *F. hepatica*, reportes de vacunación con catepsina L1 y leucina Aminopeptidasa, han mostrado los niveles de protección más elevados contra la infección al aplicarlos de forma unitaria. El desarrollo de una proteína quimérica compuesta de las secuencias más antigénicas de FhLAP y FhCL1 fue propuesto y obtenido previamente por nuestro grupo de investigación. La proteína quimérica clonada en el plásmido pET15b (pET15b-LAPCL1) y expresada en *E. coli* mostró propiedades antigénicas e inmunogénicas en conejos inmunizados, sin embargo, su obtención ha sido difícil bajo las condiciones de expresión y purificación anteriormente utilizadas. Previo a evaluar la capacidad inmunoprotectora inducida por la proteína quimérica en ovinos, fue necesario caracterizar al gen quimérico y el plásmido recombinante a fin de implementar nuevas estrategias de expresión y purificación del inmunógeno, esto con el objetivo de obtener la proteína quimérica en cantidad y pureza adecuada para la inmunización de los ovinos.

### **3. HIPÓTESIS**

La inmunización de ovinos con la proteína quimérica rFhLAP-CL1 induce protección contra la infección por *F. hepatica*, cuantificado por la reducción en el número de parásitos, reducción en la eliminación-viabilidad de huevos y títulos elevados de IgG1/IgG2 anti-rFhLAP-CL1.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Expresar y purificar la proteína quimérica rFhLAP-CL1 para evaluar su inmunogenicidad en ovinos contra *Fasciola hepatica*.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar la identidad del plásmido recombinante (pET15b-LAPCL1) a través de secuenciación de nucleótidos.
- Expresar y purificar la proteína quimérica rFhLAP-CL1 en cantidad suficiente para ensayos de inmunización en ovinos.
- Evaluar diferentes concentraciones de la proteína quimérica como inmunógeno en ovinos e infectarlos de forma experimental con *F. hepatica*.
- Determinar el nivel de protección inducido por la proteína quimérica en ovinos inmunizados y desafiados por reducción en el número de parásitos, eliminación de huevos en heces y la viabilidad de huevos del parásito.
- Determinar los niveles de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-rFhLAP-CL1 y anti-FhES en sueros de ovinos inmunizados y controles.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

El proyecto de investigación fue dividido en dos fases: la fase I, involucra el análisis de la identidad del plásmido recombinante a nivel de nucleótidos, la expresión y purificación de la proteína quimérica. La fase II, comprende la evaluación inmunogénica de la proteína quimérica contra *F. hepatica* en ovinos.

### FASE I. CARACTERIZACIÓN DEL GEN QUIMÉRICO Y EL PLÁSMIDO RECOMBINANTE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA

#### 5.1 Caracterización del gen quimérico y del plásmido recombinante

##### 5.1.1 Secuenciación del plásmido recombinante a nivel de nucleótidos

El análisis de la secuencia clonada en el vector de expresión (pET15b-LAPCL1) se efectuó en el Laboratorio de Inmunología del IIB, UNAM, con apoyo de la Q.F.B, M. en C. Adriana V. Balderas Loeza, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. El análisis de la secuencia a nivel de nucleótidos del plásmido recombinante se realizó con el fin de corroborar la identidad del plásmido utilizado por Hernández y Col. (2016)[94]; para ello, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes siguiendo el método descrito por Hanahan (1983)[96].

##### 5.1.2 Preparación de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ y *E. coli* Rosetta competentes por calcio

Las cepas bacterianas *E. coli* DH5 $\alpha$  y Rosetta DE3 se estrilaron de forma independiente en una placa de agar con medio Luria Bertani (LB) e incubaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente, una colonia bacteriana crecida en la placa LB fue picada y sembrada en 5ml de medio LB líquido sin antibiótico e incubada a 37°C a 200 revoluciones por minuto (rpm) por 16h. Posteriormente, se realizó una dilución 1:50 del cultivo anterior en 50ml de medio LB suplementado con 20mM de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) e incubó a 37°C con 200rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (OD) OD<sub>600nm</sub> de 0.5 a 0.6. Luego, el cultivo se incubó en hielo por 60 minutos, girando el matraz a intervalo de 5 minutos. Transcurrido el tiempo, la

pastilla bacteriana se obtuvo por centrifugación a 4000rpm durante 5 minutos a 4°C. La pastilla bacteriana se lavó dos ocasiones con 50mM de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) estéril y frío. Luego de los lavados, la pastilla bacteriana fue re-suspendida en 5ml de CaCl<sub>2</sub> 50mM y glicerol al 20%, se prepararon alícuotas de 200µl, se etiquetaron y almacenaron a -70°C hasta su uso.

### **5.1.3 Transformación de células DH5α con el plásmido quimérico**

La transformación de las bacterias DH5α competentes, se realizó de acuerdo al método descrito por Hanahan (1983)[96], con algunas modificaciones. Brevemente, las bacterias fueron descongeladas en hielo y el plásmido quimérico pET15b-LAPCL1 (10-100ng) fue adicionado lentamente e incubado por 30 minutos en hielo. Posteriormente, se dio un choque térmico a las bacterias, al incubarlas a 42°C por 90 segundos y luego en hielo por 2 minutos. Para la recuperación de las bacterias, se les adicionó 800µl medio de caldo superóptimo (SOC) estéril sin antibiótico e incubaron a 37°C a 220rpm por 60 minutos. Transcurrido la recuperación de las bacterias, el cultivo se centrifugó a 2500rpm por 5min a 4°C, posteriormente 50µl de bacterias se sembraron en placas LM con carbenicilina (Carb, 100µg/ml medio). Las placas se incubaron a 37°C toda la noche para permitir el crecimiento de bacterias recombinantes.

### **5.1.4 Purificación del plásmido quimérico de diferentes colonias.**

A partir del crecimiento de colonias bacterianas en placas LM, transformadas con el plásmido quimérico pET15b-LAPCL1, se picaron 10 colonias de forma independiente e inocularon en tubos de vidrio, conteniendo 10 ml de medio LB líquido con Carb (LB/Carb, 100µg/ml), éstos fueron incubados a 37°C con 220rpm por 16h. Posteriormente, el ADN plasmídico fue purificado a través de columnas QIAprep Miniprep (Qiagen, ID: 27104), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, los plásmidos purificados fueron cuantificados por espectrofotometría de luz ultravioleta (UV, OD<sub>260/280nm</sub>) y visualizados en un gel de agarosa al 1% al ser teñidos con bromuro de etidio (0.5µg/ml). Finalmente, los

plásmidos purificados se enviaron a la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM para su secuenciación. Para ello, se utilizaron dos oligos proporcionados por la UBM-IFC-UNAM que flanquean la secuencia clonada río arriba y río abajo: oligo *Forward* (T7 promoter primer #69348: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3) y oligo *reverse* (T7 terminator primer #69337: GCTAGTTATTGCTCAGCGG) ambos hibridan con el vector pET15b.

### 5.1.5 Construcción *in silico* de la secuencia quimérica LAP-CL1

Para la construcción *in silico* a nivel de nucleótidos de la secuencia quimérica, se emplearon las secuencias de la base de datos del GenBank utilizadas por Hernández y Col. (2016): LAP (AAV59016.1) y CL1 (CAC12806.1)[94]; sin embargo, éstas secuencias reportadas codifican para la secuencia de aminoácidos, por lo cual se buscaron y utilizaron las secuencias de nucleótidos respectivos: LAP (AY644459.1, GI: 55714630) y CL1 (AJ279092.1, GI: 10798510).

Para la construcción *in silico* de la secuencia quimérica LAP-CL1 a nivel de nucleótidos, se tomó la secuencia que codifica para los aminoácidos 192-281 de LAP y el fragmento de CL1 se obtuvo de los aminoácidos 173 a 309, tal como lo reporta Hernández y col. (2016)[94]. Las regiones seleccionadas de FhLAP y FhCL1 se fusionaron y su identidad se corroboró por secuenciación del vector recombinante pET15b-LAPCL1.

El análisis de alineamiento entre la secuencia de nucleótidos del gen quimérico experimental con el gen quimérico predicho se realizó con el programa *blastn* ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)). Posteriormente, ambas secuencias de nucleótidos se tradujeron a aminoácidos con *EMBOSS Transeq* ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_transeq/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)), los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la proteína predicha con la secuencia experimental se realizó utilizando el programa *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). El peso molecular predicho y punto

isoelectric se calculó con el programa *Expasy PI/Mw tool* ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)).

## **5.2 Expresión y purificación de la proteína quimérica**

Los ensayos de expresión y purificación de la proteína quimérica se realizaron en el Laboratorio de Inmunología a cargo de la Dra. Clara Espitia Pinzón, del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM.

### **5.2.1 Transformación de *E. coli* Rosetta con el plásmido quimérico**

El proceso de transformación de bacterias *E. coli* Rosetta competentes con el plásmido quimérico fue similar al descrito en la sección de transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$  (sección 5.1.3), con una excepción, luego de la recuperación de las bacterias en medio SOC, éstas se sembraron en cajas LB agar con carbenicilina (Carb, 100 $\mu$ g/ml medio) e incubaron a 37°C por 12h, para permitir el crecimiento de bacterias transformadas.

### **Preparación de stock de *E. coli* Rosetta DE3 recombinantes**

A partir del crecimiento de colonias bacterianas en placas LB agar, previamente transformadas con el plásmido recombinante pET15b-LAPCL1, se picaron varias colonias de forma independiente e inocularon en tubos de vidrio, conteniendo medio LB/Carb (100 $\mu$ g/ml), éstos fueron incubados a 37°C con 200rpm por 16h. Al día siguiente, se realizaron alícuotas de 1ml, con 800 $\mu$ l de bacterias crecidas y 20% de glicerol estéril. Las alícuotas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### **5.2.2 Expresión de la proteína quimérica por *E. coli* Rosetta**

Las bacterias transformadas con el plásmido pET15b-LAPCL1 y mantenidas a -70°C, fueron descongeladas en hielo. A continuación, las bacterias se estriaron en placas LB agar con Carb (100 $\mu$ g/ml) e incubaron a 37°C toda la noche para permitir el crecimiento de colonias aisladas. Para realizar el pre-cultivo,

se picó una colonia bacteriana e inoculó en medio líquido LB/Carb, ésta fue incubada a 37°C con agitación a 200rpm por 16h. Al día siguiente, las bacterias fueron sub-cultivadas en medio LB/carb fresco a una dilución 1:100, cuando alcanzaron una OD<sub>600nm</sub> de 0.5-0.6, se indujo la expresión de la proteína quimérica con 0.25mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma Aldrich). Transcurridas cuatro horas de inducción, la pastilla bacteriana fue obtenida por centrifugación a 4500rpm por 25min a 4°C. Previo a este ensayo, se realizó una cinética de crecimiento bacteriano y se realizaron ensayos de expresión a pequeña escala para determinar si la proteína quimérica se expresa en forma soluble o insoluble; además de realizar una cinética de expresión de la proteína quimérica por 16h.

### **5.2.3 Purificación de la proteína quimérica**

Considerando que la proteína quimérica se expresa en forma insoluble, la pastilla bacteriana obtenida previamente fue lavada en dos ocasiones con solución salina tamponada con fosfato (PBS-1x, pH 7.4), re-suspendida en amortiguador de sonicación (AS: 50mM de Tris-HCl pH 8.0, 1mM de PMSF, 100mM NaCl, 20mM imidazol) e incubada a 4°C por 45-60 minutos. Tras la incubación, las bacterias fueron sonicadas (*Virsonic 550, VirtisCo., Gardiner, New York, USA*) a una amplitud de 70%, con 10 ciclos de 30 segundos de ráfagas y 30s descanso mantenida a 4°C. El material sonificado fue centrifugado a 14 000rpm por 40 minutos a 4°C, la pastilla obtenida fue lavada una ocasión con PBS-1x y dos veces con PBS-Tritón x-100 al 1%. Luego, la pastilla bacteriana fue solubilizada con amortiguador de unión (Bb: 50mM de Fosfato de sodio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 50mM NaCl, 8M urea, 10mM Imidazol, pH 8.0) e incubado en agitación constante a 4°C por 16h, con el fin de liberar la proteína quimérica dentro de los cuerpos de inclusión. Posterior a la incubación, la muestra fue centrifugada a 14 000rpm/30 minutos a 4°C y, el sobrenadante conteniendo la proteína quimérica fue colectado, filtrado a través de membranas con punto de corte de 1.2μM y 0.45μM.

La proteína quimérica fue purificada por cromatografía de afinidad a níquel, utilizando columnas HisTrap<sup>TM</sup>HP (*GE Healthcare Life Sciences, USA*) a través del equipo ÄKTA-FPLC (*GE Healthcare*). El sobrenadante filtrado fue cargado a la columna *HisTrap<sup>TM</sup>HP*, previamente equilibrada con el amortiguador de unión. Luego, la columna fue lavada con amortiguador de lavado (BL, 50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50mM NaCl, 8M urea, 20mM Imidazol, pH 8.0), las proteínas unidas a la columna fueron eluidas con amortiguador de elución (BE, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50mM NaCl, 8M urea, 500mM Imidazol, pH 8.0) utilizando un gradiente escalonado. Las fracciones colectadas de la purificación (fracción no pegada, lavados y eluidos) fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12%, teñido con azul de *Coomassie*, con el objetivo de determinar el peso molecular y la pureza de la proteína quimérica purificada.

#### **5.2.4 Renaturalización de la proteína quimérica purificada**

La proteína quimérica contenida en las diferentes fracciones colectadas de la purificación, se identificó a través de un cromatograma generado por el equipo ÄKTA-FPLC, así como en geles SDS-PAGE al 12%. Tras identificar los picos de elución de la proteína quimérica, las fracciones se mezclaron en un *pool* para preparar un lote. Para eliminar la urea contenida en las muestras purificadas, se realizó el proceso de renaturalización de la proteína por medio de diálisis, utilizando membranas *Spectra/por (Molecular poros Membrana MWCO 3500, Broadwich St. USA)* contra una solución de fosfatos (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50mM NaCl, pH 8.0) sin imidazol, a concentraciones decrecientes de urea (6M, 4M, 2M, 1M, 0.5M y 0M). Como regla general, se utilizó 10ml muestra por 1L de solución de fosfatos en agitación lenta a 4°C, con recambio de la solución cada 12 horas. La proteína quimérica dializada a cero molar de urea, fue centrifugada a 4500rpm por 30 min a 4°C y el sobrenadante fue almacenado a -70°C hasta su uso. La concentración de la proteína quimérica fue determinada a través del ensayo de ácido bicinconínico (*ThermoFisher Scientific, USA*), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### 5.2.5 Identificación de la proteína quimérica dializada por SDS-PAGE

La pureza de la proteína quimérica purificada y libre de urea fue evaluada por SDS-PAGE al 12%. Las muestras fueron tratadas con amortiguador de lisis (SDS 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, glicerol 20%, 0.2M Tris-HCl, pH 6.8, azul de bromofenol 0.05%) en proporción 1:1. Luego, las muestras fueron incubadas a 90°C por 10 minutos y cargadas a los geles de poliacrilamida. Las condiciones electroforéticas para el gel concentrador fueron de 60 volts constantes y para el gel de resolución 120 volts, en una solución SDS 1x (Glicina 1.91M, Tris-Base 0.25M, SDS 1%). Posterior a la separación electroforética, la proteína quimérica fue transferida a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, *Millipore, CO. Bedford, Mass*) con una solución de transferencia (Tris 0.25M, glicina 1.91M) a 60 volts por 60min a 4°C. La membrana de PVDF fue teñida con azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Boehringer Mannheim Corp. Indpls, IN USA) para visualizar a la proteína quimérica en el peso esperado, se utilizó un marcador estándar de proteínas de bajo peso molecular (Bio-Rad, catálogo 1610304).

### 5.2.6 Reconocimiento de la proteína quimérica por *Western blot*

La proteína quimérica fue identificada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-histidina (mAb anti-6XHis-HRP) y un anticuerpo policlonal (anti-rFhLAP-CL1) generado en conejos [94].

La membrana de PVDF conteniendo a la proteína quimérica previamente teñida con azul de *Coomassie*, se recortaron dos carriles: uno para el mAb anti-6XHis y otro para el suero policlonal anti-rFhLAP-CL1. La membrana de PVDF fue desteñida con solución desteñidora (50% metanol, 7% ácido acético, 43% agua destilada) y lavada tres veces con solución de lavado (PBS-Tween 20 al 0.05%, pH 7.4). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con solución de bloqueo (PBS-Tween 20 al 0.01%, BSA 3%) e incubadas 1h con agitación lenta a temperatura ambiente. Luego de tres lavados, se adicionó el anticuerpo mAb anti-6XHis-HRP (1:3000, H1029 Sigma-aldrich) o el Ab anti-rFhLAP-CL1 (1:8000) en

solución de incubación (PBST 0.05%, 1% BSA) e incubó con agitación lenta a 4°C por 12h. Al día siguiente, la membrana incubada con el Ab anti-rFhLAP-CL1 fue lavada tres ocasiones y se adicionó la proteína A-HRP (1:2000, *Sigma-aldrich*) e incubó 1 h en agitación lenta a temperatura ambiente. Tras la incubación, ambas tiras fueron lavadas cuatro veces y la reacción se reveló por oxidación activa de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, *ThermoFisher Scientific*).

**FASE II:** EVALUACIÓN INMUNOGENICA DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA rFhLAP-CL1 EN OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *F. hepatica*

### **5.3 Evaluación de la capacidad inmunoprotectora de la proteína quimérica contra *F. hepatica* en ovinos**

El experimento de inmunización de ovinos se realizó en el Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la FMVZ, UNAM. Los análisis parasitológicos se realizaron en el Laboratorio de parasitología, FMVZ, UNAM y los ensayos de ELISA para evaluar la respuesta inmune humoral contra la proteína quimérica (anti-rFhLAP-CL1) y contra antígenos de excreción-secreción (anti-FhES) de *F. hepatica* se llevaron a cabo en el Laboratorio de Inmunología del IIB-UNAM.

#### **5.3.1 Animales de experimentación**

Veinticinco ovinos machos, cruce Katahdin x East Friesian, de 6 a 8 meses de edad fueron utilizados para los ensayos de inmunización. Los animales permanecieron en corrales con piso de cemento en el CEPIPSA-UNAM. Previo al inicio del experimento, todos los borregos fueron sondeados para la infección por *F. hepatica*, a través de la identificación de huevos en heces por la técnica de sedimentación y detección de IgG anti-productos de excreción- secreción de *F. hepatica* adulta por ELISA indirecta, con resultados negativos en ambos casos. Los animales se alimentaron con heno y alimento comercial, con acceso a agua *ad libitum* durante todo el curso del experimento. Este experimento fue aprobado

por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la FMVZ, UNAM, con número de protocolo DC-2017/1-20.

### **5.3.2 Formulación de la vacuna con adyuvante Quil A**

El adyuvante Quil A (Accurate Chemical & Scientific Corp, USA) se disolvió a una concentración de 1mg/ml (w:v) en PBS estéril a pH 7.0, luego se filtró a través de un filtro de 0.22µm[97]. La proteína quimérica rFhLAP-CL1 se emulsionó con un volumen igual del adyuvante Quil A e incubó a 4°C en agitación por 14h, esta preparación se realizó con un día de anticipación.

### **5.3.3 Obtención de la fase infectante de *F. hepatica***

Las metacercarias de *F. hepatica* usadas para el desafío de ovinos fueron obtenidas de caracoles *Lymnaea cubensis* infectados experimentalmente con miracidios de *F. hepatica* de origen bovino. Tras la obtención de metacercarias, se contaron y almacenaron a 4°C. La viabilidad de las metacercarias fue confirmado previo a su encapsulamiento (200 metacercarias/cápsula) y utilizadas con dos meses desde su obtención. Una cápsula de gelatina fue administrada *per os* a cada animal utilizando una pinza esofágica.

### **5.3.4 Vacunación e infección experimental**

Los 25 ovinos se pesaron y agruparon en cinco grupos (n=5). Los grupos 1, 2 y 3, se inmunizaron con 100µg, 200µg y 400µg de la proteína quimérica emulsionada con el adyuvante Quil A, respectivamente. Los grupos 4 y 5, fungieron como control del adyuvante (Quil A) y control de la infección (no inmunizado), respectivamente. Los animales se inmunizaron por vía subcutánea en la tabla del cuello, aplicando dos dosis a intervalo de dos semanas (semana 0 y 2). Transcurrido dos semanas post-segunda inmunización (semana 4), todos los ovinos fueron infectados con 200 metacercarias de *F. hepatica* por vía oral. El periodo total del experimento fue de 24 semanas.

### **5.3.5 Reducción de la carga parasitaria en ovinos vacunados con la proteína quimérica**

Al final del experimento todos los ovinos fueron sacrificados humanitariamente (semana 24), el hígado y la vesícula biliar de cada ovino fueron colectados para su disección. Los conductos principales del hígado y la vesícula biliar se abrieron con cuidado utilizando tijeras romas y los trematodos hallados se extrajeron con pinzas romas y se contaron. Posteriormente, el hígado se cortó en pequeños trozos (1cm<sup>2</sup>) y se estrujó, con el fin de detectar la presencia de parásitos inmaduros o dañados, de éstos solo se consideró el extremo anterior con la ventosa. El porcentaje de protección en animales inmunizados fue calculado de acuerdo a Maggioli y col. (2011), con la fórmula:  $[(U - V)/U] \times 100$ . Donde “U” es el promedio de la carga parasitaria del control positivo a la infección y “V” es el promedio de la carga parasitaria del grupo inmunizado[69].

### **5.3.6 Conteo de huevos de *F. hepatica* en muestras fecales**

El desarrollo de la infección por *F. hepatica* en ovinos fue monitoreado a través de la observación y conteo de huevos del parásito adulto usando tres gramos de materia fecal en cada animal, en seis tiempos diferentes. Las muestras se colectaron directamente del recto de cada animal usando bolsas de plástico, mismas que fueron etiquetadas y transportadas con refrigerante al laboratorio para su procesamiento, a través de la técnica de sedimentación [60]. El conteo de huevos de *F. hepatica* fue expresado como huevos por gramo de heces (hpgh)  $\pm$  desviación estándar. El porcentaje de reducción de huevos de *F. hepatica* por grupo fue calculado con la misma fórmula utilizada en la carga parasitaria, mencionada anteriormente.

### **5.3.7 Evaluación de la viabilidad de huevos de *F. hepatica***

Se evaluó la viabilidad de huevos de *F. hepatica* colectadas en muestras fecales y de la vesícula biliar. Para la obtención de huevos de *F. hepatica* de la vesícula biliar, ésta se separó del hígado de cada ovino, se abrió con un punzo

cortante y la bilis se decantó en un vaso de precipitado de 1L con agua de la llave. Después de 60 minutos, el sobrenadante fue decantado y el material sedimentado conteniendo los huevos de *F. hepatica* fue nuevamente lavado por cinco veces más.

Los huevos de *F. hepatica* provenientes de muestras fecales y de vesícula biliar, se colocaron en placas de 24 pozos con fondo plano, por triplicado e incubaron a 27°C por 15 días en completa oscuridad para permitir su embrionación[98]. Después de la incubación, los huevos fueron estimulados para su eclosión con luz artificial (100W) y visualizados con un microscopio estereoscópico. La viabilidad de huevos de *F. hepatica* fue evaluada al estimar el porcentaje de huevos que contenían un miracidio bien desarrollado con una mancha ocular característica. La viabilidad de huevos en cada grupo se expresó en porcentaje [73].

### **5.3.8 Obtención de antígenos de excreción-secreción de *F. hepatica* (FhES)**

Los antígenos solubles de excreción-secreción de *F. hepatica* fueron obtenidos del parásito adulto, para ser utilizados en inmunoensayos para la detección de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-FhES. Para ello, los parásitos adultos se extrajeron de hígados de bovinos colectados en el rastro Municipal de Toluca, Estado de México, México. Los antígenos de FhES se obtuvieron siguiendo el método descrito por Dalton y col. (1996)[73]. Brevemente, los parásitos adultos se lavaron seis veces con PBS 1x, pH 7.2, luego se mantuvieron con medio RPMI 1640 suplementado con ampicilina (100UI/ml), estreptomina (100µg/ml) y un inhibidor de proteasas (Roche Diagnostics GmbH, Germany) e incubaron a 37°C por 12h. Al día siguiente, se colectó y centrifugó el medio a 14,000rpm por 30 minutos a 4°C, el sobrenadante conteniendo los antígenos FhES se concentraron utilizando una columna Amicon® Ultra-15 con punto de corte de 10kDa (Millipore, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración proteica de FhES se determinó por ensayo de BCA

(ThermoFisher Scientific, USA) y fueron visualizadas por electroforesis SDS-PAGE. Finalmente, los antígenos FhES fueron puestos en alicuotas y almacenados a -20°C hasta su uso.

### **5.3.9 Respuesta inmune humoral inducida por la vacunación en ovinos**

Los títulos de IgG, IgG1 e IgG2 anti-FhES y anti-rFhLAP-CL1 (IgG1 e IgG2) fue determinado en sueros de ovinos de experimentación a través de ELISA indirecta.

Se utilizaron microplacas de 96 pozos con fondo plano (Nunc-Immuno MaxiSorp, USA) que se sensibilizaron con 2µg/ml de FhES or 1µg/ml de rFhLAP-CL1 en 100µl de amortiguador de carbonatos, pH 9.6 e incubaron a 4°C toda la noche en agitación lenta. Luego de cuatro lavados con PBS, pH 7.4, Tween 20 0.05% (PBST), los sitios de unión restantes se bloquearon con 200µl de solución de bloqueo (PBST, BSA 3%) e incubaron por 60 minutos a 37°C. Tras cuatro lavados con PBST, se adicionaron los sueros 1:400 en 100 µl de amortiguador de dilución (PBST, BSA 1%) e incubaron por 60 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como se describe anteriormente y los anticuerpos secundarios fueron adicionados: IgG total-HRP anti-ovino, generado en conejo (Ab6747, Abcam, 1:5000), IgG1-HRP anti-cabra/borrego, generado en ratón (A9452, Sigma, 1: 30,000), IgG2-biotinilado anti-humano generado en ratón (B3773, Sigma, 1: 10,000, este reacciona con IgG2 de ovino), los anticuerpos se incubaron por 60 minutos a temperatura ambiente en amortiguador de dilución. Un paso adicional se realizó para IgG2-biotina, se incubó con estreptavidina-HPR por 60 minutos a TA. Transcurrido el tiempo, las placas fueron lavadas y la reacción fue desarrollada con O-phenylenediamine (OPD) en amortiguador de citratos, la reacción se incubó por 30 minutos en oscuridad a TA. Finalmente, la reacción se detuvo al adicionar 50µl/pozo de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2M). La absorbancia fue medida a 492nm usando un lector de ELISA (Multiskan 60, Thermo Scientific) y los resultados se expresaron como densidad óptica (OD) ± error estándar.

#### 5.4 Análisis estadístico

Las medias aritméticas y desviación estándar fueron calculadas para la carga parasitaria, conteo de huevos fecales, viabilidad de huevos y los valores de la densidad óptica de IgG, IgG1 e IgG2 contra FhES y rFhLAP-CL1. El porcentaje de protección fue calculado de acuerdo a Maggioli y col. (2011)[69]. Los datos fueron analizados para normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene's test). Las diferencias entre grupos en el número de parásitos recuperados, conteo de huevos y valores de absorbancia fueron probados con Kruskal-Wallis. La correlación entre peso vivo, viabilidad de huevos de *F. hepatica*, títulos de IgG, IgG1 e IgG2 con carga parasitaria, se calculó con la prueba de correlación no paramétrica de Spearman. Todas las pruebas se realizaron con el software IBM SPSS Statistics 21 para Windows. Los gráficos fueron generados con el programa graphpad Prism v7. Una  $p < 0.05$  fue considerada significativa.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Secuenciación de nucleótidos del plásmido quimérico

El análisis de la secuencia de nucleótidos del plásmido quimérico se realizó con el objetivo de confirmar que el plásmido quimérico a estudiar fuera el mismo utilizado por Hernández y col. (2016)[94], considerando que anteriormente solo se había reportado la secuencia de aminoácidos. Para ello, se purificaron diez clonas del plásmido recombinante pET15b-LAPCL1 a través de columnas QIAprep Miniprep, éstos fueron cuantificados por espectrofotometría de luz UV (**Anexo I, Tabla 4**) y visualizados en un gel de agarosa al 1% (**Anexo I, figura 1.1**). Los plásmidos fueron secuenciados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Las diez clonas secuenciadas utilizando oligos que flanquean la secuencia quimérica clonada (LAPCL1) en el vector de expresión pET15b, mostraron una homología del 100% entre ellas, indicando que provienen de una sola clona. La construcción *in silico* de la secuencia quimérica se realizó con las mismas secuencias de LAP y CL1 del GenBank utilizadas por Hernández y col. (2016). La secuencia quimérica construida *in silico* contiene 681pb, 270pb de LAP y 411 pb de CL1.

#### >Gen quimérico LAP-CL1 (681pb) construido In silico

```
GATCCGGAA CGAATGGCTGCACCCAGAATTGTGGACTATCTGAAAACCTTCACTCGGTGGTATGAAGGGAA
TTACCATGAGTGTGGAAAAGGTGGACATTCAGAAATACCCCTCTGATGGCTGCGGTGAATCGTGCGGCATC
CGTTGTGCGCACGCCATGACGGACGCGTGGTTCATCTCAAGTACGAGCCGCCCAATCCAACCGAGGTGGA
TACGACTCTTTACTTGATTGGAAAAGGTATCACTTATGACACCGGTGGAGCAGACATCAAGGGATTGGAAA
CCGAGTCTTCTTATCCCTACAGGGCTGTGGAAGGACAGTGTGATAACAACGAGCAGTTGGGAGTTGCCAA
AGTGACTGGCTACTATACTGTGCATTCTGGCAGTGAGGTAGAATTGAAAAATCTAGTCGGTTCCGAAGGA
CCTGCCGCGATTGCTGTGGAGGCCGAATCTGACTTCATGATGTACAGGAGTGGTATTTATCAGAGCCAAA
CTTGTTTACCGTTGCTTTGAATCATGCAGTCTTGGCTGTGCGTTATGGAACACAGGATGGTACTGACTAT
TGGATTGTGAAAAATAGTTGGGGATTGTCGTGGGGTGAGCGCGTTACATTCGAATGGCTAGGAATCGAG
GTAACATGTGTGGAATTGCTTCGCTGGCCAGTCTCCCGATGGTGGCAGCA-----
```

>Gen quimérico LAP-CL1 experimental subclonado en pET15b (clona B, 847 pb)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATG**GAT**  
**CCGGAACGA**ATGGCTGCACCCAGAATTGTGGACTATCTGAGAACTTCACTCGGTGGTATGAAGGGAA  
TTACCATGAGTGTGGAAAAGGTGGACATTCAGAAATACCCTCTGATGGCTGCGGTGAATTGTGCGGC  
ATCCGTTGTGCGACGCCATGACGGACGCGTGGTTCATCTCAAGTACGAGCCGCCAATCCAACCGAG  
GTGGATACGACTCTTTACTTGATTGGAAAAGGTATCACTTATGACACCGGTGGAGCAGACATCAAGGG  
ATTGAAAACCGAGTCTTCTTATCCGTACACGGCTGTGGAAGGTCAAGTGTGATAAATGAGCAGTTAG  
GAGTTGCCAAAGTGACTGGCTACTACACTGTGCATTCTGGCAGTGAGGTAGAATTGAAAAATCTAGTC  
GGTGCCGAAGGACCTGCCGCGGTGCTGTGGATGTGGAATCTGACTTCATGATGTACAGGAGTGGT  
ATTTATCAGAGCCAAACTTGTTACCGCTTAGTGTGAATCATGCAGTCTGGCTGTCGGTTACGGAAC  
ACAGGATGGTACTGACTATTGGATTGTGAAAAATAGTTGGGGATCGTACTGGGGTGAGCGCGGTTAC  
ATTCCAATGGCTAGGAATCGAGGTAACATGTGTGGAATTGCTTCGCTGAAGCTTCTCCCG**ATGGTGG**  
**CACGA**TAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCA  
ATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGA-----

El alineamiento a nivel de nucleótidos de la secuencia quimérica predicha (*in silico*) con la experimental no fue reportado previamente. El alineamiento de nucleótidos de ambas secuencias realizado en este estudio mostró una homología del 96% (**Anexo I, figura 1.2**). La traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos de la quimera predicha y la experimental fueron traducidos con *EMBOSS Transeq* (**Anexo I, Figura 1.3**). El alineamiento a nivel de aminoácidos de la secuencia predicha y la experimental, mostró una homología del 93% (**Figura 5**). Tras el análisis las regiones seleccionadas de LAP y CL1 en forma separada, se determinó que LAP se conserva en 98% a nivel de aminoácidos (192-281aa) (**Anexo I, Figura 1.4**) y CL1 se conservó en un 91% (**Anexo I, Figura 1.5**). El peso molecular de la proteína quimérica inferido era de 27.07kDa, el peso molecular de la proteína experimental fue de ~31 kDa, considerando la etiqueta de histidinas y sitio de trombina. El punto isoeléctrico predicho de la proteína quimérica fue de 6.12 (**Anexo I, Figura 1.6**).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Predicha_1      DPERMAAPRIVDYLRKTSLGGMKGITMSVEKVDIQKYPDMAAVNRAASVVARHDGRVVHLK      60
Experimental_1 DPERMAAPRIVDYLRKTSLGGMKGITMSVEKVDIQKYPDMAAVNCAASVVARHDGRVVHLK      60
*****

Predicha_1      YEPPNPTEVDTTLYLIGKGITYDTGGADIKGLETESSYPYRAVEGQCRYNEQLGVAKVTG      120
Experimental_1 YEPPNPTEVDTTLYLIGKGITYDTGGADIKGLETESSYPYRAVEGQCRYNEQLGVAKVTG      120
*****

Predicha_1      YYTVHSGSEVELKKNLVGSEGPAAIAVEAESDFMRYRSGIYQSQTCLPFALNHAVLAVGYG      180
Experimental_1 YYTVHSGSEVELKKNLVGAEGPAAVAVDVESDFMRYRSGIYQSQTCSPLSVNHAVLAVGYG      180
*****

Predicha_1      TQDGDYWIVKNSWGLSWGGERGYIRMARNRGNMCGIASLASLPMVAR      227
Experimental_1 TQDGDYWIVKNSWGSYWGGERGYIRMARNRGNMCGIASLKLPMVAR      227
*****

```

**Figura 5. Alineamiento a nivel de aminoácidos de la secuencia química predicha con la experimental obtenida.**

## 6.2 Transformación de *E. coli* Rosetta con el plásmido quimérico

El plásmido recombinante pET15b-LAP-CL1 fue utilizado para transformar bacterias *E. coli rosseta* competentes por calcio[96]. Las colonias transformadas, se estriaron en placas LB agar con el antibiótico de selección (carbenicilina 100µg/ml). Adicionalmente, se prepararon dos placas LB agar, una para bacterias *E. coli rosetta* no transformadas con el plásmido quimérico, sin antibiótico (control positivo) y la segunda con antibiótico (control negativo). Como resultado, se observó crecimiento de colonias bacterianas en la placa LB agar en presencia del antibiótico de selección, este crecimiento sugiere la transformación de la bacteria con el plásmido de interés (**Figura 6a**). Además, se demostró la viabilidad de las células bacterianas, al crecer en placas LB agar sin antibiótico (**Figura 6b, control positivo**) y un control negativo (**Figura 6c, control negativo**), donde las bacterias no fueron transformadas con ningún plásmido, pero fueron crecidas en placas LB con antibiótico demostrando así, que el plásmido quimérico confiere la resistencia al antibiótico.



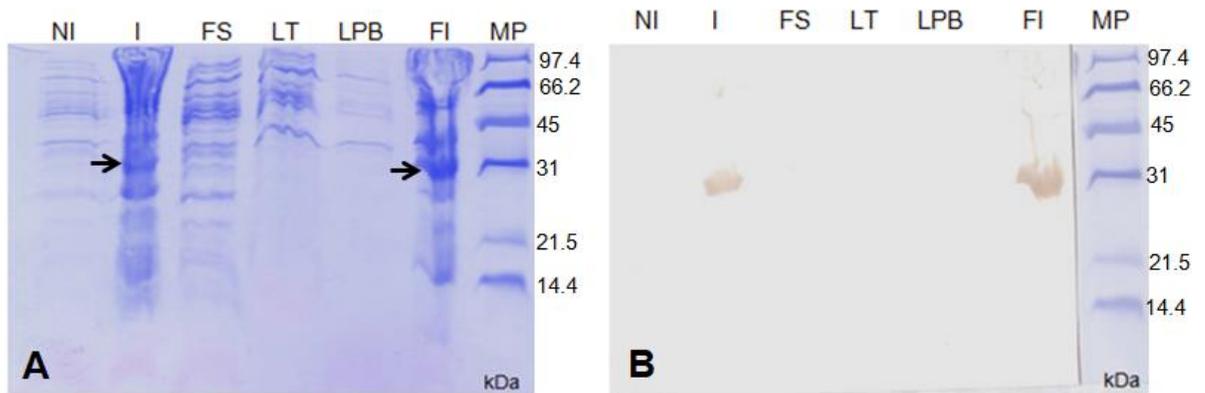
### Figura 6. Transformación de *E. coli rosetta* con el vector recombinante

(a) Bacterias transformadas con el plásmido quimérico fueron sembradas en placas LB agar con carbenicilina 100µg/ml, (b) bacterias no transformadas sin antibiótico (control positivo), y (c) bacterias no transformadas con antibiótico (control negativo).

### 6.3 Expresión de la proteína quimérica e identificación por *western blot*

Luego de la transformación de *E. coli rosetta* con el plásmido quimérico, la expresión de la proteína acoplada a una etiqueta de histidinas (His-tag) en el extremo N-terminal fue inducida con IPTG (0.25mM) a 37°C, el vector de expresión se basa en el promotor T7.

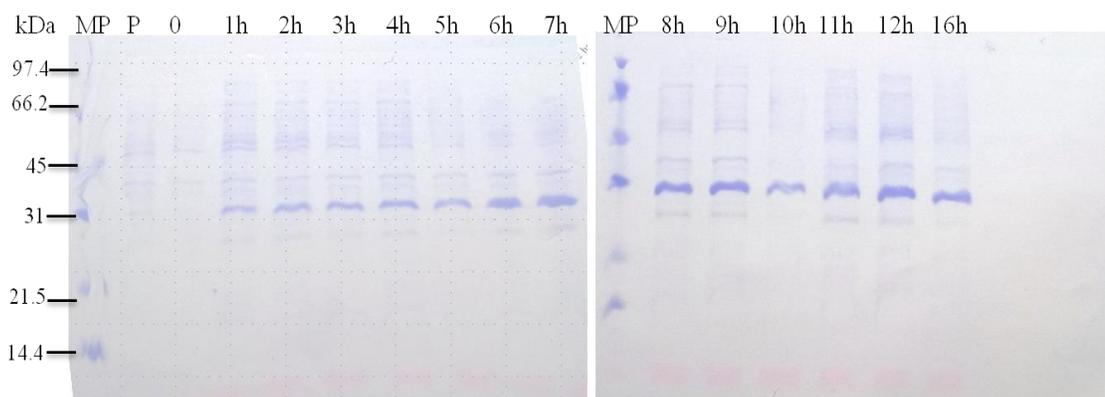
Un ensayo de expresión a pequeña escala se realizó para determinar si la proteína quimérica se expresaba en forma soluble o insoluble, punto clave para su posterior purificación. Por análisis SDS-PAGE, se determinó que la proteína quimérica se expresa tras su inducción con IPTG (**Figura 7A, carril I**) y se encuentra en la fracción insoluble (**Figura 7A, carril FI**), como agregados en cuerpos de inclusión (CI). Por otra parte, en la fracción soluble no se detectó la proteína quimérica (**Figura 7A, carril FS**), ni en los lavados con Tritón X-100 o con PBS (**Fig. 7A, carril LT/LPB**). La proteína quimérica tuvo un peso molecular de ~31 kDa, el cual correlaciona con el peso predicho a partir de la secuencia de nucleótidos experimental. Por ensayo de *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal anti-histidinas, se identificó a la proteína quimérica en la fracción inducida (**Fig. 7B, carril I**) e insoluble (**Figura 7B, carril FI**), pero no en la fracción soluble (**Figura 7B, carril FS**) y lavados con PBS (**Figura 7B, carril L1/ L2**).



**Figura 7. Expresión e identificación de la proteína quimérica en cultivo *E. coli* Rosetta.**

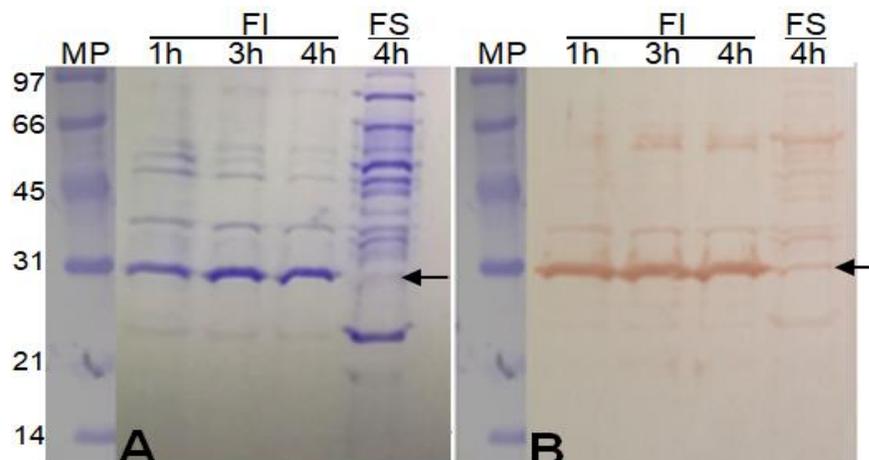
(A) Identificación de la proteína rFhLAP-CL1 por SDS-PAGE al 12%. (B) *Western blot* con un anticuerpo anti-histidina. La proteína quimérica se expresó con IPTG 0.25mM (I) en forma de cuerpos de inclusión (FI) de ~31 kDa. En la fracción soluble (FS) y lavados con tritón x-100 y PBS (LT, LPB) no se visualizó la proteína de interés.

Para determinar la dinámica de expresión de la proteína quimérica se realizó una cinética de expresión de la proteína de interés. Por análisis de SDS-PAGE se determinó que la proteína se expresa desde la primera hora de la inducción con IPTG hasta las 16h (**Figura 8**), de ese tiempo en adelante hasta las 24h la expresión proteica declina. En el precultivo (P) y al momento de su inducción (0h) no se detectó la proteína quimérica. Posteriormente, se tomaron tres puntos de la expresión de la proteína quimérica (1h, 3h y 4h) de la fracción insoluble y un punto de la fracción soluble (4h), para ser identificada por SDS-PAGE y *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal anti-histidina (**Figura 9**). Con este ensayo se confirmó que la proteína quimérica se encuentra en la fracción insoluble en forma de cuerpos de inclusión y en pequeñas cantidades en forma soluble (FS, 4h).



**Figura 8. Expresión temporal de la proteína quimérica de la fracción insoluble en *E. coli Rossetta* analizada por SDS-PAGE.**

La proteína quimérica se detectó a partir de la primera hora (1h) post-inducción con IPTG (0.25mM) hasta las 16h con una banda de ~31kDa. La proteína quimérica no se detectó en el precultivo (P), ni al momento de la inducción (0).



**Figura 9. Identificación de la proteína quimérica en la fracción soluble e insoluble por SDS-PAGE y *Western blot*.**

(A) Análisis de la expresión de la proteína quimérica por SDS-PAGE al 12%. (B) Identificación de la proteína quimérica a través de *Western blot* utilizando el anticuerpo policlonal anti-rFhLAP-CL1. La proteína quimérica se detecta en la fracción insoluble a la 1h, 3h y 4h post-inducción de la expresión con IPTG y en la fracción soluble se detectan trazas de la proteína quimérica.

#### **6.4 Purificación de la proteína quimérica por cromatografía de afinidad a níquel.**

La expresión de la proteína quimérica se realizó a mayor escala (1.2 L de cultivo), tras su identificación en la fracción insoluble, la pastilla bacteriana fue

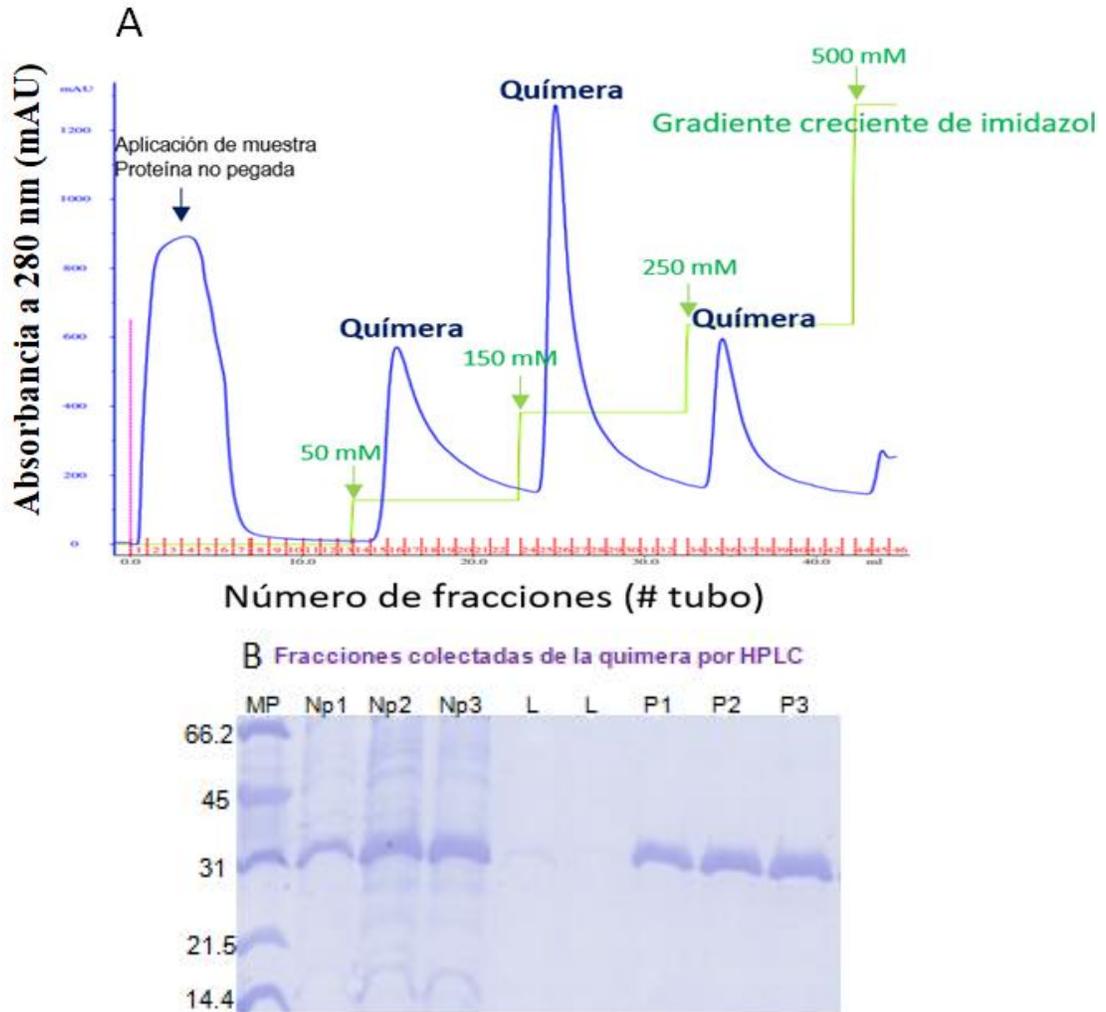
colectada a las 4 horas post-inducción con IPTG. Debido a que la proteína se encuentra dentro de los cuerpos de inclusión, éstos se solubilizaron con urea 8M y se purificó por cromatografía de afinidad *Ni-NTA* utilizando columnas HisTrap<sup>HP</sup> (Healthcare Life Sciences, Germany). El equipo de cromatografía arrojó un cromatograma; las fracciones colectadas durante el proceso de purificación de la proteína quimérica se indican en números rojos (Eje X), las proteínas son absorbidas a 280nm, señaladas por una línea azul. Las fracciones 1-7 corresponden a la fracción no pegada que incluyen proteínas bacterianas junto con la proteína quimérica. Para la elución de la proteína quimérica se utilizó un gradiente escalonado de imidazol a 0.5M (línea verde), la proteína quimérica se eluyó a las concentraciones de 50mM, 150mM y 250mM de imidazol, observado en tres picos (línea azul) (**Figura 10A**).

Las fracciones colectadas durante el proceso de purificación de la proteína quimérica fueron analizadas por SDS-PAGE al 12%, transferidas a una membrana de PVDF y teñida con azul de Coomassie (**Figura 10B**). Las fracciones no pegadas (Np1-Np3) contienen a la proteína de interés con restos bacterianos. En los lavados de la columna (L) con amortiguador de lavado, se observó trazas de la proteína quimérica. La proteína quimérica se detectó en los tres picos de elución (P1-P3), con un peso molecular de ~31 kDa y libre de contaminantes bacterianos.

### **6.5 Renaturalización de la proteína quimérica e identificación por *Western blot***

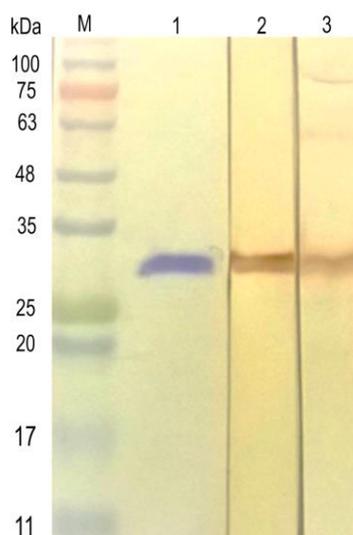
Para remover el agente desnaturante (urea 8M) y replegar a la proteína quimérica, se realizó el proceso diálisis. Para ello, se realizó un *pool* con las fracciones de los tres picos de la proteína quimérica eluida observada en el cromatógrama y corroborado por SDS-PAGE. La diálisis se realizó contra una solución de fosfatos y a concentraciones decrecientes de urea de 6M, 4M, 2M, 1M, 0.5M y 0M de urea, sin imidazol. Tras la diálisis, la proteína quimérica purificada y renaturalizada, se detectó con el peso molecular esperado (~31 kDa) por SDS-PAGE al 12%. Además, la proteína de interés fue reconocida en ensayos de

Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-histidinas y un anticuerpo policlonal anti-rFhLAP-CL1 generado en conejo (**Figura 11**).



**Figura 10. Purificación de la proteína quimérica a través de cromatografía de afinidad a Ni-NTA**

**(A)** Perfil cromatográfico: la absorción máxima de las proteínas es de 280nm; la fracción no pegada corresponde a las fracciones 1-7 (números rojos) y contiene tanto proteínas bacterianas como a la proteína quimérica (línea azul). Las fracciones 8-14 (números rojos) corresponden al lavado de la columna. Para la elución de la proteína quimérica se realizó un gradiente escalonado de imidazol (0.5M) al 10%, 30%, 50% y 100% de imidazol (línea verde). La proteína quimérica se eluyó a 50mM (pico 1), 150mM (pico 2) y 250mM (pico 3). **(B)** Análisis de las fracciones colectadas durante la purificación de la proteína quimérica por SDS-PAGE al 12%. La proteína quimérica se detectó en las fracciones no pegadas (Np1, Np2 y Np3) junto con contaminantes, la proteína quimérica eluida con imidazol se obtiene libre de contaminantes en los tres picos de elución (p1-p3), en los lavados, se detectan trazas de la proteína quimérica (L).



**Figura 11. Identificación de la proteína quimérica por *Western blot* usando anticuerpo: monoclonal y policlonal.**

Identificación de la proteína quimérica por SDS-PAGE al 12% (carril 1) con peso molecular de ~31 kDa. Identificación de la proteína quimérica por un anticuerpo monoclonal anti-histidina-HRP (carril 2) y un anticuerpo policlonal anti-rFhLAP-CL1 (carril 3) generado en conejos.

### **EVALUACIÓN INMUNOGENÉTICA DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA rFhLAP-CL1 EN OVINOS CONTRA *F. hepática*.**

#### **6.6 Reducción de la carga parasitaria en ovinos vacunados con la proteína quimérica**

Tres grupos de ovinos inmunizados en dos ocasiones con 100µg (G1), 200µg (G2) y 400µg (G3) de la proteína quimérica, un grupo control de adyuvante (G4) y un grupo control de la infección (G5), se infectaron con metacercarias de *F. hepática*. Al final del experimento (semana 24), todos los animales fueron sacrificados, siguiendo los lineamientos establecidos por SICUAE de la UNAM (Protocolo número DC-2017/1-20). Los hígados junto con la vesícula biliar de cada ovino, se extrajeron para recuperar y contar los trematodos de *F. hepática*. El conteo de parásitos por grupo se expresó como media aritmética ± desviación estándar (**Tabla 3**) y el porcentaje de protección se calculó de acuerdo a Maggioli y col. (2011)[69].

El número de parásitos recuperados en el grupo control de la infección (G5) mostró la carga parasitaria más alta que los grupos vacunados con la proteína quimérica. El porcentaje de protección se calculó en relación al grupo G5. Los tres grupos vacunados con la proteína quimérica tuvieron un rango de protección entre 25.58% a 46.51%. El porcentaje más alto de protección se observó en ovinos vacunados con 400 µg de la proteína quimérica rFhLAP-CL1, con una reducción del 46.51% ( $p < 0.01$ ). Animales vacunados con 100µg y 200µg de rFhLAP-CL1, tuvieron 25.58% ( $p > 0.05$ ) y 30.74% ( $p < 0.05$ ) de protección, respectivamente. El grupo control de adyuvante (Quil A), tuvo un 9.81% de reducción en parásitos ( $p > 0.05$ ). El nivel de protección general en ovinos vacunados con la proteína quimérica fue de 34.27%.

Cuando calculamos el porcentaje de protección en relación al grupo control de adyuvante (G4), los niveles de protección en ovinos vacunados con 100 µg, 200 µg y 400 µg de la proteína quimérica fue del 17.47% ( $p > 0.05$ ), 23.20% ( $p > 0.05$ ) y 40.68% ( $p < 0.01$ ), respectivamente.

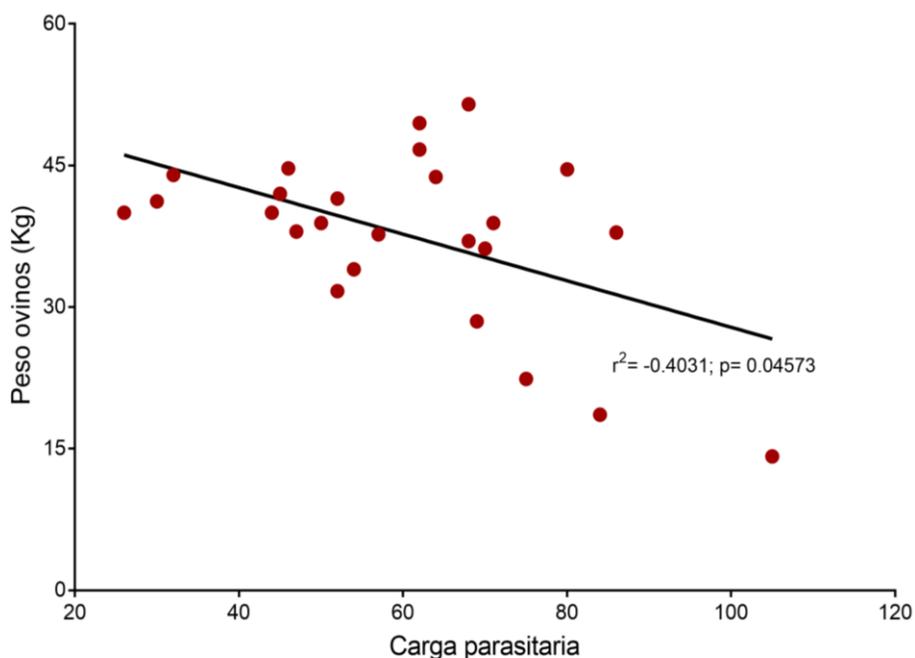
La tasa de implantación de parásitos en los grupos controles G4 y G5 fue del 34.9% y 38.7%, respectivamente, de un inoculo original de 200 metacercarias de *F. hepatica*. Las tasas de implantación para los grupos G1, G2 y G3 fueron del 28.8% ( $p > 0.05$ ), 26.8% ( $p < 0.05$ ) y 20.7% ( $p < 0.05$ ), respectivamente, porcentajes más bajos comparados con los grupos control de la infección (G5).

Al realizar un análisis de correlación entre el peso de los ovinos al final del experimento con la carga parasitaria, se encontró una correlación negativa significativa ( $r = -0.4031$ ;  $p = 0.045$ ), es decir, ovinos que tuvieron menor número de parásitos contados durante la necropsia su peso vivo fue mayor comparado con ovinos que tenían un mayor número de parásitos donde el peso vivo fue más bajo (**Figura 12**).

**Tabla 3. Carga parasitaria de ovinos vacunados con la proteína quimérica y grupos controles, infectados con metacercarias de *F. hepatica*.**

Grupos (Antígeno/Adyuvante)	Número de parasites recuperados		(%)	(%)
	Datos individuales	Mean ± D.E	Protección	Implantación
100µg rFhLAP-CL1+QS	50, 69, 26, 75, 68	57.60 ± 19.98	25.58	28.8
200µg rFhLAP-CL1+QS	52, 45, 70, 44, 57	53.60 ± 10.59	30.74*	26.8
400µg rFhLAP-CL1+QS	46, 52,, 30, 47, 32	41.40 ± 9.78	46.51**	20.7
Adyuvante <i>Quil A</i>	68, 84, 64, 71, 62	69.80 ± 8.67	9.81	34.9
Control de infección	54, 86, 105, 62, 80	77.40 ± 20.16	-	38.7

Desviación estándar (D.E), Adyuvante Quil A (*Quillaja saponaria*)-QS



**Figura 12. Análisis de correlación de Spearman entre carga parasitaria y peso vivo de ovinos de experimentación**

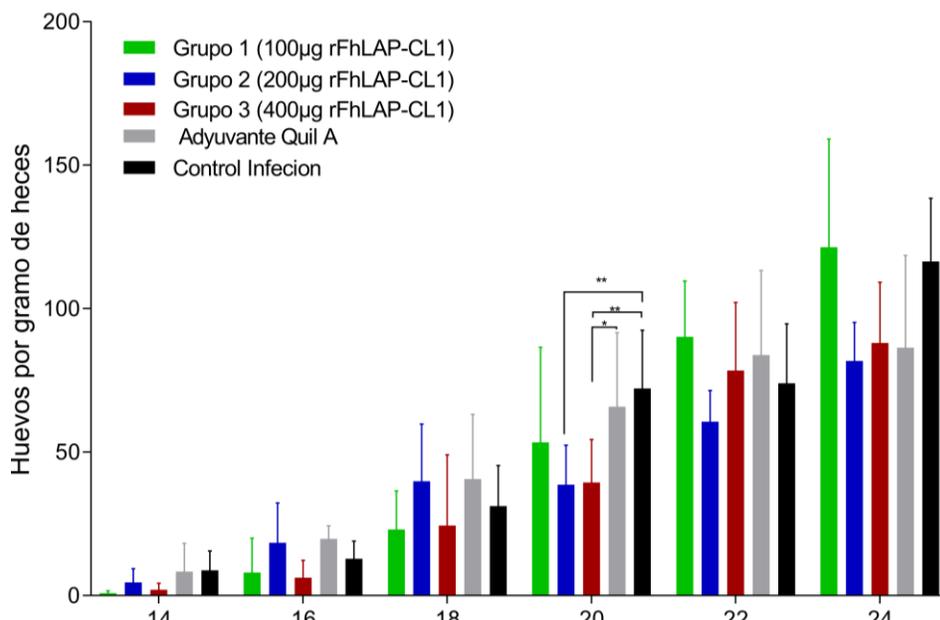
Hay una correlación negativa significativa entre carga parasitaria y peso de ovinos ( $r^2 = -0.4031$ ;  $p = 0.04573$ ).

## 6.7 Reducción de huevos de *F. hepatica* en ovinos de experimentación

Los huevos de *F. hepatica* aparecieron en la semana 10 post-infección (semana 14 post-primera inmunización) e incrementaron gradualmente al final del experimento (semana 24), el conteo de huevos por gramo de heces (hpgh) se representan como media aritmética  $\pm$  desviación estándar y la reducción en la producción de huevos del parásito entre grupos vacunados y controles se expresa en porcentaje. La dinámica de eliminación de huevos en los grupos inmunizados y controles se muestra en la **Figura 13**.

El promedio total de hpgh en animales vacunados fue más bajo comparado con los grupos control de adyuvante e infección. En los grupos controles (G4, G5), el promedio de hpgh fue de  $304.7 \pm 43.5$  y  $315.4 \pm 56$ , respectivamente. Los grupos inmunizados con 100 $\mu$ g, 200 $\mu$ g y 400 $\mu$ g of rFhLAP-CL1, tuvieron  $296.8 \pm 27.3$ ,  $243.8 \pm 45.2$  y  $238.4 \pm 22.9$ , respectivamente. Hubo una reducción en la producción de huevos del 22.7% ( $p < 0.05$ ) y 24.4% ( $p < 0.01$ ) en ovinos vacunados con 200 $\mu$ g y 400 $\mu$ g of rFhLAP-CL1, respectivamente, comparado con el control de la infección (G5). No hubo diferencia estadística de hpgh en ovinos inmunizados con 100 $\mu$ g de rFhLAP-CL1 comparado con el grupo control de la infección, probablemente debido a la variabilidad encontrada.

En la semana 20, el conteo de hpgh liberados en animales inmunizados con 200  $\mu$ g ( $p < 0.01$ ) y 400  $\mu$ g ( $p < 0.01$ ) de rFhLAP-CL1 fue significativamente más baja que en el grupo control de la infección (G5). Además, el grupo 3 mostró una reducción significativa de FEC ( $p < 0.05$ ) cuando se comparó con el control de adyuvante.



**Figura 13. Dinámica del conteo de huevos de *F. hepatica* en heces de ovinos vacunados y controles desafiados con metacercarias.**

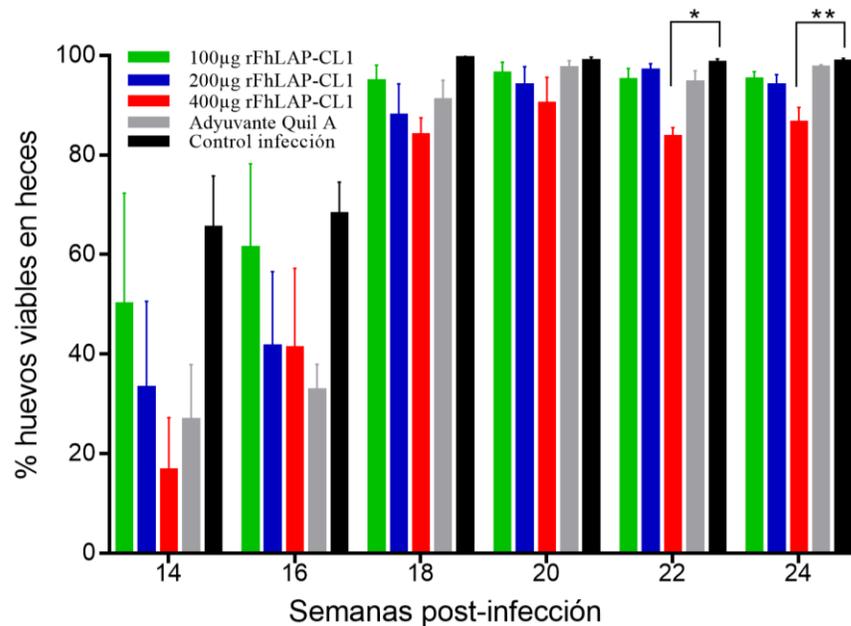
Los huevos de *F. hepatica* se detectaron a las 10 semanas post-infección (semana 14 del experimento). Ovinos fueron inmunizados con 100µg, 200µg y 400µg de rFhLAP-CL1. Los datos son representados como media aritmética  $\pm$  desviación estándar de cinco animales por grupo. Al considerar los seis puntos analizados (semana 14-24) y comparar el conteo de huevos fecales en ovinos inmunizados comparados con el grupo control de la infección (G5), los grupos 2 y 3 tuvieron una reducción en la eliminación de huevos del 22.7% ( $p < 0.05$ ) y 24.4% ( $p < 0.01$ ), respectivamente. En la semana 20 post-inmunización hubo diferencia significativa en la eliminación de huevos en los grupos G2 ( $p < 0.01$ ) y G3 ( $p < 0.01$ ), comparado con el grupo control de infección, además, el grupo G3 mostró diferencia significativa en el conteo de huevos en heces ( $p < 0.05$ ) comparado con el grupo control de adyuvante.

### 6.8 Reducción de la viabilidad de huevos de *F. hepatica* de ovinos en experimentación

Los huevos de *F. hepatica* obtenidos a partir de muestras fecales y de la vesícula biliar, fueron incubados a 27°C por 15 días en oscuridad, con el objetivo de determinar el porcentaje de viabilidad.

La viabilidad de huevos de *F. hepatica* de muestras fecales fueron analizados en diferentes puntos del experimento (**Figura 14**). El porcentaje general de la viabilidad de huevos de *F. hepatica* en los grupos G4 (control

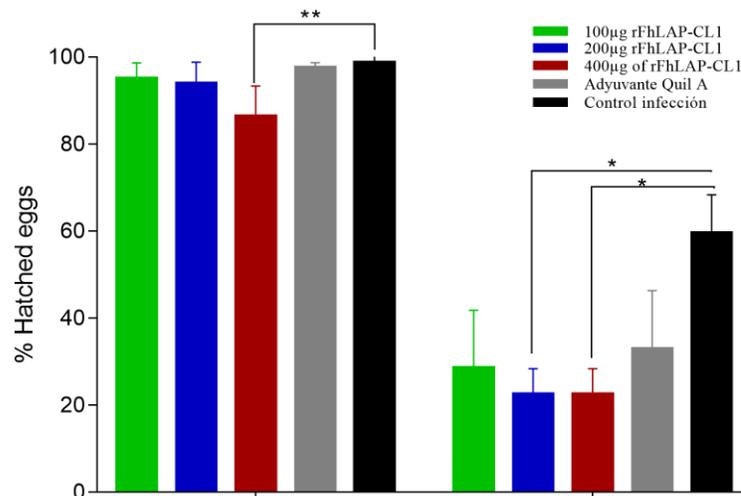
adyuvante) y G5 (control de infección) fue del 73% y 88%, respectivamente. Los porcentajes de viabilidad de huevos de *F. hepatica* fecales en ovinos inmunizados con 100µg, 200µg y 400µg de rFhLAP-CL1 fueron del 82%, 75% y 67%, respectivamente. En las semanas 14 y 16 post-infección, hubo una reducción en la viabilidad de huevos del parásito, pero no fue significativa en ovinos inmunizados comparado con los grupos control (G4 y G5). En ovinos inmunizados con 400µg de rFhLAP-CL1, hubo diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad de huevos de *F. hepatica* entre las semanas 22 ( $p<0.05$ ) y 24 ( $p<0.01$ ) post-inmunización, respecto al grupo control de la infección.



**Figura 14. Viabilidad de huevos de *F. hepatica* en heces de ovinos inmunizados y controles.**

La viabilidad de huevos se evaluó a partir de la semana 10 post-infección (semana 14 del experimento). Diferencias significativas fueron observadas en la semana 22 ( $p<0.05$ ) y 24 ( $p<0.01$ ), entre ovinos inmunizados con 400µg de rFhLAP-CL1 y el grupo control de la infección (G5). Los datos son representados como media aritmética  $\pm$  error estándar. Diferencia significativa es denotada por \* ( $p<0.05$ ) y \*\* ( $p<0.01$ ).

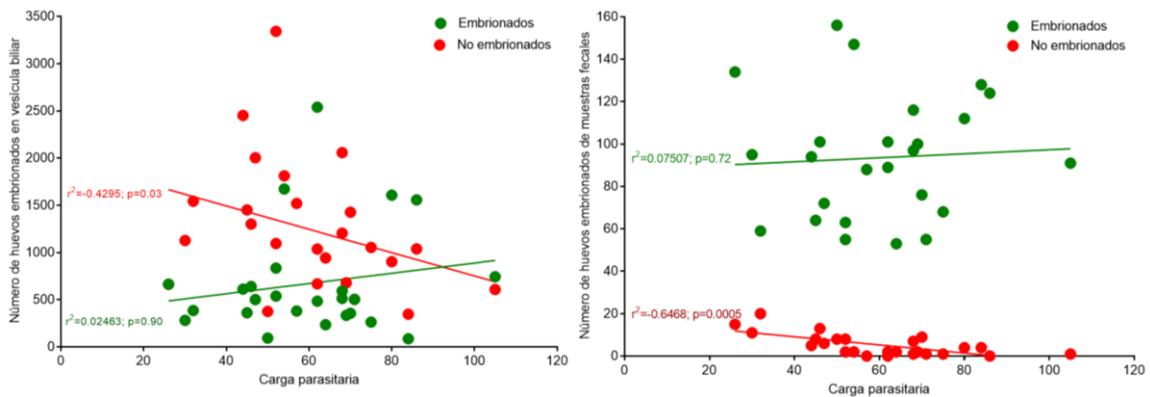
La viabilidad de huevos de *F. hepatica* provenientes de la vesícula biliar fueron analizados al final del experimento y se comparó la viabilidad de huevos colectados de las muestras fecales de la semana 24 (**Figura 15**). El porcentaje promedio de viabilidad de los huevos de *F. hepatica* colectados de la vesícula biliar en los grupos control de adyuvante y control de infección fueron del 33% y 59.6%, respectivamente. Los ovinos inmunizados con 100µg, 200µg y 400µg de rFhLAP-CL1, el porcentaje de viabilidad de huevos del parásito fue de 28.6%, 22 y 22.6%, respectivamente. Diferencias significativas en la viabilidad de huevos del parásito fueron observadas en ovinos inmunizados con 200µg y 400µg de rFhLAP-CL1 comparadas con el grupo control (p<0.05). Al comparar la viabilidad de huevos del parásito colectados de muestras fecales con las obtenidas de la vesícula biliar (semana 24), el porcentaje más alto de viabilidad de huevos de *F. hepatica* fue en las muestras fecales. El grupo inmunizado con 400µg de rFhLAP-CL1 mostró diferencia significativa con el grupo control de la infección en la viabilidad de huevos del parásito provenientes de muestras fecales (p<0.01) y de la vesícula biliar (p<0.05).



**Figura 15. Viabilidad de huevos de *F. hepatica* colectado de vesícula biliar de ovinos vacunados y controles al final del experimento.**

Diferencias significativas en la viabilidad de huevos de *F. hepatica* fueron observadas en muestras fecales (p<0.01) y de vesícula biliar (p<0.05) del grupo G3 comparada con el grupo control de la infección (G5). Diferencia significativa (p<0.05) del grupo G2 comparada con el grupo G5 fue observado solo en muestras de vesícula biliar. Los datos son representados como media aritmética ± desviación estándar. Diferencia significativa es denotada por \* (p<0.05) y \*\* (p<0.01).

Por análisis de correlación de *Spearman* no paramétrica, se detectó una correlación negativa significativa entre los huevos no embrionados provenientes de la vesícula biliar ( $r^2=0.4295$ ,  $p=0.0321$ ) y de las muestras fecales ( $r^2=-0.6468$ ,  $p=0.0005$ ) con la carga parasitaria (**Figura 16**). Por el contrario, no hubo correlación significativa entre huevos embrionados de vesícula biliar ( $r^2=0.0246$ ,  $p=0.90$ ) y huevos embrionados de muestras fecales ( $r^2=0.0750$ ,  $p=0.72$ ) con carga parasitaria.



**Figura 16. Correlación de la viabilidad de huevos de *F. hepatica* de muestras fecales y de vesícula biliar con la carga parasitaria.**

Se encontró una correlación negativa entre huevos no embrionados de la vesícula biliar ( $r^2=0.4295$ ,  $p=0.03$ ) y huevos no embrionados en heces ( $r^2=-0.6468$ ,  $p=0.0005$ ) con la carga parasitaria.

### 6.9 Títulos de IgG1 e IgG2 anti-FhLAP-CL1 en sueros de ovinos de experimentación

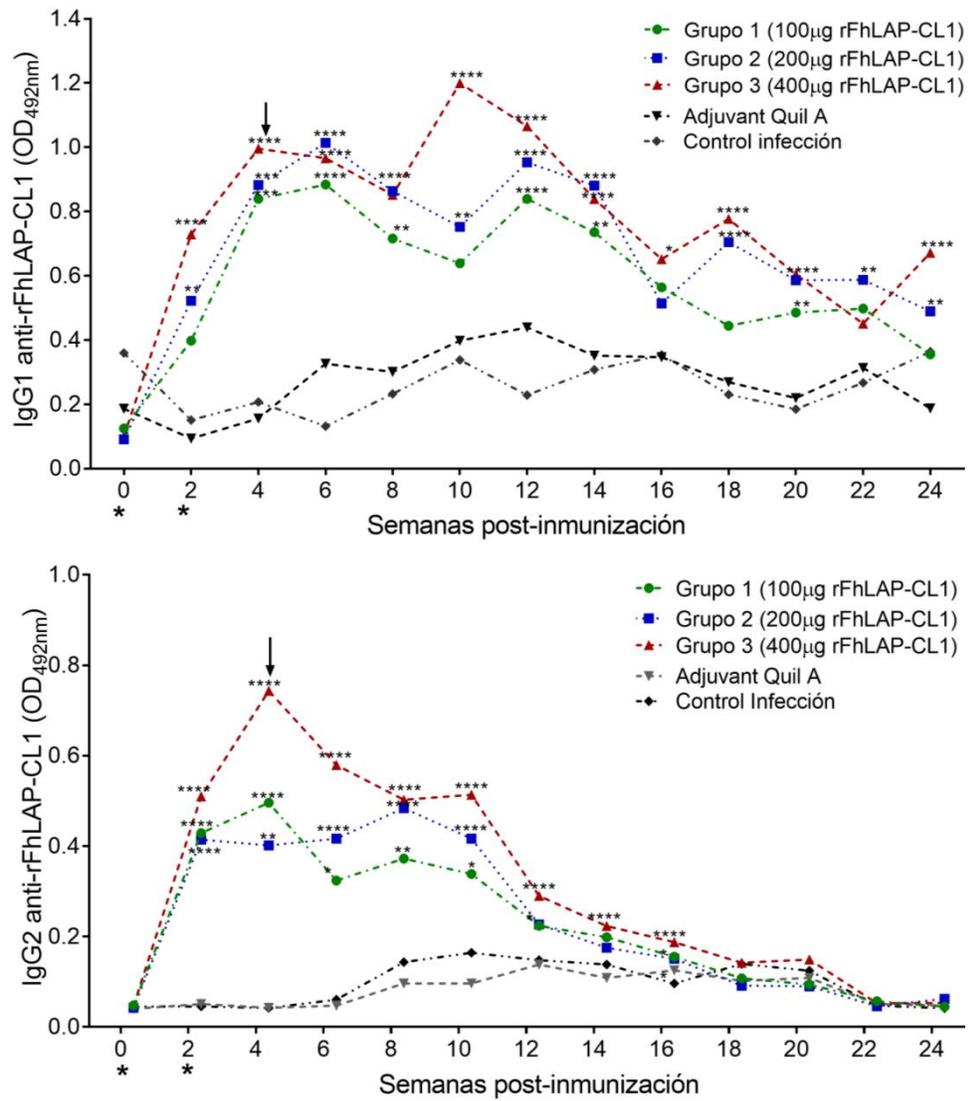
Los títulos de IgG1 e IgG2 reactivos a la proteína quimérica rFhLAP-CL1 fueron analizados por ELISA indirecta y los resultados se muestran en la figura 17.

Los títulos de IgG1 anti-rFhLAP-CL1 se produjeron en todos los ovinos vacunados después de la primera inmunización con incremento de anticuerpos luego de la segunda inmunización (**Figura 17a**). Los niveles máximos de IgG1 en los ovinos inmunizados se observó a las 2 semanas post-desafío (excepto en el grupo 3, el pico se observó en la semana 10) y luego disminuyeron gradualmente hasta el final del experimento (semana 24). De los grupos vacunados, el grupo 3

mostró los títulos de IgG1 más altos comparados con los grupos 1 y 2. Los niveles de IgG1 fueron significativamente más altos en los grupos inmunizados comparado con los grupos control, durante todo el experimento. Un ligero incremento de IgG1 en los grupos controles (G4 y G5) fue observado tras el desafío, con aumento no significativo durante toda la fase experimental.

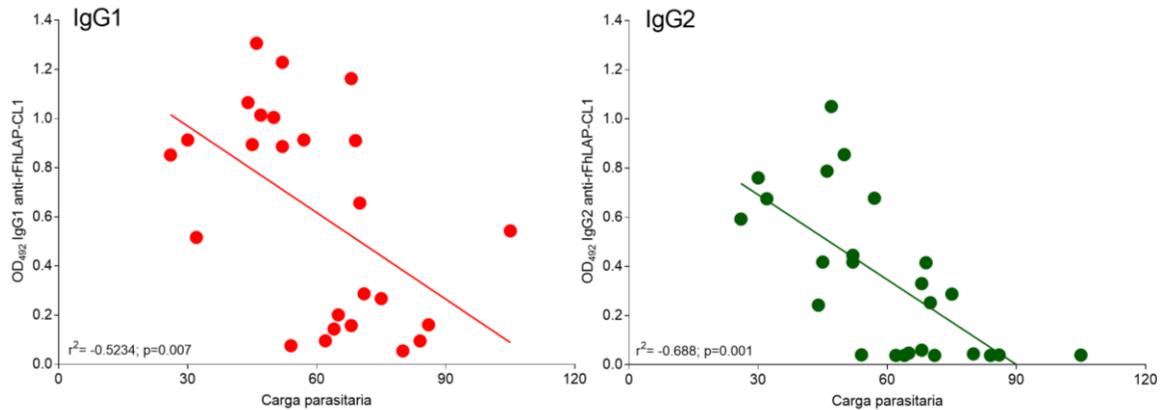
En los ovinos inmunizados, los niveles de IgG2 anti-rFhLAP-CL1 incrementaron con la primera y segunda dosis del inmunógeno (**Figura 17b**). El grupo 3, mostró los títulos de IgG2 más altos al momento del desafío (semana 4). Luego de la infección, los grupos inmunizados tuvieron los títulos de IgG2 anti-rFhLAP-CL1 más altos que en los grupos controles en las semanas 6, 8 y 10. Un ligero incremento en los niveles de IgG2 en grupos control fue detectado tras el desafío (semana 8), sin incremento significativo en todo el experimento.

Utilizando la prueba de correlación de *Spearman* no-paramétrica, se encontró una correlación significativa entre títulos de IgG1 ( $r^2=-0.523$ ,  $p=0.007$ ) e IgG2 ( $r^2=-0.688$ ,  $p=0.001$ ) anti-rFhLAP-CL1 con la carga parasitaria, cuando se incluyeron todos los animales, pero no hubo correlación cuando el análisis se realizaba por grupos (**Figura 18**).



**Figura 17. Títulos de anticuerpos IgG1 e IgG2 anti-rFhLAP-CL1 de sueros de ovinos vacunados y controles.**

Los animales se inmunizaron dos ocasiones en la semana 0 y 2 (asterisco) con 100 µg (G1), 200 µg (G2) and 400µg (G3) de la proteína quimérica emulsionadas con adyuvante Quil A y desafiados con 200 metacercarias vía oral (flecha negra). Los títulos de anticuerpos IgG1 (a) e IgG2 (b) anti-rFhLAP-CL1 son expresados como la media aritmética de la densidad óptica de suero de ovinos por grupo, por triplicado (1:400). \*= $p < .05$ ; \*\*= $p < .01$ ; \*\*\*= $p < .001$ .



**Figura 18. Correlación entre títulos de IgG1 e IgG2 anti-rFhLAP-CL1 con la carga parasitaria.**

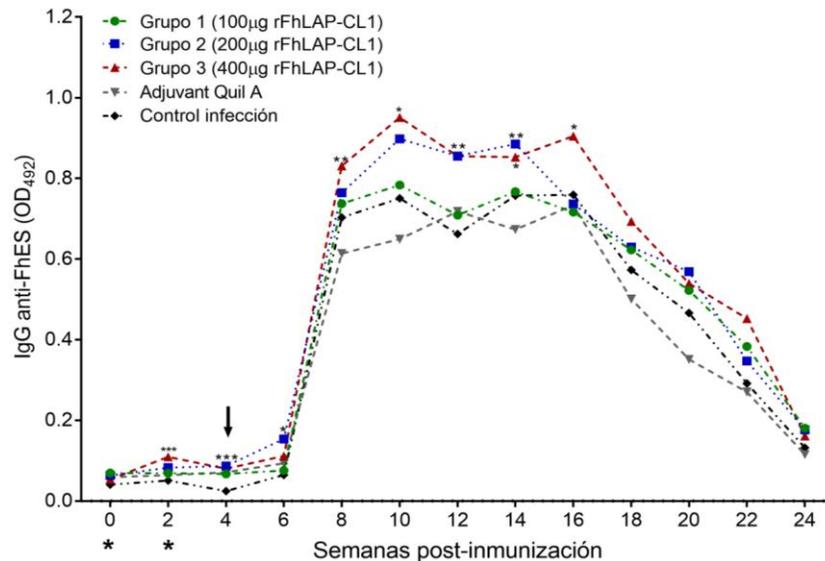
Hubo una correlación negativa significativa entre títulos IgG1 ( $r^2=-0.523$ ,  $p=0.007$ ) e IgG2 ( $r^2=-0.688$ ,  $p=0.001$ ) con la carga parasitaria.

### **6.10 Títulos de IgG, IgG1 e IgG2 anti-FhES en sueros de ovinos de experimentación**

Los sueros colectados de todos los ovinos en diferentes tiempos del periodo experimental fueron analizados por ELISA indirecta para determinar los niveles de IgG e isotipos reactivos a los antígenos nativos (FhES) del parásito.

Una ligera, pero significativa respuesta de IgG se produjo en los grupos vacunados con 200µg (grupo 2) and 400 µg (grupo 3) de la proteína quimérica a las dos semanas post-primera inmunización (**Figura 19**). Además, un incremento en niveles de IgG en los grupos vacunados fue observado dos semanas después del desafío (semana 6), con un pico a la semana 10 después de la primera inmunización y permaneció elevado hasta la semana 16, después de esto, los niveles de anticuerpos disminuyeron gradualmente hasta el final del experimento (semana 24). Los títulos de IgG hacia antígenos de FhES fue más alto en los sueros de ovinos inmunizados con 200µg y 400 µg de la proteína quimérica que en ovinos vacunados con 100µg de la proteína o en los grupos controles. Los niveles de IgG contra los productos FhES en sueros de los grupos control se encontraban a niveles basales antes del desafío, después de esto, un incremento

en los títulos de anticuerpos se observó a las 2 semanas post-desafío, con un pico entre la semana 8 a 16, después de esto disminuyó gradualmente. La absorbancia contra FhES fue más baja en los grupos controles comparado con los ovinos inmunizados.

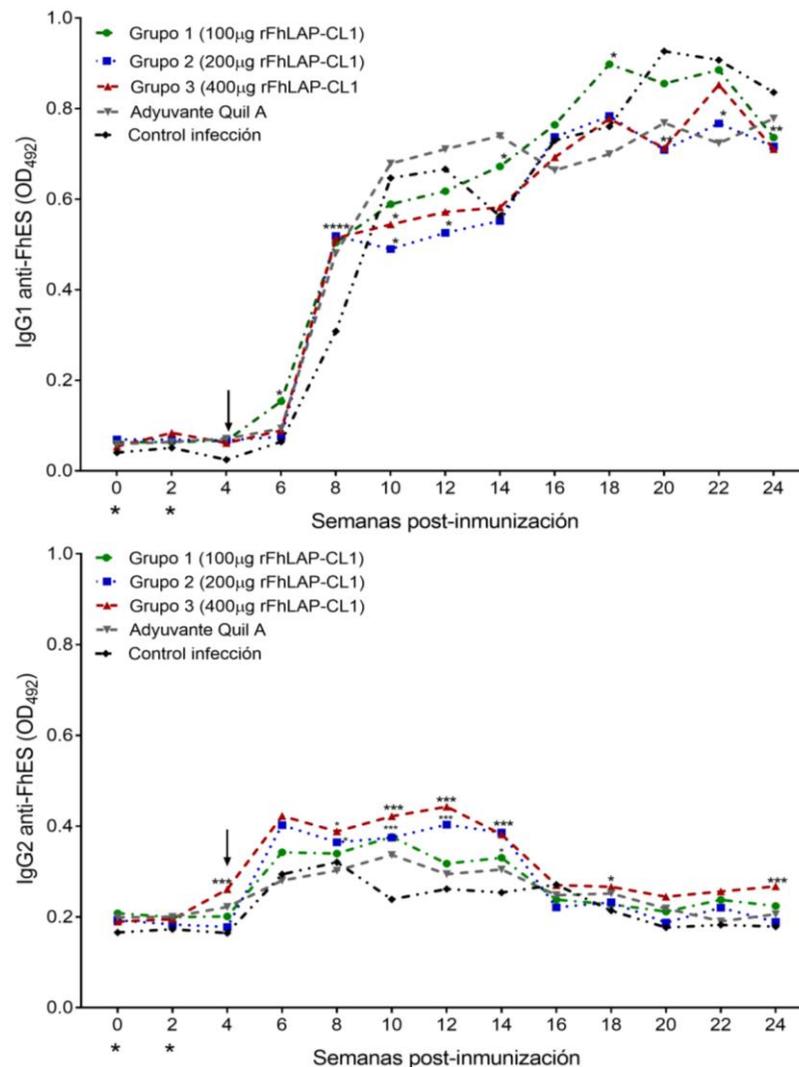


**Figura 19. Títulos de IgG anti-FhES en suero de ovinos vacunados y controles.**

Los animales se inmunizaron dos ocasiones en la semana 0 y 2 (\*) con 100µg (G1), 200µg (G2) and 400µg (G3) de la proteína quimérica emulsionadas con adyuvante Quil A, un grupo control de Adyuvante (G4) y el grupo control de infección (G5) sin inmunizar. Todos los animales fueron desafiados con 200 metacercarias vía oral (flecha negra). Los títulos de anticuerpos de IgG anti-FhES son expresados como la media aritmética de la densidad óptica de los sueros de ovinos por grupo, el ensayo se realizó por triplicado empleando una dilución 1:400. \*= $p < .05$ ; \*\*= $p < .01$ ; \*\*\*= $p < .001$ .

Los niveles de IgG1 e IgG2 anti-FhES fueron basales previo al desafío en todos los ovinos de experimentación (**Figura 20**). Posteriormente, un incremento en los títulos de IgG1 fue notado de la semana 6 hasta el final del experimento (semana 24). Sin embargo, no hubo diferencias significativas considerables entre ovinos inmunizados con la proteína quimérica y los grupos control (excepto en la semana 8 post-inmunización). Por otra parte, los títulos de IgG2 anti-FhES fueron más elevados en ovinos inmunizados con la proteína quimérica que en ovinos de los grupos control entre las semanas 6 a 14 post-inmunización. Los ovinos

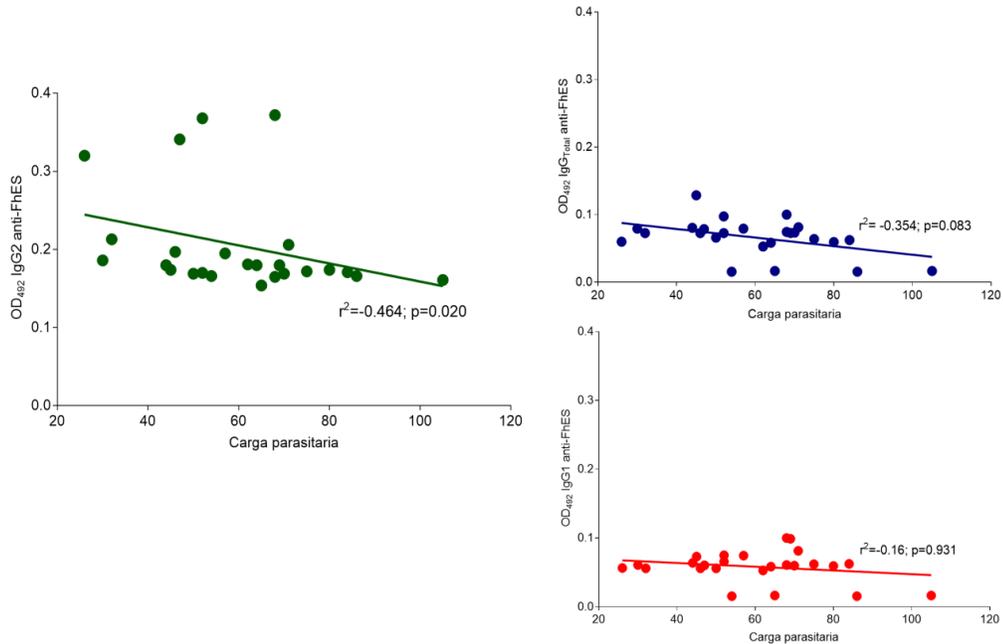
inmunizados con 200µg y 400µg de la proteína quimérica mostraron los títulos de IgG2 anti-FhES más altos comparados con los grupos control de la infección y control de adyuvante entre las semanas 6 a 14 post-inmunización. En ovinos de los grupos control, los niveles de IgG2 anti-FhES incrementaron después del desafío, aunque fueron más bajos comparados con los ovinos inmunizados.



**Figura 20. Títulos de IgG1 e IgG2 anti-FhES en suero de ovinos vacunados y controles.**

Los animales se inmunizaron dos ocasiones en la semana 0 y 2 (asterisco) con 100 µg (G1), 200 µg (G2) and 400µg (G3) de la proteína quimérica emulsionadas con adyuvante Quil A y desafiados con 200 metacercarias vía oral (flecha negra). Los títulos de anticuerpos son expresados como la media aritmética de la densidad óptica de los sueros de ovinos por grupo, el ensayo se realizó por triplicado empleando una dilución 1:400. \*= $p < .05$ ; \*\*= $p < .01$ ; \*\*\*= $p < .001$ .

Una correlación significativa se observó entre títulos de IgG2 ( $r^2 = -0.464$ ;  $p = 0.020$ ) con la carga parasitaria, cuando se incluyeron todos los animales (**Figura 21**). Sin embargo, no se encontró correlación cuando el análisis se realizó por grupo. No hubo correlación significativa entre los niveles de IgG total ( $r^2 = -0.354$ ,  $p = 0.083$ ) e IgG1 ( $r^2 = -0.16$ ,  $p = 0.931$ ) con carga parasitaria.



**Figura 21. Correlación de Spearman de títulos de IgG1 e IgG2 anti-FhES y carga parasitaria.**

Correlación significativa entre títulos de IgG2 anti-FhES ( $r^2 = -0.464$ ;  $p = 0.020$ ) con la carga parasitaria. No hubo correlación significativa entre títulos de IgG total e IgG1 anti-FhES con carga parasitaria ( $p > 0.05$ ).

## 7. DISCUSIÓN

El trematodo *F. hepatica*, es un patógeno económicamente importante para la industria ganadera (ovinos, bovinos y caprinos) en todo el mundo; en los animales infectados, los parámetros reproductivos y productivos se ven reducidos [12]. Además, es una zoonosis reemergente importante [99]. El control de la fasciolosis se basa principalmente en el uso de antihelmínticos, en particular, el triclabendazol (TCBZ), ya que afecta las etapas juveniles y adultas del parásito. Sin embargo, poblaciones de *F. hepatica* resistentes al TCBZ han sido reportadas en varias partes del mundo, por lo que nuevas estrategias de control son necesarios [4].

El desarrollo de una vacuna contra la infección por *F. hepatica* es una alternativa económica viable, ya que son seguras, no dejan residuos químicos en los alimentos y son amigables con el medio ambiente. Además, son bien aceptados tanto por productores y consumidores de alimentos de origen animal [45]. Sin embargo, debido a la complejidad del ciclo de vida del parásito y a la composición de un repertorio de antígenos (somáticos y de excreción-secreción) expresados en cada fase evolutiva, el desarrollo de una vacuna comercial eficaz ha sido difícil. No obstante, se han realizado avances importantes en la identificación de moléculas esenciales de *F. hepatica* que juegan roles importantes en la interacción huésped-parásito, como blancos potenciales para el desarrollo de una vacuna. Éstas moléculas se han utilizado de forma nativa, purificadas directamente del parásito o en su forma recombinante expresadas en sistemas procariotas o eucariotas. Entre ellas, se encuentra la Glutación S-Transferasa (GST) [100], proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) [101], Saposin-2 (FhSAP-2) [102], Leucina Aminopeptidasa (FhLAP) [69] y Catepsina L (FhCL) [73], entre otras. Al evaluar a estas proteínas como inmunógenos contra *F. hepatica*, el nivel de protección inducidas en las diferentes especies animales ha sido variable.

Las proteasas FhLAP y FhCL1 han sido propuestas como candidatos potenciales a la primera vacuna comercial contra fasciolosis en animales, por inducir altos niveles de protección en rumiantes. FhLAP se ha relacionado con procesos de digestión [66], al utilizarla como inmunógeno en ovinos, los niveles de protección superaron el 80% [68,69]. Por otra parte, FhCL1 es el mayor componente encontrado en los productos de excreción-secreción del parásito adulto y está involucrado en la virulencia, adquisición de nutrientes y evasión del sistema inmune del huésped [103]. La inmunización de bovinos con la proteína rFhCL1 recombinante, tras la infección con metacercarias de *F. hepatica*, indujo una reducción del 48.2% de la carga parasitaria [44]. En caprinos vacunados con rFhCL1, la reducción en la carga parasitaria fue del 38% [81] y, en ovinos inmunizados con el mismo antígeno, no indujo protección significativa [104]. Los diferentes niveles de protección pueden ser resultados de múltiples factores, incluyendo la especie huésped vacunada, método de obtención del antígeno, tipo de adyuvante, entre otros.

Para el desarrollo de vacunas contra *F. hepatica*, se han empleado varias estrategias, entre ellas, la producción de proteínas recombinantes, aunque el nivel de inmunogenicidad inducida por éstas ha sido más baja comparada con las proteínas nativas del parásito [101]. Para aumentar el nivel de protección contra la infección, se han evaluado diferentes formulaciones con dos o más proteínas recombinantes, logrando aumentar los niveles de protección [105].

Otra estrategia poco empleada para la vacunación contra parásitos, es el desarrollo y uso de proteínas quiméricas. A través de la tecnología del ADN recombinante es posible obtener proteínas quiméricas que se forman por la combinación de fragmentos de dos o más genes en un gen de fusión para expresar una proteína con diferente conformación. En los últimos años, el uso de proteínas quiméricas en el campo de la parasitología se han utilizado para mejorar la sensibilidad y especificidad en pruebas de diagnóstico, por ejemplo en *Toxoplasma gondii* [90], así como posibles antígenos vacunales contra

*Schistosoma mansoni* [92], *Babesia bovis* [106], *Plasmodium vivax* [84], entre otros. En *F. hepatica*, el desarrollo y uso de proteínas quiméricas como inmunógenos, aún no ha sido explorado a nivel mundial.

Previamente nuestro grupo de investigación diseñó y construyó un gen quimérico a partir de secuencias antigénicas de FhLAP y FhCL1 seleccionadas por herramientas inmunoinformáticas, con el objetivo de ser empleada en ensayos de inmunoprotección en rumiantes. Para ello, se seleccionaron las regiones más antigénicas de ambas proteasas de *F. hepatica* y se obtuvo un gen de fusión (LAPCL1), mismo que fue subclonado en el vector de expresión pET15b[94]. En el presente estudio, con el fin de contar con la secuencia de nucleótidos del gen quimérico y confirmar la identidad del plásmido utilizado previamente, células *E. coli* DH5 $\alpha$  fueron transformadas con el plásmido recombinante para analizar diez clonas por secuenciación de ADN, los resultados mostraron un 100% de homología entre ellas. Además, para examinar la homología entre el gen quimérico predicho previamente con el experimental obtenido, a nivel de nucleótidos y aminoácidos, en este estudio se realizó una construcción *in silico* del gen quimérico de acuerdo a las referencias descritas previamente[94]. De los análisis de alineamientos, se concluye que el gen quimérico experimental se conserva con un 96% a nivel de nucleótidos y 93% a nivel de aminoácidos, esta baja variabilidad entre las regiones de los genes FhLAP y FhCL1 que conforman a la proteína quimérica refuerza la idea de que podría ser un buen inmunógeno contra el trematodo hepático a nivel mundial[107].

Debido a que la proteína quimérica se expresó en forma de cuerpos de inclusión y por los problemas de agregación temprana durante su purificación reportados previamente [108], en este estudio cambiamos las condiciones de expresión y purificación de la proteína quimérica. Para ello, *E. coli Rosseta* se transformaron con el plásmido recombinante pET15b-LAPCL1 y la inducción de la expresión de la proteína quimérica se realizó cuando el cultivo alcanzó una OD<sub>600</sub> de 0.5-0.6, además, se cambió el tiempo de cosecha de las bacterias de 16h[94] a

4h, al realizar una cinética de expresión proteica; asimismo, se cambió de amortiguador de sonicación para mejorar la estabilidad de la proteína quimérica y su purificación se realizó a través de columnas empacadas con histidinas, utilizando un sistema automatizado (AKTA-FPLC) bajo condiciones desnaturalizantes, con estos cambios se logró aumentar la solubilidad de la proteína quimérica y con ello, la agregación proteica durante el proceso de renaturalización se redujo de manera significativa, además, el rendimiento de la proteína quimérica fue mayor que con el protocolo previamente reportado.

Tras la purificación de la proteína quimérica, se propuso evaluar su potencial inmunogénico en ovinos, ya que son la especie más susceptibles a la infección por *F. hepatica*[6], además, son de importancia económica para la ganadería mundial. A diferencia de los animales de laboratorio (ratas, conejos, ratones) donde se obtienen altos niveles de protección (80-100%) al utilizar proteínas recombinantes de *F. hepatica*[105,109], en rumiantes los niveles de protección han sido bajos a nulos[104,110,111]. En este estudio, se utilizaron 20 ovinos para ensayos de inmunoprotección inducida por la proteína quimérica; para ello, la rFhLAP-CL1 se emulsionó con el adyuvante Quil A, una mezcla de saponinas triterpenoides extraídos de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* [112], que ha sido empleada en ensayos de vacunación contra *Taenia multiceps* [113], *Haemonchus contortus* [114], *Echinococcus granulosus* [115] y *Toxoplasma gondii* [116], entre otros. En el presente ensayo, los ovinos inmunizados con rFhLAP-CL1 + Quil A, se indujo una protección moderada tras ser infectados experimentalmente con metacercarias de *F. hepatic*; además, se logró una fuerte respuesta humoral en ovinos vacunados comparado con el grupo control de la infección. Se ha demostrado que el adyuvante Quil A tras ser inyectado por vía subcutánea en ovinos, induce títulos elevados de anticuerpos séricos: IgG1, IgG2, IgA e IgE hacia *F. hepatica*, sugiriendo que el adyuvante “*per se*” estimula una respuesta inmune pro-inflamatoria (Th1), además de reducir de forma significativa el conteo de huevos fecales [97,112].

La reducción en la carga parasitaria en animales inmunizados, es un parámetro clave para evaluar la eficacia de una vacuna tras el desafío con metacercarias de *F. hepatica* [117]. En el presente trabajo, la inmunización de ovinos con la proteína quimérica redujo la carga parasitaria en un rango de 25.58% a 46.51%. En ovinos inmunizados con 200µg y 400µg de rFhLAP-CL1, una reducción significativa del 30.74% ( $p<0.05$ ) y 46.51% ( $p<0.01$ ) de la carga parasitaria fue observada. Resultados similares de protección en rumiantes se han reportado al utilizar proteínas recombinantes. En cabras inmunizadas con rFhCL1+FhPrx (peroxirredoxina) y FhCL1 sola, ambas emulsionadas con Quil A, se obtuvo una reducción en la carga parasitaria del 33.3% y 38.7%, respectivamente [81]. Golden y Col. (2010), reportaron reducción significativa de la carga parasitaria del 48.2%, en bovinos vacunados con una mutante inactiva de Catepsina L1 (rmFhCL1) [44] y Garza-Cuartero y Col. (2018), obtuvieron un 37.6% de reducción de la carga parasitaria en bovinos inmunizados con el mismo antígeno [79]. Por otra parte, en el presente estudio los ovinos inmunizados con 100µg de rFhLAP-CL1, se obtuvo un 25.5% de reducción en la carga parasitaria, sin embargo, no fue significativo, probablemente por la variabilidad encontrada o por la baja concentración del antígeno utilizado; esta baja protección coincide con lo reportado por Pacheco y Col. (2017), al inmunizar ovinos con 100µg de FhCL1+ISA 70VG, no hubo reducción de la carga parasitaria en animales inmunizados comparado con el grupo control de adyuvante y control de la infección [104]. De forma similar, Perez-Caballero y Col. (2018), reportaron nula protección en ovinos inmunizados con la proteína rFh14-3-3z (100µg) emulsionado con Montanide™ ISA 71VG [9].

En ovinos infectados con metacercarias de *F. hepatica*, se ha reportado que las tasas de implantación del parásito en el hígado varía de un 30% a 50% [6]. En el presente ensayo de inmunización, las tasas promedio de implantación de *F. hepatica* en los grupos control de adyuvante y control de la infección fueron del 34.9% y 38.7%, respectivamente; porcentajes similares se han obtenido en

diferentes ensayos de vacunación usando proteínas recombinantes contra *F. hepatica* en ovinos que reportan tasas de implantación del trematodo para los grupos control desde un 32% hasta 51% [69,104,118]. En este estudio, los ovinos inmunizados usando tres concentraciones diferentes de la proteína quimérica, el rango promedio de implantación de *F. hepatica* fue del 20.7% a 28.8%; éstos porcentajes de implantación fueron ligeramente más altos comparados con ovinos inmunizados con las proteínas recombinantes rFhLAP[69], rFhCL1[104] y mimotopos de FhCL1[75,119]. El mecanismo de protección inducido por la proteína rFhLAP-CL1 es desconocido, pero podría estar relacionado con la producción de anticuerpos tras la inmunización que podrían estar bloqueando la actividad de ambas enzimas; como consecuencia, el mecanismo de evasión inmune y adquisición de nutrientes por el parásito podría ser inhibida, sin embargo, se requieren otros estudios para explicar esta hipótesis.

La reducción en la producción de huevos por *F. hepatica* en animales inmunizados con un antígeno vacunal, es otro parámetro importante a evaluar, ya que puede disminuir potencialmente la contaminación de pastos y con ello, la diseminación de la enfermedad, ésta reducción se mide a través del conteo de huevos eliminados en las heces y se expresa en porcentaje [117]. En ensayos de vacunación de ovinos con antígenos nativos de cisteín proteasas, FhCL1 y FhCL2, se han reportado una reducción en la producción de huevos desde 70% a 81% [68,72]. En el presente estudio, los ovinos inmunizados con 200µg (G2) y 400µg (G3) de rFhLAP-CL1 lograron una reducción significativa en la producción de huevos de *F. hepatica* del 22.7% ( $p < 0.05$ ) y 24.4% ( $p < 0.01$ ), respectivamente; aunque estos porcentajes de reducción en la producción de huevos fueron más bajos comparado con ensayos de vacunación en rumiantes utilizando antígenos nativos o recombinantes del parásito. En 2008, Villa-Mancera y Col. Inmunizaron ovinos con mimotopos de Catepsina L1/L2, posterior al desafío con metacercarias, la reducción en el conteo de huevos fecales fue del 25% a 45% [75]. Contrario a lo reportado por Hacariz y Col. (2009), que evaluaron el “efecto de adyuvante” de

Quil A en ovinos contra *F. hepatica*, como resultado los ovinos que fueron inyectados con el adyuvante mostraron una reducción significativa en la producción de huevos de *F. hepatica* comparado con el grupo control de la infección[97]. En el presente estudio, los ovinos inmunizados con 100µg de rFhLAP-CL1 y el grupo control de adyuvante (Quil A), no presentaron reducción en la producción de huevos; esta nula reducción en la producción de huevos de *F. hepatica* en el grupo 1 y grupo de Quil A, coincide con otros ensayos de vacunación en bovinos, caprinos y corderos utilizando a Glutathion S-transferasa, cistein proteasas y rFhCL1 como inmunógenos contra *F. hepatica*[111,118,120].

Una de las características poco evaluadas en los ensayos de vacunación contra *F. hepatica*, es el efecto anti-embrionación de huevos del parásito; la reducción de la embrionación de huevos del trematodo colectados de ovinos inmunizados podría reducir la contaminación de pastos y con ello, la transmisión de la enfermedad. En ensayos tempranos de vacunación en bovinos utilizando antígenos nativos del parásito (nFhCL1, nFhCL2, nFhHb), los porcentajes de viabilidad de huevos de *F. hepatica* colectados de la vesícula biliar de animales vacunados, fueron más bajos (35-57%) comparados con el grupo control (95%) [73,80]. En el presente ensayo de vacunación con la proteína quimérica en ovinos, se registró reducción en la viabilidad de huevos del parásito de un 22% a 28%, habiendo diferencias significativas respecto al grupo control de la infección que presentó 59.6% de viabilidad de huevos de *F. hepatica*. Maggioli y Col.(2011), reportaron una reducción significativa de la viabilidad de huevos de *F. hepatica* en ovinos inmunizados con rFhLAP que van de 9% a 54%[69]. El mecanismo de reducción de la viabilidad de huevos de *F. hepatica* en animales inmunizados es desconocido, posiblemente los anticuerpos generados por la vacunación interactúan directamente con FhCL1 y FhLAP en la glándula vitelina o glándula de *Mehlis* afectando directamente la producción de huevos; otra posible alternativa es que con la vacunación de la proteína quimérica en los ovinos, los anticuerpos generados contra dichas FhLAP y FhCL1 son neutralizadas, por lo que se afecta

la nutrición del parásito y con ello su desarrollo, esta hipótesis es soportado en los ensayos de vacunación de ovinos con mimotopos de Catepsina L1, al encontrar parásitos más pequeños en animales inmunizados comparados con el grupo control[75].

Aunque la viabilidad de huevos de *F. hepatica* colectados de la vesícula biliar ha sido evaluada en la mayoría de los ensayos de inmunización en rumiantes [69,73,110], determinar la viabilidad de huevos de *F. hepatica* en muestras fecales nos acerca más a la realidad. En este estudio, los huevos del parásito obtenidos de muestras fecales en diferentes tiempos de la infección, fueron analizados para determinar el porcentaje de su viabilidad; de manera interesante, los porcentajes de viabilidad de huevos de *F. hepatica* colectados de ovinos inmunizados con la proteína quimérica fueron del 67 a 82%, similar al grupo control de la infección (88%). Del resultado anterior, se sugiere que la proteína quimérica no tuvo un efecto anti-embrionación en los huevos del parásito, por lo que se propone evaluar la viabilidad de huevos provenientes de muestras fecales en ensayos de inmunización contra *F. hepatica*.

Previamente, Hernández y Col. (2016) evaluaron la antigenicidad de la proteína quimérica al utilizar sueros de bovinos infectados naturalmente por *F. hepatica* (positivos a huevos de *F. hepatica* por coprología); como resultado, todos los sueros de bovinos infectados reconocieron a la proteína quimérica pero no a sueros de bovinos que fueron negativos a huevos de *F. hepatica*[94]. En el presente ensayo de inmunización con la proteína quimérica en ovinos, se realizó un ensayo de ELISA utilizando como antígeno a los productos de FhES con el fin de determinar si los anticuerpos inducidos por la inmunización en los ovinos eran capaces de reconocer antígenos nativos del parásito; durante el pre-desafío, los ovinos inmunizados con 200µg(G2) y 400µg(G3) de rFhLAP-CL1 presentaron anticuerpos IgG anti-FhES significativamente más altos comparados con ovinos inmunizados con la menor concentración (100µg) o grupos controles. Además, la magnitud de los niveles de anticuerpos IgG anti-FhES en los grupos G2 y G3,

fueron más altos entre la semana 8 a 16, que en los grupos G1 o grupos control, sugiriendo que los niveles de anticuerpos eran de células B de memoria generadas por la vacunación y que fueron reforzadas por los antígenos FhES. Estos resultados coinciden con lo reportado por Villa y Col. 2008, al inmunizar ovinos con mimotopos de FhCL1, los títulos de anticuerpos IgG anti-FhES antes y después del desafío, fueron significativamente más elevados en ovinos inmunizados que en los grupos control [75]. En una infección natural por *F. hepatica* en ovinos, los títulos de anticuerpos IgG anti-FhES incrementan dos semanas post-infección, permaneciendo elevados hasta el final del experimento (semana 22)[16]. En el presente ensayo de vacunación con la proteína quimérica, los grupos control de la infección y control del adyuvante, los niveles de IgG anti-FhES fueron similares a una infección natural. El reconocimiento de los antígenos nativos del parásito por anticuerpos generados en ovinos inmunizados con la proteína quimérica pre-desafío, sugieren que rFhLAP-CL1 comparten epitopes con los antígenos FhLAP y FhCL1 nativos, aunque otros estudios son necesarios para dilucidar esta hipótesis.

La inmunogenicidad inducida por la proteína quimérica en ovinos vacunados fue demostrado al producir una fuerte respuesta de anticuerpos anti-rFhLAP-CL1 tras la primera inmunización, que se mantuvo hasta el final del experimento. Este resultado coincide con lo reportado por Hernández y Col.(2016), al inmunizar conejos con la rFhLAP-CL1, los conejos produjeron niveles elevados de IgG anti-rFhLAP-CL1[94]. Posteriormente, analizamos los isotipos de IgG (IgG1/IgG2) anti-rFhLAP-CL1 en todos los animales de experimentación a través de ELISA utilizando a la rFhLAP-CL1 como antígeno. En estudios previos han demostrado que la producción de IgG1 predominante se asocia con una respuesta inmune no protectora tipo Th2 en ovinos y bovinos infectados naturalmente; en contraste, una fuerte respuesta de IgG2 (Th1) fue asociada con una baja carga parasitaria en bovinos inmunizados con Catepsina L2 y hemoglobina [47]. En el presente estudio, los tres grupos inmunizados con la proteína quimérica (G1-G3),

lograron un incremento significativo en los niveles de IgG1 e IgG2 anti-rFhLAP-CL1 comparados con los grupos control (adyuvante e infección), sugiriendo una mezcla de respuesta Th1/Th2. Los niveles más altos de IgG1 e IgG2 fueron observados en ovinos inmunizados con 200µg y 400µg de la proteína quimérica, que se relaciona con los mayores porcentajes de protección medido por la reducción de la carga parasitaria; mientras que en ovinos de los grupos control post-desafío, se observaron altos niveles de IgG anti-FhES y bajos niveles de IgG2 anti-rFhLAP-CL1, sugiriendo una respuesta inmune Th2 no protectora, que fue evidenciado por el mayor número de parásitos recuperados.

Algunos estudios han demostrado una correlación significativa entre respuesta de anticuerpos séricos (IgG) y reducción de la carga parasitaria luego de la vacunación con antígenos de *F. hepatica*. Mulcahy y Col. (1998) encontraron altos títulos de IgG1 e IgG2 que fueron asociadas con baja carga parasitaria; por el contrario, bajos títulos de anticuerpos de IgG1/IgG2 se asociaron con mayor carga parasitaria[47]. En nuestro ensayo de vacunación con la proteína quimérica, al realizar el análisis de correlación entre los niveles de anticuerpos de IgG con la carga parasitaria, hubo una correlación significativa entre niveles elevados de IgG1 e IgG2 anti-rFhLAP-CL1 con carga parasitaria, cuando el análisis se realizó al momento del desafío y al incluir todos los animales de experimentación, pero no hubo correlación cuando el análisis se realizó al final del experimento o cuando el análisis se realizó por grupo. Un resultado similar ha sido reportado por Maggioli y Col. (2011), donde observó una correlación significativa entre títulos de anticuerpos (IgG e isotipos) con la carga parasitaria en ovinos inmunizados con FhLAP usando diferentes adyuvantes[69]. Contrario a lo anterior, en otro ensayo de vacunación usando a la Tiorredoxina Glutación en ovinos, tras analizar la asociación entre títulos de IgG e isotipos IgG1, IgG2 contra la carga parasitaria, no encontraron correlación significativa[121]. La mezcla de isotipos de anticuerpos IgG1/IgG2 en ovinos inmunizados con la proteína quimérica rFhLAP-CL1 en este ensayo fue asociado con protección y aunque el rol de anticuerpos en la

protección contra *F. hepatica* no es clara, esta mezcla de respuesta de anticuerpos ha sido reportado en otros ensayos de inmunización con niveles de protección significativos [76,122].

La mezcla de respuesta Th1/Th2 inducida en ovinos inmunizados con la proteína quimérica, pudo ser promovida por epitopes protectores contenidos en la proteína quimérica. El fragmento más grande de la proteína quimérica comprende las secuencias antigénicas de FhCL1 (411pb) y el resto por FhLAP(270pb), estas secuencias fueron seleccionadas por análisis bioinformáticos prediciendo epitopes de células B [94]. Al analizar la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica, identificamos epitopes inmunoprotectores de FhCL1, previamente reportados por otros investigadores. Harmsen y Col. (2004) reportaron una reducción de la carga parasitaria de 63.6% y 40.4% en ratas inmunizadas con los epitopes de SPCL1a (15-33 a.a de FhCL1) y SPCL1b (104-122 a.a de FhCL1), respectivamente[123]. Utilizando mimotopos de FhCL1 (181-191 a.a. YPYTAVEGQCRY de rFhLAP-CL1) como inmunógenos en ovinos y ratas, se indujo una protección del 47.61% y 66.67%, respectivamente[75,124]. En otro ensayo de inmunización, caprinos vacunados con los mimotopos 4,11 y 15 de CL1 (283-289 a.a de FhCL1, RGYIRMA de rFhLAP-CL1) indujeron 31.08% de protección tras la infección, así como una mezcla de respuesta inmune Th1/Th2[76]. Además, la región QTCSP<sup>L</sup>SVNHAVLAVGYGTQ de la proteína quimérica se sobrepone con los péptidos B7 (QTCSP<sup>L</sup>SVNHAVLAVGYGTQ) y B8 (QTT<sup>S</sup>PL<sup>R</sup>SVNHAVLAVGYGTQ) (245-264 a.a de FhCL1) reportados por Rojas-Caraballo y Col. (2014), que indujeron una mezcla de respuesta inmune Th1/Th2/Th17 en ratones inmunizados[95].

Finalmente, la baja protección inducida por la proteína quimérica en ovinos inmunizados con la menor concentración proteica, pudo ser atribuida a epitopes no protectores contenidas en la secuencia de FhCL1. En un estudio reciente, Garza-Cuartero y Col. (2018) caracterizaron epitopes lineales de células B utilizando anticuerpos de sueros de bovinos vacunados e infectados

experimentalmente que reconocen regiones específicas de FhCL1 [79]. Los sueros de bovinos vacunados y controles, reconocieron tres regiones específicas de FhCL1 en las posiciones: 268-285aa, 288-296aa y 301-309aa, estos epitopes están contenidas dentro de la región de FhCL1 de la proteína quimérica, por lo cual podría ser atribuido la baja protección en ovinos inmunizados con la menor concentración de rFhLAP-CL1.

A pesar de los esfuerzos por desarrollar una vacuna contra *F. hepatica* utilizando proteínas recombinantes, niveles bajos a moderados de protección han sido obtenidos en rumiantes[78,81,111]. Nuestro grupo de investigación, apostó por el desarrollo de una proteína quimérica que contuviera las secuencias más antigénicas de las dos proteasas candidatas a la primera vacuna comercial contra *F. hepatica*: FhLAP y FhCL1, esperando aumentar el grado de protección en los rumiantes inmunizados. En este estudio se demostró que la proteína quimérica contiene propiedades antigénicas e inmunogénicas ya que se indujo una fuerte respuesta inmune en ovinos inmunizados. Además, con la inmunización de la proteína quimérica, hubo una reducción de la carga parasitaria junto con una disminución en la producción de huevos en animales inmunizados comparados con el grupo control de la infección. Los datos presentados aquí son el primer reporte a nivel mundial del uso de una proteína quimérica compuesta de secuencias antigénicas de FhLAP y FhCL1 como inmunógeno contra *F. hepatica* evaluada en ovinos.

## 8. CONCLUSIONES

- ✓ La secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína quimérica experimental con la predicha *in silico*, se conserva en un 96% y 93%, respectivamente.
- ✓ La proteína quimérica se expresó en la fracción insoluble, como agregados en cuerpos de inclusión, con un peso molecular aproximado de 31 kDa.
- ✓ La proteína quimérica se expresó desde la primera hora post-inducción con IPTG hasta las 16h, posteriormente, la expresión declina conforme pasa el tiempo.
- ✓ La proteína quimérica se eluye a concentraciones de 50mM, 150mM y 250mM de Imidazol durante su purificación por cromatografía de afinidad a níquel.
- ✓ Los niveles de protección inducido en ovinos inmunizados con 100µg, 200µg y 400µg de la proteína quimérica emulsionado con Quil A, fueron del 25.58%, 30.74% y 46.51%, respectivamente.
- ✓ El menor porcentaje de implantación de parásitos fue obtenido en ovinos inmunizados con las tres concentraciones diferentes de la proteína quimérica (20.7-28.8%) comparado con los grupos control (34.9-38.7%).
- ✓ Hubo reducción en la producción de huevos del 22.7% y 24.4% en ovinos inmunizados con 200µg y 400µg de la proteína quimérica, respectivamente.
- ✓ La viabilidad de huevos de *F. hepatica* colectados de vesícula biliar fue más bajo en ovinos inmunizados (22-28%) que en el grupo control de la infección (59.6%).
- ✓ Los títulos de IgG1 e IgG2 anti-rFhLAP-CL1 fueron más altos en ovinos inmunizados que en los grupos control de adyuvante e infección durante toda la fase experimental.
- ✓ Hubo una correlación significativa entre títulos IgG1 ( $r^2=-0.523$ ,  $p=0.007$ ) e IgG2 ( $r^2=-0.688$ ,  $p=0.001$ ) con carga parasitaria.
- ✓ Los títulos de IgG e IgG2 anti-FhES fueron más altos en ovinos inmunizados con 200µg y 400 µg de la proteína quimérica que en ovinos de los grupos control.
- ✓ Hubo correlación negativa significativa entre títulos de IgG2 anti-FhES ( $r^2=-0.464$ ,  $p=0.020$ ) con la carga parasitaria.
- ✓ Una respuesta Th1/Th2 fue obtenida en ovinos inmunizados con la proteína quimérica al inducir niveles elevados de IgG1 e IgG2, que se asocia con protección contra fasciolosis.

## **9. PERSPECTIVAS**

Los resultados de inmunoprotección conferido por la proteína quimérica en ovinos inmunizados, medido por la reducción de la carga parasitaria, producción de huevos y el desarrollo de una respuesta inmune Th1/Th2, nos alienta para continuar con estudios sobre la respuesta inmune celular inducida por la proteína quimérica, cuantificar citocinas pro- y anti-inflamatorias. Asimismo, evaluar el daño hepático de ovinos inmunizados e infectados experimentalmente, a través de enzimas hepáticas y estudios histopatológicos. Además de realizar diferentes ensayos de protección, empleando un mayor número de animales con diferente sexo, diferentes especies de rumiantes de importancia económica, aumentar la concentración proteica y evaluar con diferentes adyuvantes disponibles en el mercado, podría aumentar el grado de protección conferida por la proteína quimérica.

## 10. LISTA DE ABREVIATURAS

**AAMΦ**: Macrófagos activados de forma alternativa

**ACF**: Adyuvante completo de Freund

**ADCC**: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

**AIF**: Adyuvante incompleto de Freund

**Carb**: Carbenicilina

**CD4<sup>+</sup>**: Linfocitos T cooperadores

**CD8<sup>+</sup>**: Linfocitos T citotóxicos

**CPS**: Métodos coproparasitoscópicos

**DCs**: Células dendríticas

**ELISA**: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)

**FABP**: Proteínas de unión a ácidos grasos

**FEC**: Conteo de huevos fecales

**Fh15**: Proteínas de unión a ácidos grasos recombinante

**FhCB**: Catepsina B de *F. hepatica*

**FhCL1**: Catepsina L1 de *F. hepatica*

**FhES**: Antígenos de excreción-secreción de *F. hepatica*

**FhHb**: Hemoglobina de *F. hepatica*

**FhLAP**: Leucina Aminopeptidasa de *F. hepatica*

**FhPrm**: Paramiosina de *F. hepatica*

**FhPrx**: Peroxirredoxina de *F. hepatica*

**FhSAP2**: Saponsin 2 de *F. hepatica*

**GST**: Glutación S-transferasa

**HRP**: Peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase)

**IBs**: Cuerpos de inclusión

**IFN**: Interferón

**IgG**: Inmunoglobulina G

**IPTG**: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

**mAb**: Anticuerpo monoclonal

**Medio LB:** Luria Bertani

**Medio SOC:** Medio de caldo superóptimo

**MΦ:** Macrófagos

**NEJs:** Parásito juvenil recién desenquistado, del inglés newly excysted juveniles

**OD:** Densidad óptica

**ON:** Óxido nítrico

**P.i:** Post-infección

**PBS:** Solución Salina tamponada (Phosphate buffered saline)

**PBST:** Solución Salina tamponada con Tween 20

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**pH.** Potencial de hidrógeno

**Placa LM:** Medio de cultivo en agar

**proFhCL1:** Zimógeno inactivo de catepsina L1 de F. hepatica

**PVDF:** Membrana de fluoruro de polivinilideno

**rCPFhW:** Cisteína proteasa W recombinante de F. hepatica

**rFh14-3-3z:** Proteína 14-3-3z de F. hepatica

**RPM:** Revoluciones por minuto

**rSm14:** Proteínas de unión a ácidos grasos recombinante de Schistosoma mansoni

**rTGR:** Tiorredoxin Glutation reductasas recombinante

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

**SOD:** Superóxido dismutasa

**SPI:** Semanas post-infección

**TCBZ:** Tricabendazol

**TCBZ-R:** Resistencia al triclabendazol por F. hepatica

**TGR:** Tiorredoxin Glutation Reductasa

**TMB:** 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

## 11. REFERENCIAS

- [1] Andrews SJ. The Life Cycle of *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis, editor. Dalt. JP, vol. 71. 1st ed., UK: CABI Publishing; 1999, p. 1–29. doi:10.4102/jsava.v71i2.698.
- [2] Cwiklinski K, O'Neill SM, Donnelly S, Dalton JP. A prospective view of animal and human Fasciolosis. *Parasite Immunol* 2016;38:558–68. doi:10.1111/pim.12343.
- [3] Piedrafita D, Spithill TW, Smith RE, Raadsma HW. Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. *Parasite Immunol* 2010;32:572–81. doi:10.1111/j.1365-3024.2010.01223.x.
- [4] Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill TW. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol* 2016;32:458–69. doi:10.1016/J.PT.2016.03.002.
- [5] Molina-Hernández V, Mulcahy G, Pérez J, Martínez-Moreno Á, Donnelly S, O'Neill SM, et al. *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Vet Parasitol* 2015;208:101–11. doi:10.1016/j.vetpar.2015.01.004.
- [6] Behm CA, Sangster NC. Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. In: Dalton JP, editor. Fasciolosis. 1st ed., UK: CABI Publishing; 1999, p. 202–41.
- [7] Moazeni M, Ahmadi A. Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol* 2016;169:81–9. doi:10.1016/J.EXPPARA.2016.07.010.
- [8] Cwiklinski K, Dalton JP, Dufresne PJ, La Course J, Williams DJ, Hodgkinson J, et al. The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biol* 2015;16:71. doi:10.1186/s13059-015-0632-2.
- [9] Pérez-Caballero R, Siles-Lucas M, González-Miguel J, Martínez-Moreno FJ, Escamilla A, Pérez J, et al. Pathological, immunological and parasitological study of sheep vaccinated with the recombinant protein 14-3-3z and experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Immunol Immunopathol* 2018;202:115–21. doi:10.1016/J.VETIMM.2018.07.006.
- [10] Zafra R, Pérez-Écija RA, Buffoni L, Pacheco IL, Martínez-Moreno A, LaCourse EJ, et al. Early hepatic and peritoneal changes and immune response in goats vaccinated with a recombinant glutathione transferase sigma class and challenged with *Fasciola hepatica*. *Res Vet Sci* 2013;94:602–9. doi:10.1016/J.RVSC.2012.10.026.
- [11] Buffoni L, Zafra R, Pérez-Écija A, Martínez-Moreno FJ, Martínez-Galisteo E, Moreno T, et al. Immune response of goats immunised with glutathione S-transferase and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Int* 2010;59:147–53. doi:10.1016/j.parint.2009.12.005.
- [12] Beesley NJ, Caminade C, Charlier J, Flynn RJ, Hodgkinson JE, Martinez-Moreno A,

- et al. Fasciola and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound Emerg Dis* 2018;65:199–216. doi:10.1111/tbed.12682.
- [13] Munguía-Xóchihua JA, Ibarra-Velarde F, Ducoing-Watty A, Montenegro-Cristino N, Quiroz-Romero H. Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and fecal analysis) in ruminants from a semi-desert area in the northwest of Mexico. *Parasitol Res* 2007;101:127–30. doi:10.1007/s00436-006-0438-y.
- [14] Flanagan A, Edgar HWJ, Gordon A, Hanna REB, Brennan GP, Fairweather I. Comparison of two assays, a faecal egg count reduction test (FECRT) and a coproantigen reduction test (CRT), for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet Parasitol* 2011;176:170–6. doi:10.1016/J.VETPAR.2010.10.057.
- [15] Rapsch C, Schweizer G, Grimm F, Kohler L, Bauer C, Deplazes P, et al. Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *Int J Parasitol* 2006;36:1153–8. doi:10.1016/J.IJPARA.2006.06.001.
- [16] Phiri IK, Phiri AM, Harrison LJS. Serum antibody isotype responses of Fasciola-infected sheep and cattle to excretory and secretory products of Fasciola species. *Vet Parasitol* 2006;141:234–42. doi:10.1016/j.vetpar.2006.05.019.
- [17] Almazán C, Avila G, Quiroz H, Ibarra F, Ochoa P. Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. *Vet Parasitol* 2001;97:101–12. doi:10.1016/S0304-4017(01)00376-4.
- [18] Adela Valero M, Victoria Periago M, Pérez-Crespo I, Rodríguez E, Jesús Perteguer M, Gárate T, et al. Assessing the validity of an ELISA test for the serological diagnosis of human fascioliasis in different epidemiological situations. *Trop Med Int Heal* 2012;17:630–6. doi:10.1111/j.1365-3156.2012.02964.x.
- [19] Cornelissen JBW., Gaasenbeek CP., Borgsteede FH., Holland WG, Harmsen MM, Boersma WJ. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *Int J Parasitol* 2001;31:728–37. doi:10.1016/S0020-7519(01)00175-8.
- [20] Gonzales Santana B, Dalton JP, Vasquez Camargo F, Parkinson M, Ndao M. The diagnosis of human fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant cathepsin L protease. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2414. doi:10.1371/journal.pntd.0002414.
- [21] Figueroa-Santiago O, Delgado B, Espino AM. *Fasciola hepatica* saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:355–61. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.03.016.
- [22] Mirzadeh A, Yoosefy A, Kazemirad E, Barati Z, Golkar M, Babaie J, et al. Evaluation of a set of refolded recombinant antigens for serodiagnosis of human fascioliasis. *PLoS One* 2018;13:e0203490. doi:10.1371/journal.pone.0203490.

- [23] Duménigo B., Mezo M. Monoclonal antibody sandwich immunoassay detection of coproantigen to evaluate the efficacy of treatment in natural ovine fasciolosis. *Res Vet Sci* 1999;66:165–7. doi:10.1053/RVSC.1998.0259.
- [24] Kajugu P-E, Hanna REB, Edgar HW, McMahon C, Cooper M, Gordon A, et al. *Fasciola hepatica*: Specificity of a coproantigen ELISA test for diagnosis of fasciolosis in faecal samples from cattle and sheep concurrently infected with gastrointestinal nematodes, coccidians and/or rumen flukes (paramphistomes), under field conditions. *Vet Parasitol* 2015;212:181–7. doi:10.1016/J.VETPAR.2015.07.018.
- [25] Arifin MI, Höglund J, Novobilský A. Comparison of molecular and conventional methods for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in the field. *Vet Parasitol* 2016;232:8–11. doi:10.1016/J.VETPAR.2016.11.003.
- [26] Ashrafi K, Bargues MD, O'Neill S, Mas-Coma S. Fascioliasis: A worldwide parasitic disease of importance in travel medicine. *Travel Med Infect Dis* 2014;12:636–49. doi:10.1016/J.TMAID.2014.09.006.
- [27] Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, Abbas RZ, Ijaz M, Durrani AZ, et al. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb Pathog* 2017;109:253–62. doi:10.1016/J.MICPATH.2017.06.006.
- [28] Figueroa-Castillo JA. Frecuencia de *Fasciola hepatica* en ganado ovino, caprino y venados en México. In: Quiroz-Romero H, Figueroa-Castillo JA, editors. *Estud. la Fasciolosis en México 1879 a 2006*. 1st ed., Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México; 2010, p. 125–36.
- [29] Quiroz Romero H. Estudios sobre prevalencia, frecuencia y distribución geográfica de *Fasciola hepatica* en ganado bovino de México. In: H QR, JA FC, editors. *Estud. la Fasciolosis en México 1879 a 2006*. 1st ed., Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México; 2010, p. 85–116.
- [30] Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A. Bulk tank milk ELISA to detect IgG1 prevalence and clustering to determine spatial distribution and risk factors of *Fasciola hepatica*-infected herds in Mexico. *J Helminthol* 2018:1–7. doi:10.1017/S0022149X18000792.
- [31] Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A. High prevalence, potential economic impact, and risk factors of *Fasciola hepatica* in dairy herds in tropical, dry and temperate climate regions in Mexico. *Acta Trop* 2019;193:169–75. doi:10.1016/J.ACTATROPICA.2019.03.005.
- [32] Villa-Mancera A, Molina-Mendoza P, Hernández-Guzmán K, Olivares-Pérez J, Sarracent-Pérez J, Zumaquero-Ríos J. Comparative Diagnosis of Serum IgG1 and Coproantigen ELISA for Fasciolosis Detection of Goats in Mexico. *Biomed Res Int* 2016;2016:3860928. doi:10.1155/2016/3860928.

- [33] Zumaquero-Ríos JL, Sarracent-Pérez J, Rojas-García R, Rojas-Rivero L, Martínez-Tovilla Y, Valero MA, et al. Fascioliasis and intestinal parasitoses affecting schoolchildren in Atlixco, Puebla State, Mexico: epidemiology and treatment with nitazoxanide. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2553. doi:10.1371/journal.pntd.0002553.
- [34] Charlier J, Vercruyse J, Morgan E, Dijk J Van, Williams DJL. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitology* 2014;141:236–335. doi:10.1017/S0031182013001662.
- [35] Munguía-Xóchihua JA. Impacto económico de la fasciolosis en México. In: Quiroz-Romero H, Figueroa-Castillo JA, editors. *Estud. la Fasciolosis en México 1879 a 2006*. 1st ed., Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México; 2010, p. 181–200.
- [36] Fairweather I, Boray JC. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. *Vet J* 1999;158:81–112. doi:10.1053/TVJL.1999.0377.
- [37] SMEAL MG, HALL CA. The activity of triclabendazole against immature and adult *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Aust Vet J* 1983;60:329–31. doi:10.1111/j.1751-0813.1983.tb02833.x.
- [38] Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schellenbaum M, Von Orelli M, et al. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet Rec* 1983;113:315–7.
- [39] Overend D, Bowen F. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J* 1995;72:275–6. doi:10.1111/j.1751-0813.1995.tb03546.x.
- [40] Olaechea F, Lovera V, Larroza M, Raffo F, Cabrera R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet Parasitol* 2011;178:364–6. doi:10.1016/j.vetpar.2010.12.047.
- [41] Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M, et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Vet Parasitol* 2013;195:118–21. doi:10.1016/j.vetpar.2013.01.001.
- [42] Novobilský A, Höglund J. First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2015;5:172–7. doi:10.1016/j.ijpddr.2015.07.003.
- [43] Van Milligen FJ, Cornelissen JBWJ, Bokhout BA. Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunol* 1999;21:243–51. doi:10.1046/j.1365-3024.1999.00226.x.
- [44] Golden O, Flynn RJ, Read C, Sekiya M, Donnelly SM, Stack C, et al. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine* 2010;28:5551–7.

doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.039.

- [45] Toet H, Piedrafita DM, Spithill TW. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int J Parasitol* 2014;44:915–27. doi:10.1016/J.IJPARA.2014.07.011.
- [46] Dalton JP, Robinson MW, Mulcahy G, O'Neill SM, Donnelly S. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet Parasitol* 2013;195:272–85. doi:10.1016/J.VETPAR.2013.04.008.
- [47] Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, et al. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 1998;16:932–9. doi:10.1016/S0264-410X(97)00289-2.
- [48] Collins PR, Stack CM, O'Neill SM, Doyle S, Ryan T, Brennan GP, et al. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *J Biol Chem* 2004;279:17038–46. doi:10.1074/jbc.M308831200.
- [49] Moreau E, Chauvin A. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:428593. doi:10.1155/2010/428593.
- [50] Marcilla A, Trelis M, Cortés A, Sotillo J, Cantalapiedra F, Minguez MT, et al. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One* 2012;7:e45974. doi:10.1371/journal.pone.0045974.
- [51] Hillyer GV. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J Helminthol* 2005;79:241–7. doi:10.1079/JOH2005304.
- [52] Morphew RM, Wilkinson TJ, Mackintosh N, Jahndel V, Paterson S, McVeigh P, et al. Exploring and Expanding the Fatty-Acid-Binding Protein Superfamily in *Fasciola* Species. *J Proteome Res* 2016;15:3308–21. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00331.
- [53] Figueroa-Santiago O, Espino AM. *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein induces the alternative activation of human macrophages. *Infect Immun* 2014;82:5005–12. doi:10.1128/IAI.02541-14.
- [54] López-Abán J, Esteban A, Vicente B, Rojas-Caraballo J, Olmo E del, Martínez-Fernández AR, et al. Adaptive Immune Stimulation Is Required To Obtain High Protection with Fatty Acid Binding Protein Vaccine Candidate Against *Fasciola hepatica* In Balb/C Mice. *J Parasitol* 2012;98:527–35. doi:10.1645/GE-2891.1.
- [55] Hillyer G V, Haroun ET, Hernandez A, de Galanes MS. Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *Am J Trop Med Hyg* 1987;37:363–9.

- [56] Spithill TW, Piedrafita D, Smooker PM. Immunological approaches for the control of fasciolosis. *Int J Parasitol* 1997;27:1221–35. doi:10.1016/S0020-7519(97)00120-3.
- [57] Scarcella S, Lamenza P, Virkel G, Solana H. Expression differential of microsomal and cytosolic glutathione-S-transferases in *Fasciola hepatica* resistant at triclabendazole. *Mol Biochem Parasitol* 2012;181:37–9. doi:10.1016/j.molbiopara.2011.09.011.
- [58] Duncan J, Cutress D, Morphew RM, Brophy PM. Purification of native Sigma class glutathione transferase from *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 2018;222:45–50. doi:10.1016/J.MOLBIOPARA.2018.04.006.
- [59] LaCourse EJ, Perally S, Morphew RM, Moxon J V, Prescott M, Dowling DJ, et al. The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1666. doi:10.1371/journal.pntd.0001666.
- [60] Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, et al. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol* 1990;145:3905–10.
- [61] Cancela M, Carmona C, Rossi S, Frangione B, Goñi F, Berasain P. Purification, characterization, and immunolocalization of paramyosin from the adult stage of *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res* 2004;92:441–8. doi:10.1007/s00436-003-1059-3.
- [62] Jiz M, Wu H-W, Meng R, Pond-Tor S, Reynolds M, Friedman JF, et al. Pilot-scale production and characterization of paramyosin, a vaccine candidate for schistosomiasis japonica. *Infect Immun* 2008;76:3164–9. doi:10.1128/IAI.00409-08.
- [63] Rinaldi G, Morales ME, Alrefaei YN, Cancela M, Castillo E, Dalton JP, et al. RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Mol Biochem Parasitol* 2009;167:118–26. doi:10.1016/J.MOLBIOPARA.2009.05.002.
- [64] Rogers WP, Brooks F. The mechanism of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 1977;7:61–5. doi:10.1016/0020-7519(77)90026-1.
- [65] Joshua GWP. Functional analysis of leucine aminopeptidase in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasitol* 2001;113:223–32. doi:10.1016/S0166-6851(01)00221-3.
- [66] Acosta D, Cancela M, Piacenza L, Roche L, Carmona C, Tort JF. *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol Biochem Parasitol* 2008;158:52–64. doi:10.1016/J.MOLBIOPARA.2007.11.011.
- [67] Acosta D, Goñi F, Carmona C. Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *J Parasitol* 1998;84:1–7.
- [68] Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C. Vaccination with

cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun* 1999;67:1954–61.

- [69] Maggioli G, Acosta D, Silveira F, Rossi S, Giacaman S, Basika T, et al. 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* 2011;29:9057–63. doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.020.
- [70] Cwiklinski K, Donnelly S, Drysdale O, Jewhurst H, Smith D, De Marco Verissimo C, et al. The cathepsin-like cysteine peptidases of trematodes of the genus *Fasciola*. *Adv Parasitol* 2019;104:113–64. doi:10.1016/BS.APAR.2019.01.001.
- [71] Robinson MW, Tort JF, Lowther J, Donnelly SM, Wong E, Xu W, et al. Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:1111–23. doi:10.1074/mcp.M700560-MCP200.
- [72] Wijffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, et al. Vaccination of Sheep with Purified Cysteine Proteinases of *Fasciola hepatica* Decreases Worm Fecundity. *Exp Parasitol* 1994;78:132–48. doi:10.1006/EXPR.1994.1014.
- [73] Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP, And †, Andrews SJ. Induction of Protective Immunity in Cattle against Infection with *Fasciola hepatica* by Vaccination with Cathepsin L Proteinases and with Hemoglobin. vol. 64. 1996.
- [74] Roche L, Dowd AJ, Tort J, McGonigle S, McSweeney A, Curley GP, et al. Functional Expression of *Fasciola Hepatica* Cathepsin L1 in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Eur J Biochem* 1997;245:373–80. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00373.x.
- [75] Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D, Ibarra F, Reyes-Pérez M, Reyes-Vivas H, et al. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology* 2008;135:1437. doi:10.1017/S003118200800471X.
- [76] Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A, Utrera-Quintana F, Carreón-Luna L. Cathepsin L1 mimotopes with adjuvant Quil A induces a Th1/Th2 immune response and confers significant protection against *Fasciola hepatica* infection in goats. *Parasitol Res* 2014;113:243–50. doi:10.1007/s00436-013-3650-6.
- [77] Quiroz-Romero H, Correa D, Castillo-Mata D, Ortega-Vargas S, Villa-Mancera A. Protection, liver function and humoral immune response in sheep vaccinated with mimotopes of cathepsin L1 and L2 experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Arch Med Vet* 2014;46. doi:10.4067/S0301-732X2014000200011.
- [78] Villa-Mancera A, Méndez-Mendoza M. Protection and antibody isotype responses against *Fasciola hepatica* with specific antibody to pIII-displayed peptide mimotopes of cathepsin L1 in sheep. *Vet J* 2012;194:108–12. doi:10.1016/J.TVJL.2012.03.003.

- [79] Garza-Cuartero L, Geurden T, Mahan SM, Hardham JM, Dalton JP, Mulcahy G. Antibody recognition of cathepsin L1-derived peptides in *Fasciola hepatica*-infected and/or vaccinated cattle and identification of protective linear B-cell epitopes. *Vaccine* 2018;36:958–68. doi:10.1016/J.VACCINE.2018.01.020.
- [80] Mulcahy G, O'Connor F, Clery D, Hogan SF, Dowd AJ, Andrews SJ, et al. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepaticavaccines*. *Res Vet Sci* 1999;67:27–33. doi:10.1053/RVSC.1998.0270.
- [81] Buffoni L, Martínez-Moreno FJ, Zafra R, Mendes RE, Pérez-Écija A, Sekiya M, et al. Humoral immune response in goats immunised with cathepsin L1, peroxiredoxin and Sm14 antigen and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 2012;185:315–21. doi:10.1016/J.VETPAR.2011.09.027.
- [82] Norbury LJ, Basařaj K, Zawistowska-Deniziak A, Sielicka A, Wilkowski P, Wesolowska A, et al. Intranasal delivery of a formulation containing stage-specific recombinant proteins of *Fasciola hepatica* cathepsin L5 and cathepsin B2 triggers an anti-fecundity effect and an adjuvant-mediated reduction in fluke burden in sheep. *Vet Parasitol* 2018;258:14–23. doi:10.1016/J.VETPAR.2018.05.008.
- [83] Dias DS, Ribeiro PAF, Martins VT, Lage DP, Costa LE, Chávez-Fumagalli MA, et al. Vaccination with a CD4+ and CD8+ T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from *Leishmania infantum* proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis. *Transl Res* 2018;200:18–34. doi:10.1016/J.TRSL.2018.05.001.
- [84] Shabani SH, Zakeri S, Salmanian AH, Amani J, Mehrizi AA, Snounou G, et al. Biological, immunological and functional properties of two novel multi-variant chimeric recombinant proteins of CSP antigens for vaccine development against *Plasmodium vivax* infection. *Mol Immunol* 2017;90:158–71. doi:10.1016/J.MOLIMM.2017.06.033.
- [85] Kaba SA, Price A, Zhou Z, Sundaram V, Schnake P, Goldman IF, et al. Immune responses of mice with different genetic backgrounds to improved multiepitope, multitarget malaria vaccine candidate antigen FALVAC-1A. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1674–83. doi:10.1128/CVI.00164-08.
- [86] Theisen M, Roeffen W, Singh SK, Andersen G, Amoah L, van de Vegte-Bolmer M, et al. A multi-stage malaria vaccine candidate targeting both transmission and asexual parasite life-cycle stages. *Vaccine* 2014;32:2623–30. doi:10.1016/J.VACCINE.2014.03.020.
- [87] Jaramillo Ortiz JM, Del Médico Zajac MP, Zanetti FA, Molinari MP, Gravisaco MJ, Calamante G, et al. Vaccine strategies against *Babesia bovis* based on prime-boost immunizations in mice with modified vaccinia Ankara vector and recombinant proteins. *Vaccine* 2014;32:4625–32. doi:10.1016/J.VACCINE.2014.06.075.
- [88] Jaramillo Ortiz JM, Montenegro VN, de la Fournière SAM, Sarmiento NF, Farber MD, Wilkowsky SE. Development of an Indirect ELISA Based on a Recombinant

Chimeric Protein for the Detection of Antibodies against Bovine Babesiosis. *Vet Sci* 2018;5. doi:10.3390/vetsci5010013.

- [89] Holec-Gasior L, Ferra B, Drapala D. MIC1-MAG1-SAG1 chimeric protein, a most effective antigen for detection of human toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol* 2012;19:1977–9. doi:10.1128/CVI.00452-12.
- [90] Ferra B, Holec-Gasior L, Kur J. A new *Toxoplasma gondii* chimeric antigen containing fragments of SAG2, GRA1, and ROP1 proteins-impact of immunodominant sequences size on its diagnostic usefulness. *Parasitol Res* 2015;114:3291–9. doi:10.1007/s00436-015-4552-6.
- [91] Yang W, Jackson DC, Zeng Q, McManus DP. Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. *Vaccine* 2000;19:103–13. doi:10.1016/S0264-410X(00)00165-1.
- [92] Pinheiro CS, Ribeiro APD, Cardoso FC, Martins VP, Figueiredo BCP, Assis NRG, et al. A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. *Parasite Immunol* 2014;36:303–12. doi:10.1111/pim.12118.
- [93] Kalita P, Lyngdoh DL, Padhi AK, Shukla H, Tripathi T. Development of multi-epitope driven subunit vaccine against *Fasciola gigantica* using immunoinformatics approach. *Int J Biol Macromol* 2019;138:224–33. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2019.07.024.
- [94] Hernández-Guzmán K, Sahagún-Ruiz A, Vallecillo AJ, Cruz-Mendoza I, Quiroz-Romero H. Construction and evaluation of a chimeric protein made from *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase and cathepsin L1. 2016;90:7–13. doi:10.1017/S0022149X14000686.
- [95] Rojas-Caraballo J, López-Abán J, Pérez del Villar L, Vizcaíno C, Vicente B, Fernández-Soto P, et al. In vitro and in vivo studies for assessing the immune response and protection-inducing ability conferred by *Fasciola hepatica*-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes. *PLoS One* 2014;9:e105323. doi:10.1371/journal.pone.0105323.
- [96] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166:557–80. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- [97] Haçarız O, Sayers G, McCullough M, Garrett M, O'Donovan J, Mulcahy G. The effect of Quil A adjuvant on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine* 2009;27:45–50. doi:10.1016/J.VACCINE.2008.10.035.
- [98] Chryssafidis AL, Fu Y, De Waal T, Mulcahy G. Standardisation of egg-viability assays for *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi*: A tool for evaluating new technologies of parasite control. *Vet Parasitol* 2015;210:25–31. doi:10.1016/j.vetpar.2015.03.005.

- [99] Mas-Coma S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminthol* 2005;79:207–16.
- [100] Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T, et al. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* 1996;14:1603–12. doi:10.1016/S0264-410X(96)00147-8.
- [101] Muro A, Ramajo V, López J, Simón F, Hillyer G V. *Fasciola hepatica*: Vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol* 1997;69:219–29. doi:10.1016/S0304-4017(96)01131-4.
- [102] Espino AM, Osuna A, Gil R, Hillyer G V. *Fasciola hepatica*: Humoral and cytokine responses to a member of the saposin-like protein family following delivery as a DNA vaccine in mice. *Exp Parasitol* 2005;110:374–83. doi:10.1016/J.EXPPARA.2005.03.029.
- [103] Spithill TW, Smooker PM, Sexton JL, Bozas E, Morrison CA, Creaney J, et al. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis, editor. Dalton, J.P. First edit, London UK: CABI Publishing; 1999, p. 377–409.
- [104] Pacheco IL, Abril N, Morales-Prieto N, Bautista MJ, Zafra R, Escamilla A, et al. Th1/Th2 balance in the liver and hepatic lymph nodes of vaccinated and unvaccinated sheep during acute stages of infection with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 2017;238:61–5. doi:10.1016/J.VETPAR.2017.03.022.
- [105] Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PM. Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet Parasitol* 2009;160:230–6. doi:10.1016/J.VETPAR.2008.10.099.
- [106] Jaramillo Ortiz JM, Molinari MP, Gravisaco MJ, Paoletta MS, Montenegro VN, Wilkowsky SE. Evaluation of different heterologous prime–boost immunization strategies against *Babesia bovis* using viral vectored and protein-adjuvant vaccines based on a chimeric multi-antigen. *Vaccine* 2016;34:3913–9. doi:10.1016/J.VACCINE.2016.05.053.
- [107] Dominguez MF, González-Miguel J, Carmona C, Dalton JP, Cwiklinski K, Tort J, et al. Low allelic diversity in vaccine candidate genes from different locations sustain hope for *Fasciola hepatica* immunization. *Vet Parasitol* 2018. doi:10.1016/j.vetpar.2018.06.011.
- [108] Hernández Guzmán Karina. Desarrollo de un inmunógeno quimérico de leucina aminopeptidasa y catepsina L1 de *Fasciola hepatica*. Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
- [109] Kofta W, Mieszczanek J, Płucienniczak G, Wędrychowicz H. Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. *Vaccine* 2000;18:2985–90. doi:10.1016/S0264-410X(00)00095-5.
- [110] Raina OK, Nagar G, Varghese A, Prajitha G, Alex A, Maharana BR, et al. Lack of

protective efficacy in buffaloes vaccinated with *Fasciola gigantica* leucine aminopeptidase and peroxiredoxin recombinant proteins. *Acta Trop* 2011;118:217–22. doi:10.1016/j.actatropica.2011.02.008.

- [111] Pérez-Ecija RA, Mendes RE, Zafra R, Buffonni L, Martínez-Moreno A, Pérez J. Pathological and parasitological protection in goats immunised with recombinant cathepsin L1 and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet J* 2010;185:351–3. doi:10.1016/j.tvjl.2009.07.004.
- [112] Sun H-X, Xie Y, Ye Y-P. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* 2009;27:1787–96. doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.091.
- [113] Gauci C, Vural G, Öncel T, Varcasia A, Damian V, Kyngdon CT, et al. Vaccination with recombinant oncosphere antigens reduces the susceptibility of sheep to infection with *Taenia multiceps*. *Int J Parasitol* 2008;38:1041–50. doi:10.1016/j.ijpara.2007.11.006.
- [114] González-Sánchez ME, Cuquerella M, Alunda JM. Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* with the recombinant rHc23. Effect of adjuvant and antigen dose. *PLoS One* 2018;13:e0193118. doi:10.1371/journal.pone.0193118.
- [115] Zhang Z-Z, Guo G, Li J, Shi B-X, Zhao L, Guo B-P, et al. Dog vaccination with EgM proteins against *Echinococcus granulosus*. *Infect Dis Poverty* 2018;7:61. doi:10.1186/s40249-018-0425-4.
- [116] Zulpo DL, Igarashi M, Sammi AS, Santos JR Dos, Sasse JP, Cunha IAL da, et al. rROP2 from *Toxoplasma gondii* as a potential vaccine against oocyst shedding in domestic cats. *Rev Bras Parasitol Vet n.d.*;26:67–73. doi:10.1590/S1984-29612017007.
- [117] Turner J, Howell A, McCann C, Caminade C, Bowers RG, Williams D, et al. A model to assess the efficacy of vaccines for control of liver fluke infection. *Sci Rep* 2016;6:23345. doi:10.1038/srep23345.
- [118] Wedrychowicz H, Kesik M, Kaliniak M, Kozak-Cieszczyk M, Jedlina-Panasiuk L, Jaros S, et al. Vaccine potential of inclusion bodies containing cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke. *Vet Parasitol* 2007;147:77–88. doi:10.1016/J.VETPAR.2007.03.023.
- [119] Quiroz-Romero H, Correa D, Castillo-Matac D, Ortega-Vargas SA, Villa-Mancera A. Protección, función hepática y respuesta inmune humoral de ovinos vacunados con mimotopos de catepsina L1 y L2 infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*. *Arch Med Vet* 2014;46:253–61.
- [120] De Bont J, Claerebout E, Riveau G, Schacht AM, Smets K, Conder G, et al. Failure of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental *Fasciola hepatica* infection. *Vet Parasitol* 2003;113:135–44.

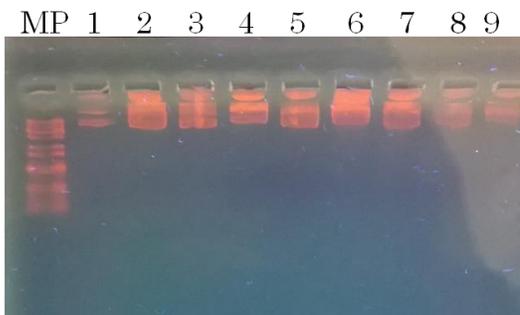
- [121] Maggioli G, Bottini G, Basika T, Alonzo P, Salinas G, Carmona C. Immunization with *Fasciola hepatica* thioredoxin glutathione reductase failed to confer protection against fasciolosis in cattle. *Vet Parasitol* 2016;224:13–9. doi:10.1016/j.vetpar.2016.05.007.
- [122] Rivera F, Espino AM. Adjuvant-enhanced antibody and cellular responses to inclusion bodies expressing FhSAP2 correlates with protection of mice to *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol* 2016;160:31–8. doi:10.1016/j.exppara.2015.11.002.
- [123] Harmsen MM, Cornelissen JBWJ, Buijs HECM, Boersma WJA, Jeurissen SHM, van Milligen FJ. Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *Int J Parasitol* 2004;34:675–82. doi:10.1016/J.IJPARA.2003.12.011.
- [124] Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D, Alonso RA. Proteolytic activity in *Fasciola hepatica* is reduced by the administration of cathepsin L mimotopes. *J Helminthol* 2011;85:51–5. doi:10.1017/S0022149X1000026X.

## ANEXO I. Material suplementario

Cuantificación del plásmido quimérico pET15b-LAPCL1 por espectrofotometría de luz UV.

**Tabla 4. Cuantificación del plásmido quimérico pET-15b-LAPCL1**

ID_clon	Concentración (ng/μl)	Ratio 260/280
Clon 1	173.0	1.87
Clon 2	509.7	1.87
Clon 3	403.9	1.88
Clon 4	465.5	1.86
Clon 5	502.2	1.83
Clon 6	947.6	1.89
Clon 7	396.0	1.88
Clon 8	208.1	1.85
Clon 9	290.7	1.88
Clon 10	429.2	1.87



**Figura 1.1. Identificación del plásmido pET15b-LAPCL1 en gel de agarosa al 1%.**

**Clonas del plásmido quimérico recombinante pET15b -LAPCL1 purificados por QIAprep miniprep.** Gel de agarosa 1%. Los plásmidos de ADN (carril 1-9) fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5μg/ml). MP: marcador de peso.

**Figura 1.2. Alineamiento a nivel de nucleótidos de la secuencia química predicha (*in silico*) con la experimental obtenida. Hubo 96% de homología.**

Experimental quimera LAP-CL1 (847pb)  
 Sequence ID: Query\_110389 Length: 846 Number of Matches: 1

Range 1: 64 to 744 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1103 bits(597)	0.0	654/682(96%)	2/682(0%)	Plus/Plus
Predicha	1	GATCCGGAACGAATGGCTGCACCCAGAATTGTGGACTATCTGAAAACTTCACTCGGTGGT	60		
Experimental	64	GATCCGGAACGAATGGCTGCACCCAGAATTGTGGACTATCTGAGAACTTCACTCGGTGGT	123		
Predicha	61	ATGAAGGGGAATTACCATGAGTGTGGAAAAGGTGGACATTAGAAAATACCCCTCTGATGGCT	120		
Experimental	124	ATGAAGGGGAATTACCATGAGTGTGGAAAAGGTGGACATTAGAAAATACCCCTCTGATGGCT	183		
Predicha	121	GCGGTGAATCGTGCAGCATCCGTTGTGCACGCCATGACGGACGCGTGGTTCATCTCAAG	180		
Experimental	184	GCGGTGAATCGTGCAGCATCCGTTGTGCACGCCATGACGGACGCGTGGTTCATCTCAAG	243		
Predicha	181	TACGAGCCGCCCAATCCAACCGAGGTGGATACGACTCTTTACTTGATTGGAAAAGGTATC	240		
Experimental	244	TACGAGCCGCCCAATCCAACCGAGGTGGATACGACTCTTTACTTGATTGGAAAAGGTATC	303		
Predicha	241	ACTTATGACACCGGTGGAGCAGACATCAAGGGATTGAAAACCGAGTCTTCTTATCCCTAC	300		
Experimental	304	ACTTATGACACCGGTGGAGCAGACATCAAGGGATTGAAAACCGAGTCTTCTTATCCGTAC	363		
Predicha	301	AGGGCTGTGGAAGGACAGTGTGATACAAACGAGCAGTTGGGAGTTGCCAAAGTACTGGC	360		
Experimental	364	ACGGCTGTGGAAGGTGAGTGTGATACAAATGAGCAGTTAGGAGTTGCCAAAGTACTGGC	423		
Predicha	361	TACTATACTGTGCATTTCTGGCAGTGAAGTAGAATTGAAAAATCTAGTCGGTTCGGAAGGA	420		
Experimental	424	TACTACTACTGTGCATTTCTGGCAGTGAAGTAGAATTGAAAAATCTAGTCGGTTCGGAAGGA	483		
Predicha	421	CCTGCCGCGATTGCTGTGGAGGCCGAATCTGACTTCATGATGTACAGGAGTGGTATTTAT	480		
Experimental	484	CCTGCCGCGGTCGCTGTGGATGTGGAATCTGACTTCATGATGTACAGGAGTGGTATTTAT	543		
Predicha	481	CAGAGCCAAACTTGTGTTACCG-TTCGCTTTGAATCATGCAGTCTTGGCTGTCGGTTATGG	539		
Experimental	544	CAGAGCCAAACTTGTGTTACCG-TGTGAAATCATGCAGTCTTGGCTGTCGGTTACGG	602		
Predicha	540	AACACAGGATGGTACTGACTATTGGATTGTGAAAAATAGTTGGGGATTGTCGTGGGGTGA	599		
Experimental	603	AACACAGGATGGTACTGACTATTGGATTGTGAAAAATAGTTGGGGATCGTACTGGGGTGA	662		
Predicha	600	GCGCGGTTACATTGCAATGGCTAGGAATCGAGGTAACATGTGTGGAATTGCTTCGCTGGC	659		
Experimental	663	GCGCGGTTACATTGCAATGGCTAGGAATCGAGGTAACATGTGTGGAATTGCTTCGCTGAA	722		
Predicha	660	CAGTCTCCCGATGGTGGCACGA	681		
Experimental	723	GCTTCTCCCGATGGTGGCACGA	744		

**Figura 1.3 Traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos de la quimera predicha y la experimental.**

```
>Predicha_1
DPERMAAPRIVDYLKTSLGGMKGITMSVEKVDIQKYPLMAAVNRAASVVARHDGRVVHLKYEPPNP
TEVDTTLYLIGKGIITYDTGGADIKGLETESSYPYRAVEGQCRYNEQLGVAKVTGYT VHSGSEVEL
KNLVGSEGPAAIAVEAESDFMMYRSGIYQSQTCLPFALNHAVLAVGYGTQDGTDYWIVKNSWGLSW
GERGYIRMARNRGNMCGIASLASLPMVAR
```

```
>Experimental_1
DPERMAAPRIVDYLR TSLGGMKGITMSVEKVDIQKYPLMAAVNCAASVVARHDGRVVHLKYEPPNP
TEVDTTLYLIGKGIITYDTGGADIKGLETESSYPYTAVEGQCRYNEQLGVAKVTGYT VHSGSEVEL
KNLVGAEGPAAVAVDVESDFMMYRSGIYQSQTCSPLSVNHAVLAVGYGTQDGTDYWIVKNSWGSYW
GERGYIRMARNRGNMCGIASLKL LPMVAR
```

**Figura 1.4. Alineamiento a nivel de aminoácidos de LAP de la secuencia quimérica predicha (*in silico*) contra la experimental obtenida. LAP se conserva en un 98%**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
LAP-predicha      DPERMAAPRIVDYLKTSLGGMKGITMSVEKVDIQKYPLMAAVNRAASVVARHDGRVVHLK      60
LAP-Experimental DPERMAAPRIVDYLR TSLGGMKGITMSVEKVDIQKYPLMAAVNCAASVVARHDGRVVHLK      60
*****
LAP-predicha      YEPPNPTEVDTTLYLIGKGIITYDTGGADIK      90
LAP-Experimental YEPPNPTEVDTTLYLIGKGIITYDTGGADIK      90
*****
```

**Figura 1.5. Alineamiento a nivel de aminoácidos de CL1 de la secuencia quimérica predicha (*in silico*) contra la experimental obtenida. CL1 se conserva en un 91%.**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
CL1-predicha      GLETESSYPYRAVEGQCRYNEQLGVAKVTGYT VHSGSEVELKNLVGSEGPAAIAVEAES      60
CL1-Experimental GLETESSYPYTAVEGQCRYNEQLGVAKVTGYT VHSGSEVELKNLVGAEGPAAVAVDVES      60
*****
CL1-predicha      DFMMYRSGIYQSQTCLPFALNHAVLAVGYGTQDGTDYWIVKNSWGLSWGERGYIRMARNR      120
CL1-Experimental DFMMYRSGIYQSQTCSPLSVNHAVLAVGYGTQDGTDYWIVKNSWGSYWGERGYIRMARNR      120
*****
CL1-predicha      GNMCGIASLASLPMVAR      137
CL1-Experimental GNMCGIASLKL LPMVAR      137
*****
```

**Figura 1.6. Cálculo del peso molecular y punto isoeléctrico de la proteína quimérica por *Expasy PI/Mw tool***

### Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

```
      10      20      30      40      50      60
DPERMAAPRI VDYLRTSLGG MKGITMSVEK VDIQKYPLMA AVNCAASVVA RHDGRVVHLK

      70      80      90      100     110     120
YEPPNPTEVD TTYLIGKGI TYDTGGADIK GLETESSYPY TAVEGQCRYN EQLGVAKVTG

      130     140     150     160     170     180
YYTVHSGSEV ELKNLVGAEG PAAVAVDVES DFMMYRSGIY QSQTCSPLSV NHAVLAVGYG

      190     200     210     220
TQDGTDYWIV KNSWGSYWGE RGYIRMARNR GNMCGIASLK LLPMVAR
```

Theoretical pI/Mw: 6.12 / 24780.17

## SOLUCIONES UTILIZADAS

*Luria Bertani* (LB, 1L)

- Cloruro de sodio (NaCl) -10gr
  - Extracto de Levadura – 5gr
  - Peptona de caseína – 10 gr
- Diluir los en agua destilada y esterilizar por autoclave.

Placas LB-Agar

- Medio LB más agar bacteriológico -15gr/L
- Diluir en agua destilada y esterilizar por autoclave.  
Preparar con el antibiótico de selección.

Medio LB + Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>)

- Al medio LB suplementar con 20 mM de cloruro de magnesio
- Preparar 50-100ml, esterilizar por autoclave.

Solución de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) estéril frío.

- Preparar 100 ml de CaCl<sub>2</sub> a 50 mM
- Filtrar con pirinola de 0.22µM

Solución de CaCl<sub>2</sub> y glicerol

- 50mM de CaCl<sub>2</sub> filtrado (0.22µM) más 20% de glicerol

#### Placas LM agar

- 1% (w/v) Bactotryptona
- 0.5% (w/v) Extracto de levadura
- 10mM Cloruro de Sodio (NaCl)
- 10 mM sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ )
- 1.5% (w/v) Bacto-Agar

Preparar con agua destilada, autoclavear y adicionar el antibiótico de selección.

#### Medio SOB

- 2% (w/v) Bacto-tryptona
- 0.5 % (w/v) Extracto de Levadura
- 10 mM NaCl
- 2.5 mM KCl
- 10 m  $MgCl_2$
- 10mM  $MgSO_4$

El medio SOB se prepara con agua destilada, pH 7.0 y luego esteriliza por autoclave. El  $MgCl_2$  y  $MgSO_4$  se adiciona de forma separada, previamente filtradas (0.22 $\mu$ m).

#### Medio SOC

- Medio SOB suplementado con 20mM de glucosa.  
El agua usada debe ser la más pura posible (MiliQ)

#### PBS-10X

- 80gr Cloruro de sodio (NaCl)
  - 2gr Cloruro de potasio (KCl)
  - 14.4gr Fosfato de Sodio dibásico ( $Na_2PO_4 \cdot 7H_2O$ )
  - 2.4gr Fosfato de potasio monobásico ( $KH_2PO_4$ )
- Ajustar pH 7.4, ajustar volumen para 1 L, esterilizar por autoclave.

#### Amortiguador de sonicación (As)

- 50 mM de Tris-HCl
- 1mM de PMSF
- 100mM NaCl
- 20mM imidazol
- Filtrar y ajustar pH 8.0.

#### Amortiguador de unión (Bb)

- 50mM de Fosfato de sodio monobásico ( $NaH_2PO_4$ )
  - 50mM Cloruro de sodio (NaCl)
  - 8M urea ( $CH_4N_2O$ )
  - 10mM Imidazol ( $C_3H_4N_2$ )
- Filtrar y ajustar pH 8.0. Utilizar agua MiliQ

#### Amortiguador de elución (Be)

- 50 mM de Fosfato de sodio monobásico ( $NaH_2PO_4$ )
- 50 mM NaCl
- 8 M urea ( $CH_4N_2O$ )

- 500 mM Imidazol ( $C_3H_4N_2$ )  
Filtrar y ajustar pH 8.0. Utilizar agua MiliQ

#### Solución de fosfatos

- 50mM de Fosfato de sodio monobásico ( $NaH_2PO_4$ )
- 50mM NaCl  
Ajustar pH 8.0.

#### Amortiguador de lisis para SDS-PAGE

- SDS 10%
- $\beta$ -mercaptoetanol 5%
- Glicerol 20%
- 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8
- Azul de bromofenol 0.05g  
Agua MiliQ

#### Solución de corrida para geles SDS-PAGE (SDS 1x)

- Glicina 1.91M
- Tris-Base 0.25M
- SDS 1%  
Agua destilada

#### Solución de transferencia

- Tris 0.25M
- Glicina 1.91M  
Agua destilada

#### Solución de tinción

- Azul de Coomassie 0.1%
- Metanol 50%
- Ácido acético 7%  
Preparar en agua destilada, teñir dos minutos o más.

#### Solución desteñidora de geles o membranas

- 50% metanol
- 7% ácido acético
- 43% agua destilada

#### Solución de lavado

- PBS-1x/Tween 20 al 0.05%, pH 7.4

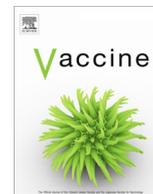
#### Solución de bloqueo

PBS-1x/Tween 20 al 0.01%, BSA 3%

#### Solución de incubación

PBS-1x/Tween 20 al 0.05%, BSA 1%.

## **ANEXO II. Publicación de artículo**



## Moderate protection is induced by a chimeric protein composed of leucine aminopeptidase and cathepsin L1 against *Fasciola hepatica* challenge in sheep

S. Ortega-Vargas<sup>a,\*</sup>, C. Espitia<sup>b</sup>, A. Sahagún-Ruiz<sup>c</sup>, C. Parada<sup>b</sup>, A. Balderas-Loaeza<sup>a</sup>, A. Villa-Mancera<sup>d</sup>, H. Quiroz-Romero<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Delegación Coyoacán, Ciudad de México C.P. 04510, Mexico

<sup>b</sup>Departamento de inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510 México, DF, Mexico

<sup>c</sup>Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Delegación Coyoacán, C.P. 04510 México, D.F, Mexico

<sup>d</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 4 Sur 304 Col. Centro, C.P. 75482, Tecamachalco, Puebla, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 December 2018

Received in revised form 16 April 2019

Accepted 18 April 2019

Available online 26 April 2019

#### Keywords:

*Fasciola hepatica*  
Chimeric protein  
Immunization  
Sheep

### ABSTRACT

Leucine aminopeptidase (FhLAP) and cathepsin L1 (FhCL1) of *Fasciola hepatica* play a critical role in parasite feeding, migration through host tissue, and immune evasion. These antigens have been tested for immune protection as single components with variable degrees of success. The chimeric-protein approach could improve protection levels against fasciolosis. Previously, we reported the design and construction of a chimeric protein composed of antigenic sequences of FhLAP and FhCL1 of *F. hepatica*. The goal of the present study was to express and evaluate the immune-protective capacity of this chimeric protein (rFhLAP-CL1) in sheep. Animals were randomly allocated into five groups with five animals in each group. Groups 1, 2 and 3 were immunized twice with 100 µg, 200 µg and 400 µg of rFhLAP-CL1 emulsified with Quil A adjuvant, whereas groups 4 and 5 were the adjuvant control and infection control groups, respectively. The animals were then challenged with 200 metacercariae two weeks after the rFhLAP-CL1 booster. The fluke burden was reduced by 25.5%, 30.7% ( $p < 0.05$ ) and 46.5% ( $p < 0.01$ ) in sheep immunized with 100 µg, 200 µg and 400 µg of chimeric protein, respectively, in comparison to the infection control group. There was a reduction of 22.7% ( $p < 0.05$ ) and 24.4% ( $p < 0.01$ ) in fecal egg count in groups 2 and 3, respectively, compared to the infection control group. Sheep immunized with chimeric protein produced *F. hepatica* excretion-secretion product-specific total IgG antibody, which were increased after challenge. Moreover, the levels of rFhLAP-CL1-specific IgG1 and IgG2 isotypes in immunized sheep increased rapidly two weeks after the first immunization and were significantly more elevated than those of the control groups, indicating a mixed Th1/Th2 response. This is a preliminary evaluation of the chimeric protein rFhLAP-CL1 as a possible immunogen against *F. hepatica* infection in sheep.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Fasciolosis is caused by the digenetic trematode *Fasciola hepatica*, a major parasitic disease of livestock, particularly sheep, goats and cattle. The economic losses to livestock production by fasciolosis are estimated to be over US\$3 billion per annum, with over 600 million animals infected [1]. Furthermore, fasciolosis is recognized as an emerging human disease with an estimated 2.4 million

people infected and 180 million at risk of infection [1,2]. Currently, the control of *F. hepatica* is based on anthelmintic treatment, and triclabendazole is the drug of choice, which is active against both juvenile and mature flukes [3]. However, due to the overuse of anthelmintics, resistance to triclabendazole and other fasciolicides has been reported [4,5]. In addition, the fasciolicides do not prevent reinfections, and continuous treatment leads to resistance and increased treatment expenses. This, along with consumer pressure for chemical free foods, increases interest in new control strategies, and the development of a vaccine would offer an alternative method of control for this disease [1,6].

\* Corresponding author.

E-mail address: [fmvz.samy@comunidad.unam.mx](mailto:fmvz.samy@comunidad.unam.mx) (S. Ortega-Vargas).

There are several antigens of *F. hepatica* that have been characterized and proposed as possible vaccine candidates in the form of native or recombinant proteins, including glutathione S-transferase [7], saposin-like protein-2 [8], cathepsin L1 [9] and leucine aminopeptidase [10], with variable protection levels when administered as single components.

Cathepsin L1 (FhCL1) and leucine aminopeptidase (FhLAP) of *F. hepatica* are involved in crucial activities such as migration, feeding and immune evasion, and both proteases have been identified in FhES products, used in immunoassays [11,12] and proposed as promising candidates for vaccination [13,14]. Previous vaccine trials with rFhCL1 and rFhLAP have shown reductions in fluke burden ranging from 37.6% to above >80% in cattle and sheep, respectively [9,10], depending on the strategy used to obtain these immunogens. Chimeric proteins have the ability to present multiple antigenic epitopes from different proteins at the same time and thus can induce better levels of protection against pathogens [15]. To date, few studies have focused on the use of chimeric proteins to induce better levels of immunoprotection against parasites, including *Schistosoma mansoni* [16], *Babesia bovis* [17] and *Plasmodium vivax* [18]. The immunization of mice with two chimeric proteins composed of tegument proteins of *S. mansoni*, SmTSP-2 fused to the N- or C-terminus of Sm29, induced a reduction in worm burden and liver pathology compared to control groups [19]. To our knowledge, there are no reports of the use of chimeric proteins based on sequences of LAP and CL1 as possible immunogens against *F. hepatica* in ruminants. Our research group previously designed and constructed a chimeric protein composed of four and six antigenic determinants of LAP (GenBank; AAV59016.1; 192–281 aa) and CL1 (GenBank CAC12806.1; 173–309 aa), respectively. The selection of these sequences was based on bioinformatics analyses that predicted these antigenic regions (BCEPred, ABCPred and Kolaskar & Togaonkar) [20]. The CL1 region of the chimeric protein comprised B-cell epitopes; two epitopes within the chimeric sequence (181–191 aa and 283–289 aa) were previously evaluated as immunogens and showed protection of 47.61% and 30.08% against *F. hepatica* in sheep and goats, respectively [21,22]. Another region (245–264 aa) of CL1 induced high levels of IgG, IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-17 in mice immunized with peptide B7/B8 [23]. In addition, the sequence of CL1 (288–296 aa) has been recognized by sera of cattle vaccinated with FhCL1/FhCL3 [9].

The aim of this study was to express and evaluate the level of protection and the immune response in sheep immunized with an rFhLAP-CL1 chimeric protein formulated with Quil A adjuvant and challenged with *F. hepatica* metacercariae. The worm burden, fecal egg count and serum levels of antibodies were analyzed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Expression and purification of the rFhLAP-CL1 recombinant chimeric protein

The 681 bp chimeric gene contains 270 bp of LAP and 411 bp of CL1 and was previously subcloned into the expression vector pET15b [20]. The pET15b-LAP/CL1 recombinant plasmid was transformed into Rosetta (DE3) *E. coli*, spread onto agar plates containing 100  $\mu$ g/ml carbenicillin (Carb) and incubated at 37 °C overnight. After that, a clone was selected and grown in 3 ml of Luria-Bertani medium supplemented with 100  $\mu$ g/ml of Carb (LB/Carb) and incubated at 37 °C with shaking at 220 rpm overnight. A culture of the recombinant strain was used to subculture fresh medium (1:100 dilution) containing antibiotic selection. When the cultures reached an OD<sub>600</sub> = 0.5–0.6, expression was induced using 0.25 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma-Aldrich, México). After four hours, bacterial cells were har-

vested by centrifugation, washed twice with 1 $\times$  PBS pH 7.4 and resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM PMSF, 100 mM NaCl, and 20 mM imidazole, incubated at 4 °C for 45 min and sonicated (10 burst cycle of 30 s with 30 s pauses). The lysate was centrifuged at 20,196  $\times$  g for 40 min at 4 °C, and the pellet was washed with PBS-1% Triton X-100. Then, the pellet was solubilized in binding buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 50 mM NaCl, 8 M urea, and 10 mM Imidazole, pH 8.0) and incubated at 4 °C with gentle stirring. Following incubation, cell debris was removed by centrifugation, and the supernatant was filtered through a 0.45  $\mu$ m Millipore filter.

The purification of His-tagged chimeric protein was carried out using an AKTA-FPLC purification system (GE Healthcare) by HisTrap™ HP columns (GE Healthcare Life Sciences, USA) under denaturing conditions. The filtered supernatant was applied to a HisTrap™ HP column previously equilibrated with binding buffer, the column was washed with buffer containing 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 50 mM NaCl, 8 M urea, and 20 mM Imidazole at pH 8.0, and bound proteins were eluted through a stepwise gradient with elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 50 mM NaCl, 8 M urea, and 500 mM Imidazole, pH 8.0). The protein-containing fractions were pooled and dialyzed against phosphate buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O and 50 mM NaCl, pH 8.0) with a step gradient of 6 M to zero M urea. The protein concentration was determined using a bicinchoninic acid assay (ThermoFisher Scientific, USA). Sample purity was evaluated on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels stained with Coomassie Blue. The chimeric protein was confirmed by Western blot using anti-(His)<sub>6</sub> antibody (1:3000) (H1029, Sigma-Aldrich) and anti-rFhLAP-CL1 polyclonal antibody generated in rabbits (1:8000). The chimeric protein was kept at –20 °C until use.

### 2.2. Vaccine formulation

The Quil A adjuvant (Accurate Chemical & Scientific Corp, USA) was dissolved at a concentration of 1 mg/ml (w:v) in sterile PBS (pH 7.0) and filtered through a 0.20  $\mu$ m filter [24]. Subsequently, an adjuvant volume was emulsified with an equal volume of the chimeric protein and stirred overnight at 4 °C.

### 2.3. Experimental animals

Twenty-five 6- to 8-month-old Katahdin  $\times$  East Friesian male sheep were obtained and maintained at the Teaching and Research Centre for Animal Health and Production (CEPIPSA) of the National Autonomous University of México, Topilejo, México. This center is a liver fluke-free area; sheep were reared and housed in covered pens with cement floors and shown to be free of infection by faecal egg count and detection of anti-*F. hepatica* excretory-secretory products antibody by ELISA. The animals were weighed and provided hay and pellets and water *ad libitum* throughout the course of the test. The experiment was approved by the Institutional Subcommittee for the Care and Use of Experimental Animals (SICUAE, UNAM), protocol number DC-2017/1-20.

### 2.4. Metacercariae of *F. hepatica*

The metacercariae of *F. hepatica* used to challenge the sheep were collected from laboratory colonies of *Lymnaea cubensis* experimentally infected with miracidia of a fluke of bovine origin. The metacercariae were stored at 4 °C until use, and the viability was confirmed by microscopy prior to the infection. Gelatin capsules containing 200 metacercariae were administered *per os* to each animal with esophageal tongs. Only metacercariae less than two months old were used in this experiment.

## 2.5. Vaccination and experimental infection

All sheep were randomly allocated into five groups with five animals in each group. Groups 1, 2 and 3 were subcutaneously immunized with 100 µg, 200 µg and 400 µg of rFhLAP-CL1 chimeric protein emulsified with Quil A adjuvant, respectively. Groups 4 (Quil A adjuvant and infected) and 5 (unimmunized) were control groups. Immunization was carried out at weeks 0 and 2 in the neck. On week 4 all animals were orally challenged with 200 metacercariae. The experimental period was 24 weeks.

## 2.6. Protection assessment by vaccination

All sheep were humanely euthanized 24 weeks after the first immunization, and the liver and gallbladder were collected for dissection. The gall bladder was opened, and the flukes were recovered. Then, the major bile ducts were carefully opened with blunt-blunt scissors, and the worms were removed with blunt forceps and counted. The liver of each sheep was cut into small pieces (1 cm<sup>2</sup>), soaked in water at 37 °C for 45 min, squeezed, and forced through a 300 µm-mesh sieve; the retained material was analyzed for the presence of damaged flukes [25]. Percentage protection for immunized animals was calculated [10] with the formula:  $[(U - V)/U] \times 100$ , where  $U$  is mean value of the fluke burden of the unvaccinated-infected-control group and  $V$  is the mean value of the fluke burden of the vaccinated groups.

## 2.7. Fecal egg count (FEC)

To assess egg output, fecal samples were collected biweekly from each animal directly from the rectum. The fecal samples were placed in plastic bags, labeled and transported with refrigerant to the laboratory for analysis. Three grams of each sample were processed individually using the sedimentation technique as described by Sexton et al. (1990), and the egg counts were expressed as eggs per gram of feces (EPG) ± standard deviation [26].

## 2.8. Humoral responses induced by vaccination

Blood samples were collected from all sheep prior to primary immunization (0 week) and every two weeks until the end of the experiment at week 24. The samples were centrifuged, and the serum obtained was stored at -20 °C until use. The humoral response elicited by immunization with chimeric protein and infection was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Excretion-secretion products of *F. hepatica* (FhES) were obtained and used to determine total IgG antibody titers in the serum samples [21]. The production of rFhLAP-CL1-specific IgG1 and IgG2 isotypes was measured. Flat bottomed micro ELISA plates (Nunc-Immuno MaxiSorp, USA) were coated with 100 µl containing 2 µg/ml of FhES or 1 µg/ml of rFhLAP-CL1 chimeric protein in carbonate buffer, pH 9.6 and incubated overnight at 4 °C with gentle shaking. After four washes with PBST (0.05% Tween 20 in PBS pH 7.4), the remaining binding sites were blocked with 200 µl of 3% bovine serum albumin (BSA) in PBST for 1 h at 37 °C and then washed 4 more times. The serum samples were diluted 1:400 in dilution buffer (PBST with 1% BSA) and incubated at 37 °C for 1 h. The plates were washed as described above and incubated with HRP-conjugated rabbit anti-sheep IgG (Ab6747, Abcam), HRP-conjugated mouse anti-goat/sheep IgG1 (A9452, Sigma), and mouse anti-human IgG2 biotinylated isotype (B3773, Sigma; this antibody reacts with sheep IgG2) for 1 h at room temperature in dilution buffer. After incubation and washing under the same conditions as previously described, the reaction was developed with O-phenylenediamine (OPD) in citrate buffer and incubated for

30 min at room temperature in the dark. The reaction was stopped by adding 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 µl/well), and the absorbance was measured at 492 nm using an ELISA reader (*Multiskan 60, Thermo Scientific*). The results expressed as the mean of the optical density were obtained from triplicate samples.

## 2.9. Statistical methods

The mean ± standard deviation (SD) was calculated for fluke burden and fecal egg count. The percent of protection was calculated as previously described [10]. Data were checked for normality (Shapiro-Wilk's test) and variance homogeneity (Levene's test). Differences between groups in the number of worms recovered, egg count and absorbance values were tested by a nonparametric Kruskal-Wallis test. Correlations were calculated with Spearman's nonparametric correlation test to assess the relationship among total IgG, IgG1 and IgG2 in serum and fluke burden. All tests were performed with the software IBM SPSS Statistics 21 for Windows. A  $p < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Expression and purification of the rFhLAP-CL1 chimeric protein

Chimeric protein was expressed as inclusion bodies and purified under denaturing conditions (8 M urea) by nickel-affinity chromatography, which eluted at 10%, 30% and 50% of imidazole (0.5 M). The procedure for protein refolding resulted in a substantial loss of protein via precipitation but yielded sufficient soluble protein to be used for immunization experiments. The purified protein was resolved as a single band with an apparent molecular mass of 31 kDa on 12% SDS-PAGE (Fig. S1, lane 1). This value is in agreement with the value estimated from the deduced amino acid sequence of rFhLAP-CL1 plus the hexahistidine tag.

Western blot analysis revealed that the chimeric protein was recognized by mAb anti-histidine as a single band (Fig. S1, lane 2). In addition, rabbit antibodies generated against the chimeric protein reacted with rFhLAP-CL1 at the expected size (~31 kDa) (Fig. S1, lane 3).

### 3.2. Parasite burden in sheep vaccinated with rFhLAP-CL1 chimeric protein

At the end of the experiment, all sheep were humanely euthanized at 24 weeks after immunization. The parasites in the bile ducts and liver tissue were recovered and counted, and the results were expressed as the mean liver fluke count ± SD (Table 1).

The number of worms recovered from the infection control group exhibited the highest parasitic burden compared to that of the rFhLAP-CL1 vaccinated groups. The percentage of protection was calculated in relation to the infection control group. The three groups vaccinated with rFhLAP-CL1 chimeric protein showed a reduction in fluke burden with the level of protection ranging from 25.5% to 46.5%. The highest degree of protection was observed in sheep vaccinated with 400 µg of the rFhLAP-CL1 chimeric protein, with a mean reduction in fluke burden of 46.5% ( $p < 0.01$ ). Animals vaccinated with 100 µg and 200 µg of rFhLAP-CL1 showed a mean reduction in fluke burden of 25.5% and 30.7% ( $p < 0.05$ ), respectively. In animals treated with Quil A adjuvant only, the mean reduction in fluke burden was 9.8%. The overall protection level achieved in sheep vaccinated with rFhLAP-CL1 was 34.2% ( $p > 0.05$ ). Fluke burdens were compared between the vaccinated groups and adjuvant control group. The levels of protection in sheep vaccinated with 100 µg, 200 µg and 400 µg of rFhLAP-CL1

**Table 1**Fluke burden (mean  $\pm$  S.D) and percentages of recovery from vaccinated and control groups after challenge with *F. hepatica* metacercariae.

Group (antigen/adjuvant)	Number of flukes recovered		(% Protection)	(% Recovery)
	Individual date	Mean $\pm$ S.D		
Group 1 (100 $\mu$ g rFhLAP-CL1 + QS)	50, 69, 26, 75, 68	57.6 $\pm$ 19.9	25.5	28.8
Group 2 (200 $\mu$ g rFhLAP-CL1 + QS)	52, 45, 70, 44, 57	53.6 $\pm$ 10.5	30.7	26.8
Group 3 (400 $\mu$ g rFhLAP-CL1 + QS)	46, 52, 30, 47, 32	41.4 $\pm$ 9.7	46.5**	20.7
Quil A adjuvant	68, 84, 64, 71, 62	69.8 $\pm$ 8.6	9.8	34.9
Infection control	54, 86, 105, 62, 80	77.4 $\pm$ 20.1		38.7

S.D standard deviation.

were 17.4% ( $p > 0.05$ ), 23.2% ( $p > 0.05$ ) and 40.6% ( $p < 0.01$ ), respectively.

In the infection control group, the mean worm burden from the original inoculum of 200 metacercariae was 38.7%, and the mean worm burden in the adjuvant control group was 34.9%. The fluke implantation rate was 28.8% for group 1, 26.8% for group 2 and 20.7% for group 3. The weight of sheep was significantly correlated with the parasite burden ( $r = -0.4031$ ;  $p = 0.045$ , Fig. S2).

### 3.3. Fecal egg count (FEC)

Eggs of *F. hepatica* first appeared at week 10 postinfection and gradually increased until the end of the experiment (week 24). The average and standard deviation of the fecal egg count of the immunized and control groups are shown in Fig. 1.

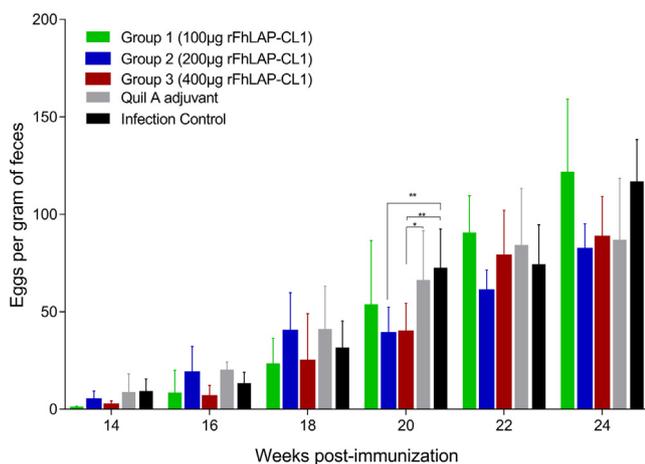
The mean total FEC of rFhLAP-CL1-vaccinated animals was lower than the adjuvant control group or infection control group. The adjuvant and infection control groups showed  $304.7 \pm 43.5$  and  $315.4 \pm 56$  FECs, respectively. The groups immunized with 100  $\mu$ g, 200  $\mu$ g and 400  $\mu$ g of rFhLAP-CL1 showed  $296.8 \pm 27.3$ ,  $243.8 \pm 45.2$  and  $238.4 \pm 22.9$  FECs, respectively. There was a reduction in the egg output of 22.7% ( $p < 0.05$ ) and 24.4% ( $p < 0.01$ ) in animals vaccinated with 200  $\mu$ g and 400  $\mu$ g of rFhLAP-CL1, respectively, compared to the infection control group. There was no significant difference in the FECs ( $p > 0.05$ ) between sheep immunized with 100  $\mu$ g of rFhLAP-CL1 (group 1) and control groups, probably due to the high variability found.

It was observed that at week 20, the number of eggs released from animals vaccinated with 200  $\mu$ g ( $p < 0.01$ ) and 400  $\mu$ g

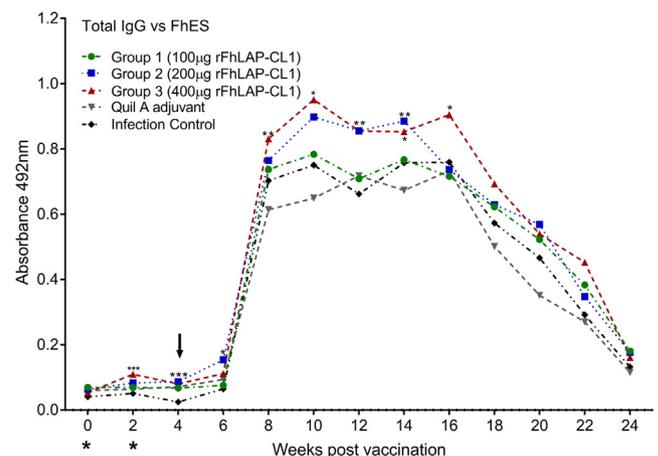
( $p < 0.01$ ) of rFhLAP-CL1 was significantly lower than that released from the infection control group. In addition, group 3 ( $p < 0.05$ ) showed a statistically significant reduction in FEC compared with the adjuvant control group.

### 3.4. Humoral responses induced by vaccination and detected by indirect ELISA

Serum samples collected from sheep were tested for anti-FhES products IgG, rFhLAP-CL1-specific IgG1 and IgG2 isotypes, by indirect ELISA. Fig. 2 shows the reactivity of sera from all sheep towards the FhES products. A slight but significant antibody response was elicited in the groups vaccinated with 200  $\mu$ g (group 2) and 400  $\mu$ g (group 3) of rFhLAP-CL1 protein two weeks after the first immunization. In addition, an increase in the absorbance of the groups immunized with rFhLAP-CL1 protein was observed within 2 weeks after challenge (week 4), with a peak 10 weeks after the first immunization that remained high until 16 weeks, after which, the level decreased gradually until the end of the experiment (week 24). FhES-specific total IgG levels were higher in the serum of sheep immunized with 200  $\mu$ g and 400  $\mu$ g of rFhLAP-CL1 protein than in sheep immunized with 100  $\mu$ g of rFhLAP-CL1 protein or in control groups. The absorbance of IgG in serum against adult fluke FhES products was found at background levels before challenge to *F. hepatica* infection in the adjuvant control group or infection control group. After that, an increase in antibody titers was observed two weeks postchallenge with a peak at weeks 8–16 that decreased gradually thereafter. The absorbance of IgG in serum against adult fluke FhES products was



**Fig. 1.** Egg count dynamics throughout the experiment of sheep immunized with 100  $\mu$ g (group 1), 200  $\mu$ g (group 2) and 400  $\mu$ g (group 3) of rFhLAP-CL1 chimeric protein, as well as adjuvant control group and infection control group. Data are presented as the means  $\pm$  standard deviation of five animals per group. Groups 2 and 3 showed significant differences compared with group 4 denoted by \*\* ( $p < 0.01$ ). Only group 3 ( $p < 0.05$ ) showed a statistically significant difference in FEC compared with the adjuvant control group.



**Fig. 2.** Total IgG levels against ES products of *F. hepatica* in the serum of immunized and control animals. Sheep were given two immunizations at 0 and 2 weeks with 100  $\mu$ g (group 1), 200  $\mu$ g (group 2) and 400  $\mu$ g (group 3) of rFhLAP-CL1 chimeric protein in Quil A adjuvant and challenged with 200 metacercariae orally (black arrow). Antibody titers are expressed as OD means of 1:400 diluted sera in triplicate wells. \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; and \*\*\* =  $p < 0.001$ .

lower in the adjuvant control group or the infection control group than in the immunized sheep.

Fig. 3 shows the levels of IgG1 and IgG2 reacting to the rFhLAP-CL1 chimeric protein. The rFhLAP-CL1-specific IgG1 levels were produced in all vaccinated sheep after the first immunization with an increase in antibodies with the 2nd booster (Fig. 3a). The maximum levels of IgG1 in immunized sheep were observed at 2 weeks postchallenge (except group 3, where a peak was observed at week 10) and then decreased gradually until the end of the experiment (week 24). Of the vaccinated groups, group 3 showed the highest IgG1 levels compared to groups 1 and 2. IgG1 levels were significantly higher in the immunized groups compared with the adjuvant control group or the infection control group throughout the experiment. In animals from both control groups, a slight increase in IgG1 levels after challenge was observed, with no significant increase throughout the experimental phase.

In immunized sheep, rFhLAP-CL1-specific IgG2 levels increased with the 1st and 2nd booster of recombinant protein (Fig. 3b). Group 3 (immunized with 400 µg rFhLAP-CL1), showed the highest IgG2 titers at the time of the challenge (week 4). After infection, the immunized groups showed higher rFhLAP-CL1-specific IgG2 titers than the adjuvant control group or the infection control group at weeks 6, 8 and 10. A slight increase in the rFhLAP-CL1-specific IgG2 levels in the sera of animals in the adjuvant control group or infection control group was detected at two weeks postinfection (week 6), without a significant increase throughout the experiment.

Using a nonparametrical Spearman correlation's test, a statistically significant correlation was observed between IgG1 ( $r^2 = -0.523$ ,  $p = 0.007$ ) and IgG2 ( $r^2 = -0.688$ ,  $p = 0.001$ ) titers and parasite burden when analysis was performed including all

animals, but not when analysis was performed by each group. In addition, no statistically significant correlation was obtained between total IgG ( $r^2 = -0.354$ ,  $p = 0.083$ ) titers and parasite burden.

#### 4. Discussion

Recombinant chimeric proteins used as immunogens have been minimally explored in the field of parasitology. Chimeric proteins have the advantage of containing several antigenic and immunogenic epitopes, at least two or more proteins from the different stages of the life cycle of parasite, that induce protective effects against infection [27,28].

In trematodes, especially in *F. hepatica*, the development and use of chimeric proteins as immunogens has not been explored. For the development of a vaccine against *F. hepatica*, many researchers have focused on proteins that play important roles in the biology of the parasite, such as cathepsin L [14] and leucine aminopeptidase [13], and are therefore targets for vaccination. Immunization of cattle with the recombinant protein CL1 followed by a challenge infection with *F. hepatica* resulted in a reduction of 48.2% of worm burden [29]. However, other immunization trials have not shown a similar reduction in fluke burden [30,31]. Moreover, the vaccination of sheep with recombinant LAP formulated with different adjuvants reduced worm burden up to 86.7%, which is the highest level of protection achieved thus far in large animals [10], although more trials are necessary.

To improve protection with CL1 and LAP in vaccination trials in ruminants, our research group designed and constructed a chimeric protein called rFhLAP-CL1, which contains antigenic sequences of both proteins. This chimeric protein was highly immunogenic in immunized rabbits, inducing strong and specific antibody responses towards rFhLAP-CL1. In addition, their antigenicity was evaluated using serum samples from bovines naturally infected with *F. hepatica* through Western blot analyses [20].

We evaluated the immune-protective capacity of rFhLAP-CL1 against *F. hepatica* in sheep by a preliminary study conducted with a small number of animals using different concentrations of immunogen (100 µg, 200 µg and 400 µg). We demonstrated that it is possible to induce moderate protection along with a high humoral immune response in sheep vaccinated with rFhLAP-CL1 formulated with Quil A adjuvant. This adjuvant is a complex mixture of triterpenoid saponins extracted from the bark of *Quillaja saponaria* tree [32] and has been used in vaccine trials against *Taenia multiceps* [33] and *Haemonchus contortus* [34]. Upon assessment of the effect of the adjuvant Quil A against *F. hepatica* in sheep, a significant reduction in FEC and higher *F. hepatica*-specific serum antibody levels (IgG1, IgG2, IgA and IgE) were observed, suggesting that Quil A adjuvant boosted a pro-inflammatory immune response (Th1) [24].

Reduction in fluke burden is a key parameter for evaluating vaccine efficacy after challenge with *F. hepatica*. Immunization with recombinant chimeric protein rFhLAP-CL1 can reduce liver fluke burden in vaccinated and infected animals. The highest reduction in liver fluke burden was observed in sheep immunized with 400 µg of rFhLAP-CL1, which induced a significant level of protection of 46.5% compared with the infected control group. In the group immunized with 200 µg of rFhLAP-CL1, there was a reduction of 30.7% ( $p < 0.05$ ) in fluke burden, while in animals immunized with 100 µg of protein, there was a reduction of 25.5% ( $p > 0.05$ ); this result was not statistically significant, probably due to the high variability found. Similar results have been obtained with other recombinant proteins evaluated as immunogens against *F. hepatica*. Goats immunized with a synthetic peptide of Sm14 antigen induced 45.9% protection against *F. hepatica* [35].

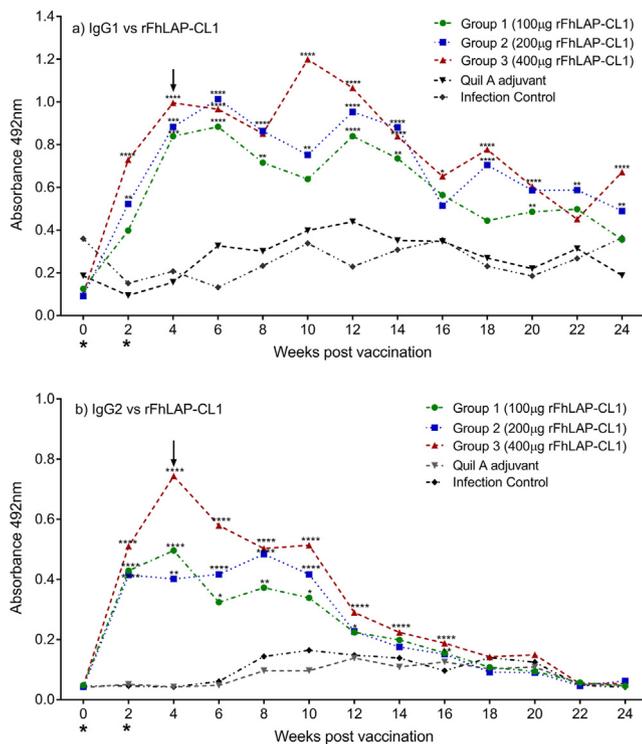


Fig. 3. Analysis of IgG1 (a) and IgG2 (b) antibody responses specific to rFhLAP-CL1 in the serum of vaccinated and control sheep during the experiment. Sheep were given two immunizations at 0 and 2 weeks with 100 µg (group 1), 200 µg (group 2) and 400 µg (group 3) of rFhLAP-CL1 chimeric protein in Quil A adjuvant and challenged with 200 metacercariae orally (black arrow). Antibody titers are expressed as OD means of 1:400 diluted sera in triplicate wells. \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; and \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ .

Immunization of goats with peroxiredoxin and FhCL1 emulsified with Quil A adjuvant induced reductions in fluke burden of 33.2% and 38.7%, respectively [30]. Golden et al., 2010 reported that cattle vaccinated with an inactive mutant of rFhCL1, expressed in *Pichia pastoris*, showed a significant reduction in fluke burden of 48.2%, and Garza-Cuartero et al., 2018 found that cattle vaccinated with rFhCL1 showed a fluke burden reduction of 37.6%. However, other trials have not shown a similar reduction in worm burden with different proteins, such as glutathione S-transferase [36], leucine aminopeptidase [37] or thioredoxin glutathione reductase [38].

In this trial, the mean fluke implantation rate (38.7% in unimmunized-infected control group) was similar to that in other reported trials, e.g., 34% in Merino sheep [39] and 33% in Corriedale sheep [10], except for a trial in goats that was slightly higher with 46% [30]. Sheep immunized with 100 µg, 200 µg and 400 µg of rFhLAP-CL1 had implantation rates of 28.8%, 26.8% and 20.7%, respectively, slightly higher than those reported in previous vaccine trials [10,36]. The mechanism of protection induced by the rFhLAP-CL1 protein is unknown but may be related to antibody production after immunization, neutralizing the activity of both enzymes; as a consequence, the mechanism of parasite immune evasion and nutrient acquisition is inhibited. However, further studies are necessary to explain the mechanism of immune protection in sheep.

Another important criterion to assess the efficacy of an immunogen against *F. hepatica* is the reduction in egg production because it can potentially affect pasture contamination. The fecundity of *F. hepatica* in sheep vaccinated with 100 µg of rFhLAP-CL1 does not appear to have been affected after establishment in the bile ducts, as evidenced by the reduction in FEC. However, in sheep immunized with 200 µg and 400 µg of rFhLAP-CL1, the protein showed significant reductions of 22.7% ( $p < 0.05$ ) and 24.4% ( $p < 0.01$ ), respectively. Immunization assays with recombinant antigens of *F. hepatica* did not significantly reduce fecal egg output in immunized animals [30,40].

Immunization with rFhLAP-CL1 chimeric protein elicited a strong humoral immune response as measured by single dilution, and all vaccinated sheep had significantly increased antibodies compared to the control groups. This result confirms the immunogenicity of the rFhLAP-CL1 protein observed in rabbits by high production of IgG after immunization with this antigen [20].

The rFhLAP-CL1 chimeric protein used in this trial elicited an IgG response of low but significant magnitude against the FhES products two weeks after the first dose, especially in sheep immunized with 200 µg and 400 µg of immunogen. After challenge, FhES-specific total IgG levels increased in all the experimental animals, with a peak at weeks 8 to 16 after the first immunization. Of the immunized sheep, the group immunized with 200 µg and 400 µg of rFhLAP-CL1 showed higher antibody titers than the group immunized with 100 µg of rFhLAP-CL1 or control groups, suggesting that the antibody levels were from native antigen-boosted memory B cells and that sequences of epitopes from rFhLAP-CL1 chimeric protein exist in the native molecule. This antibody response elicited by rFhLAP-CL1, coincided with high levels of IgG elicited by CL1 mimotopes evaluated as immunogens in sheep (181–191 aa; YPYTAVEGQCRY) and goats (283–289 aa; RGYIRMA) along with a reduction in fluke burden [21,22].

The analysis of IgG subclasses by indirect ELISA, showed a significant increase in rFhLAP-CL1-specific IgG1 and IgG2 isotypes in all immunized sheep two weeks after the first immunization compared to the adjuvant and infection control groups, suggesting a mixed Th1/Th2 response. The highest IgG1 and IgG2 levels were observed in sheep immunized with the highest concentration of rFhLAP-CL1 chimeric protein, which was related to the highest reduction in worm burdens. Previous studies showed that predom-

inant IgG1 production has been associated with nonprotective Th2 responses in naturally infected sheep and cattle [41]. In contrast, a strong IgG2 response was associated with a low fluke burden in cattle immunized with cathepsin L2 and hemoglobin (Hb) [41]. The mixture Th1/Th2 response induced by chimeric protein could be associated with epitopes contained in CL1. The region 245–264 of CL1 (QTCSPLSVNHAVLAVGYGTQ) overlaps with peptides B7 and B8 that induced a mixed Th1/Th2/Th17 response in mice immunized with both peptides [23]. In this trial, the adjuvant-infected control group elicited a nonprotective response, as indicated by the reduction in fluke burden. Moreover, low levels of rFhLAP-CL1-specific IgG1 and IgG2 were observed in sheep of both control groups, suggesting a Th2 nonprotective response.

Correlation between fluke burden and antibody titers (IgG1 and IgG2) at the time of challenge (4 weeks postpriming) was found when analysis was performed with immunized sheep and control animals, but when analysis was performed by each group or at the time of necropsy, no significant correlations were found. A similar result has been reported by Maggioli (2011), where a significant correlation between antibody titers (IgG and isotypes) and fluke burden was obtained at the time challenge when all animals were included [10]. In contrast, no significant correlation between titers of IgG, IgG1 or IgG2 and fluke burden at time necropsy was observed in cattle immunized with thioredoxin glutathione [38]. The mixed IgG1/IgG2 antibody isotypes in sheep immunized with chimeric protein rFhLAP-CL1 in this trial were associated with protection, and although the role of antibodies in the protection against *F. hepatica* is not clear, this mixed antibody response has been reported in other immunization trials [8,22].

## 5. Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that immunization of sheep with recombinant chimeric protein rFhLAP-CL1 combined with Quil A adjuvant induced moderate protection against *F. hepatica* infection in terms of reduction in fluke burden and reduction in FEC. In addition, a marked humoral immune response was elicited, with production of both IgG1- and IgG2 specific antibodies towards recombinant chimeric protein, suggesting a mixed Th1/Th2 immune response associated with protection. Although at this point, the magnitude of the humoral immune response in immunized animals is unknown, for which serial dilutions are necessary. This moderate protection achieved by this chimeric protein against liver flukes in large animals is a preliminary protection test, and thus more trials with a larger number of animals emulsified with different adjuvants are necessary to determine the potential capacity of the rFhLAP-CL1 protein as a vaccine candidate.

## Financial support

This study was supported by the project PAPIIT- IN 214,915 DGAPA-UNAM as well the scholarship 401,769 granted by the National Council of Science and Technology (CONACYT), México.

## Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.067>.

## References

- [1] Spithill TW, Smooker PM, Sexton JL, Bozas E, Morrison CA, Creaney J. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. First edit. London UK: CABI Publishing; 1999. p. 377–409.
- [2] Mas-Coma S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminthol* 2005;79:207–16.
- [3] Smeal MG, Hall CA. The activity of triclabendazole against immature and adult *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Aust Vet J* 1983;60:329–31. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1983.tb02833.x>
- [4] Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M, et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Vet Parasitol* 2013;195:118–21. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.001>
- [5] Novobilský A, Höglund J. First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2015;5:172–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.07.003>
- [6] Molina-Hernández V, Mulcahy G, Pérez J, Martínez-Moreno Á, Donnelly S, O'Neill SM, et al. *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Vet Parasitol* 2015;208:101–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.004>
- [7] Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T, et al. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* 1996;14:1603–12. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(96\)00147-8](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(96)00147-8)
- [8] Rivera F, Espino AM. Adjuvant-enhanced antibody and cellular responses to inclusion bodies expressing FHSAP2 correlates with protection of mice to *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol* 2016;160:31–8. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.11.002>
- [9] Garza-Cuartero L, Geurden T, Mahan SM, Hardham JM, Dalton JP, Mulcahy G. Antibody recognition of cathepsin L1-derived peptides in *Fasciola hepatica* -infected and/or vaccinated cattle and identification of protective linear B-cell epitopes. *Vaccine* 2018;36:958–68. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.01.020>
- [10] Maggioli G, Acosta D, Silveira F, Rossi S, Giacaman S, Basika T, et al. 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* 2011;29:9057–63. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.020>
- [11] O'Neill SM, Parkinson M, Strauss W, Angles R, Dalton JP. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fascioliasis) in a human population in the Bolivian altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:417–23.
- [12] Marcilla A, De la Rubia JE, Sotillo J, Bernal D, Carmona C, Villavicencio Z, et al. Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:95–100. <https://doi.org/10.1128/cvi.00338-07>
- [13] Acosta D, Cancela M, Piacenza L, Roche L, Carmona C, Tort JF. *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol Biochem Parasitol* 2008;158:52–64. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.11.011>
- [14] Collins PR, Stack CM, O'Neill SM, Doyle S, Ryan T, Brennan GP, et al. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propetide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *J Biol Chem* 2004;279:17038–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308831200>
- [15] Dias DS, Ribeiro PAF, Martins VT, Lage DP, Costa LE, Chávez-Fumagalli MA, et al. Vaccination with a CD4+ and CD8+ T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from *Leishmania infantum* proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis. *Transl Res* 2018;200:18–34. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.05.001>
- [16] Yang W, Jackson DC, Zeng Q, McManus DP. Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. *Vaccine* 2000;19:103–13. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00165-1](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00165-1)
- [17] Jaramillo Ortiz JM, Molinari MP, Gravisaco MJ, Paoletta MS, Montenegro VN, Wilkowsky SE. Evaluation of different heterologous prime-boost immunization strategies against *Babesia bovis* using viral vectored and protein-adjuvant vaccines based on a chimeric multi-antigen. *Vaccine* 2016;34:3913–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.053>
- [18] Shabani SH, Zakeri S, Salமான AH, Amani J, Mehrizi AA, Snounou G, et al. Biological, immunological and functional properties of two novel multi-variant chimeric recombinant proteins of CSP antigens for vaccine development against *Plasmodium vivax* infection. *Mol Immunol* 2017;90:158–71. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.06.033>
- [19] Pinheiro CS, Ribeiro APD, Cardoso FC, Martins VP, Figueiredo BCP, Assis NRG, et al. A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. *Parasite Immunol* 2014;36:303–12. <https://doi.org/10.1111/pim.12118>
- [20] Hernández-Guzmán K, Sahagún-Ruiz A, Vallecillo AJ, Cruz-Mendoza J, Quiroz-Romero H. Construction and evaluation of a chimeric protein made from *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase and cathepsin L1. *J Helminthol* 2016;90:7–13. <https://doi.org/10.1017/s0022149x14000686>
- [21] Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D, Ibarra F, Reyes-Pérez M, Reyes-Vivas H, et al. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology* 2008;135:1437. <https://doi.org/10.1017/s00318200800471x>
- [22] Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A, Utrera-Quintana F, Carreón-Luna L. Cathepsin L1 mimotopes with adjuvant Quil A induces a Th1/Th2 immune response and confers significant protection against *Fasciola hepatica* infection in goats. *Parasitol Res* 2014;113:243–50. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3650-6>
- [23] Rojas-Caraballo J, López-Abán J, Pérez del Villar L, Vizcaíno C, Vicente B, Fernández-Soto P, et al. In vitro and in vivo studies for assessing the immune response and protection-inducing ability conferred by *Fasciola hepatica*-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes. *PLoS ONE* 2014;9:e105323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105323>
- [24] Haqariz O, Sayers G, McCullough M, Garrett M, O'Donovan J, Mulcahy G. The effect of Quil A adjuvant on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine* 2009;27:45–50. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.035>
- [25] Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun* 1999;67:1954–61.
- [26] Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, et al. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol* 1990;145:3905–10.
- [27] Anugraha G, Madhumathi J, Prince PR, Jeya Prita PJ, Khatri VK, Amdare NP, et al. Chimeric epitope vaccine from multistage antigens for lymphatic filariasis. *Scand J Immunol* 2015;82:380–9. <https://doi.org/10.1111/sji.12340>
- [28] Kaba SA, Price A, Zhou Z, Sundaram V, Schnake P, Goldman IF, et al. Immune responses of mice with different genetic backgrounds to improved multiepitope, multitarget malaria vaccine candidate antigen FALVAC-1A. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1674–83. <https://doi.org/10.1128/cvi.00164-08>
- [29] Golden O, Flynn RJ, Read C, Sekiya M, Donnelly SM, Stack C, et al. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine* 2010;28:5551–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.039>
- [30] Buffoni L, Martínez-Moreno FJ, Zafra R, Mendes RE, Pérez-Écija A, Sekiya M, et al. Humoral immune response in goats immunised with cathepsin L1, peroxiredoxin and Sm14 antigen and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 2012;185:315–21. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.09.027>
- [31] Pacheco IL, Abril N, Morales-Prieto N, Bautista MJ, Zafra R, Escamilla A, et al. Th1/Th2 balance in the liver and hepatic lymph nodes of vaccinated and unvaccinated sheep during acute stages of infection with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 2017;238:61–5. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.022>
- [32] Sun H-X, Xie Y, Ye Y-P. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* 2009;27:1787–96. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.091>
- [33] Gauci C, Vural G, Öncel T, Varcasia A, Damian V, Kyngdon CT, et al. Vaccination with recombinant oncosphere antigens reduces the susceptibility of sheep to infection with *Taenia multiceps*. *Int J Parasitol* 2008;38:1041–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.006>
- [34] González-Sánchez ME, Cuquerella M, Alunda JM. Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* with the recombinant rHc23. Effect of adjuvant and antigen dose. *PLoS ONE* 2018;13:e0193118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193118>
- [35] Zafra R, Buffoni L, Martínez-Moreno A, Pérez-Écija A, Martínez-Moreno FJ, Pérez J. A study of the liver of goats immunized with a synthetic peptide of the Sm14 antigen and challenged with *Fasciola hepatica*. *J Comp Pathol* 2008;139:169–76. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.06.004>
- [36] Buffoni L, Zafra R, Pérez-Écija A, Martínez-Moreno FJ, Martínez-Galisteo E, Moreno T, et al. Immune response of goats immunised with glutathione S-transferase and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Int* 2010;59:147–53. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.12.005>
- [37] Raina OK, Nagar G, Varghese A, Prajitha G, Alex A, Maharana BR, et al. Lack of protective efficacy in buffaloes vaccinated with *Fasciola gigantica* leucine aminopeptidase and peroxiredoxin recombinant proteins. *Acta Trop* 2011;118:217–22. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.008>
- [38] Maggioli G, Bottini G, Basika T, Alonzo P, Salinas G, Carmona C. Immunization with *Fasciola hepatica* thioredoxin glutathione reductase failed to confer protection against fasciolosis in cattle. *Vet Parasitol* 2016;224:13–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.007>
- [39] Pérez-Caballero R, Siles-Lucas M, González-Miguel J, Martínez-Moreno FJ, Escamilla A, Pérez J, et al. Pathological, immunological and parasitological study of sheep vaccinated with the recombinant protein 14–3–3z and experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Immunol Immunopathol* 2018;202:115–21. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.07.006>
- [40] De Bont J, Claerebout E, Riveau G, Schacht AM, Smets K, Conder G, et al. Failure of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental *Fasciola hepatica* infection. *Vet Parasitol* 2003;113:135–44.
- [41] Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, et al. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 1998;16:932–9. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(97\)00289-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(97)00289-2)

# Motility of *Fasciola hepatica* miracidia assessed with a computer-assisted sperm analyser

A. Villa-Mancera<sup>1\*</sup>, A. Reynoso-Palomar<sup>1</sup>, J. Olivares-Pérez<sup>2</sup>,  
S. Ortega-Vargas<sup>3</sup>, I. Cruz-Mendoza<sup>3</sup> and H. Quiroz-Romero<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tecamachalco Puebla, México: <sup>2</sup>Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero, Ciudad Altamirano, Guerrero, México: <sup>3</sup>Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México

(Received 8 July 2013; Accepted 11 March 2014; First Published Online 23 April 2014)

## Abstract

The motility parameters of *Fasciola hepatica* miracidia were assessed at different temperatures and times post-hatching using computer-assisted sperm analysis. Eggs were incubated at 22°C or 25°C for 14 days. Five motion parameters were evaluated at different incubation temperatures up to 10 h post-hatching. No differences were observed in the percentage that hatched after incubation at the two different temperatures. However, the straight-line velocity of miracidia following incubation at 22°C was significantly different from that observed at 25°C ( $P < 0.01$ ). All miracidium motion parameters at different post-hatching temperatures showed an overall decrease at the end of the experiment. Those miracidia hatching from eggs incubated at 25°C had a higher velocity of 1673.3  $\mu\text{m/s}$  compared with 1553.3  $\mu\text{m/s}$  at 22°C. Velocity parameters increased as the post-hatching temperature increased from 22°C to 37°C.

## Introduction

Fasciolosis or liver fluke disease is caused by *Fasciola hepatica*, the common liver fluke, which is recognized as one of the most important parasitic helminths affecting a wide range of mammals. Fasciolosis causes annual losses worldwide of more than US\$3 billion per year from the agricultural sector (Spithill *et al.*, 1999). Human infection is estimated to be between 2.4 and 17 million individuals and is an increasing global health problem (Keiser & Utzinger, 2009). Human and animal hosts become infected through drinking contaminated water or ingesting vegetation contaminated with metacercariae. These metacercariae then undergo excystation, releasing newly excysted juveniles that penetrate the intestinal wall to

enter the peritoneal cavity, subsequently migrating through the liver capsule into the parenchyma. Within the major bile ducts the parasites mature and start to release embryonated eggs that are carried into the environment with the bile juices and faeces. Eggs reach a freshwater habitat and development is temperature dependent. When the eggs hatch on exposure to light, the ciliated miracidia swim actively to penetrate the snail host and asexual reproduction occurs prior to cercarial development. Cercariae penetrate out of the snail and then swim to nearby vegetation where they then encyst, transforming into metacercariae (Andrews, 1999; Mas-Coma *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2010).

Computer-assisted sperm analysis (CASA) improves the objectivity, accuracy and efficiency of the evaluation of sperm motion. Using digital images of each sperm track, CASA machines are able to analyse, by processing algorithms, the motion properties of spermatozoa.

\*E-mail: abel.villa@gmail.com

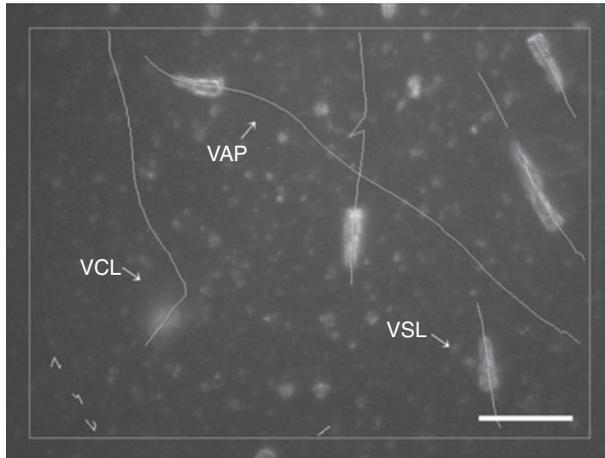


Fig. 1. Tracks of miracidia of *Fasciola hepatica* to show curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL) and average path velocity (VAP) using the computer-assisted sperm analyser. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ .

The aim of the present study was to evaluate the motility parameters of miracidia at different temperatures and times post-hatching using CASA.

## Materials and methods

### *In vitro* cultures and hatching of eggs

Adult *F. hepatica* collected from the bile ducts of naturally infected cattle livers on the day of slaughter were washed six times in 0.01 M phosphate-buffered saline, at pH 7.2, and incubated overnight at 37°C. Eggs were incubated with tap water in complete darkness at 22°C or 25°C for 14 days (Alvarez *et al.*, 2009; Villa-Mancera & Méndez-Mendoza, 2012). They were examined microscopically for evidence of miracidium development. Eggs were exposed to the light of a 100 W lamp for 15 min to stimulate the hatching of miracidia (Andrews, 1999; Fairweather *et al.*, 2012).

Table 1. The effect of incubation at 22°C and 25°C on the curvilinear (VCL), straight line (VSL) and average path (VAP) velocities of miracidia of *Fasciola hepatica* for up to 10 h post-hatching; velocities given in  $\mu\text{m/s}$  and mean values as  $\pm$  SD; with \*level of significance at  $P < 0.01$ .

Time post-hatching (h)	Motion parameters and incubation temperatures					
	VCL		VSL		VAP	
	22°C	25°C	22°C	25°C	22°C	25°C
0	1578.6 $\pm$ 32.0	1593.3 $\pm$ 31.7	1553.3 $\pm$ 16.3	1563.3 $\pm$ 16.7	1658.6 $\pm$ 151.4	1673.3 $\pm$ 147.0
1	1308.6 $\pm$ 116.1	1326.7 $\pm$ 101.1	1198.8 $\pm$ 90.5	1217.8 $\pm$ 78.6	1239.9 $\pm$ 83.2	1243.6 $\pm$ 80.3
2	1158.7 $\pm$ 356.3	1263.2 $\pm$ 260.7	970.5 $\pm$ 105.9	1016.0 $\pm$ 130.0	1041.2 $\pm$ 53.4	1045.7 $\pm$ 49.7
3	1065.4 $\pm$ 206.0	1078.5 $\pm$ 204.5	834.7 $\pm$ 78.4	849.1 $\pm$ 79.4	905.4 $\pm$ 33.6	910.07 $\pm$ 29.2
4	1011.0 $\pm$ 287.0	1014.3 $\pm$ 287.4	713.7 $\pm$ 102.3	722.5 $\pm$ 94.3	786.5 $\pm$ 43.0	794.3 $\pm$ 38.9
5	919.3 $\pm$ 198.4	925.4 $\pm$ 199.1	595.1 $\pm$ 77.0	602.5 $\pm$ 70.8	667.0 $\pm$ 41.2	675.4 $\pm$ 35.6
6	951.2 $\pm$ 200.7	954.4 $\pm$ 198.2	401.3 $\pm$ 92.2	405.3 $\pm$ 88.0	545.0 $\pm$ 38.2	549.9 $\pm$ 33.6
7	910.7 $\pm$ 210.5	915.1 $\pm$ 211.7	344.6 $\pm$ 57.9	347.9 $\pm$ 56.2	459.6 $\pm$ 22.1	465.7 $\pm$ 17.2
8	942.0 $\pm$ 255.1	949.1 $\pm$ 253.8	291.0 $\pm$ 49.8	298.3 $\pm$ 46.0	390.7 $\pm$ 19.4	393.7 $\pm$ 17.8
9	791.1 $\pm$ 314.4	794.5 $\pm$ 312.7	207.7 $\pm$ 60.8	210.3 $\pm$ 61.4	340.2 $\pm$ 18.6	343.5 $\pm$ 14.8
10	674.1 $\pm$ 196.9	677.8 $\pm$ 195.5	171.3 $\pm$ 38.6	174.3 $\pm$ 37.5	252.5 $\pm$ 45.0	254.7 $\pm$ 42.5

### Evaluation of miracidial motility

Motion parameters were determined using a CASA system (Ultimate Sperm Analyzer, version 12.21; Hamilton Thorne Biosciences, Massachusetts, USA), consisting of an Olympus BX41 phase-contrast microscope with a 22–37°C heat plate equipped with Ultimate™ software. Miracidia of *F. hepatica* were placed on a warmed slide and covered with a 22  $\times$  22 mm cover slip. Using up to ten microscopic fields, a minimum of 100 miracidia were examined at 20 $\times$  magnification with an Olympus 20  $\times$  0.40 PLAN objective using a negative phase-contrast field, and analysed hourly for up to 10 h. Software setting parameters included frames per second (Hz) 60, number of frames 45, minimum contrast 25, minimum cell size 10 pix, cell size 12 pix, cell intensity 50, slow-static cells with average path velocity (VAP) cut-off 20  $\mu\text{m/s}$  and straight-line velocity (VSL) cut-off 5  $\mu\text{m/s}$ . The studied CASA-derived motility characteristics were curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ , defined as the average velocity measured over the actual point-to-point track followed by the cell), VSL ( $\mu\text{m/s}$ , defined as the average velocity measured in a straight line from the beginning to the end of the track), VAP ( $\mu\text{m/s}$ , defined as the average velocity of the smoothed cell path), linearity of the curvilinear trajectory (ratio of VSL/VCL, %) and straightness (ratio of VSL/VAP, %).

### Data analysis

Data were analysed using the software IBM SPSS 20 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Analysis of variance for repeated measures followed by the Scheffé test was used to evaluate the effect of incubation temperature and time post-hatching on miracidium kinematics. Values are given as means and standard deviations, and are considered significant at  $P \leq 0.05$ .

## Results

Trajectories of miracidia were observed using the CASA system (fig. 1). No significant differences were observed

in the percentage of egg hatching after incubation, with 91.7% and 93.5% hatching at 22°C and 25°C, respectively.

All motility parameters of miracidia showed an overall decrease after 10 h (table 1). A significant decrease in VSL was found following incubation at 22°C. At 0 h those miracidia hatching from eggs incubated at 25°C showed a higher VAP of 1673.3 µm/s, compared with a VSL of 1553.3 µm/s of miracidia that had hatched from eggs incubated at 22°C. No significant differences ( $P > 0.05$ ) were found in VCL and VAP between 22°C and 25°C of incubation. A significant difference between the VSL of miracidia at different incubation temperatures was observed ( $P < 0.01$ ) (table 1).

Analysing the effects of incubation of eggs at 22°C or 25°C for 14 days on miracidium motion parameters at different post-hatching temperatures, the velocity parameters VCL, VSL and VAP increased as the post-hatching temperature increased from 22°C to 37°C (table 2). At 22°C those miracidia hatching from eggs incubated at 25°C showed a higher VAP of 1673.3 µm/s compared with a VSL of 1553.3 µm/s that had hatched from those incubated at 22°C. At the post-hatching temperature of 28°C, VCL and VSL were significantly different ( $P < 0.01$ ) between incubation temperatures of 22°C and 25°C (table 2).

## Discussion

The miracidium is the first free-living larval stage of *F. hepatica*. Its life-span is associated with the depletion of finite energy reserves, thus providing the miracidium with a limited time-span for finding and infecting its molluscan intermediate host before death (Graczyk & Fried, 1999). Miracidia are propelled by cilia and swim in a spiralling movement in the direction of the apical papilla. Tracks of miracidia have been described as practically linear, some showing a tendency to regular undulations with a frequency of about 2 s, wavelength of about 600 µm and amplitude up to a maximum of 80 µm (Wilson & Denison, 1970). These observations are consistent with the parameters VCL, VSL and VAP measured by CASA in the present study. CASA is easy to perform, and provides an objective, rapid and multiple-parameter assessment of miracidial movement.

A miracidium is incapable of snail invasion during its first few minutes of life. However, optimal invasion capability of miracidia is achieved at 1.5–2.0 h after hatching, and then this capacity slowly declines (Graczyk & Fried, 1999). These results are in agreement with the higher miracidium velocity observed in the present study during the first 3 h post-hatching.

There appears to be no evidence that miracidial mortality varies with the pH of water between 6.0 and 8.0 (Smith & Grenfell, 1984). However, miracidial mortality differs according to the temperature of aerated tap water and the age of miracidia. The mean expected life-span of miracidia decreases from about 35 h at 6°C to about 6 h at 25°C (Smith & Grenfell, 1984). At 10°C the mean life-span is about 24 h (Andrews, 1999).

The velocity of miracidia is related to infectivity. Miracidia swimming in circles or taking 30 s to move 1 cm do not infect snails, while those requiring 4–12 s to travel 1 cm are generally infective (Boray, 1969). Although

Table 2. The effect of post-hatching temperatures on the curvilinear (VCL), straight line (VSL) and average path (VAP) velocities of miracidia of *Fasciola hepatica*, together with percentage (%) differences in straightness (STR) and VCL linearity (LIN); velocities given in µm/s and mean values as ± SD, with \* significant at  $p < 0.01$ .

Post-hatching temperature (°C)	Motion parameters and incubation temperatures													
	VCL			VSL			VAP			STR			LIN	
	22°C	25°C		22°C	25°C		22°C	25°C		22°C	25°C		22°C	25°C
22	1578.6 ± 32.0	1593.3 ± 31.7		1553.3 ± 16.3	1563.3 ± 16.7		1658.6 ± 151.4	1673.3 ± 147.0		98.4 ± 2.5	98.1 ± 2.0		94.2 ± 9.1	93.9 ± 8.5
25	1640.5 ± 9.5	1648.0 ± 11.9		1625.6 ± 18.3	1637.3 ± 17.3		1694.1 ± 26.6	1704.0 ± 23.8		99.0 ± 0.8	99.3 ± 0.6		95.9 ± 2.3	96.1 ± 2.2
28	1700.0 ± 14.4	1706.6 ± 10.8*		1686.6 ± 5.4	1696.6 ± 6.6*		1685.3 ± 5.7	1696.6 ± 6.6		99.2 ± 0.6	99.4 ± 0.3		100.0 ± 0.1	100.0 ± 0.0
31	1796.0 ± 45.2	1824.0 ± 28.9		1773.3 ± 11.5	1786.6 ± 13.3		1814.0 ± 22.6	1824.0 ± 25.6		98.7 ± 2.8	97.9 ± 1.9		97.7 ± 1.8	97.9 ± 1.8
34	1884.6 ± 61.1	1893.3 ± 61.8		1887.3 ± 61.8	1896.0 ± 61.3		1900.0 ± 63.0	1925.3 ± 55.4		100.1 ± 0.2	100.1 ± 0.6		99.3 ± 0.1	98.4 ± 1.1
37	2157.3 ± 34.6	2165.3 ± 34.7		2150.0 ± 22.1	2149.3 ± 31.8		2146.9 ± 21.3	2152.0 ± 22.3		99.6 ± 2.1	99.2 ± 2.2		100.1 ± 1.6	99.8 ± 1.7

miracidia are capable of covering over 50 m at temperatures between 10 and 15°C (Andrews, 1999), the results of the present study indicate that the potential travel distance in  $\mu\text{m}$  declines with time, so that 10-hour-old miracidia travel at approximately 57, 89 and 85% of the motion parameters VCL, VSL and VAP, respectively, compared with initial velocity. Wilson & Denison (1970) reported a similar result at 7 h post-hatching miracidia, with a 60% reduction in velocity. However, they found that the decrease in speed over the first hours was only 4%, whereas in the present study, velocity decreased between 17% and 26%. If the motion path of a sperm is very regular and linear, VAP is almost identical to VSL (Lu *et al.*, 2013). This observation is in agreement with our study.

At or below 5°C, miracidia are not infective, with the optimum temperature for infection being between 15 and 26°C. A clear inverse relationship has been demonstrated between environmental temperature and the duration of the host-finding capacity of miracidia (Christensen *et al.*, 1976).

Once hatched from the egg the miracidium becomes active, immediately starting to swim at great speed, depending on temperature, ranging from 570  $\mu\text{m}/\text{s}$  at 4.6°C to 1400  $\mu\text{m}/\text{s}$  at 20°C (Wilson & Denison, 1970). Based on our study at higher temperatures of 22°C and 25°C post-hatching, velocity parameters using CASA ranged between 1553.3  $\mu\text{m}/\text{s}$  and 1704.0  $\mu\text{m}/\text{s}$ .

*Fasciola hepatica* eggs from different isolates, after incubation at 25°C, can vary in their duration of incubation period and hatching success (Walker *et al.*, 2006; Canevari *et al.*, 2013). The egg hatch percentage of the Rio Chico (94.8%) and Cajamarca (92.8%) isolates in the present study was similar to those incubated by Canevari *et al.* (2013).

The miracidium is the short-lived, non-feeding, free-living phase in a trematode's life cycle, survival of which is potentially influenced by temperature and intrinsically linked to climate change (Morley & Lewis, 2012). As miracidial energy generation is dependent on endogenous glycogen reserves, at higher temperatures glycogen utilization increases, due to more intense parasite movement, and thereby results in elevated mortality (Boyunaga *et al.*, 2001). Global warming can affect the geographical distribution of parasitic diseases, with potentially drastic consequences for their hosts. However, the role of temperature in influencing parasite transmission is still being evaluated, with differing interpretations of its effects (Poulin, 2006; Morley & Lewis, 2012).

CASA improves the objectivity, accuracy and efficiency of the evaluation of motion of miracidia at different temperatures. The effect of temperature on miracidium motility is an important factor influencing transmission viability, and its incorporation into future assessments of the effects of global climate change on the dynamics of host-trematode infections could be useful.

### Financial support

This study was partially supported by the Mexican National Council of Science and Technology (CONACyT)

and Meritorious Autonomous University of Puebla (VIEP-VIMA-NAT-14-I).

### Conflict of interest

None.

### References

- Alvarez, L., Moreno, G., Moreno, L., Ceballos, L., Shaw, L., Fairweather, I. & Lanusse, C. (2009) Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. *Veterinary Parasitology* **164**, 211–216.
- Andrews, S.J. (1999) The life cycle of *Fasciola hepatica*. pp. 1–29 in Dalton, J.P. (Ed.) *Fasciolosis*. Wallingford, UK, CAB International.
- Boray, J.C. (1969) Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology* **7**, 95–210.
- Boyunaga, H., Schmitz, M.G.J., Brouwers, J.F.H.M., Van Hellemond, J.J. & Tielens, A.G.M. (2001) *Fasciola hepatica* miracidia are dependent on respiration and endogenous glycogen degradation for their energy generation. *Parasitology* **122**, 169–173.
- Canevari, J., Ceballos, L., Sanabria, R., Romero, J., Olaechea, F., Ortiz, P., Cabrera, M., Gayo, V., Fairweather, I., Lanusse, C. & Alvarez, L. (2013) Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. *Journal of Helminthology* **19**, 1–7.
- Christensen, N.Ø., Nansen, P. & Frandsen, F. (1976) The influence of temperature on the infectivity of *Fasciola hepatica* miracidia to *Lymnaea truncatula*. *Journal of Parasitology* **62**, 698–701.
- Fairweather, I., McShane, D.D., Shaw, L., Ellison, S.E., O'Hagan, N.T., York, E.A., Trudgett, A. & Brennan, G.P. (2012) Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: proof of concept. *Veterinary Parasitology* **183**, 249–259.
- Graczyk, T.K. & Fried, B. (1999) Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. pp. 31–46 in Dalton, J.P. (Ed.) *Fasciolosis*. Wallingford, UK, CAB International.
- Keiser, J. & Utzinger, J. (2009) Food-borne trematodiasis. *Clinical Microbiology Reviews* **22**, 466–483.
- Lu, J.C., Huang, Y.F. & Lü, N.Q. (2013) Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia* **46**, 329–338.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D. & Valero, M.A. (2007) Plant-borne trematode zoonoses: fascioliasis and fasciolopsiasis. pp. 293–334 in Murrell, K.D. & Fried, B. (Eds) *Food-borne parasitic zoonoses. Fish- and plant-borne parasites*. New York, Springer.
- Morley, N.J. & Lewis, J.W. (2012) Thermodynamics of cercarial development and emergence in trematodes. *Parasitology* **140**, 1211–1224.
- Poulin, R. (2006) Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology* **132**, 143–151.

- Smith, G. & Grenfell, B.T.** (1984) The influence of water temperature and pH on the survival of *Fasciola hepatica* miracidia. *Parasitology* **88**, 97–104.
- Spithill, T.W., Smooker, P.M. & Copeman, D.B.** (1999) *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. pp. 465–525 in Dalton, J.P. (Ed.) *Fasciolosis*. Wallingford, UK, CAB International.
- Villa-Mancera, A. & Méndez-Mendoza, M.** (2012) Protection and antibody isotype responses against *Fasciola hepatica* with specific antibody to pIII-displayed peptide mimotopes of cathepsin L1 in sheep. *Veterinary Journal* **194**, 108–112.
- Walker, S.M., Hoey, E., Fletcher, H., Brennan, G., Fairweather, I. & Trudgett, A.** (2006) Stage-specific differences in fecundity over the life-cycle of two characterized isolates of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* **133**, 209–216.
- Wilson, R.A. & Denison, J.** (1970) Studies on the activity of the miracidium of the common liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **32**, 301–313.
- Young, N.D., Hall, R.S., Jex, A.R., Cantacessi, C. & Gasser, R.B.** (2010) Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* – a key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite. *Biotechnology Advances* **28**, 222–231.

## Protección, función hepática y respuesta inmune humoral de ovinos vacunados con mimotopos de catepsina L1 y L2 infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*

Protection, liver function and humoral immune response in sheep vaccinated with mimotopes of cathepsin L1 and L2 experimentally infected with *Fasciola hepatica*

H Quiroz-Romero<sup>a\*</sup>, D Correa<sup>b</sup>, D Castillo-Mata<sup>c</sup>, S Ortega-Vargas<sup>a</sup>, A Villa-Mancera<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

<sup>b</sup>Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, México, D.F.

<sup>c</sup>Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

<sup>d</sup>División de Biotecnología Veterinaria y Biología Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tecamachalco Puebla, México.

### SUMMARY

Protection, liver function and humoral immune response were assessed in sheep vaccinated with mimotopes of cathepsin L1 and/or L2 and challenged with *Fasciola hepatica* metacercariae. Twenty sheep were randomly allocated in four groups of five animals each, for immunization with  $1 \times 10^{14}$  phage particles of cathepsin L1 (YVYRWVEAECVA), cathepsin L2 (YVYEGRSRVRPP), cathepsin L1/L2 (YVYRWVEAECVA and YVYEGRSRVRPP) and phosphate buffered saline (PBS, control group), without adjuvant at weeks 0 and 2. All groups were challenged with 300 metacercariae at week 6 and slaughtered at week 22. Sheep vaccinated with cathepsin L1 mimotopes had a reduction in fluke burden of 50.11% when compared to control group, whereas animals vaccinated with cathepsin L2 and L1/L2 the reduction was 35.82% and 13.85% respectively. This difference was not significant. Animals receiving cathepsin L2 and L1/L2 showed a significant reduction in eggs output. The sheep vaccinated with phage clones produced significantly higher titres of IgG antibodies than the sheep in the control group. No significant differences in serum glucose, levels of GLDH and GGT were observed between the control group and the vaccinated sheep.

*Key words:* *Fasciola hepatica*, sheep, phage display vaccine, cathepsin L.

### RESUMEN

Protección, función hepática y respuesta inmune humoral fueron evaluadas en ovinos vacunados con mimotopos de catepsina L1 y/o L2 y desafiados con metacercarias de *Fasciola hepatica*. Veinte ovinos fueron asignados al azar en cuatro grupos de cinco animales cada uno, para ser inmunizados con  $1 \times 10^{14}$  partículas de fagos de catepsina L1 (YVYRWVEAECVA), catepsina L2 (YVYEGRSRVRPP), catepsina L1/L2 (YVYRWVEAECVA y YVYEGRSRVRPP) y amortiguador de fosfato salino (PBS, grupo control), sin adyuvante en las semanas 0 y 2. Todos los grupos fueron desafiados con 300 metacercarias en la semana 6 y sacrificados en la semana 22. La vacunación de ovinos con mimotopos de catepsina L1, indujo una reducción de la carga parasitaria de 50,11% en comparación con el grupo control, mientras que los animales vacunados con catepsina L2 y L1/L2 fue de 35,82% y 13,85% respectivamente; esta diferencia no fue significativa. Los animales que recibieron catepsina L2 y L1/L2 mostraron una reducción significativa en la producción de huevos. Los ovinos vacunados con clones de fagos producen títulos de anticuerpos IgG significativamente más altos que el grupo control. No hubo diferencias significativas en glucosa sérica, niveles de GLDH y GGT entre el grupo control y ovinos vacunados.

*Palabras clave:* *Fasciola hepatica*, ovinos, vacunación con fagos filamentosos, catepsina L.

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad parasitaria conocida como fasciolosis o distomatosis hepática es causada por el trematodo *Fasciola hepatica* en varias especies de mamíferos. En humanos, más de 90 millones de personas están en riesgo

de infección y entre 2,4-17 millones de individuos están infectados con *F. hepatica* a nivel mundial (Keiser y Utzinger 2009). Esta enfermedad ha emergido como un importante patógeno en seres humanos en países como Bolivia, Perú, Ecuador, Egipto e Irán (O'Neill y col 1998, Rokni y col 2002, Mas-Coma y col 2005). Los hospederos más comunes de este helminto son los ovinos y los bovinos siendo una de las parasitosis más importantes en regiones templadas y tropicales en todo el mundo (Behn y Sangster 1999). La fasciolosis es una enfermedad para-

Aceptado: 26.09.2013.

\* hquiroz@unam.mx

sitaria de gran impacto económico, estimándose pérdidas por más de 3 mil millones de dólares por año (Spithill y col 1999).

El triclabendazol es la droga más efectiva contra estadios juveniles y maduros del parásito, se ha reportado ampliamente resistencia del helminto a este fasciolicida (Boray y col 1983, Fairweather 2009, Hanna y col 2013, Ortiz y col 2013). Otras medidas de control, particularmente vacunación, son necesarias para reducir la prevalencia de *F. hepatica* en animales domésticos, así como el riesgo zoonótico.

*Fasciola hepatica* secreta varias cisteínas o tiol proteasas durante su ciclo de vida en los hospederos definitivos (Dalton y Heffernan 1989). Las catepsinas son las principales enzimas proteolíticas secretadas por el estadio larvario infectivo para atravesar la pared intestinal del hospedero (catepsinas B y L3), estadios migratorios para invadir tejido del hígado (catepsinas L1, L2, L3, L5 y B), así como parásitos adultos maduros que residen en los conductos biliares (catepsinas L1, L2 y L5) para alimentarse de sangre del hospedero (Kasny y col 2009, Robinson y col 2009, Morphew y col 2011, Stack y col 2011). También se ha demostrado que las proteasas del parásito participan en la producción de huevos y evasión de la respuesta inmune (Dalton y col 2003, Smooker y col 2010, McVeigh y col 2012).

Experimentos de vacunación en animales de laboratorio y rumiantes, utilizando moléculas purificadas nativas o recombinantes de catepsina L han demostrado inducir respuestas protectoras (McManus y Dalton 2006, Kesik y col 2007, Kašn y col 2009, Pérez-Ecija y col 2009, Golden y col 2010).

La tecnología de despliegue en fagos o *phage display* es una herramienta útil para identificar péptidos que mimetizan epitopos de antígenos (mimotopos) (Devlin y col 1990, Sidhu y Koide 2007). Las bibliotecas de péptidos aleatorios han sido usadas exitosamente en el desarrollo de vacunas contra *Plasmodium vivax* (Demangel y col 1996), *Plasmodium yoelii* (Narum y col 2006), *Schistosoma japonicum* (Wu y col 2006), *Taenia solium* (Guo y col 2010, Gazarian y col 2012), *Rhipicephalus microplus* (Prudencio y col 2010) y *Fasciola hepatica* (Villa-Mancera y col 2008, Villa-Mancera y Méndez-Mendoza 2012). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la vacunación de ovinos con mimotopos de catepsina L1 y L2 contra *Fasciola hepatica* sobre la carga parasitaria, producción de huevos, función hepática y respuesta inmune humoral.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### SELECCIÓN DE PÉPTIDOS DE UNA BIBLIOTECA DE DESPLIEGE EN FAGOS (*PHAGE DISPLAY*)

Las clonas de fagos filamentosos fueron obtenidas como se ha descrito previamente (Villa-Mancera y col

2008). Los pozos de una placa de ELISA (Nunc-Immuno Plate F96, Cert, Maxisorp), fueron cubiertos con 150 µg/mL de IgG anti-catepsina purificadas de conejo en 100 µl de amortiguador de fosfato salino (PBS), pH 7,3, y cubierta en un contenedor húmedo para evitar evaporación e incubada toda la noche en agitación a 4°C. Posteriormente los pozos fueron bloqueados con 300 µl de amortiguador de bloqueo (PBS conteniendo albumina sérica bovina [BSA] al 1%) durante 1 hora a 4°C. Después de lavar seis veces con 200 µl de PBS-T (PBS conteniendo Tween-20 al 1%), se añadieron  $1,0 \times 10^{11}$  partículas de fagos de una biblioteca combinatoria (M13) que expone aleatoriamente péptidos de 12 aminoácidos en la región N-terminal fusionado con la proteína III (New England Biolabs, USA), en 100 µl de PBS-T, incubándose por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Los fagos que no se unieron fueron removidos lavando con 200 µl de PBS-T al 0,1% por 10 ocasiones. Los fagos que se unieron fueron incubados con 100 µl de glicina-HCl 0,2 M, pH 2,2 por 10 minutos a temperatura ambiente y neutralizados con Tris-HCl 1M, pH 9,0. Una pequeña fracción fue usada para titulación, el resto fue utilizado para infectar células de la cepa de *E. coli* ER2738 (New England Biolabs, USA) para la amplificación del fago. Se llevaron a cabo otras tres rondas de selección por afinidad, el primero utilizando 150 µg/mL de IgG purificada y por último utilizando 75,0 y 37,5 µg/mL de IgG anti-catepsina purificada. Los fagos eluidos fueron adicionados a la cepa de *E. coli* ER2738 en el medio de cultivo 2XYT, por 4,5 horas a 37°C en agitación constante y sembradas en una caja de Petri con agar LB y Xgal-IPTG. Las cajas Petri se incubaron toda la noche a 37°C y posteriormente 36 clonas fueron picadas al azar, cada clona seleccionada fue amplificada, purificada y titulada para ser secuenciada.

### PROTOCOLO DE VACUNACIÓN

Veinte ovinos pelibuey de un año de edad fueron adquiridos del Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México, y mostraron estar libres de la infección por análisis de heces (detección de huevos por la técnica de sedimentación) y anticuerpos contra los productos de excreción secreción (E/S) de *F. hepatica* en suero por ELISA (Villa-Mancera y col 2008). Los 20 ovinos fueron distribuidos al azar en 4 grupos de 5 animales. El grupo 1 (n = 5) fue vacunado con  $1 \times 10^{14}$  partículas de fagos de catepsina L1 (YVYRWVEAECVA), el grupo 2 (n = 5) recibió  $1 \times 10^{14}$  partículas de fagos de catepsina L2 (YVYEGRSRVRPP), el grupo 3 (n = 5) fue inmunizado con  $1 \times 10^{14}$  partículas de fagos de catepsina L1 y L2 (YVYRWVEAECVA y YVYEGRSRVRPP), y el grupo 4 (n = 5) control recibió PBS estéril. Cada animal recibió la primera inyección por vía subcutánea y sin ningún adyuvante en la semana 0. Una segunda inyección fue administrada a los 28 días (semana 4).

#### TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE

Se colectó sangre completa en tubos vacutainer y sin anticoagulante de la vena yugular de cada ovino, ésta fue centrifugada a 2.000 rpm a 4 °C por 10 minutos y guardada a -20 °C hasta su uso. Las muestras fueron obtenidas cada 2 semanas desde la semana 0 y hasta el fin del experimento (semana 22).

#### CONTEO DE HUEVOS EN HECES

Las muestras de heces fueron colectadas semanalmente del recto de los animales inmunizados y del grupo control. Cinco gramos de cada muestra de heces fue procesada por la técnica de sedimentación como es descrita por Sexton y col (1990). Los huevos de *F. hepatica* fueron expresados como el número de huevos por gramo de heces (hpg).

#### DESAFÍO CON PARÁSITOS

Las cercarias de *F. hepatica* fueron liberadas de caracoles *Lymnaea cubensis* y guardadas a 4 °C. Las cápsulas de gelatina conteniendo las metacercarias (menos de 2 meses de edad) fueron administradas *per os* a cada animal con unas pinzas esofágicas. Cada ovino recibió 300 metacercarias 14 días después de la segunda inmunización (semana 6).

#### MEDICIÓN DE LA PROTECCIÓN

Todos los ovinos fueron sacrificados en la semana 22 posterior a la primera inmunización. En la necropsia, las vesículas biliares fueron abiertas en búsqueda de helmintos, los conductos biliares del hígado fueron cortados y los trematodos retirados con pinza roma. El hígado se cortó en trozos pequeños para la recolección de los parásitos restantes.

#### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y GLUCOSA SÉRICA

Glutamato deshidrogenasa (GDH, indicativo de daño a parénquima hepático), gamma glutamil transferasa (GGT, indicativo de daño a conductos biliares) y glucosa fueron determinadas utilizando kits comerciales (Randox Laboratories Ltd, Antrim, UK; Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA, USA), en un analizador de química Vitlab Selectra Junior (Vital Scientific, The Netherlands).

#### RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR MIMOTOPOS ANTI-CATEPSINA L1 Y L2

Los pozos de una placa de ELISA fueron cubiertos con 10<sup>10</sup> partículas de fagos que fueron diluidos en PBS/BSA 0,2% e incubados toda la noche a 4 °C en agitación. Los pozos fueron lavados en cuatro ocasiones con PBS/Tween-20 al 0,1% y bloqueados con 200 µl de PBS conteniendo BSA al 1% por 1 hora a 37 °C. Nuevamente fueron lavados los

pozos en cuatro ocasiones. Posteriormente se incubó suero de ovino inmunizado a una dilución de 1:400 en PBS/BSA 0,2%-Tween 0,2% 1 hora a 37 °C. Se adicionó el anticuerpo anti-ovino-HRP (Serotec Ltd, Oxford, UK) en amortiguador de bloqueo (PBS/BSA 1%) en un volumen final de 200 µl por pozo, incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente sin agitación. La unión específica de los fagos fue visualizada utilizando Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma, USA), utilizando un volumen de 200 µl por pozo. Se utilizó como control negativo PBS. La absorbancia fue determinada a 450 nm en un lector de ELISA (Biotek ELx800). Así mismo, para los productos de E/S (30 µg/mL) se empleó un ELISA indirecto (descrito anteriormente) con una dilución de suero de ovino de 1:800.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las medias aritméticas y desviación estándar fueron calculadas para la carga parasitaria, número de huevos en heces, actividad enzimática (GGT y GDH), glucosa y valores de los ELISA de los grupos vacunados y control. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para confirmar normalidad. Para comparar los resultados entre grupos, se utilizó una prueba t de Student cuando la distribución fue normal y U de Mann-Whitney cuando la distribución no fue paramétrica. Para todas las pruebas se utilizó el programa IBM SPSS versión 20 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). Una  $P \leq 0,05$  fue considerada como significativa.

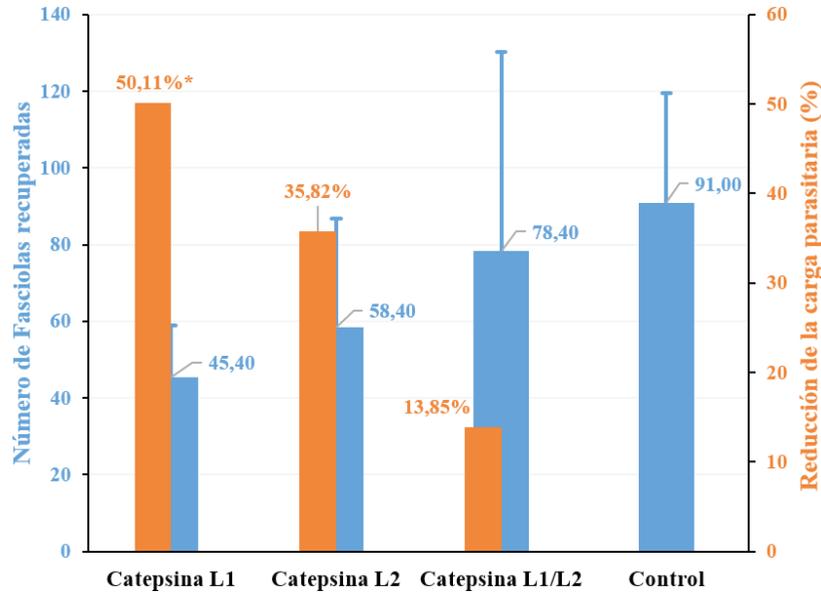
#### RESULTADOS

##### CARGA PARASITARIA DE ANIMALES INMUNIZADOS CON MIMOTOPOS DE CATEPSINA L

Veintidós semanas después del inicio del experimento, los animales fueron sacrificados y los parásitos presentes en la vesícula biliar e hígado fueron contados (figura 1). El porcentaje de fasciolas recuperadas del grupo control fue en promedio 30,33% del total de 300 metacercarias administradas en la semana 6 del experimento. La inmunización de ovinos usando clones de mimotoPOS de catepsina L1 sin adyuvante resulta en porcentajes de reducción significativas de la carga parasitaria de 50,11% ( $P < 0,05$ ), comparado con el grupo control. Sin embargo, el grupo de animales inmunizados con catepsina L2 y una combinación de catepsina L1 y L2 no indujeron una protección significativa (35,82% y 13,85%,  $P > 0,05$ ).

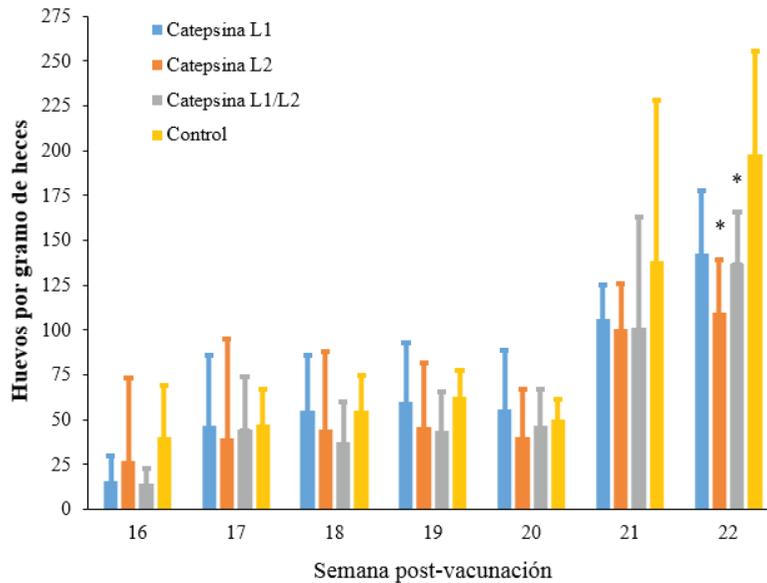
##### CONTEO DE HUEVOS EN HECES

Se colectaron muestras de heces de ovinos inmunizados para su análisis coproparasitológico semanalmente, a partir de la semana 0 y hasta el sacrificio (semana 22). Los primeros huevos aparecen en las heces de los ovinos a partir de la semana 10 posterior a la infección con metacercarias del parásito (figura 2). El análisis de la producción



**Figura 1.** Reducción de la carga parasitaria de ovinos vacunados con mimotopos de catepsina L de *Fasciola hepatica*. \*Diferencias significativas en comparación con el grupo control (P < 0,05).

Reduction of parasite burden of sheep vaccinated with cathepsin L mimotopes of *Fasciola hepatica*. \* Significant differences versus control group (P < 0.05).



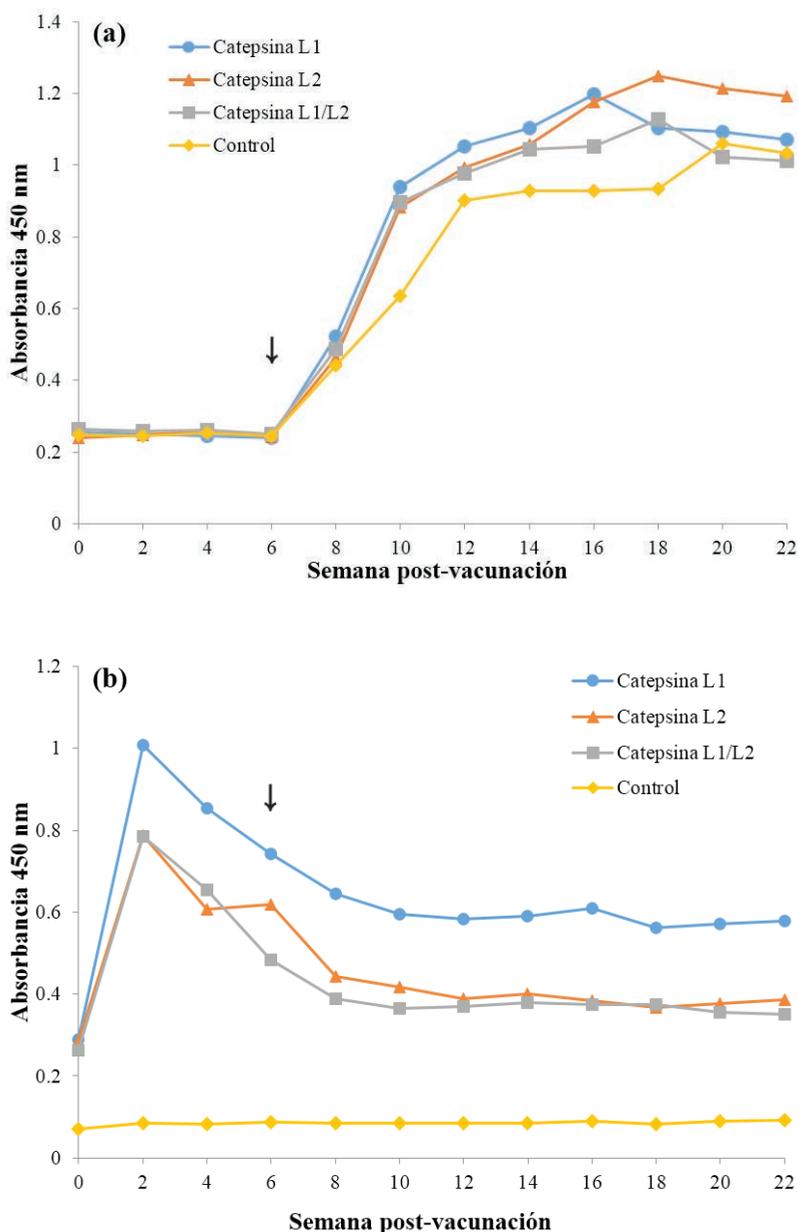
**Figura 2.** Media geométrica del número de huevos en heces de cada grupo durante el período de estudio. \*Diferencias significativas en comparación con el grupo control (P < 0,05).

Geometric mean fecal egg counts from each group during the study period. \*Significant differences versus control group (P < 0.05).

de huevos de *F. hepatica* por gramo de heces muestra una reducción significativa del 44,50% (P < 0,05) para el grupo vacunado con catepsina L2 en la semana 22 del estudio, comparado con el grupo control. Para el grupo de ovinos inmunizados con catepsina L1, la reducción promedio fue del 27,85%, y para catepsina L1/L2 30,78% (P < 0,05).

RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR MIMOTOPOS DE CATEPSINA L

La figura 3a muestra la dinámica de la respuesta de los anticuerpos contra los fagos filamentosos al utilizar en el ELISA como antígeno los productos de E/S de *F. hepa-*



**Figura 3.** Análisis por ELISA de la IgG inducida por mimotopos de catepsina L1, L2 y L1/L2. Se utilizó como antígeno los productos de E/S de *F. hepatica* (a) y las clonas empleadas para la vacunación de ovinos (b). Los ovinos fueron inmunizados con  $1 \times 10^{14}$  partículas de fagos sin adyuvante, en la semana 0 y 4. La flecha indica la semana de la infección experimental. Cada punto representa la media de 5 animales.

Analysis by ELISA of IgG induced by mimotopes of cathepsin L1 and/or L2. Excretion/secretion products was used as antigen (a), and clones used for vaccination of sheep. Sheep were given two immunizations at 0 and 4 week with  $1 \times 10^{14}$  phage particles without adjuvant. Week of experimental infection is indicated by the arrow.

*tica*. Una baja respuesta de anticuerpos aparecen en el suero de ovinos inmunizados dentro de las 6 semanas posteriores a la primera inmunización y muestran un marcado incremento después de la infección con metacercarias en la semana 6. Los niveles de respuesta de los anticuerpos inducidos por los mimotopos de catepsina L1 y/o L2 fueron más elevados que los producidos en el grupo control.

Los valores de las absorbancias de los ELISA muestran que los ovinos inmunizados con los mimotopos de catepsina L1, L2 y L1/L2, desarrollan anticuerpos IgG circulantes contra los fagos filamentosos, alcanzando un pico máximo dos semanas después de la primera inmunización (figura 3b). Esta respuesta desciende y permanece relativamente constante hasta el fin del experimento (semana 22). Se observó una fuerte respuesta de anticuerpos

inducidos en animales vacunados con catepsina L1. Los ovinos vacunados con catepsina L2 y L1/L2 mostraron una menor respuesta inmune humoral.

#### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y GLUCOSA SÉRICA

La actividad plasmática de las enzimas GLDH y GGT, así como glucosa permanecen dentro del rango normal para todos los grupos previo al desafío con metacercarias de *F. hepatica* en la semana 6 (figura 4a-c). La actividad de la GGT se eleva dos semanas después de la infección con los parásitos, alcanzando un pico en la semana 16 y disminuyendo hasta la semana 22. Dos semanas después del desafío (semana 6), existe un pequeño incremento en la actividad de la GLDH, alcanzando un nivel máximo en la semana 10, reduciéndose posteriormente estos valores hasta el final del experimento. Los niveles de glucosa permanecen relativamente constantes hasta la semana 10, disminuyendo estos valores entre la semana 12 y 14, aumentando al final del estudio. No hubo diferencias significativas entre los grupos de animales vacunados y el grupo control.

#### DISCUSIÓN

Existen numerosos estudios utilizando moléculas nativas purificadas o recombinantes como candidatos de vacunación contra *F. hepatica* (Hillyer 2005, Manus y Dalton 2006). Entre estas moléculas se encuentran las catepsinas L, las cuales son secretada en abundantes cantidades por el trematodo para facilitar la sobrevivencia en el hospedero, por lo cual es deseable aislar los motivos de inmunización con propósitos de vacunación. Mientras que las catepsinas L nativas pueden ser purificadas en cantidades suficientes para pruebas experimentales, una producción a gran escala requiere un sistema factible (Dalton y col 2003). Las bibliotecas de fagos filamentosos han sido empleadas para seleccionar péptidos que mimetizan mimotopos de antígenos y que pueden ser utilizados como candidatos en el desarrollo de vacunas en el área de parasitología (Ellis y col 2012).

La vacunación de ovinos con dos mimotopos de catepsina (L1 y L2) y un mimotopo de catepsina L2 ubicado en la región media y amino terminal de la molécula nativa no se ha reportado. La inmunización de ovinos con mimotopos de catepsina L1 y L2 indujeron niveles de protección de 50,11 y 35,82% respectivamente, cuando éstas fueron administradas separadamente; el alineamiento con la catepsina L1 y L2 madura sugiere ser un epitopo conformacional, por lo que los anticuerpos contra este péptido pueden estar jugando directamente un papel protector. La unión de la IgG de conejo anti-catepsina L1 a la proteasa *in vitro* resulta en la inhibición de la capacidad para romper moléculas de IgG que median la unión de los eosinófilos al parásito (Smith y col 1994).

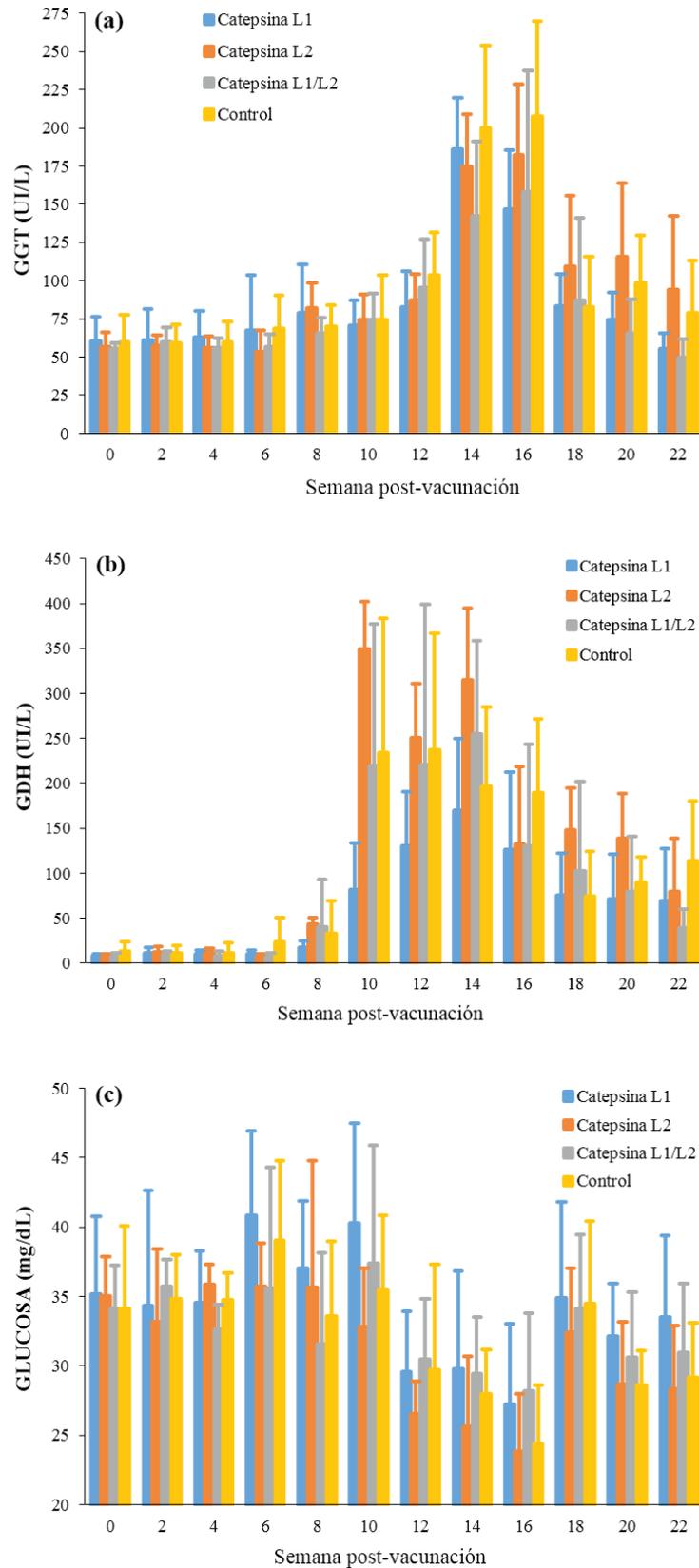
Además, se observó una reducción en el número de huevos en heces de 27,85 a 44,50% en animales vacu-

nados con los bacteriófagos. La actividad de catepsina L posiblemente fue bloqueada debido a la inducción de anticuerpos afectando la producción de huevos. La inmunización con cada mimotopo de catepsina L1 y/o L2 indujo un efecto único en la carga parasitaria y el número de huevos producidos. En el primer reporte de vacunación en ovinos con catepsina L nativa, el número de huevos en heces se redujo en 69,7%, sin tener un efecto sobre la carga parasitaria (Wijffels y col 1994). La inmunización de ovinos con catepsina L1 o L2 nativa contra *F. hepatica* indujo niveles de protección de 33 y 34% en la carga parasitaria, así como reducciones en el número de huevos producidos de 71 y 81% respectivamente; mientras que la administración en conjunto de catepsina L1 y L2 indujo una reducción del 60% de la carga parasitaria (Piacenza y col 1999). La expresión de catepsina L1 recombinante en *Pichia pastoris* para pruebas de vacunación indujo protección de 35 a 45% en borregos con un efecto en la fecundidad del parásito de 50% (McManus y Dalton 2006). El nivel de protección inducido con los mimotopos de fagos filamentosos estuvo dentro del rango reportado con el uso de otros inmunógenos más grandes y costosos.

Ovinos infectados experimentalmente con metacercarias de *F. hepatica* han mostrado porcentajes de implantación entre 26,4 y 39,0% (Wijffels y col 1994, Piacenza y col 1999, Raadsma y col 2007); en este estudio, el porcentaje de implantación promedio en el grupo control fue de 30,33%. Para los grupos de animales vacunados con catepsina L1, L2 y L1/L2 los porcentajes de implantación (15,13, 19,46 y 26,13% respectivamente) fueron similares a los reportados en trabajos previos (rango de 14,6 a 26,4%) (Wijffels y col 1994, Piacenza y col 1999, Villa-Mancera y Méndez-Mendoza 2012).

Las clonas de catepsina L utilizadas en este estudio inducen una respuesta alta de IgG y de magnitud significativa contra los productos de E/S. Además, el desafío con metacercarias indujo un aumento en la respuesta en esos grupos, lo cual sugiere que los niveles de anticuerpos fueron amplificados en respuesta a linfocitos B de memoria y que estos epitopos existen en la molécula nativa. Por otro lado, los anticuerpos producidos en respuesta a las clonas, inducen una respuesta de IgG característica posterior a la primera inmunización, alcanzando los títulos un pico en la semana 2 y disminuyendo hasta el final del experimento. Sin embargo, sólo se observó un segundo pico característico, posterior a una segunda inmunización o refuerzo en el grupo de ovinos vacunados con catepsina L2.

Animales infectados con metacercarias de *F. hepatica* producen IgG1, elicitando una respuesta TH2 no protectora (Mulcahy y col 1999, O'Neill y col 1998, Hoyle y col 2003). La subclase de anticuerpos (IgG1, IgG2) producidos posterior a la vacunación, puede determinar el mecanismo efector para eliminar la infección. Ovinos y bovinos vacunados con catepsina L tienen una correlación positiva entre carga parasitaria y títulos altos de



**Figura 4.** Análisis cinético de las actividades de gamma glutamil transferasa (GGT) (a), glutamato deshidrogenasa (GDH) (b) y glucosa (c) de animales vacunados con mimotopos de catepsina L y PBS (grupo control).

Kinetic analysis of activities of gamma glutamyl transferase (GGT) (a), glutamate dehydrogenase (GDH) (b) and glucose (c) of animals vaccinated with cathepsin L mimotopes and PBS (control group).

anticuerpos IgG1 e IgG2, indicando que la protección está asociada con la inducción de una respuesta TH1 o balance Th1/Th2 (Mulcahy y col 1998, Villa-Mancera y Mendez-Mendoza 2012).

Los datos presentados demuestran que los mimotopos de cathepsina L inducen una respuesta inmune protectora contra la infección de *F. hepatica*. Estos resultados son alentadores en términos de desarrollo de vacunas debido a la simplicidad relativa en la selección y corta longitud de los péptidos. La potenciación de la respuesta inmune a los mimotopos utilizando adyuvantes apropiados podría ser investigada. Además, las clonas de fagos de la misma enzima o de diferentes moléculas como antígenos pueden ser usados en conjunto para incrementar el nivel de protección. Por otro lado, la reducción de la carga parasitaria, número de huevos en heces pueden reducir la morbilidad y mortalidad en el ganado. Una diseminación baja de huevos puede tener un efecto negativo en la contaminación de pasturas y en este sentido en la prevalencia de fasciolosis en zonas endémicas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Proyectos DGAPA-PAPIIT-UNAM IT230011 y BUAP-VIEP (VIMA-NAT-14-I).

## REFERENCIAS

- Behm CA, NC Sangster. 1999. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: Dalton JP (ed). *Fasciolosis*. CABI Publishing, Oxon, UK, Pp 185-224.
- Boray JC, PD Crowfoot, MB Strong, JR Allison, M Schellenbaum, M Von Orelli, G Sarasin. 1983. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet Rec* 113, 315-317.
- Dalton JP, M Heffernan. 1989. Thiol proteases released *in vitro* by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 35, 161-166.
- Dalton JP, SO Neill, C Stack, P Collins, A Walshe, M Sekiya, S Doyle, G Mulcahy, D Hoyle, E Khaznadji, N Moiré, G Brennan, A Mousley, N Kreshchenko, AG Maule, SM Donnelly. 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol* 33, 1173-1181.
- Demangel C, P Lafaye, JC Mazie. 1996. Reproducing the immune response against the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 with mimotopes selected from a phage-displayed peptide library. *Mol Immunol* 33, 909-916.
- Devlin JJ, LC Panganiban, PE Devlin. 1990. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* 249, 404-406.
- Ellis SE, GF Newlands, AJ Nisbet, JB Matthews. 2012. Phage display library biopanning as a novel approach to identifying nematode vaccine antigens. *Parasite Immunol* 34, 285-295.
- Fairweather I. 2009. Triclabendazole progress report, 2005-2009: an advancement of learning?. *J Helminthol* 83, 139-150.
- Gazarian K, M Rowley, T Gazarian, JE Vazquez Buchelli, M Hernández Gonzáles. 2012. Mimotope peptides selected from phage display combinatorial library by serum antibodies of pigs experimentally infected with *Taenia solium* as leads to developing diagnostic antigens for human neurocysticercosis. *Peptides* 38, 381-388.
- Golden O, RJ Flynn, C Read, M Sekiya, SM Donnelly, C Stack, JP Dalton, G Mulcahy. 2010. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine* 28, 5551-5557.
- Guo A, X Cai, W Jia, B Liu, S Zhang, P Wang, H Yan, X Luo. 2010. Mapping of *Taenia solium* TSOL18 antigenic epitopes by phage display library. *Parasitol Res* 106, 1151-1157.
- Hanna RE, FI Forster, GP Brennan, I Fairweather. 2013. *Fasciola hepatica*: histological demonstration of apoptosis in the reproductive organs of flukes of triclabendazole-sensitive and triclabendazole-resistant isolates, and in field-derived flukes from triclabendazole-treated hosts, using *in situ* hybridisation to visualise endonuclease-generated DNA strand breaks. *Vet Parasitol* 191, 240-251.
- Hillyer GV. 2005. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J Helminthol* 79, 241-247.
- Hoyle DV, JP Dalton, M Chase-Topping, DW Taylor. 2003. Pre-exposure of cattle to drug-abbreviated *Fasciola hepatica* infections: the effect upon subsequent challenge infection and the early immune response. *Vet Parasitol* 111, 65-82.
- Kasný M, L Mikes, V Hampl, J Dvorák, CR Caffrey, JP Dalton, P Horák. 2009. Peptidases of trematodes. *Adv Parasit* 69, 205-297.
- Keiser J, J Utzinger. 2009. Food-borne trematodiasis. *Clin Microbiol Rev* 22, 466-483.
- Kesik M, L Jedlina-Panasiuk, M Kozak-Cieszczyk, A Plucienniczak, H Wedrychowicz. 2007. Enteral vaccination of rats against *Fasciola hepatica* using recombinant cysteine proteinase (cathepsin L1). *Vaccine* 25, 3619-3628.
- Mas-Coma S, MD Bargues, MA Valero. 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol* 35, 1255-1278.
- McManus DP, JP Dalton. 2006. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 133, S43-S61.
- McVeigh P, AG Maule, JP Dalton, MW Robinson. 2012. *Fasciola hepatica* virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes Infect* 14, 301-310.
- Morphew RM, HA Wright, EJ Lacourse, J Porter, J Barrett, DJ Woods, PM Brophy. 2011. Towards delineating functions within the *Fasciola* secreted cathepsin L protease family by integrating *in vivo* based sub-proteomics and phylogenetics. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e937.
- Mulcahy G, F O'Connor, S McGonigle, A Dowd, DG Clery, SJ Andrews, JP Dalton. 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16, 932-939.
- Mulcahy G, F O'Connor, D Clery, SF Hogan, AJ Dowd, SJ Andrews, JP Dalton. 1999. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Res Vet Sci* 67, 27-33.
- Narum DL, SA Ogun, AH Batchelor, AA Holder. 2006. Pas-

- sive immunization with a multicomponent vaccine against conserved domains of apical membrane antigen 1 and 235-kilodalton rhoptry proteins protects mice against *Plasmodium yoelii* blood-stage challenge infection. *Infect Immun* 74, 5529-5536.
- O'Neill SM, M Parkinson, W Strauss, R Angles, JP Dalton. 1998. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *Am J Trop Med Hyg* 58, 417-423.
- Ortiz P, S Scarcella, C Cerna, C Rosales, M Cabrera, M Guzmán, P Lamenza, H Solana. 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an *in vivo* efficacy test in sheep. *Vet Parasitol* doi: 10.1016/j.vetpar.2013.01.001.
- Pérez-Ecija RA, RE Mendes, R Zafra, L Buffonni, A Martínez-Moreno, J Pérez. 2010. Pathological and parasitological protection in goats immunised with recombinant cathepsin L1 and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet J* 18, 351-353.
- Piacenza L, D Acosta, I Basmadjian, JP Dalton, C Carmona. 1999. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun* 67, 1954-1961.
- Prudencio CR, AO Marra, R Cardoso, LR Goulart. 2010. Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 172, 122-131.
- Raadsma HW, NM Kingsford, Suharyanta, TW Spithill, D Piedrafita. 2007. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep. I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. *Vet Parasitol* 143, 275-286.
- Robinson MW, R Menon, SM Donnelly, JP Dalton, S Ranganathan. 2009. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol Cell Proteomics* 8, 1891-1907.
- Rokni MB, J Massoud, SM O'Neill, M Parkinson, JP Dalton. 2002. Diagnosis of human fascioliasis in the Gilan province of Northern Iran: application of cathepsin L-ELISA. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44, 175-179.
- Sexton JL, AR Milner, M Panaccio, J Waddington, G Wijffels, D Chandler, C Thompson, L Wilson, TW Spithill, GF Mitchell, NJ Campbell. 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol* 145, 3905-3910.
- Sidhu SS, S Koide. 2007. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. *Curr Opin Struct Biol* 17, 481-487.
- Smith AM, C Carmona, AJ Dowd, S McGonigle, D Acosta, JP Dalton. 1994. Neutralization of the activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. *Parasite Immunol* 16, 325-328.
- Smooker PM, R Jayaraj, RN Pike, TW Spithill. 2010. Cathepsin B proteases of flukes: the key to facilitating parasite control? *Trends Parasitol* 26, 506-514.
- Spithill, TW, PM Smooker, DB Copeman. 1999. *Fasciola gigantica*: Epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: Dalton JP (ed). *Fasciolosis*. CABI Publishing, Oxon, UK, Pp 465-525.
- Stack C, JP Dalton, MW Robinson. 2011. The phylogeny, structure and function of trematode cysteine proteases, with particular emphasis on the *Fasciola hepatica* cathepsin L family. *Adv Exp Med Biol* 712, 116-135.
- Villa-Mancera A, H Quiroz-Romero, D Correa, F Ibarra, M Reyes-Pérez, H Reyes-Vivas, G López-Velázquez, K Gazarian, T Gazarian, RA Alonso. 2008. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology* 135, 1437-1445.
- Villa-Mancera A, M Méndez-Mendoza. 2012. Protection and antibody isotype responses against *Fasciola hepatica* with specific antibody to pIII-displayed peptide mimotopes of cathepsin L1 in sheep. *Vet J* 194, 108-112.
- Wijffels GL, L Salvatore, M Dosen, J Waddington, L Wilson, C Thompson, N Campbell, J Sexton, J Wicker, F Bowen, T Friedel, TW Spithill. 1994. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Exp Parasitol* 78, 132-148.
- Wu HW, XM Hu, Y Wang, JD Kurtis, FJ Zeng, ST McGarvey, GL Wu, ZS Zhang, ZC Hua. 2006. Protective immunity induced by phage displayed mitochondrial related peptides of *Schistosoma japonicum*. *Acta Trop* 99, 200-2007.

## Efecto de la vacunación de cerdas y lechones contra circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en la ganancia de peso y porcentaje de mortalidad en México

Effect of vaccination of sow and piglets against porcine circovirus type 2 (PCV2) on weight gain and percentage mortality in Mexico

A Villa-Mancera<sup>a\*</sup>, R Huerta-Crispín<sup>a</sup>, A Córdova-Izquierdo<sup>b</sup>,  
S Ortega-Vargas<sup>a</sup>, A Trejo-Córdova<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Genética y Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

<sup>b</sup>Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México. División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México.

<sup>c</sup>Universidad del Papaloapan, Oaxaca, México.

### SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the efficacy of three different vaccination protocols (sows, piglets and sows and piglets) on average daily weight gain and mortality rate in piglets from farrow to finish farm with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). During the period after vaccination (weeks 3-22) the piglets, sows and piglets, exhibited significantly improved average daily weight gain and significantly reduced mortality rate. Compared with the control group, sows and piglets vaccinated against PCV2 had a significantly higher average daily gain and significantly lower mortality rate for the study period (weeks 1-22). It is concluded that vaccination against PCV2 was effective at improving growth performance and reducing mortality rate in a herd infected with PCV2.

*Key words:* PCV2, vaccination protocols, weight gain, mortality.

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia de tres protocolos de vacunación (cerdas, lechones o cerdas y lechones), sobre la media de la ganancia diaria de peso y porcentaje de mortalidad en lechones desde el parto hasta la finalización, en una granja con Síndrome Multisistémico de Desmedro Postdestete (PMWS). Durante el periodo posterior a la vacunación (semana 3-22) de lechones, cerdas y lechones, éstos mostraron un aumento significativo en la media de la ganancia diaria de peso y una reducción significativa en el porcentaje de mortalidad. Las cerdas y lechones vacunados contra PCV2 para el periodo de estudio (semana 1-22), tuvieron un aumento significativo en la ganancia diaria de peso y una reducción significativa en el porcentaje de mortalidad cuando se les comparó con el grupo control. Estos datos demuestran que la vacunación contra PCV2 fue efectiva en mejorar el crecimiento y reducir el porcentaje de mortalidad en una piara infectada con PCV2.

*Palabras clave:* PCV2, protocolos de vacunación, ganancia de peso, mortalidad.

### INTRODUCCIÓN

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es el agente causal del Síndrome Multisistémico de Desmedro Postdestete (PMWS), los principales signos clínicos son retraso en el crecimiento, frecuentemente acompañado de palidez, disnea y en menor medida de diarrea y/o ictericia, principalmente en cerdos de entre 2 y 4 meses de edad, etapa tardía del destete y temprana de engorda (Harding 1998, Segalés y Domingo 2002, Harding 2004). Suele afectar entre

4-30% de los animales, de los cuales mueren de 70-80%, causando importantes pérdidas económicas a la industria porcina (Segalés y Domingo 2002). Otra manifestación clínica de animales infectados con PCV2 son las fallas reproductivas, ocasionando abortos durante la mitad y final de la gestación o lechones nacidos muertos, los cuales muestran miocarditis necrotizante y presencia de PCV2 en tejido cardíaco (West y col 1999, Mikami y col 2005).

Los anticuerpos maternos están presentes en prácticamente todos los lechones tras la toma de calostro y van disminuyendo progresivamente durante la lactación y la transición (Rodríguez-Arrijoja y col 2002). La viremia por PCV2 suele aparecer entre la fase final de transición y el inicio de la fase de engorda, coincidiendo con el momento en el que los anticuerpos maternos alcanzan niveles mínimos (Sibila y col 2004). Se ha descrito que

Aceptado: 29.11.2012.

\* Proyecto VIEP-BUAP 2011-2013 (VIMA-NAT11-I)

\* Laboratorio de Genética y Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 4 Sur 304 Col. Centro, CP 75482, Tecamachalco Puebla, México; abel.villa@gmail.com

un bajo porcentaje de animales pueden presentar ya la infección por PCV2 a los pocos días de vida (Sibila y col 2004, Calsamiglia y col 2007).

Las vacunas comerciales contra PCV2 disponibles en el mercado difieren en el tipo de antígeno y adyuvante, animales (cerdas y/o lechones) y dosis (una o dos) (Chae 2012). La vacuna comercial Circovac® (Merial) introducida en 2006, está compuesta por virus inactivado y contiene aceite de parafina ligero como adyuvante; inicialmente fue utilizada sólo en cerdas (2 ml) y posteriormente aplicada a lechones (0,5 ml) (Fraile y col 2012). El principio de la vacunación de cerdas es conferir inmunidad pasiva para proteger a los lechones recién nacidos contra la exposición a PCV2, mientras estos son altamente susceptibles; en contraste, la vacunación de lechones induce inmunidad activa contra enfermedades asociadas a circovirus porcino (PCVD) (Opriessnig y col 2010, Beach y Meng 2012, Chae 2012).

Las vacunas comerciales actualmente disponibles contra PCV2 son herramientas efectivas en el control del PMWS en condiciones de campo y experimentales. La vacunación de cerdas primerizas y adultas bajo condiciones de campo, incrementa los títulos de anticuerpos en suero, reduce la carga viral en leche y calostro, incrementando la ganancia diaria de peso (GDP) y reduciendo los porcentajes de mortalidad de su descendencia (Pejsak y col 2010, Gerber y col 2011, Kurmann y col 2011, Fraile y col 2012). La vacunación de lechones contra PCV2, induce una respuesta de anticuerpos neutralizantes, una respuesta inmune humoral mediada por células secretoras de IFN- $\gamma$ , reduciendo o retrasando la infección por PCV2 durante el destete o engorda (Fort y col 2008, Kekarainen y col 2010, Opriessnig y col 2010). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de tres protocolos de vacunación contra PCV2 en cerdas y lechones sobre la ganancia de peso y porcentaje de mortalidad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### LOCALIZACIÓN

La unidad de producción porcina se ubica en el estado de Puebla, México; es una granja porcina con un sistema

de producción en tres sitios, con flujo todo dentro/todo fuera por edificio. En el sitio uno se encuentra el área de gestación y maternidad (etapa de lactancia: semana 1-3), en el sitio dos se tienen a los cerdos destetados (semana 3-10) y en el sitio tres a los animales en etapa de engorda o finalización (semana 10-22). Esta unidad productiva tiene un inventario de 4.500 hembras y produce alrededor de 2.000 cerdos semanales.

Como antecedente, la granja fue diagnosticada con PCVD asociado con PCV2, confirmado en base a los signos clínicos (palidez, desmedro, diarrea y tos) y carga viral por PCR cuantitativa. En la necropsia, los animales revelan evidencia de síndrome de dermatitis y nefropatía porcina con lesiones en piel de color rojo o púrpura, PMWS con depleción linfoidea, en los pulmones se observan vasculitis y neumonía intersticial. La granja es seropositiva pero estable a PRRS (Herdcheck2XR, IDEXX; Civtest Suis PRRS A/S, Hipra; Civtest Suis PRRS E/S, Hipra) negativa al virus de influenza porcina (Civtest Suis Influenza, Hipra) y cepas patógenas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP-ApxIV, IDEXX). Los cerdos fueron vacunados a los 7 y 21 días de edad contra *Haemophilus parasuis* y *Mycoplasma hyopneumoniae* a los 23 días de edad.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Se seleccionaron 76 cerdas para ser divididas en cuatro grupos, de acuerdo a su paridad. Se utilizaron 3 diferentes protocolos de vacunación contra PCV2: 1) cerdas vacunadas, lechones no vacunados, 2) cerdas no vacunadas, lechones vacunados, 3) cerdas vacunadas, lechones vacunados; grupo control: cerdas no vacunadas, lechones no vacunados (cuadro 1). Las cerdas fueron vacunadas en dos ocasiones con un intervalo de 3-4 semanas antes del parto, mientras que los lechones fueron inmunizados a las 3 semanas de edad con 0,5 ml Circovac® (Merial). Los lechones fueron identificados individualmente en la oreja para su monitoreo y evaluación. Los animales del grupo control o sin vacunar fueron inyectados con agua estéril.

El porcentaje de mortalidad para cada grupo de cerdos vacunados y etapa productiva fue calculado dividiendo el

**Cuadro 1.** Datos descriptivos de grupos vacunados contra PCV2 y grupo control.

Descriptive data of vaccinated groups against PCV2 and control group.

Variable	Animales vacunados $\pm$ DE			Control
	Cerdas	Lechones	Cerdas y lechones	
Número de cerdas	18	20	20	18
Paridad	4,6 $\pm$ 1,5	4,5 $\pm$ 1,7	4,6 $\pm$ 1,7	4,7 $\pm$ 1,4
Lechones vivos por camada	10,2 $\pm$ 1,7	10,6 $\pm$ 1,6	10,7 $\pm$ 1,8	10,1 $\pm$ 1,6
Número de lechones (semana 3)	166	200	206	164

Media  $\pm$  desviación estándar (DE). En cada columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en comparación con el grupo control.

número de cerdos que murieron en esa etapa sobre el número de cerdos asignados a ese grupo, multiplicado por 100. Los cerdos que murieron a lo largo del periodo de estudio que no mostraron signos clínicos del PMWS fueron diagnosticados por inmunohistoquímica (Kim y Chae 2004).

Todos los cerdos fueron pesados individualmente después de nacer (semana 1), al destete (semana 3), al entrar al sitio tres o etapa de finalización (semana 10) y el día previo a su venta (semana 22). Se determinó la ganancia diaria de peso para cada cerdo, para la etapa de lactancia, destete y finalización. La GDP se calculó restando el peso ganado al inicio de cada etapa al peso final de la misma, dividido por el número de días que permanecieron en la etapa productiva. Finalmente se calculó la GDP para cada cerdo desde el día que fue vacunado (semana 3) hasta el día previo a su venta (semana 22).

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos sobre porcentaje de mortalidad y GDP fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) usando el procedimiento modelo lineal general (GLM), comparando el grupo control contra los grupos de cerdos vacunados para el modelo de efectos fijos, paridad y número de lechones por parto como efectos aleatorios. Se utilizó el programa *SPSS* versión 17 para *Windows* (SPSS Inc, Chicago IL, USA). Una  $P < 0,05$  fue considerada como significativa.

#### RESULTADOS

La media de lechones nacidos vivos por camada para animales vacunados: cerdas, lechones, cerdas y lechones fue de 10,2, 10,6 y 10,7 respectivamente. Así mismo, el número de lechones nacidos vivos en el grupo control fue de 10,1 (cuadro 1). El número de partos promedio para el grupo control fue de 4,7, mientras que para los diferentes grupos de animales vacunados (cerdas, lechones y cerdas y lechones) fueron de 4,6, 4,5 y 4,6 respectivamente. Los diferentes grupos de cerdos inmunizados, no mostraron diferencias significativas en el número de partos en comparación con el grupo control (cuadro 1).

#### EFFECTO DE LA VACUNACIÓN SOBRE LA GANANCIA DIARIA DE PESO

En la etapa de lactancia (semana 1-3, cuadro 2), la GDP para el grupo control fue de 227,0 g/d, el grupo de cerdas y lechones inmunizados obtuvo la mayor ganancia de peso (238,6 g/d,  $P < 0,05$ ), mientras que en las cerdas vacunadas se observó una menor ganancia de peso (232,3 g/d,  $P > 0,05$ ). Para la etapa de destete (semana 3-10), la GDP de los tres grupos evaluados tuvieron un aumento significativo en comparación con el grupo control. Los lechones, cerdas y lechones vacunados, para la etapa de finalización (semana 10-22), la GDP fue significativa ( $P < 0,05$ ). Los lechones, cerdas y lechones vacunados mostraron un efecto significativo sobre la GDP (699,4 g/d y 704,0 g/d) para el periodo comprendido entre la semana 3 y 22. Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para los tres grupos de cerdos vacunados para la GDP en las tres etapas evaluadas durante el estudio (semana 1-22, cuadro 2), sobresaliendo el grupo de cerdas y lechones inmunizados (656,2 g/d) en comparación a los demás grupos. El grupo de cerdas vacunadas obtuvo el menor incremento en la GDP (634,0 g/d).

#### EFFECTO DE LA VACUNACIÓN SOBRE EL PORCENTAJE DE MORTALIDAD

Se evaluó el efecto de tres diferentes protocolos de vacunación sobre el porcentaje de mortalidad para el periodo de estudio (semana 1-22), el cual fue dividido en tres periodos: lactación (semana 1-3), destete (semana 3-10) y finalización (semana 10-22, cuadro 3). El mayor porcentaje de mortalidad fue en la etapa de destete para el grupo control (12,20%), mientras que el menor porcentaje fue para el grupo de cerdas y lechones inmunizados (1,52%, 10-22 semanas). El grupo de cerdas y lechones vacunados para la etapa de lactación y destete mostraron diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad (3,74% y 3,33%) cuando se les comparó con el grupo control (9,89% y 12,20%,  $P < 0,05$ ). Así mismo, dos grupos de animales vacunados: lechones, y cerdas y lechones (2,13% y 1,52%), respectivamente,

**Cuadro 2.** Media de la ganancia diaria de peso (g/d) durante diferentes periodos de estudio.  
Average daily weight gain (g/d) of piglets during different study intervals.

Animales vacunados	Etapa, periodo en semanas $\pm$ DE				
	Lactancia 1-3	Destete 3-10	Finalización 10-22	3-22	1-22
Cerdas	232,3 $\pm$ 27,5	400,4 $\pm$ 46,8 <sup>a</sup>	874,9 $\pm$ 108,0	681,8 $\pm$ 84,7	634,0 $\pm$ 57,4 <sup>a</sup>
Lechones	238,0 $\pm$ 29,9 <sup>a</sup>	417,8 $\pm$ 54,3 <sup>a</sup>	883,9 $\pm$ 116,6 <sup>a</sup>	699,4 $\pm$ 92,9 <sup>a</sup>	638,8 $\pm$ 71,2 <sup>a</sup>
Cerdas y lechones	238,6 $\pm$ 29,7 <sup>a</sup>	423,2 $\pm$ 57,2 <sup>a</sup>	916,5 $\pm$ 109,7 <sup>a</sup>	704,0 $\pm$ 89,7 <sup>a</sup>	656,2 $\pm$ 56,3 <sup>a</sup>
Control	227,0 $\pm$ 26,7	387,3 $\pm$ 47,1	860,4 $\pm$ 99,9	680,7 $\pm$ 79,8	618,2 $\pm$ 55,5

Media  $\pm$  desviación estándar (DE). Superíndices (a) en cada columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en comparación con el grupo control.

**Cuadro 3.** Porcentaje de mortalidad (%) de grupos vacunados contra PCV2 y grupo control.  
Mortality rates (%) of vaccinated groups against PCV2 and control group.

Animales vacunados	Etapa, periodo en semanas $\pm$ DE				
	Lactancia 1-3	Destete 3-10	Finalización 1 0-22	3-22	1-22
Cerdas	9,78 $\pm$ 0,06	9,64 $\pm$ 0,10	3,33 $\pm$ 0,06	12,97 $\pm$ 0,12	22,75 $\pm$ 0,11
Lechones	5,66 $\pm$ 0,06	6,00 $\pm$ 0,07	2,13 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	8,13 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	13,79 $\pm$ 0,09
Cerdas y lechones	3,74 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	3,33 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,52 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	5,40 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	9,14 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
Control	9,89 $\pm$ 0,08	12,20 $\pm$ 0,10	5,56 $\pm$ 0,07	17,75 $\pm$ 0,09	27,64 $\pm$ 0,10

Media  $\pm$  desviación estándar (DE). Superíndices (a) en cada columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en comparación con el grupo control.

mostraron reducciones significativas en el porcentaje de mortalidad ( $P < 0,05$ ) en la etapa de finalización, cuando se les comparó con el grupo control (5,56%). Las cerdas y lechones vacunados mostraron un efecto significativo sobre el porcentaje de mortalidad (5,40%,  $P < 0,05$ ) para el periodo posterior a la inmunización (semana 3-22). El porcentaje de mortalidad acumulada para el periodo de estudio (semana 1-22) en el grupo control fue de 27,64%, las cerdas y lechones vacunados mostraron diferencias significativas (9,14%,  $P < 0,05$ ); mientras que el grupo de cerdas vacunadas y el grupo de lechones inmunizados no se observaron diferencias significativas (22,75% y 13,79%,  $P > 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

En México existen varias vacunas comerciales contra PCV2, incluyendo una vacuna inactivada con adyuvante usada en cerdas para inducir una respuesta inmune celular que es transferida pasivamente después de la ingestión de calostro a los lechones, los cuales aumentan significativamente el número de células secretoras de IFN- $\gamma$ , incrementando la respuesta de hipersensibilidad retardada, induciendo una fuerte respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica (Oh y col 2012). Los lechones son vacunados a las 3 semanas de edad, cuando los anticuerpos maternos descienden. La vacuna induce una respuesta de anticuerpos neutralizantes, reduciendo o retrasando la infección por PCV2 durante el destete o engorda (Fort y col 2008).

En este estudio, el grupo de lechones, cerdas y lechones inmunizados mostraron GDP significativas para las dos etapas (destete y finalización) posteriores a la aplicación de la vacuna Circovac<sup>®</sup>. La GDP para los lechones desde la administración de la vacuna hasta la salida al mercado (semana 3-22) fue de 699,4 g/d y para el grupo control 680,7 g/d. Así mismo, la GDP para los lechones en la etapa de finalización o engorda (semana 10-22) fue de 883,9 g/d y para el grupo control 860,4 g/d. Heissenberger y col (2010) demostraron que lechones vacunados con Circovac<sup>®</sup> a las tres semanas de edad, tienen mayor GDP (584,8 g), frente al grupo control (519,9 g) en el periodo de 13-21 semanas; la principal viremia se presenta

en las semanas 13-28 cuando la GDP es más evidente (651,04 g vs 609,61 g). Soukup y Dušek 2010 estudiaron el efecto de la vacunación de lechones con Circovac<sup>®</sup> a los 21 días de edad en granjas con problemas de PCVD, mostrando GDP de 434 g durante las etapas posteriores al destete, así como en la etapa de engorda 752 g; los controles para ambas etapas mostraron GDP de 359 g y 766 g respectivamente. Cerdas y lechones vacunados con Porcilis<sup>®</sup> (Intervet) mostraron GDP menores a los observados en el presente estudio (626,0 g vs 704,0 g) en periodos semejantes (4-25 semanas vs 3-22 semanas); así mismo, hembras inmunizadas contra PCV2 (612,0 g vs 681,8 g) (Fraile y col 2012).

En nuestro estudio, se observó una reducción del 6,20% en mortalidad para el grupo de lechones vacunados (semana 3-10) en comparación con el grupo control. En Austria, se utilizaron 1.105 lechones divididos en dos grupos para ser inmunizados con 0,5 ml de Circovac<sup>®</sup> a las 3 semanas de edad, observándose una reducción en el porcentaje de mortalidad del 5,15% para las semanas 13-21, que corresponden al periodo principal de viremia; para las semanas 13-28 se observó una reducción significativa del 7,4% en la mortalidad de los lechones (Heissenberger y col 2010). Por otro lado, los lechones inmunizados, mostraron una reducción significativa en el porcentaje de mortalidad para el periodo posterior a la vacunación (semana 3-22) en comparación con el grupo control (8,13% vs 17,75%), así como para el periodo de finalización (semana 10-22, 2,13% vs 5,56%). Estos resultados concuerdan con los obtenidos al vacunar lechones con Circovac<sup>®</sup> a los 21 días de edad, los cuales mostraron una reducción en el porcentaje de mortalidad en comparación con el grupo control (3,68 vs 13,35%), mientras que para la etapa de engorda fue de 4,32 vs 6,46% (Soukup y col 2010). Cerdas y/o lechones vacunados con Porcilis<sup>®</sup> (Intervet) no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad cuando se les comparó con el grupo control para la etapa de destete a finalización (Fraile y col 2012).

Pejsak y col (2010) utilizaron diferentes protocolos de inmunización para tres grupos de animales: cerdas, lechones y por último cerdas y lechones. Las cerdas fueron vacunadas con Circovac<sup>®</sup> en dos ocasiones con un inter-

valo de 4 semanas antes del parto, los lechones fueron inmunizados a la edad de 4 semanas, mientras que en el tercer grupo las cerdas fueron vacunadas en dos ocasiones con un intervalo de 4 semanas y los lechones en la semana 4 y 7 de edad. Los porcentajes de mortalidad y GDP para los distintos grupos fueron: cerdas (16,93% y 635,2 g), lechones (16,12% y 640,3 g), y cerdas y lechones (15,35% y 656,0 g) y durante la presentación del PMWS (28,76% y 568,5 g). Estos datos coinciden con la GDP observada en nuestro estudio; sin embargo, el porcentaje de mortalidad en los diferentes grupos vacunados para el periodo de estudio fueron diferentes: cerdas (22,75% y 634,0 g), lechones (13,79% y 638,8 g), cerdas y lechones (9,14% y 656,2 g) y para el grupo control (27,64% y 618,2 g).

En conclusión, este estudio demuestra que la vacunación de cerdas y lechones con Circovac® reduce significativamente el porcentaje de mortalidad de cerdos inmunizados, así como un aumento en la ganancia diaria de peso en comparación con el grupo de animales sin vacunar. Estos datos sugieren que la vacunación contra PCV2 puede ser útil en el control de la PCVD, influyendo en los parámetros productivos y reduciendo las pérdidas económicas asociadas a la circovirusosis porcina.

## REFERENCIAS

- Beach NM, XJ Meng. 2012. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* 164, 33-42.
- Calsamiglia M, L Fraile, A Espinal, A Cuxart, C Seminati, M Martín, E Mateu, M Domingo, J Segalés. 2007. Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res Vet Sci* 82, 299-304.
- Chae C. 2012. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. *Vet J* 194, 151-157.
- Fort M, M Sibila, A Allepuz, E Mateu, F Roerink, J Segalés. 2008. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* 26, 1063-1071.
- Fraile L, M Sibila, M Nofrarías, R López-Jimenez, E Huerta, A Llorens, S López-Soria, D Pérez, J Segalés. 2012. Effect of sow and piglet porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on piglet mortality, viraemia, antibody titre and production parameters. *Vet Microbiol* 161, 229-234.
- Gerber PF, FM Garrocho, AM Lana, ZI Lobato. 2011. Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. *Vet J* 188, 240-242.
- Harding J. 1998. Postweaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *J Swine Health Prod* 6, 249-254.
- Harding JC. 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol* 98, 131-135.
- Heissenberger B, A Ladinig, C Lang, C Püschel, M Ritzmann. 2010. Results of one-shot Circovac® vaccination at 0.5 ml in piglets on weight and mortality parameters. *Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress*, Vancouver, Canada, Pp 329.
- Kekarainen T, K McCullough, M Fort, C Fossum, J Segalés, GM Allan. 2010. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet Immunol Immunopathol* 15, 185-193.
- Kim J, C Chae. 2004. A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. *J Vet Diagn Invest* 16, 45-50.
- Kurmann J, T Sydler, E Brugnera, E Buerger, M Haessig, M Suter, X Sidler. 2011. Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth parameters in finisher pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. *Clin Vaccine Immunol* 18, 1644-1649.
- Mikami O, H Nakajima, K Kawashima, M Yoshii, Y Nakajima. 2005. Nonsuppurative myocarditis caused by porcine circovirus type 2 in a weak-born piglet. *J Vet Med Sci* 67, 735-738.
- Oh Y, HW Seo, K Han, C Park, C Chae. 2012. Protective effect of the maternally derived porcine circovirus type 2 (PCV2)-specific cellular immune response in piglets by dam vaccination against PCV2 challenge. *J Gen Virol* 93, 1556-1562.
- Opriessnig T, AR Patterson, DM Madson, N Pal, S Ramamoorthy, XJ Meng, PG Halbur. 2010. Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Vet Microbiol* 142, 177-183.
- Pejsak Z, K Podgórska, M Truszczyński, P Karbowski, T Stajdek. 2010. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33, e1-e5.
- Rodríguez-Arriola GM, J Segalés, M Calsamiglia, AR Resendes, M Balasch, J Plana-Duran, J Casal, M Domingo. 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 63, 354-357.
- Segalés J, M Domingo. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 24, 109-124.
- Sibila M, M Calsamiglia, J Segalés, P Blanchard, L Badiella, M Le Dimna, A Jestin, M Domingo. 2004. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 65, 88-92.
- Soukup I, P Dušek. 2010. Effect of piglets PCV2 vaccination with CIRCOVAC® in the farm with severe porcine circovirus type 2 disease (PCVD) in post-weaning. *Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress*, Vancouver, Canada, Pp 381.
- West KH, JM Bystrom, C Wojnarowicz, N Shantz, M Jacobson, GM Allan, DM Haines, EG Clark, S Krakowka, F McNeill, C Konoby, K Martin, JA Ellis. 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 11, 530-532.