



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

EVALUACIÓN DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS Y  
SINTÉTICOS DE *FASCIOLA HEPATICA* EN  
DIAGNÓSTICO Y VACUNACIÓN

Ricardo Alfredo Orbeagozo Medina

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA MICROBIANA Y  
PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019





## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

### **Evaluación de antígenos quiméricos y sintéticos de *Fasciola hepatica* en diagnóstico y vacunación**

D. Ricardo Alfredo Orbegozo Medina

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En Santiago de Compostela, 30 de Abril de 2019.*

Fdo. Ricardo Alfredo Orbegozo Medina





## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

D. Florencio César Martínez Ubeira (Director y Tutor)

Dña. Mercedes Mezo Menéndez (Directora)

INFORMAN:

*Que la presente tesis, titulada: **Evaluación de antígenos quiméricos y sintéticos de Fasciola hepática en diagnóstico y vacunación**, se corresponde con el trabajo realizado por D. RICARDO ALFREDO ORBEGOZO MEDINA, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta, no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 30 de abril de 2019*

Fdo/ Florencio César Martínez Ubeira

Fdo/ Mercedes Mezo Menéndez





## CONFLICTO DE INTERÉS

**Evaluación de antígenos quiméricos y sintéticos de *Fasciola hepatica* en diagnóstico y vacunación**

El doctorando declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la presente Tesis Doctoral

*En Santiago de Compostela, 30 de Abril de 2019.*

Fdo. Ricardo Alfredo Orbegozo Medina



LOS ARTÍCULOS QUE SE RELACIONAN A CONTINUACIÓN DESCRIBEN RESULTADOS Y MÉTODOS QUE CONSTITUYEN EL NÚCLEO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL:

1. **Orbegozo-Medina RA**, Martínez-Sernández V, Perteguer MJ, Hernández-González A, Mezo M, González-Warleta M, Romarís F, Paniagua E, Gárate T, Ubeira FM (2019). In-plate recapturing of a dual-tagged recombinant *Fasciola* antigen (FhLAP) by a monoclonal antibody (US9) prevents non-specific binding in ELISA. *PLoS One*. 14: e0211035. doi: 10.1371/journal.pone.0211035. Acceso: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211035>
2. **Orbegozo-Medina RA**, Martínez-Sernández V, Folgueira I, Mezo M, González-Warleta M, Perteguer MJ, Romarís F, Leiro JM, Ubeira FM (2018). Antibody responses to chimeric peptides derived from parasite antigens in mice and other animal species. *Mol Immunol*. 106: 1-11. doi: 10.1016/j.molimm.2018.11.019. Acceso: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.11.019>
3. **Orbegozo-Medina RA**, Martínez-Sernández V, González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Mezo M, Ubeira FM (2018). Vaccination of sheep with Quil-A® adjuvant expands the antibody repertoire to the *Fasciola* MF6p/FhHDM-1 antigen and administered together impair the growth and antigen release of flukes. *Vaccine*. 36: 1949-1957. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.02.115. Acceso: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.115>
4. Martínez-Sernández V, Perteguer MJ, Hernández-González A, Mezo M, González-Warleta M, **Orbegozo-Medina RA**, Romarís F, Paniagua E, Gárate T, Ubeira FM (2018). Comparison of recombinant cathepsins L1, L2, and L5 as ELISA targets for serodiagnosis of bovine and ovine fascioliasis. *Parasitol Res*. 117: 1521-1534. doi: 10.1007/s00436-018-5809-7. Acceso: <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5809-7>

LOS ARTÍCULOS QUE SE RELACIONAN A CONTINUACIÓN DESCRIBEN OTROS RESULTADOS Y MÉTODOS EN LA TEMÁTICA DE LA TESIS CON PARTICIPACIÓN DEL DOCTORANDO DURANTE LA ETAPA DOCTORAL:

1. Martínez-Sernández V, **Orbegozo-Medina RA**, González-Warleta M, Mezo M, Ubeira FM (2016). Rapid Enhanced MM3-COPRO ELISA for Detection of Fasciola Coproantigens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jul 20;10(7):e0004872. doi: 10.1371/journal.pntd.0004872. Acceso: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004872>
2. Martínez-Sernández V, **Orbegozo-Medina RA**, Romarís F, Paniagua E, Ubeira FM (2016). Usefulness of ELISA Methods for Assessing LPS Interactions with Proteins and Peptides. *PLoS One*. 2016 Jun 1;11(6):e0156530. doi: 10.1371/journal.pone.0156530. Acceso: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156530>





*A MIS PADRES*



La culminación de este trabajo de investigación no sería posible sin las ayudas institucionales\* y sin el esfuerzo y el gran apoyo brindado tanto por los directores de esta tesis como por los investigadores, doctorandos y técnicos de los grupos de investigación involucrados, personas a las que siento que debo mencionar y agradecer de forma individual.

En primer lugar, quiero agradecer al director y tutor de este trabajo, el Prof. Florencio Martínez Ubeira, a quien debo no solo la gran cantidad de conocimientos adquiridos sino que ha velado por cada detalle en la realización de este trabajo. Si bien la realización de una tesis doctoral representa un gran esfuerzo y colaboración entre los distintos miembros, he de reconocer que para mí la tesis ha resultado difícil por aspectos ajenos al laboratorio que varias veces me hicieron pensar que esta tesis simplemente no llegaría a término. Sin embargo, el gran esfuerzo realizado tanto por mi tutor como por mi compañera de laboratorio, la Dra. Victoria Martínez Sernández, en el diseño experimental y la elaboración de las publicaciones que hoy componen esta tesis, han hecho posible la culminación de este texto. Considero que la participación de ambos no solo ha ido más allá de lo académico y de lo que correspondería a un trabajo de tesis doctoral, sino que me han brindado un apoyo incondicional durante los últimos años, lo que ha hecho posible que esta tesis tenga un final, un buen final. También he de agradecer a la Prof.<sup>a</sup> Fernanda Romarís Martínez, por su participación en la elaboración de los poster y presentaciones en congresos, así como sus aportes en la elaboración de este texto. Al Dr. Lázaro Guillermo Pérez Montoto por su colaboración a través de las herramientas bioinformáticas empleadas en este trabajo. A nuestra técnico de investigación, Ana Isabel Vidal Varela, quien siempre estuvo pendiente no solo de los materiales y del cuidado de los animales de experimentación, sino que además también estuvo pendiente de mí a lo largo de todos estos años. También he de agradecer a todos los demás miembros del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), a quienes no menciono explícitamente pero que en algún u otro momento he precisado de su apoyo y colaboración.

En segundo lugar, pero no menos importante, quiero agradecer la acogida recibida en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM) en el que se llevaron a cabo los experimentos en rumiantes, trabajo arduo que requirió un gran esfuerzo humano, y que es difícil reflejar en los “materiales y métodos” de una publicación científica. En particular, quiero dejar constancia de mi agradecimiento a la Dra. Mercedes Mezo Menéndez, no solo por la importancia de su papel como codirectora de esta tesis, sino por su supervisión constante, tiempo y apoyo durante las tareas realizadas en este centro, además de su capacidad de transmitirme aspectos relevantes del trabajo que me motivaron a buscar cada vez más información sobre el mismo. Un agradecimiento especial a la Dra. Marta González Warleta, a quien reconozco su gran esfuerzo, dedicación y paciencia, esenciales para llevar a cabo, una a una, las tareas realizadas en el CIAM. También quiero agradecer a aquellas personas que no aparecen reflejadas en las publicaciones, pero cuya participación fue imprescindible para el desarrollo de éstas, como son: Dña. M<sup>a</sup> Carmen Carro Corral y el Dr. José Antonio Castro Hermida, por la gran ayuda brindada dentro y fuera del laboratorio, con quienes tuve la oportunidad de compartir la mayor parte del tiempo. También quisiera agradecer a Xabier Cortizo Mella por el apoyo brindado durante las arduas tareas de recolección de muestras y manipulación de animales. He de reconocer que fue un gran placer poder trabajar con vosotros y que forman parte de las experiencias más enriquecedoras de la tesis.

Otro de los agradecimientos corresponde a la fallecida Dra. Teresa Gárate Ormaechea y a la Dra. María Jesús Perteguer Prieto del Centro Nacional de Biotecnología del Instituto de Salud Carlos III de Madrid (CNM-ISCIII), cuyo grupo de investigación ha estado a cargo del diseño de las bacterias recombinantes empleadas en este trabajo.

También quiero agradecer al grupo de investigación del Prof. José Manuel Leiro Vidal, especialmente a la Dra. Ana Paula de Felipe González y la doctoranda Iria Folgueira López, la colaboración que dio lugar a los ensayos de péptidos quiméricos en rodaballo de gran relevancia en este trabajo.

Por último, quisiera agradecer a mi familia, a mi madre (Q.E.P.D), que siempre me brindó su apoyo incondicional y cuyo ejemplo siempre tendré presente, a mi padre, un superviviente en todos los aspectos y quién me ha enseñado que no importa cuan difíciles sean las circunstancias en la vida, siempre hay un camino para solucionarlas. A mi hermana Viviana, mi más grande apoyo en los últimos 15 años fuera de mi país y a quien le debo haber venido a España y descubrir el gran talento humano que existe a nivel de ciencia. A mi hermano Julio, a quien agradezco el estar pendiente de mis padres en momentos en que ni mi hermana ni yo hemos podido estar presentes. Finalmente, a mi pareja Karin, quien me ha brindado su cariño y cuyo apoyo ha sido clave estos últimos dos años para poder culminar la tesis.



---

(\*) Este trabajo de investigación ha sido financiado en parte a través de los Proyectos de Investigación AGL2011-30563-C03-01/02/03 (Ministerio de Economía y Competitividad), GPC 2014/058 y ED431B 2017/18 (Xunta de Galicia, Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria), RTA2017-00010-C02-01/02 (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad; INIA) y 2017/ACDE/001583 (Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación; AE-CID). Durante el periodo de realización de este trabajo, D. *Ricardo Alfredo Orbe-gozo Medina* disfrutó de una beca para la realización de los estudios de tercer ciclo a través del Subprograma de Formación de Personal Investigador concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2012-060270).



ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
APC	Células presentadoras de antígeno
BRSV	Virus respiratorio sincitial bovino
BSA	Seroalbúmina bovina
CB	Catepsinas B
CDC	Citotoxicidad dependiente de complemento
cDNA	DNA complementario
CL	Catepsinas L
CLR	Receptores de lectina tipo C
CFA	Adyuvante completo de Freund
DC	Células dendríticas
DAB	3,3' diaminobencidina
DNA	Ácidos desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
F2	Hemoglobina F2
FABP	Proteínas de unión a ácidos grasos
FcεR1	Receptor de alta afinidad para IgE
Fh12	Molécula derivada de las FABP de <i>F. hepatica</i>
FhTeg	Antígenos tegumentales derivados de <i>F. hepatica</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GPX	Glutación peroxidasas
GST	Glutación-S-tranferasas
HDM-1	Molécula de defensa helmíntica-1
HO-1	Hemoxygenasa-1
HRP	Peroxidasa de rábano
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
IFN-γ	Interferon gamma
IFA	Adyuvante incompleto de Freund
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucinas
IMAC	Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
ITT	Ovejas cola delgada Javanesa - Indonesia

kDa	Kilodaton
KTM	Molécula tipo <i>kunitz</i>
LAP	Leucin aminopeptidasa
LPS	Lipopolisacárido
LSZ	Lisozima
mAb	Anticuerpo monoclonal
MW	Peso molecular ( <i>molecular weight</i> )
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
M1	Macrófagos activados por vía clásica
M2a	Macrófagos activados por vía alternativa
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MF6p/FhHDM-1	Proteína de unión a hemo derivada de <i>F. hepatica</i>
MRLC	Cadena ligera reguladora de la miosina
NEJ	Larva juvenil desenquistada
NTD	Enfermedades desatendidas
OPD	Orto-fenilendiamina
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PB	Tampón fosfato
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica ( <i>periferal blood mononuclear cell</i> )
PBS	Tampón fosfato salino (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 11 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4 mM, NaCl 135 mM, pH 7.3)
PBS-BSA	PBS con 1% de BSA
PBS-T	PBS con 0,2% de Tween 20
PBS-T-SM	PBS-T con 1% de leche descremada
pCL	Procatepsina L
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCV	Volúmen de células empaquetadas o hematocrito
PGK	Fosfoglicerato quinasa
p.i.	Post-infección
PI-3	Virus de la parainfluenza 3
PM	Peso molecular
Pmy	Paramiosina
Productos ES	Productos de excreción/secreción
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones

---

Prx	Peroxirredoxina
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SAP	Proteínas de tipo saposina
SD	Desviación estándar
Sm14	Proteína de <i>S. mansoni</i> homóloga a FABP
SmKI-1	Inhibidor tipo kunitz recombinante de <i>S. mansoni</i>
SOD	Superóxido dismutasa
Stf	Estefinas
TA	Temperatura ambiente
TCBZ	Triclabendazol
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento tumoral
TGR	Tiorredoxín glutatión reductasa
TLR	Receptores tipo <i>Toll</i>
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral
TPx	Tiorredoxín peroxidasa
Th	Células T colaboradoras
Treg	Células T reguladoras
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
WB	<i>Western Blot</i>



<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>Clasificación taxonómica</b>	4
<b>Ciclo biológico</b>	4
<i>Características anatómicas del adulto</i>	5
<i>Postura y liberación de huevos en las heces del hospedador mamífero</i>	6
<i>Eclosión del miracidio e infección del hospedador mamífero</i>	7
<i>Infección del hospedador mamífero</i>	9
<b>Metabolismo de <i>F. hepatica</i></b>	11
<b>Los antígenos de <i>F. hepatica</i></b>	13
<i>Productos de excreción/secreción testados como vacuna</i>	14
Catepsinas	14
Proteína de unión a hemo (MF6p/FhHDM-1)	16
Mucinas	17
Hemoglobinas	17
Inhibidores tipo Kunitz	17
<i>Otros productos de excreción/secreción relevantes</i>	18
Dipeptidil peptidasas	18
Legumaína	19
Serpina	19
Cistatinas	19
<i>Antígenos asociados al tegumento</i>	19
Peroxirredoxina (PRX)	20
Glutación-S-transferasas (GST)	20
Tiorredoxin glutation reductasa (TGR)	21
Otras enzimas antioxidantes relevantes	21
Otras proteínas relevantes	22
<i>Antígenos somáticos</i>	22
Paramiosina (Pmy)	22
Proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs)	23
Proteínas de tipo saposina (SAP)	23
Leucin aminopeptidasa	24
Fosfoglicerato quinasas (PGK)	24
Cadena ligera reguladora de la miosina (MLRC)	24
<b>Respuesta inmune frente a <i>F. hepatica</i></b>	24

<i>Efecto de la infección sobre la respuesta inmune innata</i>	26
Células dendríticas (DC)	27
Macrófagos	28
Neutrófilos	28
Eosinófilos	29
Mastocitos	31
<i>Efecto de la infección sobre la respuesta inmune adaptativa</i>	32
Polarización de la respuesta inmune durante la infección por <i>F. hepatica</i>	32
Las células Treg y su influencia en la respuesta inmune frente a la infección por <i>F. hepatica</i>	33
Papel de los anticuerpos en la respuesta a la fasciolosis	34
<b>Control de la fasciolosis</b>	35
<i>Desarrollo de vacunas frente a F. hepatica</i>	35
<i>Tratamiento farmacológico</i>	36
<b>OBJETIVO</b>	41
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	45
<b>Métodos comunes generales</b>	47
<i>Obtención de antígenos de secreción de F. hepatica</i>	47
<i>Producción y purificación de los mAbs MM3, US9 y UR3</i>	47
<i>Péptidos y proteínas sintéticas</i>	48
<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	48
<i>Clonación de los genes de las FhpCL1, FhpCL2 y FhpCL5 de F. hepatica</i>	49
<i>Expresión de la FhpCL1 recombinante</i>	49
<i>Purificación y replegado de la FhpCL1 recombinante</i>	49
<i>Aspectos éticos y legales</i>	51
<i>Determinación de la concentración de proteínas</i>	51
<b>Métodos empleados para el estudio de formulaciones vacunales en Quil-A® sobre la infección por F. hepatica en ovejas</b>	51
<i>Antígenos vacunales</i>	51
<i>Diseño experimental</i>	52
<i>Aislamiento y cultivo de PBMC</i>	52
<i>Necropsias y determinaciones post mortem</i>	53
<i>ELISAS indirectos</i>	53
<i>ELISAS sándwich</i>	54
<i>Análisis estadístico</i>	54

<b>Métodos empleados en la construcción y evaluación de antígenos quiméricos en distintas especies animales</b>	55
<i>Clonación, subclonación y producción del gen US9-FhpCL1</i>	55
<i>Obtención y purificación de rUS9-FhpCL1</i>	56
<i>Animales e inmunizaciones</i>	56
<i>ELISA indirecto para medir anticuerpos IgG totales contra antígenos quiméricos en ratones y ovejas</i>	57
<i>ELISA indirecto para medir las subclases de anticuerpos IgG frente a antígenos quiméricos en ratones</i>	58
<i>ELISA indirecto para medir los niveles de anticuerpos séricos frente a antígenos quiméricos en rodaballos</i>	58
<i>Herramientas bioinformáticas</i>	59
<b>Métodos empleados para investigar la recaptura en placa como estrategia de repurificación de antígenos recombinantes</b>	59
<i>Recogida de muestras biológicas</i>	59
<i>Clonación del gen FhLAP</i>	60
<i>Clonación y subclonación del gen quimérico US9-FhLAP</i>	61
<i>Obtención y purificación de rUS9-FhLAP</i>	61
<i>Análisis de SDS-PAGE y Western blotting</i>	62
<i>Procedimientos ELISA</i>	63
ELISA captura con mAb MM3 (MM3-ELISA)	63
ELISA captura con mAb US9	64
ELISA indirecto con rUS9-FhLAP	64
ELISA competitivo indirecto con rUS9-FhLAP	65
ELISA indirecto con proteínas M15 retenidas en IMAC	65
Inmunoensayos con LPS	65
<i>Herramientas bioinformáticas</i>	66
<i>Análisis estadístico</i>	66
<b>RESULTADOS</b>	67
<b>Estudio de diversas formulaciones vacunales en Quil-A<sup>®</sup> sobre la infección por <i>F. hepatica</i> en ovejas</b>	69
<i>Efecto del adyuvante Quil-A<sup>®</sup> sobre el repertorio de anticuerpos</i>	69
<i>Efecto de la inmunización de ovejas con sMF6/FhHDM-1 en Quil-A<sup>®</sup> sobre la respuesta de anticuerpos inducidos durante la infección por <i>F. hepatica</i></i>	72
<i>Efecto de la inmunización de ovejas con antígenos de <i>F. hepatica</i> en Quil-A<sup>®</sup> sobre la respuesta de anticuerpos IgG1 y la producción de IFN-<math>\gamma</math> in vitro</i>	74

<i>Efecto de la inmunización de ovejas con con la proteína MF6p/FhHDM-1 de F. hepatica formulada en Quil-A®</i>	76
<b>Construcción y evaluación de antígenos quiméricos en distintas especies animales</b>	79
<i>Respuestas de anticuerpos inducidas por quimeras B diepitópicas derivadas de secuencias de helmintos en ratones</i>	79
<i>Respuestas de anticuerpos de ratón inducidas por quimeras B triepitópicas construidas con diversos espaciadores</i>	85
<i>El epítipo US9 influye en la respuesta de anticuerpos de los ratones al epítipo CL2</i>	88
<i>Análisis de las respuestas de anticuerpos inducidas por quimeras di y triepitópicas en otras especies animales</i>	90
<b>La recaptura en placa como nueva estrategia para purificar antígenos recombinantes expresados en E. coli y evitar reacciones inespecíficas en ELISA</b>	93
<i>Clonación y expresión de la proteína quimérica rUS9-FhLAP</i>	93
<i>Reconocimiento de rUS9-FhLAP por sueros de rumiantes infectados y no infectados</i>	95
<b>DISCUSIÓN</b>	105
<b>Estudio de diversas formulaciones vacunales en Quil-A® sobre la infección por F. hepatica en ovejas</b>	108
<i>Actividad del adyuvante Quil-A® sobre el repertorio de epítopos B reconocidos por ovejas inmunizadas con el antígeno MF6p/FhHDM-1</i>	110
<i>Evaluación de diversos antígenos de F. hepatica formulados en Quil-A sobre la biología del parásito</i>	111
<b>Construcción y evaluación de antígenos quiméricos en distintas especies animales</b>	114
<i>Respuestas de anticuerpos en ratones frente a quimeras B diepitópicas unidas por el espaciador GSGSG y derivadas de secuencias de helmintos</i>	117
<i>Respuestas de anticuerpos de ratón inducidas por quimeras B triepitópicas construidas con espaciadores simples o combinados</i>	121
<i>El epítipo US9 influye en la respuesta de ratones frente al epítipo CL2</i>	122
<i>Análisis de la respuesta de anticuerpos inducida por quimeras B di y triepitópicas en otras especies animales</i>	123
<b>La recaptura en placa como nueva estrategia para purificar antígenos recombinantes expresados en E. coli y evitar reacciones inespecíficas en ELISA</b>	126
<b>CONCLUSIONES</b>	131
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	135
<b>ANEXO 1</b>	171

---

<b>ANEXO 2</b>	183
<b>ANEXO 3</b>	197
<b>ANEXO 4</b>	219





# **Introducción**



## INTRODUCCIÓN

La fasciolosis está reconocida como una de las enfermedades parasitarias más importantes en medicina veterinaria debido especialmente a su impacto económico en los sistemas de producción de ganadería extensiva (Fiss *et al.*, 2013). Las enormes pérdidas económicas causadas por el parásito se deben a la mortalidad de los animales infectados, reducción de la fecundidad, aumento de la susceptibilidad a otras infecciones, descenso de la producción de carne, leche y lana, y al decomiso de los hígados en matadero. A pesar de los esfuerzos realizados en los últimos años para su control, la prevalencia de la fasciolosis en el ganado sigue siendo elevada e incluso varios estudios reflejan una tendencia al aumento de la prevalencia y la aparición de la enfermedad en nuevas zonas de Europa (Charlier *et al.*, 2014). Probablemente son varios los factores que contribuyen a esta situación como las condiciones climáticas y medioambientales, que favorecen la dispersión del parásito, el desplazamiento del ganado, una inapropiada aplicación de las medidas de control, la aparición de resistencias a los antihelmínticos y la ausencia de vacunas comerciales.

En los seres humanos, la fasciolosis fue considerada durante mucho tiempo una zoonosis secundaria, describiéndose casos individuales en países desarrollados con fasciolosis animal endémica, fundamentalmente en Europa (Francia, España, Portugal) y este de Rusia (Hotez y Gurwith, 2011). Sin embargo, en los últimos 25 años esta situación ha cambiado completamente, aumentando tanto el número de casos humanos descritos como la distribución de la enfermedad, con la descripción de grandes áreas endémicas e incluso hiperendémicas en distintos continentes. Según estimaciones de la OMS ([www.who.int/neglected\\_diseases/preventive\\_chemotherapy/Newsletter10\\_spa.pdf](http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/Newsletter10_spa.pdf)) la fasciolosis afecta al menos a 2.4 millones de personas en más de 70 países, siendo áreas reconocidas de alta transmisión el altiplano andino, el valle del Nilo, la cuenca del mar Caspio, así como Asia oriental y el sudeste asiático. Sin embargo, dada la falta de datos detallados, es muy probable que la extensión geográfica y la carga de la enfermedad sean significativamente mayores que las estimaciones actuales. Probablemente este aumento en el diagnóstico del número de casos humanos, junto con el elevado número de personas en riesgo de infección y la alta tasa de morbilidad que causa entre la población afectada, es lo que ha llevado a la OMS a incluir esta enfermedad dentro de las denominadas enfermedades desatendidas (NTD) y a poner en marcha una iniciativa mundial contra la fasciolosis humana (OMS, 2007 y OMS, 2008), incluyen-

do distintas líneas de acción en diferentes situaciones epidemiológicas en Bolivia, Camboya, Perú y Vietnam. De lo anterior se deduce que las estrategias actuales de control son insuficientes, haciendo imperativa la búsqueda de nuevas alternativas para el control efectivo de la fasciolosis. Ante la tendencia a utilizar cada vez menos quimioprofilácticos que dejen residuos tóxicos en el ambiente, el desarrollo de vacunas como medida de control ha adquirido una mayor relevancia en los últimos años (Toet *et al.*, 2014).

## Clasificación taxonómica

A continuación se muestra la clasificación taxonómica de *Fasciola* (Eukaryota; Opisthokonta; Metazoa; Eumetazoa; Bilateria\*) teniendo en cuenta la morfología de los parásitos (Jones, 2005; Mas-Coma *et al.*, 2009; Tkach *et al.*, 2016) y estudios moleculares filogenéticos (Olson *et al.*, 2003):

- Filo Platyhelminthes Minot, 1876
  - Superclase Neodermata Ehlers, 1985
    - Clase Trematoda Rudolphi, 1808
      - Subclase Digenea Carus, 1863
        - Orden Plagiorchiida La Rue, 1957
          - Suborden Echinostomata La Rue, 1926
            - Superfamilia Echinostomatoidea Looss, 1899
              - Familia Fasciolidae Railliet, 1895
                - Subfamilia Fasciolinae Railliet, 1895
                  - Género *Fasciola* Linnaeus, 1758\*\*
                    - *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758
                    - *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855

\*Los grandes grupos taxonómicos fueron tomados de GenBank Taxonomy.

La especie *F. jacksoni* (ver Figura 1) no se ha incluido dentro del género *Fasciola* ya que algunos investigadores sugieren que el género *Fasciola* puede ser parafilético y que la especie *F. jacksoni* debe ser incluida en el género *Fascioloidea* (Heneberg, 2013; Lotfy *et al.*, 2008).

## Ciclo biológico

*F. hepatica* tiene un lugar muy importante en la historia de la parasitología, siendo el primer ciclo de vida descubierto en un trematodo (Leuckart y Thomas, 1880; citado por Reinhard, 1957). El ciclo de vida de *F. hepatica* es

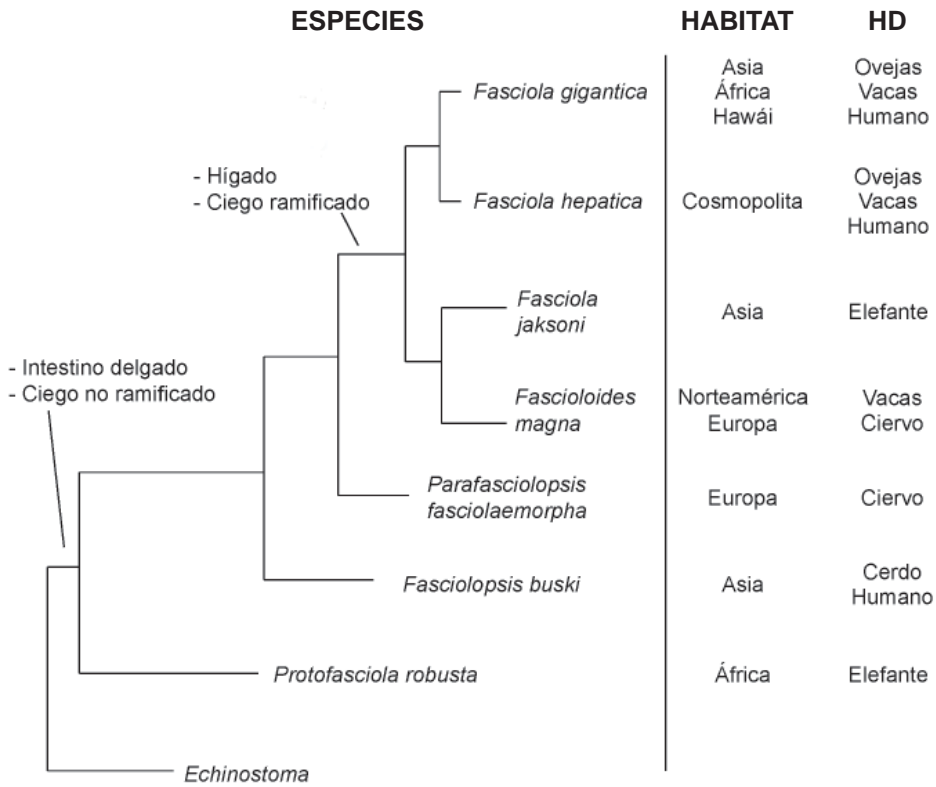


Figura 1. Árbol mostrando las relaciones evolutivas de los miembros de la familia Fasciolidae, junto con el hábitat y los hospedadores definitivos de cada una de las especies (tomada de Lotfy, 2008).

diheteroxeno, alternando la infección de dos hospedadores: un caracol anfibio de la familia Lymnaeidae (hospedador intermediario) y un mamífero (hospedador definitivo). El ciclo completo se desarrolla en un rango de 10 a 23 semanas (Mas-Coma y Bargues, 1997). Este apartado muestra un breve resumen del ciclo biológico del parásito en base a la revisión realizada por Mas-Coma *et al.*, (2014), e incorpora algunos datos relevantes de otros autores.

### Características anatómicas del adulto

El adulto de *F. hepatica* se localiza en las vías biliares del mamífero hospedador y presenta morfológicamente un cuerpo aplanado dorso-ventralmente, con un extremo anterior ensanchado y un extremo posterior puntiagudo, con un tamaño medio de aproximadamente 20-50/6-13 mm. En el extremo anterior presenta

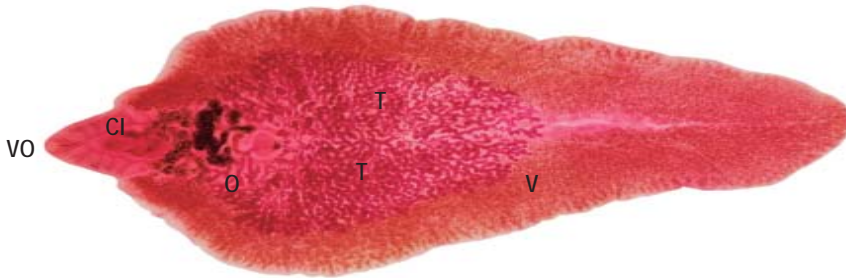


Figura 2. Morfología de un ejemplar adulto de *F. hepatica* teñido con rojo carmín (vista dorsal). Abreviaturas: CI: ciego intestinal; O: ovario; T: testículos; V: glándulas vitelógenas; VO: ventosa oral.

una proyección en forma de cono con una ventosa oral, seguida de un marcado ensanchamiento del cuerpo, dando un aspecto de hombros característico a simple vista. La base del cono, presenta una ventosa ventral próxima a la oral, ligeramente más grande. Estas ventosas permiten la adherencia del parásito a la pared de los conductos biliares. La faringe es prominente y el ciego es largo, abarcando la parte posterior del cuerpo y presentando numerosos divertículos laterales ramificados. Los testículos, también ramificados, abarcan el segundo y tercer tercio del cuerpo (Mas-Coma y Bargues, 1997; Behm y Sangster, 1999). El parásito está provisto de los sistemas: nervioso, excretor, aparato digestivo y tegumento, mientras que carece de los sistemas respiratorio y circulatorio (Fairweather *et al.*, 1999). Además, presenta un sistema reproductor hermafrodita, con testículos grandes y ramificados, dispuestos en tándem detrás del ovario, este último con forma dendrítica, localizado al lado derecho previo a los testículos.

### *Postura y liberación de huevos en las heces del hospedador mamífero*

El parásito adulto realiza la postura de huevos en las vías biliares, estos pasan al duodeno junto con la bilis y son eliminados con las heces. En este momento los huevos se encuentran fértiles, pero sin embrionar. Son grandes y de color amarillento, con un tamaño que oscila entre 130-150/63-90  $\mu\text{m}$ , de forma ovalada y con una cubierta delgada, en cuyo extremo anterior presentan un opérculo corto y recto (Mas-Coma y Bargues, 1997). También se ha descrito en el extremo posterior de la cáscara del huevo, la presencia de una invaginación semejante a un ombligo (Hussein *et al.*, 2010a; Hussein *et al.*, 2010b).



**Figura 3.** Ciclo biológico de *Fasciola*. Los adultos del parásito, localizados en las vías biliares del hospedador definitivo, liberan huevos que salen al exterior con las heces. Los huevos embrionan en el medio externo, liberan una larva ciliada (miracidio) que nada en el agua e infecta al hospedador intermediario (caracol pulmonado de agua dulce). En el caracol, el parásito se reproduce asexualmente generando un gran número de cercarias que al salir del mismo se enquistan en la vegetación circundante (metacercarias). La ingestión de los vegetales contaminados por parte de los hospedadores definitivos (habitualmente rumiantes, pero también humanos) produce el desenquistamiento de las larvas (juveniles), las cuales migran al hígado y se transforman en nuevos adultos, cerrándose el ciclo.

El desarrollo del huevo se completa fuera del hospedador, en presencia de agua dulce, formándose una larva ciliada, denominada miracidio. En condiciones de temperatura (15-25°C) y humedad adecuadas, este proceso se completa en un período entre 9 a 21 días. Aunque el huevo no madura a temperaturas bajas (entre 2 a 10°C), puede permanecer viable durante varios meses.

### *Eclósión del miracidio e infección del hospedador intermediario*

Los principales hospedadores intermediarios de *F. hepatica* son caracoles del grupo *Galba/Fossaria*, dentro de los cuales destacan: *G. truncatula*, originario de Europa e introducido en América; *G. neotropica* y *G. viatrix*, frecuentes en Suramérica (Standley *et al.*, 2013); además de *G. cubensis*, frecuente en Norte y Centro América (Jabbour-Zahab *et al.*, 1997). Adicionalmente, se ha descrito que



Figura 4. Huevos de *F. hepatica* (10X).

el caracol *Austropeplea tomentosa* es el mayor hospedador intermediario de *F. hepatica* del sudeste australiano (Puslednik *et al.*, 2009; Rathinasamy *et al.*, 2018).

Al terminar su desarrollo, el miracidio eclosiona y comienza a nadar a gran velocidad hasta contactar con un hospedador intermediario adecuado, siendo infectivo durante un período de tiempo limitado (de aprox. 3 horas; Villa-Mancera *et al.*, 2015). De no encontrarlo, las reservas de energía se agotan de forma progresiva hasta causar la muerte del mismo (en aprox. 24 horas; Graczyk y Fried, 1999). Para el reconocimiento del hospedador intermediario, el miracidio cuenta con distintos mecanismos, tales como: selección del hábitat del hospedador, período de movimiento aleatorio (Andrews, 1999) y la orientación por medio de mecanismos cinéticos y de quimiotaxis hacia estas especies específicas de caracol (Kalbe *et al.*, 2000). Cuando el miracidio entra en contacto con el caracol, se adhiere a su superficie a través de la papila apical (Buzzell, 1983), penetra el epitelio, pierde los cilios y se transforma en un esporocisto.

Dentro del caracol, en el transcurso de 4 a 7 semanas, ocurre la reproducción asexual del parásito, con el desarrollo de 3 a 4 generaciones de redias, y posteriormente cercarias. Éstas emergen del caracol provistas de una cola que les permite

nadar por poco tiempo, y luego, tras adherirse a un soporte físico como plantas acuáticas o hierbas, pierden la cola y forman un quiste transparente, denominado metacercaria. Este estadio es resistente a las bajas temperaturas invernales, pero, sensible a altas temperaturas y a la desecación (Andrews, 1999).

### *Infección del hospedador mamífero*

Aunque los hospedadores definitivos habituales son principalmente rumiantes, se han descrito otros herbívoros domésticos y silvestres, susceptibles a la infección, tales como: caballos, asnos, mulas, búfalos, ciervos, varios marsupiales, conejos, cobayos, liebres (Boray, 1969), capibaras (Labruna *et al.*, 2018) camélidos (Al-Qudah *et al.*, 1999), castores (Gayo *et al.*, 2011) y el jabalí (Mezo *et al.*, 2013; Sarkari *et al.*, 2018), especies que adquieren la infección a través de la ingesta de metacercarias enquistadas en el pasto. Por otra parte, en el caso de la infección en humanos, esta suele deberse generalmente al consumo de vegetales contaminados con metacercarias viables o al ingerir agua contaminada (Cwiklinski *et al.*, 2016). De hecho, recientemente se ha reportado que la cría de ganado, el consumo de



Figura 5. Muestreo de caracoles (*G. truncatula*) en un entorno típico para la proliferación de esta especie en la localidad de Carballo (provincia de A Coruña).

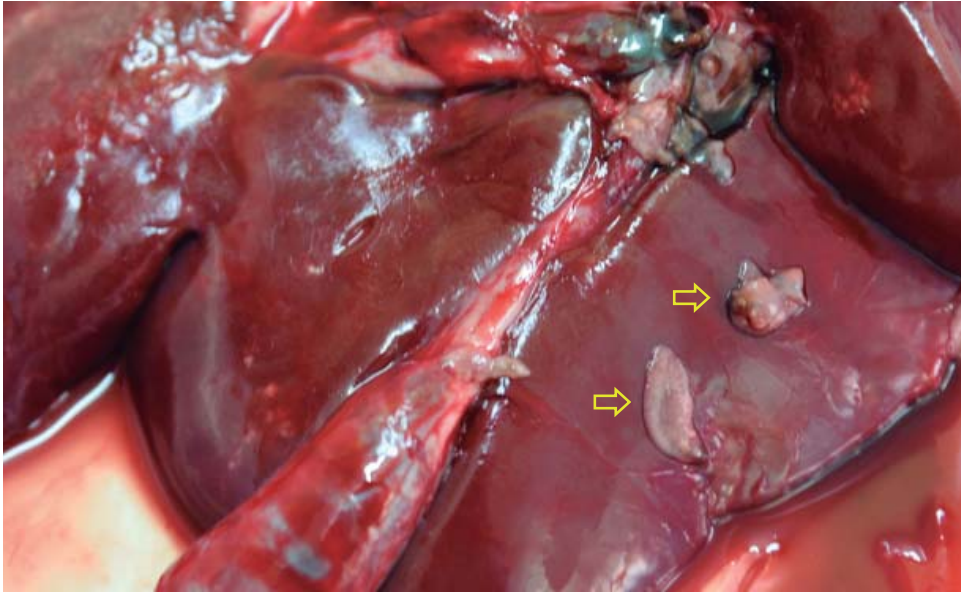


Figura 6. Hígado de oveja parasitado por *F. hepatica*. Se puede observar la cara inferior del hígado, la vesícula biliar y varias fasciolas adultas depositadas sobre la superficie del hígado (flechas amarillas). Imagen tomada de un hígado procedente de una infección experimental de ovejas de raza gallega en el INGACAL-CIAM (Mabegondo).

rábano y la costumbre de masticar hierbas, son factores de riesgo asociados a la infección de *F. hepatica* en niños en Cajamarca, Perú (Rodríguez-Ulloa *et al.*, 2018).

Una vez en el intestino delgado del hospedador, la metacercaria sale del quiste como “larva juvenil desenquistada” (NEJ) que debe migrar hacia los conductos biliares del hígado. Aunque algunos autores lo han puesto en duda recientemente (Moazeni y Ahmadi, 2016), generalmente se asume que las NEJ atraviesan la pared intestinal, migran por la cavidad abdominal hacia el hígado y penetran la capsula de Glisson, en un período de aprox. 4 o 5 días. Durante dicha migración, las células del tracto intestinal de la larva difieren morfológicamente de las del adulto y parecen tener una función principalmente secretora. Posteriormente, tras penetrar la cápsula del hígado, las células de los ciegos pasan a ser similares a las del adulto, cumpliendo funciones de absorción y secreción (Reddington *et al.*, 1984). Durante esta fase aguda de la infección, las larvas juveniles continúan migrando por el parénquima hepático (entre 5 y 6 semanas), alimentándose de tejido y aumentando significativamente de tamaño, causando así, hemorragias profusas y fibrosis. Durante la fase crónica (a las 7 semanas p.i. aprox.), las larvas se establecen en los conductos biliares donde alcanzan la madurez sexual (Andrews, 1999; Robinson



Figura 7. Hígado de oveja parasitado por *F. hepatica*. Se pueden observar numerosas lesiones fibróticas/necróticas blanquecinas (flechas amarillas). Imagen tomada de un hígado procedente de una infección experimental de ovejas de raza gallega en el INGACAL-CIAM (Mabegondo).

*et al.*, 2009). En síntesis, el período prepatente (desde la ingestión de metacercarias hasta la liberación de huevos en heces), es de aproximadamente 2 meses en ovejas y vacas, mientras que en humanos es de 3 a 4 meses. El tiempo de vida que puede permanecer el parásito en el hospedador depende de la especie parasitada, por ejemplo, en ganadería bovina la mayoría de las larvas son eliminadas en un período de 9 a 11 meses, adquiriendo resistencia parcial a nuevas infecciones. Por el contrario, en ovejas y cabras, no existe evidencia de que la infección induzca una respuesta inmune protectora, siendo susceptibles a la reinfección (Mas-Coma *et al.*, 2014).

### Metabolismo de *F. hepatica*

De acuerdo con las aportaciones de Tielens (1999) sobre la obtención de nutrientes durante los diferentes estadios del ciclo de vida de *F. hepatica*, el metabolismo debe adaptarse a entornos con distintos parámetros físicoquímicos, disponibilidad de oxígeno y nutrientes. Los estadios parasitarios que transcurren dentro del hospedador, intermediario o definitivo, están adaptados a una forma de vida

oportunista, aprovechando la disponibilidad de nutrientes tanto para la síntesis de elementos estructurales como la generación y almacenamiento de energía. Por el contrario, las fases de vida libre (miracidio, cercaria, metacercaria y huevos) deben adaptarse a la movilización de las reservas endógenas obtenidas en el estadio previo. Estas adaptaciones metabólicas conllevan una síntesis limitada de glucosa, aminoácidos y algunos lípidos (que pueden ser obtenidos del hospedador) y se favorece la síntesis de moléculas más complejas, esenciales para la maquinaria energética, reparación y reproducción del parásito. La obtención de nutrientes se produce a través de las superficies parasitarias (el tegumento y el epitelio superficial del intestino), en contacto con las moléculas del hospedador. El tegumento es una bicapa lipídica estándar que permite la absorción de nutrientes simples como: glucosa, aminoácidos, ácidos grasos y colesterol. Por el contrario, los nutrientes más complejos ingresan a través de la ventosa oral al tracto digestivo, donde son degradados por digestión enzimática para su posterior absorción. Durante la migración de larvas juveniles, estos nutrientes son principalmente tejidos adyacentes del hospedador y epitelio del conducto biliar, digeridos especialmente por proteasas de cisteína. Aunque durante la fase migratoria puede haber un pequeño aporte de sangre, en el parásito adulto la sangre pasa a ser la principal fuente de nutrientes, obteniendo principalmente aminoácidos, a través de la digestión de la hemoglobina por las enzimas: catepsina L, catepsina B y aspartil proteasas. Adicionalmente, además de proteínas, en el adulto de *Fasciola* se ha demostrado la acción de la proteína homóloga a las proteínas de unión a ácidos grasos de mamíferos, lo que permite la obtención y transporte de este nutriente.

En cuanto al destino de los nutrientes, como señala Tielens (1999), en el caso de la glucosa, una vez obtenida del hospedador, es utilizada como fuente de energía y para la síntesis de reservas de carbohidratos, como glicoproteínas del glicocálix de superficie o glucógeno. Por el contrario, el hallazgo reciente de que *F. hepatica*, al igual que otros trematodos, carecen de la enzima galactoquinasa, que cataliza la fosforilación de galactosa dependiente de ATP, parece indicar que estos parásitos son incapaces de metabolizar la galactosa (Zinsser *et al.*, 2018). En cuanto a los aminoácidos, aunque no son una fuente de energía importante, son precursores esenciales de enzimas y elementos estructurales como componentes del citoesqueleto, actina y tubulina. Además, la síntesis de proteína es importante para la postura de huevos, abarcando gran parte de la capacidad sintética y gasto energético de *F. hepatica*. En cuanto a los lípidos, han sido descartadas algunas de las vías de síntesis, favoreciendo selectivamente las vías que modifican los lípidos obtenidos del hospedador, como el colesterol y los ácidos grasos. Tanto los ácidos grasos modificados como los no modificados, son incorporados en los fosfolípidos y tri-

glicéridos, componentes esenciales de la membrana externa del parásito, principal sitio de interacción entre el parásito y el hospedador. Sin embargo, algunos lípidos específicos (como ácidos grasos insaturados), son difíciles de obtener debido a su baja concentración en el hospedador, razón por la que se cree son sintetizados por modificación de otros sustratos más abundantes. En conjunto, el metabolismo lipídico y energético de *F. hepatica*, están adaptados a una forma de vida oportunista.

Por último, sobre el metabolismo propiamente, el trabajo de Tielens (1999) menciona que los adultos de *F. hepatica* tienen una capacidad metabólica aeróbica limitada, dada la baja tensión de oxígeno de la bilis, razón por la que el metabolismo energético de esta etapa se basa en la fermentación, principalmente de carbohidratos, ya que los lípidos presentan un fuerte estado de reducción que les impide este propósito. Por el contrario, los estadios de vida libre no obtienen nutrientes pero sí un aporte de oxígeno del entorno, obteniendo energía a través del metabolismo aeróbico de reservas del glucógeno y glicoproteínas de la superficie del glicocálix. Además, se cree que pueden utilizar lípidos como fuente adicional. En cuanto a los aminoácidos, estos son precursores esenciales en la síntesis de proteína para el crecimiento y reproducción de *F. hepatica*, y aunque pueden ser oxidados, no se considera que tengan un papel relevante en el metabolismo energético global.

## Los antígenos de *F. hepatica*

Durante varias décadas se ha prestado atención, cada vez mayor, a los antígenos presentes en las diversas etapas del ciclo de vida de *F. hepatica*, por su capacidad para estimular la respuesta inmune celular y humoral del hospedador (Reddington *et al.*, 1984). Durante la infección, existen varias fuentes importantes de antígenos del parásito, que incluyen: la capa tegumentaria externa, de renovación constante, cada 2-3 h, y los productos de excreción/secreción, de liberación continua. Ambas mezclas antigénicas están en contacto íntimo con las células del sistema inmune del hospedador, causando efectos inmunomoduladores (Adams *et al.*, 2014). Otro grupo importante de moléculas son los antígenos somáticos, que están compuestos a su vez por antígenos tegumentarios y varias moléculas compartidas con los productos de excreción/secreción (Shafiei *et al.*, 2015). En este grupo también podemos encontrar proteínas citoplasmáticas, estructurales y algunos antígenos internos intestinales de reciente relevancia en vacunación (Di Maggio *et al.*, 2016; McAllister *et al.*, 2011; Henker *et al.*, 2017; Hanna *et al.*, 1988). A continuación, este apartado resume los principales antígenos descritos durante la fasciolosis de acuerdo a la localización, la proporción relativa según el estadio de desarrollo y su posible función.

### *Productos de excreción/secreción, testados como vacuna*

Además de la producción de huevos y la excreción de productos finales de la degradación de sustratos, se sabe que los adultos de *F. hepatica* excretan o secretan otras sustancias que entran en interacción con el hospedador. Estas sustancias a menudo se denominan productos de excreción/secreción (ES), considerando la “excreción”, como la eliminación de los productos de desecho (p. ej. productos finales del metabolismo); y la “secreción”, como la descarga de sustancias que interaccionan con el hospedador o los alimentos (Dalton, 1999). Ya que los productos ES son liberados también por los estadios inmaduros del parásito y que muchos de éstos son inmunogénicos, diversos autores los han empleado tanto para el diagnóstico de la fasciolosis en humanos y animales como para la investigación de vacunas (Rodríguez *et al.*, 2015; Cervi *et al.*, 1996). Estos incluyen proteínas y otras moléculas secretadas por el intestino, los poros excretores y la superficie tegumentaria (Dalton, 1999). En cuanto a su composición, durante la fasciolosis mantenida en diferentes sistemas mamíferos (p. ej. llamas, ratas, ratones y vacas), han sido identificadas un amplio rango de proteínas presentes en los productos ES, compuestos principalmente por catepsinas, además de otras moléculas, tales como: MF6p/FhHDM-1, legumina, leucin aminopeptidasa, superóxido dismutasa, peroxiredoxina, paramiosina, glutatión-S-transferasa y proteínas de unión a ácidos grasos (Cwiklinski y Dalton, 2018; Garcia-Campos *et al.*, 2016b; Martínez-Sernández *et al.*, 2014; Donnelly *et al.*, 2006).

La Figura 8, basada en el estudio de Di Maggio (Di Maggio *et al.*, 2016), resume de forma clara, la proporción relativa de los productos ES presentes en NEJ y adulto, además de la relación de proteínas somáticas presentes en la fracción soluble de NEJ. Además de las diferencias en la proporción de los productos ES de NEJ y adulto, también existe una variación en su composición. Estudios recientes del “estadio migratorio de NEJ” reportan un mayor nivel de complejidad en el secretoma de la larva durante la migración (45 proteínas), comparado con NEJ de 24 h (29 proteínas) y adulto (22 proteínas), presentando un mayor rango de secreción de isotipos de catepsinas y de enzimas antioxidantes (Cwiklinski y Dalton, 2018). Dentro de las proteínas presentes en los productos ES con interés en el desarrollo de vacunas, se encuentran las que se indican a continuación.

### **CATEPSINAS**

Son proteasas de cisteína similares a la papaína, expresadas ampliamente en parásitos helmintos y secretadas principalmente a través del intestino (Cancela *et al.*, 2008). Estas enzimas no son exclusivas de parásitos, ya que los mamíferos

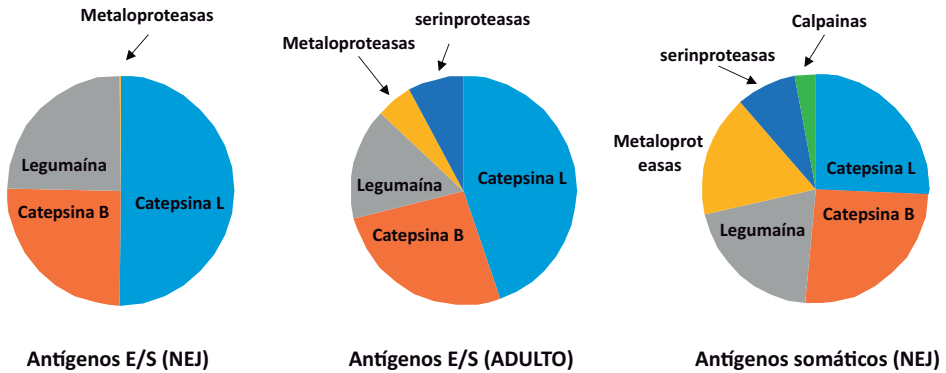


Figura 8. Comparación de las proporciones relativas de antígenos ES de *F. hepatica* presentes en NEJ (A) y adulto (B), además de la relación de proteínas somáticas presentes en la fracción soluble de NEJ (C). Esquema basado en basadas en el estudio de Di Maggio *et al.* (2016).

también presentan catepsinas (específicamente las “L”) con especificidad similar de sustratos, si bien las de *F. hepatica* son activas en un intervalo de pH más amplio (4.0-8.5), presentan una mayor estabilidad a pH neutro fisiológico y son de acción más prolongada (Collins *et al.*, 2004). En las catepsinas de *F. hepatica* han sido descritas dos subfamilias: i) las catepsinas L (CL), enzimas con actividad endopeptidasa expresadas tanto en “parásitos adultos” (clados CL1, CL2 y CL5) como en los “estadios juveniles infectivos” (clados CL3 y CL4) (Zawistowska-Deniziak *et al.*, 2013); y ii) las catepsinas B (CB), de actividad endo y exoproteasa, secretadas abundantemente por los estadios juveniles del parásito (clado CB3) (Lecaille *et al.*, 2002; Cancela *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2008; Garcia-Campos *et al.*, 2016a). Ambas subfamilias son importantes para la invasión del hospedador, con diferentes grados de expresión según se va desarrollando la enfermedad (Cancela *et al.*, 2008; McGonigle *et al.*, 2008). En la fase inicial de la infección, durante el desenquistamiento de larvas y las 24 h siguientes, los clados más relevantes son el CB3 y CL3 (Zawistowska-Deniziak *et al.*, 2013), relacionados con la invasión del epitelio intestinal y la cápsula del hígado (Robinson *et al.*, 2009), gracias a su capacidad de degradar proteínas, como se ha demostrado *in vitro* en el caso de la cadena pesada de inmunoglobulinas de oveja y de la albúmina sérica bovina, pero no de hemoglobina bovina (Wilson *et al.*, 1998). Posteriormente, los estadios parasitarios más tardíos presentes en hígado y conductos biliares, secretan mayoritariamente enzimas del clado CL1, seguido del clado CL2 (Robinson *et al.*, 2009), que son relevantes en la degradación de tejidos y alimentación (Robinson *et al.*, 2009). En este sentido se ha comprobado que estas enzimas son capaces de degradar colágeno

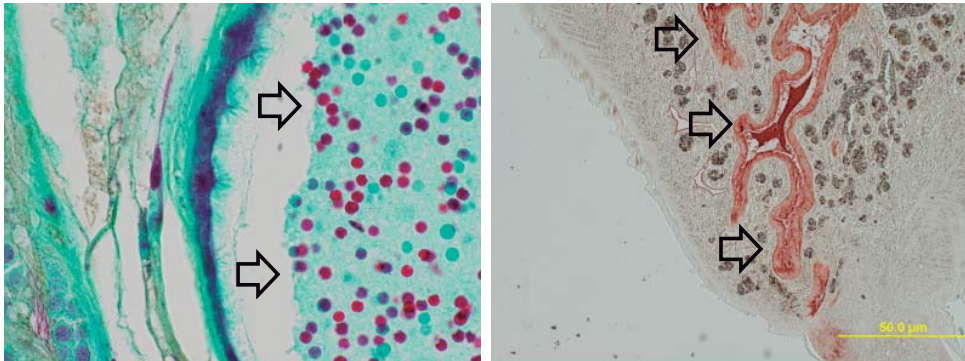


Figura 9. A) Corte transversal de un adulto de *F. hepatica* donde se puede apreciar la luz de un ciego intestinal con abundantes eritrocitos y otras células hemáticas en proceso de digestión (flechas). Tinción tricrómica de Wheatley; B) Corte transversal de un adulto de *F. hepatica* donde se puede apreciar la localización de las catepsinas L (flechas) que se secretan a la luz intestinal (tinción IHQ empleando el anticuerpo monoclonal MM3 y el cromógeno AEC). Imágenes cedidas por la Dra. Victoria Martínez-Sernández.

no fibrilar (tipo IV), fibronectina y laminina, que componen la membrana basal, colágeno fibrilar de tipo I y III, que componen el estroma y la capsula del hígado (Berasain *et al.*, 1997), así como la hemoglobina del hospedador para su posterior absorción en forma de péptidos pequeños (Lowther *et al.*, 2009). En resumen, de todo lo anterior se puede concluir que las catepsinas participan en la penetración de tejidos, alimentación, migración y evasión inmune, cruciales durante la infección del hospedador (Wesolowska *et al.*, 2018).

Debido a su gran antigenicidad, diversas catepsinas han sido también incluidas como candidatos potenciales en la mayor parte de los ensayos experimentales de protección vacunal realizados hasta el momento. Como se indica más adelante (ver Tabla 1), las catepsinas de *Fasciola* son el antígeno más testado, ya sea en su forma nativa purificada (Dalton *et al.*, 1996), recombinante (Golden *et al.*, 2010) o en moléculas sintéticas derivadas de la misma (Hernandez-Guzman *et al.*, 2016).

### PROTEÍNA DE UNIÓN A HEMO (MF6P/FhHDM-1)

Es una proteína producida por células del parénquima que es transportada a tejidos del vitelo y testículos, además de ser liberada a través de la superficie tegumental (Martínez-Sernández *et al.*, 2014). Inicialmente fue considerada como una molécula de defensa helmíntica (FhHDM-1) perteneciente a la familia de proteínas de tipo catelicidinas (Robinson *et al.*, 2012) que, al contrario que sus homólogos en mamíferos, no presentan actividad antimicrobiana (Thivierge *et al.*, 2013). En un

trabajo posterior, nuestro grupo ha demostrado que la proteína FhHDM-1 (=MF6p/FhHDM-1) es una proteína con capacidad de unión a hemo, y cuya función podría estar relacionada con la captura y detoxificación del mismo (Martínez-Sernández *et al.*, 2014; Martínez-Sernández *et al.*, 2017). Es más, nuestros datos también sugieren que la proteína MF6p/FhHDM-1 tiene dos porciones definidas, la región C-terminal, con capacidad para unir hemo, y una región N-terminal con características típicas de los péptidos de penetración celular (CPP). La posibilidad de que parte de la secuencia de la proteína MF6p/FhHDM-1 actúe como un CPP ha sido también sugerida recientemente en los estudios de Tanaka (2018).

## MUCINAS

Han sido descritas como moléculas importantes implicadas en el establecimiento del parásito, debido a su rol en la adherencia de células del hospedador, protección frente a acción de proteasas y en la evasión de la respuesta inmune (Noya *et al.*, 2015). Estas enzimas presentan una mayor expresión en NEJ en comparación con los adultos de *F. hepatica* y se cree que pueden ser secretadas (Cancela *et al.*, 2015). Además, una de estas moléculas ha sido testada como antígeno vacunal en ratones (Noya *et al.*, 2015).

## HEMOGLOBINAS

En *F. hepatica* han sido descritas dos isoformas, F1 y F2, ambas son globinas intracelulares de un solo dominio, con afinidad intermedia por el oxígeno. Debido a su potencial como inmunógeno, la forma recombinante de la F2 ha sido testada como posible candidato vacunal en terneros, reportando una protección no significativa (Dewilde *et al.*, 2008).

## INHIBIDORES TIPO KUNITZ

Son inhibidores competitivos de las proteasas de serina, de bajo peso molecular, (Bozas *et al.*, 1995), identificados en los productos ES, tanto en NEJ (Di Maggio *et al.*, 2016) como en adultos de *F. hepatica*. Recientemente, ha sido caracterizada una molécula tipo Kunitz (FhKTM) en el parásito adulto, cuya actividad incluye la inhibición de la tripsina y la supresión de la producción de citoquinas proinflamatorias en células dendríticas (Falcon *et al.*, 2014). Si bien no se ha reportado el uso de la FhKTM en ensayos de protección frente a *F. hepatica*, se cree que éste podría ser un candidato vacunal potencial debido a que es una proteína en común con los adultos de *S. mansoni*, parásito en el que ha sido reportado un

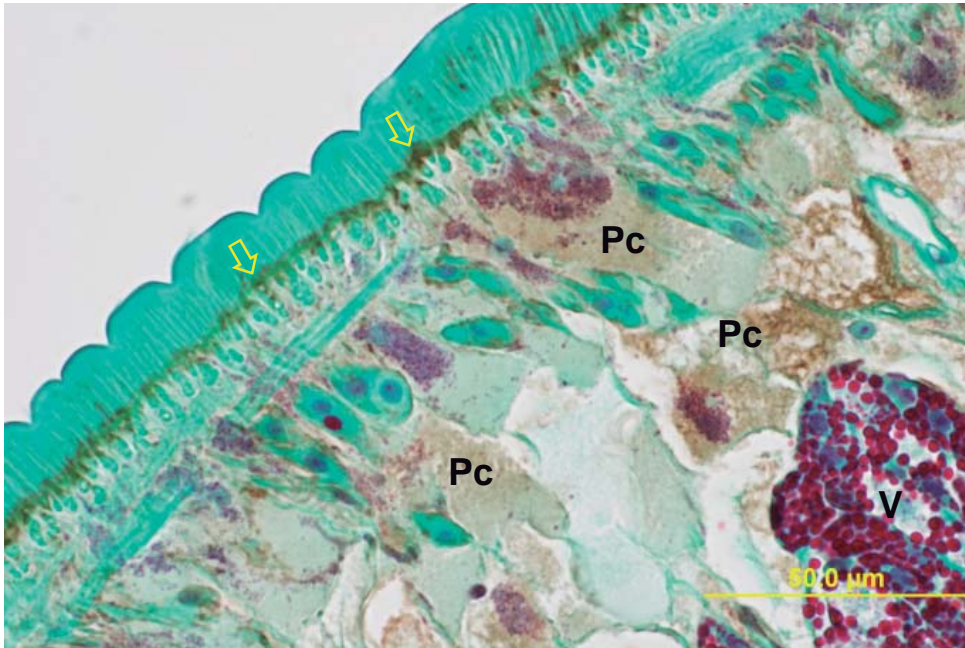


Figura 10. Inmunocitocalización de la proteína MF6p/FhHDM-1 (tinción marrón) en una sección histológica de adultos de *F. hepatica* con el AcMo MF6 teñidas con tinción Tricrómica de Wheatley (Sanmartín et al., 1991). Nótese los gránulos presentes entre los cuerpos celulares del tegumento y debajo del tegumento hacia donde la proteína es secretada (verde marrónáceo, flechas). Pc, células parenquimales; Tg, tegumento; V, glándulas vitelógenas. Imagen cedida por la Dra. Victoria Martínez-Sernández.

inhibidor tipo kunitz recombinante (SmKI-1) que ha demostrado cierto grado de protección en ratones (Ranasinghe *et al.*, 2018).

### *Otros productos de excreción/secreción relevantes*

En los productos ES también han sido descritas otras proteínas que no han sido testadas como candidatos vacunales, aunque merecen ser mencionadas gracias a su relevancia en el desarrollo exitoso de la infección por *F. hepatica*.

## **DIPEPTIDIL PEPTIDASAS**

Aunque la principal actividad de degradación la cumplen las catepsinas, también se ha demostrado la presencia de dipeptidil peptidasas, proteasas de serina capaces de degradar colágeno tipo I junto a las CL (Berasain *et al.*, 1997). Estas exoproteasas son secretadas tanto por NEJ como por estadios inmaduros y madu-

ros del parásito (Carmona *et al.*, 1994). Como proteasas, se cree que éstas contribuyen en la digestión de macromoléculas del hospedador (Maggioli *et al.*, 2011a), permitiendo la absorción de dipéptidos a modo de nutriente a través del intestino, actividad especialmente relevante en los últimos estadios de desarrollo del parásito (Carmona *et al.*, 1994).

## LEGUMAÍNA

Esta proteasa cuyo nombre deriva de su amplia distribución en semillas de legumbres, fue descrita inicialmente como una asparaginil endopeptidasa de *C. ensiformis*, involucrada en el procesamiento de la concanavalina A (Takeda *et al.*, 1994). En *F. hepatica* ha sido identificada una proteasa de tipo legumaína presente en los productos ES de NEJ cuya actividad aparentemente ésta involucrada en la activación de la procatepsina B1 (Tort *et al.*, 1999; Tkalcevic *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1998; Beckham *et al.*, 2006).

## SERPINA

Las serpinas son inhibidores irreversibles de las proteasas de serina, identificadas en los productos ES y la fracción somática soluble de NEJ, con propiedades anticoagulantes e inmunomoduladoras, que durante la infección permiten el establecimiento y la supervivencia de *F. hepatica* (Figueroa-Santiago y Espino, 2017; Di Maggio *et al.*, 2016).

## CISTATINAS

Son proteínas que se unen al sitio catalítico de proteasas tipo papaína (por ej. CL), inhibiéndolas de forma reversible y que se cree son requeridas para proteger al NEJ de sus propias proteasas (Khaznadji *et al.*, 2005). Recientemente, han sido estudiadas tres cistatinas recombinantes pertenecientes a la subfamilia de las estefinas (FhStf-1, FhStf-2 y FhStf-3), con una potente actividad inhibidora de CL de *F. hepatica* y que difieren en su capacidad para inhibir las catepsinas B, L y C de hospedadores mamíferos (Cancela *et al.*, 2017).

## *Antígenos asociados al tegumento*

El tegumento es la parte del parásito con mayor superficie de contacto con los tejidos y fluidos del hospedador, participando en las interacciones bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas entre hospedador y parásito. Inicialmente se le consideró como una cutícula metabólicamente inerte secretada por células bajo las capas mus-

culares. Sin embargo, actualmente se le considera un “sincitio” formado por la fusión de células tegumentales especializadas, localizadas debajo de las capas musculares longitudinales y transversales (Fairweather *et al.*, 1999). Es una capa metabólicamente activa, especializada en la síntesis y secreción de varias sustancias, absorción de nutrientes y osmorregulación. Ésta también provee de protección al parásito frente a la actividad surfactante de la bilis, al efecto del sistema inmune del hospedador, y frente a enzimas digestivas del hospedador o incluso de aquellas liberadas por el mismo parásito (Bennett y Threadgold, 1975; citados por Fairweather *et al.*, 1999).

Por otro lado, se sabe que los adultos de *F. hepatica* presentan un metabolismo mayoritariamente anaeróbico ya que viven en los conductos biliares donde la presión de oxígeno es relativamente baja. Sin embargo, éstos están expuestos a las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas de forma endógena durante la producción de huevos, o exógena, producidas por células efectoras del sistema inmune (Assady *et al.*, 2011), por lo que las enzimas antioxidantes son de gran relevancia (McGonigle *et al.*, 1997). Si bien *F. hepatica* carece de actividad catalasa (McGonigle *et al.*, 1997), una de las enzimas antioxidantes más frecuentes e importantes (Amstad y Cerutti, 1990), se ha demostrado la expresión de otras enzimas que cumplen un rol clave en la detoxificación de las ROS endógenas y exógenas (Henkle-Dührsen y Kampkötter, 2001). Dentro de los antígenos asociados al tegumento con interés vacunal, se encuentran varias enzimas antioxidantes (McGonigle *et al.*, 1997).

### **PEROXIRREDOXINA (PRX)**

Es una enzima que protege al NEJ del estrés oxidativo durante la invasión de la pared intestinal y la migración a través de la cavidad peritoneal del hospedador (Sekiya *et al.*, 2006) y que en el parásito adulto es ejercida por la tioperoxirredoxina (McGonigle *et al.*, 1997). La peroxirredoxina ha sido testada como antígeno recombinante (rFhPrx) en algunos ensayos de protección vacunal en cabras, en los que se han obtenido resultados contradictorios, reportados por el mismo grupo de investigación (Mendes *et al.*, 2010; Buffoni *et al.*, 2012).

### **GLUTATIÓN-S-TRANFERASAS (GST)**

Son una familia de enzimas involucradas en la eliminación de un amplio rango de sustancias potencialmente tóxicas, a través de la conjugación con glutatión. Hasta el momento, han sido identificadas varias isoenzimas diferentes de GST, presentes en los productos de desecho liberados por metacercarias (Mannervick, 1985; Tsuchida y Sato, 1992; citados por Creaney *et al.*, 1995), en el citoplasma de células parenquimales, presentes en el subtegumento de larvas juveniles y ma-

duras, además del tegumento, o asociadas a las lamelas del epitelio del ciego de larvas maduras (Howell, 1988 y Wijffels, 1992; citados por Creaney *et al.*, 1995). Su interés vacunal surge de la protección obtenida por sus homólogos frente a *S. mansoni* y *S. japonicum*, sugiriendo su potencial como posible candidato frente a *F. hepatica* (Spithill y Dalton, 1998). Se han realizado ensayos con distintas formas de este antígeno, obteniéndose protección significativa con la forma nativa purificada en bovinos y ovinos, pero no con las formas recombinante o con vacunas de ADN, testadas en bovino, caprino y ratón (ver Tabla 1).

### **TIOREDOXÍN GLUTATIÓN REDUCTASA (TGR)**

La TGR forma parte de la familia de las tioredoxin reductasas, principales enzimas redox dependientes de tiol, involucradas en el control del balance redox celular. La TGR presente en parásitos plathelminthos se diferencia de los sistemas convencionales presentes la mayoría de células eucarióticas, razón por la cual se piensa que esta molécula podría ser un excelente candidato vacunal (Maggioli *et al.*, 2011b). A este respecto, los ensayos vacunales de protección frente a *F. hepatica* reportaron una reducción significativa de la carga parasitaria en conejos, pero no en bovinos, previamente inmunizados con la forma recombinante de la TGR (ver Tabla 1).

### **OTRAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES RELEVANTES**

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima con acción detoxificante de las ROS, a través de la dismutación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Assady *et al.*, 2011). La SOD, así como la GST, están presentes en NEJ de *F. hepatica*, con niveles que se incrementan (entre 2 a 20 veces) en los estadios inmaduros y maduros del parásito (Ravida *et al.*, 2016b), con una actividad especialmente alta en los productos ES, en comparación con los extractos somáticos y/o solubles en detergente (Piacenza *et al.*, 1998). Aunque no ha sido reportado su uso como candidato vacunal en *F. hepatica* (FhSOD), se han hecho ensayos serológicos utilizando la SOD de *F. gigantica* (FgSOD) muy cercana en homología con la FhSOD (con un 98.9%), donde sueros de conejos inmunizados con la forma recombinante de la FgSOD reconocen la forma nativa purificada (Jaikua *et al.*, 2016), mientras que sueros de búfalos infectados con *F. gigantica* no han reconocido la forma recombinante de la FgSOD (Lalrinkima *et al.*, 2015). Otra familia de enzimas relacionadas son las glutatión peroxidasas (GPX), enzimas capaces de metabolizar el peróxido de hidrógeno. Esta familia de enzimas pueden contener selenio (en la mayoría de mamíferos) o ser independientes de este, como es el caso de nematodos parasitarios (Henkle-Dührsen y Kampkötter,

2001). En *F. hepatica* se ha descrito una actividad mínima de la GPX independiente de selenio (Barret, 1980; citado por McGonigle *et al.*, 1997) y se sugiere que la eliminación del peróxido de hidrógeno podría deberse principalmente a la Prx (McGonigle *et al.*, 1997), mencionada previamente en este apartado.

## OTRAS PROTEÍNAS RELEVANTES

Además de las moléculas testadas como antígenos vacunales, en el tegumento han sido descritas glicoproteínas con propiedades inmunomoduladoras, predominantemente oligosacáridos que se expresan en las espinas, las ventosas y la cubierta tegumentaria de NEJ (Ravida *et al.*, 2016b), incluyendo: el receptor de tetraspanina CD63, proteína estructural de membrana asociada a la activación, adhesión y diferenciación de eosinófilos, mastocitos y macrófagos (Wilson *et al.*, 2011); la TRIL, proteína que unida directamente al LPS podría explicar cómo el tegumento previene respuestas inducidas por LPS en células dendríticas y mastocitos (Ravida *et al.*, 2016b); la nardilisina, metaloproteasa que puede prevenir la unión o activación de la enzima convertidora de TNF $\alpha$ , y/o interferir en el equilibrio entre la activación anormal de células T y la anergia (Ravida *et al.*, 2016b); la proteína de choque térmico HSP70, enzima cuya acción podría relacionarse con la modulación de la respuesta inmune del hospedador (Morphew *et al.*, 2013). Además de las glicoproteínas, recientemente ha sido descrita una proteína miembro de la superfamilia TGF- $\beta$ , específicamente una molécula tipo activina/TGF, denominada FhHTM, que deriva de *F. hepatica* y que ha demostrado ser relevante en la embrionación de huevos, así como en el incremento de la viabilidad y motilidad de NEJ (Japa *et al.*, 2015).

### *Antígenos somáticos*

Como se mencionó al inicio de este apartado, los antígenos somáticos son otra fuente importante de moléculas, varias de ellas compartidas con los productos de ES tanto de NEJ como de adultos de *F. hepatica*, aunque en proporciones distintas como se puede apreciar en la Figura 2 (Shafiei *et al.*, 2015). Dentro de las proteínas somáticas, ya sean estructurales, citoplasmáticas o metabólicas, podemos encontrar las siguientes:

### **PARAMIOSINA (PMY)**

Es una proteína fibrilar somática, localizada principalmente en el músculo de invertebrados, como componente del núcleo de filamentos gruesos, cuyo nombre deriva de su grado de homología con la miosina (Cohen *et al.*, 1987). Sin embargo, también se ha demostrado su presencia en estructuras extramusculares,

como la superficie lamelar del intestino y en el tegumento. Esta ubicuidad sugiere una interacción de la Pmy con el sistema inmune del hospedador, de forma similar a otras infecciones helmínticas, interfiriendo en la vía clásica de activación del complemento (Cancela *et al.*, 2004). Además de la caracterización de la FhPmy, el autor citado menciona ensayos de su grupo utilizando este antígeno en ovinos, aunque no existen publicaciones que respalden una capacidad protectora vacunal hasta el momento.

### **PROTEÍNAS DE UNIÓN A ÁCIDOS GRASOS (FABPs)**

Son una larga familia de proteínas citoplasmáticas involucradas en la unión y transporte de una variedad de ligandos hidrofóbicos (especialmente lípidos no sintetizados por el parásito) y se encuentran localizadas en el tegumento y células parenquimales (Ramos-Benítez *et al.*, 2017). Las FABPs fueron de las primeras fracciones definidas y antigénicas, testadas como vacuna frente a la fasciolosis desde los años 70 (Hillyer, 2005). Han sido realizados varios ensayos de protección con la FABP de *F. hepatica* como vacuna de subunidades, utilizando la forma purificada (nFh12) y recombinante (rFh15), en especies tales como conejos, ratones y ovejas, obteniéndose valores de protección dispares en esta última especie, desde la reducción (Lopez-Aban *et al.*, 2007), hasta el aumento de la carga parasitaria (Ramajo *et al.*, 2001), ambas reportadas por el mismo grupo de investigación. Dada la estrecha relación con la FABP homóloga de *S. mansoni*, también ha sido testada la forma recombinante de esta (Sm14) en las especies antes mencionadas, además de cabras, en las cuales también ha inducido un aumento de la carga parasitaria, en comparación con otras formulaciones recombinantes de la CL1 y la Prx, derivadas de *F. hepatica* (Buffoni *et al.*, 2012).

### **PROTEÍNAS DE TIPO SAPOSINA (SAP)**

Las proteínas que forman parte de esta familia difieren ampliamente en sus funciones. Así, en humanos y roedores, éstas abarcan desde la organización de lípidos en el surfactante pulmonar a actividades antimicrobianas y antitumorales, donde cada molécula es capaz de interactuar con fosfolípidos (Reed *et al.*, 2000). En *F. hepatica*, ha sido localizada una de las proteínas de esta familia, la denominada FhSAP-2, en las células epiteliales que rodean el intestino, además de las células tegumentales de adultos y NEJ (Caban-Hernandez y Espino, 2013). Dicho antígeno ha sido empleado tanto para el diagnóstico de fasciolosis crónica en humanos (Figuroa-Santiago *et al.*) como candidato vacunal en ensayos de protección en ratones (Espino y Rivera, 2010) y conejos (Espino y Hillyer, 2004).

### LEUCIN AMINOPEPTIDASA (LAP)

Es una metaloproteasa localizada en las células de la gastrodermis que recubren el tracto alimentario del adulto de *F. hepatica*, siendo particularmente abundante en las microvellosidades. Su actividad exopeptidasa se asocia al catabolismo de péptidos generados por la actividad de otras endoproteasas en el intestino, liberando aminoácidos que pueden ser utilizados en el anabolismo proteico del parásito y cuya actividad se ve incrementada en presencia de cationes metálicos divalentes (Maggioli *et al.*, 2011a). La LAP ha sido testada como candidato vacunal frente a *F. hepatica* en ensayos de protección en ovinos, empleando tanto su forma nativa purificada como la recombinante, obteniendo las mayores reducciones de carga parasitaria reportadas hasta el momento (>80%), tanto con adyuvantes de uso experimental como el adyuvante completo de Freund (CFA; Piacenza *et al.*, 1999) como con otros autorizados para su uso comercial (Maggioli *et al.*, 2011a), en los que se incluyen hidróxido de aluminio y emulsiones basadas en aceite mineral (Burakova *et al.*, 2018).

### FOSFOGLICERATO QUINASAS (PGK)

Son enzimas involucradas en el metabolismo energético del parásito, en reacciones de anabolismo metabólico de estadios tempranos del desarrollo del parásito, así como metabolismo aeróbico de estadios tardíos (Jaros *et al.*, 2010). Hasta el momento no se han reportado experimentos sobre el uso de tales moléculas en diagnóstico y/o vacunación.

### CADENA LIGERA REGULADORA DE LA MIOSINA (MRLC)

Es una molécula que forma parte de los llamados “antígenos ocultos” y está involucrada en la contracción del músculo liso, posibilitando la activación de la miosina y su interacción con la actina. Estudios en *S. mansoni* señalan como el praziquantel, uno de los fármacos comúnmente utilizados para tratar la esquistosomosis, actúa fosforilando la MRLC, lo que conduce a la afluencia de calcio, permitiendo así la acción de los linfocitos y la muerte del parásito. Recientemente una forma recombinante de MRLC ha sido testada en ratas como candidato potencial para vacunas, debido al éxito previo con otro antígeno de la misma familia (MLC), utilizado en la protección de ovejas frente a garrapatas (Henker *et al.*, 2017).

### Respuesta inmune frente a *F. hepatica*

Es un hecho conocido que *F. hepatica* puede infectar a un gran número de mamíferos, si bien el grado de susceptibilidad a la infección y la capacidad para

generar una respuesta inmunológica frente al parásito es diferente en cada especie (Haraun y Hyllier, 1986). Así, mientras que las ovejas (Chauvin *et al.*, 2000) y las cabras (Reddington JJ *et al.*, 1986) son altamente susceptibles a infecciones primarias y secundarias, y la cronicación de la enfermedad es un hecho común, otras especies como las ratas o las vacas presentan una cierta resistencia a la reinfección (Haraun and Hyllier, 1986).

Desde una perspectiva general, la respuesta inmune durante una infección por *F. hepatica* en rumiantes cursa con la proliferación de células específicas de antígeno y la síntesis de IFN- $\gamma$ , que va cambiando hacia una respuesta de tipo Th2 en la que predomina la producción de las citoquinas IL-4 e IL-13, con respuestas celulares variables que comienzan a decrecer desde la semana 2 hasta las semanas 6-8 p.i. Posteriormente, a medida que la infección progresa, la proliferación de células específicas de antígeno disminuye de manera notoria, predominando las citoquinas reguladoras IL-10 y TFG- $\beta$  (ver Figura 11). Este patrón general puede estar también acompañado de múltiples picos de eosinofilia, activación alternativa de los macrófagos y de un perfil de anticuerpos dominado por el isotipo IgG1

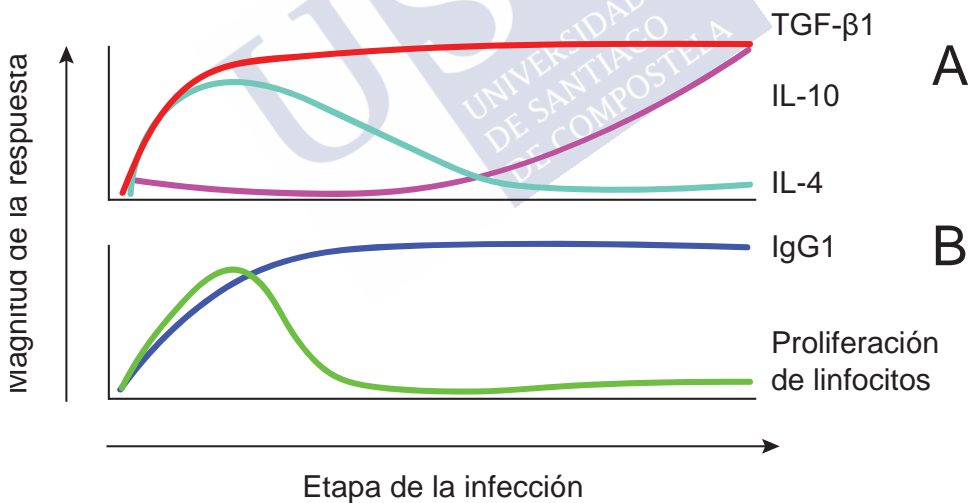


Figura 11. Cinética de la producción de citoquinas y proliferación de linfocitos con el progreso de la infección por *F. hepatica*. La respuesta adaptativa se hace evidente a partir de la semanas 3-4 post-infección, momento en que la IL-4 e IgG1 presentan valores medibles (A,B). También se puede observar una proliferación de linfocitos que se solapa con la presencia de NEJ en el intestino, aunque el pico alcanzado se disipa rápidamente (B). Mientras que los niveles de TGF- $\beta$  se mantienen altos a lo largo de la infección, los valores IL-10 y de IL-4 presentan una relación inversa (A). En general, los niveles IgG1, la proliferación linfocitaria y la respuesta de citoquinas mostrados en esta figura se correlacionan con la carga parasitaria, indicando la importancia que cumplen los antígenos del parásito en la conducción de estas respuestas. Figura adaptada de Beesley *et al.*, (2018).

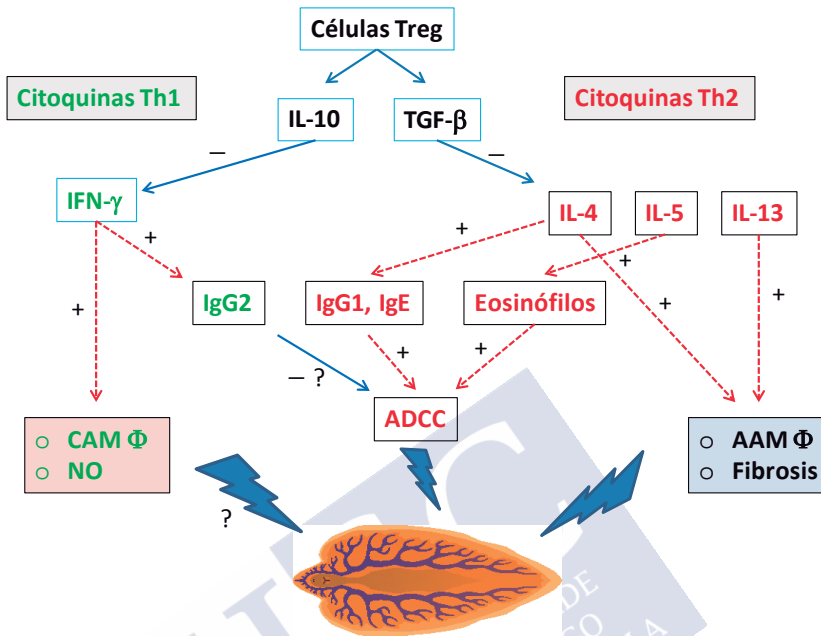


Figura 12. Posibles mecanismos inmunológicos inducidos en respuesta frente a *F. hepatica* y su regulación por el parásito. Se proponen dos mecanismos inmunológicos: i) durante la fase temprana de la infección los macrófagos activados por vía clásica (M1) pueden inducir NO que puede ser tóxico para el parásito.; ii) durante la fase crónica de la infección, los mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) permite la liberación de mediadores tóxicos como la proteína básica principal, la proteína catiónica de los eosinófilos y reactivos intermediarios del N2. La activación de macrófagos por vía alternativa (M2a) pueden también producir moléculas tóxicas para *Fasciola*, al tiempo que participan en los procesos de reparación tisular. Concomitantemente, la inducción de células Treg producen citoquinas que frenan la producción de citoquinas Th1 y Th2. Esquema confeccionado a partir de la revisión publicada por Moreau y Chauvin (2010).

que va incrementando desde el inicio de la infección (Beesley *et al.*, 2018). En la Figura 12, (tomada de Moreau y Chauvin, 2009), se muestran los mecanismos inmunoreguladores que podrían operar a nivel hepático en respuesta a una infección por *F. hepatica*. Sin embargo, como se describe a continuación, el parásito ha desarrollado mecanismos de evasión para contrarrestar tales defensas.

### *Efecto de la infección sobre la respuesta inmune innata*

Durante la invasión de NEJ se ha descrito que las moléculas derivadas del parásito tienen un efecto profundo sobre las células de la respuesta inmune innata

del hospedador, según la cuál, los productos ES y los glicanos derivados del tegumento de *F. hepatica* afectan la activación de las APCs, principalmente DC y macrófagos, lo que potencia una respuesta inmune de tipo Th2, caracterizada por la activación de células T reguladoras, anérgicas y/o hiporeactivas, acompañadas de células B y monocitos/macrófagos reguladores (van Die y Cummings, 2017).

## CÉLULAS DENDRÍTICAS (DC)

Las DC son células fagocíticas especializadas que presentan abundantes ramificaciones y juegan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune. Las DC son una población heterogénea de células (Chistiakov *et al.*, 2014), mayoritariamente de origen hematopoyético, que comprende DC convencionales (cDC, similares a los monocitos), DC plasmacitoides y DC foliculares (de origen mesenquimal y no expresan moléculas del CPH de clase II).

Por su gran capacidad para capturar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T de manera óptima las DC son consideradas las principales células presentadoras antigénicas (Vázquez *et al.*, 2012). Actualmente se sabe que también pueden activar otros tipos celulares como linfocitos B, células NK, macrófagos o eosinófilos, además de generar tolerancia inmunológica.

En relación con la fasciolosis, se ha descrito que el extracto total de *F. hepatica*, la molécula tipo Kunitz (Fh-KTM; Falcon *et al.*, 2014) y los antígenos tegumentales (FhTeg; Hamilton *et al.*, 2009), vuelven a estas células hiporespondedoras a la activación mediada por receptores TLR, con lo que se atenúa la secreción de citoquinas proinflamatorias (Vukman *et al.*, 2013c). Este es el caso de las moléculas rFhCL1 y rFhGST-si, que a través del aumento de la producción de IL-10 suprimen la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-12p70, IL-6, TNF- $\alpha$ ) y la expresión de moléculas coestimuladoras de la superficie celular (CD80, CD86, CD40), afectando la capacidad fagocítica y la capacidad de las DCs para estimular células T, con la correspondiente atenuación de las respuestas celulares inflamatorias Th1 y Th17 (Dowling *et al.*, 2010). También se ha comprobado que los glicanos derivados de los productos ES y los glicoconjugados de superficie inducen la expresión de DC semimaduras, caracterizadas por secretar IL-10, y por presentar una baja expresión de moléculas MHC-II, como consecuencia de la interacción de estas moléculas con receptores CLR específicos de manosa (Rodríguez *et al.*, 2015). Sin embargo, otros autores reportan como las DC expuestas a mucina *ex vivo* (Noya *et al.*, 2017) y/o a antígenos provenientes del extracto total del parásito, aumentan la expresión de TLR4 y permiten la maduración de las DC en presencia de LPS, promoviendo de esta manera respuestas inmunes de tipo Th1 con niveles

de IFN- $\gamma$  elevados y una mayor expresión de anticuerpos IgG específicos de antígenos del parásito (Noya *et al.*, 2017).

## MACRÓFAGOS

Los macrófagos son células que forman parte del sistema fagocítico mononuclear (antiguamente conocido como sistema retículo-endotelial) y que derivan de los monocitos de la sangre. Como se ha mencionado antes, dependiendo de la forma de activación, los macrófagos pueden diferenciarse en dos fenotipos principales: M1 y M2 (M2a, M2b y M2c; Martínez y Gordon, 2014).

Las moléculas derivadas de *F. hepatica* promueven la activación de macrófagos M2a, lo que conlleva una inhibición de las respuestas Th1 (a través de la liberación de citoquinas reguladoras IL-10 y TGF- $\beta$ ), además de suprimir la proliferación linfocitaria (Donnelly *et al.*, 2005). Entre las moléculas parasitarias implicadas se han propuesto: la FhPrx (Donnelly *et al.*, 2008), la FhTPx (Donnelly *et al.*, 2005) y una quitinasa descrita en ovinos (Flynn *et al.*, 2007). Otras moléculas pueden actuar alterando el funcionamiento de los receptores TLR. En particular, se ha notificado que una molécula derivada de las FABP (Fh12) es capaz de inhibir la activación del receptor TLR4 (Guasconi *et al.*, 2012) y de promover la activación de macrófagos M2a resistentes a la estimulación con LPS (Figueroa-Santiago y Espino, 2014) y que la FhCL1 es capaz de cortar el TLR3 dentro del endosoma, inhibiendo así la liberación de factores proinflamatorios por parte de los macrófagos (McNeilly y Nisbet, 2014). Finalmente, otros estudios han mostrado que la infección por *F. hepatica* cursa con un incremento de la hemoxygenasa-1 (HO-1) producida por células M2a y DC reguladoras, que se acompaña de un incremento en la producción de citoquinas IL-10 y TGF- $\beta$  en el hígado (Carasi *et al.*, 2017). La inhibición farmacológica de la HO-1 con el inhibidor SnPP revocó los efectos supresores de la IL-10 (Carasi *et al.*, 2017).

## NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos o polimorfonucleares son los leucocitos más abundantes de la sangre y su número aumenta considerablemente durante los procesos inflamatorios agudos. Desde hace mucho tiempo se sabe que las ratas pueden presentar resistencia a la reinfección por *F. hepatica* y que la entrada del parásito en la cavidad peritoneal cursa con un rápido recubrimiento de anticuerpos y de células inmunes, principalmente neutrófilos, que podrían estar implicados en la alteración del tegumento y la muerte de los NEJ en tan solo 4h p.i. (Davies y Goose, 1981; Burden *et al.*, 1983). También se ha observado que durante la infección se produ-

ce un reclutamiento de poblaciones celulares peritoneales ricas en neutrófilos, las cuales presentan incrementada la expresión de superóxido (Jedlina *et al.*, 2011). Aunque algunos autores señalan que el aumento de los neutrófilos circulantes en ratas ocurre a partir de la semana 4 p.i. (Poitou *et al.*, 1993), otros indican que la infiltración masiva del hígado por neutrófilos ocurre en el primer mes de infección (Keegan y Trudgett, 1992). Además de la infección, el aumento de neutrófilos circulantes puede ser inducido en ratas por inmunización con moléculas derivadas del parásito, específicamente por FhGST (Wedrychowicz *et al.*, 2001) y por FhPGK (Wesolowska *et al.*, 2016).

Por otra parte, aunque se ha descrito que durante la infección experimental de vacas el tejido hepático lesionado presentaba un alto infiltrado de neutrófilos durante la primera semana p.i. (Doy y Hughes, 1984), los productos ES generados por el parásito son capaces de alterar la capacidad de respuesta de estas células (Jefferies *et al.*, 1996, 1997; Baeza *et al.*, 1993). En este sentido, también se ha observado que la respuesta de neutrófilos es significativamente menor en animales infectados por *F. hepatica* y posteriormente vacunados con los patógenos respiratorios PI-3, BRSV y *Mannheimia haemolytica* (Krump *et al.*, 2014). De manera similar, estudios realizados en cabras demostraron que la respuesta oxidativa de neutrófilos durante la fagocitosis bacteriana puede verse afectada durante la infección concomitante de *F. hepatica* (Martinez-Moreno *et al.*, 2000).

## EOSINÓFILOS

Los eosinófilos representan menos del 5% de los leucocitos de la sangre en animales sanos, pero su número se incrementa dramáticamente en infecciones por helmintos (Huang y Appleton, 2016). Sin embargo, su papel específico en la defensa frente a infecciones parasitarias no ha sido definido todavía con claridad (Klion *et al.*, 2004).

El incremento progresivo de eosinófilos presentes en el líquido peritoneal durante los estadios tempranos de infección con *F. hepatica* ha sido reportado por muchos grupos de investigación en varias especies incluyendo ovejas (Ruiz-Campillo, 2018), vacas (Doy y Hughes, 1984), ratas (Jedlina *et al.*, 2011) y ratones (Milbourne y Howell, 1990), además de animales aslvajes como el venado (Vengust *et al.*, 2003) y el bisonte (Foreyt y Drew, 2010).

En ovejas se produce una respuesta bifásica temprana de eosinófilos circulantes, sin evidencia de que éstos confieran una resistencia significativa durante la infección por *F. hepatica* (Sinclair, 1975; Raadsma *et al.*, 2007). La infección experimental de ovejas con diferentes cantidades de metacercarias (5, 30 y 150) revela

que el aumento de eosinófilos en sangre periférica es significativamente diferente y acorde a la dosis de infección, pero aparece incluso cuando la dosis es muy baja (Chauvin *et al.*, 2001). De hecho, el daño hepático parece ser más severo cuando la infección experimental se hace con dosis de metacercarias más pequeñas y repetidas, en cuyo caso el infiltrado inflamatorio de células (incluyendo los eosinófilos) es particularmente más marcado (Perez *et al.*, 2002). Los infiltrados de eosinófilos han sido encontrados en el hígado de ovejas tanto en primoinfecciones (Lee *et al.*, 1992) como en reinfecciones experimentales o en infecciones naturales (Meeusen *et al.*, 1995; Matanovic *et al.*, 2007). Dichos infiltrados se localizan en los túneles migratorios producidos por larvas juveniles en el hígado, que aparecen como áreas locales de necrosis (Chauvin y Boulard, 1996).

A pesar de lo expuesto antes, el papel de los eosinófilos en la fasciolosis ovina es diferente dependiendo de la especie de *Fasciola*. En este sentido, los estudios realizados en ovejas cola delgada de indonesia (ITT) demuestran que la resistencia de esta raza de animales a la infección por larvas juveniles de *F. gigantica* está asociada a un mecanismo ADCC y a la liberación de radicales superóxido por parte de eosinófilos y macrófagos *in vitro*. Este mecanismo depende del contacto entre estas células efectoras y el parásito, pero no es efectivo en la infección por *F. hepatica*, posiblemente debido a una mayor expresión de SOD, que le permitiría evadir la muerte mediada por superóxido (Piedrafita *et al.*, 2007). Además, recientemente se ha notificado que las infecciones por *F. hepatica* son capaces de inducir apoptosis *in vivo* de los eosinófilos, tanto en la periferia de focos necróticos en el hígado (Escamilla *et al.*, 2016) como en el peritoneo de ovejas infectadas experimentalmente (Escamilla *et al.*, 2017).

Respecto a las vacas, se ha sido descrito un aumento de eosinófilos en la mucosa del intestino delgado y colon, que se presenta durante cada reinfección experimental y que el mismo es dependiente de la dosis (McCole *et al.*, 1998; Wicki *et al.*, 1991). Además, durante la migración temprana de larvas inmaduras, se presenta en el hígado un infiltrado de neutrófilos y linfocitos desde el día 7 p.i., seguido de una marcada respuesta de eosinófilos a partir del día 14 p.i. (Doy y Hughes, 1984). Otros autores reportan como los eosinófilos provenientes de la glándula mamaria de vacas infectadas con *F. hepatica*, presentan gránulos que contienen una proteína similar a la proteína básica principal presente en humanos, y que en gran cantidad es capaz de dañar y matar larvas juveniles de *F. hepatica in vitro* (Duffus *et al.*, 1980). Sin embargo, en otro trabajo de este mismo autor se sugiere que la rápida renovación y excreción del glicocálix externo de NEJ previene la adherencia íntima de granulocitos (incluyendo los eosinófilos mencionados) y el daño mediado por ADCC (Duffus y Franks, 1980). De hecho, otros autores sugieren la presencia de

una capa protectora compuesta de complejos antígeno-anticuerpo que derivan del glicocálix secretado del parásito, que impiden la unión estrecha de los eosinófilos y el efecto deletéreo asociado a la degranulación de éstos (Glauert *et al.*, 1985). En otros trabajos relacionados, utilizando antígenos somáticos y productos ES derivados del parásito, los autores no hallaron correlación entre la respuesta de eosinófilos y el desarrollo de resistencia en vacas (Bossaert *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha demostrado que las CL presentes en los productos ES de los NEJ, previenen la adhesión de los eosinófilos del hospedador (Carmona *et al.*, 1992), lo que podría estar relacionado con la capacidad de estas enzimas para cortar inmunoglobulinas en la región bisagra (Carmona *et al.*, 1993).

Finalmente, en ratas existen estudios muy antiguos de la resistencia desarrollada en esta especie frente a la reinfección por *F. hepatica*, en la que se observó una marcada respuesta intestinal de eosinófilos (Doy *et al.*, 1981; Charbon *et al.*, 1991; Keegan y Trudgett, 1992) que permanece elevada durante toda la fase migratoria del parásito (Poitou *et al.*, 1993). Durante la migración de NEJ también se ha observado un reclutamiento temprano de eosinófilos, capaces de producir altos niveles óxido nítrico inducible *in vivo* (Jedlina *et al.*, 2011). También existen estudios *in vitro* notificando que los eosinófilos derivados del peritoneo podrían adherirse al tegumento de NEJ de *F. hepatica* (Doy *et al.*, 1980) y liberar el contenido de sus gránulos y dañar al parásito (Davies y Goose, 1981; Burden *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1992).

## MASTOCITOS

Los mastocitos o células cebadas constituyen otra población de granulocitos que también tienen importantes funciones en la respuesta inmunitaria. Además de su reconocida participación liberando, junto con los basófilos, mediadores en las respuestas de hipersensibilidad tipo I, estas células desempeñan importantes funciones en la reparación de tejidos, en la angiogénesis, en la tolerancia inmunológica y en el reconocimiento de patógenos. De hecho, además del receptor de alta afinidad para IgE (FcεR1), estas células tienen receptores para reconocimiento de patrones (ej. TLR), capaces de reconocer patógenos, y también pueden activarse por algunos componentes del complemento (da Silva *et al.*, 2014). Aunque estas células participan de forma relevante en la erradicación de helmintos intestinales, su posible papel en el transcurso de la fasciolosis no está del todo claro (Cwiklinski *et al.*, 2016). Inicialmente fue notificado un aumento significativo de mastocitos en el hígado y en el intestino de bovinos (Bossaert *et al.*, 2000; Wicki *et al.*, 1991). Este incremento podría estar relacionado con la liberación de moléculas del tegumento de *Fasciola*, capaces de inducir la producción de quimiocinas por parte de

DC, lo que promovería la quimiotaxis de los mastocitos (Vukman *et al.*, 2013a). También se ha descrito que los antígenos tegumentales afectan directamente la capacidad de los mastocitos para promover la respuesta inmune de tipo Th1, suprimiendo mecanismos tales como la producción de citoquinas, la transcripción de factores en la vía de señalamiento TLR, la expresión de ICAM1, y la activación de NF- $\kappa$ B y de MAPK (Ravida *et al.*, 2016a).

### *Efecto de la infección sobre la respuesta inmune adaptativa*

## **POLARIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DURANTE LA INFECCIÓN POR *F. HEPATICA***

Las células Th (CD4+) regulan las respuestas inmunes celulares y humorales apropiadas frente a un amplio rango de patógenos (Baumjohann y Ansel, 2013). Para ello, las células Th vírgenes (Th0) que se encuentran inicialmente en un estado funcionalmente inmaduro, deben ser activadas a través de su TCR, proliferar y diferenciarse en células del subtipo Th1 responsables de la inmunidad mediada por células o del subtipo Th2 responsable de la inmunidad humoral (Lieberman *et al.*, 2003), diferenciación determinada principalmente por las citoquinas presentes durante el proceso de activación (ver Figura 13). De ahí, que las células Th0 activadas en presencia de las citoquinas IL-2 e IFN- $\gamma$  se diferencian en células Th1, mientras que las Th0 activadas en presencia de IL-4 conduce hacia la diferenciación de células Th2 (Zhang *et al.*, 2014).

Con carácter general, la inmunidad Th1 es activada ante la replicación de patógenos intracelulares, mientras que las respuestas Th2 deberían controlar la infección por helmintos y promover la cicatrización de tejidos durante la fase resolutive de un proceso infeccioso. Sin embargo, muchos patógenos aprovechan la polarización de la respuesta inmune en su propio beneficio, utilizando las vías regulatorias de la inmunidad del hospedador para limitar el daño de las respuestas inflamatorias favoreciendo la persistencia de la infección (Muraille *et al.*, 2014). Este es el caso de *F. hepatica* que durante la infección es capaz de modular la respuesta inmune del hospedador mamífero suprimiendo la respuesta Th1 y potenciar las respuestas Th2, caracterizadas por la supresión de la proliferación linfocitaria y la alta producción de IL-4 (Graham-Brown *et al.*, 2018), lo que se asocia a la infección crónica y no logra la eliminación del parásito (Flynn y Mulcahy, 2008; Donnelly *et al.*, 2010). Como ya hemos indicado, dicha respuesta está estrechamente relacionada con la activación alternativa de macrófagos (M2a), cuyo fenotipo regulador puede apreciarse desde el primer día de la infección en modelos murinos (Ruiz-Campillo

*et al.*, 2018). A este respecto, se ha demostrado que los productos ES del parásito, entre los que se incluyen moléculas como la Prx (Naranjo Lucena *et al.*, 2017) o la Fh12, derivada de la FABP (Figuroa-Santiago y Espino, 2014), son capaces de inducir la activación alternativa de macrófagos en hospedadores mamíferos. Como consecuencia de ello, se puede llegar a afectar la respuesta al LPS (agonista TLR4) y a la proteína purificada derivada de *Mycobacterium bovis* (agonista TLR2), efecto parcialmente dependiente de glicanos (Flynn y Mulcahy, 2008), especialmente los glicanos manosilados (Rodríguez *et al.*, 2018). En consecuencia, las infecciones por *F. hepatica* llegan a alterar la respuesta inmunológica a infecciones bacterianas concomitantes, como la inhibición de la respuesta protectora frente a *Bordetella pertussis* en ratones (Brady *et al.*, 1999) o la respuesta mediada por células frente a *M. bovis* en vacas (Naranjo Lucena *et al.*, 2017). Además, se puede ver negativamente afectado el diagnóstico postmortem de la tuberculosis de animales previamente expuestos a cepas virulentas en el matadero (Byrne *et al.*, 2018) y observarse una disminución en la respuesta al IFN- $\gamma$  de animales inmunizados con la cepa avirulenta “BCG”, utilizada en vacunación de humanos (Flynn *et al.*, 2007b). También se ha reportado que la infección en ganado bovino podría incrementar el riesgo de diseminación de *E. coli* O157, bacteria zoonótica que puede causar diarrea hemorrágica en humanos (Howell *et al.*, 2018).

## **LAS CÉLULAS TREG Y SU INFLUENCIA EN LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCIÓN POR *F. HEPATICA***

Durante la infección por *F. hepatica* se generan células Treg, como las células T CD4<sup>+</sup> Foxp3, presentes en los hígados de ovejas infectadas (Pacheco *et al.*, 2018), y células T $\gamma\delta$  (WC1<sup>+</sup>), capaces de inhibir la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en bovinos (Guzman *et al.*, 2014). Como consecuencia, en los principales nódulos linfáticos hepáticos las células T presentan un fenotipo de “agotamiento” caracterizado por una ausencia de proliferación específica frente a antígenos y pobre secreción de interleuquinas (Sachdev *et al.*, 2017). También se ha visto en ovejas, que si bien los productos ES derivados del parásito pueden inducir una leve proliferación de PBMC si se aplican a dosis bajas, a dosis óptimas son capaces de inhibir la estimulación inducida por mitógenos en las PBMC y en las células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Moreau *et al.*, 2002). Finalmente, otros estudios sugieren que varias proteínas que componen los productos ES de adultos de *F. hepatica* son capaces de unirse a citoquinas Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) y Th17 (IL-17) indicando que el parásito podría evadir la respuesta inmune interactuando directamente con las mismas (Liu *et al.*, 2017).

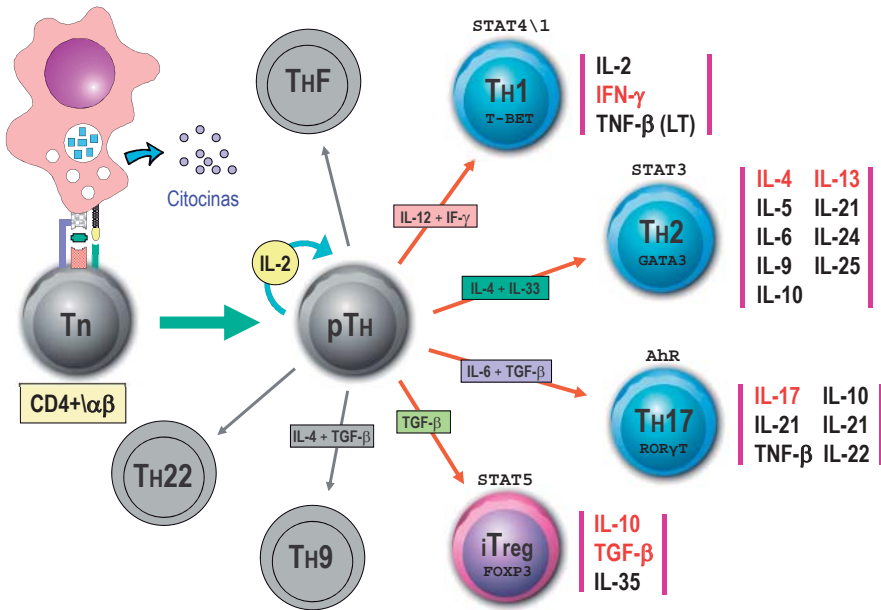


Figura 13. Esquema mostrando la diferenciación de linfocitos Th a partir de un precursor común dependiendo del ambiente de citoquinas (perfil de citoquinas recibidas). Basado en Hirota et al (2010).

## PAPEL DE LOS ANTICUERPOS EN LA RESISTENCIA A LA FASCIOSIS

Es bien conocido que los anticuerpos juegan un papel muy importante en la defensa del hospedador frente a patógenos extracelulares, limitando su infección y/o patogénesis a través de mecanismos efectores ADCC, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y/o por medio de neutralización directa (Forthal, 2014). Dentro de estos mecanismos, las respuestas ADCC parecen tener un papel importante en la muerte de larvas de helmintos durante la invasión del hospedador. Sin embargo, como ya hemos indicado, la relevancia de los mecanismos ADCC solo se han podido demostrar claramente en ovejas ITT frente a la infección por *F. gigantica*.

Por otra parte, algunos estudios en rumiantes revelan que las CL presentes en los productos ES de estadios inmaduros y maduros de *F. hepatica* pueden neutralizar la unión de los anticuerpos por dos mecanismos: i) cortando la región bisagra de las inmunoglobulinas (Carmona *et al.*, 1993) y ii) mediante desprendimiento y renovación rápida de la superficie del glicocálix (Hanna, 1980).

## Control de la fasciolosis

Aunque en la actualidad existen métodos sensibles y específicos para el diagnóstico de la infección tanto en los hospedadores definitivos (Mezo *et al.*, 2004, 2007; Martínez-Sernández *et al.*, 2016) como en el hospedador intermediario (Martínez-Ibeas *et al.*, 2013; Iglesias-Piñeiro *et al.*, 2016), la prevalencia de la fasciolosis animal continua siendo alta en muchas partes del mundo. Esto se debe a la dificultad que supone interrumpir el ciclo del parásito con los medios actualmente disponibles. Cabe señalar que las actuaciones sobre el hospedador intermediario se reducen, en la práctica, al drenaje de las praderas encharcadas que constituyen su hábitat, lo que resulta extremadamente costoso, sobre todo en explotaciones con alta prevalencia que suelen tener amplias áreas de pasto contaminadas. Además, y debido precisamente a su amplitud, el cercamiento de estas zonas para evitar la ingestión de hierba contaminada implica profundas modificaciones tanto en el manejo de los animales como del entorno, por lo que resulta impracticable.

### *Desarrollo de vacunas frente a F. hepatica*

El desarrollo de vacunas surgió como una estrategia de control alternativa prometedora, sustentada por distintas publicaciones que sugieren que los rumiantes podrían adquirir resistencia a la infección tras la vacunación con metacercarias irradiadas, extracto del parásito, o antígenos derivados del mismo (Ross, 1967). A pesar de estos intensos esfuerzos en investigación, el progreso en el desarrollo de una vacuna efectiva para el control de *F. hepatica* ha sido relativamente lento (Mendes *et al.*, 2010) e infructuoso. Durante los últimos 25 años se han llevado a cabo ensayos experimentales para el desarrollo de vacunas de subunidades empleando moléculas procedentes de *F. hepatica* en varios modelos animales, obteniendo resultados muy diversos, como se puede apreciar en la Tabla 1.

Aunque algunos de estos trabajos sugieren una alta protección frente a la infección por *F. hepatica*, también es cierto que los índices de protección tienden a ser muy variables, y no queda claro cuál es la forma más adecuada para administrar el antígeno a utilizar, si es más conveniente una vacuna monovalente o una multivalente, y tampoco existe un consenso sobre el tipo de adyuvante a emplear. Tampoco existe consenso sobre cual es la mejor ruta de inmunización y el número de dosis a emplear (Mendes *et al.*, 2010). Como puede apreciarse en la Tabla 1, los rangos de protección reportados en dichos trabajos son bastante variables y a pesar de que algunos de estos ensayos (publicados hace ya varios años) sugieren que las catepsinas podrían llegar a conferir altas tasas de protección, no existe una vacuna disponible a nivel comercial que pueda respaldar estas afirmaciones hasta

el momento (Wesolowska *et al.*, 2018). Como consecuencia de todo ello, hasta el momento no existe ninguna vacuna comercial ni tampoco vacunas experimentales que presenten potencial para su comercialización a corto/medio plazo.

### *Tratamiento farmacológico*

La actuación sobre el hospedador definitivo se reduce al tratamiento con fasciolicidas, que tienen limitaciones en cuanto a su capacidad para evitar la transmisión de la infección debido a: 1) ineficacia frente a los estadios inmaduros del parásito; 2) aparición de poblaciones de *F. hepatica* resistentes y 3) restricciones legales en cuanto a su uso en animales productores de alimentos para consumo humano.

Respecto al primer punto, hay que indicar que aunque existen actualmente 7 principios activos frente a *F. hepatica*, solo uno de ellos, el triclabendazol, es eficaz frente a fasciolas de un amplio rango de edad (a partir de las 2 semanas). La actividad del resto de las moléculas se restringe a los estadios de más de 6-8 semanas (rafoxanida, closantel, nitroxinil y clorsulón) o exclusivamente a las formas adultas de edad superior a las 12 semanas (albendazol y oxiclozanida) (Malone *et al.*, 1984; Yazwinski *et al.*, 1985; Boray, 1986; Zimmerman *et al.*, 1986; McKellar y Kinabo, 1991; Fairwather y Boray, 1999; George *et al.*, 2017). Algunos estudios han demostrado que mediante la administración de tratamientos repetidos estratégicamente a lo largo del año es posible interrumpir el ciclo biológico del parásito y reducir significativamente la prevalencia de infección (Cringoli *et al.*, 2006; Elitok *et al.*, 2006), especialmente cuando se utiliza triclabendazol que suprime la excreción de huevos y, por tanto, la contaminación de los pastos durante períodos más prolongados (hasta 8-10 semanas) (Parr y Gray, 2000). Sin embargo, la eficacia de los tratamientos puede verse comprometida por la aparición de poblaciones de *F. hepatica* resistentes. De hecho, en diferentes estudios de campo realizados en ovinos y bovinos de zonas endémicas se han descrito resistencias frente a todos los fasciolicidas, excepto a la oxiclozanida (Overend y Bowen, 1995; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2006; Mooney *et al.*, 2009; Elliott *et al.*, 2015; Hanna *et al.*, 2015; Novobilský y Höglund, 2015; Kelley *et al.*, 2016; Novobilský *et al.*, 2016; George *et al.*, 2017). De ahí que hayan surgido estudios proteómicos que traten de esclarecer los mecanismos moleculares implicados en la aparición de resistencia, algunos de los cuales sugieren que las cepas resistentes presentan alteraciones en el flujo de absorción y en la desintoxicación del fármaco que permitirían convertir al TCBZ en formas menos activas (Webb y Cabada, 2018). De hecho, dentro de estas posibles alteraciones asocia-

das resistencia se encuentra la expresión de isoformas la proteína GST de clase  $\mu$ , cuya función detoxificadora podría estar implicada en la resistencia al TCBZ reportada en las cepas Sligo, Cajamarca y Rubino, de *F. hepatica* (Radio *et al.*, 2018; Fernandez *et al.*, 2015).

El problema de la aparición de resistencias es grave no solo por el escaso número de principios activos disponibles para efectuar tratamientos alternativos, sino también porque las cepas resistentes pueden perpetuarse incluso aunque se aplique una medida sanitaria tan drástica como la eliminación de los hospedadores definitivos infectados. Esto se debe a que las formas larvarias resistentes pueden permanecer en los pastos -dentro de los caracoles o enquistadas en la hierba- durante períodos prolongados, de manera que, el ciclo puede completarse cuando se introducen en la explotación nuevos hospedadores definitivos (Borgsteede *et al.*, 2005). La participación de los animales silvestres en el mantenimiento de las cepas resistentes tampoco puede descartarse (Mezo *et al.*, 2008, 2013).

Por otra parte, la administración de fasciolicidas en las especies ganaderas está condicionada por la legislación europea [Reglamentos (CE) n° 470/2009; Reglamento (UE) n° 37/2010; Reglamentos de ejecución (UE) n° 201/2012, n° 676/2014, n° 681/2014, n° 682/2014 y n° 683/2014], que establece los límites máximos de residuos (LMRs) de estos principios activos en los alimentos obtenidos de los animales. Para lograr que las concentraciones de residuos se reduzcan hasta niveles admisibles es preciso que transcurra un período de tiempo adecuado entre la administración del último tratamiento y la obtención del producto alimenticio derivado de ese animal (tiempo de espera), lo que condiciona tanto el principio activo a utilizar como el número de tratamientos administrados y el momento de aplicación. En consecuencia, el control farmacológico de la fasciolosis es difícil, especialmente en los rebaños lecheros, ya que los 2 únicos principios activos con un tiempo de espera en leche zootécnicamente asumible (4 días) son el albendazol y la oxiclozanida, que solo son eficaces frente a las formas adultas del parásito (>12 semanas). De acuerdo con la evaluación científica realizada por el Comité de Medicamentos Veterinarios de la Agencia Europea de Medicamentos, los fasciolicidas con actividad frente a los estadios inmaduros de *F. hepatica* (clorsulón, closantel, nitroxinil, rafoxanida y triclabendazol) no deberían em-

Tabla 1. Resultados de los ensayos de vacunación frente a *F. hepatica* obtenidos en diferentes especies animales. En la tabla se muestran los porcentajes de protección obtenidos, los antígenos ensayados en cada experimento, la especie animal vacunada, la edad, la dosis infectante, la(s) vía(s) de administración, los adyuvantes y la edad/peso de los animales en el momento de iniciar la vacunación. SC: vía subcutánea; IM: vía intramuscular; ID: vía intradérmica; IG: vía intragástrica (vacuna oral); IN: vía intranasal; NR: no reportado.



**TABLA 1**



**TABLA 1**

plearse para el tratamiento de las vacas lecheras, ni siquiera durante el período seco. Su uso se limitaría a las novillas de recría, siempre y cuando el tratamiento se administrase entre 5 meses y 1 año antes del primer parto. En el ganado ovino y caprino, no existen datos científicos sobre la eliminación de fasciolidas en la leche de las hembras tratadas, por lo que no debe usarse ni siquiera en la recría [Decisión de ejecución C, (2012) 8604].

Hay que señalar que, en el caso de las vacas lecheras, no siempre se respetan las recomendaciones del Comité, ya que en países como Reino Unido, Irlanda y Francia se comercializan medicamentos con principios activos eficaces frente a fasciolas inmaduras para el tratamiento durante el periodo seco. Además, los tiempos de espera varían no solo entre las distintas presentaciones de un mismo principio activo, sino también entre presentaciones idénticas comercializadas en distintos países de la UE. Así, el triclabendazol en suspensión oral fabricado y comercializado por Elanco tiene tiempos de espera de 37 días en Irlanda (Fasinex 240 mg/ml), 49 días en Francia (Fascinex 240) y 50 días en Reino Unido (Fasinex 240, 24% w/v), a pesar de tratarse de la misma formulación (ANSES, 2018; HPRA, 2018; VMD, 2018). Esta discrepancia es, cuando menos, incomprensible. Además, resulta sorprendente que este mismo medicamento se comercialice en Australia para uso no solo en vacas, sino también en ovejas (Fasinex 240 oral flukicide for cattle and sheep) y con un tiempo de espera en leche muy reducido (21 días) (APVMA, 2018), por lo que la leche y productos lácteos podrían contener concentraciones de residuos superiores a las legalmente admitidas en la UE.

Por otra parte, no hay en Europa libre circulación de medicamentos veterinarios, de manera que el sector ganadero de aquellos estados (España, Portugal, Italia, Bélgica, etc.) en los que no se comercializan fármacos eficaces frente a fasciolas inmaduras para uso en vacas lecheras carecen de una herramienta básica para el control de la infección y las explotaciones están, por tanto, en desventaja en cuanto a estado sanitario y capacidad productiva. La situación puede ser grave en regiones con alto censo de vacas lecheras y fasciolosis endémica. En este sentido, cabe señalar que existe en la actualidad una propuesta del Parlamento Europeo y del Consejo cuyo objetivo es, entre otros, mejorar la disponibilidad de medicamentos veterinarios (Procedimiento 2014/0257/COD). No obstante, en el caso de los fasciolidas el panorama es poco esperanzador, puesto que en los últimos 40 años ni se han descubierto nuevos principios activos ni se han mejorado las formulaciones para reducir los tiempos de espera en los alimentos de origen animal.

**Objetivo**



## OBJETIVO

La fasciolosis es la trematodosis de mayor impacto para el sector ganadero en Europa y en otros continentes. Ante la carencia de vacunas efectivas, el control de la enfermedad se ha basado principalmente en el tratamiento de los animales infectados con distintas combinaciones de antihelmínticos, la mayoría de las cuales contienen TCB en su composición. Sin embargo, como hemos comentado en la sección anterior, los límites impuestos actualmente por la Directiva Europea (Reglamento de Ejecución (UE) No 676/2014 de 19 de junio de 2014) para TCB en leche, que no se logran alcanzar durante el período de seca de las vacas, hacen inviables los tratamientos que se venían realizando hasta la fecha. Esta medida, que podría tener un impacto positivo sobre la fasciolosis humana al evitar que se generen resistencias al TCB, el único antihelmíntico capaz de matar tanto los adultos como las formas juveniles del parásito, genera una gran incertidumbre sobre el futuro control de la fasciolosis en animales de producción al no disponerse de un fármaco alternativo eficaz. Ante esta situación, la investigación en el desarrollo de nuevas vacunas y en la mejora y simplificación de los métodos de diagnóstico constituyen líneas de investigación importantes sobre las que se está volcando la investigación de la fasciolosis.

A pesar de que se han realizado avances importantes en el campo de la vacunación (Molina-Hernández et al., 2015; Beesley et al., 2018), nuestros conocimientos son todavía muy limitados sobre cuáles serían los antígenos y adyuvantes más adecuados para el desarrollo de vacunas, así como los mecanismos efectores que se deberían potenciar para lograr el máximo de protección en los animales a vacunar.

Respecto al inmunodiagnóstico, en los últimos años se han puesto a punto y comercializado métodos ELISA que permiten cuantificar antígenos de *Fasciola* en las heces de los animales infectados a escala picomolar (Martínez-Sernández et al., 2016), así como la detección específica de anticuerpos circulantes empleando como dianas CL nativas capturadas por anticuerpos monoclonales (Mezo et al., 2011) o CL recombinantes en ELISA indirecto (Martínez-Sernández et al., 2018). Sin embargo, el empleo de antígenos recombinantes todavía presenta algunos problemas de especificidad (Martínez-Sernández et al., 2018) que necesitan ser corregidos.

Por todo lo arriba expuesto, y como continuación a las líneas de investigación desarrolladas por nuestro equipo en los campos de las vacunas y el inmunodiagnóstico, en el presente trabajo nos hemos planteado abordar los siguientes objetivos:

1. *Analizar el papel del adyuvante Quil-A® en el reconocimiento del antígeno MF6p/FhHDM-1 de F. hepatica en ovejas,*
2. *Analizar el reconocimiento de antígenos quiméricos compuestos por epitopos B obtenidos de proteínas procedentes de diferentes helmintos por el sistema inmunitario de especies distantes evolutivamente (ratón, oveja, rodaballo), y*
3. *Analizar la utilidad de la recaptura antigénica en placas ELISA mediante un anticuerpo monoclonal para eliminar las proteínas contaminantes cuando se purifican mediante técnicas IMAC antígenos recombinantes generados E. coli.*



## **Material y métodos**



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Métodos comunes generales

#### *Obtención de antígenos de secreción de F. hepatica*

Los antígenos de secreción de *F. hepatica* se obtuvieron en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM, INGACAL, Abegondo, España) siguiendo el procedimiento descrito por Mezo *et al.* (2003). Las fasciolas adultas procedían de hígados de vacas con infecciones naturales y sacrificadas en el mata-dero. Tras su extracción manual de los conductos biliares, los parásitos fueron lavados con una solución salina (NaCl 8,7 g/L) estéril con antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomycinina 100 µg/mL) y glucosa (2 g/L), a 38°C, que fue renovada 5 veces a lo largo de 2 h. A continuación fueron lavados en medio de cultivo celular RPMI 1640 que contenía ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico 20 mM, L-glutamina a 0,3 g/L, bicarbonato sódico a 2 g/L y antibióticos, durante 2 h a 38°C y en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Los parásitos fueron transferidos a frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> (Asahi Techno Glass Corporation, Chiba, Japón) y mantenidos en el medio de cultivo (3 mL/parásito) durante 24 h bajo las mismas condiciones de incubación. A continuación, el medio con los antígenos de secreción fue extraído y centrifugado a 10.000 g durante 20 min, a 4°C, en presencia de inhibidores de proteasas (SigmaFast™ *Protease Inhibitor Tablets*; Sigma-Aldrich, Madrid, España). El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de 0,45 µm (Millipore; Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), concentrado en una unidad de ultrafiltración Amicon® 8050 (Amicon Inc, Beverly, Massachusetts, EEUU) equipado con una membrana de 10 kDa de punto de corte, dializado frente a PBS, esterilizado por filtración (0,22 µm; Millipore) y almacenado en alícuotas a -80°C hasta su uso.

#### *Producción y purificación de los mAbs MM3, US9 y UR3.*

Los hibridomas secretores de los mAbs UR3 (IgG1/κ) anti-IgM de rodaballo, US9 (IgG1/κ) anti-gp53 de *T. spiralis* y MM3 (IgG1/κ) anti-catepsinas L1 de *Fasciola* se obtuvieron como se describió anteriormente (Estévez *et al.*, 1994a, Romarís *et al.*, 2002, Mezo *et al.*, 2004). Las distintas células de hibridoma se inocularon por vía intraperitoneal en ratones BALB/c primados con pristano y el fluido ascítico fue recogido al cabo de 12-20 días. Según las necesidades de cada ensayo, los anticuerpos monoclonales correspondientes se utilizaron directamente, parcialmente purificados mediante precipitación con ácido caprílico y/o sulfato

amónico, o purificados a partir del fluido ascítico mediante cromatografía de afinidad con una columna de proteína G (HiTrap Protein G, GE Healthcare, Madrid, España) siguiendo el protocolo del fabricante.

### *Péptidos y proteínas sintéticas.*

Todas las secuencias de péptidos sintéticos, incluidas las quimeras D1-D8 y T1-T3, la secuencia madura completa (sMF6p) de la proteína de unión al hemo de *F. hepatica* MF6p/FhHDM-1 y la secuencia truncada correspondiente a la región N-terminal (sMF6a) se obtuvieron (>95% de pureza) de GeneCust Europe (Dudelange, Luxemburgo). El péptido 12-mer (TSP12) correspondiente a la región N-terminal (A<sup>29</sup>-S<sup>40</sup>) del antígeno *gp53* de *T. spiralis* (gb | CAD86781.1) y *T. britovi* (gb | CAD86782.1), que contiene el epítipo reconocido por el mAb US9 (epítipo US9), se sintetizó (> 90% de pureza) en un sintetizador de péptidos modelo 433A (Applied Biosystems, Foster City, CA) en el Instituto Carlos III (Madrid). Su secuencia fue confirmada por espectrometría de masas (Reflex, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Las secuencias de aminoácidos correspondientes a cada péptido/proteína se muestran en la Figura 1 (Anexo 2).

### *Electroforesis en geles de poliacrilamida*

La electroforesis se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970), empleando geles discontinuos (70 x 80 x 0,75 mm) compuestos por un gel concentrador superior (5% de poliacrilamida) y un gel separador inferior de gradiente lineal de poliacrilamida (10-20%). Las muestras fueron reducidas y desnaturalizadas mediante dilución ½ en tampón Tris-HCl 62 mM (pH 6,8) conteniendo DTT al 0,2%, azul de bromofenol al 0,004%, glicerol al 10% y dodecilsulfato sódico (SDS) al 2%, y posterior calentamiento a 95-100°C durante 5 min. Una vez centrifugadas las muestras, las proteínas se separaron utilizando una cubeta Hoefer™ SE 260 Mighty Small™ (Hoefer Scientific Instruments, Holliston, Massachusetts, USA) con una fuente de alimentación P500B (Sigma-Aldrich). La electroforesis fue realizada durante 1 h aplicando un voltaje constante de 200 V y temperatura controlada (20°C), en presencia de tampón Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS al 1%, pH 8,3). Como marcadores de PM se utilizó el preparado comercial de proteínas (de 11 a 250 kDa) preteñidas PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas Life Sciences, Madrid, España). Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas en el gel fueron teñidas con el reactivo Imperial™ Protein Stain (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante, o fueron sometidas a inmunotransferencia.

### *Clonación de los genes de las FhpCL1, FhpCL2 y FhpCL5 de F. hepatica*

Los procedimientos empleados para clonar y subclonar la rFhpCL1 de *F. hepatica* fueron descritos previamente (Muiño *et al.* 2011), y la secuencia de aminoácidos fue anotada con el n° de acceso CCA61803.1. Los procedimientos para clonar las catepsinas rFhpCL2 y rFhpCL5 fueron descritos con detalle por Martínez-Sernández *et al.*, 2018 (Ver Anexo 4). Dichas secuencias fueron empleadas para el diseño de algunos péptidos quiméricos utilizados a lo largo de este estudio. Una comparativa de secuencias de estas tres procatepsinas recombinantes se presenta en la Tabla 1 de esta sección.

### *Expresión de la FhpCL1 recombinante*

Tras hacer un preinóculo a partir de una colonia, las bacterias transformadas se cultivaron en medio LB amp/kan a 37°C con agitación a 200 rpm. El cultivo bacteriano se dejó crecer hasta un valor de DO<sub>600</sub> de 0,6-0,7, y la expresión de la proteína fue inducida añadiendo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) 1mM. Transcurridas 4 h de incubación a 37°C, la suspensión bacteriana se centrifugó durante 25 min a 2000 g y se desechó el sobrenadante, quedando solamente el sedimento bacteriano que fue almacenado a -30°C hasta su uso (Muiño *et al.* 2011).

### *Purificación y replegado de la FhpCL1 recombinante*

El protocolo empleado para la purificación de la rFhpCL1 fue el mismo utilizado por Muiño *et al.* (2011). Para lisar las bacterias y recuperar los cuerpos de inclusión en los que se encuentran las rFhpCL en forma insoluble, se resuspendió el sedimento bacteriano procedente de un 1 L de cultivo en 20 mL de B-PER® (Pierce) con ayuda de una pipeta durante 10 min a TA. Posteriormente, se centrifugó a 15.000 g durante 25 min en una centrífuga Centrifuge 5804 R (Eppendorf) y se descartó el sobrenadante. El sedimento obtenido con los cuerpos de inclusión se resuspendió en otros 20 mL de B-PER® y se incubó 5 min en presencia de lisozima (LSZ; 200 µg/mL) a TA. Después, se añadieron 100 mL de B-PER® diluido 1/10 en dH<sub>2</sub>O y se centrifugó de nuevo. Tras desechar el sobrenadante, los cuerpos de inclusión se lavaron dos veces más con 100 mL de B-PER® diluido. Finalmente los cuerpos de inclusión se solubilizaron en tampón desnaturizante PB-urea pH 8 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 95 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, urea 8 M). Una vez filtrada la solución por fibra de vidrio (Whatman® Glass Microfibre Filters GF/C Grade; Whatman, Barcelona, España), y nitrocelulosa de 0,45 µm y 0,22 µm (Millipore), las rFhpCL

|        |     |  |     |
|--------|-----|--|-----|
| FhpCL1 | 1   | SNDDLWHQWKRMYNKEYNGDDQHRRNIWEKNVKHIQEHNLRHDLGLVTTYTLGLNQFTDMTFEEFKAKYL   | 70  |
| FhpCL2 | 1   | SNDDLWHQWKRMYNKEYNGDDQHRRNIWEKNVKHIQEHNLRHDLGLVTTYTLGLNQFTDMTFEEFKAKYL   | 70  |
| FhpCL5 | 1   | SNDDLWHQWKRMYNKEYNGDDQHRRNIWEKNVKHIQEHNLRHDLGLVTTYTLGLNQFTDMTFEEFKAKYL   | 70  |
| FhpCL1 | 71  | TEMSRASDILSHGVFPYEANNRAVPDKIDWRESGYVTEVKDQCGNCGSCWAFSTTGTMEGQYMKNERTSISF | 140 |
| FhpCL2 | 71  | TEMSRASDILSHGVFPYEANNRAVPDKIDWRESGYVTEVKDQCGNCGSCWAFSTTGTMEGQYMKNERTSISF | 140 |
| FhpCL5 | 71  | TEMSRASDILSHGVFPYEANNRAVPDKIDWRESGYVTEVKDQCGNCGSCWAFSTTGTMEGQYMKNERTSISF | 140 |
| FhpCL1 | 141 | SEQQLVDCSGPWGNGCSGGLMENAYQYLKQFGLLETSSYPYTAVEGQCRYNKQLGVAKVTGYITVHSGS    | 210 |
| FhpCL2 | 141 | SEQQLVDCSRDFGNYGCGGGLMENAYYLKNGLETESYYPYQAVEGQCRYNKQLGVAKVTGYITVHSGS     | 210 |
| FhpCL5 | 141 | SEQQLVDCSRDFGNYGCGGGLMENAYYLKNGLETESYYPYQAVEGQCRYNKQLGVAKVTGYITVHSGS     | 210 |
| FhpCL1 | 211 | EVELKNLVGAEGPAAVAVDVESDFMMYSGGIYQSQTCSPLGLNHAVLAVGYGTQGGTDYWIWKNWSGSYW   | 280 |
| FhpCL2 | 211 | EVELKNLVGAEGPAAVAVDVESDFMMYSGGIYQSQTCLPDRLLHAVLAVGYGTQGGTDYWIWKNWSGSYW   | 280 |
| FhpCL5 | 211 | EVELKNLVGAEGPAAVAVDVESDFMMYSGGIYQSQTCSPLNLHGLAVLAVGYGTQGGTDYWIWKNWSGSYW  | 280 |
| FhpCL1 | 281 | GERGYIRMARNRGNMCGIASLASLPMVARFP  | 311 |
| FhpCL2 | 281 | GERGYIRMARNRGNMCGIASLASLPMVARFP  | 311 |
| FhpCL5 | 281 | GERGYIRMARNRGNMCGIASLASLPMVARFP  | 311 |

Fig. 1. Alineación de las secuencias de aminoácidos correspondientes a FhpCL1 (gb | CCA61803.1), FhpCL2 (gb | KY464953) y FhpCL5 (gb | KY392883). La porción de las secuencias completas correspondientes a las enzimas maduras se resaltaron en negrita, mientras que la región correspondiente a los propéptidos (residuos 1-91 en las tres secuencias) se muestran con tipografía normal. Los residuos representativos de cada clado (residuos en las posiciones 69, 70, 135, 160, 161, 163 y 209 en la secuencia madura) de acuerdo con Norbury et al. (2012) están subrayados. Las sustituciones de aminoácidos en los clados L2 y L5 con respecto al clado L1 están marcadas en cian o amarillo. Esta Figura está tomada del Martínez-Sernández *et al.*, 2018 (Ver Anexo 4).

solubilizadas se purificaron mediante IMAC en condiciones desnaturalizantes a 4°C. Para la cromatografía se empleó una columna cargada con el gel *HIS-Select Nickel Affinity Gel* (Sigma-Aldrich). Una vez equilibrada la columna con el tampón PB-urea pH 8, se aplicó la muestra y posteriormente se lavó la columna con tampón PB-urea pH 6,3 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 22,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 77,5 mM, urea 8 M) hasta que la DO<sub>280</sub> cayó a valores basales. A continuación, la rFhpCL se eluyó con tampón PB-urea pH 8 que contenía imidazol 200 mM.

Una vez eluida de la columna, la proteína se diluyó 1/50 en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8, con cisteína 10 mM y cistina 1 mM, mediante dispersión rápida de 2 en 2 mL cada 30 min en dicho tampón, bajo agitación magnética y en cámara fría. Una vez dispersada, se filtró por 0,45 µm (Millipore) para descartar los posibles agregados, y a continuación se sometió a un proceso de concentración/lavado con NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M utilizando un concentrador Amicon® (Amicon Inc.) equipado con una membrana de 10 kDa de punto de corte (Omega™; Pall Corporation). Una vez eliminada la urea, la proteína concentrada se sometió a un proceso de reconcentración y diálisis con PBS diluido ¼ en dH<sub>2</sub>O y un filtro Nanosep® (Pall Corporation). Tras la determinación del contenido proteico, la proteína concentrada se almacenó a -80°C hasta su uso.

### *Aspectos éticos y legales*

Todos los experimentos con animales incluidos en esta tesis se llevaron a cabo en estricta conformidad con las directrices de la legislación europea (Directiva Europea 2010/63/UE) y la legislación Española (RD53/2013) sobre Cuidado y Uso de Animales de Experimentación. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Consellería de Medio Rural de la Xunta de Galicia con fecha 08/03/2011) y por el Comité de Bioética para la experimentación animal de la USC (PROCEDIMIENTOS: 15007AE/12/ DIG ENF 06/ OUTROS 04/ FMU2 y 15007AE/12/ FUN 01/ PAT 05/E/ FMU4). Los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo en el Animalario Experimental de la Facultad de Farmacia de la USC (REGA: ES150780263301) y en el Animalario del CIAM de la Xunta de Galicia (REGA: ES150010121301).

### *Determinación de la concentración de proteínas*

Cuando fue requerido, la concentración proteica de las muestras fue determinada mediante el Micro BCA™ *Protein Assay Kit* (Pierce; Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, la concentración de inmunoglobulinas purificadas fue determinada midiendo la absorbancia de las muestras a 280 nm y dividiendo el valor obtenido entre 1,36. Si los valores obtenidos fuesen inferiores a  $OD = 0,6$  o superiores a  $DO = 1,5$  las muestras fueron concentradas o diluidas apropiadamente. En algunas ocasiones la concentración proteica se determinó empleando un equipamiento Nanodrop 2000 (ThermoFisher, Barcelona, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **Métodos empleados para el estudio de formulaciones vacunales en Quil-A® sobre la infección por *F. hepatica* en ovejas.**

### *Antígenos vacunales*

El antígeno MF6p/FhHDM-1 nativo (nMF6p/FhHDM-1) se purificó a partir de ES de *F. hepatica* mediante cromatografía de afinidad utilizando el mAb MF6 inmovilizado en las columnas como se describió anteriormente (Martínez-Sernández *et al.*, 2014). Dado que se detectó la presencia de endotoxina (LPS) en las preparaciones de nMF6p/FhHDM-1 utilizando el kit de cuantificación de endotoxina cromogénica Pierce LAL (Thermo Fisher Scientific), este antígeno se pasó a través de una resina Endotrap Red (Hyglos GmbH, Bernied, Alemania) para su elimina-

ción. El nivel de endotoxina en el producto final fue inferior a 10 EU/ml. La proteína sintética MF6p/FhHDM-1 madura completa (sMF6p/FhHDM-1;  $\geq 95\%$  de pureza) fue obtenida de GeneCust Europe (Dudelange, Luxemburgo). La proteína MF6p/FhHDM-1 madura (nativa o sintética) tiene una longitud de 68 residuos (ver Fig. 1 en Anexo 2). La proteína recombinante rFhpCL1 se produjo siguiendo los protocolos de clonación, expresión, purificación y replegamiento descritos antes.

### *Diseño experimental*

Se han empleado ovejas hembras ( $n = 40$ ) de raza autóctona gallega de 4 a 6 meses de edad, nacidas y criadas en la granja libre de *Fasciola* del CIAM.

En un primer ensayo, se utilizaron 25 ovejas que se dividieron en 5 grupos iguales, tres de los cuales se inmunizaron y los restantes grupos se mantuvieron como controles. Los grupos inmunizados recibieron dos inyecciones subcutáneas, separadas por 4 semanas, de 100  $\mu\text{g}$  del antígeno correspondiente (rFhpCL1, nMF6p/FhHDM-1 o sMF6p/FhHDM-1) mezclados con 1 ml de una solución de Quil-A® (Quillaja saponaria, Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY, USA) a la concentración de 1 mg/ml en PBS. Los grupos de control se inocularon al mismo tiempo con la solución de Quil-A® sola o PBS. Cuatro semanas después de la segunda inyección, todos los animales se infectaron experimentalmente con una dosis de 100 metacercarias de *F. hepatica* obtenidas en nuestro laboratorio a partir de caracoles *Galba truncatula* infectados experimentalmente (un único pase). Las muestras de sangre fueron recogidas inmediatamente antes de la primera vacunación y luego, quincenalmente, hasta la necropsia a 14 semanas después de la infección. La sangre también se recolectó en tres momentos: al comienzo del ensayo, 2 semanas después de la segunda inmunización y 2 semanas después de la infección.

En el segundo ensayo, se hicieron tres grupos iguales ( $n = 5$  ovejas). A dos de ellos se les administraron dos inyecciones subcutáneas, separadas por cuatro semanas, consistentes en 1 ml de Quil-A®, diluido como se indicó previamente, o Alhydrogel® (hidróxido de aluminio, Sigma-Aldrich) diluido al 15% en PBS (v/v). A los animales del tercer grupo se les inyectó PBS solo (1 ml) al mismo tiempo. Cuatro semanas después de la segunda inyección, todos los grupos se infectaron experimentalmente como se indicó anteriormente. Las muestras de suero se obtuvieron cada dos semanas hasta las 8 semanas posteriores a la infección.

### *Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)*

Las PBMC de cada oveja se aislaron de 30 ml de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente sobre Histopaque™-1077 (Sigma-Aldrich), de

acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego, se recogió la capa blanca de PBMC y se sometió a tres etapas de lavado por centrifugación con 25 ml de PBS frío (250 x g, 10 min a 4°C). Después de verificar la viabilidad mediante tinción con azul tripano, las células se contaron y se resuspendieron a la concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 suplementado con bicarbonato de sodio, antibióticos y suero fetal de ternera al 10% (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se dispensaron alícuotas de 1 ml de esta suspensión de PBMC en placas de 24 pocillos (Biolite, 24 pocillos multidisco, Thermo Fisher Scientific) y luego, cada antígeno (10 µg/ml), así como los controles de Concanavalina A (2,5 µg/ml; Con A, Sigma-Aldrich) y PBS, se agregaron por duplicado a los pocillos. Finalmente, las placas se cultivaron durante 72 horas a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub> (5% de CO<sub>2</sub>). Después de la incubación, los sobrenadantes de los cultivos se recogieron y se congelaron a -80°C hasta su análisis.

### *Necropsias y determinaciones post mortem.*

Los hígados y las muestras de heces de los animales se recolectaron durante las autopsias a las 14 semanas posteriores a la infección. Los animales se sedaron con clorhidrato de xilazina (Rompun; Bayer, Mannheim, Alemania) y luego se sacrificaron con una inyección intravenosa de una solución que contenía embutramida, yoduro de mebezonio y clorhidrato de tetracaína (T611; MSD Animal Health, Salamanca, España). Cada hígado fue examinado para recolectar y contar todas las fasciolas presentes. Las fasciolas extraídas intactas se midieron inmediatamente para determinar la longitud del cuerpo desde la cabeza hasta la cola. Las heces individuales se mezclaron con agua destilada en una proporción de 1:4 p/v (1 g + 4 ml), se centrifugaron a 1000 g durante 15 minutos y los sobrenadantes se recogieron para investigar la presencia de coproantígenos de *F. hepatica*.

### *ELISAs indirectos*

Los anticuerpos IgG específicos para rFhpCL1, nMF6p/ hHDM-1, sMF6p/ FhHDM-1 y ES se determinaron mediante ELISA indirecto. Las placas de microtitulación (Nunc Immunoplate Maxisorp Surface, Thermo Fisher Scientific) se recubrieron con 100 µl/pocillo del antígeno correspondiente (5 µg de antígeno/ml) diluido en 0,05 M de tampón-carbonato, pH 9,6. Después de la incubación durante la noche a 4°C, las placas se lavaron 3 veces con PBS y luego se bloquearon, durante 1 hora a 37°C, con 200 µl/pocillo de leche descremada al 5% en PBS. Después de otro lavado, se agregaron a cada pocillo 100 µl de cada dilución de suero de oveja a analizar (2 pocillos/dilución de suero). Se probaron diferentes diluciones de los sueros en solución tampón (PBS + 0.2% Tween 20 + 1% de leche descremada): i)

1:200, para la detección de anticuerpos de isotipo IgG total e IgG1; ii) 1:100, para la detección de anticuerpos de isotipo IgG2; iii) diluciones seriadas 1:1, para la titulación de los sueros. Después de una incubación durante 2 horas a 37°C, las placas se lavaron 6 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,2% (PBS-T). Posteriormente, se procedió de la siguiente manera: i) Para la detección de anticuerpos IgG totales, las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C con 100 µl/pocillo con un anticuerpo IgG anti-oveja producido en conejo y conjugado con HRP (Sigma-Aldrich), dilución 1:20.000. Después de 6 lavados con PBS-T, se agregaron 100 µl de sustrato (SIGMAFAST OPD; Sigma-Aldrich) a cada pocillo. La reacción se detuvo 30 minutos más tarde mediante la adición de 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N. La densidad óptica (OD) se midió a 492 nm en un lector Rainbow Thermo (Tecan, Mannedorf, Suiza). ii) Para la detección de isotipos de IgG1 e IgG2, se realizaron dos incubaciones (1 h 37°C): la primera, con el correspondiente anticuerpo monoclonal, anti-IgG1 o anti-IgG2 (Prionics, Lelystad, Países Bajos), ambos diluidos 1:500 en solución tampón; y el segundo, con suero de conejo anti-IgG de ratón, marcado con HRP (Cusabio, College Park, MD, EE. UU.), también diluido 1:500. La reacción con el sustrato y la lectura de DO se realizaron como se indicó anteriormente. Los niveles de anticuerpos se expresaron como valores de DO<sub>492</sub> y/o títulos. Para calcular los títulos, se realizaron regresiones lineales, para cada suero, entre el logaritmo de los factores de dilución y las lecturas correspondientes de DO<sub>492</sub>. Los títulos de punto final se obtuvieron por interpolación en el valor de corte de ELISA (DO<sub>492</sub> = 0.1).

### *ELISAS sándwich*

La cuantificación de IFN-γ en el sobrenadante de los cultivos se realizó con un kit ELISA sándwich comercial (*Bovine IFN-γ ELISA development kit*, Mabtech, Nacka Strand, Suecia), pero utilizando como estándar un IFN-γ recombinante ovino (Cusabio) en lugar del IFN-γ recombinante bovino suministrado por el fabricante. La curva de calibración fue lineal en el rango de 6,25-2.000 pg/ml. Los coproantígenos de *F. hepatica* se cuantificaron en los sobrenadantes fecales utilizando la prueba ELISA MM3-COPRO descrita por primera vez por Mezo *et al.* (2004) y posteriormente modificado por Martínez-Sernández *et al.* (2016). Este método revela las CL de los clados L1, L2 y L5, que son liberados en los conductos biliares por las fasciola adultas (Martínez-Sernandez *et al.*, 2018, Anexo 4).

### *Análisis estadístico*

La prueba U de Mann-Whitney se utilizó para las comparaciones entre las medias de los niveles de anticuerpos, la carga parasitaria, el tamaño de las fas-

ciolas y la liberación de antígenos de los diferentes grupos de ovejas. El test no paramétrica de Spearman se usó para evaluar las correlaciones entre los niveles individuales de anticuerpos IgG2 o IFN- $\gamma$  de las ovejas frente a la media del tamaño de las fasciolas adultas o a la concentración de antígeno liberado en heces. Los resultados se consideraron significativos para valores de  $p < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS v 15.0 (Chicago, IL, USA).

## Métodos empleados en la construcción y evaluación de antígenos quiméricos en distintas especies animales.

### *Clonación, subclonación y producción del gen US9-FhpCL1*

La procathepsina L1 de *F. hepatica* (FhpCL1) correspondiente al gen L33771.1 se amplificó por PCR y se subclonó adicionalmente en el vector pQE (pQE30-FhpCL1-K22) como se ha indicado antes. A continuación, se construyó una quimera (rUS9-FhpCL1) que contiene el gen *FhpCL1* completo y los aminoácidos (MTFSVPIS) correspondientes al epítipo mAb US9 (Perteguer *et al.*, 2004). El ensamblaje de la quimera se realizó mediante PCR, utilizando la polimerasa estándar (Biotools, Madrid, España) y los cebadores rUS9-FhCL1-F (5' 30 US9 BamH1): 5'-GGATCCATGACATTTTCAGTTCCTATTTCTC-GAATGATGATTTGTGGCATCAGTGGAAGCG-3' y rUS9-FhCL1-R (3' 30 Sal1): 5'-GTCGACCGGAAATCGTGCCACCATCGG-3'. El plásmido pQE30-FhpCL1-K22 (K2.2) se usó como molde en una dilución 1/1000 para amplificar la quimera. La clonación direccional en el vector de expresión pQE (Qiagen; Qiagen Iberia SL, Madrid, España) se realizó utilizando las endonucleasas de restricción BamH I y Sal I (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) siguiendo los protocolos estándar (Sambrook y Russel, 2001). Los plásmidos recombinantes positivos se seleccionaron mediante PCR estándar con los cebadores universales pQE-*forward* y pQE-*reverse*. Posteriormente, el DNA del plásmido rUS9-FhpCL1 extraído del gel (QIAquick Gel Extraction, Qiagen) se secuenció automáticamente con el sistema ABI PRISM (Perkin Elmer, Langen, Alemania) para descartar cualquier error de secuencia. En el proceso de secuenciación se utilizaron los cebadores directos e inversos pQE universales. El pQE30-rUS9-FhpCL1 recombinante se transformó en células XL1 Blue (Agilent, Santa Clara, CA). Posteriormente, las células se resuspendieron en medio SOB (Pronadisa, Madrid) conteniendo 20% de glicerol estéril y se almacenaron a -80°C.

### *Obtención y purificación de rUS9-FhpCL1.*

La cepa de *E. coli* M15 [pREP4] (Qiagen) se transformó con 10 ng de DNA de pQE30-US9-FhpCL1. Se cultivó una colonia de células transformadas en 1 L de medio LB a 37°C con agitación (200 rpm/min) hasta alcanzar un  $DO_{600}$  de 0,5 y la expresión de la proteína rUS9-FhpCL1 se indujo por la adición de IPTG 1 mM al cultivo celular e incubación adicional durante 4 h. Luego, las células se recogieron mediante centrifugación durante 20 minutos a 5.000 g y se almacenaron congeladas durante 24 horas a -30°C. Posteriormente, el sedimento se resuspendió en 20 ml de reactivo de extracción de proteína bacteriana B-PER™ (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España) suplementado con lisozima y DNasa I, según lo indicado por el proveedor. Luego, el lisado bacteriano se resuspendió con pipeta Pasteur hasta que fue homogénea e incubado con agitación (150 rpm/min) durante 30 min adicionales a TA. Para separar las proteínas insolubles de las solubles, el lisado celular se centrifugó a 15.000 g durante 15 min y los cuerpos de inclusión que contenían la proteína rUS9-FhpCL1 se purificaron mediante cromatografía de afinidad con HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en condiciones desnaturalizantes (urea 8 M), según lo indicado por el proveedor. Para el repliegamiento, la proteína rUS9-FhpCL1 eluida de la columna de afinidad IMAC se trató con DTT 10 mM durante 1 hora a TA, y luego se diluyó en una proporción de 1/10 en TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8) que contenía cisteína 10 mM, 1 mM de cistina y 1 mM de EDTA. Una vez dializado contra TBS (pH 8), el rUS9-FhpCL1 se dializó contra PBS y se concentró por filtración en membrana empleando un aparato de ultrafiltración con agitación (Amicon) equipado con una membrana de la serie Omega de Filtron (límite de peso molecular nominal de 10 kDa; Pall Corporation, Port Washington, NY). Finalmente, la proteína recombinante se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m y se almacenó a -80°C hasta su uso.

### *Animales e inmunizaciones.*

Se inmunizaron ratones BALB/c (8-12 meses de edad, hembra; n = 8-12 animales por grupo) con una sola inyección de antígenos quiméricos sintéticos o recombinantes disueltos en PBS y emulsionados 1:1 v/v en adyuvante completo de Freund (CFA; Sigma-Aldrich). Cada ratón se inmunizó por vía subcutánea en la parte posterior (región lumbar) con 100  $\mu$ l de la emulsión que contenía 50  $\mu$ g del antígeno. Un mes después de la inmunización, los animales se sangraron mediante una punción cardíaca y se agrupó la sangre por lotes de 4 animales antes de obtener los sueros (ver final de esta sección). Los ratones fueron anestesiados con isoflurano antes de las inmunizaciones y extracciones de sangre.

Los corderos de raza autóctona gallega (5-6 meses, hembras; n = 3 animales por grupo), se inmunizaron mediante inyección en la región axilar con 1 ml de una formulación que contenía 150 µg de los antígenos quiméricos sintéticos (D2, T2 o T3), diluidos en PBS más 1 mg de Quil-A. Las muestras de sangre de cada animal se recogieron 1 mes después de la inmunización y se procesaron para obtener los sueros como se indica al final de esta sección. Los animales fueron criados y alojados en el CIAM. Al final de los experimentos, los animales se eutanasiaron como se ha indicado previamente (ver sección de Necropsias y Determinaciones Post-mortem).

Respecto a los rodaballos (*Scophthalmus maximus*), se utilizaron peces de aproximadamente 30-40 g de peso corporal (n = 20 animales por grupo). El protocolo incluyó una primera inmunización intraperitoneal (Ip) con la quimera correspondiente (T2 o T3) disuelta en PBS y luego emulsionada 1:1 v/v en CFA (día 0), y una segunda inmunización preparada en las mismas condiciones, pero emulsionada en adyuvante incompleto de Freund (IFA) e inyectado por la misma ruta un mes después. En paralelo, un grupo de 10 rodaballos se inyectó con el adyuvante solo y se usó como control. Cada rodaballo del grupo inmunizado recibió una inyección de 200 µL que contenía 50 µg del antígeno correspondiente. Al final del experimento (día 60), los animales se sangraron mediante punción de la vena caudal. Para todos los procedimientos, los peces fueron anestesiados en baño con benzocaína (50 mg/L). La sangre de cada 10 rodaballos se juntó en un solo lote para su posterior uso. Para todos los animales (ratones, ovejas y rodaballo), la sangre recolectada se dejó coagular durante 12 horas a 4°C, se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos y luego se recogieron los sueros, se diluyeron 1:1 v/v con glicerol, y se almacenaron a -30°C hasta su uso.

### *ELISA indirecto para medir anticuerpos IgG totales contra antígenos quiméricos en ratones y ovejas*

Los pocillos de las placas ELISA (Greiner Bio-One; Soria-Melguizo, Madrid, España) se recubrieron con 100 µl de cada uno de los antígenos descritos anteriormente (diluidos a 10 µg/ml en PBS), se incubaron durante toda la noche a 4°C, se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con 200 µL/pocillo de caseinato sódico al 1.5% en PBS durante 1 hora a TA. Después, se añadieron 100 µl de los correspondientes sueros de ratones o corderos, diluidos 1/100 en PBS que contenía 0,05% de Tween-20 y 1% de leche descremada en polvo (PBS-T-SM), y se incubaron durante 1 hora a TA y agitación orbital a 750 rpm. A continuación, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y los anticuerpos IgG unidos se detectaron con

anticuerpos policlonales de cabra anti-IgG de ratón conjugados con HRP (Bio-Rad, Madrid, España; dilución 1/3.000 en PBS-T-SM) o anticuerpos monoclonales de ratón anti-IgG de oveja/cabra, conjugados con HRP (Sigma-Aldrich; dilución 1/30.000 en PBS-T-SM). Una vez incubadas durante 30 min a temperatura ambiente con agitación a 750 rpm, las placas se lavaron y se incubaron con 100  $\mu$ l/pocillo de OPD (SigmaFast OPD, Sigma-Aldrich). Finalmente, la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N después de 20 min a temperatura ambiente y la DO se midió a 492 nm en un lector ELISA (Titertek Multiskan, Flow Laboratories, McLean, VA).

### *ELISA indirecto para medir las subclases de anticuerpos IgG frente a antígenos quiméricos en ratones*

Las placas de ELISA se incubaron con el antígeno quimérico correspondiente y se bloquearon como se indicó en el método anterior. Luego, se agregaron alícuotas de 100  $\mu$ L de cada *pool* de suero, diluido 1/100 en PBS-T-SM, a cada pocillo de las placas y se incubaron durante 1 hora a TA y agitación orbital a 750 rpm. Posteriormente, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T, y los anticuerpos de cada subclase de IgG unidos se detectaron primero utilizando un kit de isotipado de conejo anti-ratón (Bio-Rad) y, después de una etapa de lavado como la anterior, se añadió a cada pocillo 100  $\mu$ L del anticuerpo secundario marcado (anticuerpos policlonales de cabra anti-IgG de conejo marcados con HRP (Bio-Rad; dilución 1/3.000 en PBS-T-SM). Finalmente, la DO a 492 nm se leyó como se indicó anteriormente.

### *ELISA indirecto para determinar los niveles de anticuerpos séricos para antígenos quiméricos en rodaballo*

Los niveles de anticuerpos séricos contra los péptidos quiméricos se determinaron mediante ELISA indirecto como se describió anteriormente (Estévez *et al.*, 1994b, Piazzon *et al.*, 2008) con algunas modificaciones. Las placas de ELISA se incubaron con el antígeno quimérico correspondiente y se bloquearon como se indicó anteriormente para ratones y ovejas. Luego, se agregaron alícuotas de 100  $\mu$ L de cada suero de rodaballo diluido 1/100 en PBS-T-SM a cada pocillo de las placas y se incubaron durante 30 min a TA, con agitación orbital a 750 rpm. A continuación, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y se añadieron a cada pocillo de las placas ELISA alícuotas de 100  $\mu$ L del anticuerpo monoclonal UR3 anti-rodaballo, diluido 1/1000 en PBS-T-SM. Posteriormente, las placas se lavaron con PBS-T y los anticuerpos de ratón unidos se detectaron con Ig de conejo anti-ratón conjugadas con HRP (Dako, Barcelona, España) diluida 1:2000 en PBS-T-

SM y se incubaron durante 30 min a TA con agitación orbital a 750 rpm. Después de cinco lavados con PBS-T, las placas se revelaron como se indicó anteriormente para ratones y ovejas.

### *Herramientas bioinformáticas.*

La herramienta bioinformática PredBALB/c (<http://cvc.dfci.harvard.edu/balbc/>; Zhang *et al.*, 2005) se usó para la predicción de la unión de los péptidos a moléculas MHC de clase II (I-A e I-E) de ratón BALB/c (H-2<sup>d</sup>). Según los autores, esta herramienta utiliza matrices cuantitativas validadas utilizando secuencias de péptidos ligantes y no ligantes, comprobados experimentalmente, así como estudios *in vivo* con proteínas virales. La herramienta bioinformática BcePred (Saha y Raghava, 2004), basada en las propiedades fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos (<http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/>) se usó para la predicción de epítomos de células B lineales en la proteína de *Fasciola* MF6p/FhHDM-1. Ciertos parámetros peptídicos, incluyendo el peso molecular teórico, los índices alifáticos y el promedio de los valores de hidropaticidad (GRAVY) se calcularon utilizando la herramienta bioinformática ProtParam de Expasy (<https://www.expasy.org/resources>).

## **Métodos empleados para investigar la recaptura en placa como estrategia de repurificación de antígenos recombinantes.**

### *Recogida de muestras biológicas.*

Para este estudio se obtuvieron sueros de ovejas no infectadas (n = 20) de animales criados en una granja libre de *Fasciola* del CIAM. Además, se obtuvieron sueros de ovejas infectadas con *Fasciola* (n = 18) del rebaño de una granja comercial que sufría de fascioliasis crónica. Al igual que en el estudio anterior, todas las ovejas eran de una raza autóctona gallega). La confirmación de la presencia o ausencia de infección se realizó mediante la determinación de coproantígenos en muestras fecales utilizando el MM3-COPRO ELISA (Mezo *et al.*, 2004; Martínez-Sernández *et al.*, 2016). Además, las muestras de heces de todos los animales se sometieron a procedimientos de sedimentación y de flotación para concentrar los huevos de helmintos, para ser examinados al microscopio (Anderson *et al.*, 1999).

Los sueros de bovinos no infectados (n = 49) y los bovinos infectados naturalmente con *Fasciola* (n = 36) se seleccionaron al azar entre la colección de sueros

almacenados en CIAM. Se recolectaron muestras de suero de ganado no infectado de animales pertenecientes a las razas Holstein *Friesian* y “rubia galega” criadas en la granja libre de *Fasciola* del CIAM. En cuanto a las ovejas no infectadas, las muestras fecales de estos animales dieron negativo en el test MM3-COPRO ELISA. Las muestras de suero de ganado infectado con *Fasciola* se obtuvieron de animales, de las razas mencionadas, que se sacrificaron en mataderos locales y se clasificaron como infectados debido a la presencia de fasciolas en los hígados (estándar de oro). Las muestras fecales de estos animales también dieron positivo por MM3-COPRO ELISA. En cuanto a las muestras de ovejas, se examinaron muestras de heces de todos los animales para detectar tanto la presencia de huevos de *F. hepatica* como de otros parásitos intestinales.

Además de *F. hepatica*, los nematodos pertenecientes a las familias Trichostrongylidae, Molineidae (*Nematodirus* spp.), Ancylostomatidae, Strongylidae y Trichuridae (*Trichuris* spp.) fueron frecuentemente identificados en ambos rebaños de ovejas. Con respecto a las muestras de ganado vacuno, los registros individuales de los ganaderos revelaron que la mayoría de ellos se trataron de forma rutinaria con albendazol durante el período seco y se vacunaron contra la rinotraqueitis infecciosa bovina y la enfermedad respiratoria bovina (virus sincitial respiratorio bovino, virus parainfluenza tipo 3 y *Mannheimia haemolytica*). Algunos también fueron vacunados al final del período de gestación contra coronavirus, rotavirus y *E.coli*, aunque no se disponía de registros de vacunación individuales. Como se esperaba, la mayoría de las vacas tenían nematodos intestinales de uno o más géneros de las familias Trichostrongylidae, Trichuridae (*Trichuris* spp.) y Strongylidae.

### Clonación del gen FhLAP

La síntesis de cDNA se llevó a cabo con el kit de amplificación de cDNA Marathon (Clontech, Palo Alto, CA) empleando 1 µg de mRNA de *F. hepatica* extraído de fasciolas adultas empleando el *Fast Track mRNA isolation kit* (Invitrogen, San Diego, CA) como se describe en Muiño y col., (2011). El gen FhLAP fue amplificado por *Touchdown-PCR* usando un conjunto de cebadores basados en la secuencia gb|AY644459: FhLAP-Fc: 5'-ATGGCGGCGTTGGCTGTGGGCGTGTCT-3' FhLAP-Rc: 5'-CTATTTGAATCCCAGTCGTGGTAGTACGTAACGGCTGGC-GAAC-3'. Se utilizó una combinación de DNA polimerasa y una Taq DNA polimerasa de inicio en caliente (Advantage mix polimerase kit, Takara Bio USA Inc., Mountain View, CA) siguiendo las instrucciones del proveedor. El cDNA de *F. hepatica* se usó como molde a una dilución de 1/250. Luego, el gen FhLAP amplificado (1562 pb) se clonó en el vector pGEM-T (Promega Biotech Ibérica SL,

Madrid, España) siguiendo protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 2001). Los plásmidos recombinantes positivos se seleccionaron mediante PCR estándar con los cebadores universales D y SP6. Además, para descartar cualquier error de secuencia, se secuenció automáticamente el DNA del plásmido FhLAP extraído del gel (QIAquick Gel Extraction, Qiagen; Qiagen Iberia SL, Madrid, España), utilizando un secuenciador ABI PRISM (Perkin Elmer, Langen, Alemania).

### *Clonación y subclonación del gen quimérico US9-FhLAP.*

Se construyó una quimera (US9-FhLAP) que contiene el gen FhLAP completo y los aminoácidos (MTFSVPIS), correspondientes al epítipo reconocido por el mAb US9. El ensamblaje de la quimera se realizó mediante PCR, utilizando polimerasa estándar (Biotools, Madrid, España) y los cebadores US9-FhLAP-F: 5'-GGATCC-ATGACATTTTCAGTTCCTATTTCCATGGCGGGGTTGG-3' y US9-FhLAP-R: 5'-AAGCTT-CTATTTGAATCCCAGTCGTGG-3'. El plásmido pQE30-US9-FhLAP DNA (10 LAP1) se usó como molde a una dilución de 1/1.000 para amplificar la quimera. La clonación direccional en el vector de expresión pQE (Qiagen) se realizó utilizando las endonucleasas de restricción BamH I y Hind III (Roche Molecular Systems, Inc.) y siguiendo los protocolos estándar. Los plásmidos recombinantes positivos se seleccionaron mediante PCR estándar con los cebadores universales pQE-forward y pQE-reverse. Además, se secuenció automáticamente el DNA del plásmido US9-FhLAP DNA extraído del gel (QIAquick Gel Extraction, Qiagen) para descartar cualquier error de secuencia. Además de los cebadores directos y reversos pQE universales, se usaron los siguientes cuatro nuevos cebadores (dos diseñados en las regiones terminales amino y carboxi y dos en la mitad de la secuencia de LAP) en el procedimiento de secuenciación: FhLAP AMINO FWD: 5'-ATGGCGGGGGTGGCTGGGG-3', FhLAP CENTRAL REV: 5'-CATAAGTGATACCTTTTCCAATCA-3', FhLAP CENTRAL FWD: 5'-GAGCCGCCCAATCCAACCGAGG-3', FhLAP CARBOXY REV: 5'-CTATTTGAATCCAGTCAGTCGTGGGG-3'. El pQE30-US9-FhLAP recombinante se transformó en células XL1 Blue (Agilent, Santa Clara, CA). Posteriormente, las células se resuspendieron en medio SOB (Pronadisa, Madrid) conteniendo 20% de glicerol estéril y se almacenaron a -80°C.

### *Obtención y purificación de rUS9-FhLAP.*

La cepa de *E. coli* M15 [pREP4] (Qiagen) se transformó con 10 ng de DNA de pQE30-US9-FhLAP. Se cultivó una colonia de células transformadas en 1 L de medio LB a 37°C con agitación (200 rpm/min) hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,5 y

la expresión de la proteína rUS9-FhLAP fue inducida por la adición de IPTG 0,5 mM al cultivo celular y posterior incubación durante 6 h a 22°C con agitación (120 rpm/min). Luego, las células se recogieron después de 20 min de centrifugación a 5.000 g y se almacenaron congeladas durante 24 horas a -30°C. Posteriormente, el sedimento se resuspendió en 50 mL de reactivo de extracción de proteína bacteriana B-PER™ (Thermo Fisher Scientific) suplementado con lisozima y DNAasa I, según lo indicado por el proveedor. Para facilitar el proceso de lisis, la suspensión bacteriana se disgregó empleando una pipeta Pasteur hasta que la misma fue homogénea. Después, el lisado celular se incubó durante 30 min adicionales a TA con agitación (150 rpm/min). Para separar las proteínas solubles de las insolubles, el lisado celular se centrifugó a 15.000 g durante 15 minutos y el sobrenadante que contenía el rUS9-FhLAP soluble se purificó mediante IMAC (HIS-Select; Sigma-Aldrich) en condiciones no desnaturalizantes.

Para llevar a cabo la purificación IMAC, la columna se equilibró previamente con PBS y, después, se añadió la solución que contenía la rUS9-FhLAP soluble (diluida previamente 1/4 con PBS conteniendo 10 mM imidazol) con la ayuda una bomba peristáltica (V= 5 mL/min). Luego, la columna se lavó con 5 volúmenes de PBS más imidazol 10 mM y la proteína retenida se eluyó con PBS más imidazol 250 mM. Finalmente, la proteína se concentró por ultrafiltración (punto de corte de la membrana= 10 kDa; Pall Corporation, Port Washington, NY), se filtró con un filtro de 0,22 µm, se suplementó con 5% de glicerol, y se almacenó a -30°C hasta su uso posterior en ELISA.

Además de las células M15 transformadas, se cultivaron células M15 sin transformar como control. Para ello, las bacterias se cultivaron a 37°C durante 8 h sin la adición de IPTG, se recogieron por centrifugación y se lisaron con reactivo B-PER como se indicó anteriormente. Luego, la solución de B-PER que contenía las proteínas solubles se diluyó 4 veces con PBS más imidazol 5 mM y se sometió a cromatografía IMAC en las mismas condiciones que anteriormente, excepto que se usó PBS más imidazol 5 mM para los lavados de la columna.

### *Análisis de SDS-PAGE y Western Blotting (WB)*

La fracción de proteína soluble extraída después de la inducción con IPTG de células M15 transformadas y no transformadas (ver arriba), y las fracciones de proteína purificadas por IMAC se separaron en geles de poliacrilamida de gradiente lineal del 10-20%, como se describió al inicio del apartado de Material y Métodos (ver Métodos comunes generales). Después, las proteínas separadas se tiñeron con BlueSafe (Nzytech, Lisboa, Portugal) o se transfirieron a membranas

de PVDF (Immobilon-P, Millipore Ibérica SA, Madrid, España) empleando una célula de transferencia Trans-Blot SD (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). A continuación, la membrana se bloqueó con PBS que contenía PBS-T-SM durante 2 horas a TA en un agitador orbital y se cortaron en tiras de 5 mm de ancho, aproximadamente. Posteriormente, las tiras se incubaron con mAb US9 (1/2.000) seguido de un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado con HRP hecho en cabra (Bio-Rad, 1/3.000), seguido de una etapa de lavado (tres veces con PBS-T durante 5 min cada una), o con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-polihistidina conjugado con HRP (Sigma-Aldrich, 1/100.000). Cada anticuerpo se incubó durante 1 h a TA en un agitador orbital. Finalmente, las tiras se lavaron nuevamente y las bandas se revelaron empleando tabletas de tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

### *Procedimientos ELISA*

#### **ELISA CAPTURA CON mAb MM3 (MM3-ELISA)**

El MM3-ELISA se usó como método de referencia para comparar la sensibilidad y la especificidad de esta prueba con los resultados obtenidos utilizando rUS9-FhLAP como antígeno diana en los ELISA indirectos y de captura (ver más abajo). Las placas de microtitulación de poliestireno de alta capacidad de unión (Greiner BioOne 96 well 8 x F12) se tapizaron con mAb MM3 purificado (100 µL/pocillo a 5 µg/mL en PBS), se incubaron toda la noche a 4°C, se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con 200 µl/pocillo de caseinato sódico al 1,5% en PBS durante 1 hora a TA. A continuación, se añadieron partes de 100 µl de ES de *F. hepatica* a la concentración de 1 µg/mL en PBS o PBS solo a cada uno de los pocillo de las filas impares de la placa (Ag+) y de las filas pares (Ag-), respectivamente. Después, las placas se incubaron durante 2 horas a TA y se lavaron tres veces con PBS, antes de agregar 100 µl de cada muestra de suero (de ovejas o vacas) diluidas 1/100 en PBS-T-SM a cada pocillo Ag+ y Ag- por duplicado. Las placas se incubaron luego durante 30 min a TA con agitación orbital a 750 rpm, se lavaron cinco veces con PBS-T y se detectaron los anticuerpos IgG unidos empleando anticuerpos monoclonales de ratón anti-IgG de oveja/cabra conjugado con HRP (Sigma-Aldrich, 1/30,000 en PBS-T-SM), o anticuerpos policlonales de oveja anti-IgG bovina IgG1 conjugados con HRP (Bio-Rad, 1/6,000 en PBS-T-SM). Posteriormente, las placas se lavaron como se indicó arriba, y se incubaron durante 20 minutos a TA con 100 µl/pocillo de OPD (SigmaFast OPD, Sigma-Aldrich). Finalmente, la

DO se midió a 492 nm. Los valores de DO para cada muestra se calcularon como  $DO1-DO2$ , donde  $DO1$  es el valor para el pocillo  $Ag^+$ , y  $DO2$  es el valor para el pocillo  $Ag^-$ . Se consideraron dos valores de corte para las ovejas y vacas con el fin de maximizar la especificidad. El corte 1 se calculó como la suma del valor de DO máxima obtenida para los sueros negativos de cada especie más una SD (ver Anexo 4) y el corte 2 se determinó mediante una curva ROC, considerando una especificidad del 100%.

### **CAPTURA ELISA CON EL mAb US9**

Las placas de microtitulación de poliestireno (Greiner BioOne 96 well 8 x F12) se tapizaron con el mAb US9 purificado (100  $\mu$ L/pocillo a 5  $\mu$ g/mL en PBS), se incubaron a 4°C toda la noche, se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con 200  $\mu$ L/pocillo de caseinato sódico al 1,5% en PBS durante 1 h a TA. Después, se añadieron alícuotas de 100  $\mu$ l de una concentración óptima, previamente calculada, de rUS9-FhLAP purificada por IMAC (15  $\mu$ g/mL) en PBS-T-SM, o PBS-T-SM solo, en los pocillos impares ( $Ag^+$ ) y en las filas de pocillos pares ( $Ag^-$ ) de las placas ELISA, respectivamente. Las placas se incubaron luego durante 30 min a TA y agitación orbital a 750 rpm y se lavaron cinco veces con PBS-T. A continuación, a cada pocillo  $Ag^+$  y  $Ag^-$  se agregó, por duplicado, 100  $\mu$ l de cada muestra de suero (de ovejas o vacas) diluidas 1/100 en PBS-T-SM. Las placas se incubaron de nuevo durante 30 minutos a TA con agitación a 750 rpm, se lavaron cinco veces con PBS-T y las IgG específicas de ovino o bovino se detectaron como se describió anteriormente. Los valores de DO para cada muestra y los valores de corte se calcularon como para el MM3-ELISA.

### **ELISA INDIRECTO CON rUS9-FhLAP**

Los pocillos de las placas ELISA se tapizaron con 100  $\mu$ L de una concentración óptima calculada previamente de proteína rUS9-FhLAP purificada por IMAC (3  $\mu$ g/ml) en PBS, se incubaron durante 2 h a 37°C, se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con 200  $\mu$ L/pocillo de caseinato sódico al 1,5% en PBS durante 1 h a TA. Después, se añadieron, por duplicado, alícuotas de 100  $\mu$ l de cada muestra de suero (de ovejas o vacas) diluidas 1/100 en PBS-T-SM a cada pocillo de las placas y se incubaron durante 30 min a TA y agitación orbital a 750 rpm. Finalmente, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y los anticuerpos IgG unidos se detectaron como se describió anteriormente. Los valores de DO para cada muestra y los valores de corte se calcularon como para el MM3-ELISA.

## **ELISA COMPETITIVO INDIRECTO CON rUS9-FhLAP**

Para determinar la posible reactividad de los sueros con el epítipo US9 incluido en la secuencia quimérica rUS9-LAP, se desarrolló un ELISA competitivo indirecto con las muestras de suero de vacas en paralelo con el ELISA indirecto anterior que empleaba el antígeno rUS9-FhLAP como diana. Como inhibidor, se utilizó el péptido sintético MTFSVPIIS (epítipo de reconocimiento de US9). El mAb US9, diluido 1/1.000, se utilizó como control para calcular la concentración inhibidora óptima del péptido sintético US9, que se probó en el rango de 0,5  $\mu$ M a 1 mM. La inhibición completa de la unión del mAb US9 se logró a una concentración de péptido de 0,0625 mM; en consecuencia, la dilución del péptido anterior (0,125 mM) se seleccionó para ser utilizada para la inhibición de sueros en ELISA competitivo indirecto. Este ensayo se realizó como se describió anteriormente para el ELISA indirecto rUS9-FhLAP, pero utilizando sueros de vaca prediluidos 1/100 en PBS-T-SM junto con el péptido US9 a la concentración 0,125 mM durante 30 minutos a TA, antes de ser vertidos en los correspondientes pocillos de las placas ELISA.

## **ELISA INDIRECTO CON PROTEÍNAS M15 RETENIDAS EN IMAC**

Los pocillos de las placas ELISA se tapizaron con 100  $\mu$ L de proteínas solubles M15 retenidas por la columna de afinidad IMAC (4  $\mu$ g/mL) en PBS, se incubaron a 4°C toda la noche, se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con 200  $\mu$ L/pocillo con caseinato sódico al 1.5% en PBS durante 1 h a TA. A continuación, se añadieron, por duplicado, alícuotas de 100  $\mu$ l de suero de vacas no infectadas diluidas 1/100 en PBS-T-SM a los pocillos de las placas y se incubaron durante 30 min a TA y agitación orbital a 750 rpm. Después, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y los anticuerpos IgG unidos se detectaron con anticuerpos policlonales de oveja anti-IgG1 bovina conjugados con HRP como se describió previamente. Los valores de DO para cada muestra se calcularon restando el fondo inespecífico obtenido omitiendo el suero bovino (DO = 0,042).

## **INMUNOENSAYOS CON LPS**

Los pocillos de las placas ELISA se tapizaron con 100  $\mu$ l de una solución de PBS que contenía LPS de *E. coli* serotipo O55: B5 (Sigma-Aldrich) a 10  $\mu$ g/mL, se incubaron durante 2 horas a 37°C, se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con 200  $\mu$ L/pocillo de caseinato sódico al 1,5% en PBS durante 1 h a TA. Después, se añadieron, por duplicado, alícuotas de 100  $\mu$ l de cada muestra de suero de vacas no infectadas, diluido 1/100 en PBS-T-SM y se incubaron durante 30 min a TA y

agitación orbital a 750 rpm. Después, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y los anticuerpos IgG unidos se detectaron como se describió previamente para en ensayo MM3-ELISA.

Para detectar la presencia de LPS de células M15, a las placas ELISA recubiertas con rUS9-FhLAP, o mAb US9 más rUS9-FhLAP, se les añadió 100  $\mu$ L/pocillo de un anticuerpo policlonal de cabra anti-lípido A (ThermoFisher Scientific, Rockford, EE. UU.) diluido 1/100 en PBS-T-SM y se incubaron durante 30 min a TA con agitación orbital a 750 rpm. Después, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y los anticuerpos IgG unidos se detectaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG de oveja/cabra conjugado con HRP (Sigma-Aldrich, 1/30.000 en PBS-T-SM). Finalmente, la DO se midió a 492 nm.

Para ajustar la dilución adecuada del anticuerpo policlonal anti-lípido A se utilizaron los pocillos de una placa ELISA recubierta con *E. coli* O55: B5 (ver arriba). Con las condiciones experimentales descritas, se obtuvo un valor de DO promedio de 0,52 a una dilución de 1/100.

### *Herramientas bioinformáticas*

Los puntos isoeléctricos teóricos, los índices de inestabilidad, los índices alifáticos y los valores GRAVY se calcularon utilizando la herramienta bioinformática ProtParam de Expasy (<https://www.expasy.org/resources>).

### *Análisis estadístico*

Los coeficientes de correlación de Spearman ( $r$ ) se calcularon utilizando los paquetes de software GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) y OriginPro v 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, CA). Las diferencias se consideraron significativas para  $p < 0.05$ . Las curvas ROC se calcularon utilizando el software MedCalc v. 17.7.2 (MedCalc Software, Ostende Bélgica).

## **Resultados**



## RESULTADOS

### Estudio de diversas formulaciones vacunales en Quil-A® sobre la infección por *F. hepatica* en ovejas.

En estudios previos en nuestro laboratorio (Martínez-Sernández et al, 2017b), hemos observado que los anticuerpos IgG de ovejas inmunizadas con la forma nativa (nMF6p/FhHDM-1) o sintética (sMF6p/FhHDM-1) de la proteína madura MF6p/FhHDM-1 (68 aminoácidos) formuladas en Quil-A® reconoció, indistintamente, la proteína nativa o sintética en ELISA indirecto, mientras que los anticuerpos de ovejas infectadas naturalmente solo reaccionaron con la proteína nativa. Estos datos, además de revelar un posible plegado incorrecto del péptido sintético, sugieren que MF6p/FhHDM-1 formulado en Quil-A® induce un conjunto diferente de anticuerpos en ovejas en relación con los inducidos por la proteína nativa durante la infección. Como continuación a ese estudio, en esta parte de la tesis (ver Anexo 1) nos propusimos investigar: i) si el adyuvante Quil-A® es responsable del reconocimiento diferencial del antígeno sMF6p/FhHDM-1, y ii) si la respuesta inmune inducida por el adyuvante junto con el antígeno sMF6p/FhHDM-1 tiene un efecto perjudicial sobre el metabolismo y/o la supervivencia de *Fasciola*. Además de este antígeno, en el estudio se utilizaron nMF6p/FhHDM-1 y una procathepsin L1 recombinante de *F. hepatica* (rFhpCL1) como controles.

#### *Efecto del adyuvante Quil-A® sobre el repertorio de anticuerpos.*

Para evaluar si el adyuvante Quil-A® puede influir en el repertorio de anticuerpos inducido en ovejas por antígenos de *F. hepatica*, realizamos un experimento en el que los antígenos nativo (nMF6p/ FhHDM-1) y sintético (sMF6p/ FhHDM-1) de *F. hepatica*, formulados en Quil-A®, se usaron para inmunizar un grupo de ovejas (n = 5) en las semanas -8 (primera inmunización) y -4 (segunda inmunización), antes de la infección de los animales con metacercarias de *F. hepatica*. Paralelamente, también se incluyeron como control tres grupos de ovejas (n = 5), uno inmunizado con rFhpCL1 formulado en el mismo adyuvante, y los grupos restantes inoculados con el adyuvante solo, o con PBS, y posteriormente se infectaron con metacercarias de *F. hepatica*. Después, la cinética de las respuestas de anticuerpos contra cada antígeno durante el proceso de inmunización-infección, o solo la infección (grupos de control), se midió en ELISA indirecto. Además, para obtener una evaluación más precisa de las cantidades de anticuerpos inducidos para

cada antígeno, se determinaron los títulos de anticuerpos a lo largo del procedimiento de experimentación.

Como se puede ver en la Figura 1, los títulos de anticuerpos generados en las ovejas que se inmunizaron con los antígenos respectivos y posteriormente infectadas, siguieron una cinética similar. En todos los casos, los títulos de anticuerpos IgG específicos aumentaron considerablemente 2 semanas después de la primera inmunización, alcanzaron valores máximos 2 semanas después de la segunda inmunización y permanecieron altos durante el período observado después de la infección experimental. Sin embargo, comparativamente, los títulos de anticuerpos fueron más altos para la rFhpCL1 (valores promedios máximos registrados en las semanas -2 y +8 con  $\bar{x} = 1/148.480 \pm 81.760$  SD y  $\bar{x} = 1/353.280 \pm 313.744$  SD, respectivamente; Figura 1A) y sMF6p/FhHDM-1 (valor medio máximo máximo en la semana -2 de  $\bar{x} = 1/42.240 \pm 37.308$  SD; Figura 1C) que para nMF6p/FhHDM-1 (Figura 1B; valor promedio máximo máximo en la semana -2 de  $\bar{x} = 1/4.640 \pm 2.555$  SD). Además, las respuestas de anticuerpos a los antígenos

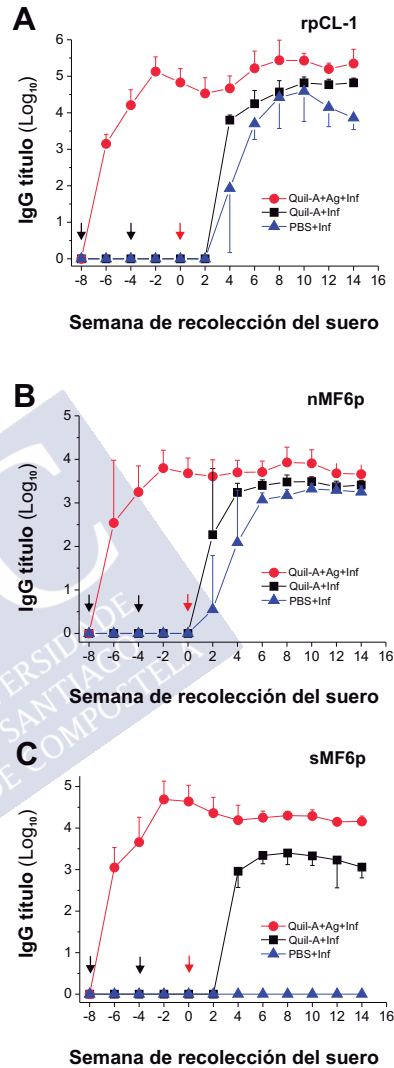


Figura 1. Cinética de la respuesta de anticuerpos IgG en ovinos frente a los antígenos de *F. hepatica* rFhpCL1 (A), MF6p / FhHDM-1 (B) nativos y MF6p / FhHDM-1 (C) sintéticos en ELISA indirecto. Los sueros analizados corresponden a ovejas inmunizadas con el Ag correspondiente formulado en Quil-A® y luego infectadas (círculos rellenos rojos), y a las ovejas a las que solo se les administró el adyuvante Quil-A® (cuadrados rellenos en negro) o PBS (azul), triángulos rellenos) antes de la infección. La inmunización consistió en dos inyecciones subcutáneas del antígeno correspondiente en las semanas -8 y -4 (flechas negras). Las infecciones experimentales se realizaron con 100 metacercarias de *F. hepatica* en el día 0 (flecha roja). Las barras verticales representan la desviación estándar del valor medio para cada grupo de ovejas y semana de muestreo. Abreviaturas: nMF6p = MF6p/FhHDM-1 nativo; sMF6p = MF6p sintético/FhHDM-1.

nos rFhpCL1 y nMF6p/FhHDM-1 inducidos por la infección sola (grupos inoculados con PBS o con Quil-A<sup>®</sup> sin antígeno) también fueron elevadas (Figuras 1A y 1B). Sin embargo, sorprendentemente, los anticuerpos contra el antígeno sintético sMF6p/FhHDM-1 solo se indujeron en el grupo de animales infectados previamente inoculados con Quil-A<sup>®</sup> (Figura 1C). Esto sugiere que dicho adyuvante puede promover cambios en el repertorio de anticuerpos inducidos por el antígeno nativo nMF6p/FhHDM-1 liberado por el parásito durante la infección, incluso cuando se aplica sin antígeno.

Para investigar si este fenómeno es particular del adyuvante Quil-A<sup>®</sup>, repetimos el experimento incluyendo un segundo adyuvante, Al(OH)<sub>3</sub> que promueve respuestas de anticuerpos Th2 dependientes (Lindblad, 2004), y continúa siendo uno de los adyuvantes más ampliamente utilizados en formulaciones vacunales (de Veer *et al.*, 2010; Azmi *et al.*, 2014). Los datos presentados en las Figuras 2A-C muestran que la inoculación previa de ovejas con Al(OH)<sub>3</sub> no altera las respuestas de anticuerpos a ninguno de los tres antígenos analizados, ya que éstos fueron similares a los obtenidos con PBS seguido de una infección. Sin embargo, la inoculación previa con Quil-A<sup>®</sup> favoreció nuevamente el reconocimiento del antígeno sMF6p/FhHDM-1. Además, los resultados en las Figuras 2A-C muestran también

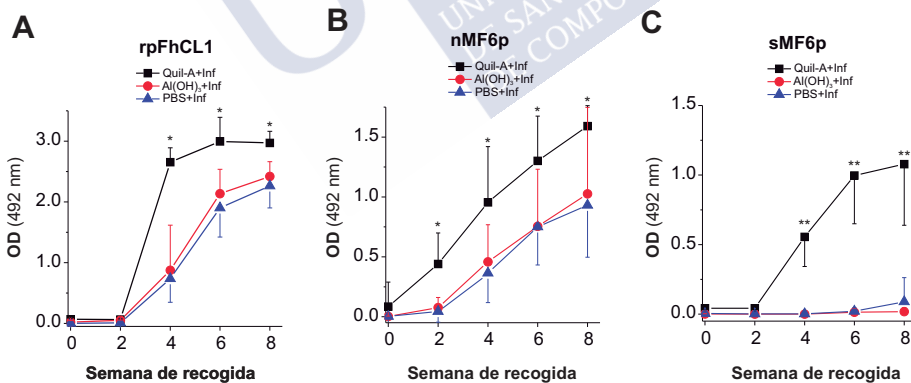


Figura 2. Efecto de Quil-A<sup>®</sup> y Al(OH)<sub>3</sub> en el repertorio de anticuerpos IgG de ovejas infectadas con *F. hepatica*. Las ovejas fueron inoculadas con Quil-A<sup>®</sup>, Al(OH)<sub>3</sub> o PBS en las semanas -8 y -4 y luego se infectaron con 100 metacercarias de *F. hepatica* (semana 0). Las determinaciones de las cinéticas de anticuerpo IgG se realizaron mediante ELISA indirecto, utilizando como diana los antígenos de *F. hepatica* rFhpCL1 (A), nMF6p/FhHDM-1 (B), o sMF6p/FhHDM-1 (C). La respuesta de anticuerpos (valores DO) obtenida de cada grupo se representó como cuadrados negros (Quil-A<sup>®</sup>), círculos rojos (Al(OH)<sub>3</sub>) y triángulos azules (PBS). Las barras verticales representan la desviación estándar del valor medio para cada grupo de ovejas y semana de muestreo. (\*) Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre Quil-A<sup>®</sup> y los otros dos grupos. Abreviaturas: nMF6p = nMF6p/FhHDM-1; sMF6p = sMF6p/FhHDM-1.

que las ovejas inoculadas con Quil-A<sup>®</sup> antes de la infección tienden a producir significativamente más anticuerpos contra los correspondientes antígenos de *Fasciola* que los inoculados con Al(OH)<sub>3</sub>.

*Efecto de la inmunización de ovejas con sMF6p/FhHDM-1 en Quil-A<sup>®</sup> sobre la respuesta de anticuerpos inducidos durante la infección por F. hepatica.*

Los resultados inesperados anteriores muestran que la administración del adyuvante Quil-A<sup>®</sup> modifica el repertorio de anticuerpos producido por las ovejas en respuesta al antígeno de *Fasciola* MF6p/FhHDM-1 nos llevó a investigar si la vacunación con Quil-A<sup>®</sup> más sMF6p/FhHDM-1 puede alterar la cinética de producción de anticuerpos contra antígenos de *F. hepatica* presentes en los ES de este parásito. Para llevar a cabo el estudio, probamos los mismos sueros de los experimentos mostrados en las Figuras 1A-C en ELISA indirecto, pero utilizando los ES de *F. hepatica* como antígeno diana, que incluyen, entre otros, FhCL1 nativo y nMF6p/FhHDM-1. La cinética de las respuestas de anticuerpos observadas en ovejas inmunizadas con rFhpCL1, sMF6p/FhHDM-1 o nMF6p/FhHDM-1, respectivamente (todas formuladas en Quil-A<sup>®</sup>) versus Quil-A<sup>®</sup> solo, o PBS, se muestran en la Figura 3. En general, la inmunización de ovejas con cada uno de los antígenos probados en Quil-A<sup>®</sup> siguió una respuesta bifásica que cubría la inmunización (semanas -8 a 0) y las fases de infección, respectivamente. Durante la fase de inmunización, los animales produjeron una cantidad discreta (sMF6p/FhHDM-1) o intermedia (rFhpCL1 y nMF6p/FhHDM-1) que reacciona con los antígenos nativos presentes en los AES de *F. hepatica* antes de la infección (día 0) y como esperado, no se observó respuesta en el grupo de animales inyectados con Quil-A<sup>®</sup> solo o con PBS. Luego, después del gran estímulo antigénico inducido por la infección por *Fasciola*, todos los grupos de ovejas aumentaron considerablemente el nivel de anticuerpos circulantes para los AES hasta alcanzar los valores máximos en la semana 8 después de la infección. Sin embargo, el tiempo requerido para alcanzar los niveles máximos de anticuerpos varió dependiendo del antígeno de inmunización. Mientras que las respuestas de anticuerpos máximas se obtuvieron en las semanas 4-6 posteriores a la infección en animales inmunizados con nMF6p/FhHDM-1 (triángulos abiertos invertidos), con rFhpCL1 (cuadrados abiertos), o inyectados con Quil-A<sup>®</sup> solo (círculos cerrados, línea roja), los valores de DO equivalentes inducidas por inmunización con Quil-A<sup>®</sup> más sMF6p/FhHDM-1 no se lograron hasta la semana 8 postinfección (triángulos cerrados, línea azul). En particular, observamos diferencias significativas en los niveles de anticuerpos en las semanas 2 ( $p < 0.05$ ), 4 ( $p < 0.01$ ) y 6 ( $p < 0.01$ ) postinfección entre el grupo

de ovejas inoculadas con Quil-A<sup>®</sup> más sMF6p/FhHDM -1 frente al grupo inoculado con Quil-A<sup>®</sup> solo (control). En este punto, es importante tener en cuenta que el efecto paradójico que se observó anteriormente en las ovejas inmunizadas con sMF6p/FhHDM-1 más Quil-A<sup>®</sup> no se debió a una inmunización deficiente ni a una respuesta inadecuada frente al inmunógeno, ya que como se muestra en la Figura 1C, estos animales produjeron una respuesta de anticuerpos alta, que fue casi diez veces más alta en promedio que la inducida por nMF6p/FhHDM-1 formulada en el mismo adyuvante (1/ 42.240 y 1/ 4.640, respectivamente).

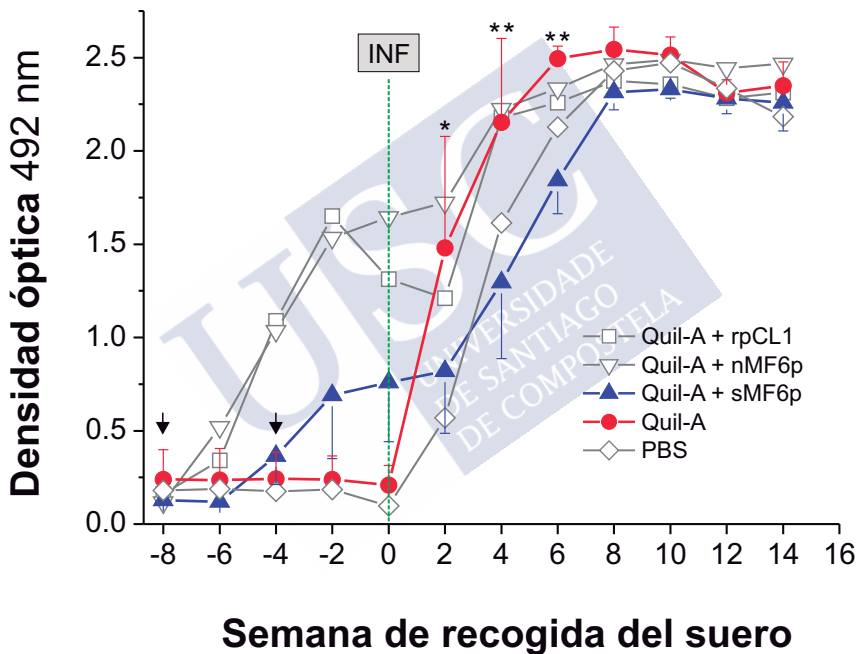


Figura 3. Cinética de los anticuerpos IgG contra las ES de *Fasciola* en ovinos inmunizados y luego infectados por *F. hepatica*. Las inmunizaciones se realizaron con Quil-A<sup>®</sup> más rFhpCL1 (cuadrados abiertos), nMF6p/FhHDM-1 (triángulos invertidos abiertos) o sMF6p/FhHDM-1 (triángulos azules). Las ovejas del grupo control se inyectaron con Quil-A<sup>®</sup> solo (círculos rojos) o PBS (diamantes abiertos) al mismo tiempo que los inmunizados. La inmunización consistió en dos inyecciones subcutáneas del antígeno correspondiente en las semanas -8 y -4 (flechas negras). Las infecciones experimentales se realizaron con 100 metacercarias de *F. hepatica* en el día 0 (línea discontinua; INF). (\*) y (\*\*) indican, respectivamente, diferencias significativas en  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  entre el grupo inmunizado con sMF6p/FhHDM-1 y el control inoculado solo con Quil-A<sup>®</sup>. Las barras verticales representan la desviación estándar del valor medio para cada grupo de ovejas y semana de muestreo. Para facilitar la visualización de los datos, solo se representan las SD de los grupos inmunizados con sMF6p/FhHDM-1 más Quil-A<sup>®</sup> o Quil-A<sup>®</sup> solo (control). Abreviaturas: nMF6p = nMF6p/FhHDM-1; sMF6p = sMF6p/FhHDM-1.

*Efecto de la inmunización de ovejas con antígenos de F. hepatica en Quil-A® sobre la respuesta de anticuerpos IgG1 y la producción de IFN- $\gamma$  in vitro.*

Aunque nunca se ha demostrado de manera convincente, algunos estudios sobre vacunación de rumiantes con antígenos de *Fasciola* sugieren que las respuestas de anticuerpos IgG2 ligados a células Th1, junto con la producción de IFN- $\gamma$ , se asocian con una protección parcial contra la infección por este parásito (Mulkahy *et al.*, 2001; Flynn *et al.*, 2008; Pleasance *et al.*, 2011). En consecuencia, probamos si las diferencias observadas anteriormente en la respuesta de IgG inducida por sMF6p/FhHDM-1 en comparación con nMF6p/FhHDM-1 y rFhpCL1 pueden deberse a la inducción de un perfil diferente de anticuerpos IgG, o a diferencias en la producción de IFN- $\gamma$  entre los diferentes grupos de ovejas.

Con respecto a los perfiles de IgG, se evaluaron las cinéticas de anticuerpos IgG1 e IgG2 en ELISA indirecto con placas tapizadas con el antígeno homólogo correspondiente. Los resultados se muestran en la Figura 4. Aunque no se pueden hacer comparaciones estadísticas entre las cinéticas de IgG1 e IgG2 inducidas por los diferentes antígenos, ya que los datos provienen de ensayos ELISA con diferentes antígenos diana, observamos lo siguiente: i) las respuestas de IgG1 fueron claramente predominantes sobre las respuestas de IgG2, y siguieron una cinética muy similar a la obtenida para la IgG total mostrada en la Figura 1 (téngase en cuenta que aunque los niveles de anticuerpos IgG1 fueron similares para todos los antígenos, para simplificar, solo se representaron los valores correspondientes a sMF6p/FhHDM-1 en la Figura 4); ii) los tres antígenos ensayados formulados en Quil-A® fueron capaces de producir anticuerpos IgG2; iii) Los niveles de anticuerpos IgG2 en los sueros se mantuvieron estables a lo largo del experimento (entre las semanas -6 y +14), aunque también se puede evidenciar un máximo en la semana -2 (dos semanas después de la segunda inmunización), particularmente en ovejas inmunizadas con sMF6p/FhHDM-1; y iv) el estímulo de la infección no aumentó los niveles de anticuerpos IgG1 o IgG2 inducidos por las inmunizaciones con el antígeno correspondiente más Quil-A® (ver, por ejemplo, las señales de DO obtenidas entre las semanas 0-4 post-infección), aunque no se pudo descartar que la infección pudiera haber tenido alguna contribución al mantenimiento de los niveles de anticuerpos alcanzados por la inmunización.

Los datos de la producción *in vitro* de IFN- $\gamma$  por parte de las PBMC obtenidas de grupos de ovejas, pre-estimuladas durante las inmunizaciones con los antígenos de *Fasciola* (sMF6p/FhHDM-1, nMF6p/FhHDM-1 y rFhpCL1) y, posteriormente reestimuladas *in vitro* con el antígeno homólogo correspondiente, o con el mitógeno Con A, se muestran en la Figura 5. Además, también mostramos los

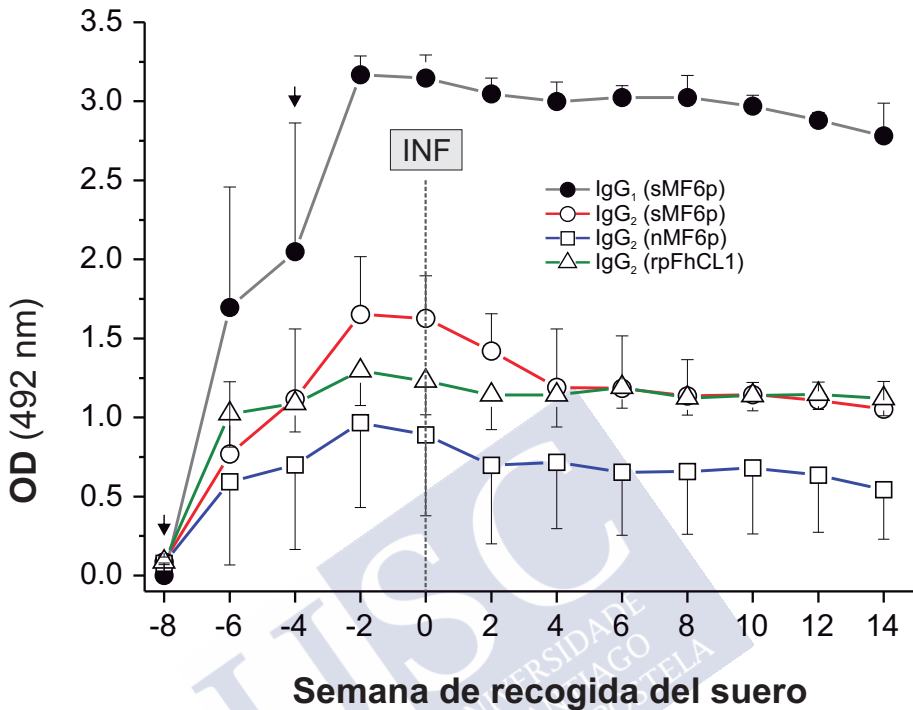


Figura 4. Cinética de los anticuerpos IgG1 e IgG2 inducidos en ovejas inmunizadas con varios antígenos de *Fasciola* formulados en Quil-A® e infectados adicionalmente. Los análisis se realizaron mediante ELISA indirecto utilizando como diana los mismos antígenos utilizados para las inmunizaciones. Las leyendas son las siguientes: círculos rellenos (respuesta IgG1 de ovejas inmunizadas con sMF6p/FhHDM-1); círculos abiertos (respuesta IgG2 de ovejas inmunizadas con sMF6p/FhHDM-1); cuadrados abiertos (respuesta IgG2 de ovejas inmunizadas con nMF6p/FhHDM-1); Triángulos abiertos (respuesta IgG2 de ovejas inmunizadas con rFhpCL1). Las barras verticales representan la SD del valor medio para cada grupo de ovejas. La inmunización consistió en dos inyecciones subcutáneas del antígeno correspondiente en las semanas -8 y -4 (flechas negras). Las infecciones experimentales se realizaron con 100 metacercarias de *F. hepatica* en el día 0 (línea discontinua; INF). Abreviaturas: nMF6p = nMF6p/FhHDM-1; sMF6p = sMF6p/FhHDM-1.

valores de IFN- $\gamma$  producidos por las PBMC procedentes de animales que recibieron solo Quil-A® o PBS (controles) y se reestimularon de nuevo *in vitro* con nMF6p/FhHDM-1 (es decir, el antígeno que provoca la mayor respuesta de IFN- $\gamma$  dentro de los grupos de control). Como se puede observar, las determinaciones de IFN- $\gamma$  se realizaron en la semana -8 (preinmunización), en la semana -2 (tiempo para la respuesta máxima de IgG1 e IgG2, según los datos de la Figura 4) y en la semana +2 (la semana en la que observó la producción máxima de IFN- $\gamma$  en ovinos infectados por *Fasciola* Moreau et al., 2010). El análisis de los datos (Figura 5A) reveló

que las PBMC estimuladas con cada uno de los antígenos probados produjeron altos niveles de IFN- $\gamma$  en la semana -2 (media valores de rango de 109,8 a 176,7 ng/ml;  $p > 0,05$ ) y semana +2 (valores promedio de 95,9 a 198,5 ng/ml;  $p > 0,05$ ), pero también una alta variabilidad en los valores de IFN- $\gamma$  entre los animales de cada grupo, lo que explica la ausencia de diferencias estadísticas entre los grupos. Además, como se esperaba, no se observó respuesta entre los animales inyectados solo con Quil-A<sup>®</sup> o con PBS (control) en ninguna de las semanas analizadas. De manera complementaria a los resultados presentados en la Figura 5A, los datos en la Figura 5B muestran la capacidad de las PBMC, preestimuladas como se indicó anteriormente, para producir IFN- $\gamma$  después de un estímulo *in vitro* con el mitógeno Con A. En este caso, las PBMC de ovejas (vírgenes, o procedentes de ovejas preinmunizadas con antígenos de *Fasciola*) produjeron cantidades apreciables de IFN- $\gamma$  (promedio de 5,9-22,1 ng/ml en la semana -8; 9,4-31,4 ng/ml en la semana -2; 8,6-65,8 ng/ml en la semana +2), pero en una proporción menor que las PBMC presensibilizadas y reestimuladas con los antígenos correspondientes (ver barras verde, blanca y gris en la Figura 5A).

#### *Efecto de la inmunización de ovejas con la proteína MF6p/FhHDM-1 de F. hepatica formulada en Quil-A<sup>®</sup>*

Con el fin de analizar si la inmunización de ovejas con antígenos MF6p/FhHDM-1 formulada en Quil-A<sup>®</sup> tiene alguna influencia en el metabolismo del parásito y, por lo tanto, en la protección de las ovejas contra la infección por *F. hepatica*, los animales infectados se sacrificaron en la semana +14 p.i. y el número y el tamaño de las fasciolas adultas, así como la liberación de antígeno en las heces, fueron registrados. Como puede verse en la Tabla 1, no hubo reducciones significativas en número de fasciolas en los grupos inmunizados, incluido el grupo inmunizado con rFhpCL1. Sin embargo, en algunos de los animales vacunados se pudo demostrar un efecto perjudicial sobre el parásito. En este sentido, observamos que la inmunización con MF6p/FhHDM-1, en particular en su forma nativa (grupo 2) redujo significativamente el tamaño de las fasciolas adultas en comparación con los inmunizados con rFhpCL1 más Quil-A<sup>®</sup> (grupo 1), o con el control que solo recibió PBS (grupo 5). Sin embargo, al analizar la liberación media de antígeno por fasciola, solo la vacunación con el antígeno sMF6p/FhHDM-1 en Quil-A<sup>®</sup> (grupo 3) mostró una reducción significativa en comparación con los controles no inmunizados (grupos 4 y 5).

Para evaluar si el efecto anterior sobre el crecimiento de las fasciolas y la liberación de antígenos tenía alguna relación con los niveles de anticuerpos IgG2

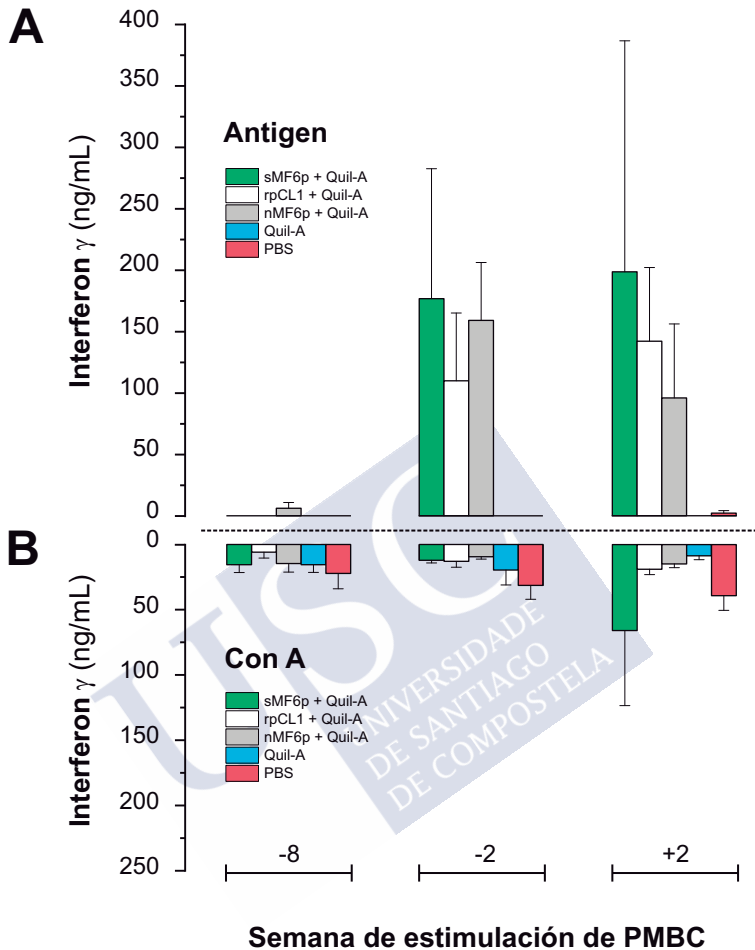


Figura 5. Producción de IFN- $\gamma$  (ng/ml) por PMBC de ovejas después de la reestimulación *in vitro* con el antígeno homólogo correspondiente (A) o con el mitógeno Con A (B). Las PMBC se obtuvieron de ovejas preestimuladas por dos inmunizaciones subcutáneas (semanas -8 y -4) con sMF6p/FhHDM-1 (barras verdes), rFhpCL1 (barras blancas) o nMF6p/FhHDM-1 (barras grises), todas ellas formuladas en Quil-A<sup>®</sup>. Las ovejas de control se inyectaron con Quil-A<sup>®</sup> (barras azules) o PBS (barras rojas) al mismo tiempo que las inmunizadas. Las determinaciones de IFN- $\gamma$  se realizaron en las semanas -8 (pre-inmunización), la semana -2 (pre-infección) y la semana +2 (post-infección). Las barras verticales representan el error estándar de los valores medios. Abreviaturas: nMF6p = nMF6p/FhHDM-1; sMF6p = sMF6p/FhHDM-1.

e IFN- $\gamma$  inducidos por los antígenos previamente descritos formulados en Quil-A<sup>®</sup>, se realizó un análisis de correlación comparando los tamaños de las fasciolas y la liberación de antígenos en el dos grupos de ovejas inmunizadas con los antígenos

MF6p/FhHDM-1 (sintéticos o nativos) con los valores individuales de producción de IgG2 e IFN- $\gamma$  (no mostrados). No se observó una correlación lineal significativa entre los valores de IgG2 o IFN- $\gamma$  medidos antes de la infección (semana -2), lo que sugiere que el efecto perjudicial para las fasciolas generado por la vacunación con tales antígenos no está directamente relacionado con la potenciación de un estímulo antigénico basado en respuestas Th1 antes de la infección.

| Grupo | Antígeno         | N° de fasciolas<br>(datos individuales) | % recuperación<br>(media $\pm$ SD) | Tamaño fasciolas (mm)<br>(media $\pm$ SD)* | Ag liberado (media $\pm$<br>SD)** |
|-------|------------------|---|------------------------------------|--|-----------------------------------|
| 1     | rpFhCL1 + Quil A | 28; 28; 45; 52; 65                      | 43.6 $\pm$ 15.9                    | 18.2 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>                | 49.5 $\pm$ 13.0                   |
| 2     | nMF6p + Quil A   | 19; 24; 33; 33; 47                      | 31.2 $\pm$ 10.7                    | 15.2 $\pm$ 3.2 <sup>a,b,c</sup>            | 51.2 $\pm$ 31.6                   |
| 3     | sMF6p + Quil A   | 24; 27; 33; 40; 52                      | 35.2 $\pm$ 11.2                    | 16.7 $\pm$ 2.8 <sup>a,d</sup>              | 27.5 $\pm$ 22.8 <sup>a,b</sup>    |
| 4     | Quil A           | 26; 28; 36; 48                          | 34.5 $\pm$ 10.0                    | 17.6 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>                | 111.6 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>      |
| 5     | PBS              | 24; 28; 36; 47; 48                      | 36.6 $\pm$ 10.9                    | 17.8 $\pm$ 3.9 <sup>c,d</sup>              | 97.4 $\pm$ 50.7 <sup>b</sup>      |

Tabla 1. Efecto de la inmunización con antígenos de *F. hepatica* formuados con Quil A<sup>®</sup> sobre el tamaño de las fasciolas y la liberación de antígeno en ovejas infectadas. Para cada grupo de infección, la tabla muestra el número de tirones establecidos, el porcentaje de recuperación de fasciolas, el tamaño de las fasciolas y la cantidad promedio de antígeno (catepsinas L1, L2 y L5) liberados por fasciola (ng/ml/fasciola). Un animal del grupo de control de Quil-A<sup>®</sup> se descartó debido a un fallo en la infección. Se midieron todas las fasciolas recuperadas sin daño dentro de cada grupo: grupo 1 (n = 141); grupo 2 (n = 127); grupo 3 (n = 97); Grupo 4 (n = 86) y Grupo 5 (n = 161). Las letras superíndice emparejadas entre grupos dentro de la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas. (\*): los valores de  $p$  dentro de la columna fueron:  $p < 0.001$  (grupos 1-2, 2-4 y 2-5),  $p < 0.01$  (grupos 1-3 y 2-3) y  $p < 0.05$  entre los grupos 3- 5. (\*\*): los valores de  $p$  dentro de la columna fueron:  $p < 0.01$  para las comparaciones entre los grupos 3-4 y  $p < 0.05$  para los grupos 3-5.

## Construcción y evaluación de antígenos quiméricos en distintas especies animales.

En el área de Parasitología se han investigado algunas vacunas compuestas de secuencias quiméricas capaces de conferir protección contra enfermedades relevantes de protozoos y helmintos (Anugraha *et al.*, 2015, Gu *et al.*, 2017, Kaba *et al.*, 2008, Pinheiro *et al.*, 2014). Sin embargo, una lógica respecto a la selección de espaciadores, la polarización de epítomos, la formación de neoepítomos T y la variación de la respuesta inmune entre diferentes especies todavía no se han investigado de una manera racional. En consecuencia, y para comprender mejor esta área, en el presente estudio (**Anexo 2**) investigamos cómo los antígenos quiméricos compuestos de dos o tres epítomos B derivados de los parásitos *Trichinella spiralis* y *F. hepatica*, y unidos por el mismo o diferentes espaciadores, indujeron la formación de anticuerpos IgG en ratones. Además, se investigó la respuesta de anticuerpos frente a una selección de quimeras en otras especies muy diferentes: oveja y rodaballo.

### *Respuestas de anticuerpos inducidas por quimeras B diepitópicas derivadas de secuencias de helmintos en ratones*

Para comprender mejor el reconocimiento de los epítomos B quiméricos lineales derivados de antígenos de helmintos en diferentes especies de animales, comenzamos este estudio probando quimeras diepitópicas en ratones. Estas quimeras consistían en dos epítomos B descritos previamente: la secuencia hidrofóbica MT-FSVPIS (GRAVY = 1,188), que pertenece a la proteína gp53 de *T. spiralis* y que es reconocida por el mAb US9 (epítomo US9) (Perteguer *et al.*, 2004, Romaris *et al.*, 2002, 2003), y una segunda secuencia (23-mer) derivada de la región N-terminal de las catepsinas L de *F. hepatica* (CL; Cornelissen *et al.*, 1999), ambas conectadas por el espaciador GSGSG flexible (de Souza *et al.*, 2013). Además, como los adultos de *F. hepatica* expresan tres clados de CL (CL1, CL2 y CL5; Robinson *et al.*, 2008a) y estas moléculas mostraron diferencias en la antigenicidad como dianas en ELISA (Martínez-Sernández *et al.*, 2018), probamos quimeras diepitópicas que contienen el epítomo US9 unido a cada uno de los epítomos derivados de CL descritos anteriormente (ver secuencias D1, D2 y D3 en la Figura 1). Para una mejor comparación, también investigamos la respuesta de anticuerpos de ratones a una quimera recombinante (rUS9-FhpCL1, 313 residuos) expresada en *E. coli*, que contiene el epítomo US9 después de la etiqueta 6XHis y es seguida por toda la procatepsina L1 de *F. hepatica*, excluyendo el péptido señal (ver Figura 1).

| Nombre corto | Nombre largo                  | Secuencia  | Largo |
|--------------|-------------------------------|--|-------|
| D1           | US9- (GSGG) -CL1              | MTFSVPI <b>SGSGG</b> GAVPDKIDWRESGYVTEVKDQGN   | 36    |
| D2           | US9- (GSGG) -CL2              | MTFSVPI <b>SGSGG</b> AVPESIDWRDYYVTEVKNQGC   | 36    |
| D3           | US9- (GSGG) -CL5              | MTFSVPI <b>SGSGG</b> GAVPDRIDWRESGYVTEVKDQGC   | 36    |
| D4           | CL2- (GSGG) -MF6p2            | AVPESIDWRDYYVTEVKNQGC <b>SGSGV</b> TKAYEKARDRA   | 40    |
| D5           | CL2- (GSGG) -MF6p4            | AVPESIDWRDYYVTEVKNQGC <b>SGSG</b> LNRLITDLEKYA   | 40    |
| D6           | US9- (GPGPG) -CL2             | MTFSVPI <b>SGPGG</b> AVPESIDWRDYYVTEVKNQGC   | 36    |
| D7           | US9- (KK) -CL2                | MTFSVPI <b>SKK</b> AVPESIDWRDYYVTEVKNQGC   | 33    |
| D8           | CL2- (KK) -US9                | AVPESIDWRDYYVTEVKNQGC <b>KK</b> MTFSVPIS   | 33    |
| T1           | US9- (GSGG) -CL2- (KK) -MF6p2 | MTFSVPI <b>SGSGG</b> AVPESIDWRDYYVTEVKNQGC <b>KK</b> VTKAYEKARDRA  | 50    |
| T2           | US9- (KK) -CL2- (KK) -MF6p2   | MTFSVPI <b>SKK</b> AVPESIDWRDYYVTEVKNQGC <b>KK</b> VTKAYEKARDRA  | 47    |
| T3           | US9- (KK) -MF6p2- (KK) -CL2   | MTFSVPI <b>SKK</b> VTKAYEKARDRA <b>KK</b> AVPESIDWRDYYVTEVKNQGC  | 47    |
| sMF6p        | sMF6p/ FhHDM-1                | SEESREKLRESGRKMYKALRDVTKAYEKARDRAMAYLAKDNLGEKITEVITILLNRL<br>TDRLEKYAGN  | 68    |
| sMF6a        | sMF6p/ FhHDM-1 (amino)        | SEESREKLRESGRKMYKALRDVTKAYEKARDR   | 33    |
| TSP12        | <i>Trichinella</i> (gp53)     | AMKE <b>MTFSVPIS</b>   | 12    |
| rUS9-FhpCL1  | US9- (gb CCA61803.1)          | MRGS <b>HHHHH</b> <b>GSMTF</b> SVVPIS <b>S</b> NSDDDLWHQWKRMYNKEYNGDDDDQHRRN IWEKNVKHIQE<br>HNLRDLGLVYITLGLNQFTDMT FEEFKAKYLTEMRSRASILSHGVPYEANNRAVPDK<br>IDWRESGYVTEVKDQGNCGGSCWAFSTTG.....ASLPMVARFP | 331   |

Figura 1. Lista de secuencias peptídicas utilizadas para la inmunización y/o como dianas en ELISA. Las secuencias espaciadoras entre los epitopos de cada quimera se muestran en color rojo. La secuencia del epitopo reconocida por el mAb US9 de la secuencia gp53 de *T. spiralis* se marcó en color cian. La secuencia correspondiente al epitopo CL2 de la catepsina L2 de *F. hepatica* (gb | KY464953) se resaltó en color azul. Las diferencias entre las letras de las secuencias de los epitopos CL1 (gb | CCA61803.1), CL2 y CL5 (gb | KY392883) se han subrayado. Los epitopos MF6p2 y MF6p4 derivados de la proteína *Fasciola* sMF6p/FhHDM-1 se resaltaron en colores amarillo y gris, respectivamente. La región poli-HIS en la quimera US9-rFhpCL1 se resaltó en color verde. El número de aminoácidos que componen cada cada péptido/proteína se muestra a la derecha de la Figura. Una sucesión de puntos indican una región truncada, no mostrada, en la secuencia de la quimera recombinante US9-rFhpCL1.

Los datos en la Figura 2 muestran los títulos de anticuerpos obtenidos en ratones inmunizados con las quimeras D1, D2, D3 o rUS9-FhpCL1. Se puede observar que las respuestas de anticuerpos a todas las quimeras D1, D2 y D3 (Figuras 2A-C) fueron excelentes (títulos  $> 1/25.000$ ) a pesar del hecho de que estos animales solo recibieron una única inmunización en CFA. Por el contrario, ninguna de las quimeras probadas indujo una respuesta de anticuerpos contra el epítipo B de US9 (contenido en el péptido TSP12; Figura 2D), que podría estar relacionada con su posicionamiento en la región N-terminal de las quimeras o con una inmunogenicidad deficiente de este epítipo.

Nuestros datos en la Figura 2 también mostraron que los animales inmunizados con la quimera rUS9-FhpCL1 mostraron una alta respuesta de anticuerpos contra esta quimera (título  $> 1/100.000$ ; no se muestra) pero una baja respuesta de IgG

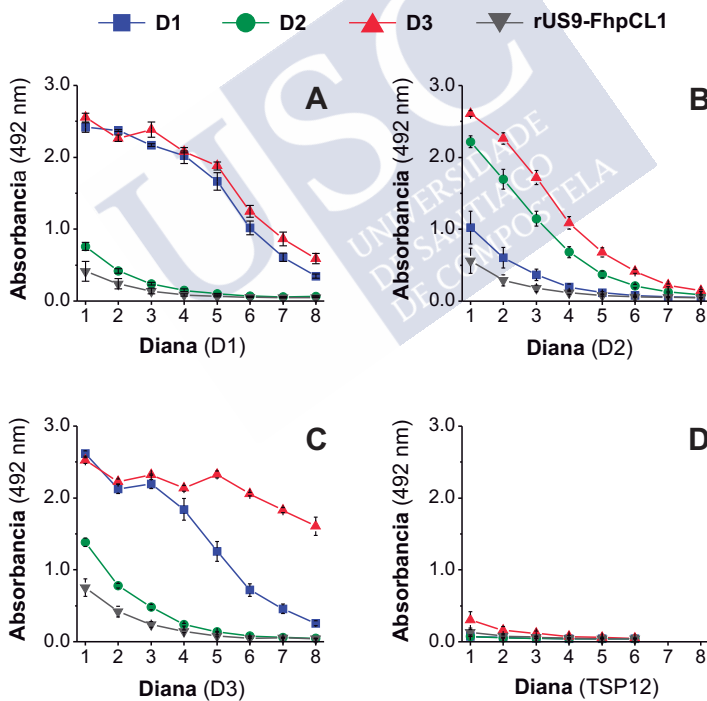


Figura 2. Títulos de anticuerpos IgG completos obtenidos en ratones BALB/c (10 animales por grupo) inmunizados con quimeras D1, D2, D3 o rUS9-FhpCL1 en CFA. Las diluciones de los sueros de cada grupo se probaron contra la secuencia US9 (TSP12) y las quimeras D1, D2 y D3 en ELISA indirecto. Los números en el eje x representan el Log2 de cada dilución a partir de 1/100. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media. El mAb US9 también se usó como control para confirmar la disponibilidad del epítipo US9 en el péptido TSP12 unido a la placa (no mostrado).

frente a la quimera D1 (Figura 2A), lo que sugiere que el epítipo CL1 tiene poca contribución a la antigenicidad global de la molécula. Además, nuestros resultados en la Figura 2 sugirieron que, aunque de secuencia similar, el epítipo CL5 (derivado de *Fasciola* CL5) presente en la quimera D3 indujo niveles de anticuerpos más altos que los epítipos CL1 y CL2 presentes en las quimeras D1 y D2, respectivamente (ver Figuras 2A-C). Sin embargo, este resultado no parece ser extrapolable a toda la molécula, ya que se informó que la CL2 recombinante fue ligeramente mejor reconocida que la CL1 y la CL5 por los anticuerpos inducidos durante las infecciones naturales del ganado (Martínez-Sernández *et al.*, 2018).

Ya que para inducir una respuesta de anticuerpos TD se requiere al menos la presencia de un epítipo de células T en el inmunógeno, las secuencias de quimeras D1, D2 y D3 se analizaron con la herramienta bioinformática PredBALB/c (Zhang *et al.*, 2005a) que predice la unión de péptidos a moléculas H-2<sup>d</sup> de clase II de ratón (alelos I-A<sup>d</sup> e I-E<sup>d</sup>). Los resultados en la Tabla 1 mostraron que contienen 2-5 nonámeros con alta probabilidad (puntuación  $\geq 9$ ; rango 0-10) de unión a los alelos H-2<sup>d</sup> de clase II, lo que está de acuerdo con las altas respuestas de anticuerpos obtenidas

| H-2 alelo        | D1                                   | D2   | D3  | D4   | D5/D6   |
|------------------|--------------------------------------|--|---|--|---|
| I-A <sup>d</sup> | SGYVTEVKD (9.50)<br>VTEVKDQGN (9.04) | <b>SGSGAVPES</b> (9.20)<br><b>SGAVPESID</b> (10.0)<br>RDYYYVTEV (9.20)<br>YYYVTEVKN (9.50) | <b>SGAVPDRID</b> (9.10)<br>SGYVTEVKD (9.50) | RDYYYVTEV (9.20)<br>YYYVTEVKN (9.50)<br><b>GSGSGVTKA</b> (9.50)<br><b>GSGVTKAYE</b> (9.10)<br>SGVTKAYEK (9.30) | RDYYYVTEV (9.20)<br>YYYVTEVKN (9.50)          |
| I-E <sup>d</sup> | KIDWRESGY (9.50)                     | IDWRDYYYYV (9.50)  |   | IDWRDYYYYV (9.50)<br>VTKAYEKAR (9.12)  | IDWRDYYYYV (9.50)<br><b>TFSVPISGP</b> (9.32)* |

| H-2 alelo        | D7  | D8   | T1  | T2   | T3  |
|------------------|---|--|---|--|---|
| I-A <sup>d</sup> | <b>TFSVPISKK</b> (9.20)<br><b>ISKKA VPES</b> (9.28)<br>RDYYYVTEV (9.20)<br>YYYVTEVKN (9.50) | RDYYYVTEV (9.20)<br>YYYVTEVKN (9.50)         | <b>SGSGAVPES</b> (9.20)<br><b>SGAVPESID</b> (10.0)<br>RDYYYVTEV (9.20)<br><b>GQCKKVTKA</b> (9.30) | <b>TFSVPISKK</b> (9.20)<br><b>ISKKA VPES</b> (9.28)<br>RDYYYVTEV (9.20)<br>YYYVTEVKN (9.50)<br><b>GQCKKVTKA</b> (9.30)<br><b>CKKVTKAYE</b> (9.30)  | <b>TFSVPISKK</b> (9.20)<br><b>SKKVTKAYE</b> (9.70)<br><b>DRAKKAVPE</b> (9.10)<br>RDYYYVTEV (9.20)<br>YYYVTEVKN (9.50)   |
| I-E <sup>d</sup> | <b>TFSVPISKK</b> (9.80)<br><b>ISKKA VPES</b> (10.0)<br>IDWRDYYYYV (9.50)                    | IDWRDYYYYV (9.50)<br><b>EVKNQGQCK</b> (9.70) | IDWRDYYYYV (9.50)<br><b>EVKNQGQCK</b> (9.70)<br><b>GQCKKVTKA</b> (9.20)                           | <b>TFSVPISKK</b> (9.80)<br><b>ISKKA VPES</b> (10.0)<br>IDWRDYYYYV (9.50)<br>EVKNQGQCK (9.70)<br><b>GQCKKVTKA</b> (9.20)<br><b>KKVTKAYEK</b> (9.70)<br>KVTKAYEKA (9.70)<br>VTKAYEKAR (9.12) | <b>TFSVPISKK</b> (9.80)<br><b>PISKKVTKA</b> (9.20)<br><b>ISKKVTKAY</b> (9.40)<br><b>KKVTKAYEK</b> (9.70)<br>KVTKAYEKA (9.70)<br>VTKAYEKAR (9.12)<br>YEKARDRAK (9.26)<br><b>EKARDRAK</b> (9.80)<br>IDWRDYYYYV (9.50) |

Tabla 1. Número de péptidos de unión de CPH de clase II putativos (H-2<sup>d</sup>) predichos para cada antígeno quimérico con el algoritmo PredBALB/c. Los números entre paréntesis indican la puntuación obtenida para cada péptido (rango 0-10). Cuanto mayor sea la puntuación, mayor será la probabilidad de que una molécula de os alelos I-A<sup>d</sup> o I-E<sup>d</sup> reconozca un péptido determinado. Los nonámeros que incluyen alguno de los residuos pertenecientes a los espaciadores utilizados para enlazar los diferentes epítipos se muestran en negrita.

(\*): Predicho en la quimera D6 solamente.

anteriormente. Además, como se puede ver, la mayoría de los supuestos epítomos T se localizaron en las secuencias CL, aunque también se predijo la presencia de tres neopítomos T que se superponen parcialmente con el espaciador GSGSG.

En vista de la ausencia de una respuesta de anticuerpos al epítomo US9 en ratones inmunizados con las quimeras D1, D2 y D3, investigamos si el posicionamiento de un epítomo CL en la posición N-terminal de una quimera también falla para inducir anticuerpos en estos animales. En este caso, el antígeno quimérico se construyó con dos epítomos de *F. hepatica*: el epítomo CL2 (23 mer), colocado en la posición N-terminal seguido por la secuencia del espaciador GSGSG y por un segundo epítomo derivado de la secuencia de MF6p/FhHDM-1 procedente de la proteína de unión a hemo madura (Martínez-Sernández *et al.*, 2014, 2017a; ver quimeras D4 y D5 en la Figura 1). Entre estos últimos, probamos dos secuencias internas de 12-mer de la proteína MF6p/FhHDM-1 madura: <sup>23</sup>VTKAYEKARDRA<sup>34</sup> y <sup>55</sup>LNRLTDRLEKYA<sup>66</sup> (Figura 1), que también están presentes en la proteína MF6p/FgHDM-1 de *F. gigantica* (Martínez-Sernández *et al.*, 2017b).

Los resultados en la Figura 3 mostraron que las quimeras D4 y D5 indujeron altas respuestas de anticuerpos en ELISA, pero una respuesta pobre cuando los sueros se sometieron a pruebas cruzadas, a pesar del hecho de que comparten la misma secuencia CL2-GSGSG. Además, mientras que los anticuerpos inducidos por la inmunización con la quimera D2 (que contiene el epítomo CL en la posición C-terminal y carece de cualquier secuencia MF6p/FhHDM-1) reaccionaron con las quimeras D4 y D5, los anticuerpos inducidos por esta última reaccionaron pobremente con la quimera D2. Estos resultados confirmaron nuevamente la falta de respuesta de anticuerpos frente al epítomo de células B ubicado en la región N-terminal de la secuencia y sugieren que la mayoría de los anticuerpos inducidos por las quimeras D4 y D5 están dirigidos contra las secuencias MF6p/FhHDM-1 colocadas en posición C-terminal (MF6p2 en la quimera D4 o MF6p4 en la quimera D5) con o sin la participación del espaciador GSGSG.

Para descartar la posible implicación de este espaciador y, por lo tanto, la formación de neopítomos, probamos los mismos sueros contra dos quimeras que contienen la secuencia MF6p2 en posición central (T3, ver Figura 1) o en la posición C-terminal (T2, ver Figura 1), careciendo ambos del espaciador GSGSG. Los resultados en la Figura 3 mostraron que los sueros de ratones inmunizados con la quimera D4 (barra negra) eran altamente reactivos con la quimera T2, pero menos reactivos con la quimera T3. Estos datos indicaron que la mayoría de los anticuerpos inducidos por la quimera D4 se dirigen contra el epítomo MF6p2, aunque este epítomo se reconoce mejor cuando se encuentra en la posición C-terminal del antígeno diana.

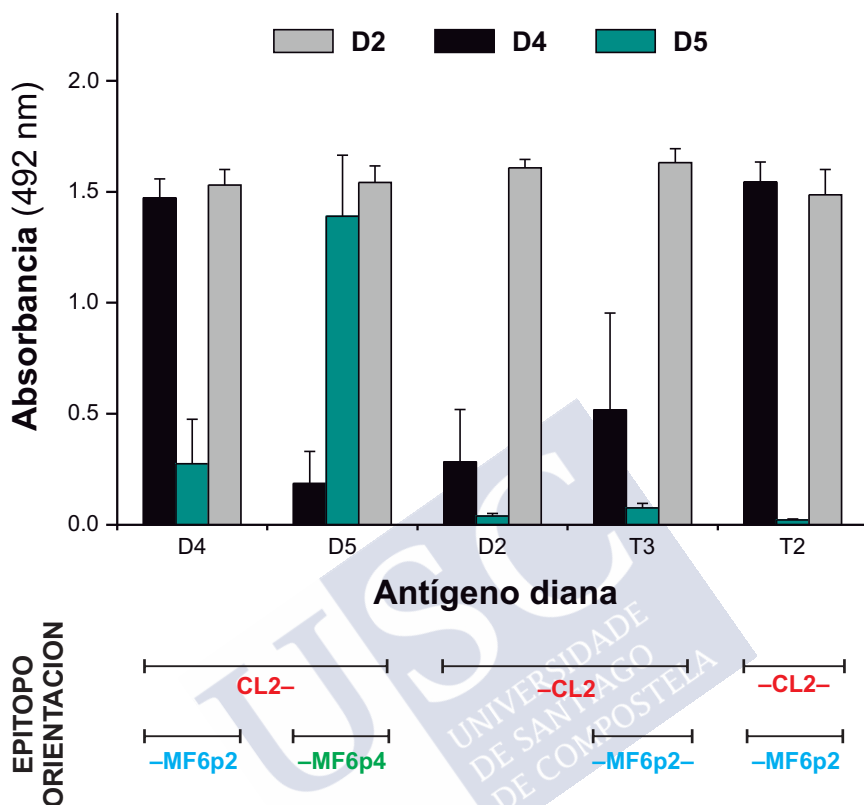


Figura 3. Respuestas de anticuerpos IgG totales obtenidos en ratones BALB/c inmunizados con quimeras D2 (10 animales), D4 (9 animales) y D5 (9 animales) en CFA. Cada grupo de sueros se probó a una dilución 1/100 contra las quimeras D2, D4, D5, T2 y T3 en ELISA indirecto. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media. La leyenda debajo de la gráfica de barras indica los epítopos que potencialmente pueden ser reconocidos por cada grupo de sueros, así como su orientación dentro de la quimera (N-terminal: guión a la derecha; central: guión izquierdo y derecho; o C-terminal: guión izquierdo) y si son compartidos o no por las diferentes quimeras (segmentos horizontales).

Para explorar mejor la influencia de los espaciadores en la antigenicidad de los antígenos quiméricos, construimos dos nuevas quimeras, que mantienen la estructura de la quimera D2, pero cambiando el espaciador GSGSG a GPGPG (quimera D6), una secuencia del espaciador utilizada para interrumpir la célula T de la unión. epítopos (Livingston *et al.*, 2002, Nezafat *et al.*, 2016), o la secuencia KK (quimera D7), utilizada recientemente para aislar epítopos de células T y B contiguos (Gu *et al.*, 2017). De nuevo, los sueros de animales inmunizados con

quimera D2 que contenían el espaciador GSGSG se usaron para comparación. Los resultados presentados en la Figura 4 mostraron, nuevamente, que no hay respuestas de anticuerpos al epítipo US9 (TSP12) presentes en las quimeras D2, D6 y D7. Sin embargo, todas las quimeras indujeron buenas respuestas de anticuerpos al epítipo CL2, como lo indican los altos valores de DO obtenidos con cada una de las quimeras inmunizantes (auto-reconocimiento) y con las quimeras unidas por otros espaciadores (reconocimiento cruzado) en ELISA. Además, investigamos la influencia de la posición del epítipo CL2 en la secuencia objetivo mediante la prueba de dos quimeras adicionales en las que el epítipo CL2 está en una posición central (T1, ver Figura 1) o en la región N-terminal (D4, ver Figura 1). En este caso, no se observaron diferencias entre las señales de DO con reacción automática y de reacción cruzada (Figura 4), lo que indica que todos los sueros reconocieron el epítipo CL2 independientemente de su posición en el antígeno diana.

Además de los epítipos de células B, también investigamos la posible influencia de los espaciadores en la alteración del repertorio de epítipos de células T a lo largo del antígeno quimérico. Como se puede ver en la Tabla 1, la herramienta de bioinformática PredBALB/c predijo que algunas de las quimeras diepitópicas no tendrían secuencias de aminoácidos capaces de unirse a los alelos I-A<sup>d</sup> y I-E<sup>d</sup> que contienen parciales (quimeras D2, D3, D4 y D6) o secuencias de espaciador completas (D7) (todas marcadas en negrita). Curiosamente, con respecto a las quimeras D6 y D7, la adición de residuos correspondientes al espaciador GPGPG o KK, respectivamente, convirtió la secuencia US9 en un probable epítipo de células T, lo que podría aumentar la señalización de las células T favoreciendo la inducción de anticuerpos al epítipo CL2.

### *Respuestas de anticuerpos de ratón inducidas por quimeras B triepitópicas construidas con diversos espaciadores*

A partir de los resultados bioinformáticos presentados en la sección anterior, llegamos a la conclusión de que las secuencias espaciadoras pueden contribuir a aumentar el número de epítipos T disponibles en las quimeras al inducir la formación de neoepítipos T. Sin embargo, no pudimos dilucidar qué secuencia espaciadora sería más favorable para inducir respuestas de anticuerpos timo-dependientes (TD) con mínima o ninguna formación de neoepítipos B, un aspecto relevante para lograr la máxima eficacia de la vacuna. Además, nuestros resultados no aclararon cuáles son las posiciones más adecuadas para los epítipos de células B en quimeras multiepítipo. Para abordar estas preguntas, diseñamos quimeras triepitópicas utilizando una combinación del espaciador GSGSG con KK, o KK solo, y permutando

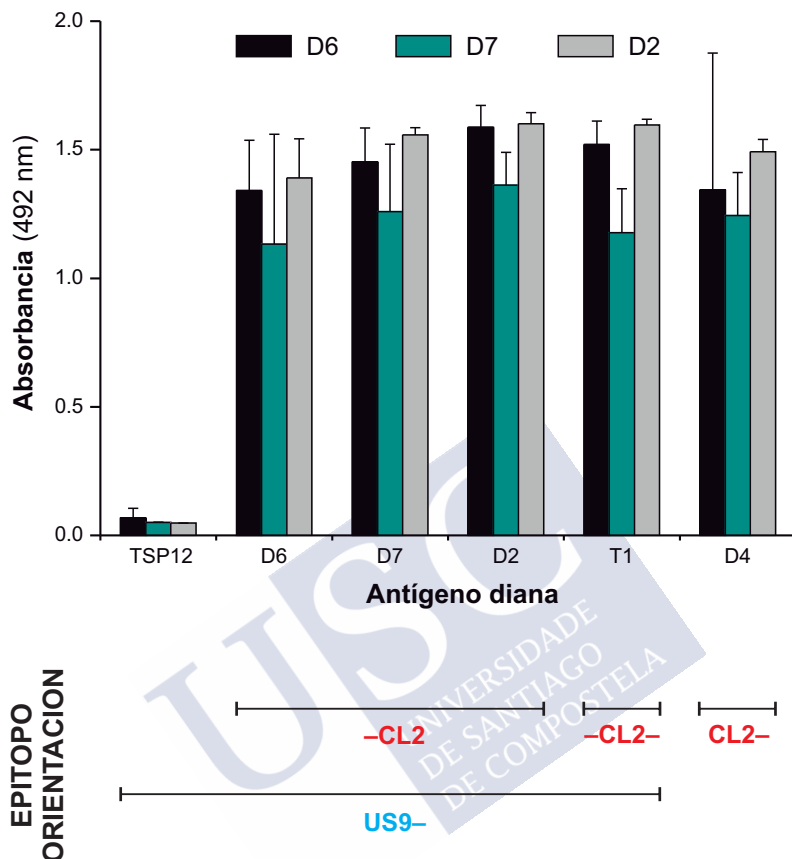


Figura 4. Respuestas de anticuerpos IgG totales obtenidos en ratones BALB/c inmunizados con las quimeras D2 (10 animales) y D6 (8 animales) y D7 (8 animales) analizados. Cada grupo de suero se probó a una dilución 1/100 frente a las quimeras D2, D4, D6, D7 y T1, así como frente al péptido TSP12 (epítipo US9) en ELISA indirecto. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media. La leyenda debajo de la gráfica de barras indica los epítipos que potencialmente pueden ser reconocidos por cada grupo de sueros, así como su orientación dentro de la quimera (N-terminal: guión derecho; central: guiones izquierdo y derecho; o C-terminal: guión a la izquierda) y si son compartidos o no por las diferentes quimeras (segmentos horizontales). El mAb US9 también se usó como control para confirmar la disponibilidad del epítipo US9 en el péptido TSP12 unido a la placa (no mostrado).

la posición de los epítipos central y C-terminal (ver quimeras T1, T2 y T3, Figura 1). Las respuestas de anticuerpos obtenidas después de la inmunización de ratones BALB/c con cada una de estas quimeras se muestran en la Figura 5. Se observaron tres hallazgos principales: i) en cuanto a las quimeras diepitópicas, no se dirigió

ninguna respuesta de anticuerpos al epítipo US9 (antígeno TSP12) colocado en la posición N-terminal de la quimera; ii) las tres quimeras triepitópicas indujeron excelentes respuestas de anticuerpos contra sí mismas (reconocimiento propio y cruzado) y contra las quimeras D2 y D4, pero solo los anticuerpos inducidos por las quimeras T2 y T3 reaccionaron fuertemente con la quimera D5, que carece del epítipo MF6p2; y iii) la proteína sintética MF6p/FhHDM-1, que contiene la secuencia del epítipo interno MF6p2 (<sup>23</sup>V-<sup>66</sup>A), solo fue reconocida por anticuerpos inducidos por la quimera T2 y, en menor medida, por aquellos inducidos por la quimera T3. A partir de estos resultados, llegamos a la conclusión de que las quimeras T1, T2 y T3 eran capaces de inducir anticuerpos contra los epítipos tanto de CL2 como de MF6p2. Sin embargo, en comparación con T2 y T3, parece que T1 indujo un conjunto diferente de anticuerpos ya que: i) estos anticuerpos no reaccionaron con el epítipo CL2 cuando se ubicaron en la posición N-terminal de la secuencia objetivo (por ejemplo, quimera D5, Figura 5) y ii) el epítipo MF6p2 no se reconoció cuando se ubicó en una posición interna (como en la proteína sintética MF6p/FhHDM-1). Estas conclusiones también fueron respaldadas por varios ELISA de inhibición (no mostrados) que descartaron cualquier posible artefacto debido a una orientación inadecuada de los péptidos diana en los ELISA indirectos.

En cuanto al efecto de la orientación de los epítipos en el antígeno, nuestros resultados también indicaron que las secuencias espaciadoras pueden ejercer una influencia sobre la antigenicidad de las quimeras triepitópicas. Esto se dedujo del hecho de que, aunque las quimeras T1 y T2 comparten el mismo posicionamiento del epítipo, generaron un conjunto distinto de anticuerpos, ya que solo los anticuerpos inducidos por la quimera T2 fueron capaces de reconocer los epítipos CL2 (presentes en las quimeras D2 y D5) y MF6p2 (presente en la quimera D4 y en MF6p/FhHDM-1) independientemente de su posición en el antígeno diana (Figura 5). Estos resultados sugieren que los epítipos separados por los espaciadores KK pueden ser una mejor opción para los experimentos de inmunización con antígenos quiméricos.

Además de la determinación de las respuestas de anticuerpos IgG totales inducidas por las quimeras triepitópicas en ratones, investigamos la influencia de los diferentes espaciadores y/o la posición de los epítipos B en el repertorio de subclases de IgG inducidas por estas quimeras. Las respuestas de anticuerpos de la subclase IgG inducidas por las quimeras T1, T2 y T3 frente a sí mismas, así como frente a las quimeras D5 y sMF6p, se determinaron en ELISA. Los resultados presentados en la Figura 6 muestran que todas las quimeras indujeron la formación de anticuerpos de todas las subclases de IgG en ratones, lo cual es concordante con la respuesta de anticuerpos obtenida para anticuerpos anti-IgG totales (ver arriba).

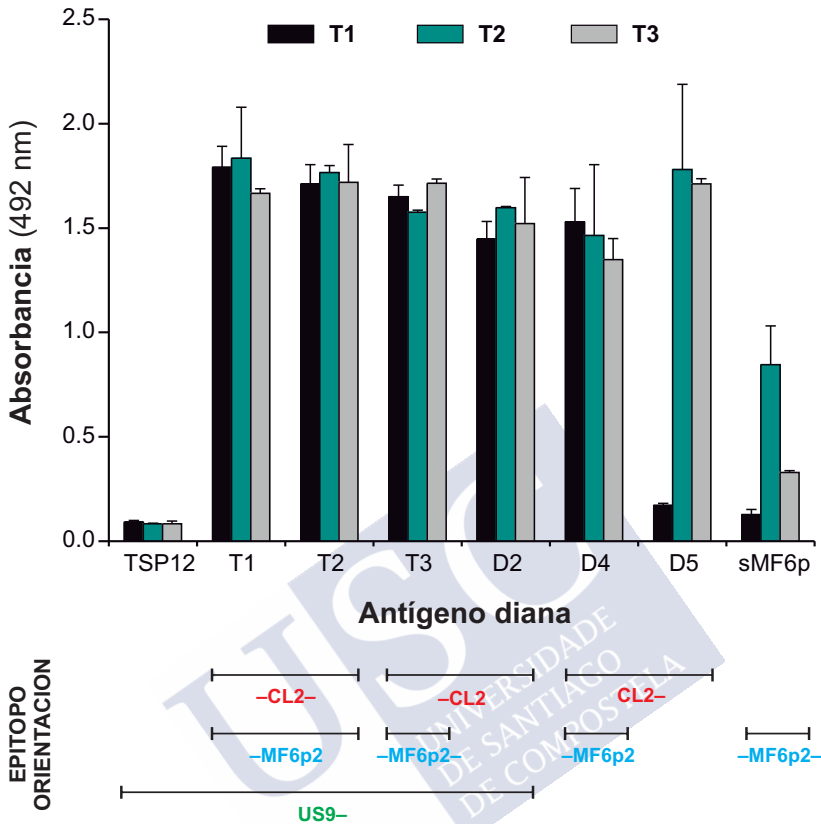


Figura 5. Respuestas de anticuerpos IgG totales obtenidos en ratones BALB/c (8 animales por grupo) inmunizados con quimeras triepitópicas T1, T2 y T3. Las mezclas de sueros se analizaron en ELISA indirecto a una dilución 1/100 frente al péptido TSP12 (epitopo US9), las quimeras triepitópicas T1, T2 y T3, las quimeras diepitópicas D2, D4 y D5 y la proteína sMF6p/FhHDM-1. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media. La leyenda debajo de la gráfica de barras indica los epítomos que potencialmente pueden ser reconocidos por cada grupo de sueros, así como su orientación dentro de la quimera (N-terminal: guión a la derecha; central: guiones izquierdo y derecho; o C-terminal: guión a la izquierda) y si son compartidos o no por las diferentes quimeras (segmentos horizontales). El mAb US9 también se usó como control para confirmar la disponibilidad del epítopo US9 en el péptido TSP12 unido a la placa (no mostrado).

### *El epítopo US9 influye en la respuesta de anticuerpos de los ratones al epítopo CL2*

La falta de una respuesta de anticuerpos relevante en ratones para el epítopo colocado en la región N-terminal de las quimeras diepitópicas y triepitópicas (es

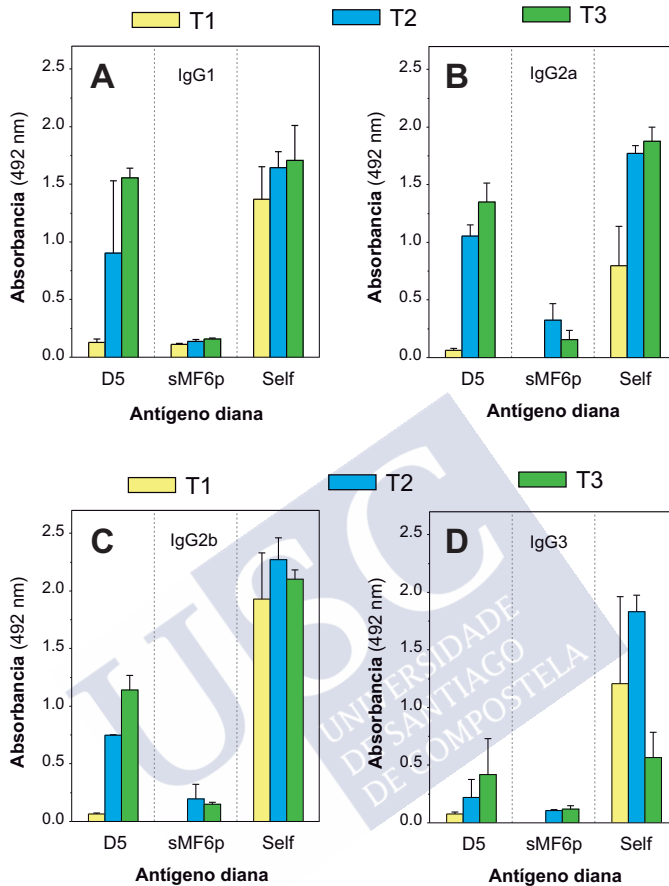


Figura 6. Análisis de las respuestas de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 obtenidas en ratones BALB/c después de la inmunización con las quimeras triepitópicas T1, T2 y T3 en CFA. Las mezclas de sueros se analizaron en ELISA indirecto diluidos 1/100 y se ensayaron frente a la quimera D5, la proteína sMF6p/FhHDM-1 y la quimera correspondiente utilizada para la inmunización (auto-reconocimiento). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media.

decir, contra los epítomos de US9 o CL2) nos llevó a asumir que ésta podría no ser una posición adecuada colocar un epítomo B. Sin embargo, considerando que la secuencia CL2 contiene supuestos epítomos T (Tabla 1), surge una duda sobre si la presencia del epítomo US9 hidrofóbico en cualquier posición de una quimera puede modular las respuestas a otros epítomos vecinos. Para comprobar este aspecto, inmunizamos ratones con una nueva quimera diepitópica (D8; ver Figura 1) que tiene los mismos epítomos US9 y CL2 que la quimera D7 pero invertidos en sus

posiciones. Después de probar los sueros obtenidos de ratones inmunizados con la quimera D8, observamos que esta quimera producía una excelente respuesta de anticuerpos contra sí misma (Figura 7) y que dicha respuesta se dirigía exclusivamente contra el epítipo CL2. Este resultado fue sorprendente, ya que, como se señaló anteriormente, los anticuerpos inducidos por las quimeras D4 y D5, que llevan el epítipo CL2 en la misma posición N-terminal que D8 pero carecen de la secuencia US9, no reaccionaron con dicho epítipo.

### *Análisis de las respuestas de anticuerpos inducidas por quimeras B di y triepitópicas en otras especies animales*

Además de los ratones BALB/c hemos realizado un estudio exploratorio sobre las respuestas de anticuerpos de ovejas y rodaballo frente a una selección de los antígenos quiméricos anteriores. Los datos sobre las respuestas de anticuerpos IgG de ovejas inducidas por inmunización con quimeras D2, T2 y T3 se muestran en la Figura 8. En cuanto a los ratones, no se obtuvo respuesta de anticuerpos al epítipo US9 con ninguna de las tres quimeras inmunizantes. Sin embargo, las respuestas de anticuerpos de estos animales mostraron algunas diferencias notables con respecto a los ratones. En este sentido, observamos que mientras las ovejas

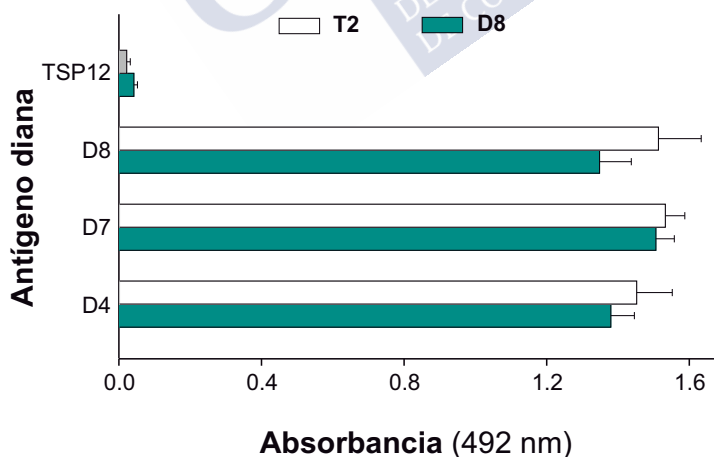


Figura 7. Respuestas de anticuerpos IgG completos obtenidos en ratones BALB/c inmunizados con quimeras D8 y T2. Los grupos de sueros se analizaron en ELISA indirecto a una dilución 1/100 frente al péptido TSP12 (epítipo US9) y las quimeras diepitópicas D4, D7 y D8. Las barras horizontales representan la desviación estándar de la media. El anticuerpo monoclonal US9 también se usó como control para confirmar la disponibilidad del epítipo US9 en el péptido TSP12 unido a la placa (no mostrado).

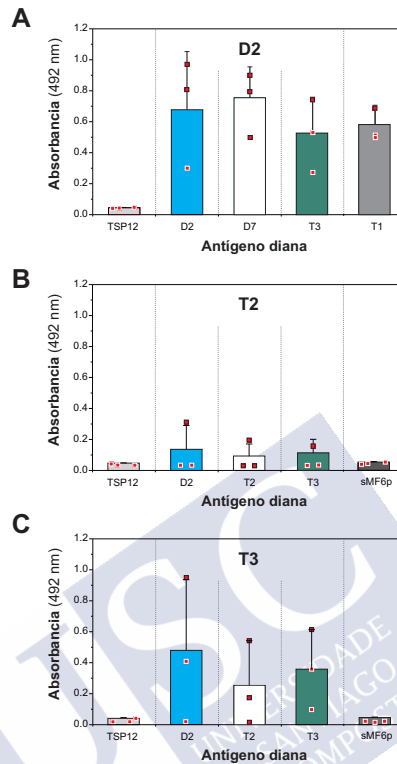


Figura 8. Respuestas de anticuerpos IgG totales obtenidos en ovejas (3 animales por grupo) inmunizadas con la quimera diepitópica D2 o con las quimeras triepitópicas T2 y T3 formuladas en Quil-A®. El suero de cada animal individual se probó diluido 1/100 en ELISA indirecto frente al péptido TSP12 (epítipo US9), las quimeras D2, D7, T1, T2 y T3, y la proteína sMF6p/FhHDM-1. A) oveja inmunizada con la quimera D2, B) oveja inmunizada con la quimera T2; C) Oveja inmunizada con la quimera T3. El valor medio de DO obtenido para cada oveja individual dentro de un grupo (n = 3) se representó mediante un pequeño cuadrado rojo en la figura. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media. El mAb US9 también se usó como control para confirmar la disponibilidad del epítipo US9 en el péptido TSP12 unido a la placa (no mostrado).

producían poco o ningún anticuerpo para la quimera T2 (Figura 8B), estos animales respondían bien a las quimeras D2 (respuesta más alta) y T3, aunque se observó una variabilidad relevante entre los animales dentro de cada grupo (representado en la Figura 8 con puntos rojos). Además, considerando la composición de epítipos de los antígenos quiméricos, es de destacar que la mayoría de los anticuerpos producidos en ovejas se dirigieron contra el epítipo CL2. Esto se dedujo del hecho de que hubo una ausencia de reconocimiento de los epítipos US9 (Figuras 8A-C) y MF6p2 (Figuras 8B-C), y que se obtuvieron valores de DO similares utilizando

como diana la quimera inmunizante (auto-reconocimiento) y quimeras diferentes del inmunógeno, pero que comparten el epítipo CL2 (reconocimiento cruzado).

Una vez investigada la respuesta a las quimeras T2 y T3 en ovejas, evaluamos la respuesta de anticuerpos del rodaballo frente a estos antígenos. Las respuestas de anticuerpos de estos peces a las quimeras T2 y T3 se muestran en la Figura 9. Se debe subrayar que, a diferencia de las ovejas, el rodaballo generó una alta respuesta de anticuerpos frente a los epítipos B presentes en la quimera T2 (epítipos CL2 y MF6p2) pero, inesperadamente, poca o ninguna respuesta a la quimera T3. El buen reconocimiento del epítipo MF6p2 por los anticuerpos inducidos por la quimera T2 se evidenció por la excelente reactividad de dichos anticuerpos empleando como diana los antígenos sMF6p/FhHDM-1 y sMF6a (Figura 9).

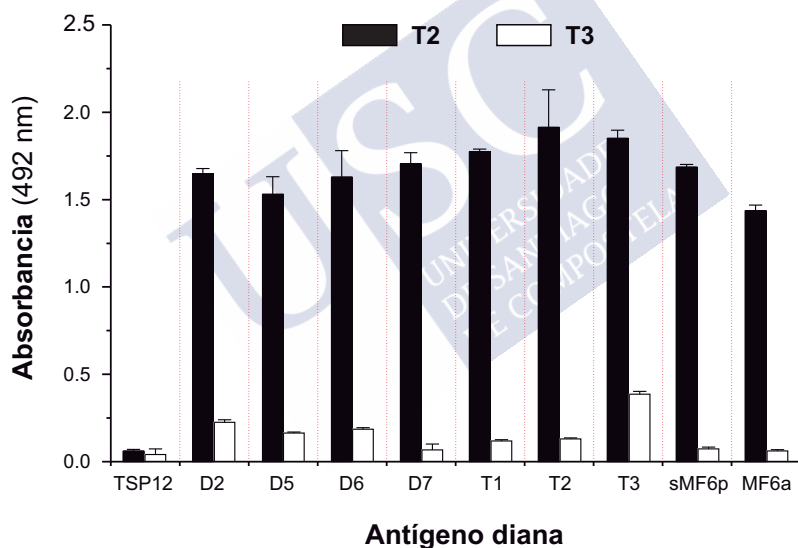


Figura 9. Análisis de la respuesta de anticuerpos IgM en rodaballos (20 animales por grupo) inmunizados con las quimeras triepitópicas T2 y T3 formulado en CFA (primera inmunización) y en IFA (segunda inmunización). Los sueros combinados de cada grupo ( $n = 20$ ) se probaron diluidos a 1/100 en ELISA indirecto frente a los péptidos TSP12 (epítipo US9), sMF6a, la proteína sMF6p, las quimeras diepitópicas D2, D5, D6 y D7, así como contra quimeras triepitópicas T1, T2 y T3. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media. El mAb US9 también se usó como control para confirmar la disponibilidad del epítipo US9 en el péptido TSP12 unido a la placa (no mostrado).

## La recaptura en placa como nueva estrategia para purificar antígenos recombinantes expresados en *E. coli* y evitar reacciones inespecíficas en ELISA.

El empleo de columnas cromatográficas IMAC es una estrategia ampliamente utilizada para la purificación de antígenos recombinantes que continenen la etiqueta 6xHis en un solo paso. Sin embargo, la contaminación con proteínas ricas en histidina, procedentes de los microorganismos transformados (principalmente, *E. coli*), puede generar problemas de inespecificidad cuando las mismas se usan en inmunodiagnóstico. Una posible estrategia para evitar dicho problema es injertar en la proteína de interés una segunda etiqueta consistente en un epítipo lineal reconocido por un anticuerpo monoclonal (mAb). Es mas, esta segunda etiqueta podría ser empleada para desarrollar métodos ELISA sándwich ya que permitiría recapturar el antígeno directamente en los pocillos de las placas ELISA en un solo paso. Para explorar esta metodología, y partiendo de la disponibilidad del anticuerpo monoclonal US9 que reconoce la secuencia lineal MTFSVPI (epitopo US9; ver artículo anterior y Anexo 2), en este nuevo estudio hemos investigado el potencial de esta secuencia en el diseño de nuevos métodos de inmunodiagnóstico. Para ello, y como prueba de concepto, hemos empleado como molécula diana una proteína recombinante de *Fasciola*, FhLAP, que se expresa en forma soluble en *E. coli*.

### *Clonación y expresión de la proteína quimérica rUS9-FhLAP*

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos correspondiente al marco de lectura de la proteína FhLAP clonada en este estudio (gb|MF945962) y la secuencia anotada por Acosta *et al.* (Resultados no publicados; gb|AAV59016.1) se muestra en la Fig. 1. También se muestra la región terminal amino extra (subrayada), que incluye la etiqueta 6xHis correspondiente (azul) y el epítipo US9 (rojo). Respecto a la secuencia del epítipo US9, la herramienta bioinformática ProtParam mostró que dicha secuencia es de naturaleza hidrófoba, con un índice alifático de 85 y un valor de GRAVY de 1,188 (altamente hidrófobo). Sin embargo, considerando la secuencia completa de aminoácidos insertada en la región amino terminal de rUS9-FhLAP, es decir, los primeros 20 residuos en la Fig. 1 (subrayado), el índice alifático disminuyó a 34.0 y el valor de GRAVY fue -0.735 (moderadamente hidrófilo). Además del residuo inicial M, también se introdujeron una R y dos dipéptidos (GS) que flanquean las etiquetas 6xHis y US9 en la proteína recombinante debido al procedimiento de clonación en el vector pQE30 escindido con las enzimas de restricción BamH I y Hind III.

```

MRGSHHHHHHGSMTFVSPISMAALAVGVSDLSDKRFDVVIFINDDADEGCAKDAAVYEALKSFSKINPNLGSLSIVPFF60
.....
AHPGRLIYSPTGALNTDADIRNVYDAACAGVKRALSMGCHAPLLYLGSLSRSASFGFEW120
.....
MQRKHLLLNALLGAYHALYLPLEVREMRPTTGLKAQHLGVKEDTKGSDELVLRRLAMALEE180
.....
GRWLARDIGGSDPERMAAPRIVDYLYLKTSLGGMKGITMSVERVDIQKYPLMAAVNRAASVV240
.....
ARHDGRVVHLKYEPPNPTEVDTTLYLIGKGITYDTGGADIKANGVMAGMHRDKCGAAATA300
.....
GLFKTLGELQPPGLSVSAALAFVRNSVGADSYVADEIILVARSGQRIRVGNTDAEGRMVMT360
.....
DLLREAKEKAINATNPFLFTIATLTGHVVRAVKHYTAVMDNGPARIHRVSQSLQEAGDRI420
. . . C . . . . . P . . . . .
SDMAEISTVRKEDYEFNRGKTEYEDILQCNNLPSSATPRGHQIPAAFMALASGLDKHGLG480

```

Fig 1. Alineación de gb | AAV59016 (parental) y gb | MF945962 (este estudio) de FhLAP recombinantes de *F. hepatica*. Se muestran las diferencias en las secuencias de aminoácidos entre ambas proteínas, así como la región amino terminal que contiene las dos etiquetas insertadas (6xHis, azul) y US9 (MTFVSPIS, rojo), y los residuos adicionales (incluidos dos dipéptidos GS) introducidos durante el procedimiento de clonación.

Comparando las secuencias de cDNA gb|MF945962 y gb|AAV59016, observamos que ambos tienen la misma extensión (1569 pb) una identidad muy alta (99,99%) con solo 8 cambios de nucleótidos (C<sup>31</sup>T, C<sup>78</sup>A, G<sup>93</sup>A, T<sup>1090</sup>C, C<sup>1210</sup>G, C<sup>1251</sup>T, C<sup>1337</sup>T, A<sup>1489</sup>G). Además, la traducción de la secuencia de nucleótidos gb|MF945962 reveló la existencia de solo 4 cambios de aminoácidos localizados en la región terminal carboxi (C<sup>364</sup>R, P<sup>404</sup>A, T<sup>446</sup>I y T<sup>497</sup>A) con respecto a la secuencia parental gb|AAV59016 (ver Figura 1).

Respecto a la expresión del antígeno rUS9-FhLAP, el análisis mediante WB que se muestra en la Fig. 2A reveló que la proteína se expresa correctamente en *E. coli*, apareciendo como una banda principal con un MW aparente de 60 kDa (MW teórico = 58.665,25 Da). Además, se pueden observar varias bandas de menor tamaño (carril 3), que probablemente corresponden a proteínas truncadas y/o contaminantes de *E. coli* copurificados durante el procedimiento IMAC. La presencia de rUS9-FhLAP truncados se pudo confirmar en WB, revelando las proteínas con el mAb US9 (carril 4) y un mAb que reconoce la etiqueta 6xHis (Fig. 2A, carril 5). Además, el excelente reconocimiento, tanto de la proteína completa como de la rUS9-FhLAP truncada, por el mAb US9 indicó que el posicionamiento del epítipo US9 entre la etiqueta 6xHis y la secuencia FhLAP es adecuado para el objetivo del estudio. Además, investigamos si la molécula rUS9-FhLAP también se reconoce correctamente en ELISA por un suero de una oveja infectada con *Fasciola*. Los datos en las Figs. 2B y 2C mostraron que el suero de oveja reaccionó con

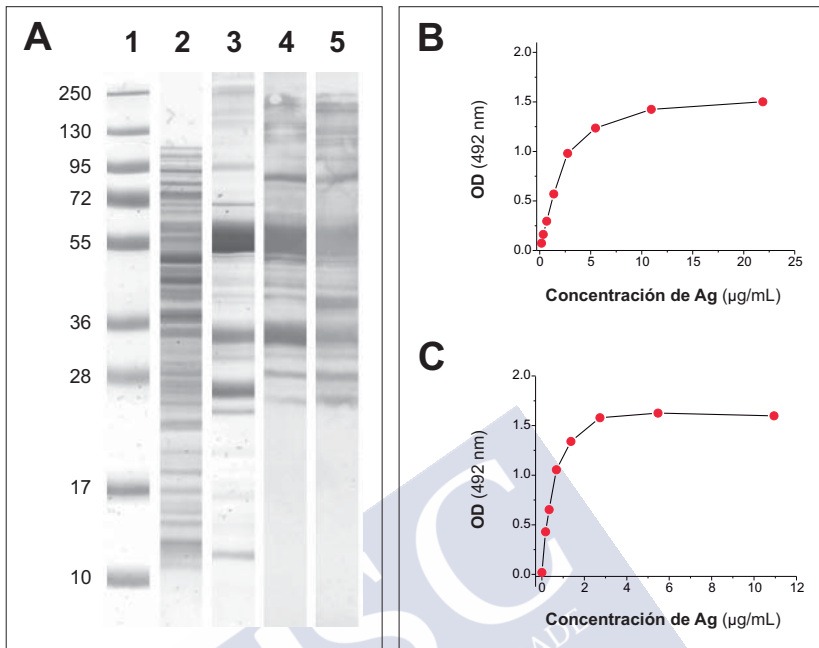


Fig. 2. Análisis de la expresión de la proteína recombinante quimérica rUS9-FhLAP en *E. coli* y optimización de su uso en ELISA. (A) Análisis SDS-PAGE y WB de la expresión rUS9-FhLAP. Carril 1: marcadores de peso molecular. Carril 2: tinción con azul de Coomassie de la fracción de proteína soluble obtenida después de la inducción con IPTG 0,5 mM. Carril 3: tinción con azul de Coomassie de rUS9-FhLAP después de la purificación por IMAC. Carril 4: análisis mediante WB de rUS9-FhLAP revelado con mAb US9 como anticuerpo primario. Carril 5: análisis mediante WB de rUS9-FhLAP revelado con anti-polihistidina conjugada con HRP. (B) Valores de DO obtenidos en ELISA probando diferentes concentraciones de rUS9-FhLAP (rango: 0.7-22 µg/mL) como antígeno diana en ELISA de captura con mAb US9. (C) Valores de DO en ELISA obtenidos probando diferentes concentraciones de rUS9-FhLAP (rango: 0,3-11 µg/ml) como antígeno diana en ELISA indirecto. El análisis se llevó a cabo con el suero de una oveja infectada con *Fasciola* como anticuerpo primario.

el antígeno recombinante de una manera dependiente de la dosis y que la señal de ELISA alcanzó una meseta en concentraciones de antígeno superiores a 10 µg/mL para US9-ELISA y más de 3 µg/mL para ELISA indirecto.

### *Reconocimiento de rUS9-FhLAP por sueros de rumiantes infectados y no infectados*

Como se indicó anteriormente, una purificación por afinidad de un solo paso de antígenos recombinantes solubles producidos en *E. coli* por IMAC puede implicar la presencia de cantidades variables de proteínas contaminantes del hospedador

que pueden tener consecuencias negativas en la especificidad de los ELISA indirectos. Para investigar si este inconveniente se puede evitar mediante la recaptura en placa del antígeno rUS9-FhLAP por el mAb US9, comparamos el reconocimiento de dicho antígeno en el ELISA indirecto de US9 y capturamos sueros de no infectados o naturalmente infectados por *F. hepatica* ovinos y bovinos. Cada suero se analizó simultáneamente en ELISA indirecto utilizando rUS9-FhLAP acoplado a los pocillos de las placas ELISA, y en dos ELISA de captura, US9-ELISA y MM3-ELISA (método de referencia). Además, dado que el estudio se diseñó para investigar el efecto de las proteínas contaminantes presentes en las preparaciones de antígenos que afectan la especificidad de los ensayos, dos valores de corte (corte 1 y corte 2; ver la sección Materiales y Métodos) que garantizaran el máximo de especificidad.

Teniendo en cuenta los sueros de ovejas (Fig. 3) y el punto de corte 1, 17/18 (94,4%) de muestras positivas verdaderas se obtuvieron mediante ELISA indirecto, mientras que el 100% de las muestras de ovejas infectadas dieron positivo usando el valor de punto de corte 2, menos restrictivo, es decir, calculada por análisis ROC. Los mismos porcentajes también se obtuvieron al analizar los sueros por US9-ELISA, pero el suero que generó un falso resultado negativo empleando el punto de corte 1 en ELISA indirecto y en US9-ELISA no fue el mismo.

Aunque la mayoría de los sueros de ovejas se clasificaron correctamente utilizando ELISA indirecto o US9-ELISA captura, si consideramos las diferencias obtenidas entre los valores de DO para cada uno de los sueros positivos y los valores de corte correspondientes, los mejores resultados se obtuvieron, como se esperaba, con el método MM3-ELISA, seguido del US9-ELISA. También debe tenerse en cuenta que para ambos puntos de corte tales diferencias fueron mayores que 0.9 para nuestro método de referencia (MM3-ELISA), mientras que solo 4/18 (22.2%) de los sueros alcanzaron estos valores con los otros dos métodos ELISA. Estos datos sugieren fuertemente que FhLAP es reconocida durante la infección de ovejas por *F. hepatica* pero que esta proteasa provoca un estímulo antigénico menor que las L-catepsinas, probablemente debido a dos hechos: i) a diferencia de FhLAP (citoplasmática), las CL de *Fasciola* son las proteínas secretadas más abundantes y, por lo tanto, permanecen en contacto permanente con las células inmunes del hospedador, y ii) durante su ciclo biológico, *Fasciola* produce diferentes CL (Norbury et al., 2011), pero que tienen un alto porcentaje de identidad de secuencia, por lo que pueden estimular recíprocamente la producción de anticuerpos.

En cuanto a las ovejas, todos los sueros de bovinos infectados y no infectados se clasificaron correctamente utilizando el MM3-ELISA, independientemente de los dos valores de corte investigados (Fig. 4). Sin embargo, los datos en la Fig.

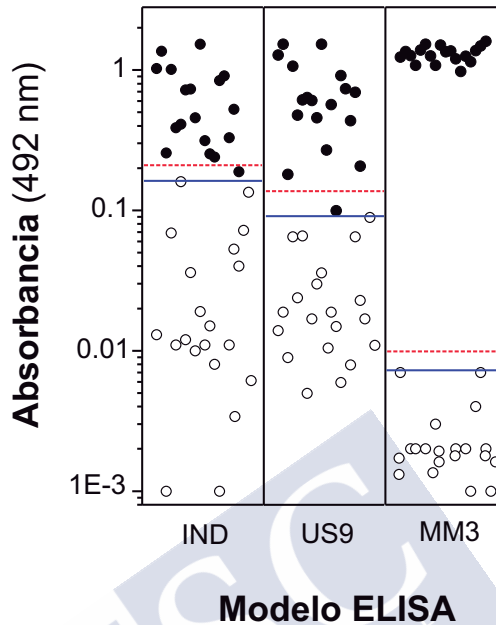


Fig. 3. Valores de DO en ELISA obtenidos ensayando sueros de ovejas libres de *Fasciola* (círculos abiertos) e infectadas con *Fasciola* (círculos cerrados). Cada punto en la Figura representa el valor medio de DO (dos réplicas) obtenido para cada muestra de suero individual. IND = sueros probados en ELISA indirecto con antígeno rUS9-FhLAP como diana. US9 = sueros probados en ELISA captura con mAb US9 acoplado a las placas ELISA y rUS9-FhLAP como antígeno diana. MM3 = sueros probados en ELISA de captura con mAb MM3 (MM3-ELISA; prueba de referencia). Las líneas horizontales representan los valores de corte (línea discontinua roja: punto de corte 1; línea azul: punto de corte 2). Los respectivos valores de corte 1 y corte 2 para cada ELISA fueron los siguientes: DO = 0,205 y 0,16 (IND); DO = 0,114 y 0,089 (US9); DO = 0,009 y 0,007 (MM3).

4 también revelaron que los antígenos presentes en la preparación de rUS9-FhLAP son reconocidos por un gran número de sueros de vacas no infectadas en ELISA indirecto. En este sentido, observamos que 33/49 (67,3%) de los sueros de bovinos no infectados produjeron valores de DO  $\geq 0.2$  (rango DO = 0.069-0.963) después de restar el valor de unión no específico correspondiente a los pocillos control sin suero (DO = 0.06). Como era de esperar, la alta reactividad de estos sueros limitó el número de vacas infectadas que dieron positivo en ELISA indirecto, ya que solo 10/36 (27,8%) y 13/36 (36,1%) muestras se clasificaron como positivas usando los puntos de corte 1 y 2, respectivamente.

A diferencia del ELISA indirecto, la captura del antígeno rUS9-FhLAP por el mAb US9 redujo drásticamente los valores de DO obtenidos con sueros de vacas no infectadas. Como se puede observar en la Fig. 4, de manera similar al MM3-

ELISA, el US9-ELISA proporcionó valores de DO por debajo de 0,1 (rango 0.0-0.084). Sin embargo, los resultados en la Fig. 4 también demostraron que, a diferencia de las L-catepsinas, solo una parte de las vacas infectadas produjo anticuerpos específicos contra FhLAP. Específicamente, 18/36 (50%) y 20/36 (55,5%) de sueros de vacas infectadas dieron positivo por US9-FhLAP-ELISA usando punto de corte 1 y 2, respectivamente. No obstante, estos resultados fueron mejores que los obtenidos por ELISA indirecto (ver arriba).

Si bien el ELISA indirecto y los inmunoensayos US9-ELISA de captura utilizan el mismo antígeno rFhLAP, dado que son de diseño diferente, surge una duda con respecto a la concordancia entre la clasificación de los sueros positivos y negativos por ambos métodos. Para aclarar este aspecto, realizamos un análisis de

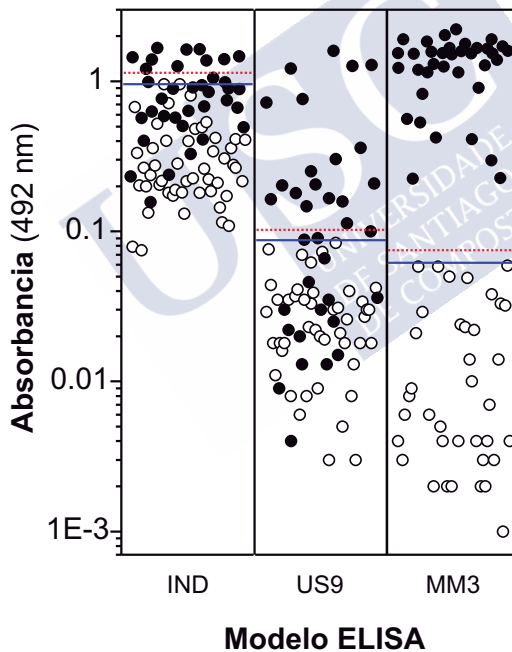


Fig. 4. Valores de DO en ELISA obtenidos ensayando sueros de vacas libres de *Fasciola* (círculos abiertos) e infectadas con *Fasciola* (círculos cerrados). Cada punto en la Figura representa el valor medio de DO (dos réplicas) obtenido para cada muestra de suero individual. IND = sueros probados en ELISA indirecto con antígeno rUS9-FhLAP como diana. US9 = sueros probados en ELISA captura con mAb US9 acoplado a las placas ELISA y rUS9-FhLAP como antígeno diana. MM3 = sueros probados en ELISA de captura con mAb MM3 (MM3-ELISA; prueba de referencia). Las líneas horizontales representan los valores de corte (línea discontinua roja: punto de corte 1; línea azul: punto de corte 2). Los respectivos valores de corte 1 y corte 2 para cada ELISA fueron los siguientes: OD = 1,174 y 0,963 (IND); OD = 0,111 y 0,084 (US9); OD = 0,075 y 0,059 (MM3).

regresión lineal entre los valores de DO obtenidos para las vacas no infectadas o infectadas con *Fasciola* por ambos métodos. Los resultados en la Fig. 5 mostraron que los valores de DO obtenidos para los sueros procedentes de vacas no infectadas (Fig. 5A) e infectadas (Fig. 5B) presentaron una correlación muy significativa entre ambos métodos ( $P < 0,001$ ). Sin embargo, como indican los valores de  $R^2$  relativamente bajos obtenidos (0,20 y 0,48 para sueros de vacas no infectadas e infectadas, respectivamente), particularmente para los sueros de vacas no infectadas, una cantidad considerable de sueros produjeron valores de DO discordantes cuando se compararon ambos métodos ELISA.

En nuestro US9-ELISA, el epítipo MTFSPVIS está bloqueado por el paratopo del mAb US9, evitando así su reconocimiento por sueros de animales infectados o no infectados. Sin embargo, dado que este epítipo está disponible de forma

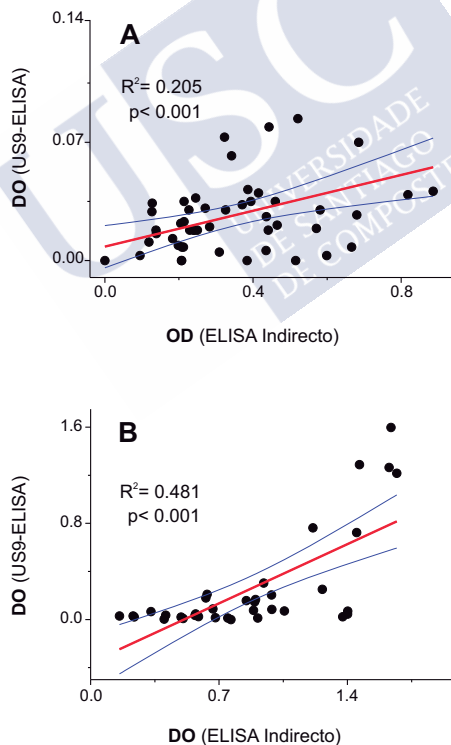


Fig. 5. Análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados obtenidos comparando los valores de DO de sueros de ganado no infectados (A) e infectados con *Fasciola* (B) obtenidos en ELISA indirecto y US9-ELISA. Cada punto representa los valores de DO pareados obtenidos para cada suero por ambos métodos. Las líneas azules representan los niveles de confianza superior e inferior del 95%.

libre cuando el antígeno rUS9-FhLAP se usa en ELISA indirecto, hipotéticamente podría ser reconocido por anticuerpos de reactividad cruzada presentes en sueros de animales infectados o no infectados. Para descartar esta posibilidad, en paralelo con el ELISA indirecto realizado con el antígeno rUS9-FhLAP (ver arriba), realizamos un ELISA de inhibición utilizando el péptido sintético MTFSPIS. Como se esperaba, la incubación de sueros de ganado vacuno con el péptido no modificó la reactividad de los sueros de ganado no infectados (Fig. 6A) e infectados (Fig. 6B), como se dedujo de los excelentes coeficientes de correlación entre los valores de DO de inhibidores no inhibidos e inhibidos. sueros ( $R^2 = 0.965$  y  $R^2 = 0.917$  para sueros de ganado no infectados e infectados, respectivamente).

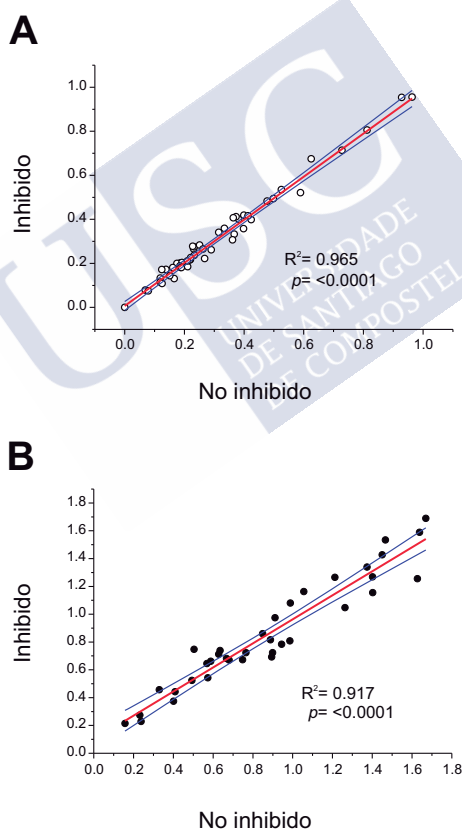


Fig. 6. Análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados que compara sueros no inhibidos e inhibidos (péptido MTFSPIS) de bovinos no infectados (A) o sueros de bovinos (B) infectados naturalmente con *F. hepatica*. Cada punto representa los valores de DO pareados obtenidos para cada suero en ELISA indirecto usando rUS9-FhLAP como antígeno diana. Las líneas azules representan los niveles de confianza superior e inferior del 95%.

En un intento por identificar la(s) diana(s) probable(s) de reactividad cruzada mostrado por sueros de vacas no infectadas, primero investigamos si esto podría deberse a proteínas solubles de *E. coli* M15 que podrían unirse a la columna cromatográfica y coeluir durante la purificación IMAC del antígeno rUS9-FhLAP. Con este fin, los perfiles de proteínas de las proteínas *E. coli* M15 solubles, antes y después de la purificación con IMAC, se separaron en un gel de SDS-PAGE y posteriormente fueron teñidas con BlueSafe (Fig. 7A). Después, la fracción de proteína eluida se usó como antígeno diana en ELISA indirecto para investigar si era reconocida por sueros de vacas no infectadas (Fig. 7B). Los resultados en la Fig. 7 mostraron claramente que: i) un amplio rango de proteínas solubles con MW variable (10-200 kDa) procedentes de *E. coli* M15 no transformado se unieron a la columna IMAC (Fig. 7A), ii) estas proteínas fueron reconocidas directamente en ELISA indirecto por sueros de vacas no infectadas (DO promedio =  $0,17 \pm 0,08$  SD; rango de DO: 0,07-0,47), y iii) la reactividad observada en ELISA indirecto

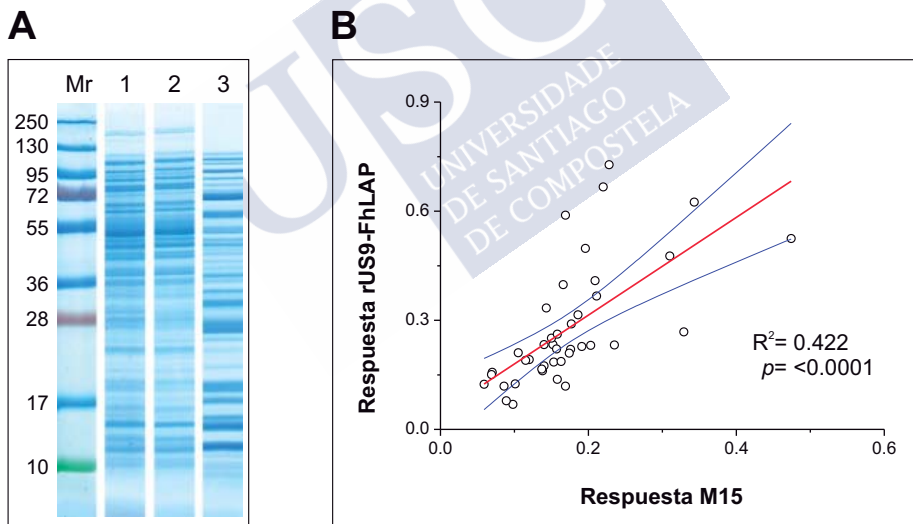


Fig 7. Análisis de las proteínas solubles de *E. coli* que se unen a las columnas de afinidad IMAC. (A) Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas solubles de *E. coli* M15 presentes en la muestra de inicio (carril 1), en la fracción no retenida (carril 2) y en la fracción eluida (carril 3, concentrada). La movilidad relativa de los estándares de MW se muestra a la izquierda. (B) Análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados comparando los valores de DO obtenidos en ELISA indirecto para sueros de vacas no infectadas ( $n = 35$ ) usando como diana proteínas purificadas por IMAC de bacterias *E. coli* M15 no transformadas (Respuesta M15; eje X) o transformadas (Respuesta rUS9-FhLAP; eje Y). Cada punto representa los valores de DO pareados obtenidos para cada suero en los ELISA indirectos. Las líneas azules representan los niveles de confianza del 95% superior e inferior.

testando los sueros de vacas no infectadas ( $n = 35$ ) se correlacionó significativamente ( $R^2 = 0,42$ ;  $p < 0,0001$ ) con la obtenida utilizando rUS9-FhLAP purificado con IMAC (Fig. 7B). Estos datos, junto con el hecho de que la fracción de proteína M15 purificada por IMAC fue capaz de inhibir el 50-70% de la reactividad de los sueros seleccionados procedentes de las vacas no infectados en un ELISA indirecto con rUS9-FhLAP (no mostrado), indica claramente que las proteínas nativas de *E. coli* se unen y coeluyen con proteínas recombinantes durante la purificación de IMAC y, por lo tanto, constituyen una fuente relevante de unión no específica para los anticuerpos naturales presentes en el suero de estos animales. Además, dado que no se observó tal reactividad al probar los mismos sueros en WB (no mostrado), se deduce que la diana de los anticuerpos del ganado vacuno son principalmente epítomos conformacionales.

Otra posible diana para los anticuerpos naturales circulantes capaces de generar reacciones cruzadas en el ganado bovino es el LPS (van Altena *et al.*, 2016). Para investigar si una posible contaminación por LPS procedente de las células M15 podría contaminar el antígeno de rUS9-FhLAP y ser la diana de anticuerpos séricos presentes en el ganado bovino no infectado, se verificó la presencia de

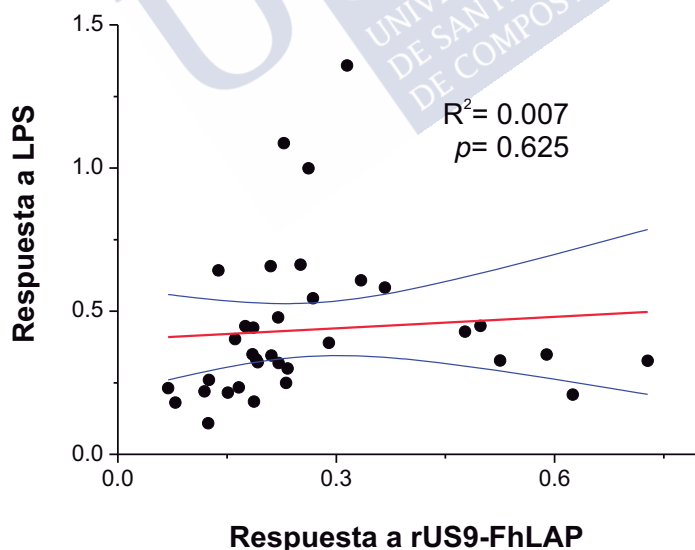
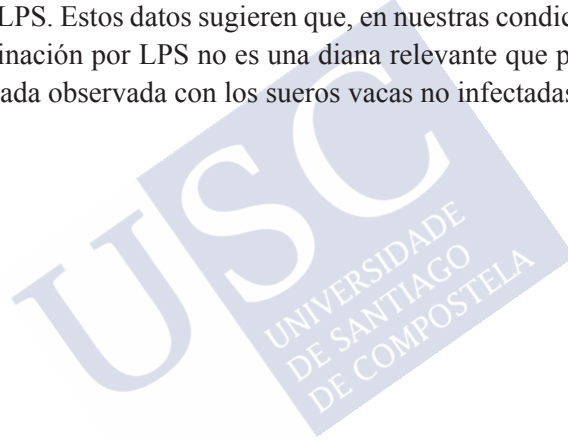


Fig 8. Análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados entre valores de OD obtenidos en sueros de prueba ELISA indirectos de ganado no infectado en respuesta a rUS9-FhLAP (respuesta rUS9-FhLAP; eje X) y LPS de *E. coli* serotipo O55: B5 (LPS respuesta; eje Y). Cada punto representa los valores de DO pareados obtenidos para cada suero. Las líneas azules representan los niveles de confianza superior e inferior del 95%

lípidos A en los pocillos de las placas ELISA utilizando anticuerpos policlonales anti-lípidos A. Además, investigamos una posible correlación entre los valores de DO obtenidos con sueros de ganado no infectado frente a rUS9-FhLAP y frente a LPS *E. coli* O55:B5, ambos en ELISA indirecto. Cuando se trata de la presencia del lípido A, los anticuerpos policlonales anti-lípidos A produjeron valores bajos de DO en los pocillos de las placas ELISA recubiertas con rUS9-FhLAP (DO = 0,12) y ninguna señal en los pocillos recubiertos con mAb US9 más rUS9-FhLAP. Además, los resultados en la Fig. 8 claramente indicaron que muchos de los sueros de vacas no infectadas presentaron niveles moderados/altos de anticuerpos contra el LPS O55:B5 de *E. coli*, pero no se observó una correlación significativa ( $p = 0,62$ ) comparando los valores de DO obtenidos in ELISA indirecto para los antígenos rUS9-FhLAP y LPS. Estos datos sugieren que, en nuestras condiciones experimentales, la contaminación por LPS no es una diana relevante que pudiera explicar la reactividad cruzada observada con los sueros vacas no infectadas por *F. hepatica*.





## **Discusión**



## DISCUSIÓN

Los helmintos parásitos constituyen un amplio grupo de organismos de gran éxito, capaces de desarrollar numerosas estrategias evolutivas, que les permiten sobrevivir en los hospedadores que parasitan. De hecho, resulta sorprendente que, a pesar de que en general poseen un gran tamaño y de que migran a través de los tejidos del hospedador, las infecciones por helmintos suelen generar respuestas inflamatorias de poca intensidad. Entre los mecanismos de defensa de los helmintos y otros parásitos, hoy se presta mucha atención al potencial inmunomodulador de los productos secretados por los mismos, ya sean solubles o en forma de vesículas extracelulares (ej. exosomas). Aunque la información es todavía limitada, se sabe que tales productos de secreción son capaces de interactuar con células del sistema inmune innato que expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) entre los que se incluyen receptores tipo *toll*, receptores de lectina tipo C y el inflammasoma (Zakeri *et al.*, 2018). Esta capacidad inmunomoduladora, unida a la complejidad antigénica y a la complejidad de su ciclo biológico, con múltiples estadios (Mutapi *et al.*, 2013), explican en parte que no se hayan logrado generar vacunas efectivas frente a los mismos hasta la fecha (Molina-Hernández *et al.*, 2015).

En relación con la fasciolosis, en las últimas décadas se ha realizado numerosos trabajos orientados a conocer y a analizar el potencial vacunal de muchos antígenos de *Fasciola*, ya fuese en su forma nativa o recombinante, lo que ha permitido alcanzar niveles de protección significativos en diversos ensayos con rumiantes (Molina-Hernández *et al.*, 2015). Sin embargo, como se desprende de la revisión bibliográfica que presentamos en la Tabla 1 (ver páginas 38-39 de esta memoria), los resultados obtenidos muestran un alto grado de variabilidad, incluso comparando datos obtenidos por un mismo grupo de investigación, lo que hace que haya que replantearse algunas de las estrategias de vacunación empleadas en anteriores estudios. Aunque las causas de la variabilidad no han sido estudiadas en detalle, Molina-Hernández *et al.* (2015) sugieren que podrían ser atribuidas a diferencias en los calendarios de vacunación, las formulaciones empleadas, el número y/o factores intrínsecos de los animales utilizados tales como edad y raza, además de los regímenes de infección y/o dosis infectante. Además, tampoco existe consenso sobre los posibles candidatos y/o la combinación más adecuada de éstos para ser empleados en los ensayos de protección vacunal (Toet *et al.*, 2014). Todos estos problemas, junto con una escasa caracterización del funcionamiento de la respuesta inmune frente a *F. hepatica* (Hewitson y Maizels, 2014) y el pobre

conocimiento del funcionamiento de determinados adyuvantes en muchos de los hospedadores utilizados (Beesley *et al.*, 2018) hace que la posibilidad de obtener una vacuna funcional frente a *F. hepatica* en rumiantes sea una meta todavía lejana.

Al contrario de lo que ocurre con las vacunas, los métodos de diagnóstico de la fasciolosis humana y de los animales de interés en ganadería han experimentado importantes avances en los últimos años con la introducción de métodos de inmunodiagnóstico fiables (principalmente, ELISA). Tales procedimientos permiten la detección de anticuerpos en el suero y/o la cuantificación de antígenos secretados por el parásito en muestras de heces procedentes de animales infectados en un periodo inferior a 2 horas. En este sentido, cabe destacar que el desarrollo y comercialización de test serológicos y coprológicos basados en el anticuerpo monoclonal MM3 (Mezo *et al.*, 2004; Mezo *et al.*, 2007; Muiño *et al.*, 2011; Martínez-Sernández *et al.*, 2016) permiten detectar la presencia de infecciones en rumiantes infectados por un solo parásito. Sin embargo, aun siendo altamente fiables y estando disponibles comercialmente, estos test presentan una cierta limitación debida a la necesidad de disponer de antígeno nativo del parásito, ya sea para la versión serológica (antígeno diana) como para ser empleado como control positivo en el test coprológico. Una alternativa para evitar la dependencia de obtener parásitos vivos en mataderos, y su posterior cultivo para obtener antígenos de secreción, es el empleo de antígenos recombinantes. Sin embargo, los problemas que pueden surgir durante el repliegamiento de las moléculas recombinantes y la frecuente contaminación con proteínas de *E. coli* que pueden ser reconocidas por anticuerpos presentes en el suero de animales no infectados generando falsos resultados positivos (Martínez-Sernández *et al.*, 2018), hace que se deba seguir investigando en este campo.

Con el fin de abordar la problemática arriba indicada, en esta sección se discuten los resultados obtenidos en tres publicaciones que cubren aspectos relacionados con el uso del adyuvante Quil-A® en ovejas (Capítulo 1), la construcción de antígenos quimera basados en secuencias de helmintos y el análisis de su reconocimiento en ratón y otras especies (oveja y rodaballo; Capítulo 2), así como el diseño de antígenos quimera que portan un epítipo reconocido por un anticuerpo monoclonal para mejorar la especificidad de antígenos recombinantes en sistemas ELISA evitando la presencia de antígenos contaminantes de *E. coli* (Capítulo 3).

## Estudio de diversas formulaciones vacunales en Quil-A® sobre la infección por *F. hepatica* en ovejas.

Las vacunas son armas terapéuticas efectivas y relativamente baratas que se utilizan fundamentalmente para la prevención de enfermedades infecciosas. Sin

embargo, para que sean eficaces suele ser habitual que las mismas se formulen incluyendo una sustancia adyuvante con el fin de potenciar o de modular la respuesta frente a los antígenos que la componen. El empleo de adyuvantes se hace incluso más necesario cuando se trata de vacunas compuestas de subunidades, las cuales presentan la ventaja de ser más seguras, pero menos antigénicas (Reed *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2016). Habitualmente, los adyuvantes son capaces de activar al sistema inmunitario actuando como ligandos para los PRR que expresan algunas de las células que participan en la respuesta inmunitaria innata (Coffman *et al.*, 2010). Sin embargo, estas sustancias también son capaces de estimular al sistema inmunológico adaptativo ya sea reforzando la respuesta de las células T, la respuesta humoral, o ambas (Bastola *et al.*, 2017).

Respecto a su modo de acción, se postula que los adyuvantes pueden ejercer su acción mediante varios mecanismos entre los que se incluyen: la formación de depósitos de antígeno, el reclutamiento de células que participan en la respuesta inmunológica, el reforzamiento de la presentación antigénica por las moléculas del MHC, la activación del inflammasoma, y/o ejerciendo una actividad inmunomoduladora conducente a la modificación del perfil de citocinas secretadas (Azmi *et al.*, 2014; Bastola *et al.*, 2017). Por otra parte, los adyuvantes también pueden ejercer actividades inmunológicas independientes del antígeno (Knudsen *et al.*, 2016).

Además de la selección adecuada de los adyuvantes, para el desarrollo de vacunas se requiere del conocimiento de aspectos clave del sistema inmune del hospedador definitivo y de su interacción con el agente patógeno (Germain, 2010). También se requiere de evidencias de que el hospedador definitivo tenga la capacidad de establecer una respuesta inmune natural protectora, que pueda ser promovida a través de la vacunación (Pulendran y Ahmed, 2011). En este sentido, en los últimos años ha habido un rápido desarrollo en el campo de la Inmunología, permitiendo una mayor comprensión de las interacciones celulares y de las funciones de las citoquinas, enfocados especialmente en los modelos de infección murinos. No obstante, estudios similares en grandes animales se han visto obstaculizados por diversas causas, incluyendo la falta de reactivos, tecnologías y/o sus altos costos (Newton y Meeusen, 2003). El desarrollo de vacunas frente a la fasciolosis no es una excepción ya que los conocimientos que tenemos de la infección y de los efectos inmunomoduladores de sus moléculas proceden en gran parte de modelos murinos, que han demostrado no ajustarse a las respuestas en rumiantes (Newton y Meeusen, 2003).

Teniendo en cuenta lo anterior, en el primer artículo que se adjunta con esta memoria (Capítulo 1) hemos investigado el potencial vacunal de la molécula MF6p/FhHDM-1 de *F. hepatica*, una proteína de unión a hemo (Martínez-Sernán-

dez *et al.*, 2014), que adicionalmente presenta propiedades inmunomoduladoras (Thivierge *et al.*, 2013), lo que le confiere interés como una diana prometidora para la vacunación. En particular, en este trabajo hemos investigado los efectos del adyuvante Quil-A<sup>®</sup> en la respuesta inmune de las ovejas frente a la MF6p/FhHDM-1 y el potencial como vacuna de las formas nativa y sintética de esta proteína frente a la fasciolosis ovina.

### *Actividad del adyuvante Quil-A<sup>®</sup> sobre el repertorio de epítomos B reconocidos por ovejas inmunizadas con el antígeno MF6p/FhHDM-1*

Uno de los hallazgos destacados de este estudio tiene que ver con la actividad inmunomoduladora que ejerce el adyuvante Quil-A<sup>®</sup> sobre la respuesta de anticuerpos de ovejas frente al antígeno MF6p/FhHDM-1 de *F. hepatica*. En nuestro trabajo pudimos observar que, al contrario de lo que ocurre con la administración de Al(OH)<sub>3</sub>, la sola administración de Quil-A<sup>®</sup> fue capaz de incrementar la intensidad de la respuesta de anticuerpos frente al antígeno nativo MF6p/FhHDM-1 (nMF6p/FhHDM-1) liberado durante la infección, así como de ampliar el repertorio de anticuerpos generado contra esta proteína. Para entender este efecto, es necesario tener en cuenta las características de este adyuvante.

Quil-A<sup>®</sup> es uno de los adyuvantes más potentes y de mayor uso en medicina veterinaria (Zhu y Tuo, 2016). Es un extracto del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* Molina que contiene varias fracciones de saponinas solubles (Oda *et al.*, 2000), posee actividad mitogénica, estimulando la proliferación de células T (revisado en: Cox y Coulter, 1992; Rajput *et al.*, 2007), y es capaz de promover las respuestas celulares de tipo Th1, lo que se cree que puede favorecer la protección de rumiantes frente a la infección por *F. hepatica* (Mulcahy *et al.*, 1999b; Moreau y Chauvin, 2010; Vukman *et al.*, 2013b). Además de estas características, el Quil-A<sup>®</sup> también ha demostrado ejercer una actividad adyuvante en ratones aún cuando el antígeno ha sido inyectado por separado (Flebbe y Braley-Mullen, 1986). Este efecto no es exclusivo del Quil-A<sup>®</sup>, ya que también se ha reportado en ratones al ser inoculados con un adyuvante de aceite en agua que contiene Marcol 52, adyuvante utilizado frecuentemente en la protección de lechones frente a la diarrea post-destete sin necesidad de antígeno alguno (van Der Heijden *et al.*, 1986). Por lo tanto, si este efecto pudiese manifestarse también en otras especies de mamíferos, se podría explicar por qué la inyección de Quil-A<sup>®</sup> favorece una mayor respuesta de anticuerpos frente a los antígenos de *Fasciola* durante la infección, en comparación con la administración de Al(OH)<sub>3</sub> (un adyuvante potenciador de la respuesta inmune Th2, sin actividad mitogénica), o con animales que solo fueron infectados

(Reed *et al.*, 2013). Sin embargo, el hecho de que la administración de Quil-A<sup>®</sup> sin antígeno pudiese ampliar el repertorio de anticuerpos contra el antígeno nMF6p/FhHDM-1 liberado durante una infección posterior es un hallazgo novedoso e insospechado. Aunque no tenemos una explicación definitiva para este fenómeno, suponemos que puede estar relacionado con dos características del Quil-A<sup>®</sup>: i) la actividad mitogénica reportada para este adyuvante (Corbel y Melchers, 1984; Chavali *et al.*, 1987), que permitiría la expansión del conjunto total de linfocitos y el aumento del número absoluto de linfocitos vírgenes portadores de receptores específicos para el antígeno nMF6p/FhHDM-1, y ii) su naturaleza acuosa, que permitiría la diseminación del adyuvante más allá de los ganglios linfáticos de drenaje local (Flebbe y Braley-Mullen, 1986). De este modo, el Quil-A<sup>®</sup> podría generar un estímulo policlonal capaz de expandir los clones de células T (locales y distantes) portadores de un TCR con afinidad para algunos epítopos poco reactivos del antígeno nMF6p/FhHDM-1, reduciendo el umbral de señal requerido para la activación de células T. Posteriormente, las células T foliculares previamente estimuladas (Qi, 2016) podrían reconocer con su TCR los péptidos antigénicos presentados por las APC que procesaron el antígeno nativo durante la subsiguiente infección por *F. hepatica*, potenciándose así la producción de anticuerpos por células B específicas. Estas observaciones resaltan la importancia de hacer una selección adecuada del adyuvante a emplear en las formulaciones vacunales en función de la enfermedad y de la especie animal a la que será dirigida la vacuna.

### *Evaluación de diversos antígenos de F. hepatica formulados en Quil-A<sup>®</sup> sobre la biología del parásito*

En nuestro trabajo hemos estudiado el funcionamiento de vacunas que contenían el antígeno MF6p/FhHDM-1 en sus variantes sintética (sMF6p/FhHDM-1) y nativa (nMF6p/FhHDM-1) formuladas en Quil-A<sup>®</sup> en ovinos, pero también otras que emplearon una procatepsina L1 recombinante (rFhpCL1).

Después de la vacunación con cualquiera de las formulaciones de MF6p/FhHDM-1 se detectó una alteración significativa en el crecimiento de las fasciolas, observándose además una disminución de la secreción de antígenos por parte de las mismas. También encontramos que la formulación con el antígeno sintético provocó una respuesta inmune específica capaz de retrasar en 2-4 semanas la producción de anticuerpos generados por una infección posterior, hallazgo que además de sorprendente, no fue observado en las ovejas inmunizadas con el antígeno nMF6p/FhHDM-1, la rFhpCL1, o en el grupo de ovejas que solo recibieron Quil A<sup>®</sup>. Este retraso no puede atribuirse a la incapacidad del hospedador para ge-

nerar una respuesta adecuada de anticuerpos, dados los altos niveles de IgG específicos producidos después de la inmunización con el sMF6p/FhHDM-1. Además, los niveles de anticuerpos contra los productos ES de *F. hepatica* fueron similares en todos los grupos a partir de las 8 semanas post-infección. Estas observaciones sugieren que los anticuerpos circulantes primarios inducidos por la inmunización con sMF6p/FhHDM-1 en Quil-A<sup>®</sup>, o cualquier otro mecanismo efector inmunológico desconocido, tienen efectos negativos sobre el crecimiento de las fasciolas.

Dado que el adyuvante Quil-A<sup>®</sup> promueve la inducción de respuestas Th1 (Hacariz *et al.*, 2009), una hipótesis alternativa para explicar el retraso en la producción de anticuerpos podría ser una polarización de la respuesta inmunológica hacia el fenotipo Th1 tras la inmunización con sMF6p/FhHDM-1 en Quil-A<sup>®</sup>. Nuestros datos mostraron que sMF6p/FhHDM-1 tiende a producir un pico más pronunciado de IgG2 alrededor de la semana 2 que la proteína nativa, junto con altos niveles *in vitro* de IFN- $\gamma$  en respuesta al antígeno a la estimulación con la lectina Con A. Sin embargo, debido a la alta variabilidad en las respuestas obtenidas en ovejas, no pudimos demostrar ninguna asociación significativa entre los eventos asociados a Th1 (producción de anticuerpos IgG2 e IFN- $\gamma$ ) y el efecto retardante observado en la producción de anticuerpos a los productos ES en los animales vacunados con sMF6p/FhHDM-1 formulado en Quil-A<sup>®</sup>.

Entre los candidatos vacunales más empleados hasta el momento por otros autores se encuentran las CL, principales constituyentes de los productos ES de *Fasciola* (Jefferies *et al.*, 2001; Morphew *et al.*, 2007). Estas proteasas constituyen la diana de la mayoría de anticuerpos producidos por hospedadores definitivos durante las infecciones por *Fasciola* (Valero *et al.*, 2009; Martínez-Sernández *et al.*, 2011; Mokhtarian *et al.*, 2016). Sin embargo, actualmente sabemos que las CL liberadas por las fasciolas adultas durante la infección (clados L1, L2 y L5) generan altos niveles de anticuerpos que pueden ser indicativos hasta cierto punto de la gravedad de la infección (Mezo *et al.*, 2010a), pero no de un efecto protector, ya que estas enzimas se liberan y ejercen primero su acción en la luz intestinal de los parásitos, un lugar al que los anticuerpos funcionales no pueden acceder. No obstante, un estudio de Mulcahy *et al.* (1998) reportó una correlación negativa entre los niveles de anticuerpos IgG2 inducidos por la vacunación de terneros con una combinación de CL2 nativa de *F. hepatica* y una “falsa” hemoglobina (ahora identificada como la proteína MF6p/FhHDM-1; Martínez-Sernández *et al.*, 2014) y la carga parasitaria después de la infección. Dado que en nuestro estudio las determinaciones mediante ELISA se realizaron utilizando los productos ES de *F. hepatica* como antígenos diana, no fue posible distinguir si los anticuerpos IgG2 detectados se dirigen a CL2, nMF6p/FhHDM-1, u otros antígenos presentes en la fracción de

productos ES. Por ese motivo, serán necesarios estudios adicionales para analizar si la inducción de anticuerpos IgG2 anti-MF6p/FhHDM-1 resulta ventajosa en términos de protección frente a los anticuerpos IgG1 de oveja.

Aunque en nuestro estudio no pudimos demostrar un efecto protector de la vacunación con MF6p/FhHDM-1 en términos de reducción de la carga parasitaria, nuestros resultados son prometedores ya que demuestran por primera vez que el bloqueo de la proteína MF6p/FhHDM-1, que se secreta a través del tegumento del parásito (Martínez-Sernández *et al.*, 2014) y se sospecha tiene una función endógena en la homeostasis del hemo (Martínez-Sernández *et al.*, 2017a), además de una actividad inmunomoduladora (Robinson *et al.*, 2012), puede tener un efecto perjudicial sobre el parásito. Aunque actualmente ignoramos el mecanismo inmunológico mediante el cual la vacunación con variantes del MF6p/FhHDM-1 altera la homeostasis de las larvas, creemos que puede deberse a un bloqueo de la actividad de la proteína secretada por anticuerpos circulantes dirigidos a epítomos clave durante la fase de migración del parásito. La presencia de estos anticuerpos también podría explicar el hallazgo de la respuesta retardada de anticuerpos frente a los productos ES de *F. hepatica* en ovinos inmunizados con sMF6p/FhHDM-1 formulado en Quil-A<sup>®</sup>. En este sentido, es posible que al desarrollarse más lentamente las fasciolas se retrase la producción de antígenos de secreción (CL y otros), lo que conduciría a respuestas de anticuerpos retardadas, como se describe en este trabajo.

Al contrario de lo señalado para el antígeno MF6p/FhHDM-1, la vacunación de animales con rFhpCL1 en Quil-A<sup>®</sup>, o con una LAP recombinante de *F. hepatica* expresada en *E. coli* y formulada en Al(OH)<sub>3</sub>, no mostraron ningún efecto protector. Estos resultados contradicen estudios anteriores que notificaron protecciones del 48% (ganado vacuno) y del 86% (ovejas) utilizando FhCL1 y FhLAP recombinantes, respectivamente (Golden *et al.*, 2010; Maggioli *et al.*, 2011a). Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con otros estudios que no encontraron protección inmunizando ovejas (Fu *et al.*, 2016; Pacheco *et al.*, 2017) o cabras (Buffoni *et al.*, 2010; Pérez-Écija *et al.*, 2010; Zafra *et al.*, 2013a) con rFhpCL1, ni en búfalos inmunizados con rLAP y después infectados con *F. gigantica* (Raina *et al.*, 2011). Aunque actualmente no tenemos una razón única y clara que pueda explicar la alta variabilidad en la protección obtenida en diferentes ensayos empleando diversos antígenos de *Fasciola*, es posible que se den resultados contradictorios dependiendo de la raza ovina, la edad de las ovejas en el momento de la inmunización y la capacidad infectante de las metacercarias de *F. hepatica* empleadas en cada estudio. En este sentido, se ha demostrado

recientemente que diferentes aislados de *F. hepatica* son capaces de inducir una respuesta inmune diferente sobre macrófagos bovinos (Baska *et al.*, 2019).

## Construcción y evaluación de antígenos quiméricos en distintas especies animales.

Las estrategias de vacunación han evolucionado en paralelo con nuestro conocimiento del funcionamiento del sistema inmunitario y de la biología de los patógenos. Mientras que en las vacunas clásicas se emplean patógenos vivos, inactivados, atenuados o muertos, en las vacunas de subunidades se usan antígenos singulares, tales como toxoides, polisacáridos capsulares bacterianos, proteínas o fragmentos completos y antígenos quiméricos (Cunningham *et al.*, 2016). Los antígenos quiméricos comprenden péptidos sintéticos cortos, o péptidos recombinantes de mayor longitud, que contienen partes antigénicas seleccionadas de uno o más patógenos, combinadas artificialmente en una sola molécula quimérica. Además, tales epítomos también pueden proceder de antígenos que se expresan en diferentes estadios del ciclo de vida de un patógeno (Sette y Fikes, 2003; Blanco *et al.*, 2013).

Típicamente, los antígenos quiméricos cuentan con un diseño minimalista que ofrece diversas ventajas, incluyendo: i) facilidad de producción, ya que ambos métodos de obtención (sintético o recombinante) cuentan con condiciones adecuadas para su escalabilidad, transporte y almacenamiento; ii) carecen de material infeccioso, ya que no requieren del cultivo de patógenos complejos como los helmintos, lo que permite una manufactura segura; iii) permiten la delineación precisa del antígeno, facilitando la exclusión de componentes redundantes u homólogos a los del hospedador, lo que disminuye el riesgo de alergias o de respuestas autoinmunes; y iv) no presentan riesgo de integración o recombinación como podría ocurrir con las vacunas de ADN (Purcell *et al.*, 2007; Fernández-Robledo y Vasta, 2010; Blanco *et al.*, 2013; Skwarczynski y Toth, 2016). Además de las ventajas antes mencionadas, los péptidos vacunales tienen un gran interés en investigación en campos tan diversos como el tratamiento del cáncer, la inmunocastración de animales, las enfermedades autoinmunes, así como la prevención de enfermedades infecciosas virales, bacterianas y parasitarias (Purcell *et al.*, 2007). Adicionalmente, la investigación del reconocimiento de antígenos peptídicos también es relevante en el campo de la inmunopeptidómica, para estudiar el repertorio de péptidos presentados en la superficie celular por las moléculas MHC-I y MHC-II en humanos y especies animales (Shao *et al.*, 2018), y como dianas para inmunoensayos (Faria *et al.*, 2015; Mucci *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017).

Por el contrario, las vacunas quiméricas presentan el inconveniente de que, en general, resultan menos antigénicas que las vacunas clásicas y que su diseño es complicado. En este sentido, cabe destacar que a diferencia de otros inmunógenos (como los peptidoglicanos, ADN metilado y polisacáridos de la pared bacteriana), las proteínas precisan del procesamiento por las APC para su presentación a las células Th (antígenos TD) y que se generan fenómenos de inmunodominancia, donde el reconocimiento de uno o varios epítomos predomina sobre otros (Butler *et al.*, 2002). Por otra parte, también ha sido notificado que un tamaño inadecuado de un antígeno peptídico puede tener un impacto negativo sobre su inmunogenicidad, lo que podría estar relacionado con la carencia de secuencias reconocidas como señales de daño y de epítomos T relevantes (Dudek *et al.*, 2010; Skwarczynski y Toth, 2014). Por el contrario, también existen estudios que demuestran como algunos péptidos naturales y sintéticos son capaces de desencadenar respuestas de anticuerpos TD, pese a su corta longitud (Borras-Cuesta *et al.*, 1987). Esto se debe a que para inducir una respuesta de anticuerpos dependiente de células T frente un antígeno dado, es necesario que este contenga al menos un epítomo reconocido por células B y un epítomo reconocido por células T, donde el epítomo T debe unirse con afinidad suficiente a la molécula MHC-II de una APC y al receptor TCR de un linfocito Th en reposo (Borras-Cuesta *et al.*, 1987; Mamula y Janeway, 1993; Parker, 1993; Brumeanu *et al.*, 1997). No obstante, también se ha reportado que algunos epítomos B lineales pueden cumplir con las características requeridas por epítomos T, permitiendo que “una misma secuencia” pueda promover respuestas de células T al tiempo que puede ser diana de respuestas de anticuerpos específicos sin que esto tenga un impacto negativo sobre la inmunogenicidad de la molécula (Harris *et al.*, 1996). Esto es probablemente debido a que la antigenicidad de los epítomos lineales es más fácil de preservar que la de los epítomos conformacionales (Chandra y Singh, 2012), que son altamente susceptibles a la acción de proteasas. Además, la respuesta de anticuerpos está dirigida mayoritariamente a un número limitado de epítomos conformacionales inmunodominantes (Newman *et al.*, 1992) para cuya identificación se requiere de información estructural de alta resolución del antígeno nativo (Forsstrom *et al.*, 2015).

Otro factor relevante a tener en cuenta al diseñar antígenos quiméricos empleando péptidos lineales es la manera de separarlos entre sí (Golvano *et al.*, 1990). Los antígenos nativos cuentan con secuencias espaciadoras naturales descritas como secuencias cortas de aminoácidos que conectan diferentes dominios en una única proteína (Reddy Chichili *et al.*, 2013). Dentro de estas secuencias espaciadoras se ha descrito que las regiones ricas en Gly proporcionan flexibilidad y, en consecuencia, facilitan las interacciones entre dominios, mientras que las re-

giones ricas en Pro generan rigidez e interacciones desfavorables (Reddy Chichili *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta estos factores, varios estudios han empleado espaciadores ricos en Gly, combinados con Ser (p. ej., GSGSG) o Pro (p. ej., GPGPG) para el diseño vacunas quiméricas (Liu *et al.*, 2005; Nezafat *et al.*, 2016; Wen *et al.*, 2015). Sin embargo este no ha sido el único enfoque empleado en la selección de secuencias espaciadoras. En este sentido, se ha reportado como los pares de aminoácidos básicos (KK, KR, RR) constituyen posiciones peptídicas presuntamente escindidas por catepsinas B durante la presentación del antígeno a las células T (Takahashi *et al.*, 1989). Partiendo de esta información, varios autores han utilizado la secuencia KK como espaciador que unido a epítomos T y B podría minimizar la formación de neoepítomos (Sarobe *et al.*, 1993; Yano *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta lo anterior, se ha propuesto que el empleo de secuencias espaciadoras podría mejorar el reconocimiento de los epítomos dentro de una molécula quimérica. Sin embargo, su selección no es algo trivial ya que a medida que aumenta la longitud del péptido aumenta la probabilidad de alterar la inmunogenicidad de la molécula (Schubert y Kohlbacher, 2016; Kim *et al.*, 2017). En este sentido, ha sido reportado que la combinación de secuencias espaciadoras con secuencias que aparentemente son solo epítomos B, puede conducir a la formación de nuevos epítomos de células T (neoepítomos T), que pueden ser reconocidos por las moléculas MHC-II altamente polimórficas en las APC, dependiendo del conjunto particular de estos receptores que sea expresado por el individuo que está siendo inmunizado. Finalmente, otro factor a considerar en la construcción de antígenos peptídicos quiméricos es definir el número y la posición donde colocar cada uno de los epítomos de células T y B a lo largo de la secuencia peptídica. En este sentido, se ha descrito que la orientación (= polarización) de los epítomos es de gran importancia para obtener respuestas óptimas a las vacunas de epítomos quiméricos (Golvano *et al.*, 1990; Lowenadler *et al.*, 1992; Blanco *et al.*, 2013).

En el campo de la Parasitología se han evaluado algunas vacunas de epítomos quiméricos para conferir protección contra enfermedades relevantes de protozoos y helmintos (Kaba *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2014; Anugraha *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2017). Sin embargo, en relación con las vacunas quiméricas, nuestro conocimiento respecto a la adecuada selección de espaciadores, la polarización de epítomos, los fenómenos de inmunodominancia entre los mismos (Steffensen *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017; Sesterhenn *et al.*, 2019), la formación de neoepítomos T y la variación de la respuesta inmune entre diferentes especies es todavía muy deficiente. En consecuencia, y para comprender mejor esta área, en el segundo artículo que se adjunta en esta memoria (Capítulo 2) hemos investigado cómo los antígenos quiméricos compuestos de dos o tres epítomos B derivados de los parásitos *Trichinella*

*spiralis* y *F. hepatica*, unidos por el mismo o diferentes espaciadores, indujeron la formación de anticuerpos IgG en ratones. Además, se investigó la respuesta de anticuerpos frente a una selección de quimeras en otras especies tan diferentes como las ovejas y los rodaballos.

### *Respuestas de anticuerpos en ratones frente a quimeras B diepitópicas.*

Para comprender mejor el reconocimiento de epítomos B quiméricos lineales derivados de antígenos de helmintos en diferentes especies animales, comenzamos el estudio probando quimeras diepitópicas en ratones. Estas quimeras consistieron en dos epítomos B, la secuencia hidrófoba MTFSVPIIS (GRAVY = 1,188) y una segunda secuencia (23 aa) derivada de la región amino terminal de las catepsinas L de *F. hepatica* (Cornelissen *et al.*, 1999), unidas a través del espaciador flexible GSGSG (de Souza *et al.*, 2013). En condiciones naturales, la secuencia MTFSVPIIS se encuentra localizada en la región amino terminal del antígeno *gp53* de especies encapsuladas de *Trichinella* y, como se ha indicado en la sección de Material y Métodos, es reconocida por el mAb US9 (IgG1/ $\kappa$ ; Romarís *et al.*, 2002; Romarís *et al.*, 2003; Perteguer *et al.*, 2004). Además, dado que los adultos de *F. hepatica* expresan tres clases de catepsinas L (CL1, CL2 y CL5; Robinson *et al.*, 2008a) y que estas moléculas mostraron diferentes antigenicidades como diana en ELISA (Martínez-Sernández *et al.*, 2018), probamos quimeras diepitópicas que contienen el epítomo US9 unido a variantes de epítomos derivadas de las catepsinas L recombinantes CL1, CL2 o CL5 (quimeras D1, D2 y D3, respectivamente). Para una mejor comparación, también se investigó la respuesta de anticuerpos de ratones frente a una quimera recombinante (rUS9-FhpCL1) expresada en *E. coli* que contiene el epítomo US9 después de la etiqueta 6xHis, seguida de la secuencia completa de la procathepsina L1 de *F. hepatica* en la que se eliminó el péptido señal.

En los títulos de anticuerpos obtenidos en ratones inmunizados con quimeras D1, D2, D3 o rUS9-FhpCL1 (313 aa), se observó que el epítomo B US9 al estar ubicado en la posición N-terminal de la quimera no indujo la formación de anticuerpos en ratones. Por el contrario, las respuestas de anticuerpos a las secuencias CL1, CL2 y CL5 (quimeras D1, D2 y D3) ubicadas después del espaciador GSGSC en la región C-terminal fueron excelentes (títulos > 1/25.000) a pesar del hecho de que estos animales recibieron una única inmunización en FCA. En este sentido, el efecto de la polarización de los epítomos B y T en antígenos quiméricos (diméricos) en las respuestas de anticuerpos específicos había sido investigado por algunos autores en el pasado con resultados no concluyentes. El grupo de Sarobe (1993) reportó la falta de respuesta de anticuerpos frente al epítomo B de una quimera

diepitópica  $B \rightarrow T$  y una buena respuesta a la formulación de  $T \rightarrow B$ , mientras que otro trabajo del mismo grupo (Golvano *et al.*, 1990), al igual que Blanco (2013) encontraron buenas respuestas de anticuerpos frente al epítipo B con orientaciones  $B \rightarrow T$  pero no con orientación  $T \rightarrow B$ . Aunado a estos estudios, también ha sido reportado que la orientación del epítipo no fue relevante en un experimento que combinó secuencias que contenían epítipos T y B (es decir, formulaciones T/B  $\rightarrow$  T/B) unidas por el espaciador KK (Yano *et al.*, 2005).

Nuestros datos también mostraron que los animales inmunizados con la quimera rUS9-FhpCL1 presentaron una alta respuesta de anticuerpos (título  $> 1/100.000$ ), pero una baja respuesta de IgG a la quimera D1, lo que sugiere que el epítipo CL1 tiene poca contribución a la antigenicidad global de la molécula. Este resultado no es sorprendente si consideramos que, a diferencia de las secuencias de epítipos B lineales cortas, las respuestas de anticuerpos frente a catepsinas de *Fasciola* correctamente plegadas se dirigen preferentemente a epítipos conformacionales (Martínez-Sernández *et al.*, 2011; Muiño *et al.*, 2011), como ya habíamos indicado al inicio de este capítulo. Además, nuestros resultados sugirieron que, aunque de secuencia similar, el epítipo CL5 (derivado de CL5 de *Fasciola*) presente en la quimera D3 indujo niveles de anticuerpos más altos que los epítipos CL1 y CL2 presentes en las quimeras D1 y D2, respectivamente. Sin embargo, este resultado no parece ser extrapolable a toda la molécula, ya que se sabe que la CL2 recombinante es ligeramente mejor reconocida que CL1 y CL5 por los anticuerpos inducidos durante las infecciones naturales del ganado (Martínez-Sernández *et al.*, 2018).

Dado que para inducir una respuesta de anticuerpos T dependientes se requiere de la presencia de al menos un epítipo de células T en el inmunógeno, las secuencias de quimeras D1, D2 y D3 fueron analizadas con la herramienta bioinformática PredBALB/c (Zhang *et al.*, 2005) que predice la unión de péptidos a moléculas H-2<sup>d</sup> de clase II de ratón (alelos I-A<sup>d</sup> y I-E<sup>d</sup>). Los resultados mostraron que estas quimeras contienen de 2-5 nonámeros con alta probabilidad de unión a los alelos H-2<sup>d</sup> de clase II, lo que está de acuerdo con las altas respuestas de anticuerpos observadas anteriormente frente a estas quimeras. Además, la mayoría de los supuestos epítipos T se localizaron en las secuencias CL, aunque también se predijo la presencia de tres neoepítipos T que se superponen parcialmente con el espaciador GSGSG. Finalmente, es importante señalar que, aunque la mayoría de los péptidos de unión a clase II H-2d reportados tienen una longitud de 13 a 16 aminoácidos, se ha sugerido que solo 9 residuos son esenciales para su posicionamiento dentro de la hendidura que alberga al péptido en las moléculas de clase II

(Murugan y Dai, 2005), lo que concuerda con la longitud del péptido utilizado por la herramienta PredBALB/c.

A continuación, y dada la ausencia de una respuesta de anticuerpos importante frente al epítipo US9 en ratones inmunizados con las quimeras D1, D2 y D3, hemos investigado si el posicionamiento del epítipo CL en la posición N-terminal de una quimera también fallaría en producir anticuerpos en estos animales. En este caso, el antígeno quimérico se construyó con dos epítopos de *F. hepatica* siendo el primero el epítipo CL2 de 23 residuos de longitud de la quimera D2 colocado en la posición N-terminal, seguido por la secuencia del espaciador GSGSG y por un segundo epítipo derivado de la secuencia de la proteína de unión a hemo MF6p/FhHDM-1 madura (Martínez-Sernández *et al.*, 2014; Martínez-Sernández *et al.*, 2017a). Entre estos últimos, probamos dos secuencias internas de 12 aa de la proteína madura MF6p/FhHDM-1, <sup>23</sup>VTKAYEKARDRA<sup>34</sup> y <sup>55</sup>LNRLTDRLEKYA<sup>66</sup> (denominadas secuencias MF6p2 y MF6p4, respectivamente), que también están presentes en la proteína MF6p/FgHDM-1 de *F. gigantica* (Martínez-Sernández *et al.*, 2017b). Ya que actualmente no existe un mapeo de los epítopos de células B derivados de MF6p/FhHDM-1, las dos secuencias de proteínas internas anteriores fueron seleccionadas en base a perfiles de polaridad y accesibilidad favorables, calculados con la herramienta bioinformática BcePred (Saha y Raghava, 2004). Los resultados mostraron que las quimeras D4 (con el epítipo MF6p2) y D5 (con el epítipo MF6p4) inducen buenas respuestas de anticuerpos contra sí mismos en ELISA, pero una respuesta pobre cuando los sueros se sometieron a pruebas cruzadas, a pesar del hecho de que ambas comparten la misma secuencia CL2-GSGSG-. Además, mientras que los anticuerpos inducidos por la inmunización con la quimera D2 (que contiene el epítipo CL en la posición C-terminal y carece de cualquier secuencia de MF6p/FhHDM-1) reaccionó con las quimeras D4 y D5, los anticuerpos inducidos por éstas reaccionaron débilmente contra la quimera D2. Estos resultados confirmaron nuevamente la falta de respuesta de anticuerpos al epítipo de células B ubicado en la región N-terminal de la secuencia y sugieren que la mayoría de los anticuerpos inducidos por las quimeras D4 y D5 están dirigidos contra las secuencias MF6p/FhHDM-1 en posición C-terminal, con o sin participación del espaciador GSGSG.

Para descartar la posible implicación del espaciador GSGSG y, por lo tanto, la formación de neoepítopos, probamos los mismos sueros contra dos quimeras que contienen la secuencia MF6p2 en posición central (quimera T3) o en posición C-terminal (quimera T2), ambos carentes del espaciador GSGSG. Los resultados mostraron que los sueros de ratones inmunizados con la quimera D4 eran altamente reactivos con la quimera T2, pero menos reactivos con la quimera T3. Estos datos

sugieren que la mayoría de los anticuerpos inducidos por la quimera D4 se dirigen contra el epítipo MF6p2, aunque este epítipo se reconoce mejor cuando se encuentra en la posición C-terminal del antígeno diana.

Para explorar mejor la influencia de los espaciadores en la antigenicidad de los antígenos quiméricos, construimos dos nuevas quimeras, que mantienen la estructura de la quimera D2, pero cambiando el espaciador GSGSG a GPGPG (quimera D6), una secuencia espaciadora utilizada para interrumpir la formación de neoepítipos observada en epítipos contiguos de células T (Livingston *et al.*, 2002; Nezafat *et al.*, 2016), o la secuencia KK (quimera D7), recientemente utilizada para aislar epítipos contiguos de células B y T (Gu *et al.*, 2017). De nuevo, los sueros de animales inmunizados con la quimera D2 que contenía el espaciador GSGSG se usaron para comparación. Los resultados mostraron nuevamente que no hay respuestas de anticuerpos al epítipo US9 (presente en la secuencia TSP12) presentes en las quimeras D2, D6 y D7. Sin embargo, todas las quimeras indujeron buenas respuestas de anticuerpos frente al epítipo CL2, como lo indican los altos valores de densidad óptica obtenidos con cada una de las quimeras inmunizantes (reconocimiento-*self*) y con las quimeras unidas por otros espaciadores (reconocimiento cruzado) en ELISA.

La influencia de la posición del epítipo CL2 en la secuencia diana se investigó probando dos quimeras adicionales en las que el epítipo CL2 está en una posición central (quimera T1) o en la región N-terminal (quimera D4). En este caso, no se observaron diferencias entre el reconocimiento-*self* y el reconocimiento cruzado, lo que indica que todos los sueros reconocieron el epítipo CL2 independientemente de su posición en el antígeno diana. Además de los epítipos de células B, también investigamos la posible influencia de los espaciadores en la alteración del repertorio de epítipos de células T a lo largo del antígeno quimérico. Para este fin, utilizamos de nuevo la herramienta de bioinformática PredBALB/c (Zhang *et al.*, 2005). La herramienta bioinformática PredBALB/c predijo que algunas de las quimeras diepitópicas tenían secuencias noáméricas de aminoácidos capaces de unirse a los alelos I-A<sup>d</sup> y I-E<sup>d</sup> que contienen parte de las secuencias espaciadoras (quimeras D2, D3, D4 y D6) o completa (D7). Curiosamente, con respecto a las quimeras D6 y D7, la adición de residuos correspondientes al espaciador GPGPG o KK, respectivamente, convirtió la secuencia US9 en un probable epítipo de células T, lo que podría aumentar la señalización de las células T favoreciendo la inducción de anticuerpos al epítipo CL2. En el caso particular de las secuencias US9 que contienen el espaciador KK (TFSVPISKK e ISKKAVPES), esta hipótesis está en desacuerdo con estudios anteriores que proponen que las cathepsinas B lisosomales de las APCs cortan preferentemente después de los pares de aminoácidos bási-

cos (Takahashi *et al.*, 1989), pero está de acuerdo con estudios más recientes que muestran que dichas enzimas tienen otras especificidades de sustrato (Cotrin *et al.*, 2004; Binióssek *et al.*, 2011). Sin embargo, dado que la actividad endopeptidasa de las APCs no se limita a las catepsinas B (Burster y Boehm, 2010), aún existe la duda sobre si estos neoepítomos de células T presentes en la quimera D7 permanecen intactos durante la presentación del antígeno.

### *Respuestas de anticuerpos de ratón inducidas por quimeras B triepitópicas.*

A partir de los resultados bioinformáticos presentados en la sección anterior, llegamos a la conclusión de que las secuencias espaciadoras pueden contribuir a aumentar el número de epítomos de células T disponibles en las quimeras al inducir la formación de neoepítomos T. Sin embargo, no pudimos dilucidar qué secuencia espaciadora sería más favorable para inducir respuestas de anticuerpos T dependientes con una formación mínima o nula de neoepítomos B, un aspecto relevante para lograr la máxima eficacia de la vacuna. Además, nuestros resultados no aclararon cuáles son las posiciones más adecuadas para los epítomos de células B en quimeras multiepitópicas. Para responder a estas preguntas, diseñamos quimeras triepitópicas utilizando una combinación del espaciador GSGSG con KK, o KK solo, permutando la posición de los epítomos central y C-terminal (quimeras T1, T2 y T3). En las respuestas de anticuerpos obtenidas después de la inmunización de ratones BALB/c con cada una de estas quimeras, se observaron tres hallazgos principales: i) en cuanto a las quimeras diepitópicas, no se dirigió ninguna respuesta de anticuerpos al epítomo US9 colocado en la posición N-terminal de la quimera; ii) las tres quimeras triepitópicas indujeron excelentes respuestas de anticuerpos frente a sí mismas (reconocimiento *self* y cruzado) y a las quimeras D2 y D4, pero solo los anticuerpos inducidos por las quimeras T2 y T3 reaccionaron fuertemente con la quimera D5, que carece del epítomo MF6p2; y iii) la proteína sintética MF6p/FhHDM-1, que contiene la secuencia del epítomo interno MF6p2, solo fue reconocida por anticuerpos inducidos por la quimera T2 y, en menor medida, por aquellos inducidos por la quimera T3. A partir de estos resultados, llegamos a la conclusión de que las quimeras T1, T2 y T3 eran capaces de inducir anticuerpos contra los epítomos CL2 y MF6p2. Sin embargo, en comparación con T2 y T3, parece que T1 indujo un conjunto diferente de anticuerpos, ya que: i) estos anticuerpos no reaccionaron con el epítomo CL2 cuando se ubicaron en la posición N-terminal de la secuencia diana (p. ej., la quimera D5) y ii) el epítomo MF6p2 no fue reconocido cuando se ubicó en una posición interna (como en la proteína sintética MF6p/FhHDM-1). Estas conclusiones también fueron respaldadas por varios ELISA de

inhibición que descartaron cualquier posible artefacto debido a una orientación inadecuada de los péptidos diana en los ELISA indirectos. En cuanto al efecto de la orientación de los epítomos en el antígeno, nuestros resultados también indicaron que las secuencias espaciadoras también pueden ejercer influencia sobre la antigenicidad de las quimeras triepitópicas. Esto se dedujo del hecho de que, aunque las quimeras T1 y T2 comparten la misma posición del epítomo, generaron un conjunto distinto de anticuerpos, ya que solo los anticuerpos inducidos por la quimera T2 fueron capaces de reconocer los epítomos CL2 (presentes en las quimeras D2 y D5) y MF6p2 (presente en la quimera D4 y en MF6p/FhHDM-1), independientemente de su posición en el antígeno diana. Estos resultados sugieren que los epítomos unidos por la secuencia espaciadora KK pueden ser una mejor opción para los experimentos de inmunización con antígenos quiméricos. Esto concuerda con la estrategia de Yano (2005) de utilizar este enlazador de lisina para unir epítomos para aplicaciones de vacunas.

La comparación de las respuestas de anticuerpos a las quimeras diepitópicas y triepitópicas reveló que estas últimas eran más antigénicas. Este hallazgo no fue sorprendente teniendo en cuenta que cuanto más larga sea la secuencia del antígeno quimérico, mayor será la probabilidad de que aumente el número de posibles epítomos T, incluida la formación de epítomos promiscuos (Fonseca *et al.*, 2016). Además, la herramienta bioinformática PredBALB/c predijo menos epítomos de células T putativos en la quimera T1 (n=7) que en las quimeras T2 (n=14) y T3 (n=14), lo que pueden estar relacionado con las diferencias observadas en la respuesta de anticuerpos inducida por la quimera T1 con respecto a las últimas quimeras.

Además de la determinación de las respuestas de anticuerpos IgG totales inducidas por las quimeras triepitópicas en ratones, investigamos la influencia de los diferentes espaciadores y/o la posición de los epítomos B en el repertorio de subclases de IgG inducidas por estas quimeras. Las respuestas de anticuerpos de la subclase IgG inducidas por las quimeras T1, T2 y T3 frente a sí mismas, así como a la quimera D5 y sMF6p/FhHDM-1, fueron determinadas en ELISA. Los resultados mostraron que todas las quimeras indujeron la formación de anticuerpos de todas las subclases de IgG en ratones, siguiendo el mismo patrón de la respuesta de anticuerpos obtenida para los anticuerpos anti-IgG totales. Las altas respuestas de anticuerpos IgG2a obtenidos están probablemente relacionadas con el uso de CFA, un adyuvante que promueve las respuestas Th1 en ratones, lo que lleva a una disminución de la proporción de anticuerpos IgG1/IgG2a (Cribbs *et al.*, 2003).

### *El epítomo US9 influye en la respuesta de ratones frente al epítomo CL2*

Como se discutió anteriormente, la falta de una respuesta de anticuerpos relevante en ratones para el epítomo localizado en la región N-terminal de las qui-

meras diepitópicas y triepitópicas (es decir, contra los epítomos US9 o CL2) nos llevó a asumir que ésta podría no ser una posición adecuada para colocar un epítomo B relevante. Sin embargo, teniendo en cuenta que la secuencia CL2 contiene supuestos epítomos de células T, surge una duda sobre si la presencia del epítomo US9 hidrófobo en cualquier posición de una quimera puede modular las respuestas a otros epítomos colindantes. Para probar esta posibilidad, inmunizamos ratones con una nueva quimera diepitópica (D8) que tiene los mismos epítomos US9 y CL2 que la quimera D7 pero invertidos en sus posiciones. Después de probar los sueros obtenidos de ratones inmunizados con la quimera D8, observamos que esta quimera produjo una excelente respuesta de anticuerpos frente a sí misma y que dicha respuesta se dirigió exclusivamente contra el epítomo CL2. Este resultado fue sorprendente ya que, como se señaló anteriormente, los anticuerpos inducidos por las quimeras D4 y D5, que llevan el epítomo CL2 en la misma posición N-terminal que D8, pero carecen de la secuencia US9, no reaccionaron con dicho epítomo. Aunque aún no comprendemos el mecanismo por el cual la introducción de la secuencia hidrófoba corta US9 en la posición C-terminal de la quimera D8 polariza la respuesta del anticuerpo al epítomo CL2, hipotetizamos que esto puede estar relacionado con los cambios inducidos por US9 en la afinidad de los péptidos procesados para la unión de MHC de clase II, o por cambios en la inmunodominancia debido a la competencia de péptidos para la unión de MHC de clase II (Adorini *et al.*, 1988; Lo-Man *et al.*, 1998). Otra alternativa, como la posible inducción de una mayor señalización de células T provocada por la quimera D8 con respecto a la quimera D7 parece menos probable ya que la herramienta PredBALB/c predijo menos epítomos de células T en la quimera D8 que en la quimera D7.

### *Análisis de la respuesta de anticuerpos inducida por quimeras B di y triepitópicas en otras especies animales*

Aunque son muy convenientes para plantear estudios preliminares de vacunación, los ratones, y particularmente las cepas singénicas, rara vez son representativas de las respuestas inmunes generadas en otras especies animales. En consecuencia, ampliamos nuestros estudios previos en ratones BALB/c, investigando las respuestas de ovejas y rodaballo a algunos de los antígenos quiméricos anteriores. La oveja fue elegida como representante de los animales de producción ya que esta especie es hospedadora natural para la infección por *F. hepatica* sin protección natural contra este trematodo (Mulcahy *et al.*, 1999a) y por ser el hospedador empleado en los estudios de vacunación con FhpCL1 y MF6p/FhHDM-1 formulados en Quil-A® (Capítulo 1). Además de la oveja, se eligió el rodaballo (*Scophthalmus*

*maximus* L), por ser un pez plano de gran interés comercial (Estévez *et al.*, 1993), porque las respuestas de anticuerpos en peces son muy diferentes de las especies de mamíferos dado que solo producen anticuerpos de los isotipos IgM e IgT (Estévez *et al.*, 1993; Salinas *et al.*, 2011), y porque el mecanismo involucrado en las respuestas de anticuerpos de T dependientes en estos animales ha sido escasamente investigado.

En cuanto a la respuesta de anticuerpos IgG en ovejas inmunizadas con las quimeras D2, T2 y T3, no se obtuvo respuesta frente al epítipo US9, al igual que las observaciones previas en ratones BALB/c. Sin embargo, las respuestas de anticuerpos de estos animales mostraron algunas diferencias notables con respecto a los ratones. En este sentido, observamos que mientras las ovejas producían poco o ningún anticuerpo para la quimera T2, estos animales respondían bien a la quimera D2 y en menor medida a la quimera T3, si bien se observó una variabilidad relevante entre los animales dentro de cada grupo. Además, considerando la composición del epítipo de los antígenos quiméricos, es interesante observar que la mayoría de los anticuerpos producidos en ovejas estaban dirigidos frente al epítipo CL2. Esto se dedujo del hecho de que hubo una falta de reconocimiento de los epítipos US9 y MF6p2, y que se obtuvieron valores de OD similares utilizando como diana la quimera inmunizante (reconocimiento-*self*) y quimeras diferentes del inmunógeno pero que comparten el epítipo CL2 (reconocimiento cruzado). Además, dada la alta respuesta de anticuerpos observada en ovejas inmunizadas con la quimera D2 frente a sí misma, así como a las quimeras D7, T1 y T3, parece que, al igual que en los ratones, las respuestas de anticuerpos IgG de ovejas a neoepítipos fueron irrelevantes.

En comparación con los ratones, la pobre respuesta de anticuerpos de las ovejas frente a la quimera T2 puede resultar sorprendente a primera vista. Nuestra hipótesis es que dicha discrepancia puede estar relacionada con la diferente localización del epítipo CL2 en D2 y T3 (ambos en la posición C-terminal) con respecto a T2 (central), junto con una capacidad diferente de ovejas y ratones para procesar y presentar tales antígenos. En este sentido, se ha descrito que las moléculas DR y DQ del MHC de clase II de ovejas (antígeno de leucocitos ovinos; OLA), se encuentran entre las moléculas más altamente polimórficas en mamíferos (Koutsogiannouli *et al.*, 2016). Sin embargo, podría ocurrir que nuestras ovejas de raza gallega careciesen de un conjunto adecuado de tales moléculas MHC capaces de estimular las células T en reposo con la especificidad de TCR para el epítipo CL2 cuando se encuentra en la posición central de la quimera. Sin embargo, dado que actualmente carecemos de herramientas bioinformáticas

adecuadas para la predicción de la unión del péptido a las moléculas DR y DQ en ovejas, esta hipótesis no pudo ser confirmada.

Una vez investigada la respuesta a las quimeras T2 y T3 en ovejas, investigamos la respuesta de anticuerpos de rodaballo frente a estos antígenos. Además de las razones antes apuntadas, la elección del rodaballo como modelo experimental presentaba otras dos ventajas adicionales: i) hay muchas explotaciones de rodaballo en Galicia y ii) la disponibilidad en nuestro laboratorio del mAb UR3, un mAb IgG1 $\kappa$  previamente desarrollado por nuestro equipo que reconoce específicamente la inmunoglobulina principal IgM de rodaballo (Estévez *et al.*, 1994a).

Dado que la respuesta inmune adaptativa de los teleosteos es probablemente menos eficiente que la de los mamíferos (Magadan *et al.*, 2015), los rodaballos fueron sometidos a dos inmunizaciones secuenciales vía i.p., la primera con CFA (como los ratones) y una segunda inyección un mes después con FIA, empleando los antígenos quiméricos T2 y T3. Debe subrayarse que, a diferencia de las ovejas, el rodaballo generó una alta respuesta de anticuerpos a los epítomos de células B presentes en la quimera T2 (epítomos CL2 y MF6p2) pero, inesperadamente, poca o ninguna respuesta a la quimera T3. El buen reconocimiento del epítomo MF6p2 por los anticuerpos inducidos por la quimera T2 se evidenció por la excelente reactividad de dichos anticuerpos a sMF6p/FhHDM-1 y sMF6a. Además, dado que el péptido sMF6a carece del residuo C-terminal (Ala) del epítomo MF6p2, parece que el mismo no es necesario para la unión del anticuerpo. Nuestros datos también mostraron que la quimera T2 no indujo una respuesta de anticuerpo relevante a ningún neoepítomo, ya que los valores obtenidos frente a las quimeras D2 y D7 (que tienen diferentes espaciadores) fueron similares. Teniendo en cuenta que los epítomos CL2 y MF6p2 en las quimeras T2 y T3 están separados por los mismos enlazadores (KK), las diferencias entre las respuestas de anticuerpos observadas en ratones, ovejas y rodaballos son nuevamente sorprendentes. Sin embargo, como los anticuerpos inducidos por la quimera T2 reconocieron los epítomos CL2 y MF6p2 en las posiciones centrales o C-terminales (quimeras D2, D5, D6 y D7), descartamos que las diferencias de anticuerpos en la respuesta de los rodaballos frente a las quimeras T2 y T3 se debieran a deficiencias en el repertorio de células B. Por lo tanto, como hemos comentado anteriormente con respecto a las ovejas, es probable que el conjunto de moléculas MHC de clase II y/o repertorio de TCR de rodaballos no sea adecuado para unirse a los epítomos de células T contenidos en la quimera T3. En este sentido, se debe tener en cuenta que los rodaballos utilizados en el presente estudio se obtuvieron de una piscifactoría local, donde se producen mediante el apareamiento de un pequeño número de animales reproductores que pueden restringir la diversidad de las moléculas MHC-II con respecto a las especies silvestres.

Aunque algunas especies de peces como *Gadus morhua* (bacalao atlántico) carecen de actividad de MHC-II, la mayoría de los peces teleósteos, incluyendo el rodaballo, tienen moléculas de MHC-II funcionales clásicas y tienen buena activación de la inmunidad humoral y la inmunidad mediada por células en respuesta a agentes infecciosos incluyendo bacterias, virus y parásitos (Leiro *et al.*, 1996; Iglesias *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017b).

## La recaptura en placa como nueva estrategia para purificar antígenos recombinantes expresados en *E. coli* y evitar reacciones inespecíficas en ELISA.

En nuestro trabajo hemos podido comprobar que la inclusión del epítipo US9 en posición amino terminal (antígeno señuelo) ha tenido consecuencias favorables en el diseño de antígenos quiméricos que han sido capaces de inducir respuestas de anticuerpos en distintas especies animales. Sin embargo, en nuestro laboratorio también es habitual la expresión de proteínas recombinantes destinadas al inmunodiagnóstico, para cuyo proceso de purificación, además de la etiqueta de polihistidina (6xHis), se pueden introducir en la secuencia otros epítopos lineales cortos reconocidos por anticuerpos específicos (Kimple *et al.*, 2013). De ahí, que la presente memoria también incluye el estudio del epítipo reconocido por el mAb US9 como posible herramienta de mejora para la repurificación de un antígeno recombinante producido por *F. hepatica*, una leucin aminopeptidasa.

En el comienzo de esta sección ya hemos mencionado que la detección de anticuerpos séricos inducidos por infecciones parasitarias utilizando métodos ELISA depende de la disponibilidad de cantidades suficientes de antígenos específicos, ya sean naturales o recombinantes, para ser utilizados en los inmunoensayos. En este sentido, podría esperarse que antígenos recombinantes (obtenidos en condiciones estandarizadas de manufactura) fuesen más específicos que los nativos, pero varios estudios han demostrado lo contrario (Cornelissen *et al.*, 2001; Figueroa-Santiago *et al.*, 2011; Kuerpick *et al.*, 2013; Martínez-Sernández *et al.*, 2018). Aunque no se han desarrollado investigaciones específicas acerca de este fenómeno, existen estudios que señalan que la presencia de contaminantes derivados de la expresión de proteínas recombinantes etiquetadas con 6xHis en *E. coli*, podría estar relacionada con su escasa especificidad (Robichon *et al.*, 2011). La secuencia 6xHis es la etiqueta más comúnmente utilizada para la purificación de proteínas recombinantes en un solo paso, permitiendo purezas de hasta el 95% con una recuperación del 90% de la proteína marcada (Bornhorst y Falke, 2000). Sin embargo, los contaminantes restantes pueden ser de gran importancia cuando estos antígenos

son utilizados como diana en inmunodiagnóstico o en cualquier otra situación en la que se requiera un producto homogéneo. También se ha descrito que la pureza de las proteínas recombinantes etiquetadas con 6xHis puede ser mejorada a través de la expresión optimizada de *E. coli* (Andersen *et al.*, 2013), los lavados ácidos (Bornhorst y Falke, 2000; Ben David *et al.*, 2015) y el lavado con bajas cantidades de imidazol (Bolanos-García y Davies, 2006), métodos comúnmente utilizados para prevenir la purificación conjunta de proteínas contaminantes. A estos métodos podríamos añadir la inclusión de 2-mercaptoetanol y detergentes no iónicos en el tampón de carga de las columnas de afinidad, para minimizar la formación de enlaces disulfuro entre la proteína de interés y otras proteínas, así como de interacciones hidrófobas no específicas, respectivamente (Bornhorst y Falke, 2000). Sin embargo, estos métodos pueden disminuir el rendimiento de la proteína purificada y no garantizan la pureza completa de las proteínas recombinantes, debido a que una fracción relevante de proteínas de *E. coli* contaminantes exhibe una afinidad, de moderada a fuerte, por las columnas de afinidad conteniendo resinas con iones-metales inmovilizados (IMAC; Bolanos-García y Davies, 2006).

La alternativa propuesta por nosotros para afrontar este problema consistió en incluir una segunda etiqueta en la secuencia rFhLAP (epítipo MTFSPIS, reconocido por el mAb US9) que nos permitiese la recaptura del antígeno en placas ELISA (formato ELISA-captura). El etiquetado con epítopos de naturaleza peptídica es una técnica de ingeniería genética que permite añadir a la proteína de interés, un epítipo reconocido por un anticuerpo monoclonal (Jarvik y Telmer, 1998; Brizzard, 2008). Esto hace posible una purificación rápida de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad con el correspondiente mAb inmovilizado, así como la detección de proteínas en Western Blot (WB), citometría de flujo y ELISA (Fujii *et al.*, 2017). Para este propósito, habitualmente se seleccionan secuencias lineales cortas (de entre 5-16 aa de longitud) que presentan un índice GRAVY negativo (es decir, hidrofílicas), característica que se cree podría permitir una mayor accesibilidad a su reconocimiento por anticuerpos. En general tales epítopos son incluidos en las regiones terminales amino o carboxi de la molécula con el fin de reducir posibles interferencias en la función de la misma, aunque esta no es una regla aplicable a cualquier proteína (Jarvik y Telmer, 1998). En este sentido, existen algunas parejas de etiquetas y mAbs patentados, que pueden ser utilizados tanto en la purificación por afinidad como en la detección de proteínas recombinantes marcadas (Kimple *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta donde sabemos, ninguno de estos métodos ha sido utilizado en el desarrollo de métodos de diagnóstico serológico ELISA en enfermedades infecciosas, en el

cual se podrían eliminar los contaminantes remanentes de la purificación por afinidad IMAC, a través de la captura en placa del antígeno una vez replegado.

Para estudiar esta estrategia, nos planteamos introducir el epítipo lineal US9 (ver página 117) en la proteína rFhLAP de *Fasciola hepatica* en tándem con la etiqueta 6xHis. La FhLAP es una metaloproteína citoplásmica que ha sido aislada de adultos de *Fasciola* (Acosta *et al.*, 1998) y es capaz de inducir anticuerpos específicos durante la infección, así como protección parcial contra la reinfección en ovejas inmunizadas (Piacenza *et al.*, 1999; Marcilla *et al.*, 2008; Maggioli *et al.*, 2011a).

Si bien en el inmunodiagnóstico de la fasciolosis en humanos y animales es más adecuado el uso de catepsinas nativas (Mezo *et al.*, 2010a; Mezo *et al.*, 2010b; Mezo *et al.*, 2011) y recombinantes (clados L1, L2 y/o L5) como antígenos diana en ELISA, en este trabajo hemos decidido emplear la rFhLAP dado que puede expresarse en la fracción soluble de bacterias *E. coli* transformadas, donde es más probable que exista contaminación con proteínas contaminantes de la bacteria. Por otra parte, ya que la FhLAP nativa había sido evaluada como antígeno diana en el inmunodiagnóstico de fasciolosis en humanos, en este estudio quisimos evaluar su potencial como antígeno diana en el serodiagnóstico de infecciones por *F. hepatica* en rumiantes domésticos (ovejas y vacas).

En nuestro estudio se pudo evidenciar la utilidad de usar el etiquetado dual de la proteína recombinante (6xHis y MTFSPVIS) ambas posicionadas en la región N-terminal de nuestra proteína rUS9-FhLAP. Mientras que la purificación en un solo paso por IMAC de la proteína rUS9-FhLAP generó una fuerte reactividad en ELISA indirecto, siendo reconocida por muchos sueros de rumiantes no infectados (principalmente bovinos), dicha reactividad inespecífica desapareció cuando este antígeno fue recapturado por el mAb US9 en ELISA captura.

Entre los contaminantes más típicos en las columnas de afinidad IMAC han sido notificados desde componentes no proteicos (p. ej., fosfolípidos, ácidos nucleicos y LPS) hasta proteínas de la célula *E. coli*, que incluyen proteínas de la membrana externa, proteínas de la maquinaria de plegado sensibles al estrés y proteínas de la subunidad ribosomal (Eggenreich *et al.*, 2016), algunas de las cuales requieren más de 80 mM de imidazol para su elución (Bolanos-García y Davies, 2006). Por lo tanto, aunque la identificación molecular de las proteínas de *E. coli* reconocidas por los sueros de ovejas y vacas va más allá de los objetivos del presente estudio, nuestros resultados en SDS-PAGE muestran la presencia de bandas que no fueron reconocidas por el mAb US9 ni anticuerpos anti-His en WB, revelando la presencia de proteínas de *E. coli* contaminantes en el rUS9-FhLAP purificado por afinidad IMAC. De forma similar, hemos observado que dentro de

las proteínas solubles presentes en células M15 de *E. coli* no transformadas, existe una gran diversidad de proteínas con afinidad por iones  $Ni^{++}$ , al utilizar PBS más imidazol 5 mM como tampón de carga y de lavado. También es importante resaltar que han sido reportados resultados falsos positivos al emplear CL recombinantes (expresadas en *Pichia pastoris* y purificadas por afinidad IMAC), antígenos que han demostrado ser mucho más antigénicos en ELISA en comparación con el antígeno FhLAP (Kuerpick *et al.*, 2013). A esto podríamos añadir que estudios recientes en nuestro laboratorio demostraron que los resultados falsos positivos son menos relevantes cuando los antígenos (procatepsinas L) han sido expresados en *E. coli* como cuerpos de inclusión, dado que estos agregados son sometidos a lavados por centrifugación que permiten eliminar la mayoría de proteínas solubles contaminantes del huésped antes de la desnaturalización y la purificación por afinidad IMAC (Martínez-Sernández *et al.*, 2018). Además de las proteínas, el LPS también ha sido reconocido como un contaminante frecuente durante la purificación IMAC de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* (Schwarz *et al.*, 2014). En este sentido, las células M15 utilizadas en este estudio derivan de una cepa K12 de *E. coli* (<https://www.qiagen.com/fr/resources/resourcedetail?id=abc8b958-d415-4b91-88a1-e5f90d0a1884&lang=en>) y aunque carecen del antígeno O del LPS (Stevenson *et al.*, 1994), retienen otros componentes como el lípido A (Liu y Reeves, 1994), que es potencialmente antigénico. Al igual que estudios previos (van Altena *et al.*, 2016), nuestros resultados mostraron que los sueros de ganado libre de *F. hepatica* presentan niveles relevantes de anticuerpos anti-LPS (serotipo O55:B5 de *E. coli*), aunque la ausencia de correlación entre dicha respuesta de anticuerpos y la obtenida frente rUS9-FhLAP excluye al lípido A de *E. coli* como fuente de reactividad cruzada en nuestro estudio. En cuanto a las características fisicoquímicas de la secuencia MTFSPIS reconocida por mAb US9, esta presenta un índice GRAVY positivo (1,188) que denota una naturaleza hidrófoba que se diferencia de la mayoría de etiquetas de epítomos reportadas anteriormente (Kimple *et al.*, 2013) y que desaconsejaría su uso para etiquetar algunas proteínas recombinantes. Sin embargo, cabe mencionar que su inserción en la secuencia rUS9-FhLAP fue realizada en tándem después de la etiqueta 6xHis, incorporando 5 residuos adicionales en la región N-terminal debido al procedimiento de clonación. En consecuencia, fueron incorporados veinte residuos adicionales en la región amino de la secuencia rFhLAP (<sup>1</sup>MRGSHHHHHHGSMTFSPIS<sup>20</sup>) con un GRAVY negativo (-0.735), que está en el rango de muchas otras etiquetas epitópicas (Kimple *et al.*, 2013). También cabe resaltar que el epítomo US9 en el rUS9-FhLAP químérico tiene una posición similar a la de la secuencia madura paterna de gp53 de *T. spiralis* (<sup>1</sup>STDNENVAMKEMTFSPIS<sup>19</sup>, GRAVY = -0,289; gb | CAD86781.1) y

*T. britovi* (<sup>1</sup>STDNENAAMKEMTFSPIS<sup>19</sup>, GRAVY = -0.416; gb | CAD86782.1) (Romarís *et al.*, 2002), lo que ya sugería un buen reconocimiento de rUS9-FhLAP por el mAb US9. A esto habría que añadir que la presencia de dipéptidos GS antes del 6xhis y el epítipo US9 probablemente facilita el reconocimiento por el mAb US9, dada su acción de enlazador flexible descrita tanto en proteínas de fusión recombinantes (Chen *et al.*, 2013; Reddy Chichili *et al.*, 2013) como en antígenos quiméricos de múltiples epítipos (Liu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014). Finalmente, también debe considerarse que, aunque la secuencia MTFSPIS pertenece a una proteína nematodo, su reconocimiento por sueros de animales infectados en ELISA de captura no es posible ya que dicho epítipo no está disponible debido a su unión con el anticuerpo de captura (US9).

Al analizar los sueros de humanos infectados con *F. hepatica*, Marcilla (2008) notificaron que una FhLAP nativa de *F. hepatica* podría tener un interés potencial en el diagnóstico serológico de la fasciolosis humana. Sin embargo, en comparación con las catepsinas L (MM3-ELISA), nuestros resultados demostraron claramente que, al menos en los rumiantes, las respuestas a este antígeno son discretas y, por lo tanto, no pueden recomendarse para el desarrollo de pruebas de inmunodiagnóstico.

En resumen, y como prueba de concepto, en este estudio demostramos por primera vez que la introducción de un epítipo hidrofóbico reconocido por un mAb en un antígeno recombinante de *Fasciola* se puede usar para recapturar en placa el antígeno permitiendo el diseño de ELISA captura nuevos y específicos. Esta estrategia puede ser ventajosa sobre los ELISA indirectos por al menos dos razones: i) a diferencia del ELISA indirecto, todas las moléculas de antígeno permanecen orientadas en el espacio por acción del mAb de captura, y ii) permite usar un pocillo como control individual para cada suero, mejorando así la detección de individuos que tienen anticuerpos que reaccionan con el mAb de captura o las proteínas utilizadas para bloquear las placas ELISA (Mezo *et al.*, 2007). Actualmente, se están realizando estudios adicionales en nuestro laboratorio para investigar si se puede realizar la misma estrategia con otros antígenos de *Fasciola*, como fragmentos completos o seleccionados de catepsinas L, para desarrollar pruebas de inmunodiagnóstico robustas sin la necesidad de obtener parásitos vivos en los mataderos.

## **Conclusiones**



## CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado por primera vez que la inyección del adyuvante Quil A® en ovejas es capaz de expandir el repertorio de anticuerpos que generan frente al antígeno MF6p/FhHDM-1 durante una infección experimental primaria con metacercarias de *F. hepatica*. Dicho efecto parece ser una característica propia de Quil-A®, ya que también se manifiesta sin la administración concomitante de antígeno, y no la presenta el hidróxido de aluminio, que es uno de los adyuvantes más empleados en vacunas comerciales.
2. Las ovejas vacunadas con el antígeno MF6p/FhHDM-1 sintético formulado en el adyuvante Quil-A® presentaron un retardo de 2-4 semanas en la producción de anticuerpos frente a los antígenos secretados por *F. hepatica* durante una infección experimental. También se ha comprobado que la población de fasciolas de los animales vacunados mostraron una menor actividad metabólica, según se desprende de su menor tamaño y reducida liberación de catepsinas con las heces de los animales.
3. Se ha evaluado la respuesta de anticuerpos inducidas en ratones, ovejas y rodaballo frente a péptidos quiméricos sintéticos, di- y tri-epitópicos, compuestos por secuencias derivadas de tres antígenos parasitarios: CL1 y MF6p/FhHDM-1, ambos de *F. hepatica*, y el epítipo US9, procedente de la glicoproteína gp53 de *T. spiralis*. Se ha comprobado que las tres especies de animales estudiados fueron capaces de generar una respuesta elevada de anticuerpos frente péptidos quiméricos de pequeño tamaño. Sin embargo, la intensidad de las respuestas se vio afectada por la orientación de los epitopos, la naturaleza de los espaciadores empleados para separar los distintos epítipos y por la generación de nuevos epítipos T.
4. Se ha observado que, al menos en ratones, la presencia del epítipo US9, tanto en posición N- como C-terminal, actúa como un epítipo señuelo frente al cuál no se generan anticuerpos, pero favorece que se generen frente a los demás epítipos que componen los péptidos quiméricos. Este hallazgo puede resultar de gran interés en campo del diseño de péptidos

sintéticos para la inmunización de ratones con el fin de producir híbridos productores de anticuerpos monoclonales.

5. Se ha diseñado por primera vez un antígeno quimérico recombinante de *F. hepatica* (leucin-aminopeptidasa) que contine la etiqueta clásica 6xHis junto con el epítipo US9. La presencia de este segundo epítipo permitió la repurificación *in situ* del antígeno recombinante en los pocillos de placas ELISA que contenían el mAb US9 inmovilizado. Esta estrategia se ha mostrado eficaz para evitar fenómenos de reactividad cruzada debidos a la presencia de proteínas contaminantes de *E. coli* cuando se usan columnas IMAC.



## **Bibliografía**



## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta D, Goni F y Carmona C (1998).** Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *J Parasitol*, **84**: 1-7.
- Adams PN, Aldridge A, Vukman KV, Donnelly S y O'Neill SM (2014).** *Fasciola hepatica* tegumental antigens indirectly induce an M2 macrophage-like phenotype in vivo. *Parasite Immunol*, **36**: 531-539.
- Adorini L, Appella E, Doria G y Nagy ZA (1988).** Mechanisms influencing the immunodominance of T cell determinants. *J Exp Med*, **168**: 2091-2104.
- Al-Qudah KM, Sharif LA, Al-Rawashdeh OF y Al-Ani FK (1999).** Efficacy of closantel plus albendazole liquid suspension against natural infection of gastrointestinal parasites in camels. *Vet Parasitol*, **82**: 173-178.
- Almeida MS, Torloni H, Lee-Ho P, Vilar MM, Thaumaturgo N, Simpson AJ y Tendler M (2003).** Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. *Parasite Immunol*, **25**: 135-137.
- Alvarez-Sánchez MA, Mainar-Jaime RC, Pérez-García J y Rojo-Vázquez FA (2006).** Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet Rec*, **159**: 424-425.
- Amstad P y Cerutti P (1990).** Genetic modulation of the cellular antioxidant defense capacity. *Environ Health Perspect*, **88**: 77-82.
- Andersen KR, Leksa NC y Schwartz TU (2013).** Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins*, **81**: 1857-1861.
- Anderson N, Luong TT, Vo NG, Bui KL, Smooker PM y Spithill TW (1999).** The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Vet Parasitol*, **83**: 15-24.
- Andrews SJ (1999).** The Life Cycle of *Fasciola hepatica*. En: DALTON JP (ed.) *Fasciolosis*. Wallingford, UK ; New York, NY, USA: CABI Pub., pp.: 1-29.
- ANSES (2018).** Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. *Disponible:* <http://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=FASCINEX+240>.
- Anugraha G, Madhumathi J, Prince PR, Prita PJ, Khatri VK, Amdare NP, Reddy MV y Kaliraj P (2015).** Chimeric epitope vaccine from multistage antigens for lymphatic filariasis. *Scand J Immunol*, **82**: 380-389.
- APVMA (2018).** Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. *Disponible:* <http://websvr.infopest.com.au/LabelRouter?LabelType=L&Mode=1&ProductCode=51262>.

- Assady M, Farahnak A, Golestani A y Esharghian M (2011).** Superoxide dismutase (SOD) enzyme activity assay in *Fasciola spp.* Parasites and liver tissue extract. *Iran J Parasitol*, **6**: 17-22.
- Azmi F, Ahmad Fuaad AAH, Skwarczynski M y Toth I (2014).** Recent progress in adjuvant discovery for peptide-based subunit vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, **10**: 778-796.
- Baeza E, Poitou I y Boulard C (1993).** In vitro effects of *Fasciola hepatica* on the main functions of polymorphonuclear leukocytes: chemotaxis and free radical generation induced by phagocytosis. *Int J Parasitol*, **23**: 1077-1081.
- Baska, P., Zawistowska-Deniziak A., Norbury L.J., Wiśniewski, M. y Januszkiewicz, K. (2019).** *Fasciola hepatica* isolates induce different immune responses in inmaturated bovine macrophages. *J Vet Res*, **63**: 63-70.
- Bastola R, Noh G, Keum T, Bashyal S, Seo JE, Choi J, Oh Y, Cho Y y Lee S (2017).** Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch Pharm Res*, **40**: 1238-1248.
- Baumjohann D y Ansel KM (2013).** MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nat Rev Immunol*, **13**: 666-678.
- Beckham SA, Law RH, Smooker PM, Quinsey NS, Caffrey CR, McKerrow JH, Pike RN y Spithill TW (2006).** Production and processing of a recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin B-like enzyme (FhcatB1) reveals potential processing mechanisms in the parasite. *Biol Chem*, **387**: 1053-1061.
- Beesley NJ, Caminade C, Charlier J, Flynn RJ, Hodgkinson JE, Martínez-Moreno A, Martínez-Valladares M, Pérez J, Rinaldi L y Williams DJL (2018).** *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound Emerg Dis*, **65 Suppl 1**: 199-216.
- Behm C y Sangster N (1999).** Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. En: DALTON J (ed.) *Fasciolosis*. Wallingford, UK ; New York, NY, USA: CABI Pub., pp.: xv, 544 p.
- Ben David A, Torgeman A, Barnea A y Zichel R (2015).** Expression, purification and characterization of the receptor-binding domain of botulinum neurotoxin serotype B as a vaccine candidate. *Protein Expr Purif*, **110**: 122-129.
- Bentancor A, Piacenza L y Carmona C (2002).** Immunization with cathepsin L proteinases CL1 and CL2 secreted by *Fasciola hepatica* elicit a preferential type 1 response based on IgG2a antibodies in rats. *J Helminthol*, **76**: 199-205.
- Berasain P, Goni F, McGonigle S, Dowd A, Dalton JP, Frangione B y Carmona C (1997).** Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J Parasitol*, **83**: 1-5.

- Biniössek ML, Nagler DK, Becker-Pauly C y Schilling O (2011).** Proteomic identification of protease cleavage sites characterizes prime and non-prime specificity of cysteine cathepsins B, L, and S. *J Proteome Res*, **10**: 5363-5373.
- Blanco E, Cubillos C, Moreno N, Barcena J, de la Torre BG, Andreu D y Sobrino F (2013).** B epitope multiplicity and B/T epitope orientation influence immunogenicity of foot-and-mouth disease peptide vaccines. *Clin Dev Immunol*, **2013**: 475960.
- Bolanos-Garcia VM y Davies OR (2006).** Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*, **1760**: 1304-1313.
- Boray JC (1969).** Experimental fascioliasis in Australia. *Adv Parasitol*, **7**: 95-210.
- Boray JC (1986).** Trematode infections of domestic animals. En: CAMPBELL WC y REW RS (eds.) *Chemotherapy of Parasitic Diseases*. Boston, MA: Springer US, pp.: 401-425.
- Borgsteede FH, Moll L, Vellema P y Gaasenbeek CP (2005).** Lack of reversion in triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Vet Rec*, **156**: 350-351.
- Bornhorst JA y Falke JJ (2000).** Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol*, **326**: 245-254.
- Borras-Cuesta F, Petit-Camurdan A y Fedon Y (1987).** Engineering of immunogenic peptides by co-linear synthesis of determinants recognized by B and T cells. *Eur J Immunol*, **17**: 1213-1215.
- Bossaert K, Jacquinet E, Saunders J, Farnir F y Losson B (2000).** Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*, **88**: 17-34.
- Bozas SE, Panaccio M, Creaney J, Dosen M, Parsons JC, Vlasuk GV, Walker ID y Spithill TW (1995).** Characterisation of a novel Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*, **74**: 19-29.
- Brady MT, O'Neill SM, Dalton JP y Mills KH (1999).** *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*, **67**: 5372-5378.
- Brizzard B (2008).** Epitope tagging. *Biotechniques*, **44**: 693-695.
- Brumeanu TD, Casares S, Bot A, Bot S y Bona CA (1997).** Immunogenicity of a contiguous T-B synthetic epitope of the A/PR/8/34 influenza virus. *J Virol*, **71**: 5473-5480.
- Buffoni L, Martínez-Moreno FJ, Zafra R, Mendes RE, Pérez-Écija A, Sekiya M, Mulcahy G, Pérez J y Martínez-Moreno A (2012).** Humoral immune response in goats immunised with cathepsin L1, peroxiredoxin and Sm14 antigen and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*, **185**: 315-321.
- Buffoni L, Zafra R, Pérez-Écija A, Martínez-Moreno FJ, Martínez-Galisteo E, Moreno T, Pérez J y Martínez-Moreno A (2010).** Immune response of goats immunised

- with glutathione S-transferase and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Int*, **59**: 147-153.
- Burakova Y, Madera R, McVey S, Schlup JR y Shi J (2018)**. Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunol*, **31**: 11-22.
- Burden DJ, Bland AP, Hammet NC y Hughes DL (1983)**. *Fasciola hepatica*: migration of newly excysted juveniles in resistant rats. *Exp Parasitol*, **56**: 277-288.
- Burster T y Boehm BO (2010)**. Processing and presentation of (pro)-insulin in the MHC class II pathway: the generation of antigen-based immunomodulators in the context of type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*, **26**: 227-238.
- Butler JE, Weber P, Sinkora M, Baker D, Schoenherr A, Mayer B y Francis D (2002)**. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VIII. Colonization is required for newborn piglets to make serum antibodies to T-dependent and type 2 T-independent antigens. *J Immunol*, **169**: 6822-6830.
- Buzzell GR (1983)**. Composition, secretion, and fate of the glands in the miracidium and sporocyst of *Fasciola hepatica* L. *J Helminthol*, **57**: 79-84.
- Byrne AW, Graham J, Brown C, Donaghy A, Guelbenzu-Gonzalo M, McNair J, Skuce RA, Allen A y McDowell SW (2018)**. Modelling the variation in skin-test tuberculin reactions, post-mortem lesion counts and case pathology in tuberculosis-exposed cattle: Effects of animal characteristics, histories and co-infection. *Transbound Emerg Dis*, **65**: 844-858.
- Caban-Hernández K y Espino AM (2013)**. Differential expression and localization of saposin-like protein 2 of *Fasciola hepatica*. *Acta Trop*, **128**: 591-597.
- Cancela M, Acosta D, Rinaldi G, Silva E, Duran R, Roche L, Zaha A, Carmona C y Tort JF (2008)**. A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie*, **90**: 1461-1475.
- Cancela M, Carmona C, Rossi S, Frangione B, Goni F y Berasain P (2004)**. Purification, characterization, and immunolocalization of paramyosin from the adult stage of *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res*, **92**: 441-448.
- Cancela M, Corvo I, E DAS, Teichmann A, Roche L, Díaz A, Tort JF, Ferreira HB y Zaha A (2017)**. Functional characterization of single-domain cystatin-like cysteine proteinase inhibitors expressed by the trematode *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **144**: 1695-1707.
- Cancela M, Santos GB, Carmona C, Ferreira HB, Tort JF y Zaha A (2015)**. *Fasciola hepatica* mucin-encoding gene: expression, variability and its potential relevance in host-parasite relationship. *Parasitology*, **142**: 1673-1681.
- Carasi P, Rodríguez E, da Costa V, Frigerio S, Brossard N, Noya V, Robello C, Anegón I y Freire T (2017)**. Heme-oxygenase-1 expression contributes to the immunoregulation induced by *Fasciola hepatica* and promotes infection. *Front Immunol*, **8**: 883.

- Carmona C, Dowd AJ, Smith AM y Dalton JP (1993).** Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol*, **62**: 9-17.
- Carmona C, McGonigle S, Dowd AJ, Smith AM, Coughlan S, McGowran E y Dalton JP (1994).** A dipeptidylpeptidase secreted by *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **109** (Pt 1): 113-118.
- Carmona C, Smith A, Dowd A y Dalton JP (1992).** A *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase prevents the adherence of eosinophils to newly excysted juveniles. *Biochem Soc Trans*, **20**: 85S.
- CE (2009).** Reglamento (CE) nº 470/2009 del parlamento europeo y del consejo de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal. DOUE L152: 11-22. *Recuperado de:* <https://boe.es/doue/2009/152/L00011-00022.pdf>.
- CE (2010).** Reglamento (CE) nº 37/2010 de la comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. DOUE L15: 1-72. *Recuperado de:* <https://boe.es/doue/2010/015/L00001-00072.pdf>.
- Cervi L, Rubinstein H y Masih DT (1996).** Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing suppression of the cellular immune responses. *Vet Parasitol*, **61**: 97-111.
- Chandra S y Singh TR (2012).** Linear B cell epitope prediction for epitope vaccine design against meningococcal disease and their computational validations through physicochemical properties. *Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics*, **1**: 153-159.
- Charbon JL, Spahni M, Wicki P y Pfister K (1991).** Cellular reactions in the small intestine of rats after infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res*, **77**: 425-429.
- Charlier J, Vercruyse J, Morgan E, van Dijk J y Williams DJ (2014).** Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitology*, **141**: 326-335.
- Chauvin A y Boulard C (1996).** Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite*, **3**: 209-215.
- Chauvin A, Moreau E y Boulard C (2001).** Responses of *Fasciola hepatica* infected sheep to various infection levels. *Vet Res*, **32**: 87-92.
- Chavali SR, Francis T y Campbell JB (1987).** An in vitro study of immunomodulatory effects of some saponins. *International Journal of Immunopharmacology*, **9**: 675-683.
- Chen X, Zaro JL y Shen WC (2013).** Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*, **65**: 1357-1369.

- Chistiakov DA, Orekhov AN, Sobenin IA y Bobryshev YV (2014).** Plasmacytoid dendritic cells: development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Front Physiol*, **5**: 279.
- Coffman RL, Sher A y Seder RA (2010).** Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*, **33**: 492-503.
- Cohen C, Lanar DE y Parry DA (1987).** Amino acid sequence and structural repeats in schistosome paramyosin match those of myosin. *Biosci Rep*, **7**: 11-16.
- Collins PR, Stack CM, O'Neill SM, Doyle S, Ryan T, Brennan GP, Mousley A, Stewart M, Maule AG, Dalton JP y Donnelly S (2004).** 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*, **279**: 17038-17046.
- Corbel C y Melchers F (1984).** The synergism of accessory cells and of soluble a-factors derived from them in the activation of B cells to proliferation. *Immunological Reviews*, **78**: 51-74.
- Cornelissen JB, Gaasenbeek CP, Boersma W, Borgsteede FH y van Milligen FJ (1999).** Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a highly specific peptide-based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Int J Parasitol*, **29**: 685-696.
- Cornelissen JB, Gaasenbeek CP, Borgsteede FH, Holland WG, Harmsen MM y Boersma WJ (2001).** Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *Int J Parasitol*, **31**: 728-737.
- Cotrin SS, Puzer L, de Souza Judice WA, Juliano L, Carmona AK y Juliano MA (2004).** Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides to define substrate specificity of carboxydipeptidases: assays with human cathepsin B. *Anal Biochem*, **335**: 244-252.
- Cox C y Coulter A (1992).** Advances in adjuvant technology and application. En: WK. Y (ed.) *Animal parasite control utilizing biotechnology*. CRC Press, pp.: 49-92.
- Creaney J, Wijffels GL, Sexton JL, Sandeman RM, Spithill TW y Parsons JC (1995).** *Fasciola hepatica*: localisation of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. *Exp Parasitol*, **81**: 106-116.
- Cribbs DH, Ghochikyan A, Vasilevko V, Tran M, Petrushina I, Sadzikava N, Babikyan D, Kessler P, Kieber-Emmons T, Cotman CW y Agadjanyan MG (2003).** Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int Immunol*, **15**: 505-514.
- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V y Genchi C (2006).** A dual anthelmintic treatment strategic scheme for the control of fasciolosis in dairy sheep farms. *Parasitol Res*, **99**: 700-705.

- Cunningham AL, Garçon N, Leo O, Friedland LR, Strugnell R, Laupèze B, Doherty M y Stern P (2016).** Vaccine development: From concept to early clinical testing. *Vaccine*, **34**: 6655-6664.
- Cwiklinski K y Dalton JP (2018).** Advances in *Fasciola hepatica* research using 'omics' technologies. *Int J Parasitol*.
- Cwiklinski K, O'Neill SM, Donnelly S y Dalton JP (2016).** A prospective view of animal and human Fasciolosis. *Parasite Immunol*.
- da Silva EZ, Jamur MC y Oliver C (2014).** Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem*, **62**: 698-738.
- Dalton JP (1999).** *Fasciolosis*. CABI Pub., p.
- Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP y Andrews SJ (1996).** Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun*, **64**: 5066-5074.
- Davies C y Goose J (1981).** Killing of newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica* in sensitized rats. *Parasite Immunol*, **3**: 81-96.
- De Bont J, Claerebout E, Riveau G, Schacht AM, Smets K, Conder G, Brake DA, Capron A y Vercruyse J (2003).** Failure of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental *Fasciola hepatica* infection. *Vet Parasitol*, **113**: 135-144.
- de Souza MQ, Galdino AS, dos Santos JC, Soares MV, de Nobrega YC, Alvares Ada C, de Freitas SM, Torres FA y Felipe MS (2013).** A recombinant multi-epitope protein for hepatitis B diagnosis. *Biomed Res Int*, **2013**: 148317.
- de Veer M, Kemp J, Chatelier J, Elhay MJ y Meeusen EN (2010).** The kinetics of soluble and particulate antigen trafficking in the afferent lymph, and its modulation by aluminum-based adjuvant. *Vaccine*, **28**: 6597-6602.
- Dewilde S, Ioanitescu AI, Kiger L, Gilany K, Marden MC, Van Doorslaer S, Vercruyse J, Pesce A, Nardini M, Bolognesi M y Moens L (2008).** The hemoglobins of the trematodes *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum epiclitum*: a molecular biological, physico-chemical, kinetic, and vaccination study. *Protein Sci*, **17**: 1653-1662.
- Di Maggio LS, Tirloni L, Pinto AF, Diedrich JK, Yates Iii JR, Benavides U, Carmona C, da Silva Vaz I, Jr. y Berasain P (2016).** Across intra-mammalian stages of the liver fluke *Fasciola hepatica*: a proteomic study. *Sci Rep*, **6**: 32796.
- Donnelly S, Dalton JP y Loukas A (2006).** Proteases in helminth- and allergen- induced inflammatory responses. *Chem Immunol Allergy*, **90**: 45-64.
- Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G y Dalton JP (2005).** Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect Immun*, **73**: 166-173.

- Donnelly S, O'Neill SM, Stack CM, Robinson MW, Turnbull L, Whitchurch C y Dalton JP (2010).** Helminth cysteine proteases inhibit TRIF-dependent activation of macrophages via degradation of TLR3. *J Biol Chem*, **285**: 3383-3392.
- Donnelly S, Stack CM, O'Neill SM, Sayed AA, Williams DL y Dalton JP (2008).** Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *Faseb j*, **22**: 4022-4032.
- Dowling DJ, Hamilton CM, Donnelly S, La Course J, Brophy PM, Dalton J y O'Neill SM (2010).** Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. *Infect Immun*, **78**: 793-801.
- Doy TG y Hughes DL (1984).** Early migration of immature *Fasciola hepatica* and associated liver pathology in cattle. *Res Vet Sci*, **37**: 219-222.
- Doy TG, Hughes DL y Harness E (1980).** The selective adherence of rat eosinophils to newly excysted *Fasciola hepatica* in vitro. *Res Vet Sci*, **29**: 98-101.
- Doy TG, Hughes DL y Harness E (1981).** Hypersensitivity in rats infected with *Fasciola hepatica*: possible role in protection against a challenge infection. *Res Vet Sci*, **30**: 360-363.
- Dudek NL, Perlmutter P, Aguilar MI, Croft NP y Purcell AW (2010).** Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Curr Pharm Des*, **16**: 3149-3157.
- Duffus WP y Franks D (1980).** In vitro effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. *Clin Exp Immunol*, **41**: 430-440.
- Duffus WP, Thorne K y Oliver R (1980).** Killing of juvenile *Fasciola hepatica* by purified bovine eosinophil proteins. *Clin Exp Immunol*, **40**: 336-344.
- Eggenreich B, Willim M, Wurm DJ, Herwig C y Spadiut O (2016).** Production strategies for active heme-containing peroxidases from *E. coli* inclusion bodies - a review. *Biotechnol Rep (Amst)*, **10**: 75-83.
- Elitok B, Elitok OM y Kabu M (2006).** Field trial on comparative efficacy of four fasciolicides against natural liver fluke infection in cattle. *Vet Parasitol*, **135**: 279-285.
- Elliott TP, Kelley JM, Rawlin G y Spithill TW (2015).** High prevalence of fasciolosis and evaluation of drug efficacy against *Fasciola hepatica* in dairy cattle in the Maffra and Bairnsdale districts of Gippsland, Victoria, Australia. *Vet Parasitol*, **209**: 117-124.
- Escamilla A, Bautista MJ, Zafra R, Pacheco IL, Ruiz MT, Martínez-Cruz S, Mendez A, Martínez-Moreno A, Molina-Hernández V y Pérez J (2016).** *Fasciola hepatica* induces eosinophil apoptosis in the migratory and biliary stages of infection in sheep. *Vet Parasitol*, **216**: 84-88.
- Escamilla A, Pérez-Caballero R, Zafra R, Bautista MJ, Pacheco IL, Ruiz MT, Martínez-Cruz MS, Martínez-Moreno A, Molina-Hernández V y Pérez J (2017).**

- Apoptosis of peritoneal leucocytes during early stages of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Vet Parasitol*, **238**: 49-53.
- Espino AM y Hillyer GV (2004)**. A novel *Fasciola hepatica* saposinlike recombinant protein with immunoprophylactic potential. *J Parasitol*, **90**: 876-879.
- Espino AM, Osuna A, Gil R y Hillyer GV (2005)**. *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*, **110**: 374-383.
- Espino AM y Rivera F (2010)**. Quantitation of cytokine mRNA by real-time RT-PCR during a vaccination trial in a rabbit model of fascioliasis. *Vet Parasitol*, **169**: 82-92.
- Estévez J, Leiro J, Sanmartín ML y Ubeira FM (1993)**. Isolation and partial characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, **105**: 275-281.
- Estévez J, Leiro J, Santamarina MT, Domínguez J y Ubeira FM (1994a)**. Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays. *Vet Immunol Immunopathol*, **41**: 353-366.
- Estévez J, Leiro J, Toranzo AE, Barja JL y Ubeira FM (1994b)**. Kinetics of Antibody-Production against Vibrio-Anguillarum Antigens in Turbot. *Aquaculture*, **123**: 191-196.
- Fairweather I y Boray JC (1999)**. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *Vet J*, **158**: 81-112.
- Fairweather I, Threadgold LT y Hanna B (1999)**. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. En: DALTON JP (ed.) *Fasciolosis*. Wallingford, UK ; New York, NY, USA: CABI Pub., pp.: xv, 544 p.
- Falcon CR, Masih D, Gatti G, Sánchez MC, Motran CC y Cervi L (2014)**. *Fasciola hepatica* Kunitz type molecule decreases dendritic cell activation and their ability to induce inflammatory responses. *PLoS One*, **9**: e114505.
- Faria AR, Veloso LD, Coura-Vital W, Reis AB, Damasceno LM, Gazzinelli RT y Andrade HM (2015)**. Novel recombinant multi-epitope proteins for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania infantum*-infected dogs. *Plos Neglected Tropical Diseases*, **9**.
- Fernandez-Robledo JA y Vasta GR (2010)**. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends Parasitol*, **26**: 244-254.
- Fernandez V, Estein S, Ortiz P, Luchessi P, Solana V y Solana H (2015)**. A single amino acid substitution in isozyme GST mu in Triclabendazole resistant *Fasciola hepatica* (Sligo strain) can substantially influence the manifestation of anthelmintic resistance. *Exp Parasitol*, **159**: 274-279.
- Figueroa-Santiago O, Delgado B y Espino AM (2011)**. *Fasciola hepatica* saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **70**: 355-361.

- Figueroa-Santiago O y Espino AM (2014).** *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein induces the alternative activation of human macrophages. *Infect Immun*, **82**: 5005-5012.
- Figueroa-Santiago O y Espino AM (2017).** *Fasciola hepatica* ESPs could indistinctly activate or block multiple toll-like receptors in a human monocyte cell line. *Ann Clin Pathol*, **5**.
- Fiss L, de Lourdes Adrien M, Marcolongo-Pereira C, Assis-Brasil ND, Sallis ES, Riet-Correa F, Ruas JL y Schild AL (2013).** Subacute and acute fasciolosis in sheep in southern Brazil. *Parasitol Res*, **112**: 883-887.
- Flebbe LM y Braley-Mullen H (1986).** Immunopotentiating effects of the adjuvants SGP and Quil A. I. Antibody responses to T-dependent and T-independent antigens. *Cell Immunol*, **99**: 119-127.
- Flynn RJ, Irwin JA, Olivier M, Sekiya M, Dalton JP y Mulcahy G (2007a).** Alternative activation of ruminant macrophages by *Fasciola hepatica*. *Vet Immunol Immunopathol*, **120**: 31-40.
- Flynn RJ, Mannion C, Golden O, Hacariz O y Mulcahy G (2007b).** Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infect Immun*, **75**: 1373-1381.
- Flynn RJ y Mulcahy G (2008).** Possible role for Toll-like receptors in interaction of *Fasciola hepatica* excretory/secretory products with bovine macrophages. *Infect Immun*, **76**: 678-684.
- Fonseca JA, Cabrera-Mora M, Kashentseva EA, Villegas JP, Fernandez A, Van Pelt A, Dmitriev IP, Curiel DT y Moreno A (2016).** A *Plasmodium* promiscuous T cell epitope delivered within the Ad5 hexon protein enhances the protective efficacy of a protein based malaria vaccine. *Plos One*, **11**.
- Foreyt WJ y Drew ML (2010).** Experimental infection of liver flukes, *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna*, in Bison (*Bison bison*). *J Wildl Dis*, **46**: 283-286.
- Forsstrom B, Axnas BB, Rockberg J, Danielsson H, Bohlin A y Uhlen M (2015).** Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One*, **10**: e0121673.
- Forthal DN (2014).** Functions of antibodies. *Microbiol Spectr*, **2**: Aid-0019-2014.
- Fu Y, Chryssafidis AL, Browne JA, O'Sullivan J, McGettigan PA y Mulcahy G (2016).** Transcriptomic study on ovine immune responses to *Fasciola hepatica* infection. *PLoS Negl Trop Dis*, **10**: e0005015.
- Fujii Y, Kaneko MK, Ogasawara S, Yamada S, Yanaka M, Nakamura T, Saidoh N, Yoshida K, Honma R y Kato Y (2017).** Development of RAP tag, a novel tagging system for protein detection and purification. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, **36**: 68-71.

- Garcia-Campos A, Baird AW y Mulcahy G (2016a).** Development of a versatile in vitro method for understanding the migration of *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles. *Parasitology*, **143**: 24-33.
- Garcia-Campos A, Ravida A, Nguyen DL, Cwiklinski K, Dalton JP, Hokke CH, O'Neill S y Mulcahy G (2016b).** Tegument glycoproteins and cathepsins of newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* carry mannosidic and paucimannosidic N-glycans. *PLoS Negl Trop Dis*, **10**: e0004688.
- Garza-Cuartero L, Geurden T, Mahan SM, Hardham JM, Dalton JP y Mulcahy G (2018).** Antibody recognition of cathepsin L1-derived peptides in *Fasciola hepatica*-infected and/or vaccinated cattle and identification of protective linear B-cell epitopes. *Vaccine*, **36**: 958-968.
- Gayo V, Cuervo P, Rosadilla D, Birriel S, Dell'Oca L, Trelles A, Cuore U y Mera y Sierra R (2011).** Natural *Fasciola hepatica* infection in nutria (*Myocastor coypus*) in Uruguay. *J Zoo Wildl Med*, **42**: 354-356.
- George SD, Vanhoff K, Baker K, Lake L, Rolfe PF, Seewald W y Emery DL (2017).** Application of a coproantigen ELISA as an indicator of efficacy against multiple life stages of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Vet Parasitol*, **246**: 60-69.
- Germain RN (2010).** Vaccines and the future of human immunology. *Immunity*, **33**: 441-450.
- Glauert AM, Lammas DA y Duffus WP (1985).** Ultrastructural observations on the interaction in vitro between bovine eosinophils and juvenile *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **91 ( Pt 3)**: 459-470.
- Golden O, Flynn RJ, Read C, Sekiya M, Donnelly SM, Stack C, Dalton JP y Mulcahy G (2010).** Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine*, **28**: 5551-5557.
- Golvano J, Lasarte JJ, Sarobe P, Gullon A, Prieto J y Borrás-Cuesta F (1990).** Polarity of immunogens: implications for vaccine design. *Eur J Immunol*, **20**: 2363-2366.
- Graczyk D y Fried B (1999).** Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. *En: DALTON JP (ed.) Fasciolosis*. Wallingford, UK ; New York, NY, USA: CABI Pub., pp.: xv, 544 p.
- Graham-Brown J, Hartley C, Clough H, Kadioglu A, Baylis M y Williams DJL (2018).** Dairy heifers naturally exposed to *Fasciola hepatica* develop a type 2 immune response and concomitant suppression of leukocyte proliferation. **86**.
- Gu Y, Sun X, Li B, Huang J, Zhan B y Zhu X (2017).** Vaccination with a paramyosin-based multi-epitope vaccine elicits significant protective immunity against *Trichinella spiralis* infection in mice. *Front Microbiol*, **8**: 1475.
- Guasconi L, Serradell MC y Masih DT (2012).** *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Vet Immunol Immunopathol*, **148**: 359-363.

- Gutierrez-Sánchez Mde L, Luna-Herrera J, Trejo-Castro L, Montenegro-Cristino N, Almanza-González A, Escobar-Gutierrez A y de la Rosa-Arana JL (2015).** Influence of levamisole and Freund's adjuvant on mouse immunisation with antigens of adults of the liver fluke *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758. *Folia Parasitol (Praha)*, **62**.
- Guzman E, Hope J, Taylor G, Smith AL, Cubillos-Zapata C y Charleston B (2014).** Bovine  $\gamma\delta$  T cells are a major regulatory T cell subset. *The Journal of Immunology Author Choice*, **193**: 208-222.
- Hacariz O, Sayers G, McCullough M, Garrett M, O'Donovan J y Mulcahy G (2009).** The effect of Quil A adjuvant on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine*, **27**: 45-50.
- Hamilton CM, Dowling DJ, Loscher CE, Morphey RM, Brophy PM y O'Neill SM (2009).** The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. *Infect Immun*, **77**: 2488-2498.
- Hanna RE (1980).** *Fasciola hepatica*: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Exp Parasitol*, **50**: 103-114.
- Hanna RE, McMahon C, Ellison S, Edgar HW, Kajugu PE, Gordon A, Irwin D, Barley JP, Malone FE, Brennan GP y Fairweather I (2015).** *Fasciola hepatica*: a comparative survey of adult fluke resistance to triclabendazole, nitroxylin and closantel on selected upland and lowland sheep farms in Northern Ireland using faecal egg counting, coproantigen ELISA testing and fluke histology. *Vet Parasitol*, **207**: 34-43.
- Hanna RE, Trudgett AG y Anderson A (1988).** *Fasciola hepatica*: development of monoclonal antibodies against somatic antigens and their characterization by ultrastructural localization of antibody binding. *J Helminthol*, **62**: 15-28.
- Haroun ET y Hillyer GV (1986).** Resistance to fascioliasis--a review. *Vet Parasitol*, **20**: 63-93.
- Harris DP, Vordermeier HM, Arya A, Bogdan K, Moreno C y Ivanyi J (1996).** Immunogenicity of peptides for B cells is not impaired by overlapping T-cell epitope topology. *Immunology*, **88**: 348-354.
- Heneberg P (2013).** Phylogenetic data suggest the reclassification of *Fasciola jacksoni* (Digenea: Fasciolidae) as *Fascioloides jacksoni* comb. nov. *Parasitol Res*, **112**: 1679-1689.
- Henker LC, Schwertz CI, Lucca NJ, Piva MM, Prior KC, Baska P, Norbury L, Januszkiwicz K, Dezen D, Duarte M, Moresco RN, Bertagnoli da Rosa L y Mendes RE (2017).** Immune protection conferred by recombinant MRLC (myosin regulatory light chain) antigen in TiterMax Gold(R) adjuvant against experimental fasciolosis in rats. *Vaccine*, **35**: 663-671.
- Henkle-Dührsen K y Kampkötter A (2001).** Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **114**: 129-142.

- Hernández-Guzman K, Sahagun-Ruiz A, Vallecillo AJ, Cruz-Mendoza I y Quiroz-Romero H (2016).** Construction and evaluation of a chimeric protein made from *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase and cathepsin L1. *J Helminthol*, **90**: 7-13.
- Hewitson JP y Maizels RM (2014).** Vaccination against helminth parasite infections. *Expert Rev Vaccines*, **13**: 473-487.
- Hillyer GV (2005).** *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J Helminthol*, **79**: 241-247.
- Hotez PJ y Gurwith M (2011).** Europe's neglected infections of poverty. *Int J Infect Dis*, **15**: e611-619.
- Howell AK, Tongue SC, Currie C, Evans J, Williams DJL y McNeilly TN (2018).** Co-infection with *Fasciola hepatica* may increase the risk of *Escherichia coli* O157 shedding in British cattle destined for the food chain. *Prev Vet Med*, **150**: 70-76.
- HPRA (2018).** Health Products Regulatory Authority. *Disponible:* [http://www.hpra.ie/img/uploaded/swedocuments/Licence\\_VPA22020-003-001\\_01062018115208.pdf](http://www.hpra.ie/img/uploaded/swedocuments/Licence_VPA22020-003-001_01062018115208.pdf).
- Huang L y Appleton JA (2016).** Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes. *Trends Parasitol*, **32**: 798-807.
- Hussein AN, Hassan IM y Khalifa RM (2010a).** Development and hatching mechanism of *Fasciola* eggs, light and scanning electron microscopic studies. *Saudi J Biol Sci*, **17**: 247-251.
- Hussein AN, Hassan IM y Khalifa RM (2010b).** Description of eggs and larval stages of *Fasciola*, light and scanning electron microscopic studies. *Research Journal of Parasitology*, **5**: 1-12.
- Iglesias-Piñeiro J, González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Córdoba M, González-Lanza C, Manga-González Y y Mezo M (2016).** Transmission of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in Galicia (Spain): Temporal follow-up in the intermediate and definitive hosts. *Parasit Vectors*, **9**: 610.
- Iglesias R, Parama A, Alvarez MF, Leiro J, Ubeira FM y Sanmartin ML (2003).** *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora:Scuticociliatida) expresses surface immobilization antigens that probably induce protective immune responses in turbot. *Parasitology*, **126**: 125-134.
- Jabbour-Zahab R, Pointier JP, Jourdane J, Jarne P, Oviedo JA, Bargues MD, Mas-Coma S, Angles R, Perera G, Balzan C, Khallayoune K y Renaud F (1997).** Phylogeography and genetic divergence of some lymnaeid snails, intermediate hosts of human and animal fascioliasis with special reference to lymnaeids from the Bolivian Altiplano. *Acta Trop*, **64**: 191-203.
- Jaikua W, Kueakhai P, Chaithirayanon K, Tanomrat R, Wongwairoi S, Riengrojpitak S, Sobhon P y Changklungmoa N (2016).** Cytosolic superoxide dismutase can provide protection against *Fasciola gigantica*. *Acta Trop*, **162**: 75-82.

- Japa O, Hodgkinson JE, Emes RD y Flynn RJ (2015).** TGF-beta superfamily members from the helminth *Fasciola hepatica* show intrinsic effects on viability and development. *Vet Res*, **46**: 29.
- Jaros S, Jaros D, Wesolowska A, Zygnier W y Wedrychowicz H (2010).** Blocking *Fasciola hepatica*'s energy metabolism - a pilot study of vaccine potential of a novel gene - phosphoglycerate kinase. *Vet Parasitol*, **172**: 229-237.
- Jarvik JW y Telmer CA (1998).** Epitope tagging. *Annu Rev Genet*, **32**: 601-618.
- Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW y Smooker PM (2009).** Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet Parasitol*, **160**: 230-236.
- Jedlina L, Kozak-Ljunggren M y Wedrychowicz H (2011).** In vivo studies of the early, peritoneal, cellular and free radical response in rats infected with *Fasciola hepatica* by flow cytometric analysis. *Exp Parasitol*, **128**: 291-297.
- Jefferies JR, Campbell AM, van Rossum AJ, Barrett J y Brophy PM (2001).** Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics*, **1**: 1128-1132.
- Jefferies JR, Corbett E, Barrett J y Turner RJ (1996).** Polarization and chemokinesis of ovine and human neutrophils in response to *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Int J Parasitol*, **26**: 409-414.
- Jefferies JR, Turner RJ y Barrett J (1997).** Effect of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products on the metabolic burst of sheep and human neutrophils. *Int J Parasitol*, **27**: 1025-1029.
- Jones A (2005).** Family Fasciolidae Railliet, 1895. *Keys to the Trematoda: Volume 2*. CABI Publ. pp: 79-85.
- Kaba SA, Price A, Zhou Z, Sundaram V, Schnake P, Goldman IF, Lal AA, Udhayakumar V y Todd CW (2008).** Immune responses of mice with different genetic backgrounds to improved multiepitope, multitarget malaria vaccine candidate antigen FALVAC-1A. *Clin Vaccine Immunol*, **15**: 1674-1683.
- Kalbe M, Haberl B y Haas W (2000).** Snail host finding by *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata*: compound analysis of "miracidia-attracting glycoproteins". *Exp Parasitol*, **96**: 231-242.
- Keegan PS y Trudgett A (1992).** *Fasciola hepatica* in the rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. *Parasite Immunol*, **14**: 657-669.
- Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, Anderson G, Skuce P y Spithill TW (2016).** Current threat of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol*, **32**: 458-469.
- Kesik-Brodacka M, Lipiec A, Kozak Ljunggren M, Jedlina L, Miedzinska K, Mikolajczak M, Plucienniczak A, Legocki AB y Wedrychowicz H (2017).** Immune response of rats vaccinated orally with various plant-expressed recombinant cysteine

- proteinase constructs when challenged with *Fasciola hepatica* metacercariae. *PLoS Negl Trop Dis*, **11**: e0005451.
- Khaznadji E, Collins P, Dalton JP, Bigot Y y Moire N (2005)**. A new multi-domain member of the cystatin superfamily expressed by *Fasciola hepatica*. *Int J Parasitol*, **35**: 1115-1125.
- Kim A, Boronina TN, Cole RN, Darrah E y Sadegh-Nasseri S (2017)**. Distorted immunodominance by linker sequences or other epitopes from a second protein antigen during antigen-processing. *Sci Rep*, **7**: 46418.
- Kimple ME, Brill AL y Pasker RL (2013)**. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr Protoc Protein Sci*, **73**: Unit 9 9.
- Klion AD y Nutman TB (2004)**. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol*, **113**: 30-37.
- Knudsen NP, Olsen A, Buonsanti C, Follmann F, Zhang Y, Coler RN, Fox CB, Meinke A, D'Oro U, Casini D, Bonci A, Billeskov R, De Gregorio E, Rappuoli R, Harandi AM, Andersen P y Agger EM (2016)**. Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens. *Sci Rep*, **6**: 19570.
- Kofta W, Mieszczanek J, Plucienniczak G y Wedrychowicz H (2000)**. Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. *Vaccine*, **18**: 2985-2990.
- Koutsogiannouli EA, Moutou KA, Stamatis C y Mamuris Z (2016)**. MHC class II DRB1 and DQA2 gene polymorphisms in four indigenous breeds of sheep (*Ovis aries*). *Mammalian Biology*, **81**: 628-636.
- Krump L, Hamilton CM, Sekiya M, O'Neill R y Mulcahy G (2014)**. The effect of *Fasciola hepatica* infection on respiratory vaccine responsiveness in calves. *Vet Parasitol*, **201**: 31-39.
- Kuerpick B, Schnieder T y Strube C (2013)**. Evaluation of a recombinant cathepsin L1 ELISA and comparison with the Pourquier and ES ELISA for the detection of antibodies against *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*, **193**: 206-213.
- Labruna MB, Costa FB, Port-Carvalho M, Oliveira AS, Souza SLP y Castro MB (2018)**. Lethal fascioliasis in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. *J Parasitol*, **104**: 173-176.
- LaCourse EJ, Perally S, Morphew RM, Moxon JV, Prescott M, Dowling DJ, O'Neill SM, Kipar A, Hetzel U, Hoey E, Zafra R, Buffoni L, Pérez Arevalo J y Brophy PM (2012)**. The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis*, **6**: e1666.
- Laemmli UK (1970)**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lalrinkima H, Raina OK, Chandra D, Jacob SS, Bauri RK, Chandra S, Yadav HS, Singh MN, Rialch A, Varghese A, Banerjee PS, Kaur N y Sharma A (2015)**.

- Isolation and characterization of Cu/Zn-superoxide dismutase in *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol*, **151-152**: 1-7.
- Lecaille F, Kaleta J y Bromme D (2002)**. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev*, **102**: 4459-4488.
- Lee CG, Zimmerman GL y Duimstra JR (1992)**. Light and scanning electron microscopic studies of the extrahepatic bile duct of sheep with experimentally induced *Fasciola hepatica* infection. *Am J Vet Res*, **53**: 796-800.
- Leiro J, Ortega M, Estévez J, Santamarina MT, Sanmartin ML y Ubeira FM (1996)**. The humoral immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* L., to spore-surface antigens of microsporidian parasites. *Vet Immunol Immunopathol*, **55**: 235-242.
- Li YX, Zhao H, Cao RY, Deng YQ, Han JF, Zhu SY, Ma J, Liu L, Qin ED y Qin CF (2014)**. Recombinant tandem multi-linear neutralizing epitopes of human enterovirus 71 elicited protective immunity in mice. *Virology*, **11**: 79.
- Liberman AC, Refojo D y Arzt E (2003)**. Cytokine signaling/transcription factor cross-talk in T cell activation and Th1-Th2 differentiation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **51**: 351-365.
- Lindblad EB (2004)**. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol*, **82**: 497-505.
- Liu D y Reeves PR (1994)**. *Escherichia coli* K12 regains its O antigen. *Microbiology*, **140** (Pt 1): 49-57.
- Liu Q, Huang SY, Yue DM, Wang JL, Wang Y, Li X y Zhu XQ (2017a)**. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products (FhESPs) involved in interacting with host PBMCs and cytokines by shotgun LC-MS/MS. *Parasitol Res*, **116**: 627-635.
- Liu X, Zhang H, Jiao C, Liu Q, Zhang Y y Xiao J (2017b)**. Flagellin enhances the immunoprotection of formalin-inactivated *Edwardsiella tarda* vaccine in turbot. *Vaccine*, **35**: 369-374.
- Liu Z, Wang Z y Chen YH (2005)**. Predefined spacers between epitopes on a recombinant epitope-peptide impacted epitope-specific antibody response. *Immunol Lett*, **97**: 41-45.
- Livingston B, Crimi C, Newman M, Higashimoto Y, Appella E, Sidney J y Sette A (2002)**. A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *J Immunol*, **168**: 5499-5506.
- Lo-Man R, Langeveld JP, Martineau P, Hofnung M, Meloen RH y Leclerc C (1998)**. Immunodominance does not result from peptide competition for MHC class II presentation. *J Immunol*, **160**: 1759-1766.
- López-Aban J, Casanueva P, Nogal J, Arias M, Morrondo P, Diez-Banos P, Hillyer GV, Martínez-Fernández AR y Muro A (2007)**. Progress in the development of

- Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Vet Parasitol*, **145**: 287-296.
- López-Aban J, Esteban A, Vicente B, Rojas-Caraballo J, del Olmo E, Martínez-Fernandez AR, Hillyer GV y Muro A (2012)**. 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*, **98**: 527-535.
- Lotfy WM, Brant SV, DeJong RJ, Le TH, Demiaszkiewicz A, Rajapakse RP, Perera VB, Laursen JR y Loker ES (2008)**. Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *Am J Trop Med Hyg*, **79**: 248-255.
- Lowenadler B, Lycke N, Svanholm C, Svennerholm AM, Krook K y Gidlund M (1992)**. T-Cell and B-Cell responses to chimeric proteins containing heterologous T-helper epitopes inserted at different positions. *Molecular Immunology*, **29**: 1185-1190.
- Lowther J, Robinson MW, Donnelly SM, Xu W, Stack CM, Matthews JM y Dalton JP (2009)**. The importance of pH in regulating the function of the *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine protease. *PLoS Negl Trop Dis*, **3**: e369.
- Magadan S, Sunyer OJ y Boudinot P (2015)**. Unique features of fish immune repertoires: Particularities of adaptive immunity within the largest group of vertebrates. *Pathogen-Host Interactions: Antigenic Variation V. Somatic Adaptations*, **57**: 235-264.
- Maggioli G, Acosta D, Silveira F, Rossi S, Giacaman S, Basika T, Gayo V, Rosadilla D, Roche L, Tort J y Carmona C (2011a)**. The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine*, **29**: 9057-9063.
- Maggioli G, Bottini G, Basika T, Alonzo P, Salinas G y Carmona C (2016)**. Immunization with *Fasciola hepatica* thioredoxin glutathione reductase failed to confer protection against fasciolosis in cattle. *Vet Parasitol*, **224**: 13-19.
- Maggioli G, Silveira F, Martín-Alonso JM, Salinas G, Carmona C y Parra F (2011b)**. A recombinant thioredoxin-glutathione reductase from *Fasciola hepatica* induces a protective response in rabbits. *Exp Parasitol*, **129**: 323-330.
- Malone JB, Ramsey RT y Loyacano AF (1984)**. Efficacy of clorsulon for treatment of mature naturally acquired and 8-week-old experimentally induced *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Am J Vet Res*, **45**: 851-854.
- Mamula MJ y Janeway CA, Jr. (1993)**. Do B cells drive the diversification of immune responses? *Immunol Today*, **14**: 151-152; discussion 153-154.
- Marcilla A, De la Rubia JE, Sotillo J, Bernal D, Carmona C, Villavicencio Z, Acosta D, Tort J, Bornay FJ, Esteban JG y Toledo R (2008)**. Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections. *Clin Vaccine Immunol*, **15**: 95-100.

- Martínez-Fernández AR, Nogal-Ruiz JJ, López-Aban J, Ramajo V, Oleaga A, Manga-González Y, Hillyer GV y Muro A (2004).** Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Vet Parasitol*, **126**: 287-298.
- Martínez-Ibeas AM, González-Warleta M, Martínez-Valladares M, Castro-Hermida JA, González-Lanza C, Minambres B, Ferreras C, Mezo M y Manga-González MY (2013).** Development and validation of a mtDNA multiplex PCR for identification and discrimination of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in the *Galba truncatula* snail. *Vet Parasitol*, **195**: 57-64.
- Martínez-Moreno A, Jimenez-Luque V, Camara S, Martínez-Moreno FJ, Acosta I y Hernández S (2000).** Oxidative responses during bacterial phagocytosis of polymorphonuclear leucocytes in primarily and secondarily *Fasciola hepatica* infected goats. *Int J Parasitol*, **30**: 1013-1017.
- Martínez-Sernández V, Mezo M, González-Warleta M, Perteguer MJ, Gárate T, Romarís F y Ubeira FM (2017a).** Delineating distinct heme-scavenging and binding functions of domains in MF6p/HDM proteins from parasitic flatworms. *J Biol Chem*.
- Martínez-Sernández V, Mezo M, González-Warleta M, Perteguer MJ, Muiño L, Guitián E, Gárate T y Ubeira FM (2014).** The MF6p/FhHDM-1 major antigen secreted by the trematode parasite *Fasciola hepatica* is a heme-binding protein. *J Biol Chem*, **289**: 1441-1456.
- Martínez-Sernández V, Muiño L, Perteguer MJ, Gárate T, Mezo M, González-Warleta M, Muro A, Correia da Costa JM, Romarís F y Ubeira FM (2011).** Development and evaluation of a new lateral flow immunoassay for serodiagnosis of human fasciolosis. *PLoS Negl Trop Dis*, **5**: e1376.
- Martínez-Sernández V, Orbegozo-Medina RA, González-Warleta M, Mezo M y Ubeira FM (2016).** Rapid enhanced MM3-COPRO ELISA for detection of *Fasciola* coproantigens. *PLoS Negl Trop Dis*, **10**: e0004872.
- Martínez-Sernández V, Perteguer MJ, Hernández-González A, Mezo M, González-Warleta M, Orbegozo-Medina RA, Romarís F, Paniagua E, Gárate T y Ubeira FM (2018).** Comparison of recombinant cathepsins L1, L2, and L5 as ELISA targets for serodiagnosis of bovine and ovine fascioliasis. *Parasitol Res*, **117**: 1521-1534.
- Martínez-Sernández V, Perteguer MJ, Mezo M, González-Warleta M, Gárate T, Valero MA y Ubeira FM (2017b).** *Fasciola* spp: Mapping of the MF6 epitope and antigenic analysis of the MF6p/HDM family of heme-binding proteins. *PLoS One*, **12**: e0188520.
- Martínez FO y Gordon S (2014).** The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *FI1000Prime Rep*, **6**: 13.
- Mas-Coma MS y Bargues MD (1997).** Human Liver Flukes: a review. *Research and Reviews in Parasitology*, **57**: 145-218.

- Mas-Coma S, Valero MA y Bargues MD (2009).** Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol*, **69**: 41-146.
- Mas-Coma S, Valero MA y Bargues MD (2014).** Fascioliasis. *Adv Exp Med Biol*, **766**: 77-114.
- Matanovic K, Severin K, Martinkovic F, Simpraga M, Janicki Z y Barisic J (2007).** Hematological and biochemical changes in organically farmed sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res*, **101**: 1657-1661.
- McAllister HC, Nisbet AJ, Skuce PJ y Knox DP (2011).** Using lectins to identify hidden antigens in *Fasciola hepatica*. *J Helminthol*, **85**: 121-127.
- McCole DF, Doherty ML, Torgerson PR y Baird AW (1998).** Local immune responses in colon from cattle infected with *Fasciola hepatica*. *Int J Parasitol*, **28**: 1733-1737.
- McGonigle L, Mousley A, Marks NJ, Brennan GP, Dalton JP, Spithill TW, Day TA y Maule AG (2008).** The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *Int J Parasitol*, **38**: 149-155.
- McGonigle S, Curley GP y Dalton JP (1997).** Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **115** ( Pt 1): 101-104.
- McKellar QA y Kinabo LD (1991).** The pharmacology of flukicidal drugs. *Br Vet J*, **147**: 306-321.
- McNeilly TN y Nisbet AJ (2014).** Immune modulation by helminth parasites of ruminants: implications for vaccine development and host immune competence. *Parasite*, **21**: 51.
- Meeusen E, Lee CS, Rickard MD y Brandon MR (1995).** Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunol*, **17**: 37-45.
- Mendes RE, Pérez-Écija RA, Zafra R, Buffoni L, Martínez-Moreno A, Dalton JP, Mulcahy G y Pérez J (2010).** Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vaccine*, **28**: 2832-2840.
- Mezo M, González-Warleta M, Carro C y Ubeira FM (2004).** An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *J Parasitol*, **90**: 845-852.
- Mezo M, González-Warleta M, Ubeira FM (2003).** Optimized serodiagnosis of sheep fascioliasis by Fast-D protein liquid chromatography fractionation of *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens. *J Parasitol*, **89**: 843-849.
- Mezo M, González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Carro C y Ubeira FM (2010a).** Kinetics of anti-*Fasciola* IgG antibodies in serum and milk from dairy cows during

- lactation, and in serum from calves after feeding colostrum from infected dams. *Vet Parasitol*, **168**: 36-44.
- Mezo M, González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Manga-González MY, Peixoto R, Mas-Coma S y Valero MA (2013)**. The wild boar (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) as secondary reservoir of *Fasciola hepatica* in Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol*, **198**: 274-283.
- Mezo M, González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Muiño L y Ubeira FM (2010b)**. Field evaluation of the MM3-SERO ELISA for detection of anti-*Fasciola* IgG antibodies in milk samples from individual cows and bulk milk tanks. *Parasitol Int*, **59**: 610-615.
- Mezo M, González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Muiño L y Ubeira FM (2011)**. Association between anti-*F. hepatica* antibody levels in milk and production losses in dairy cows. *Vet Parasitol*, **180**: 237-242.
- Mezo M, González-Warleta M, Castro-Hermida JA y Ubeira FM (2008)**. Evaluation of the flukicide treatment policy for dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol*, **157**: 235-243.
- Mezo M, González-Warleta M y Ubeira FM (2007)**. The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fascioliasis. *J Parasitol*, **93**: 65-72.
- Milbourne EA y Howell MJ (1990)**. Eosinophil responses to *Fasciola hepatica* in rodents. *Int J Parasitol*, **20**: 705-708.
- Moazeni M y Ahmadi A (2016)**. Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol*, **169**: 81-89.
- Mokhtarian K, Akhlaghi L, Mohammadi M, Meamar AR, Razmjou E, Khoshmirsafa M y Falak R (2016)**. Evaluation of anti-Cathepsin L1: a more reliable method for serodiagnosis of human fasciolosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **110**: 542-550.
- Molina-Hernández V, Mulcahy G, Pérez J, Martínez-Moreno A, Donnelly S, O'Neill SM, Dalton JP y Cwiklinski K (2015)**. *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Vet Parasitol*, **208**: 101-111.
- Mooney L, Good B, Hanrahan JP, Mulcahy G y de Waal T (2009)**. The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. *Vet Parasitol*, **164**: 201-205.
- Moreau E y Chauvin A (2010)**. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J Biomed Biotechnol*, **2010**: 428593.
- Moreau E, Herve S, Yu ZW y Alain C (2002)**. Modulation of sheep lymphocyte responses by *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Vet Parasitol*, **108**: 207-215.
- Morphew RM, Hamilton CM, Wright HA, Dowling DJ, O'Neill SM y Brophy PM (2013)**. Identification of the major proteins of an immune modulating fraction from adult *Fasciola hepatica* released by Nonidet P40. *Vet Parasitol*, **191**: 379-385.

- Morphew RM, Wright HA, LaCourse EJ, Woods DJ y Brophy PM (2007).** Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during in vitro culture ex host. *Mol Cell Proteomics*, **6**: 963-972.
- Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T y Spithill TW (1996).** Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine*, **14**: 1603-1612.
- Mucci J, Carmona SJ, Volcovich R, Altechh J, Bracamonte E, Marco JD, Nielsen M, Buscaglia CA y Agüero F (2017).** Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. *PLoS Negl Trop Dis*, **11**: e0005972.
- Muiño L, Perteguer MJ, Gárate T, Martínez-Sernández V, Beltrán A, Romarís F, Mezo M, González-Warleta M y Ubeira FM (2011).** Molecular and immunological characterization of *Fasciola* antigens recognized by the MM3 monoclonal antibody. *Mol Biochem Parasitol*, **179**: 80-90.
- Mulcahy G, Joyce P y Dalton J (1999a).** Immunology of *Fasciola hepatica* infection. En: DALTON JP (ed.) *Fasciolosis*. Wallingford, UK ; New York, NY, USA: CABI Pub., pp.: 341-376.
- Mulcahy G y Dalton JP (2001).** Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res Vet Sci*, **70**: 83-86.
- Mulcahy G, O'Connor F, Clery D, Hogan SF, Dowd AJ, Andrews SJ y Dalton JP (1999b).** Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Res Vet Sci*, **67**: 27-33.
- Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ y Dalton JP (1998).** Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine*, **16**: 932-939.
- Muraille E, Leo O y Moser M (2014).** TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front Immunol*, **5**: 603.
- Muro A, Ramajo V, López J, Simon F y Hillyer GV (1997).** *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol*, **69**: 219-229.
- Murugan N y Dai Y (2005).** Prediction of MHC class II binding peptides based on an iterative learning model. *Immunome Res*, **1**: 6.
- Mutapi F, Billingsley PF y Secor WE (2013).** Infection and treatment immunizations for successful parasite vaccines. *Trends Parasitol*, **29**: 135-141.
- Naranjo Lucena A, Garza Cuartero L, Mulcahy G y Zintl A (2017).** The immunoregulatory effects of co-infection with *Fasciola hepatica*: From bovine tuberculosis to Johne's disease. *Vet J*, **222**: 9-16.

- Newman MA, Mainhart CR, Mallett CP, Lavoie TB y Smith-Gill SJ (1992).** Patterns of antibody specificity during the BALB/c immune response to hen eggwhite lysozyme. *J Immunol*, **149**: 3260-3272.
- Newton SE y Meeusen EN (2003).** Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Parasite Immunol*, **25**: 283-296.
- Nezafat N, Karimi Z, Eslami M, Mohkam M, Zandian S y Ghasemi Y (2016).** Designing an efficient multi-epitope peptide vaccine against *Vibrio cholerae* via combined immunoinformatics and protein interaction based approaches. *Comput Biol Chem*, **62**: 82-95.
- Norbury LJ, Basalaj K, Zawistowska-Deniziak A, Sielicka A, Wilkowski P, Wesolowska A, Smooker PM y Wedrychowicz H (2018).** 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*, **258**: 14-23.
- Norbury LJ, Beckham S, Pike RN, Grams R, Spithill TW, Fecondo JV y Smooker PM (2011).** Adult and juvenile *Fasciola* cathepsin L proteases: different enzymes for different roles. *Biochimie*, **93**: 604-611.
- Norbury LJ, Hung A, Beckham S, Pike RN, Spithill TW, Craik CS, Choe Y, Fecondo JV y Smooker PM (2012).** Analysis of *Fasciola* cathepsin L5 by S2 subsite substitutions and determination of the P1-P4 specificity reveals an unusual preference. *Biochimie*, **94**: 1119-1127.
- Novobilský A, Amaya Solis N, Skarin M y Höglund J (2016).** Assessment of flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep in Sweden in the absence of a standardised test. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **6**: 141-147.
- Novobilský A y Höglund J (2015).** First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **5**: 172-177.
- Noya V, Brossard N, Berasain P, Rodríguez E, Chiale C, Mazal D, Carmona C y Freire T (2015).** A mucin-like peptide from *Fasciola hepatica* induces parasite-specific Th1-type cell immunity. *Parasitol Res*.
- Noya V, Brossard N, Rodríguez E, Dergan-Dylon LS, Carmona C, Rabinovich GA y Freire T (2017).** A mucin-like peptide from *Fasciola hepatica* instructs dendritic cells with parasite specific Th1-polarizing activity. *Sci Rep*, **7**: 40615.
- Oda K, Matsuda H, Murakami T, Katayama S, Ohgitani T y Yoshikawa M (2000).** Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol Chem*, **381**: 67-74.
- Olson PD, Cribb TH, Tkach VV, Bray RA y Littlewood DT (2003).** Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *Int J Parasitol*, **33**: 733-755.

- Overend DJ y Bowen FL (1995).** Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J*, **72**: 275-276.
- Pacheco IL, Abril N, Morales-Prieto N, Bautista MJ, Zafra R, Escamilla A, Ruiz MT, Martínez-Moreno A y Pérez J (2017).** Th1/Th2 balance in the liver and hepatic lymph nodes of vaccinated and unvaccinated sheep during acute stages of infection with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*.
- Pacheco IL, Abril N, Zafra R, Molina-Hernández V, Morales-Prieto N, Bautista MJ, Ruiz-Campillo MT, Pérez-Caballero R, Martínez-Moreno A y Pérez J (2018).** *Fasciola hepatica* induces Foxp3 T cell, proinflammatory and regulatory cytokine overexpression in liver from infected sheep during early stages of infection. *Vet Res*, **49**: 56.
- Park JY, Kim M-G, Shim G y Oh Y-K (2016).** Lipid-based antigen delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, **46**: 295-304.
- Parker DC (1993).** T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol*, **11**: 331-360.
- Parr SL y Gray JS (2000).** A strategic dosing scheme for the control of fasciolosis in cattle and sheep in Ireland. *Vet Parasitol*, **88**: 187-197.
- Pérez-Écija RA, Mendes RE, Zafra R, Buffonni L, Martínez-Moreno A y Pérez J (2010).** Pathological and parasitological protection in goats immunised with recombinant cathepsin L1 and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet J*, **185**: 351-353.
- Pérez J, Ortega J, Moreno T, Morrondo P, López-Sandez C y Martínez-Moreno A (2002).** Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *J Comp Pathol*, **127**: 30-36.
- Perteguer MJ, Rodríguez E, Romarís F, Escalante M, Bonay P, Ubeira FM y Gárate MT (2004).** Minor interspecies variations in the sequence of the gp53 TSL-1 antigen of *Trichinella* define species-specific immunodominant epitopes. *Mol Immunol*, **41**: 421-433.
- Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP y Carmona C (1999).** Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun*, **67**: 1954-1961.
- Piacenza L, Radi R, Goni F y Carmona C (1998).** CuZn superoxide dismutase activities from *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **117 ( Pt 6)**: 555-562.
- Piazzon C, Lamas J, Castro R, Budino B, Cabaleiro S, Sanmartin M y Leiro J (2008).** Antigenic and cross-protection studies on two turbot scuticociliate isolates. *Fish Shellfish Immunol*, **25**: 417-424.
- Piedrafita D, Estuningsih E, Pleasance J, Prowse R, Raadsma HW, Meeusen EN y Spithill TW (2007).** Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity in vitro against newly excysted

- juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infect Immun*, **75**: 1954-1963.
- Pinheiro CS, Ribeiro AP, Cardoso FC, Martins VP, Figueiredo BC, Assis NR, Morais SB, Caliarí MV, Loukas A y Oliveira SC (2014)**. A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. *Parasite Immunol*, **36**: 303-312.
- Pleasance J, Wiedosari E, Raadsma HW, Meeusen E y Piedrafita D (2011)**. Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. *Parasite Immunol*, **33**: 495-505.
- Poitou I, Baeza E y Boulard C (1993)**. Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*, **49**: 179-190.
- Pulendran B y Ahmed R (2011)**. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol*, **12**: 509-517.
- Purcell AW, McCluskey J y Rossjohn J (2007)**. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov*, **6**: 404-414.
- Puslednik L, Ponder WF, Dowton M y Davis AR (2009)**. Examining the phylogeny of the Australasian Lymnaeidae (Heterobranchia: Pulmonata: Gastropoda) using mitochondrial, nuclear and morphological markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**: 643-659.
- Qi H (2016)**. T follicular helper cells in space-time. *Nature Reviews Immunology*, **16**: 612.
- Raadsma HW, Kingsford NM, Suharyanta, Spithill TW y Piedrafita D (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.
- Radio S, Fontenla S, Solana V, Matos Salim AC, Araujo FMG, Ortiz P, Hoban C, Miranda E, Gayo V, Pais FS, Solana H, Oliveira G, Smircich P y Tort JF (2018)**. Pleiotropic alterations in gene expression in Latin American *Fasciola hepatica* isolates with different susceptibility to drugs. *Parasit Vectors*, **11**: 56.
- Raina OK, Nagar G, Varghese A, Prajitha G, Alex A, Maharana BR y Joshi P (2011)**. Lack of protective efficacy in buffaloes vaccinated with *Fasciola gigantica* leucine aminopeptidase and peroxiredoxin recombinant proteins. *Acta Trop*, **118**: 217-222.
- Rajput ZI, Hu S-h, Xiao C-w y Arijo AG (2007)**. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, **8**: 153-161.
- Ramajo V, Oleaga A, Casanueva P, Hillyer GV y Muro A (2001)**. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with homologous fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol*, **97**: 35-46.

- Ramos-Benitez MJ, Ruiz-Jimenez C, Aguayo V y Espino AM (2017).** Recombinant *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein suppresses toll-like receptor stimulation in response to multiple bacterial ligands. *Sci Rep*, **7**: 5455.
- Ranasinghe SL, Duke M, Harvie M y McManus DP (2018).** Kunitz-type protease inhibitor as a vaccine candidate against schistosomiasis mansoni. *Int J Infect Dis*, **66**: 26-32.
- Rathinasamy V, Hosking C, Tran L, Kelley J, Williamson G, Swan J, Elliott T, Rawlin G, Beddoe T y Spithill TW (2018).** Development of a multiplex quantitative PCR assay for detection and quantification of DNA from *Fasciola hepatica* and the intermediate snail host, *Austropeplea tomentosa*, in water samples. *Sci Rep*, **259**: 17-24.
- Ravida A, Aldridge AM, Driessen NN, Heus FA, Hokke CH y O'Neill SM (2016a).** *Fasciola hepatica* surface coat glycoproteins contain mannosylated and phosphorylated N-glycans and exhibit immune modulatory properties independent of the mannose receptor. *PLoS Negl Trop Dis*, **10**: e0004601.
- Ravida A, Cwiklinski K, Aldridge AM, Clarke P, Thompson R, Gerlach JQ, Kilcoyne M, Hokke CH, Dalton JP y O'Neill SM (2016b).** *Fasciola hepatica* surface tegument: glycoproteins at the interface of parasite and host. *Mol Cell Proteomics*.
- Reddington JJ, Leid RW y Wescott RB (1984).** A review of the antigens of *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*, **14**: 209-229.
- Reddington JJ, Leid RW y Wescott RB (1986).** The susceptibility of the goat to *Fasciola hepatica* infections. *Vet Parasitol*, **19**: 145-150.
- Reddy Chichili VP, Kumar V y Sivaraman J (2013).** Linkers in the structural biology of protein-protein interactions. *Protein Sci*, **22**: 153-167.
- Reed MB, Strugnell RA, Panaccio M y Spithill TW (2000).** A novel member of the NK-lysin protein family is developmentally regulated and secreted by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*, **105**: 297-303.
- Reed SG, Orr MT y Fox CB (2013).** Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med*, **19**: 1597-1608.
- Reinhard EG (1957).** Landmarks of parasitology. I. The discovery of the life cycle of the liver fluke. *Exp Parasitol*, **6**: 208-232.
- Reszka N, Cornelissen JB, Harmsen MM, Bienkowska-Szewczyk K, de Bree J, Boersma WJ y Rijsewijk FA (2005).** *Fasciola hepatica* procathepsin L3 protein expressed by a baculovirus recombinant can partly protect rats against fasciolosis. *Vaccine*, **23**: 2987-2993.
- Rivera F y Espino AM (2016).** Adjuvant-enhanced antibody and cellular responses to inclusion bodies expressing FhSAP2 correlates with protection of mice to *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol*, **160**: 31-38.

- Robichon C, Luo J, Causey TB, Benner JS y Samuelson JC (2011).** Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Appl Environ Microbiol*, **77**: 4634-4646.
- Robinson MW, Alvarado R, To J, Hutchinson AT, Dowdell SN, Lund M, Turnbull L, Whitchurch CB, O'Brien BA, Dalton JP y Donnelly S (2012).** A helminth cathelicidin-like protein suppresses antigen processing and presentation in macrophages via inhibition of lysosomal vATPase. *FASEB J*, **26**: 4614-4627.
- Robinson MW, Dalton JP y Donnelly S (2008a).** Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends Biochem Sci*, **33**: 601-608.
- Robinson MW, Menon R, Donnelly SM, Dalton JP y Ranganathan S (2009).** An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol Cell Proteomics*, **8**: 1891-1907.
- Robinson MW, Tort JF, Lowther J, Donnelly SM, Wong E, Xu W, Stack CM, Padula M, Herbert B y Dalton JP (2008b).** 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*, **7**: 1111-1123.
- Rodríguez-Ulloa C, Rivera-Jacinto M, Del Valle-Mendoza J, Cerna C, Hoban C, Chilon S y Ortiz P (2018).** Risk factors for human fascioliasis in schoolchildren in Banos del Inca, Cajamarca, Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **112**: 216-222.
- Rodríguez E, Francia K, Brossard N, García Vallejo JJ, Kalay H, van Kooyk Y, Freire T y Giacomini C (2018).** Immobilization of beta-galactosidase and alpha-mannosidase onto magnetic nanoparticles: A strategy for increasing the potentiality of valuable glycomic tools for glycosylation analysis and biological role determination of glycoconjugates. *Enzyme Microb Technol*, **117**: 45-55.
- Rodríguez E, Noya V, Cervi L, Chiribao ML, Brossard N, Chiale C, Carmona C, Giacomini C y Freire T (2015).** Glycans from *Fasciola hepatica* modulate the host immune response and TLR-induced maturation of dendritic cells. *PLoS Negl Trop Dis*, **9**: e0004234.
- Rojas-Caraballo J, López-Aban J, Moreno-Pérez DA, Vicente B, Fernandez-Soto P, Del Olmo E, Patarroyo MA y Muro A (2017).** Transcriptome profiling of gene expression during immunisation trial against *Fasciola hepatica*: identification of genes and pathways involved in conferring immunoprotection in a murine model. *BMC Infect Dis*, **17**: 94.
- Rojas-Caraballo J, López-Aban J, Pérez del Villar L, Vizcaino C, Vicente B, Fernandez-Soto P, del Olmo E, Patarroyo MA y Muro A (2014).** 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*, **9**: e105323.

- Romarís F, Dea-Ayuela MA, Bolas F, Martínez-Fernandez AR, Sanmartín ML y Ubeira FM (2003).** Heterogeneity and immunogenicity of the *Trichinella* TSL-1 antigen gp53. *Parasite Immunol*, **25**: 297-305.
- Romarís F, Escalante M, Lorenzo S, Bonay P, Gárate T, Leiro J y Ubeira FM (2002).** Monoclonal antibodies raised in Btk(xid) mice reveal new antigenic relationships and molecular interactions among gp53 and other *Trichinella* glycoproteins. *Mol Biochem Parasitol*, **125**: 173-183.
- Ross JG (1967).** Studies of immunity to *Fasciola hepatica*: acquired immunity in cattle, sheep and rabbits following natural infection and vaccine procedures. *J Helminthol*, **41**: 393-399.
- Ruiz-Campillo MT, Molina-Hernández V, Pérez J, Pacheco IL, Pérez R, Escamilla A, Martínez-Moreno FJ, Martínez-Moreno A y Zafra R (2018).** Study of peritoneal macrophage immunophenotype in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*, **257**: 34-39.
- Sachdev D, Gough KC y Flynn RJ (2017).** The chronic stages of bovine *Fasciola hepatica* are dominated by CD4 T-cell exhaustion. *Front Immunol*, **8**: 1002.
- Saha S y Raghava GPS (2004).** BcePred: Prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. *Artificial Immune Systems, Proceedings*, **3239**: 197-204.
- Salinas I, Zhang YA y Sunyer JO (2011).** Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev Comp Immunol*, **35**: 1346-1365.
- Sambrook J y Russell DW (2001).** *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.
- Santos FLN, Celedon PAF, Zanchin NIT, Leitolis A, Crestani S, Foti L, de Souza WV, Gomes YD y Krieger MA (2017).** Performance assessment of a *Trypanosoma cruzi* chimeric antigen in multiplex liquid microarray assays. *Journal of Clinical Microbiology*, **55**: 2934-2945.
- Santos Y, García-Marquez S, Pereira PG, Pazos F, Riaza A, Silva R, El Morabit A y Ubeira FM (2005).** Efficacy of furunculosis vaccines in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): evaluation of immersion, oral and injection delivery. *J Fish Dis*, **28**: 165-172.
- Sarkari B, Mansouri M, Noorpisheh Ghadimi S, Abdolahi Khabisi S y Doshmanziari A (2018).** Molecular evaluation of a case of *Fasciola hepatica* in wild boar in Southwestern Iran: A case report. *Iran J Parasitol*, **13**: 149-155.
- Sarobe P, Lasarte JJ, Larrea E, Golvano JJ, Prieto I, Gullon A, Prieto J y Borrascueta F (1993).** Enhancement of peptide immunogenicity by insertion of a cathepsin B cleavage site between determinants recognized by B and T cells. *Res Immunol*, **144**: 257-262.

- Schubert B y Kohlbacher O (2016).** Designing string-of-beads vaccines with optimal spacers. *Genome Med*, **8**: 9.
- Schwarz H, Schmittner M, Duschl A y Horejs-Hoeck J (2014).** Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells. *PLoS One*, **9**: e113840.
- Sekiya M, Mulcahy G, Irwin JA, Stack CM, Donnelly SM, Xu W, Collins P y Dalton JP (2006).** Biochemical characterisation of the recombinant peroxiredoxin (FhePrx) of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *FEBS Lett*, **580**: 5016-5022.
- Sesterhenn F, Galloux M, Vollers SS, Csepregi L, Yang C, Descamps D, Bonet J, Friedensohn S, Gainza P, Corthesy P, Chen M, Rosset S, Rameix-Welti MA, Eleouet JF, Reddy ST, Graham BS, Riffault S y Correia BE (2019).** Boosting subdominant neutralizing antibody responses with a computationally designed epitope-focused immunogen. *PLoS Biol*, **17**: e3000164.
- Sette A y Fikes J (2003).** Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Curr Opin Immunol*, **15**: 461-470.
- Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, Thompson C, Wilson L, Spithill TW, Mitchell GF y et al. (1990).** Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol*, **145**: 3905-3910.
- Shafiei R, Sarkari B y Sadjjadi SM (2015).** Performance of a 27 kDa *Fasciola hepatica* antigen in the diagnosis of human fascioliasis. *J Lab Physicians*, **7**: 17-20.
- Shao W, Pedrioli PGA, Wolski W, Scurtescu C, Schmid E, Vizcaino JA, Courcelles M, Schuster H, Kowalewski D, Marino F, Arlehamn CSL, Vaughan K, Peters B, Sette A, Ottenhoff THM, Meijgaarden KE, Nieuwenhuizen N, Kaufmann SHE, Schlapbach R, Castle JC, Nesvizhskii AI, Nielsen M, Deutsch EW, Campbell DS, Moritz RL, Zubarev RA, Ytterberg AJ, Purcell AW, Marcilla M, Paradela A, Wang Q, Costello CE, Ternette N, van Veelen PA, van Els C, Heck AJR, de Souza GA, Sollid LM, Admon A, Stevanovic S, Rammensee HG, Thibault P, Perreault C, Bassani-Sternberg M, Aebersold R y Caron E (2018).** The SystemMHC Atlas project. *Nucleic Acids Res*, **46**: D1237-D1247.
- Sinclair KB (1975).** The resistance of sheep to *Fasciola hepatica*: studies on the pathophysiology of challenge infections. *Res Vet Sci*, **19**: 296-303.
- Skwarczynski M y Toth I (2014).** Recent advances in peptide-based subunit nanovaccines. *Nanomedicine (Lond)*, **9**: 2657-2669.
- Skwarczynski M y Toth I (2016).** Peptide-based synthetic vaccines. *Chem Sci*, **7**: 842-854.
- Smith NC, Ovington KS y Boray JC (1992).** *Fasciola hepatica*: free radical generation by peritoneal leukocytes in challenged rodents. *Int J Parasitol*, **22**: 281-286.
- Spithill TW y Dalton JP (1998).** Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitol Today*, **14**: 224-228.

- Standley CJ, Prepelitchi L, Pietrokovsky SM, Issia L, Stothard JR y Wisnivesky-Colli C (2013).** Molecular characterization of cryptic and sympatric lymnaeid species from the *Galba/Fossaria* group in Mendoza Province, Northern Patagonia, Argentina. *Parasit Vectors*, **6**: 304.
- Steffensen MA, Pedersen LH, Jahn ML, Nielsen KN, Christensen JP y Thomsen AR (2016).** Vaccine targeting of subdominant CD8+ T cell epitopes increases the breadth of the T cell response upon viral challenge, but may impair immediate virus control. *J Immunol*, **196**: 2666-2676.
- Stevenson G, Neal B, Liu D, Hobbs M, Packer NH, Batley M, Redmond JW, Lindquist L y Reeves P (1994).** Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its rfb gene cluster. *J Bacteriol*, **176**: 4144-4156.
- Takahashi H, Cease KB y Berzofsky JA (1989).** Identification of proteases that process distinct epitopes on the same protein. *Journal of Immunology*, **142**: 2221-2229.
- Takeda O, Miura Y, Mitta M, Matsushita H, Kato I, Abe Y, Yokosawa H y Ishii S (1994).** Isolation and analysis of cDNA encoding a precursor of *Canavalia ensiformis* asparaginyl endopeptidase (legumain). *J Biochem*, **116**: 541-546.
- Tanaka A (2018).** *Characterisation of an immunomodulating peptide secreted by a helminth worm*. Doctor of Philosophy Monograph, University of Technology Sydney.
- Tandler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem AC, Da Silva JF, Savino W, Garratt RC, Katz N y Simpson AS (1996).** A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 269-273.
- Thivierge K, Cotton S, Schaefer DA, Riggs MW, To J, Lund ME, Robinson MW, Dalton JP y Donnelly SM (2013).** Cathelicidin-like helminth defence molecules (HDMs): absence of cytotoxic, anti-microbial and anti-protozoan activities imply a specific adaptation to immune modulation. *PLoS Negl Trop Dis*, **7**: e2307.
- Tielens AG (1999).** Metabolism. En: DALTON J (ed.) *Fasciolosis*. Wallingford, UK ; New York, NY, USA: CABI Pub., pp.: xv, 544 p.
- Tkach VV, Kudlai O y Kostadinova A (2016).** Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea). *International Journal for Parasitology*, **46**: 171-185.
- Tkalcevic J, Ashman K y Meeusen E (1995).** *Fasciola hepatica*: rapid identification of newly excysted juvenile proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **213**: 169-174.
- Toet H, Piedrafita DM y Spithill TW (2014).** Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int J Parasitol*, **44**: 915-927.
- Tort J, Brindley PJ, Knox D, Wolfe KH y Dalton JP (1999).** Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Adv Parasitol*, **43**: 161-266.

- UE (2012). Decisión de ejecución C (2012) 8604. Anexo II. AEMPS. 2012. *Recuperado de:* [https://aemps.gob.es/informa/notasInformativas/industria/arbitrajeUE/2012/NIMVET\\_08-2012.htm](https://aemps.gob.es/informa/notasInformativas/industria/arbitrajeUE/2012/NIMVET_08-2012.htm).
- UE (2012). Reglamento de ejecución (UE) n° 201/2012 de la comisión de 8 de marzo de 2012 por el que se modifica el anexo del Reglamento (UE) no 37/2010 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal, en lo que respecta a la sustancia nitroxinilo. DOUE L71: 37-39. *Recuperado de:* <https://boe.es/doue/2012/071/L00037-00039.pdf>.
- UE (2014). Procedimiento 2014-0257-COD. COM (2014) 558: propuesta de reglamento del parlamento europeo y del consejo sobre los medicamentos veterinarios. *Recuperado de:* <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52014PC0558>.
- UE (2014). Reglamento de ejecución (UE) n° 676/2014 de la comisión de 19 de junio de 2014 por el que se modifica el Reglamento (UE) no 37/2010 en lo que respecta a la sustancia «triclabendazol». DOUE L180: 5-7. *Recuperado de:* <https://eu.vlex.com/vid/reglamento-noa-respecta-sustancia-515699194>.
- UE (2014). Reglamento de ejecución (UE) n° 681/2014 DE LA COMISIÓN de 20 de junio de 2014 que modifica el Reglamento (UE) no 37/2010 por lo que respecta a la sustancia «rafoxanida». DOUE L182:11-13. *Recuperado de:* <https://boe.es/doue/2014/182/L00011-00013.pdf>.
- UE (2014). Reglamento de ejecución (UE) n° 682/2014 DE LA COMISIÓN de 20 de junio de 2014 por el que se modifica el Reglamento (UE) no 37/2010 en lo que respecta a la sustancia «closantel». DOUE L182: 14-16. *Recuperado de:* <https://eu.vlex.com/vid/reglamento-modifica-noa-respecta-sustancia-515805278>.
- UE (2014). Reglamento de ejecución (UE) n° 683/2014 DE LA COMISIÓN de 20 de junio de 2014 por el que se modifica el Reglamento (UE) no 37/2010 en lo que respecta a la sustancia «clorsulón». DOUE L182: 17-19. *Recuperado de:* <https://eu.vlex.com/vid/reglamento-modifica-noa-respecta-sustancia-515805394>.
- Valero MA, Ubeira FM, Khoubbane M, Artigas P, Muiño L, Mezo M, Pérez-Crespo I, Periago MV y Mas-Coma S (2009). MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Vet Parasitol*, **159**: 77-81.
- van Altena SE, Peen MA, van der Linden FH, Parmentier HK, Savelkoul HF y Tijhaar EJ (2016). Bovine natural antibodies in antibody-dependent bactericidal activity against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and risk of mastitis. *Vet Immunol Immunopathol*, **171**: 21-27.
- van Der Heijden P, Bianchi BTJ, Scholten JW y Stok W (1986). Separate application of adjuvant and antigen: The effect of a water-in-oil emulsion on the splenic plaque-forming cell response to sheep red blood cells in mice. *Immunobiology*, **171**: 143-154.

- van Die I y Cummings RD (2017).** The mannose receptor in regulation of helminth-mediated host immunity. *Front Immunol*, **8**: 1677.
- van Milligen FJ, Cornelissen JB y Bokhout BA (2000).** *Fasciola hepatica*: an antigen fraction derived from newly excysted juveniles, containing an immunoreactive 32-kDa protein, induces strong protective immunity in rats. *Exp Parasitol*, **94**: 163-171.
- Vázquez MB, Sureda M y Rebollo J (2012).** Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología*, **31**: 21-30.
- Vengust G, Klinkon M, Bidovec A y Vengust A (2003).** *Fasciola hepatica*: effects on blood constituents and liver minerals in fallow deer (*Dama dama*). *Vet Parasitol*, **112**: 51-61.
- Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D y Alonso RA (2011).** Proteolytic activity in *Fasciola hepatica* is reduced by the administration of cathepsin L mimotopes. *J Helminthol*, **85**: 51-55.
- Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D, Ibarra F, Reyes-Pérez M, Reyes-Vivas H, López-Velázquez G, Gazarian K, Gazarian T y Alonso RA (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, Reynoso-Palomar A, Olivares-Pérez J, Ortega-Vargas S, Cruz-Mendoza I y Quiroz-Romero H (2015).** Motility of *Fasciola hepatica* miracidia assessed with a computer-assisted sperm analyser. *J Helminthol*, **89**: 453-457.
- Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A, Utrera-Quintana F y Carreon-Luna L (2014).** 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*, **113**: 243-250.
- VMD (2018).** Veterinary Medicines Directorate. *Disponible:* <https://www.vmd.defra.gov.uk/ProductInformationDatabase/Default.aspx>.
- Vukman KV, Adams PN, Dowling D, Metz M, Maurer M y O'Neill SM (2013a).** The effects of *Fasciola hepatica* tegumental antigens on mast cell function. *Int J Parasitol*, **43**: 531-539.
- Vukman KV, Adams PN, Metz M, Maurer M y O'Neill SM (2013b).** *Fasciola hepatica* tegumental coat impairs mast cells' ability to drive Th1 immune responses. *J Immunol*, **190**: 2873-2879.
- Vukman KV, Adams PN y O'Neill SM (2013c).** *Fasciola hepatica* tegumental coat antigen suppresses MAPK signalling in dendritic cells and up-regulates the expression of SOCS3. *Parasite Immunol*, **35**: 234-238.
- Webb CM y Cabada MM (2018).** Recent developments in the epidemiology, diagnosis, and treatment of *Fasciola* infection. *Curr Opin Infect Dis*.
- Wedrychowicz H, Kesik M, Kaliniak M, Kozak-Cieszczyk M, Jedlina-Panasiuk L, Jaros S y Plucienniczak A (2007).** Vaccine potential of inclusion bodies containing

- cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke. *Vet Parasitol*, **147**: 77-88.
- Wedrychowicz H, Lamparska M, Kesik M, Kotomski G, Mieszczanek J, Jedlina-Panasiuk L y Plucienniczak A (2003)**. The immune response of rats to vaccination with the cDNA or protein forms of the cysteine proteinase of *Fasciola hepatica*. *Vet Immunol Immunopathol*, **94**: 83-93.
- Wedrychowicz I, Jedlina-Panasiuk L, Szymanski P y Bienkowska-Szewczyk K (2001)**. Blood leukocyte responses in rats vaccinated with cDNA encoding glutathionie-S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Wiad Parazytol*, **47**: 551-557.
- Wen X, Cao D, Jones RW, Hoshino Y y Yuan L (2015)**. Tandem truncated rotavirus VP8\* subunit protein with T cell epitope as non-replicating parenteral vaccine is highly immunogenic. *Hum Vaccin Immunother*: 0.
- Wesolowska A, Basalaj K, Norbury LJ, Sielicka A, Wedrychowicz H y Zawistowska-Deniziak A (2018a)**. Vaccination against *Fasciola hepatica* using cathepsin L3 and B3 proteases delivered alone or in combination. *Vet Parasitol*, **250**: 15-21.
- Wesolowska A, Jaros S, Norbury LJ, Jaros D, Zygnier W y Wedrychowicz H (2013)**. Microarray analysis of rat immune responses to liver fluke infection following vaccination with *Fasciola hepatica* phosphoglycerate kinase. *Exp Parasitol*, **134**: 33-38.
- Wesolowska A, Zawistowska-Deniziak A, Norbury LJ, Wilkowski P, Januszkiewicz K, Pyziel AM, Zygnier W y Wedrychowicz H (2016)**. Immune responses in rats and sheep induced by a DNA vaccine containing the phosphoglycerate kinase gene of *Fasciola hepatica* and liver fluke infection. *Acta Parasitol*, **61**: 212-220.
- Wesolowska A, Zawistowska-Deniziak A, Norbury LJ, Wilkowski P, Pyziel AM, Zygnier W y Wedrychowicz H (2017)**. Lymphocyte responses of rats vaccinated with cDNA encoding a phosphoglycerate kinase of *Fasciola hepatica* (FhPGK) and *F. hepatica* infection. *Parasitol Int*.
- Wesolowska A, Zawistowska-Deniziak A, Norbury LJ, Wilkowski P, Pyziel AM, Zygnier W y Wedrychowicz H (2018b)**. Lymphocyte responses of rats vaccinated with cDNA encoding a phosphoglycerate kinase of *Fasciola hepatica* (FhPGK) and *F. hepatica* infection. *Parasitol Int*, **67**: 85-92.
- Wicki P, Schwalbach B, Charbon JL, Steiner A, Lang M, Loup F y Pfister K (1991)**. [Intestinal cellular reaction of cattle after infection by *Fasciola hepatica*]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, **133**: 429-437.
- Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM y Spithill TW (1998)**. *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol*, **88**: 85-94.
- Wilson RA, Wright JM, de Castro-Borges W, Parker-Manuel SJ, Dowle AA, Ashton PD, Young ND, Gasser RB y Spithill TW (2011)**. Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. *Int J Parasitol*, **41**: 1347-1359.

- Yano A, Onozuka A, Asahi-Ozaki Y, Imai S, Hanada N, Miwa Y y Nisizawa T (2005).** An ingenious design for peptide vaccines. *Vaccine*, **23**: 2322-2326.
- Yazwinski TA, Kilgore RL, Presson BL, Williams ML, Fulton RK, Pote L y Greenway TE (1985).** Efficacy of oral clorsulon in the treatment of *Fasciola hepatica* infections in calves. *Am J Vet Res*, **46**: 163-164.
- Yu HR, Zhao Y, Guo C, Gan YR y Huang H (2015).** The role of proline substitutions within flexible regions on thermostability of luciferase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, **1854**: 65-72.
- Zafra R, Pérez-Écija RA, Buffoni L, Moreno P, Bautista MJ, Martínez-Moreno A, Mulcahy G, Dalton JP y Pérez J (2013a).** Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *J Comp Pathol*, **148**: 373-384.
- Zafra R, Pérez-Écija RA, Buffoni L, Pacheco IL, Martínez-Moreno A, LaCourse EJ, Perally S, Brophy PM y Pérez J (2013b).** 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*, **94**: 602-609.
- Zakeri A, Hansen EP, Andersen SD, Williams AR y Nejsum P (2018).** Immunomodulation by Helminths: Intracellular Pathways and Extracellular Vesicles. *Front Immunol*, **9**: 2349.
- Zawistowska-Deniziak A, Wasyl K, Norbury LJ, Wesolowska A, Bien J, Grodzik M, Wisniewski M, Baska P y Wedrychowicz H (2013).** Characterization and differential expression of cathepsin L3 alleles from *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*, **190**: 27-37.
- Zhang GL, Srinivasan KN, Veeramani A, August JT y Brusic V (2005).** PREDBALB/c: a system for the prediction of peptide binding to H2d molecules, a haplotype of the BALB/c mouse. *Nucleic Acids Res*, **33**: W180-183.
- Zhang J, Hu YH, Xiao ZZ y Sun L (2013).** Megalocytivirus-induced proteins of turbot (*Scophthalmus maximus*): identification and antiviral potential. *J Proteomics*, **91**: 430-443.
- Zhang Y, Zhang Y, Gu W y Sun B (2014).** TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. *Adv Exp Med Biol*, **841**: 15-44.
- Zhao X, Li G y Liang S (2013).** Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *J Anal Methods Chem*, **2013**: 581093.
- Zhu D y Tuo W (2016).** QS-21: A potent vaccine adjuvant. *Nat Prod Chem Res*, **3**.
- Zimmerman GL, Wallace DH, Schons DJ y Hoberg EP (1986).** Efficacy of clorsulon against mature, naturally acquired *Fasciola hepatica* infections in cattle and sheep. *Am J Vet Res*, **47**: 1665-1667.

- Zinsser VL, Cox C, McAuley M, Hoey EM, Trudgett A y Timson DJ (2018).** A galactokinase-like protein from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol*, **192**: 65-72.

