



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**INMUNOPROFILAXIS CONTRA *Fasciola hepatica* CON
ANTÍGENOS RECOMBINANTES**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

ABEL EDMUNDO VILLA MANCERA

TUTOR: HÉCTOR QUIROZ ROMERO

COMITÉ TUTORAL: DOLORES CORREA BELTRÁN

FROYLÁN IBARRA VELARDE

CIUDAD UNIVERSITARIA, DISTRITO FEDERAL 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A Marina, por su inmenso amor, por ser mi fuerza y compañera incondicional.

A mis padres, quienes me han dado el mejor de los regalos: la vida; por su apoyo y compañía en lograr mi formación como ser humano, siempre los llevare en mi pensamiento.

A la abuela, a su memoria: por sus consejos y atenciones para conmigo.

A mis hermanos, por el apoyo y comprensión para seguir adelante, con quienes he compartido mis logros profesionales y personales.

A mis amigos, por estar ahí cuando los he necesitado.

AGRADECIMIENTOS

Al personal y distinguidos académicos del:

Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Tutora: Dra. María Dolores Correa Beltrán, Esther Calderón y Héctor Luna.

Laboratorio de Bioquímica Genética, Instituto Nacional de Pediatría, Dr. Gabriel López Velázquez, Dr. Horacio Reyes Vivas, Carmen Ortiz e Ignacio De la Mora.

Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Dr. Rogelio Antonio Alonso Morales, Amanda Gayosso Vázquez, Rafael Calderón Rodríguez, Juan Pablo Pintor Rios y Alejandro Valdés Rosas.

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Dr. Karlen Gazarian, Dra. Tatiana Gazarian, José Alberto Campillo Balderas y Ricardo Ávila.

Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Tutores: Dr. Héctor Quiroz Romero y Dr. Froylán Ibarra Velarde; Dra. María Teresa Quintero Martínez, Dra. Yazmín Alcalá Canto, Dra. Yolanda Vera Montenegro, Dra. Irene Cruz Mendoza, Juan Manuel Reyes Pérez, Javier Munguía Xochihua, Griselda Juárez Vega y Jorge Cruz.

Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal, UNAM, Javier Gutiérrez Molotla y Aldo Bruno Alberti Navarro.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Lauro Castro Trejo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada y al proyecto PAPIIT- IN208703-03 DGAPA-UNAM.

CONTENIDO

| Tema | Página |
|--|---------------|
| Dedicatorias | i |
| Agradecimientos | ii |
| Resumen | iii |
| Abstract | iv |
| Introducción | 1 |
| Vacunas para el control de <i>Fasciola hepatica</i> en rumiantes | 4 |
| Antígenos como candidatos de vacunación | 6 |
| Tecnología de despliegue en fagos o phage display | 15 |
| Hipótesis | 23 |
| Objetivos | 23 |
| Material y métodos | 24 |
| Resultados | 34 |
| Discusión y conclusión | 53 |
| Literatura citada | 58 |

RESUMEN

Una biblioteca de fagos filamentosos que expone aleatoriamente péptidos de 12 aminoácidos se utilizó para seleccionar mimotopos de catepsina L de *Fasciola hepatica* y evaluar su potencial como inmunógeno protector en ovejas. Siete clonas mostraron reactividad en ELISA a IgG anti-catepsina purificadas de conejo, y la secuencia de aminoácidos obtenida por secuenciación de ADN. Veinte ovinos fueron distribuidos en cuatro grupos de cinco animales e inmunizados en la semana 0 y 4 con 1×10^{14} partículas de fagos de la clona 1, clona 20, un conjunto de siete clonas y PBS. No se utilizó ningún adyuvante. Todos los grupos fueron desafiados con 300 metacercarias de *F. hepatica* en la semana 6 y sacrificados 16 semanas después. El grupo de animales que fueron vacunados con la clona 1 y 20, mostraron una reducción de la carga parasitaria del 47.61% y 33.91% respectivamente, cuando se comparó con el grupo control; no se observó ningún efecto en los animales inoculados con el conjunto de clonas. Una reducción significativa en el tamaño de los parásitos recuperados y la carga parasitaria fue observada en aquellos animales inmunizados con la clona 1, mientras que los animales vacunados con la clona 20, muestran una reducción significativa en la producción de huevos. La inmunización induce una reducción en la viabilidad de huevos de *F. hepática* en un rango de 58.92 a 82.11%. Se observó una correlación negativa entre la absorbancia de los animales vacunados con la clona 1 y la carga parasitaria. Además, los animales vacunados producen anticuerpos específicos a las clonas con que fueron inmunizados, los cuales aumentaron después del desafío con metacercarias de *Fasciola hepatica*.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*; catepsina L, phage display, mimotopos, vacuna.

ABSTRACT

A M13 phage random 12-mers peptide library was used to screen cathepsin L mimotopes of *Fasciola hepatica* and to evaluate their immunogenicity in sheep. Seven clones showed positive reactivity to a rabbit anti-cathepsin L1/L2 antiserum in ELISA, and their amino acid sequence deduced by DNA sequencing were tentatively mapped on the protein. Twenty sheep were randomly allocated in four groups of five animals each, for immunization with 1×10^{14} phage particles of clones one, twenty, a mixture of seven clones and PBS, without adjuvant at the beginning and 4 weeks later. All groups were challenged with 300 metacercariae at week 6 and slaughtered 16 weeks later. The mean worm burdens after challenge were reduced by 47.61% and 33.91% in sheep vaccinated with clones one and twenty, respectively; no effect was observed in animal inoculated with the clones mixture. Also, a significant reduction in worm size and burden was observed for those sheep immunized with clone one. Animals receiving clone twenty, showed a significant reduction in eggs output. Immunization induced a reduction of egg viability ranging from 58.92 to 82.11%. Furthermore, vaccinated animals produced clone-specific antibodies which were boosted after challenge with metacercariae of *F. hepatica*.

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

INTRODUCCIÓN

La enfermedad parasitaria conocida como fasciolosis o distomatosis hepática es causada por el trematodo *Fasciola hepatica* en animales domésticos, así como en el hombre. Los huéspedes más comunes de este helminto son los ovinos y los bovinos siendo una de las parasitosis más importantes en regiones templadas y tropicales en todo el mundo (Behn y Sangster, 1999).

La fasciolosis es reconocida como una infección importante por la Organización Mundial de la Salud (1995) y se ha estimado que 2.4 millones de personas están infectadas con *Fasciola hepatica* en el mundo (Mas-Coma *et al.*, 1999). Recientemente esta enfermedad ha emergido como un importante patógeno en seres humanos en países como Bolivia, Perú, Ecuador, Egipto e Irán (O'Neill *et al.*, 1998; Mas-Coma *et al.*, 1999; Rokni *et al.*, 2002).

La fasciolosis es adquirida posterior a la ingestión de vegetación o agua contaminada con la fase infectante enquistada, denominada metacercaria, la cual se desenquista en el intestino, atraviesa la pared intestinal y migra hasta el tejido hepático donde permanece cerca de 8-12 semanas alimentándose de tejido del huésped y sangre, y consecuentemente causando extensas hemorragias y perforaciones. La forma aguda de la enfermedad puede resultar en la muerte de ovinos altamente infectados, aunque en bovinos esto raramente ocurre. Después de este periodo el parásito entra a los conductos biliares donde completa su crecimiento y maduración. El adulto hermafrodita perfora la pared de los conductos biliares y se alimenta de sangre que provee los nutrientes para la producción de un gran número de huevos que son llevados al intestino con los fluidos biliares y son transportados hacia plantas o pastos con las heces. El estado larvario acuático, o miracidio, eclosiona del huevo e infecta a moluscos del género *Lymnaea* que actúan como huéspedes intermediarios. Después de algunos estados de desarrollo y multiplicación dentro del caracol, las cercarias emergen y se enquistan en la vegetación continuando con el ciclo (Andrews, 1999).

Las pérdidas económicas debido a fasciolosis son sustanciales en la industria cárnica de bovinos y ovinos (Behn y Sangster, 1999). La fasciolosis es una enfermedad parasitaria de gran impacto económico, las pérdidas directas por decomiso de hígados y muertes son cuantiosas para la industria cárnica; mientras que las pérdidas indirectas se refieren a la deficiente conversión alimentaría, retraso en el crecimiento, baja producción de leche y carne, mala calidad de la canal, baja fertilidad y abortos (Torgerson y Claxton, 1999).

La fasciolosis ovina puede resultar en una pérdida significativa de sangre, y por lo tanto energía metabolizable, además de dañar el apetito y la retención de nitrógeno, que puede tener un efecto adverso en la ganancia de peso (Hope-Cawdery, 1984). Sinclair (1962) reporta una reducción en la ganancia de peso en ovinos con una media en la carga parasitaria de 200 parásitos. Coop y Sykes (1977) demostraron que la reducción en la ganancia de peso en grupos de ovinos con una media de 87, 157 y 233 parásitos fue de 26%, 22% y 33% respectivamente. Hawkins y Morris (1978) desarrollaron modelos relacionados a cambios en el peso corporal en ovinos con carga parasitaria. Los índices de crecimiento semanal de lana y ganancia de peso corporal decrecen cuando se incrementa la carga parasitaria. La presencia de 346 parásitos o más resulta en pérdida de peso y mortalidad de corderos, mientras que cargas parasitarias de 46 parásitos resultan en reducciones del 13.6% en la producción de lana y una disminución en la ganancia de peso del 5.1%. Otros autores han reportado reducciones del 40% en la producción de lana, como resultado de la fasciolosis (Roseby, 1970; Edwards *et al.*, 1976).

En bovinos, las infecciones con 54 parásitos por animal han mostrado reducciones en la ganancia de peso del 8-9% (Ross, 1970, Hope Cawdery *et al.*, 1977), aunque este grado de infección resulta en signos no clínicos de la enfermedad. Grandes cargas parasitarias resultantes de infecciones experimentales con 1,000 metacercarias, pueden reducir la ganancia de peso en un 28% en animales sin exposición previa (Hope Cawdery *et al.*, 1977). Una gran reducción en la ganancia de peso ocurre en las primeras 16 semanas de infección,

y permanece con una reducción significativa de peso durante el estado crónico de la enfermedad. Aun después de que los animales están libres de parásitos, el daño inicial permanece hasta el sacrificio (Hope Cawdery *et al.*, 1977). Las pérdidas en los estados iniciales de la enfermedad pueden solamente ser evitados previniendo la exposición, y no por tratamiento. Dado que la respuesta inmune no provee una protección adecuada, las pérdidas en animales reinfectados también son significativas.

En Estados Unidos, Johnson (1991) ha reportado un incremento del 8% en la ganancia de peso de bovinos tratados con fasciolicidas. En Bélgica, Genicot *et al.*, (1991) reportan un incremento del 18% en la ganancia de peso en bovinos Belgian blue de doble músculo, tratados con un fasciolicida comparado con los controles no tratados. Aún más importante, el incremento en las ganancias resultado de las mejoras en la productividad fue 4.2 veces el costo del tratamiento.

Algunos estudios han sugerido que la infección puede tener un efecto deletéreo en la calidad de la leche (Black y Froyd, 1972). La producción puede disminuir 14% (Ross, 1970), si bien se puede recuperar el 8% con tratamiento. La reducción en la producción de leche puede ser dependiente de la magnitud de la carga parasitaria y los animales pueden hasta cierto punto, compensar con un incremento en el apetito (Hope Cawdery y Conway, 1972). Sinclair (1962) atribuye una reducción en la producción de leche a los bajos índices de crecimiento observados en corderos de madres que fueron infectadas. Oakey *et al.*, (1979) y Hope Cawdery (1984) sugieren bajos índices de fertilidad en bovinos infectados o inadecuadamente tratados, mientras que pocos corderos nacen de ovejas infectadas (Hope Cawdery, 1976). Crossland *et al.*, (1977) demostraron un incremento del 9% en la fecundidad en ovejas en pastoreo, cuando los caracoles fueron controlados con molusquicidas.

Ciertos datos conservadores obtenidos en México indican que de 36 millones de bovinos, 18 millones están expuestos a la infección por *Fasciola*, debido a que este ganado se encuentra localizado en las zonas reconocidas como fasciolosas.

Sin embargo, los estudios epidemiológicos muestran que alrededor de 5 millones de bovinos están infectados (Ibarra, 2000).

A pesar de que está disponible un amplio rango de drogas para el tratamiento de fasciolosis en bovinos y ovinos, existen reportes de resistencia a ciertas poblaciones de *F. hepatica* a drogas como triclabendazol (Overend y Bowen, 1995; Mitchell *et al.*, 1998; Fairweather y Boray, 1999; Moll *et al.*, 2000; Gaasenbeek *et al.*, 2001).

Se requieren nuevas propuestas para el control debido a la existencia de métodos basados en gran parte en quimioterapia que han obtenido poco impacto en la prevalencia global de *F. hepatica*.

Vacunas para el control de *Fasciola hepatica* en rumiantes

Los antígenos purificados, nativos y recombinantes de *Fasciola hepatica* han mostrado tener un potencial inmunoprolifáctico contra fasciolosis.

Metacercarias atenuadas irradiadas

La inmunización de huéspedes definitivos contra *F. hepatica* usando metacercarias atenuadas mediante irradiación fue una de las primeras estrategias probadas, en un intento por identificar antígenos que protegen al huésped de *Fasciola*. La protección contra fasciolosis en vacas y ratas con vacunas atenuadas por irradiación ha sido inducida exitosamente, pero el resultado ha sido contrario en ratones, conejos y ovinos. En vacas se ha observado una reducción del 70% en la carga parasitaria vacunándolas dos veces, con intervalos de 4 semanas y desafiándolas 8 semanas después con metacercarias irradiadas con 3.5 krad, mientras que sólo se observó una reducción del 30% cuando el desafío fue hecho 4 semanas después de la segunda dosis de vacunación (Dargie *et al.*, 1974); mientras que en ratas estimuladas con metacercarias atenuadas con 2.5-3 krad de irradiación-x se obtiene una reducción de aproximadamente 50% de la

carga parasitaria (Thorpe y Broome, 1962; Corba *et al.*, 1971; Armour *et al.*, 1974). Los mayores niveles de protección, con más del 80%, se logran con metacercarias atenuadas con 5 y 7.5 krad de rayos-x. Sin embargo, como se ha visto en bovinos, la protección depende del tiempo transcurrido después de la vacunación, y que las metacercarias irradiadas con 10 krad no inducen protección (Thorpe y Broome, 1962).

Los ovinos no adquieren resistencia a una reinfección posterior a la inicial con metacercarias no irradiadas o irradiadas (Boray, 1969; Boyce *et al.*, 1987; Chauvin *et al.*, 1995). Sin embargo, la inmunidad por transferencia adoptiva de células linfoides de ovejas vacunadas con metacercarias irradiadas con 3 krad confieren resistencia a ovejas jóvenes (Dargie *et al.*, 1974). Además, la transferencia pasiva del suero de ovejas sensibilizadas también protege a ratas desafiadas con *Fasciola hepatica* (Dargie *et al.*, 1974).

Creaney *et al.* (1996), infectaron grupos de borregos Merino con 500 ó 2,000 metacercarias con irradiación gamma (30, 100 ó 400 Gy), observando reducciones no significativas en la carga parasitaria. Una segunda prueba fue con 2,000 metacercarias previamente irradiadas con 30, 100 ó 400 Gy de irradiación gamma, utilizando dos dosis con 4 semanas de intervalo. En ambas pruebas, la viabilidad de *F. hepatica* fue severamente afectada por la dosis de irradiación gamma de 30 Gy o más; en el grupo control, se recuperaron parásitos inmaduros a los que se les administraron metacercarias atenuadas con 70 Gy ó más, observándose una fuerte respuesta inmune humoral a antígenos somáticos de *F. hepatica* en todos los ovinos. Sólo los sueros de los borregos que recibieron metacercarias irradiadas con 70 Gy reconocieron a la glutatión S-transferasa y a la catepsina L. No se presentaron reducciones en el número de parásitos o huevos en ningún grupo.

Creaney *et al.* (1996), estudiaron el efecto de la irradiación gamma en la expresión de carbohidratos y catepsina B por adolescarias de *F. hepatica*. Después de la irradiación de metacercarias, la expresión de azúcares específicos a concavalina A disminuyeron en la superficie de las adolescarias y la expresión

de azúcares específicos a la aglutinina de germen de trigo aumentaron en el intestino, y se redujeron en la superficie de la adolescaria. Así mismo, hubo una reducción significativa en la expresión de catepsina B tisular y en la actividad proteolítica de las excreciones/secreciones.

Se ha sugerido que la protección en bovinos y ratas contra *F. hepatica* por sensibilización con metacercarias irradiadas puede deberse al establecimiento de pequeñas poblaciones normales de parásitos, que causan una fibrosis y la resistencia por lo tanto es inducida por una barrera fisiológica debido a la fibrosis del tejido más que a los mecanismos inmunológicos (Boray, 1969; Richard y Howell, 1982; Hughes, 1987). Sin embargo, los experimentos que transfieren inmunidad adoptiva con éxito han demostrado que los mecanismos inmunes son operativos en la adquisición de resistencia a *F. hepatica* en ratas y bovinos (Corba *et al.*, 1971; Dargie *et al.*, 1974; Armour y Dargie, 1974).

Antígenos como candidatos de vacunación

Proteínas que se unen a ácidos grasos (FABP)

Las proteínas que se unen a ácidos grasos son una gran familia de proteínas involucradas en la unión y transporte de una variedad de ligandos hidrofóbicos, como son oleato, palmitato y una variedad de ácidos grasos. La clase mejor caracterizada de estas proteínas es la familia de FABP citoplasmáticas. Una de las características más notables es que todos los miembros conocidos tienen un peso molecular de 14-16 kDa y 127-133 aminoácidos (Veerkamp *et al.*, 1991).

Estas proteínas de *F. hepatica* pueden ser purificadas en virtud de su reacción cruzada con antisueros de *S. mansoni*. Un subgrupo de proteínas llamadas Fh_{SIII(M)} fueron aisladas y mostraron que son capaces de proteger ratones y becerros contra el desafío con *F. hepatica* (reducción de carga parasitaria del 69-78% y 55% respectivamente) cuando se incorpora el adyuvante completo de Freund (ACF) (Cuadro 1) (Hillyer, 1985; Hillyer *et al.*, 1987). Los

ratones vacunados con Fh_{SmIII(M)} fueron protegidos por arriba del 81% de la infección con cercarias de *S. mansoni* (Hillyer *et al.*, 1979). La purificación de una fracción de Fh_{SmIII(M)}, un polipéptido homogéneo de 12 kDa, fue capaz de proteger a los ratones contra la infección de *S. mansoni* (arriba del 77%). Los anticuerpos para esta proteína están presentes en suero de animales infectados con *F. hepatica* o *S. mansoni* (Hillyer *et al.*, 1988).

Se ha observado una reducción en la carga parasitaria en conejos inmunizados con la proteína nativa FABP, mientras que aquellos vacunados con la proteína recombinante inducen menos niveles de protección, sugiriendo que las moléculas pueden tener diferencias insignificantes entre sí, de tal forma que los epitopos que son reconocidos no están presentes en la proteína recombinante. Además, los conejos vacunados desarrollan parásitos más pequeños y tienen menos lesiones en hígado que los controles (Muro *et al.*, 1997).

La proteína FABP3 se ha purificado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa y ha sido probada como vacuna contra fasciolosis en bovinos (Spithill *et al.*, 1999). El ganado fue vacunado con dos dosis de 100 µg de FABP con el adyuvante DEAE y desafiados 4 semanas después de la segunda dosis; no se observó protección, lo cual podría deberse al uso de la proteína desnaturalizada o un adyuvante diferente al ACF (Cuadro 1).

Una forma recombinante del antígeno de *S. mansoni* (rSm14) producida en *E. coli* protege ratones por arriba del 67% contra el desafío con cercarias del parásito; mientras que conejos inmunizados inducen una protección del 89% (Tendler *et al.*, 1996).

Glutación S-transferasa (GST)

Las glutación s-transferasas comprenden una familia de isoenzimas involucradas en la detoxificación celular de un amplio rango de substratos químicos, mediante la neutralización de los substratos a través de la conjugación del glutación, haciendo los productos más solubles al agua, menos tóxicos y más

rápidamente excretados. Las GSTs citosólicas de las células de mamíferos son enzimas diméricas compuestas de subunidades idénticas ó no idénticas de 24-29 kDa. Se han caracterizado seis clases de GSTs (alfa, mu, pi, theta, sigma y kappa) que comparten 70% de secuencias idénticas dentro de la clase, y 30% entre clases (Mannervik *et al.*, 1985; Meyer *et al.*, 1991; Ji *et al.*, 1995; Pemple *et al.*, 1996).

Altos niveles de GST juegan un papel importante en la homeostasis y sobrevivencia de los helmintos y pueden estar relacionados con el tegumento desnudo de parásitos helmintos y su potencial exposición a un amplio rango de xenobióticos (Brophy y Pritchard, 1994). La GST de los helmintos puede proteger contra el daño de radicales libres exógenos como resultado de mecanismos efectores inmunes del huésped dirigidos hacia el parásito (Brophy y Pritchard, 1994). Algunos estudios inmunohistoquímicos que usan anticuerpos de conejo contra una mezcla de GST nativa han localizado a la GST extensamente en todos los tejidos del parásito adulto: dentro el intestino (asociado con la superficie laminar, aparentemente adherida al glicocálix), en las células parenquimatosas, el tegumento y las células musculares adyacentes (Howell *et al.*, 1988; Wijffels *et al.*, 1992).

La GST de *S. japonicum* ha sido un pobre candidato de vacunación en ratones, estimulando reducciones en la carga parasitaria de 30% en promedio (Wijffels *et al.*, 1992), mientras que la GST de *S. mansoni* (Sm28) ha estimulado altos niveles de protección (Brophy y Pritchard, 1994; Capron *et al.*, 1995).

Los primeros estudios de vacunación han descrito el fracaso en proteger ratas con GST con el ACF de infecciones por *F. hepatica* (Howell *et al.*, 1988). Los ovinos con vacunaciones múltiples con GST nativa de *F. hepatica* con el ACF han mostrado reducciones de la carga parasitaria del 57% (Cuadro 1) (Sexton *et al.*, 1990; Sexton *et al.*, 1994).

Cuadro 1. Antígenos como vacunas probadas contra *F. hepatica*

| Antígeno | Huésped | Dosis x inyección | Adyuvante | Reducción en la carga parasitaria (%) | Reducción en el número de huevos en heces (%) | Viabilidad de huevos (%) | Referencia |
|--------------------------------|---------|-------------------------------------|-----------|---------------------------------------|---|--------------------------|-------------------------------|
| Fh _{SmIII(M)} (FABP)* | Bovinos | 500 µg x 2 | ACF/AIF | 55.0 | | | Hillyer <i>et al.</i> , 1987 |
| FABP3 | Bovinos | 100 µg x 2 | DEAE | NR | | | Spithill <i>et al.</i> , 1999 |
| GST | Ovinos | 100 µg x 3 | ACF/AIF | 57.0 | | | Sexton <i>et al.</i> , 1994 |
| GST | Bovinos | 400 µg x 1, 200 µg x 1 ó 400 µg x 2 | Quil A/SM | 43.0 en promedio (rango 19.0-69.0) | | | Morrison <i>et al.</i> , 1996 |
| | | 400 µg x 1, 200 µg x 1 | PLG/SM | 59.0 | | | Morrison <i>et al.</i> , 1996 |
| CL1 | Ovinos | 120 µg x 1, 90 µg x 1 | ACF/AIF | NR | 69.4 | | Wijffels <i>et al.</i> , 1994 |
| CL1 | Ovinos | 100 µg x 2 | ACF/AIF | 33.0 | 71.0 | | Piacenza <i>et al.</i> , 1999 |
| CL1 | Bovinos | 10-500 µg x 3 | ACF/AIF | 38.2-69.5 | | | Dalton <i>et al.</i> , 1996 |
| CL1 | Bovinos | 200 µg x 3 | ACF/AIF | 42.5 | | 40.0-65.0 | Dalton <i>et al.</i> , 1996 |
| CL2 | Ovinos | 100 µg x 2 | ACF/AIF | 34.0 | 81.0 | | Piacenza <i>et al.</i> , 1999 |
| CL1 + CL2 | Bovinos | 200 µg x 3 | ACF/AIF | 54.0 | | 55.0 | Mulcahy <i>et al.</i> , 1998 |
| CL1 + CL2 | Ovinos | 200 µg x 2 | ACF/AIF | 60.0 | | | Piacenza <i>et al.</i> , 1999 |
| Hemoglobina | Bovinos | 200 µg x 3 | ACF/AIF | 43.8 | | 30.0-75.0 | Dalton <i>et al.</i> , 1996 |
| CL1 + Hemoglobina | Bovinos | 200 µg x 3 | ACF/AIF | 51.9 | | 30.0-80.0 | Dalton <i>et al.</i> , 1996 |
| CL2 + Hemoglobina | Bovinos | 200 µg x 3 | ACF/AIF | 72.4 | | 0-7.0 | Dalton <i>et al.</i> , 1996 |
| CL1 + CL2 + LAP | Ovinos | 300 µg x 2 | ACF/AIF | 79.0 | | | Piacenza <i>et al.</i> , 1999 |
| LAP | Ovinos | 100 µg x 2 | ACF/AIF | 89.6 | | | Piacenza <i>et al.</i> , 1999 |
| Paramiosina | Ovinos | 100 µg x 2 | ACF/AIF | 45.0 | 94.0 | | Spithill <i>et al.</i> , 1999 |
| | Ovinos | 100 µg x 2 | DEAE | NR | 57.0 | | Spithill <i>et al.</i> , 1999 |
| | | | Dex/SM | | | | |
| | Bovinos | 100 µg x 2 | Quil A/SM | 47.0 | 55.0 | | Spithill <i>et al.</i> , 1999 |

*Purificada en *S. Mansoni* (reacción cruzada). FABP, proteínas que se unen a ácidos grasos. GST, glutatión S-transferasa. CL1/2, catepsina L1/2. LAP, leucina aminopeptidasa. ACF, adyuvante completo de Freund. AIF, adyuvante incompleto de Freund. SM, adyuvante Squalene Montanide. NR, ninguna reducción.

Se observaron reducciones significativas en la carga parasitaria (49-69%) en bovinos vacunados con GST en Quil A/Squalene Montanide (SM) y microesferas PLG/SM, aunque no hubo correlación entre los títulos de IgG anti-GST y la protección. En un segundo experimento, varios animales vacunados con GST en Quil A/SM, y desafiados varias veces después de un refuerzo (re-vacunación), mostraron una reducción promedio de la carga parasitaria de 43%, con un rango de 19 a 69% (Cuadro 1) (Morrison *et al.*, 1996).

Sexton *et al.* (1994), hicieron predicciones de péptidos que se superponen de las secuencias de aminoácidos que codifican para cuatro cDNA de FhGST, definiendo los epitopos lineales reconocidos por el anticuerpo policlonal de ovinos vacunados con FhGST, pero no encontraron una correlación entre la respuesta de los anticuerpos a los epitopos de los péptidos lineales y el nivel de protección (57%) inducido en ovinos por vacunación con FhGST.

El modo de acción de la respuesta inmune contra GST que lleva a la eliminación de los parásitos permanece aún por ser determinada, pero parece haber por lo menos dos posibilidades: a) que la respuesta de los anticuerpos dirigidos al sitio activo de GST neutralice o reduzca la actividad de la GST en el parásito por impedimento estérico en los sitios de unión del sustrato, y como resultado daño en el tejido del parásito, resultante de la acción exógena del ácido nítrico y oxígeno reactivo liberados por la respuesta inflamatoria del huésped en el parásito; b) que la GST esté actuando como un antígeno abundante liberado por *F. hepatica*, el cual induce una respuesta inflamatoria inmune que elimina los trematodos. Los parásitos adultos contienen cerca de 200 µg de GST por trematodo (Wijffels *et al.*, 1992), y se han detectado pocas cantidades de GST en el sobrenadante del cultivo de parásitos incubados *in vitro*, sugiriéndose que la GST puede ser secretada por parásitos vivos (Sexton *et al.*, 1994). Los conejos inmunizados con productos de excreción/secreción (E/S) de parásitos adultos desarrollan bajos niveles de anticuerpos a GST indicando que esta enzima es liberada en algún grado por el parásito adulto (Hillyer *et al.*, 1992).

Catepsinas L

Las cisteínas o tior proteasas son secretadas por todos los estados de *Fasciola hepatica* que existen en los huéspedes mamíferos (Dalton y Heffernan, 1989; Carmona *et al.*, 1993). Los principales componentes de esas secreciones son las catepsinas L, dos de las cuales, llamadas catepsina L1 (27 kDa, FhCL1) y catepsina L2 (29.5 kDa, FhCL2), han sido aisladas de productos de E/S del parásito (Smith *et al.*, 1993b; Dowd *et al.*, 1994). Estas enzimas exhiben una identidad en aminoácidos del 77% y son homólogas a las catepsinas L lisosomales de mamíferos; compartiendo similitudes en sus secuencias de aproximadamente 45% con los homólogos de mamíferos (Tort *et al.*, 1999).

Posterior a la ingestión de sangre del huésped y tejido del hígado se lleva a cabo la digestión por las catepsinas L, las cuales son secretadas al lumen del intestino del parásito. Los productos de la descomposición de esta endoproteólisis son entonces absorbidos por células epiteliales donde sufren además una degradación por dipeptidil peptidasa y aminopeptidasa, hasta aminoácidos que son usados en el anabolismo de proteínas del parásito, o en el caso de adultos, en la producción de huevos (Tort *et al.*, 1999).

Se ha demostrado que las catepsinas L del parásito pueden eficazmente romper proteínas de la matriz intersticial como fibronectina, laminina y colágena nativa (Berasain *et al.*, 1997). También se ha demostrado que las catepsinas L pueden escindir las inmunoglobulinas, en la región bisagra (separando la Fab de la región Fc) y evitando la unión mediada por anticuerpos de los eosinófilos a la superficie del parásito y por lo tanto ayuda en proteger a *F. hepatica* de un ataque inmune (Carmona *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1993a; Berasain *et al.*, 1997).

La selección de bibliotecas de cDNA de *F. hepatica* con antisuero a esas proteínas (o selección con fragmentos de PCR) confirma que la catepsina L es una proteína secretada de 326 aminoácidos, consta de 17 aminoácidos la secuencia señal, 90 aminoácidos la secuencia de activación y 219 aminoácidos la proteasa madura (Yamasaki y Aoki, 1993; Heussler y Dobbelaere, 1994;

Wijffels *et al.*, 1994a; Roche *et al.*, 1999; Dowd *et al.*, 1994). La adolescencia de *Fasciola hepatica* secreta una cisteína proteasa homóloga en secuencia con catepsina B, la cual puede jugar un papel en la invasión de tejido, renovación de glicocálix o desenquistamiento de metacercarias (Wilson *et al.*, 1998).

No se han encontrado reducciones en la carga de parásitos adultos en ovinos inmunizados con catepsina L usando el ACF, pero sí hubo una reducción significativa en el número de huevos en heces (69.4%), no existiendo una correlación con los títulos de anticuerpos contra catepsina L (Cuadro 1) (Wijffels *et al.*, 1994b).

Se han utilizado varias dosis de FhCL1 en bovinos (10-500 µg). Administrando tres inmunizaciones de FhCL1 -la primera con ACF y dos subsecuentes con adyuvante incompleto de Freund (AIF)- se indujeron reducciones en la carga parasitaria entre 38.2 y 69.5% cuando se comparó con los controles (Dalton *et al.*, 1996). También se han encontrado reducciones en la fecundidad del parásito, con una viabilidad de los huevos producidos de 40 a 65% (Cuadro 1) (Dalton *et al.*, 1996). Otro ensayo confirmó una protección del 54% en bovinos empleando una combinación de FhCL1 y FhCL2 (Cuadro 1) (Mulcahy *et al.*, 1998).

La hemoglobina de *F. hepatica* (FHb) utilizada en combinación con FhCL1 ó FhCL2 (200 µg de cada antígeno por inmunización) incrementó la eficacia de las vacunas, comparando con la FHb sola. La mejor formulación de FhCL2-FHb produjo una reducción de la carga parasitaria del 72.4% en bovinos. Los huevos de *F. hepatica* mostraron una viabilidad del 80% con preparaciones de catepsina L1-FHb, y del 0-7% para catepsina L2-FHb (Cuadro 1) (Dalton *et al.*, 1996).

Los medios por los cuales las vacunas median ese efecto de anti-fecundidad/anti- embrionación no se han comprendido completamente, pero esto es posible a través de un efecto directo de los anticuerpos sobre la catepsina L en las estructuras reproductivas del parásito ó mas probablemente un efecto indirecto en la síntesis de huevos a través de la inhibición en la adquisición de nutrientes facilitada por las proteasas en el intestino (Mulcahy y Dalton, 2001).

Hemoglobina de *Fasciola hepatica* (FHb)

La hemoglobina ha sido previamente aislada de los productos de E/S de *Fasciola hepatica*. Contiene un grupo hemo y se ha sugerido que tiene una función en el transporte de oxígeno (McGonigle y Dalton, 1995). Los ensayos de inmunización de bovinos utilizando hemoglobina con el ACF provocaron una reducción de la carga parasitaria del 43.8%, en comparación con la combinación de FhCL2-FHb del 72.4% (Cuadro 1) (Dalton *et al.*, 1996).

Leucina aminopeptidasa (LAP)

La leucina aminopeptidasa es una exoproteasa purificada de extractos de membrana solubles por detergente en *F. hepatica* y caracterizada como una leucina aminopeptidasa por su afinidad por el substrato leucina-7-amino-4-metilcumarin-NHMec. Por métodos histoquímicos se ha demostrado que la actividad de la LAP del parásito esta asociada a las células epiteliales que revisten el tracto digestivo de *F. hepatica*. Las funciones más probables de esta enzima se relacionan con los estados finales del catabolismo de péptidos que son generados por la degradación de tejidos del huésped por endoproteasas, como la cathepsina L, y son absorbidos por células epiteliales (Piacenza *et al.*, 1999).

En ovejas inmunizadas con FhCL1 y FhCL2 se obtienen niveles de protección de 33 y 34%, así como una reducción en el número de huevos en heces de 71% y 81%, respectivamente (Cuadro 1). En una segunda prueba, FhCL1 y FhCL2 indujeron una reducción de 60% en la carga parasitaria; pero cuando se combinaron con leucina aminopeptidasa (LAP) se incrementó hasta el 79%. Sin embargo, cuando se vacuna solamente con LAP, se observan altos niveles de protección (89.6%) (Cuadro 1) (Piacenza *et al.*, 1999).

Paramiosina

La paramiosina es una proteína fibrilar ampliamente distribuida entre los invertebrados, pero ausente en los vertebrados. Algunos estudios en ratones han reportado diferentes niveles de respuesta y protección con paramiosina en contra de *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum* (Pearce *et al.*, 1988; Flanigan *et al.*, 1989; Ramirez *et al.*, 1996). La mayoría de las paramiosinas tienen un peso molecular de alrededor de 100 kDa e incluyen un arreglo característico de secuencias repetidas de 7 aminoácidos de estructuras doble alfa hélice (Lanar *et al.*, 1986). Están predominantemente localizadas en el músculo como un componente del núcleo de los filamentos gruesos (Epstein y Millar, 1985). La paramiosina ha sido purificada de *F. hepatica*, y los estudios inmunohistoquímicos utilizando suero anti-paramiosina han demostrado su localización dentro del músculo subtegumental y en células musculares alrededor del intestino del parásito adulto (Cancela *et al.*, 2004). Las paramiosinas de diferentes platelmintos pueden impedir la activación de la cascada del complemento (Laclette *et al.*, 1992), unirse a colágeno (Laclette *et al.*, 1990) y a moléculas con Fc- γ (Loukas *et al.*, 2001).

En ovinos vacunados subcutáneamente con intervalos de 4 semanas, con dosis de 100 μ g de paramiosina emulsificada en ACF ó SM conteniendo DEAE dextran al 5% (p/v), y desafiados 2 semanas después del refuerzo, se observó una marcada reducción de la carga parasitaria (45%) para el grupo inmunizado con el ACF, comparado con los controles. Sin embargo, el número de huevos en heces presentó una reducción promedio del 95% para el grupo con el ACF y 57% para el grupo con DEAE dextran (Cuadro 1) (Spithill *et al.*, 1999).

Pruebas en bovinos usando solamente Quil A/SM han mostrado reducciones significativas en la carga parasitaria, así como en el número de huevos en heces en la semana 13 (55%) (Cuadro 1) (Spithill *et al.*, 1999).

Estos han sido algunos intentos contra la fasciolosis, pero no se ha logrado la introducción de una vacuna confiable en el mercado.

Tecnología de despliegue en fagos o phage display

Introducción a la tecnología de phage display

Phage display es una poderosa herramienta para seleccionar péptidos y proteínas, incluyendo anticuerpos, con alta afinidad y especificidad a casi cualquier blanco molecular de interés (Smith, 1985; Winter *et al.*, 1994; Kay y Hoess, 1996). Una biblioteca de despliegue en fagos está basada en colecciones de partículas de bacteriófagos que expresan o “despliegan” aleatoriamente secuencias de péptidos en su superficie, como producto de fusión con una de las proteínas que cubren al fago (Smith y Scott, 1993). Desde 1990, la escala y alcance de esta tecnología ha evolucionado rápidamente y se ha usado ampliamente en ciencias de la vida.

El bacteriófago filamentoso

Los fagos filamentosos (género *Inovirus*) constituyen una gran familia de virus bacterianos que infectan una variedad de bacterias gram negativas. Los bacteriófagos más ampliamente estudiados son f1, fd y M13, los cuales tienen 98% de homología en su secuencia de DNA. Estos bacteriófagos utilizan la punta del pilus conjugativo como receptor y éstos son específicos para *Escherichia coli* conteniendo el plásmido F (Russel *et al.*, 1997). La relativa simplicidad de esos virus y la facilidad con la que pueden ser manipulados genéticamente los han hecho fructíferos modelos para estudiar estructuras macromoleculares e interacciones (Sidhu, 2001).

Estructura del bacteriófago filamentoso

El bacteriófago M13 tiene un diámetro de 6.5 nm y una longitud de 930 nm. La masa molecular de la partícula es aproximadamente de 16.3 MDa, de la cual

87% es proteína. El genoma de la partícula viral consiste en una cadena sencilla de DNA covalentemente cerrada de cerca de 6,400 nucleótidos y 11 genes, que están encapsulados en un cilindro de proteína flexible. La partícula está formada por aproximadamente 2,700 copias de 50 aminoácidos de la proteína principal, llamada proteína 8 (gen VIII, pVIII) que cubre la longitud del bacteriófago. En un extremo del fago, están presentes 5 copias de 33 residuos, la proteína 7 (gen VII, pVII) y la proteína 9 (gen IX, pIX) con 32 residuos. El otro extremo contiene 5 copias, cada una de 406 residuos, la proteína 3 (gen III, pIII) y la proteína 6 (gen VI, pVI) con 112 residuos (Kehoe y Kay, 2005).

La pIII tiene tres dominios separados por regiones ricas en glicina (Stengle *et al.*, 1990). Esos dominios han sido designados como N1 o D1, N2 o D2 y CT o D3 por diferentes autores. El primer dominio, N1 contiene 68 aminoácidos en la región amino terminal, que son requeridos durante la infección para la translocación del DNA en el citoplasma y la inserción de las proteínas que cubren la membrana. El segundo dominio, N2 contiene los residuos 87-217 y es responsable de la unión con el pilus F (Deng *et al.*, 1999). Ambos dominios contienen moléculas de cisteína que están involucrados en uniones disulfuro intramoleculares dentro de cada dominio (Kremser y Rasched, 1994). N1 y N2 están expuestos en la superficie de la partícula del fago; la ausencia de estos dominios por tratamiento con proteasas produce que el fago no sea infectivo (Gray *et al.*, 1981; Armstrong *et al.*, 1981). El extremo carboxilo contiene el tercer dominio de pIII (CT) y consta de 150 aminoácidos y es esencial para la formación de una partícula de fago estable (Crissman y Smith, 1984; Kremser y Rasched, 1994).

Ciclo infeccioso del bacteriófago filamentoso

El fago filamentoso no produce una infección lítica en *E. coli*, pero puede inducir un estado lisogénico en el cual la bacteria infectada produce y secreta partículas de fago sin experimentar lisis. La infección requiere la interacción con el pilus conjugativo y las proteínas de membrana citoplasmáticas de la bacteria TolQ,

R y A. Estas proteínas bacterianas son necesarias para el mantenimiento de la integridad de la membrana externa bacteriana (Lazzaroni *et al.*, 1999). Estas tres proteínas Tol son requeridas durante la infección del fago por translocación del DNA del fago filamentoso dentro del citoplasma y la translocación de las proteínas que cubren al fago dentro de la membrana citoplasmática (Russel *et al.*, 1988; Click y Webster, 1998).

La infección se inicia con la unión de la punta del pilus sexual F al dominio N2 de la pIII del fago (Deng *et al.*, 1999). Después de que el fago se une al pilus, éste se retracta, llevando el extremo de la pIII de la partícula del fago al periplasma. La unión de N2 al pilus, libera el dominio N1 de N2, y permite a N1 interactuar con el dominio 3 de TolA (correceptor) (Riechmann y Holliger, 1997). TolQ y TolR están involucradas en la formación de algunos canales o complejo de proteínas requeridas para que el DNA atraviese la membrana. También se ha sugerido que el dominio CT de la pIII puede estar involucrado en la formación de un poro de entrada (Glaser-Wuttke *et al.*, 1989).

Una vez que el DNA circular de cadena sencilla (+) entra al citoplasma, la cadena complementaria (-) es sintetizada por enzimas bacterianas. El resultado es una doble cadena de DNA, la forma replicativa parental (FR). La cadena (-) de esta FR es la plantilla para la transcripción, y el mRNA resultante es traducido en todas las proteínas del fago. La FR experimenta replicación por círculo rodante "rolling circle" para formar una nueva cadena viral, utilizando las enzimas bacterianas. Cuando las proteínas del fago y el genoma de la cadena sencilla de DNA se acumulan dentro de la bacteria infectada, se inicia el ensamblaje del virión. Las proteínas estructurales pVIII, pVII, pIX, pVI y pIII espontáneamente se insertan en la membrana interna de la bacteria. Cuando la pV alcanza una concentración crítica, ésta cubre a la cadena sencilla recién sintetizada y previene su conversión a una doble cadena de DNA. La pIII es sintetizada con un péptido señal de 18 residuos en el extremo amino terminal, el cual es removido después de la inserción en la membrana. Por el contrario, las pVI, pVII y pIX son sintetizadas sin el péptido señal (Barbas *et al.*, 2001).

La mayoría de vectores de phage display utiliza la región N-terminal de la pIII para desplegar el péptido o proteína foránea (Smith y Scott, 1993). Las bibliotecas de pIII despliegan de 3 a 5 copias de cada péptido individual (Scott y Smith, 1990), mientras que las bibliotecas de pVIII pueden desplegar hasta 2,700 copias de pequeños péptidos (hasta seis aminoácidos) (Greenwood *et al.*, 1991)

Bibliotecas de péptidos aleatorios expresados en fagos

La construcción de bibliotecas de péptidos combinatorios es una importante aplicación de la tecnología de phage display. Las bibliotecas de péptidos que expresan muchos millones de secuencias de péptidos aleatoriamente en la superficie del bacteriófago filamentoso fd y M13, son usadas para definir sitios de unión del ligando que son difíciles de identificar por técnicas convencionales (Szardenings, 2003). Oligonucleótidos sintéticos con una longitud constante, pero con codones inespecíficos aleatoriamente a través de mutagénesis directa al sitio usando oligonucleótidos degenerados, son clonados como fusión a una de las proteínas que cubren el fago M13, y éstas son expresadas como proteínas de fusión del péptido de la cápsida del virus. Estas bibliotecas de péptidos han sido usadas para determinar el epitopo al cual un anticuerpo se une. Los anticuerpos reconocen los motivos de los péptidos basados en sólo tres o cuatro residuos conservados. Por lo tanto, es posible definir la región de una proteína reconocida por un anticuerpo basada en los motivos revelados por phage display (Scott y Smith, 1990). Además, el despliegue de pequeños péptidos en la superficie de la partícula del fago puede incrementar su inmunogenicidad y consecuentemente su potencial como candidatos de vacunación (Azzazy y Highsmith, 2002).

Aplicaciones de la tecnología de phage display en parasitología

Las bibliotecas de péptidos aleatorios han sido usados exitosamente para la identificación de péptidos que mimetizan epitopos de antígenos como vacunas. Estos mimotopos son capaces de mimetizar una región conservada de la proteína

de adhesión de la membrana apical del merozoito de *Plasmodium vivax* (Demangel *et al.*, 1996) y *Plasmodium yoelii* (Narum *et al.*, 2006).

Para obtener péptidos que mimetizan epitopos de *Trichinella spiralis* y explorar su inmunidad cruzada y capacidad protectora contra *Schistosoma japonicum*, utilizaron IgG purificada de suero de ratones infectados con *T. spiralis* para seleccionar péptidos por afinidad de una biblioteca combinatoria de 7 aminoácidos. Los ratones Kunming fueron inmunizados en tres ocasiones subcutáneamente, con una mezcla de fagos filamentosos. Comparado con el grupo control, los índices de reducción del parásito y huevos en hígado fueron 42.8 y 66.3% respectivamente (Zhou *et al.*, 2001).

También se han seleccionado epitopos inmunoprotectores de *Schistosoma japonicum* utilizando anticuerpos (IgG) purificados de suero de ratas. Los ratones Kunming fueron inmunizados con dos de estas clonas, en tres ocasiones (semana 0, 2 y 4). Comparado con el grupo control, la mezcla de estos dos péptidos induce una reducción de parásitos del 34.9%, y de huevos en hígado del 67.6%. Asimismo, dos diferentes péptidos inducen una reducción parasitaria del 31.0 y 14.5%, y una reducción en la producción total de huevos en hígado del 61.2 y 35.7%, respectivamente (Wang *et al.*, 2003).

Se han aislado e identificado epitopos antigénicos de ferritina de *Schistosoma japonicum*, utilizando suero policlonal de ratón contra ferritina recombinante para seleccionar péptidos de una biblioteca combinatoria de 12 aminoácidos. Inmunizando ratones Kunming hembras de 4 semanas de edad subcutáneamente, con 1×10^{12} partículas de fago en tres ocasiones, se obtuvieron reducciones significativas del parásito adulto, para tres péptidos seleccionados (26.7, 20.4 y 25.9%), así como los huevos por gramo de hígado (40.0, 38.2 y 40.8%) respectivamente (Tang *et al.*, 2004).

Las metaloproteasas son importantes para la invasión e inmunoevasión de *Schistosoma*. Tang *et al.* (2005), aislaron y caracterizaron péptidos que mimetizan epitopos de metaloproteasas para explorar su protección inmunológica contra *Schistosoma japonicum*, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-

metaloproteasa. Algunos ratones Kunming hembras fueron inyectados subcutáneamente con 1×10^{12} partículas de fago, en tres ocasiones. Solamente dos clonas indujeron una reducción significativa de la carga parasitaria (31 y 31.8%) y una alta reducción en el número de huevos por gramo de hígado (52.6 y 54.9%).

Wu *et al.* (2006), utilizaron suero de conejo Nueva Zelanda inmunizado con una proteína recombinante Sj338 de una biblioteca de cDNA en *Schistosoma japonicum*, para seleccionar epitopos protectores de una biblioteca combinatoria que expresa 12 aminoácidos. Experimentos de vacunación utilizando ratones BALB/c hembras de 6 semanas de edad inmunizados en tres ocasiones intraperitonealmente con cuatro clonas diferentes y un conjunto de éstas con 1×10^{12} ó 4×10^{12} unidades formadoras de colonias (ufc) respectivamente, sin adyuvantes; las cuatro clonas individuales mostraron reducciones de la carga parasitaria (11.6 - 25.1%) y el grupo de cuatro clonas (34.2%) en comparación con el grupo control.

Epitopos de catepsina L de *Fasciola hepatica*

Cornelissen *et al.* (1999), utilizó ocho péptidos sintéticos de catepsina L de 20 aminoácidos de longitud que fueron seleccionados por su región inmunodominante utilizando las secuencias de catepsinas derivadas de los datos de nucleótidos de Wijffels depositados en el NCBI. Sólo dos péptidos (CNNRAVPDKIDWRESGY-VTE y DKIDWRESGYVTEVKDQGNC) basados en ELISA detectaron anticuerpos contra *Fasciola hepatica* en suero de vacas.

Recientemente Intapan *et al.* (2005), sintetizaron dos péptidos de las regiones antigénicas de catepsina L con fines de diagnóstico de *Fasciola gigantica* utilizando una ELISA para detectar IgG en humanos. El primer péptido fue derivado de los aminoácidos 110-129 de la parte enzimática de catepsina L de *F. hepatica* (Wijffels *et al.*, 1994) (número de acceso al GenBank L33771), así como la catepsina L1-B de *F. gigantica* (Grams *et al.*, 2001) (número de acceso al

GENBANK AF239264) o de los aminoácidos 3-22 de de la catepsina L1-E de *F. gigantica* (Grams *et al.*, 2001) (número de acceso al GenBank AF239267), fue sintetizado con una carboxiamida en la región C-terminal y acetilo en la N-terminal: acetilo-DKIDWRESGYVTEVKDQGNC-carboxiamida (péptido V). Para el otro péptido se utilizaron los aminoácidos de la región enzimática de la catepsina L1 de *F. gigantica* (Grams *et al.*, 2001) (número de acceso al GenBank AF112566); éste fue sintetizado con una carboxiamida en la región C-terminal y acetilo en la N-terminal: acetilo-DKIDWRESGYVTEVKDQGNC-carboxiamida (péptido L). Los resultados sobre diagnóstico de *F. gigantica* revelan ser altamente sensibles y específicos en el ELISA con los péptidos L y V.

Se puede inducir protección por inmunidad contra *F. hepatica* por infección o vacunación con parásitos recién desenquistados (juveniles) cuando emigran a través de la pared intestinal. Se han identificado antígenos con un peso molecular de 32 kDa expresados por las fasciolas recién desenquistadas siendo altamente inmunogénicas en ratas, resultando en una reducción del 84% de la carga parasitaria (Van Milligen *et al.*, 2000). Además se ha identificado que esta proteína se encuentra dentro de la proenzima de la catepsina L.

Harmsen *et al.* (2004), aisló y secuenció dos cDNA (pFH 22 y pFH64) que codifican para la catepsina L del parásito recién desenquistado por transcripción inversa. Ya que las secuencias del plásmido pFH22 exhiben una identidad del 66 y 67% con catepsina L1 y L2, por lo que se le asignó el nombre de catepsina L3; ésta contiene el motivo con la secuencia ERFNIN, la cual es típica de las proteasas del tipo de las catepsinas (Karrer *et al.*, 1993), en la región que comprende los residuos 37-56 y un sitio con potencial de N-glicosilación en la posición 151. La CL3 recombinante fue expresada en *Saccharomyces cerevisiae*, y como resultado la secreción de la proenzima. Con base en esta información se produjeron tres péptidos sintéticos dos de los cuales contienen epitopos putativos a células B en las regiones N-terminal del propéptido y la porción madura de la catepsina L1 (Cornelissen *et al.*, 1999), usando el índice de antigenicidad de Jameson y Wolf (1988). Se inmunizaron ratas Wistar, y después de desafiar a los

animales con metacercarias obtuvieron una reducción significativa del número de parásitos, concluyendo que el propéptido de la catepsina L3 induce inmunidad contra *F. hepatica*.

HIPÓTESIS

La inmunoprolifaxis con catepsinas confiere un nivel de protección significativo a través de una reducción en el número de parásitos de *Fasciola hepatica* en el huésped definitivo y en la eliminación de huevos.

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar y evaluar inmunógenos de proteínas recombinantes para la inmunoprolifaxis de *Fasciola hepatica* en el huésped definitivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Elaborar inmunógenos de proteasas (catepsinas) a partir de una biblioteca combinatoria de fagos filamentosos para evaluarlos en ovinos.

Evaluar la respuesta inmune humoral en los animales inmunizados y desafiarlos con metacercarias de *Fasciola hepatica* para cuantificar la reducción de huevos y adultos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de *F. hepatica* y productos de excreción/secreción (E/S)

Los parásitos adultos fueron obtenidos de hígados de vacas sacrificadas en el rastro. Los trematodos fueron lavados 6 veces en amortiguador de fosfatos salinos (PBS) estéril 0.01 M, pH 7.2 y mantenidos en incubación en el medio de cultivo RPMI-1640, pH 7.3, toda la noche a 37°C con penicilina (100 UI/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml). Al término de la incubación los productos de (E/S) fueron removidos, centrifugados a 14,000 g por 30 minutos a 4°C y guardados a -20°C hasta su uso. Los productos de ES fueron concentrados mediante ultrafiltración en tubos con una membrana con corte de peso molecular de 10 kDa, centrifugándose a 3,000 rpm y una temperatura de 4°C, posteriormente la concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976).

Purificación de catepsinas

Las muestras fueron purificadas por cromatografía de intercambio iónico en HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), utilizando una columna de Q sefarosa (Amersham), equilibrada con 20 mM Tris-HCl, pH 8, y detectadas a una absorbancia de 280 nm. De las fracciones colectadas, enriquecidas con catepsina, se concentraron, y se determinó la concentración por el método de Bradford (1976). El conjunto de proteínas fueron aplicadas a una columna de filtración en gel Superdex 75 (Amersham), equilibrada con 20 mM Tris-HCl, pH 7. El proceso de purificación fue analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE) por el método de von Jagow.

Para distinguir y determinar la actividad de las catepsinas L1 y L2 fueron utilizados dos sustratos fluorogénicos sintéticos (Z-Phe-Arg-NHMec y Tos-Gly-

Pro-Arg-NHMec), utilizando los amortiguadores y métodos descritos por Dowd *et al.*, 1994.

Secuenciación de catepsinas

La región correspondiente al peso molecular de las catepsinas (27-29 kDa) en SDS-PAGE al 12% fueron cortadas, desteñidas y digeridas con tripsina (Promega, USA), como lo describe Shevchenko *et al.*, 1996. La espectrometría de masas de las muestras tratadas con tripsina fueron analizadas utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF (matrix-associated laser desorption/ionization time-of-flight) en un Voyager-DE PRO MALDITOF system (Applied Biosystems, USA).

Obtención de anticuerpos anti-catepsina e inmunotransferencia

Las fracciones obtenidas se utilizaron para inmunizar un conejo Nueva Zelanda, administrándose subcutáneamente 75 µg de la enzima purificada, utilizando inicialmente el adyuvante completo de Freund y posteriormente en cuatro ocasiones el adyuvante incompleto de Freund con intervalos de 15 días. La IgG del suero obtenido al final del protocolo de inmunización fue purificada por medio de columnas de afinidad sefarosa-proteína A (Amersham Biosciences), equilibrada con 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5. En la inmunotransferencia, los productos de excreción-secreción (E/S) fueron separados en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE) al 12%, por el método de Laemli (1970). Se utilizaron 5 µg para cada carril. Electroforéticamente fue transferida a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore), usando una cámara semiseca (Biorad). Posteriormente al bloqueo con Blotto B (leche descremada y BSA al 1% en TBS [amortiguador tris salino]) toda la noche a 4°C, se lavó la membrana en 3 ocasiones con TBS-Tween al 0.05% por 5 minutos. Posteriormente la membrana de PVDF fue incubada por 1.5 horas con 1 µg de IgG

de conejo anti-catepsina en Blotto B. Después de lavar, se incubó con el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-conejo, Sigma, USA) unido a peróxidasa de rábano a una dilución de 1:2500 en Blotto B durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. La unión de la inmunoglobulina fue visualizada utilizando 3, 3'-Diaminobenzidina (DAB, Sigma, USA). Se utiliza una tableta de DAB y una de peróxido de hidrógeno de urea disuelta en 15 ml de agua destilada (Sigma).

Análisis de la respuesta de anticuerpos a productos de E/S por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) indirecto

Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Nunc-Immuno, Plate F96, Cert, Maxisorp), utilizando 100 µl/pozo con 1 µg de productos de excreción/secreción (E/S) en amortiguador de carbonatos 0.1 M (pH 9.6). Posterior a la incubación toda la noche a 4°C, las placas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con 200 µl de PBS, conteniendo Tween-20 al 0.05% y bloqueada con 200 µl por pozo de una solución conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en PBS-Tween 20 al 0.05% por 30 minutos a 37°C. Después del bloqueo y lavado, fueron adicionados 0.625 - 20 µg/mL de anticuerpo de conejo anti-catepsina, 0.625 - 20 µg/mL µg de anticuerpo de conejo anti-productos de ES y suero de conejo negativo a *F. hepatica* en 100 µl de PBS-Tween 20 al 0.03% en cada pozo e incubados por 1 hora a 37°C. Para los sueros se hicieron diluciones sucesivas de 1:200 hasta 1:12800. La placa fue lavada como se describe anteriormente e incubada con 100 µl/pozo de un anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-conejo ó IgG de burro anti-borrego respectivamente, conjugada con peroxidasa de rábano) por 1.5 horas a 37°C. Se utilizó una dilución de 1:2,000 en PBS-Tween. Después del lavado, se adicionaron 100 µl/pozo de substrato (4 mg de ortho-phenyldiaminehydrochloride (OPD), 10 ml de amortiguador de citratos 0.1 M (pH 5), 4 µl/ml de peróxido de hidrógeno (30%, w/v) e incubado en un lugar oscuro a temperatura ambiente durante 5 minutos. La reacción fue parada adicionando 50

µl por pozo de ácido sulfúrico 1M. La absorbancia fue medida a 492 nm en un lector de ELISA (Beckman Coulter DTX 880).

Selección de péptidos de una biblioteca de exposición en fago "phage display"

Se adquirió una biblioteca combinatoria con fagos filamentosos (M13) que expone aleatoriamente péptidos de 12 aminoácidos en la región N-terminal fusionado con la proteína III, está consiste en 2.7×10^9 secuencias electroforadas y con un título de 1.5×10^{13} ufc/mL (New England Biolabs, USA).

Los péptidos fueron seleccionados con las IgG anti-catepsina purificadas de conejo. Los pozos de una placa de ELISA (Nunc-Immuno Plate F96, Cert, Maxisorp), fueron cubiertos con 150 µg/mL de IgG purificada en 100 µl de PBS, pH 7.3, y cubierta en un contenedor húmedo para evitar evaporación e incubada toda la noche en agitación a 4°C. Posteriormente los pozos fueron bloqueados con 300 µl de amortiguador de bloqueo (PBS conteniendo BSA al 1%) durante 1 hora a 4°C. Después de lavar en seis veces con 200 µl de PBS-T (PBS conteniendo Tween-20 al 1%), se añadieron 1.0×10^{11} partículas de fagos en 100 µl de PBS-T, incubándose por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Los fagos que no se unieron fueron removidos lavando con 200 µl de PBS-T al 0.1% por 10 ocasiones. Los fagos que se unieron fueron incubados con 100 µl de glicina-HCl 0.2 M, pH 2.2 por 10 minutos a temperatura ambiente y neutralizados con Tris-HCl 1M, pH 9.0. Una pequeña fracción fue usada para titulación, el resto fue utilizado para infectar células de la cepa de *E. coli* ER2738 para la amplificación del fago. Se llevaron a cabo otras dos rondas de selección por afinidad, el primero utilizando 150 µg/mL de IgG purificada y por último utilizando 75.0 y 37.5 µg/mL de IgG anti-catepsina purificada.

Amplificación y titulación de los fagos

Los fagos eluidos fueron adicionados a la cepa de *E. coli* ER2738 (New England Biolabs, USA) en el medio de cultivo 2XYT, por 4.5 horas a 37°C en agitación constante. El cultivo fue transferido a tubos y centrifugado a 11,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue removido a un tubo nuevo y se le adicionó una cuarta parte (v/v) de PEG 20%-NaCl 2.5 M, precipitándose los fagos toda la noche a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 11,000 rpm 12 minutos y se decantó. Se resuspendió el botón con 1 ml de PBS y se agregó una cuarta parte (v/v) de PEG 20%-NaCl 2.5 M. Se incubó en hielo durante 1 hora, y se centrifugó a 11,000 rpm 12 minutos. Posteriormente se desechó el sobrenadante y con PBS-NaN₃ al 0.02% se resuspendió el botón. Se centrifugó a 11,000 rpm durante 2 minutos para quitar materia insoluble. Los fagos amplificados fueron diluidos por una serie de diferentes títulos en medio LB (Luria-Bertani). Un microlitro de cada dilución fue adicionado a 200 µl de un cultivo de *E. coli* ER2738 e incubado 3 minutos a 37°C. Las células infectadas fueron transferidas a un tubo conteniendo agarosa a 45°C, y vertidas posteriormente a una caja tibia con LB e incubadas durante 16 horas a 37°C. Las cajas fueron inspeccionadas y las placas formadas contadas y expresadas como unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL). Posteriormente 36 clonas fueron picadas al azar, cada clona seleccionada fue amplificada, purificada y titulada de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.

ELISA de fagos. Unión específica de las clonas individuales de fagos filamentosos con las IgG de conejo anti-catepsina

ELISA sándwich indirecto con anti-M13

Los pozos de la placa de ELISA fueron cubiertos con IgG de conejo anti-catepsina (10 µg/mL) en PBS conteniendo BSA 0.2%-Tween 20 al 0.2% toda la noche a 4°C en agitación constante. Los pozos fueron lavados en cinco ocasiones con PBS/Tween-20 al 0.2% 5 minutos y posteriormente bloqueado con PBS conteniendo BSA al 1% por 1 hora a 37°C sin agitación. 10^{10} partículas de fagos fueron diluidos en PBS/BSA 0.2%-Tween 0.2% e incubados a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación constante. Se lavaron nuevamente los pozos con PBS-T al 0.2% por 5 ocasiones. Se adicionó el anticuerpo anti-M13-HRP (Amersham Biosciences, USA) en el amortiguador de bloqueo (PBS/BSA 1%) en un volumen final de 200 µl por pozo, incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente sin agitación. La unión específica de los fagos fue visualizada utilizando el ácido 2, 2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS, Sigma, USA) en amortiguador de citratos, utilizando un volumen de 200 µl por pozo. Se utilizó como control negativo PBS. La absorbancia fue determinada a 405 nm.

ELISA indirecto

Se cubrieron los pozos de la placa de ELISA con 10^{10} partículas de fagos que fueron diluidos en PBS/BSA 0.2% e incubados toda la noche a 4°C en agitación. Los pozos fueron lavados en cuatro ocasiones con PBS/Tween-20 al 0.1% y bloqueados con 200 µl de PBS conteniendo BSA al 1% por 1 hora a 37°C. Nuevamente se lavaron los pozos en cuatro ocasiones. Posteriormente se incubó con 10 µg/mL con el anticuerpo primario (IgG de conejo anti-catepsina) en PBS/BSA 0.2%-Tween 0.2% 1 hora a 37°C. Se adicionó el conjugado anti-IgG de de conejo-peroxidasa de rábano. La unión específica de los fagos fue visualizada

utilizando H₂O₂ y orto-fenilen-diamina. Se utilizó como control negativo PBS. La absorbancia fue determinada a 490 nm.

Secuenciación de DNA y análisis de las secuencias

La secuencia de nucleótidos de los insertos del gen III fueron secuenciados con el cebador de secuenciación -96gIII 5'-HOCCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' (New England Biolabs, USA) del kit de la biblioteca de exposición en fago utilizando el secuenciador automático ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, USA).

El alineamiento de los aminoácidos con las secuencias publicadas de catepsina L en el GenBank fue utilizando el programa Clone Manager Professional Suite (Sci Ed Central). Para el alineamiento de los mimotopos de las secuencias de catepsina se utilizó el programa MIMOX (Huang *et al.*, 2006).

Inmunotransferencia (western blot) de las clonas de fagos seleccionados

Se utilizaron 10¹² partículas de fagos de las clonas seleccionadas, incubadas por 3 minutos en amortiguador de carga conteniendo (SDS) y separados en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) al 10%, por el método de Laemli (1970). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), usando una cámara semiseca (Biorad). Posteriormente al bloqueo con Blotto B (leche descremada y BSA al 1% en TBS) toda la noche a 4°C. Se lavó la placa en 3 ocasiones con TBS-Tween al 0.05% durante 5 minutos. Posteriormente la membrana de PVDF fue incubada por 1.5 horas con 10 µg/mL de IgG de conejo anti-catepsina en Blotto B. Después de lavar, se incubó con el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-conejo, Sigma, USA) unida a peróxidasa a una dilución de 1:2,500 en Blotto B durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. La unión de la inmunoglobulina fue visualizada utilizando 3, 3'-Diaminobenzidina (DAB). Se utilizó

una tableta de DAB y una de peróxido de hidrógeno de urea disuelta en 15 ml de agua destilada (Sigma).

Evaluación de candidatos a vacunación

Protocolo de inmunización

Veinte ovinos pelibuey (once machos y nueve hembras) de un año de edad fueron estabulados en corrales. Los animales nacieron y fueron adquiridos del Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), area libre de fasciolosis y mostraron estar libres de la infección por análisis de heces y anticuerpos en suero por ELISA. Los 20 ovinos fueron agrupados en cuatro grupos de peso similar. El grupo 1 (n = 5) recibieron 1×10^{14} partículas de fagos de la clona 1 para inmunización, el grupo 2 (n = 5) recibieron 1×10^{14} partículas de fagos de la clona 20 para inmunización, el grupo 3 (n = 5) recibieron 1×10^{14} partículas de fagos de un grupo de siete clonas (1, 2, 3, 5, 17, 19, 20) para inmunización, y el grupo 4 (n = 5) control recibieron PBS estéril. Cada animal recibió la primera inyección por vía subcutánea y sin ningún adyuvante en la semana 0. Una segunda inyección fue administrada a los 28 días (semana 4).

Toma de muestras de sangre

Esta fue obtenida utilizando el sistema Vacutainer cada 2 semanas desde la semana 0 y hasta el fin del experimento (semana 22).

Conteo de huevos en heces

Las muestras de heces fueron colectadas semanalmente del recto de los animales inmunizados. Cinco gramos de cada muestra de heces fue procesada

por la técnica de sedimentación como es descrita por Sexton *et al.*, (1990). Los huevos de *F. hepatica* fueron expresados como el número de huevos por gramo de heces (hpg).

Desafío con parásitos

Las metacercarias de *F. hepatica* fueron donadas del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA), Jiutepec Morelos, México y guardadas a 4°C. Éstas fueron liberadas de caracoles *Lymnaea cubensis*. Las cápsulas de gelatina conteniendo las metacercarias (menos de 2 meses de edad) fueron administradas *per os* a cada animal con unas pinzas esofágicas. Cada ovino recibió 300 metacercarias 14 días después de la segunda inmunización (semana 6).

Medición de la protección

El sacrificio de todos los animales fue en la semana 22 posterior a la primera inmunización; el hígado y vesícula biliar fueron removidos y los parásitos recuperados, los cuales fueron contados y medidos individualmente para cada animal.

Estimación de la viabilidad de los huevos de *F. hepatica*

La bilis fue depositada individualmente en un vaso de precipitados, lavada con agua y decantada en 5 ocasiones, los huevos obtenidos fueron incubados en oscuridad a una temperatura de 22°C por 14 días (Dalton *et al.*, 1996). Los huevos fueron examinados microscópicamente y la viabilidad fue determinada al estimar el porcentaje de huevos que embrionaron y se desarrollaron en miracidios, así como aquellos huevos que eclosionaron posterior a la exposición a la luz.

Análisis por ELISA de la respuesta de anticuerpos de borregos inmunizados contra diferentes clonas de fagos filamentosos y productos de E/S

Para los fagos filamentosos se utilizó un ELISA sándwich indirecto con anti-M13 (descrito anteriormente), con una dilución de suero de borrego inmunizado de 1:400; así mismo, para los productos de E/S (30 µg/mL) se empleó un ELISA indirecto (descrito anteriormente) con una dilución de suero de ovino de 1:800.

Análisis estadístico

Las medias aritméticas fueron calculadas para la carga parasitaria, número de huevo en heces, viabilidad de huevos de *F. hepatica* y los valores de los ELISA de los grupos vacunados y control. El porcentaje de protección de acuerdo al número de parásitos recuperados fue calculado de acuerdo a la siguiente formula:

Porcentaje de protección: _____

Una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis fue utilizada para comparar los resultados de la carga parasitaria, reducción en el número de huevos por gramo de heces y viabilidad de huevos de *F. hepatica*. La diferencia estadística del tamaño de los parásitos recuperados fueron analizados con la prueba de ANOVA de un factor. Los coeficientes de correlación fueron calculados con la prueba no paramétrica de Spearman. Para las diferencias en la frecuencia de la infección se aplicó la prueba de chi cuadrado y la prueba exacta de Fischer (cuando fue necesaria). Para todas las pruebas se utilizó el programa SPSS versión 15 para Windows. Una $P \leq 0.05$ fue considerada como significativa.

RESULTADOS

Purificación de catepsinas de *F.hepatica*

Las catepsinas de *Fasciola hepatica* fueron purificadas mediante combinación de dos cromatografías: intercambio iónico (Figura 1) y filtración en gel (figura 3). Las fracciones obtenidas de la última purificación se analizaron por SDS-PAGE (bajo condiciones reductoras), las catepsinas se obtuvieron como un duplete de 27-29 kDa (Figuras 2 y 4), con una pureza del 39% para el medio de cultivo RPMI-1640. Los productos de E/S en RPMI-1640 tuvieron un rendimiento del 16%. La inmunotransferencia muestra que los anticuerpos reaccionan con la banda que contiene las catepsinas, que son componentes de los productos de E/S de *Fasciola hepatica* presente en el suero del conejo inmunizado con las catepsinas purificadas por ambas cromatografías (Figura 5).

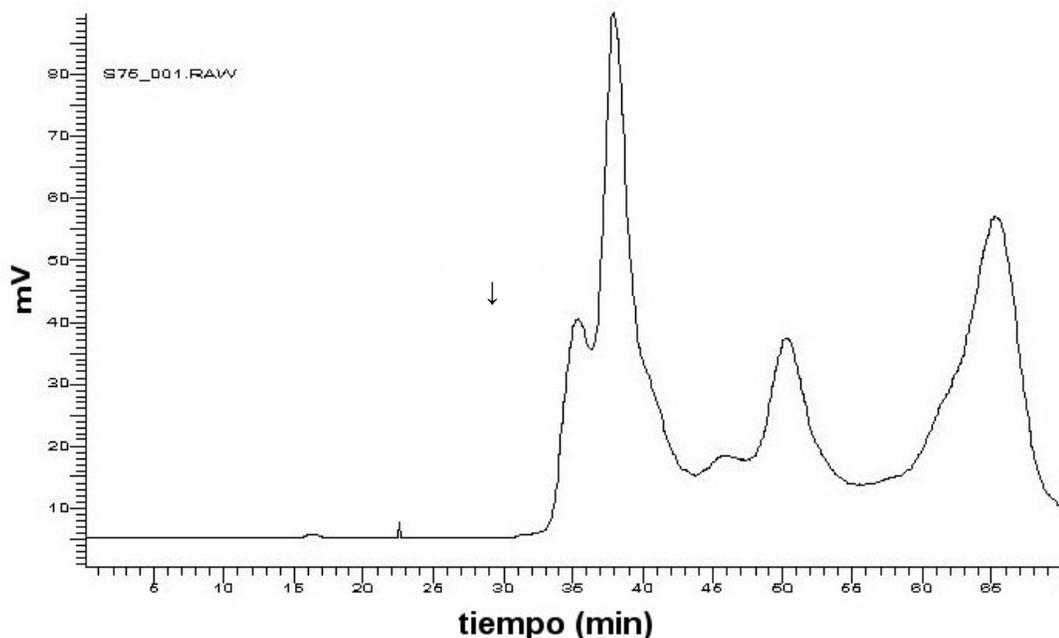


Figura 1. Cromatograma de intercambio iónico para los productos de E/S de *Fasciola hepatica*.

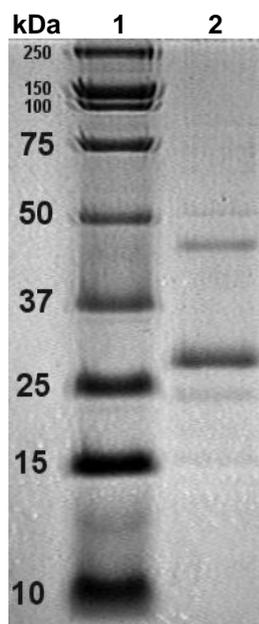


Figura 2. Análisis de los productos de E/S obtenidos en la cromatografía de intercambio iónico (Q sefarosa) por electroforesis al 12% bajo condiciones reductoras, por el método de Schagger y von Jagow. Marcador de peso molecular (carril 1).

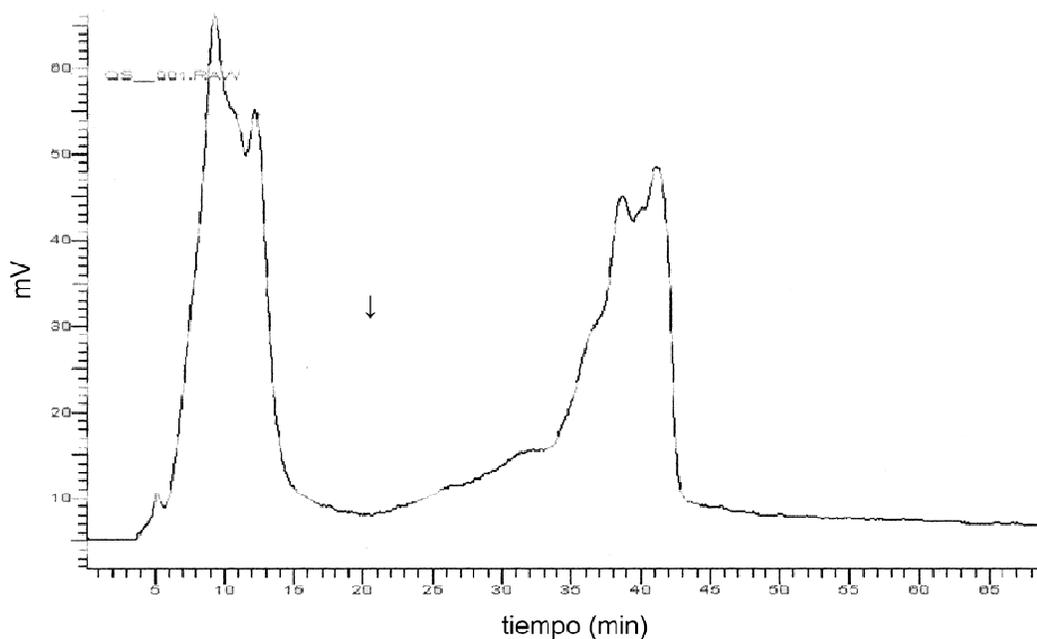


Figura 3. Cromatograma de filtración en gel para las fracciones obtenidas del intercambio iónico.

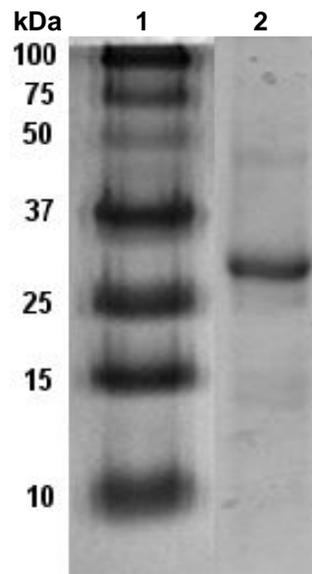


Figura 4. Análisis de la fracción obtenida en la cromatografía de filtración en gel Superdex 75 por electroforesis al 12% bajo condiciones reductoras, por el método de Schagger y von Jagow. Marcador de peso molecular (carril 1), catepsinas obtenidas de los productos de E/S incubadas en RPMI-1640 (carril 2).

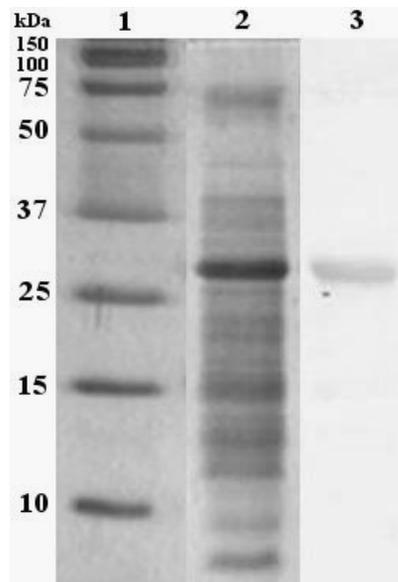


Figura 5. Análisis por inmunotransferencia (western blot), respuesta de la IgG contra la catepsina purificada de los productos de E/S de *Fasciola hepatica*. Marcador de peso molecular (carril 1), productos de E/S (carril 2) transferidos a una membrana de PVDF y reconocidos por IgG anti-catepsina (carril 3).

En el ensayo enzimático se utilizaron las proteasas purificadas de *Fasciola hepatica* con el medio de cultivo RPMI-1640 y las cromatografías antes mencionadas. La catepsina L1 tiene alta afinidad por el sustrato fluorogénico sintético Z-Phe-Arg-NHMec, y baja afinidad por el sustrato Tos-Gly-Pro-Arg-NHMec, mientras que para la catepsina L2 tiene una gran afinidad.

Secuenciación de catepsinas

Para identificar estas enzimas, fueron sujetas a secuenciación, obteniéndose un total de 65 aminoácidos (NDDLWHQWKAVPDKIDWRQFGLETESYPYTAV EGQCRNSWGLSWGGERGNMCGIASLASLPMVAR) de los 326 aminoácidos que componen la molécula (Cuadro 1). Las secuencias de las catepsinas L1 y L2 fueron alineadas con algunas secuencias de catepsinas relacionadas usando el programa BLASTP 2.2.14; teniendo un alineamiento significativo con estas enzimas de *Fasciola hepatica* L1 del 100% y L2 del 83% (Cuadro 2).

Cuadro 1. Péptidos identificados por espectrometría de masas en la región de 27-29 kDa del gel de SDA-PAGE al 16% obtenidos por diferentes cromatografías.

| Localización | Masa observada | Masa exacta experimental | Masa exacta calculada | Secuencia |
|--------------|----------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| 1-9 | 1241.5190 | 1240.5117 | 1240.5625 | NDDLWHQWK |
| 91-99 | 1099.5460 | 1098.5387 | 1098.5822 | AVPDKIDWR |
| 170-189 | 2322.0470 | 2321.0397 | 2321.0270 | QFGLETESYPYTAVEGQCR |
| 273-282 | 1191.5310 | 1190.5237 | 1190.5468 | NSWGLSWGGER |
| 292-308 | 1747.8960 | 1746.8887 | 1746.8578 | GNMCGIASLASLPMVAR |

Cuadro 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos identificados por espectrometría de masas con diferentes de proteasas relacionadas utilizando el BLASTP 2.2.14.

| NCBI* | Nombre de la proteína | % de alineamiento |
|--------------|--|--------------------------|
| gi 535600 | Catepsina [<i>Fasciola hepatica</i>] | 89.2% |
| gi 497700 | Catepsina [<i>Fasciola hepatica</i>] | 96.9% |
| gi 10798511 | Catepsina L1 [<i>Fasciola hepatica</i>] | 96.9% |
| gi 50403821 | Catepsina L1 [<i>Fasciola hepatica</i>] | 100% |
| gi 41152538 | Catepsina L [<i>Fasciola gigantica</i>] | 100% |
| gi 1809286 | Catepsina L1 [<i>Fasciola gigantica</i>] | 98.4% |
| gi 20136379 | Catepsina L [<i>Fasciola hepatica</i>] | 93.8% |
| gi 1809288 | Catepsina L2 [<i>Fasciola hepatica</i>] | 83.0% |
| gi 8547325 | Catepsina L [<i>Fasciola gigantica</i>] | 89.2% |
| gi 13774082 | Catepsina L [<i>Fasciola gigantica</i>] | 98.4% |
| gi 31558997 | Catepsina L [<i>Fasciola hepatica</i>] | 93.8% |
| gi 2662308 | Catepsina L [<i>Fasciola hepatica</i>] | 98.4% |
| gi 74765984 | Catepsina L [<i>Fasciola gigantica</i>] | 96.9% |

* National Centre for Biotechnology Information.

Análisis por inmunotransferencia (western blot) de los anticuerpos a productos de E/S

La respuesta de los anticuerpos anti-catepsina purificados previa inmunización del conejo fueron analizados por western blot, utilizando los productos de E/S de *Fasciola hepatica* como antígeno (Figura 6).

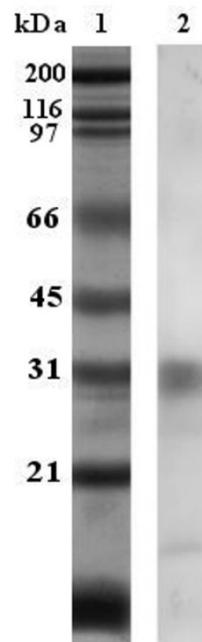


Figura 6. Análisis por inmunotransferencia (western blot), respuesta de la IgG anti-catepsina contra los productos de E/S de *Fasciola hepatica*. Marcador de peso molecular (carril 1), productos de E/S (carril 2) y IgG de conejo anti-catepsina 5 μ g (carril 3).

Respuesta de los anticuerpos a productos de E/S por ELISA indirecto

Los antígenos de *F. hepatica* (productos de E/S) fueron detectados con los anticuerpos de conejo anti-catepsina y anti-productos de E/S, mostrando mayores valores de absorbancia los anticuerpos purificados del conejo inmunizado con productos de E/S (Figura 7). Cuando se utilizan sueros de ovinos infectados con *F. hepatica*, se detectan los productos de E/S con una absorbancia menor que los anticuerpos purificados (Figura 8).

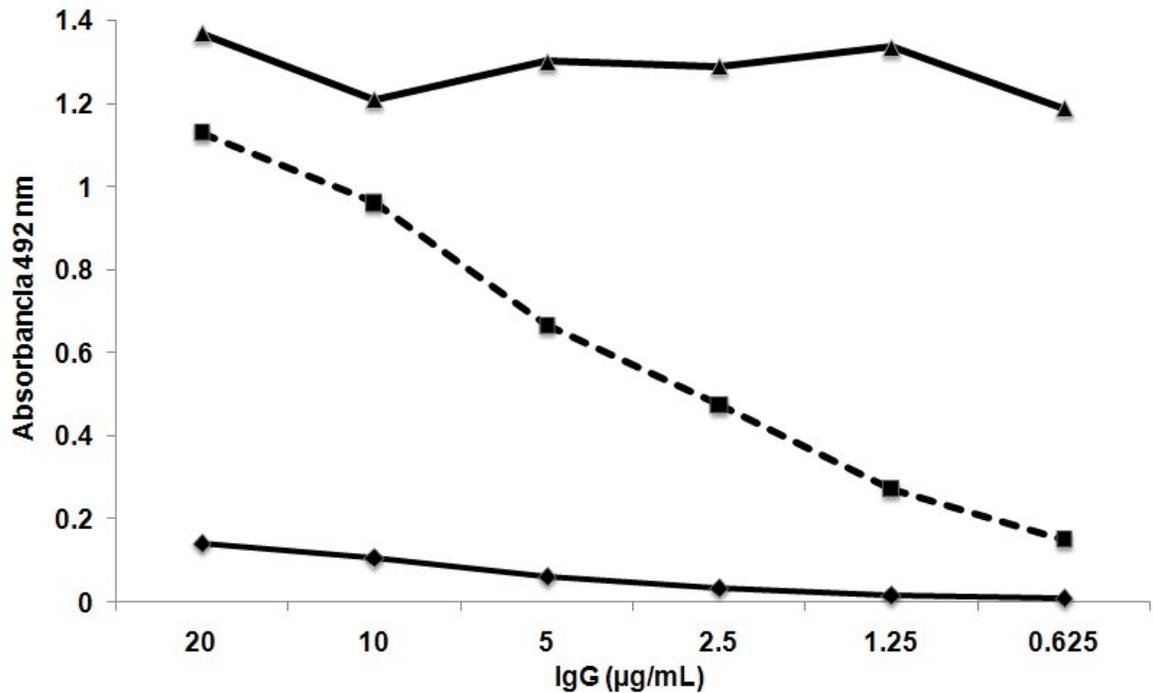


Figura 7. Valores de las IgG de conejo inmunizado con anti-catepsinas (—■—) y anti-productos de ES (—▲—) obtenidos por ELISA indirecto. Se utilizó como control suero de conejo negativo a *Fasciola hepatica* (—◆—). Los productos de ES fueron utilizados como antígenos.

Enriquecimiento de fagos

Para identificar péptidos que pueden mimetizar las características estructurales de catepsina L, se utilizó un anticuerpo policlonal anti-catepsina L1/L2 para seleccionar fagos filamentosos de una biblioteca de péptidos aleatorios. Después de la tercera ronda de selección, se observó un enriquecimiento significativo de fagos con afinidad por la IgG purificada anti-catepsina. Los fagos eluidos se incrementan de 2.0×10^7 a 4×10^5 , un enriquecimiento de 200 veces para la selección de fagos con $7.5 \mu\text{g}$ de anticuerpo anti-catepsina, y casi de 300 veces para el de $3.75 \mu\text{g}$ (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de enriquecimiento de fagos por selección “biopanning”.

| Ronda de selección “biopanning” | Fagos adicionados (ufc) | Fagos eluidos (ufc) | Fagos recuperados (ufc) |
|------------------------------------|----------------------------|--|--|
| 1 | 1.5×10^{11} | 2.0×10^4 | 2.0×10^7 |
| 2 | 1.0×10^{11} | 4.6×10^5 | 4.6×10^6 |
| 3 | 1.0×10^{11} | $4.0 \times 10^{6\dagger}$ $5.2 \times 10^{6*}$ | $4.0 \times 10^{5\dagger}$ $5.2 \times 10^{5*}$ |

Fagos seleccionados con 3.75^* y $7.5^\dagger \mu\text{g}$ de anticuerpo anti-catepsina. ufc: unidades formadoras de colonias.

Unión específica de las clonas individuales de fagos con las IgG de conejo anti-catepsina

Treinta y seis clonas fueron seleccionadas para ser probadas por ELISA para unión específica a IgG anti-catepsina. Se utilizaron dos ELISA diferentes (indirecto y sándwich indirecto) para comparar la afinidad de las clonas con el anticuerpo anti-catepsina (Figura 9 y 10). Las clonas de los fagos muestran una alta afinidad de unión a aquellas seleccionadas con 3.75 μ g de anticuerpo.

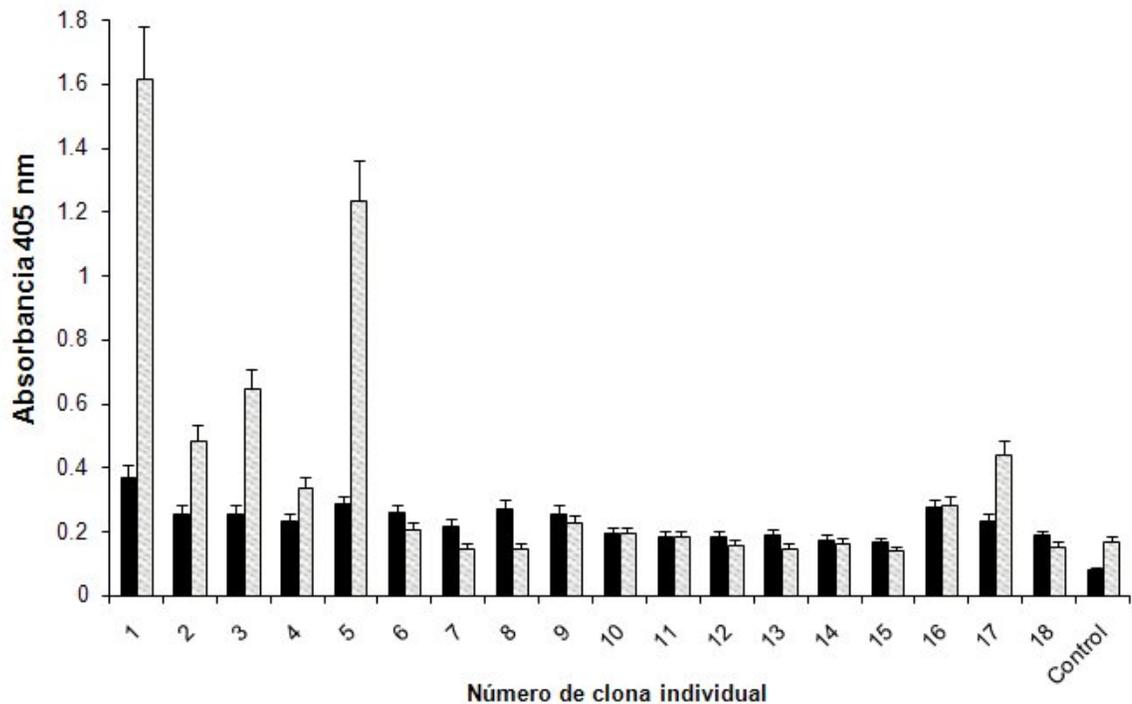


Figura 9. Comparación entre ELISA indirecto (■) y sándwich-indirecto (▨) con clonas seleccionadas con 3.75 μ g de anticuerpo de conejo anti-catepsina. Revelado con ABTS. Los datos representan la media de tres determinaciones y la desviación estándar.

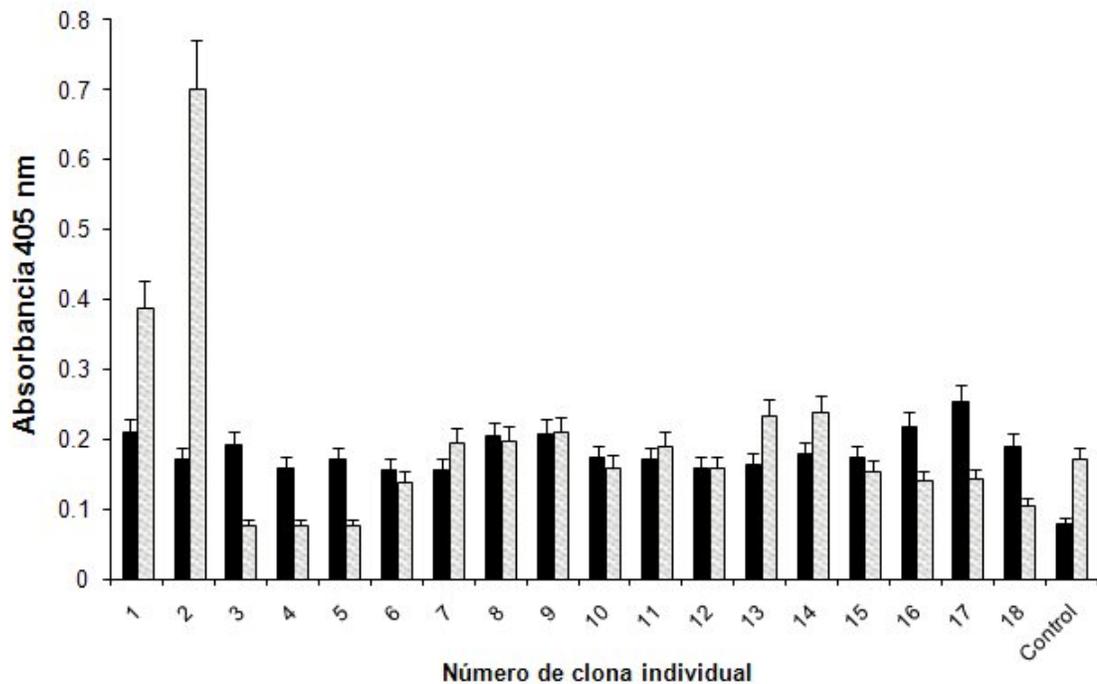


Figura 10. Comparación entre ELISA indirecto (■) y sándwich-indirecto (▨) con clonas seleccionadas con 7.5 µg de anticuerpo de conejo anti-catepsina. Los datos representan la media de tres determinaciones y la desviación estándar.

Secuenciación de DNA y análisis de las secuencias

Diez secuencias fueron obtenidas de las treinta y seis clonas seleccionadas inicialmente después del tercera ronda de selección con el anticuerpo de conejo anti-catepsina (Cuadro 4). Siete clonas por su reactividad en el ELISA de sándwich-indirecto fueron seleccionadas y alineadas con las secuencias de catepsina L1/L2 para ser evaluadas como candidatos de vacunación, éstas fueron localizadas a la mitad y/o extremo carboxilo de la secuencia de catepsina L (Figura 11A). Los aminoácidos de la secuencia consenso de los mimotopos de las clonas

seleccionadas de la biblioteca de péptidos aleatorios expresados en fagos son presentados en la figura 11B.

Cuadro 4. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de clonas de fagos

| Núm. Clona | Abs | Conc. selecc. | Secuencia de a.a | Secuencia de nucleótidos |
|-------------------|------------|----------------------|-------------------------|--|
| 1 | 1.62 | 3.75 | YVYRWVEAECVA | tacgtttatcgatgggtagaagccgagtgcgtagct |
| 2 | 0.48 | 3.75 | REPIYHKLHRLT | cgtgagcctatttatcataagcttcacggctaact |
| 3 | 0.64 | 3.75 | NTLSGQYFWRMP | aatacgctttctggtcagtattttggcggatgcct |
| 4 | 0.33 | 3.75 | MRRSSRTLLWIS | atgcgccgcagcagtagaactctccttggatatcg |
| 5 | 1.23 | 3.75 | WHVPRTWWVLPP | tggcatgtcctcgtacgtgggtgggtgctgcctccg |
| 9 | 0.23 | 7.5 | NMSPSYWRDYSP | aatatgtctccttcgtattggaggattattcgccg |
| 16 | 0.28 | 3.75 | NTLSGQYLWRMP | aatacgctttctggtcagtatttggcggatgcct |
| 17 | 0.44 | 3.75 | YIDHIVLTIYLE | tacatagatcatatagtagtactactatatacctttaa |
| 19 | 0.38 | 7.5 | YVYEGRSRVRRP | tatgtgtatgaggtagaagccgagtgcgtaggcct |
| 20 | 0.70 | 7.5 | FSPAYLRDAALK | tttagtctcgtatctgcgggatgcggcgcttaag |

Abs: Absorbancia del ELISA de sándwich-indirecto.

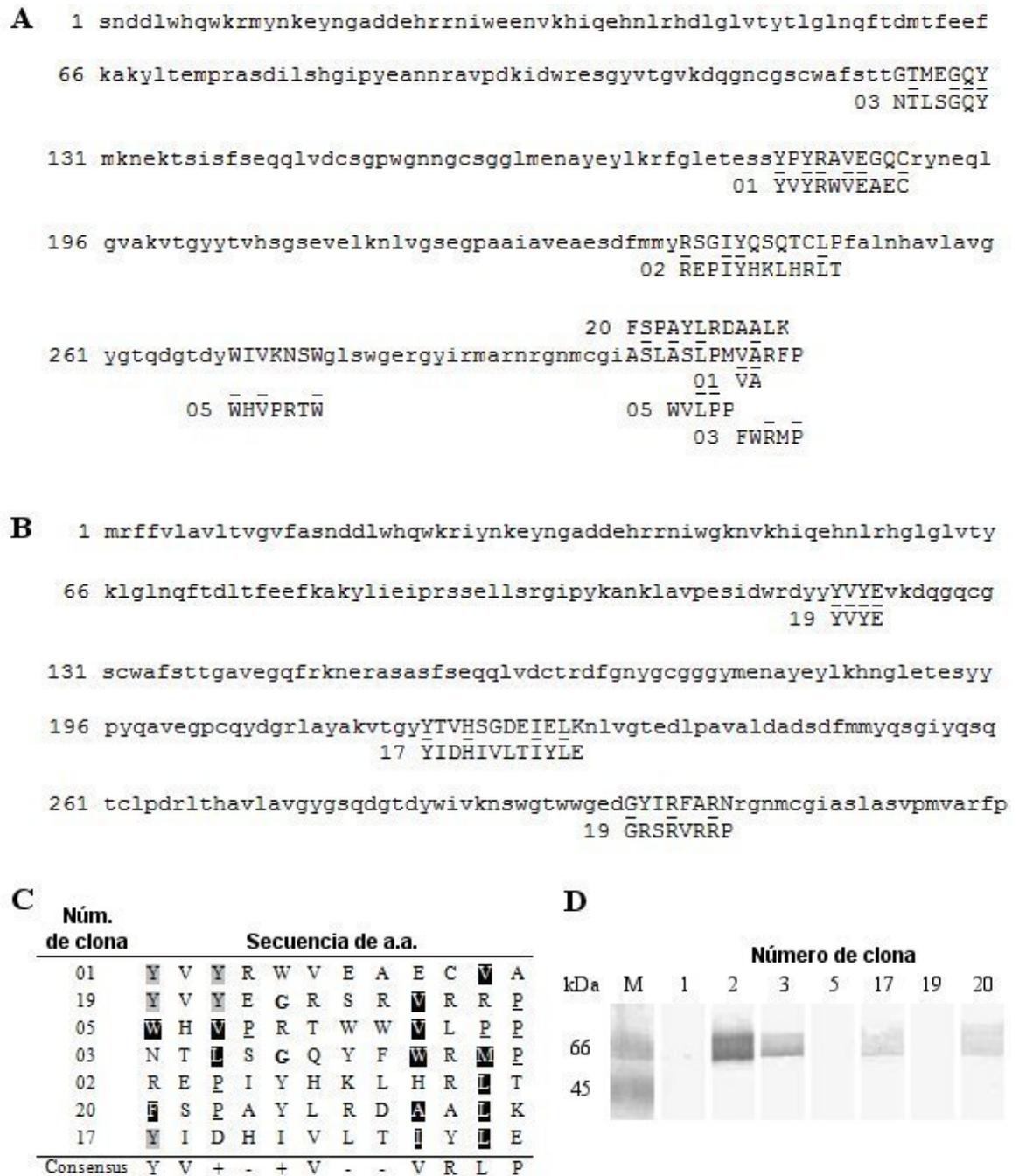


Figura 11. Análisis de aminoácidos de clonas seleccionadas con IgG de conejo anti-catepsina. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los mimotopos de clonas seleccionadas con la secuencia de catepsina L1 (A) y L2 (B) de *Fasciola hepatica* (Números de acceso al GenBank: L1, U62288; L2, U62289). (C) Secuencias de aminoácidos de clonas de fagos y secuencia consenso. (D) Análisis de la interacción de las clonas seleccionadas por western blot. M: Marcador de peso molecular.

Análisis por inmunotransferencia (western blot) de los anticuerpos anti-catepsina a las clonas de fagos seleccionadas

La IgG anti-catepsina fue probada para su reconocimiento individual por las clonas de fagos filamentosos seleccionadas positivamente por western blot (Figura 11D). Los resultados muestran el reconocimiento de la banda correspondiente a la pIII que usualmente corre con un peso molecular de entre 60 y 65 kDa, sólo para las clonas 2, 3, 17, 20 y 6. No se observaron uniones a la pIII por parte de las clonas 1, 5 y 19.

Respuesta de los anticuerpos de ovinos vacunados con clonas de fagos filamentosos

Los valores de las absorbancias de los ELISA muestran que los borregos inmunizados con las clonas 1 y 10 desarrollan anticuerpos circulantes a los fagos filamentosos, alcanzando un pico máximo dos semanas después de la primera inmunización (Figura 12). Esta respuesta desciende y permanece relativamente constante hasta el fin del experimento (semana 22). El grupo de borregos que se inmunizaron con un conjunto de siete clonas diferentes muestran 2 picos de anticuerpos que corresponden a las 2 inmunizaciones que se les administraron.

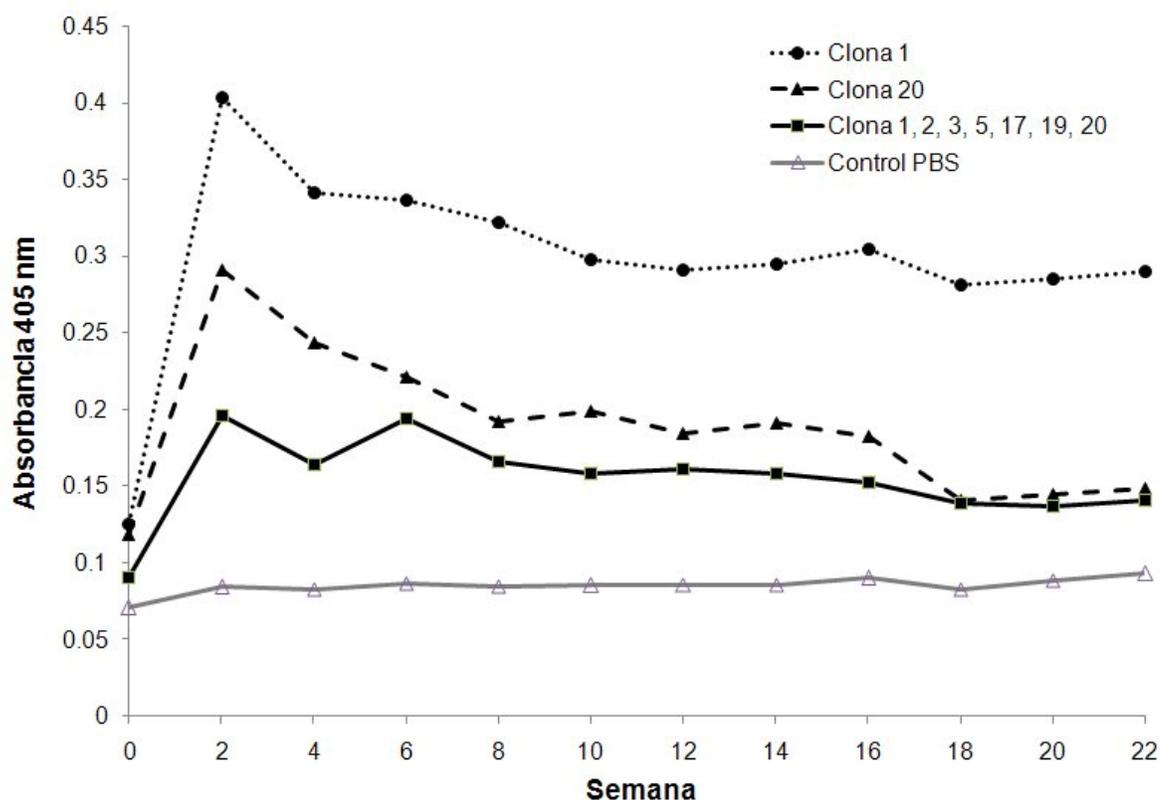


Figura 12. Análisis por ELISA de la IgG inducida por clones de fagos filamentosos seleccionados. Se utilizó como antígeno las clones con que fueron inmunizados los ovinos. Cada punto representa la media de 5 animales.

La figura 13 muestra la dinámica de la respuesta de los anticuerpos contra los fagos filamentosos al utilizar en el ELISA como antígeno los productos de E/S de *F.heaptica*. Los anticuerpos aparecen en el suero de borregos inmunizados dentro de las 4 semanas posterior a la primera inmunización y muestran un marcado incremento posterior a la infección con metacercarias en la semana 6. Los niveles de respuesta de los anticuerpos inducidos por la clona 20 fueron más altos que los producidos por la clona 1 y el grupo conformado por siete clones diferentes (Figura 13).

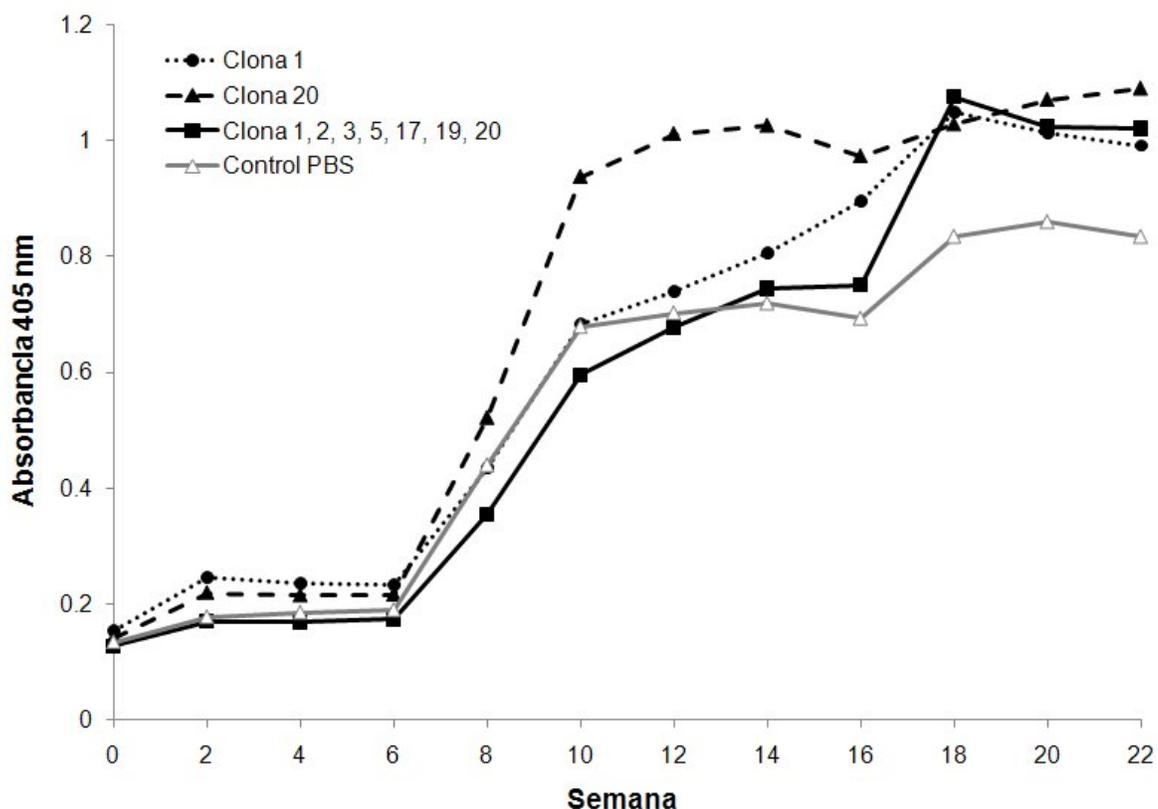


Figura 13. Análisis por ELISA de la IgG inducida por clones de fagos filamentosos seleccionados. Se utilizó como antígeno los productos de E/S de *F. hepatica*. Cada punto representa la media de 5 animales.

Carga parasitaria de animales inmunizados con clones de fagos filamentosos

Veintidós semanas después del inicio del experimento, los animales fueron sacrificados humanitariamente y los parásitos de la vesícula biliar y conductos biliares fueron contados (Cuadro 5).

El porcentaje de fasciolas recuperadas del grupo control fue en promedio de 30.66% del total de 300 metacercarias administradas en la semana 6 del experimento.

La inmunización de borregos usando clonas individuales y un grupo de éstas sin adyuvante resulta en porcentajes de reducción de la carga parasitaria de 0 a 47.61% comparado con el grupo control ($p = 0.916$ a $p < 0.05$).

Los borregos inmunizados con la clona 1 tienen un porcentaje de reducción en el número de parásitos recuperados del 47.61%, y para la clona 20 el porcentaje de protección fue de 33.91%, comparados con el grupo control. Sin embargo, el grupo de animales inmunizados con una combinación de siete clonas no indujeron protección.

Cuadro 5. Reducción de la carga parasitaria de borregos vacunados con clonas de fagos filamentosos

| Grupos | Num. parásitos recuperados | | Porcentaje de reducción (%) | P |
|------------------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| | Media \pm DE | Parásitos/animal | | |
| Clona 1 | 48.20 \pm 19.40 | 30,48, 60, 74, 29 | 47.61 | 0.047 ^a |
| Clona 20 | 60.80 \pm 25.88 | 55,26, 73, 54, 96 | 33.91 | 0.117 |
| Clona 1, 2, 3, 5, 17, 19, 20 | 95.20 \pm 55.09 | 110, 95, 27, 68, 176 | - | 0.916 |
| Control PBS | 92.00 \pm 29.96 | 90, 126, 118, 57, 69 | - | |

^a $P < 0.05$ vs Grupo control PBS, DE, desviación estándar.

Se colectaron muestras de heces de ovinos inmunizados para su análisis coproparasitológico semanalmente, a partir de la semana 0 y hasta el sacrificio (semana 22). Los primeros huevos aparecen en las heces de los ovinos a partir de la semana 10 posterior a la infección con metacercarias del parásito (Figura 14)

El análisis de la producción de huevos de *F. hepatica* por gramo de heces muestra una reducción significativa del 45.55% ($P < 0.05$) para el grupo vacunado con la clona 20, comparado con el grupo control. Para el grupo de ovinos inmunizados con la clona 1, la reducción promedio fue del 25.85%, y para el conjunto de clonas 28.78% (Cuadro 6).

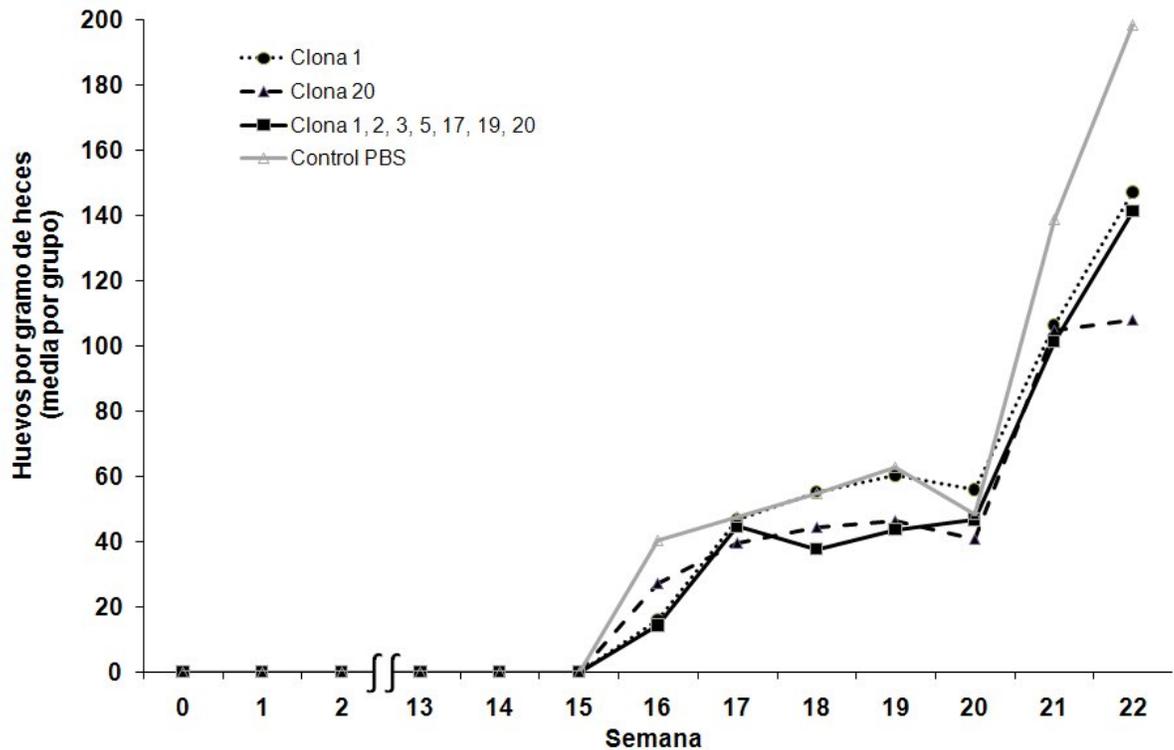


Figura 14. Media geométrica del número de huevos en heces por grupo a través del período de estudio.

Cuadro 6. Reducción del número de huevos por gramo de heces de borregos inmunizados con clonas de fagos filamentosos

| Grupos | Hpg (Media \pm DE) | % de reducción de hpg | <i>P</i> |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|
| Clona 1 | 147.00 \pm 38.82 | 25.85 | 0.174 |
| Clona 20 | 108.00 \pm 30.75 | 45.55 | 0.028 ^a |
| Clona 1, 2, 3, 5, 17, 19, 20 | 141.20 \pm 49.96 | 28.78 | 0.093 |
| Control PBS | 198.20 \pm 57.19 | - | - |

^a*P* < 0.05 vs Grupo control PBS. Hpg: huevos por gramo de heces. DE, desviación estándar.

Los parásitos recuperados de animales inmunizados con las clonas de fagos filamentosos muestran diferencias significativas en el tamaño de los parásitos en comparación con el grupo control (Cuadro 7).

Cuadro 7. Tamaño de los parásitos recuperados de borregos inmunizados con clonas de fagos filamentosos

| Grupos | No. De parásitos recuperados (media ± DE) | Tamaño (mm) media ± DE |
|-------------------------------|---|---------------------------|
| Clona 1 | 48.20 ± 19.40 | 22.39 ± 3.20 ^a |
| Clona 20 | 60.80 ± 25.88 | 24.47 ± 3.46 |
| Clonas 1, 2, 3, 5, 17, 19, 20 | 95.20 ± 55.09 | 25.39 ± 3.55 |
| Control PBS | 92.00 ± 29.96 | 26.35 ± 3.33 |

^a $P < 0.05$ vs Grupo control PBS. DE, desviación estándar.

Viabilidad de huevos recuperados de animales vacunados con clonas de fagos filamentosos

Se examinó si los animales inmunizados con las clonas tienen un efecto en la viabilidad de huevos producidos por *F. hepatica*. Los datos de la viabilidad de los huevos recuperados de cada animal son presentados en la Cuadro 8. Los huevos con una viabilidad de 96 a 98% fueron recuperados de la vesícula biliar de los animales del grupo control. El porcentaje de reducción de la viabilidad de los huevos recuperados de animales inmunizados con la clona 1, clona 20 y un conjunto de siete clonas fue de 44.36, 19.27 y 15.76%, mostrando diferencias significativas en comparación con el grupo control (Cuadro 9).

Cuadro 8. Viabilidad de huevos de *F. hepatica* recuperados de la vesícula biliar de ovinos.

| Grupo | Número de animal | % de viabilidad de huevos | Media ± DE |
|------------------------------|------------------|---------------------------|----------------------------|
| Clona 1 | 1238 | 87.78 | 58.92 ± 39.63 ^a |
| | 1241 | 93.09 | |
| | 1244 | 81.48 | |
| | 1246 | 8.75 | |
| | 1247 | 23.47 | |
| Clona 20 | 1234 | 86.95 | 73.76 ± 33.17 ^a |
| | 1235 | 85.67 | |
| | 1243 | 84.31 | |
| | 1248 | 15.06 | |
| | 1249 | 96.79 | |
| Clona 1, 2, 3, 5, 17, 19, 20 | 1230 | 94.11 | 82.11 ± 12.19 ^a |
| | 1236 | 83.88 | |
| | 1237 | 79.88 | |
| | 1240 | 90.05 | |
| | 1242 | 62.61 | |
| Control PBS | 1231 | 98.87 | 97.59 ± 1.14 |
| | 1232 | 97.41 | |
| | 1233 | 96.24 | |
| | 1239 | 98.65 | |
| | 1245 | 96.78 | |

^a*P* < 0.05 vs Grupo control PBS. DE, desviación estándar.

Cuadro 9. Porcentaje de reducción de la viabilidad de huevos de *F. hepatica* recuperados de vesículas biliares de borregos inmunizados

| Grupos | % de reducción de la viabilidad de huevos | <i>P</i> |
|------------------------------|---|--------------------|
| Clona 1 | 41.08 | 0.009 ^a |
| Clona 20 | 26.24 | 0.028 ^a |
| Clona 1, 2, 3, 5, 17, 19, 20 | 17.89 | 0.009 ^a |
| Control PBS | - | - |

^a*P* < 0.05 vs Grupo control PBS.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La infección por *F. hepatica* en humanos se ha estimado en 2.4 millones de personas alrededor del mundo, siendo un problema emergente (Mas-Coma *et al.*, 1999; Mas-Coma, 2005). La fasciolosis generalmente está asociada con climas templados; aunque existe una alta prevalencia en Europa, también se ha encontrado en los estados del sur de EUA, México, Norte de África, Nueva Zelanda y pequeñas regiones de Australia (Mas-Coma, 2005). La importancia en términos de pérdidas económicas a nivel mundial se ha estimado en más de 2,000 millones de dólares anualmente, así como más de 600 millones de animales se encuentran infectados (Spithill *et al.*, 1999). El parásito infecta principalmente bovinos y ovinos, aunque otros animales domésticos como son cabras, caballos y cerdos, también pueden estar infectados. El triclabendazol es el único fármaco efectivo contra los estadios juveniles de la enfermedad, sin embargo, se ha reportado resistencia de ciertas cepas de *F. hepatica* (Overend y Bowen, 1995; Mitchell *et al.*, 1998; Moll *et al.*, 2000; Gaasenbeek *et al.*, 2001). Es por ello que otras medidas de control a futuro dependen del desarrollo de una vacuna efectiva contra la enfermedad. Se ha alcanzado éxito notable para algunos parásitos cestodos, cuando se han desarrollado y usado proteínas recombinantes (Hein y Harrison, 2005). Existen numerosos estudios utilizando moléculas nativas purificadas o recombinantes como candidatos de vacunación contra *F. hepatica* (Hillyer, 2005; McManus y Dalton, 2006). Entre estas moléculas se encuentran las catepsinas L, las cuales son secretada en abundantes cantidades por el trematodo para facilitar la sobrevivencia en el huésped, por lo cual es deseable aislar los motivos de inmunización con propósitos de vacunación. Mientras que las catepsinas L nativas pueden ser purificadas en cantidades suficientes para pruebas experimentales, una producción a gran escala requiere un sistema factible (Dalton *et al.*, 2003).

En este estudio, las proteasas purificadas por diferentes cromatografías a partir de los productos de E/S de *F. hepatica*, fueron analizadas por SDS-PAGE,

caracterizadas por su afinidad por alguno de los sustratos fluorogénicos sintéticos y secuenciadas por espectrometría de masas. Aunque se utilizaron las dos cromatografías descritas por Smith *et al.*, (1993b), éstas fueron empleadas en diferente orden, y el rendimiento en la purificación de catepsina L fue mayor al reportado por ese estudio (12.1 vs 16%). Las bandas observadas en el análisis por SDS-PAGE corresponden a las presentadas en trabajos previos: la catepsina L se observa como un duplete de 27-29 kDa, siendo confirmadas como catepsina L1/L2 por su actividad enzimática como es descrito por Dowd *et al.*, 1994. Las secuencias de los aminoácidos obtenidos por espectrometría de masas, de las enzimas purificadas que fueron alineadas con las reportadas como catepsina L, muestran ser idénticas a catepsinas L1/L2.

Las bibliotecas de fagos filamentosos han sido empleadas para seleccionar péptidos que mimetizan mimotopos de antígenos y que pueden ser utilizados como candidatos en el desarrollo de vacunas en el área de parasitología (Demangel *et al.*, 1996; Narum *et al.*, 2006). Las bibliotecas de péptidos aleatorios también han sido seleccionadas utilizando anticuerpos policlonales (Tang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006). El empleo de la tecnología de despliegue de fagos filamentosos para seleccionar mimotopos de catepsina L1/L2 de *F. hepatica* no se ha reportado. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-catepsina L1/L2 para seleccionar por afinidad bacteriófagos de una biblioteca de péptidos aleatorios, empleando para la tercera ronda de selección dos cantidades diferentes de IgG, observándose una mayor afinidad al utilizar 3.75 µg de IgG (analizado por ELISA), así como un mayor enriquecimiento, debido a la formación de inmunocomplejos. Dos tipos de ELISA fueron utilizados para seleccionar clonas de fagos, comparando la absorbancia de cada prueba y eligiendo la técnica de ELISA sándwich-indirecto que emplea un anticuerpo secundario anti-M13.

Las siete clonas utilizadas en este estudio inducen una respuesta baja de IgG pero de magnitud significativa contra los productos de E/S, especialmente en el caso de las clonas 1 y 20. Además, el desafío con metacercarias indujo un aumento en la respuesta en esos dos grupos, lo cual sugiere que los niveles de

anticuerpos fueron amplificados en respuesta a linfocitos B de memoria y que estos epitopos existen en la molécula nativa. Por otro lado, los anticuerpos producidos en respuesta a las clonas, inducen una respuesta de IgG característica posterior a la primera inmunización, alcanzando los títulos un pico en la semana 2 y disminuyendo hasta la semana 18, permaneciendo constantes hasta el final del experimento. Sin embargo, no se observó un segundo pico característico, posterior a una segunda inmunización o refuerzo.

La inmunización de borregos con las clonas 1 y 20 indujeron niveles de protección de 47.61 y 33.91% respectivamente, cuando éstas fueron administradas separadamente. Además, se observó una reducción en el número de huevos en heces de 25.85 a 45.55% en animales vacunados con los bacteriofagos. La inmunización con cada mimotopo de catepsina L indujo un efecto único en la carga parasitaria y el número de huevos producidos. En el primer reporte de vacunación en borregos con catepsina L nativa, el número de huevos en heces se redujo en 69.7%, sin tener un efecto sobre la carga parasitaria (Wijffels *et al.*, 1994). La inmunización de ovinos con catepsina L1 ó L2 nativa contra *F. hepatica* indujo niveles de protección de 33 y 34% en la carga parasitaria, así como reducciones en el número de huevos producidos de 71 y 81% respectivamente; mientras que la administración en conjunto de catepsina L1 y L2 indujo una reducción del 60% de la carga parasitaria (Piacenza *et al.* 1999).

La expresión de catepsina L1 recombinante en *Pichia pastoris* para pruebas de vacunación indujo protección de 35 a 45% en borregos con un efecto en la fecundidad del parásito de 50% (McManus y Dalton, 2006). El nivel de protección inducido con los mimotopos de fagos filamentosos estuvo dentro del rango reportado con el uso de otros inmunógenos más grandes y costosos.

Los parásitos de *Fasciola hepatica* fueron más pequeños que los obtenidos del grupo control, particularmente en el caso de aquellos animales inmunizados con la clona 1. Dalton *et al.*, (1996) también reportaron que los parásitos recuperados de bovinos vacunados con catepsina L nativa y la hemoglobina tuvieron una reducción significativa en el tamaño, lo cual indica que la vacunación

afecta el desarrollo de los parásitos. En este ensayo, la inmunización con las clonas de fagos seleccionados también tuvieron un efecto en la viabilidad de los huevos recuperados (rango de 58.92 a 82.11%). Un efecto anti-embrión mediado por la respuesta inmune, usando catepsina L1 nativa para inmunizar bovinos ha mostrado reducciones en la viabilidad de los huevos recuperados de la vesícula biliar del 50.75% (Dalton *et al.*, 1996). Por inmunohistoquímica se ha demostrado la presencia de catepsina L en los oocitos, así como en las glándulas de Mehlis y glándulas vitelinas de *F. hepatica* (Wijffels *et al.*, 1994).

Harmsen *et al.*, (2004) inmunizaron ratas con tres péptidos sintéticos de catepsina L localizados en el extremo amino terminal: catepsina L1 (residuos 15-33), L3 (residuos 16-34) que comprende la región del propéptido, y catepsina L1 que contiene tres residuos del propéptido, así como los residuos 104-122 de la proteasa madura; reportando una reducción en la carga parasitaria de 40.4 a 70.8%. El alineamiento de las clonas de fagos filamentosos con las secuencias de aminoácidos de catepsina L1/L2 mostró que están localizadas a la mitad o en el extremo carboxilo de la secuencia de catepsina L. La clona 1 indujo un nivel de protección de 47.61% y el resultado del alineamiento con la catepsina L1 madura (aminoácidos 180-189 y 307-308), sugiere ser un epitopo conformacional, por lo que los anticuerpos contra este péptido pueden estar jugando directamente un papel protector. La unión de la IgG de conejo anti-catepsina L1 a la proteasa *in vitro* resulta en la inhibición de la capacidad para romper moléculas de IgG que median la unión de los eosinófilos al parásito (Smith *et al.*, 1994). La clona 20 probablemente despliega un epitopo lineal (demostrado por western blot) e induce un menor nivel de protección que la clona 1; pero probablemente a través de diferentes vías, interesantemente induce una significativa reducción en el número y viabilidad de los huevos producidos.

Similarmente a la clona 1, el alineamiento de aminoácidos de las clonas 5 y 19 con la catepsina L madura muestra epitopos conformacionales, como es sugerido por el western blot; estas clonas no fueron utilizadas en ensayos individuales, sino como un grupo con otras clonas. Aunque las siete clonas que se

ensayaron en un grupo de animales, no mostraron efecto en la carga parasitaria, huevos por gramo de heces, o tamaño de los parásitos, se observó una pequeña pero significativa reducción en la viabilidad de los huevos, por lo que estas clonas son buenos candidatos para estudios individuales de inmunoprolifaxis. La actividad de catepsina L posiblemente fue bloqueada debido a la inducción de anticuerpos afectando el desarrollo de los miracidios y la producción de huevos.

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

LITERATURA CITADA

1. Andrews SJ. The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 1999:1-29.
2. Armour J, Dargie JD. Immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. Successful transfer of immunity by lymphoid cells and by serum. *Exp Parasitol* 1974;35:381-388.
3. Armstrong J, Perham RN, Walker JE. Domain structure of the bacteriophage fd adsorption protein. *FEBS Lett* 1981;135:167-172.
4. Azzazy HME, Highsmith WE. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 2002;35:425-445.
5. Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. Phage display: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 2001.
6. Behm CA, Sangster NC. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: Fasciolosis. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 1999:185-224.
7. Berasain P, Goni F, McGonigle S, Dowd A, Dalton JP, Frangione B, Carmona C. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J Parasitol* 1997;83:1-5.
8. Black NM, Froyd G. The possible influence of liver fluke infestation on milk quality. *Vet Rec* 1972;90:71-72.
9. Boray JC. Experimental Fasciolosis in Australia. *Adv Parasitol* 1969;7:95-210.
10. Boyce WM, Courtney CH, Loggins PE. Resistance to experimental infection with *Fasciola hepatica* in exotic and domestic breeds of sheep. *Int J Parasitol* 1987;17:1233-1237.

11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
12. Brophy PM, Pritchard DI. Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. *Exp Parasitol.* 1994;79:89-96.
13. Cancela M, Carmona C, Rossi S, Frangione B, Goni F, Berasain P. Purification, characterization, and immunolocalization of paramyosin from the adult stage of *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res.* 2004;92:441-448.
14. Capron A, Riveau G, Grzych JM, Boulanger D, Capron M, Pierce R. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995;90:235-240.
15. Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica in vitro* prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;62:9-17.
16. Chauvin A, Bouvet G, Boulard C. Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Int J Parasitol.* 1995;25:1227-1241.
17. Click EM, Webster RE. The TolQRA Proteins are required for membrane insertion of the major capsid protein of the filamentous phage f1 during infection. *J Bacteriol* 1998;180:1723-1728.
18. Coop RL, Sykes AR. *Fasciola hepatica*: the effect of subclinical infection on food intake and efficiency of food utilization. *Parasitology* 1977;75:xxxvi-xxxvii.
19. Corba J, Armour J, Roberts RJ, Urquhart GM. Transfer of immunity to *Fasciola hepatica* infection by lymphoid cells. *Res Vet Sci.* 1971;12:292-295

20. Cornelissen JB, Gaasenbeek CP, Borgsteede FH, Holland WG, Harmsen MM, Boersma WJ. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *Int J Parasitol* 2001;31:728-737.
21. Creaney J, Wilson L, Dosen M, Sandeman RM, Spithill TW, Parsons JC. *Fasciola hepatica*: irradiation-induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol* 1996;83:202-215.
22. Crissman JW, Smith GP. Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxy-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology* 1984;132:445-455.
23. Crossland NO, Johnstone A, Beaumont G, Bennett MS. The effects of chronic fasciolosis on the productivity of lowland sheep. *Brit Vet J* 1977;133:518-524.
24. Dalton JP, Heffernan M. Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 1989;35:161-166.
25. Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP, Andrews SJ. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun* 1996;64:5066-5074.
26. Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moiré N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG, Donnelly SM. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol* 2003;33:1173-1181.
27. Dargie JD, Armour J, Rushton B, Murray M. Immune mechanisms and hepatic fibrosis in fascioliasis. In Soulsby E.J.L. (ed) *Proceeding of the Sixth International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*. Academic Press. New York 1974;119-122.

28. Demangel C, Lafaye P, Mazie JC. Reproducing the immune response against the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 with mimotopes selected from a phage-displayed peptide library. *Mol Immunol* 1996;33:909-916.
29. Deng LW, Malik P, Perham R. Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of *Escherichia coli*. *Virology* 1999;253:271-277.
30. Dowd AJ, Smith AM, McGonigle S, Dalton JP. Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur J Biochem* 1994;223:91-98.
31. Edwards CM, Al-Saigh MNR, Williams GL, chamberlain AG. Effect of liver fluke on wool production in Welsh mountain sheep. *Vet Rec* 1976;98:372.
32. Epstein HF, Miller DM 3rd, Ortiz I, Berliner GC. Myosin and paramyosin are organized about a newly identified core structure. *J Cell Biol* 1985;100:904-915.
33. Fairweather I, Boray JC. Mechanism of fasciolicide action and drug resistance in *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 1999:225–276.
34. Flanigan TP, King CH, Lett RR, Nanduri J, Mahmoud AA. Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *J Clin Invest* 1989;83:1010-1014.
35. Gaasenbeek CP, Moll L, Cornelissen JB, Vellema P, Borgsteede FH. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet Parasitol* 2001;95:37-43.
36. Genicot B, Mouligneau F, Lekeux P. Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. *J Vet Med* 1991;Series B 38:203-208.
37. Glaser-Wuttke G, Keppner J, Rasched I. Pore-forming properties of the adsorption protein of filamentous phage fd. *Biochim Biophys Acta* 1989;985:239-247.

38. Grams R, Vichasri-Grams S, Sobhon P, Upatham ES, Viyanant V. Molecular cloning and characterization of cathepsin L encoding genes *from Fasciola gigantica*. *Parasitol Int* 2001;50:105-114.
39. Gray CW, Brown RS, Marvn DA. Adsorption complex of filamentous fd virus. *J Mol Biol* 1981;146:621-627.
40. Greenwood J, Hunter GJ, Perham RN. Regulation of filamentous bacteriophage length by modification of electrostatic interactions between coat protein and DNA. *J Mol Biol* 1991;217:223-227.
41. Greenwood J, Willis AE, Perham RN. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *J Mol Biol* 1991;220:821-827.
42. Harmsen MM, Cornelissen JB, Buijs HE, Boersma WJ, Jeurissen SH, van Milligen FJ. Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *Int J Parasitol* 2004;34:675-682.
43. Hawkins CD, Morris RS. Depresión of productivity in sheep infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 1978;4:341-351
44. Hein WR, Harrison GB. Vaccines against veterinary helminths. *Vet Parasitol* 2005;132:217-222.
45. Heussler VT, Dobbelaere DA. Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1994;64:11-23.
46. Hillyer GV. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J Helminthol* 2005;79:241-247.
47. Hillyer GV, Haroun ET, Hernandez A, de Galanes MS. Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *Am J Trop Med Hyg* 1987;37:363-369.
48. Hillyer GV, Soler de Galanes M, Battisti G. *Fasciola hepatica*: host responders and nonresponders to parasite glutathione S-transferase. *Exp Parasitol* 1992;75:176-186.

49. Hillyer GV, Soler de Galanes M, Garcia Rosa MI, Montealegre F. Acquired immunity in schistosomiasis with purified *Fasciola hepatica* cross-reactive antigens. *Vet Parasitol* 1988;29:265-280.
50. Hillyer GV. Induction of immunity in mice to *Fasciola hepatica* with a Fasciola/Schistosoma cross-reactive defined immunity antigens. *American J Trop Med Hygien* 1985;1127-1131.
51. Hillyer GV. *Schistosoma mansoni*: reduced worm burdens in mice immunized with isolated *Fasciola hepatica* antigens. *Exp Parasitol* 1979;48:287-295.
52. Hope Cawdery MJ, Conway A. Production effects of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, on beef cattle. *Vet Rec* 1972;89:641-643.
53. Hope Cawdery MJ, Strickland KL, Conway A, Crowe PJ. Production effects of liver fluke in cattle. I. The effects of infection on live weight gain, food intake and food conversion efficiency in beef cattle. *Br Vet J* 1977;133:145-159.
54. Hope Cawdery MJ. Review of the economic importance of fascioliasis in sheep and cattle. *Ir Vet News* 1984:14-22.
55. Hope Cawdery MJ. The effects of fascioliasis on ewe fertility. *Br Vet J* 1976;132:569-575.
56. Howell MJ, Board PC, Boray JC. Glutathione S-transferase in *Fasciola hepatica*. *J Parasitol* 1988;74:715-718.
57. Hughes DL. Fasciola and Fascioloides. In: Soulsby, E.J.I. (ed) *Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology and Immunoprophylaxis*. Volume II Trematodes and cestodes CRC Press. Boca Raton, 1987;91-114.
58. Ibarra VF. Avances de investigación en fascioliasis. En *Temas Selectos de Parasitología*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2000;42-49.
59. Intapan PM, Tantrawatpan C, Maleewong W, Wongkham S, Wongkham C, Nakashima K. Potent epitopes derived from *Fasciola gigantica* cathepsin L1 in peptide-based immunoassay for the serodiagnosis of human fascioliasis.

Diagn microbial Infect Dis 2005; 53:125-129.

60. Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci* 1988;4:181-186.
61. Ji X, von Rosenvinge EC, Johnson WW, Tomarev SI, Piatigorsky J, Armstrong RN, Gilliland GL. Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry* 1995;34:5317-5328.
62. Johnson EG. Effects of liver on feedlot performance. *Agri-Practice* 1991;12:33-36.
63. Karrer KM, Peiffer SL, DiTomas ME. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:3063-3067.
64. Kay BK, Hoess RH. Principles and applications of phage display. In: Kay BK, Winter J, McCafferty J, editors. *Phage display of peptides and proteins*. San Diego:Academic Press, 1996:21-34.
65. Kehoe JW, Kay BK. Filamentous phage display in the new millennium. *Chem Rev* 2005;105:4056-4072.
66. Kremser A, Rasched I. The adsorption protein of the filamentous phage fd: Assignment of its disulfide bridges and identification of the domain incorporated in the coat. *Biochemistry* 1994;33:13954-13958.
67. Laclette JP, Alagon A, Willms K, Torre-Blanco A. Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. *J Parasitol* 1990;76:273-275.
68. Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A. Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol* 1992;148:124-128.

69. Lanar DE, Pearce EJ, James SL, Sher A. Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science* 1986;234:593-596.
70. Lazzaroni JC, Germon P, Ray MC, Vianney A. The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiol Lett* 1999;177:191-197.
71. Loukas A, Jones MK, King LT, Brindley PJ, McManus DP. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. *Infect Immun* 2001;69:3646-3651.
72. Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jensson H, Tahir MK, Warholm M, Jornvall H. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7202-7206.
73. Mas-Coma S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminthol* 2005;79:207-216.
74. Mas-Coma, S., Burgues, M. D., Esteban, J.G. 1999. Human fasciolosis. In: *Fasciolosis*. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 1999:411-434.
75. McGonigle S, Dalton JP. Isolation of *Fasciola hepatica* haemoglobin. *Parasitology* 1995;111:209-215.
76. McManus DP, Dalton JP. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 2006;133:S43-61.
77. Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM, Ketterer B. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J* 1991;274:409-414.
78. Mitchell GB, Maris L, Bonniwell MA. Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet Rec* 1998;143:399.
79. Moll L, Gaasenbeek CP, Vellema P, Borgsteede FH. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet Parasitol* 2000;91:153-158.

80. Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T, Spithill TW. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* 1996;14:1603-1612.
81. Mulcahy G, Dalton JP. Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res Vet Sci* 2001;70:83-86.
82. Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, Dalton JP. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 1998;16:932-939.
83. Muro A, Ramajo V, López J, Simón F, Hillyer VG. *Fasciola hepatica* vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol* 1997;219-229.
84. Narum DL, Ogun SA, Batchelor AH, Holder AA. Passive immunization with a multicomponent vaccine against conserved domains of apical membrane antigen 1 and 235-kilodalton rhoptry proteins protects mice against *Plasmodium yoelii* blood-stage challenge infection. *Infect Immun* 2006;74:5529-5536.
85. Oakey GA, Owen B, Knapp NHH. Production effects of subclinical liver fluke infection in growing dairy heifers. *Vet Rec* 1979;104:503-507.
86. O'Neill SM, Parkinson M, Strauss W, Angles R, Dalton JP. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:417-423.
87. Overend DJ, Bowen FL. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J* 1995;72:275-276.
88. Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988;73:305-318.
89. Pearce EJ, James SL, Hieny S, Lanar DE, Sher A. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*

1988;85:5678-5682.

90. Pemble SE, Wardle AF, Taylor JB. Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem J* 1996;319:749-754.
91. Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun* 1999;67:1954-1961.
92. Ramirez BL, Kurtis JD, Wiest PM, Arias P, Aligui F, Acosta L, Peters P, Olds GR. Paramyosin: a candidate vaccine antigen against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol* 1996;18:49-52.
93. Richard DM, Howell MJ. Comparative aspects of immunity in fascioliasis and cysticercosis in domesticated animals. In: Symons L.E.A. Donald A.D. and Dinen J.K. (eds) *Biology and control of Ectoparasites*. Academic Press, Sydney, 1982;243-374.
94. Riechmann L, Holliger P. The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell* 1997;90:351-360.
95. Roche L, Tort J, Dalton JP. The propeptide of *Fasciola hepatica* cathepsin L is a potent and selective inhibitor of the mature enzyme. *Mol Biochem Parasitol* 1999;98:271-277.
96. Rokni MB, Massoud J, O'Neill SM, Parkinson M, Dalton JP. Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of Northern Iran: application of cathepsin L-ELISA. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44:175-9.
97. Roseby FB. The effect of fasciolosis on the wool production of merino sheep. *Australian Veterinary Journal* 1970;46:361-365.
98. Ross JG. The economics of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *British Veterinary Journal* 1970;126:xiii-xv.
99. Russel M, Linderoth NA, Šali A. Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme. *Gene* 1997;192:23-32.

100. Russel M, Whirlow H, Sun TP, Webster RE. Low-frequency infection of F-bacteria by transducing particles of filamentous bacteriophages. *J Bacteriol* 1988;170:5312-5316.
101. Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 1990;249:386-390.
102. Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels GL, Chandler D, Thompson C, Wilson L, Spithill TW, Mitchel GF, Campbell NJ. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol* 1990;145:3905-3910.
103. Sexton JL, Wilce MC, Colin T, Wijffels GL, Salvatore L, Feil S, Parker MW, Spithill TW, Morrison CA. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a three-dimensional model of the antigen. *J Immunol* 1994;152:1861-1872.
104. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996; 68:850-858.
105. Sidhu SS. Engineering M13 for phage display. *Biomol Engin* 2001;18:57-63.
106. Sinclair KB. Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. *British Veterinary Journal* 1962:37-53..
107. Smith AM, Carmona C, Dowd AJ, McGonigle S, Acosta D, Dalton JP. Neutralization of the activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. *Parasite Immunol* 1994;16:325-328.
108. Smith AM, Dowd AJ, Heffernan M, Robertson CD, Dalton JP. *Fasciola hepatica*: a secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin. *Int J Parasitol* 1993a;23:977-83.
109. Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A, Dalton JP. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 1993b;62:1-8.

110. Smith GP, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 1993;217:228-257.
111. Smith GP. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985;228:1315–1317
112. Spithill, TW, Smooker, PM, Sexton J L, Bozas E, Morrison CA, Creaney J, Parsons JC. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 1999:377–410.
113. Stengle I, Bross P, Garces X, Giray J, Rasched I. Dissection of functional domains on phage fd adsorption protein-discrimination between attachment and penetration sites. *J Mol Biol* 1990;212:143-149.
114. Szardenings M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J Recept Signal Transduct Res* 2003;23:307-349
115. Tang L, Chen Y, Wang L, Zhang S, Zeng X, Yi X. Identification and characterization of peptides mimicking the epitopes of metalloprotease of *Schistosoma japonicum*. *Cell Mol Immunol* 2005;2:219-223.
116. Tang LF, Yi XY, Zeng XF, Wang LQ, Zhang SK. *Schistosoma japonicum*: isolation and identification of peptides mimicking ferritin epitopes from phage display library. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2004;36:206-210.
117. Tandler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem AC, Da Silva JF, Savino W, Garratt RC, Katz N, Simpson AS. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:269-273.
118. Thorpe E, Broome AWJ. Immunity to *Fasciola hepatica* infection in albino rats vaccinated with irradiated metacercariae. *Vet Rec* 1962;74:755-756.
119. Torgerson P, Claxton J. Epidemiology and control. In: Fasciolosis. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 1999:113-149.
120. Tort J, Brindley PJ, Knox D, Wolfe KH, Dalton JP. Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Adv Parasitol* 1999;43:161-266.

121. Van Milligen FJ, Cornelissen JB, Bokhout BA. *Fasciola hepatica*: an antigen fraction derived from newly excysted juveniles, containing an immunoreactive 32-kDa protein, induces strong protective immunity in rats. *Exp Parasitol* 2000;94:163-171.
122. Veerkamp JH, Peeters RA, Maatman RG. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1991;1081:1-24.
123. Wang M, Yi XY, Li XP, Zhou DM, Larry M, Zeng XF. Phage displaying peptides mimic schistosoma antigenic epitopes selected by rat natural antibodies and protective immunity induced by their immunization in mice. *World J Gastroenterol* 2005;11:2960-2966.
124. Wang M, Yi XY, Zeng XF, Li XP, Zhou DM. Studies on the mimic short peptide-based vaccine: immunoprotection in mice against *Schistosoma japonicum* infection *Chin J Parasitol Parasit Dis* 2003;21:338-341.
125. Wijffels GL, Panaccio M, Salvatore L, Wilson L, Walker ID, Spithill TW. The secreted cathepsin L-like proteinases on the trematode, *Fasciola hepatica*, contain 3-hydroxyproline residues. *Biochemical J* 1994a; 299:781-790.
126. Wijffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, Campbell N, Sexton J, Wicker J, Bowen F, Friedel T, Spithill TW. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol* 1994b;78:132-148.
127. Wijffels GL, Sexton JL, Salvatore L, Pettitt JM, Humphris DC, Panaccio M, Spithill TW. Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol* 1992;74:87-99.
128. Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM, Spithill TW. *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol* 1998;88:85-94.

129. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 1994;12:433-455.
130. Wu HW, Hu XM, Wang Y, Kurtis JD, Zeng FJ, McGarvey ST, Wu GL, Zhang ZS, Hua ZC. Protective immunity induced by phage displayed mitochondrial related peptides of *Schistosoma japonicum*. *Acta Trop* 2006;99:200-207.
131. Yamasaki H, Aoki T. Cloning and sequence analysis of the major cysteine protease expressed in the trematode parasite *Fasciola sp.* *Biochem Mol Biol Int* 1993;31:537-42.
132. Zhou DM, Yi XY, Zeng XF, Wang M, McReynolds L. Immunity against *Schistosoma japonicum* induced by phage display peptides mimicking antigenic epitopes of *Trichinella spiralis*. *Chin J Parasitol Parasit Dis* 2001;19:268-271.