

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Control de la fasciolosis:

Rol de las enzimas de fase II de detoxificación en la resistencia al Triclabendazole y evaluación de la inmunogenicidad y protección conferida por la proteína recombinante GST Mu (rFhGSTMu) contra *Fasciola hepatica* en el modelo murino

Por: Fernández Vanesa

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A



2018

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis doctoral es inevitable que me acuerde de tantas personas que han ayudado a que todo esto tenga lugar y sin ellas todo este proyecto me hubiera resultado imposible.

Empiezo por agradecer de forma especial a la profesora y doctora Silvia Estein por su apoyo y confianza en mi trabajo y por su dedicación en cada etapa de esta tesis. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Además, agradecerles a los doctores Luis Álvarez y a Laura Ceballos del departamento de Fisiopatología (cátedra de farmacología) y a todo su equipo por su apoyo, dedicación y gentileza a la hora de abarcar temas relacionados con la tesis.

También agradecerle al veterinario Rodrigo Sanabria por la gentileza de enviarme metacercarias para los ensayos y de esta manera poder terminar la tesis.

A Paula Domínguez y Claudia Cagnoli y María Celeste Moran, por su amistad, ante todo, y por ser muy buenas compañeras de trabajo, siempre dispuesta a colaborar incondicionalmente.

A todas aquellas personas que están en mi vida y a todas aquellas que hayan pasado por esta para aportarme de una forma u de otra...

Todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia. Destacar mi mención especial a mis padres y abuelos y en especial a mi hermana Yamila que por su ejemplo, dedicación y palabras de aliento nunca bajaron los brazos para que yo tampoco lo haga aun cuando todo se complicaba, y agradecer de manera muy especial a mi hija Manuela que es la luz que Dios puso en mi vida para darme tantas alegrías y fuerzas para seguir adelante.

RESUMEN

Fasciola hepatica es el agente causal de la fasciolosis, enfermedad parasitaria zoonótica. Desde un punto de vista productivo, la enfermedad cobra relevancia en la cría de ovinos y bovinos en diferentes partes del mundo, incluidas amplias regiones de la Argentina. De las diferentes medidas de control disponibles, el tratamiento químico es el más utilizado. Si bien se conocen distintos grupos químicos, el triclabendazole (TCBZ) ha sido el compuesto de elección en ovinos y bovinos debido a que el mismo presenta una elevada eficacia sobre estadios inmaduros y maduros de *F. hepatica*. El uso indiscriminado de estos compuestos químicos en diferentes regiones del mundo ha generado una importante presión de selección, reportándose el desarrollo de cepas de *F. hepatica* resistentes a la mayoría de los fasciolicidas, especialmente a TCBZ. En este contexto, la vacunación aparece como una herramienta interesante para el control de este parásito.

Las enzimas Glutación S-Transferasas (GSTs) son el principal sistema de detoxificación de fase II en parásitos helmintos. Se ha demostrado que *F. hepatica* presenta niveles elevados de GST con funciones fisiológicas importantes.

En el presente proyecto de Tesis se evaluó la expresión y actividad de enzimas de las diferentes vías metabólicas de detoxificación involucradas en el proceso de metabolización de TCBZ de Fase I: Carboxil estearasa (CE) y de Fase II: Glutation S-Transferasa, Glutación Peroxidasa y Glutación Reductasa (GSR) por parte de diferentes cepas de *F. hepatica* susceptible y resistentes a TCBZ. Se detectó una respuesta multienzimática que involucra a toda la familia de enzimas dependientes de glutatión (GSH). La enzima CE no expresó diferencias significativas entre las cepas evaluadas. Dicha enzima no estaría involucrada en el fenómeno de resistencia.

Se demostró que la actividad citosólica es aproximadamente 50% más efectiva en las GSTs correspondientes a cepas resistentes a TCBZ. Cuando se analizaron las diferentes isoenzimas se determinó que la isoenzima Mu no solo está implicada en los fenómenos de detoxificación sino que además participaría en el fenómeno de resistencia antihelmíntica. Al evaluar el grado de implicancia de dicha isoenzima Mu, hemos identificado y caracterizado genéticamente el gen GST Mu aislado de las cepas de *F. hepatica* susceptible (TCBZ-S) y resistente (TCBZ-R) a TCBZ. Se detectó una mutación en el gen la cual modifica el aminoácido 143 de la isoenzima GST Mu en la cepa TCBZ-R pudiendo ser la misma parte responsable de la sobreexpresión del sistema enzimático metabólico en estudio.

Teniendo en cuenta la relevancia de GST Mu, se detectó por PCR el gen correspondiente a esta isoenzima y se envió a sintetizar la proteína recombinante (rFhGSTMu). Se confirmó su pureza por SDS-PAGE y se evaluó su actividad enzimática.

Para cumplir con el otro objetivo de la Tesis, se estableció el número de metacercarias de *F. hepatica* para evaluar la actividad protectora de rFhGSTMu formulada en tres adyuvantes distintos contra *F. hepatica* en ratones Balb/c. Los animales fueron inmunizados en tres oportunidades cada 15 días por la vía subcutánea con las siguientes formulaciones: rFhGSTMu+ Adyuvante de Freund Incompleto, rFhGSTMu+ Hidróxido de Aluminio (Al(OH)₃), rFhGSTMu+ Quil A y Grupo Control (sin inmunizar). Se detectaron niveles de anticuerpos IgG y subisotipos (IgG1 e IgG2a), IL-4 e IFN- γ . Todas las formulaciones vacunales indujeron anticuerpos IgG específicos con una respuesta mixta IgG1/IgG2a (Th2//Th1), sin embargo, la formulación rFhGSTMu + Al (OH)₃ estimuló principalmente un perfil Th2 coincidente con una mayor producción de IL-4 en comparación con IFN- γ .

La formulación rFhGSTMu+ Al(OH)₃ redujo entre 75-90% el número de parásitos y la diferencia en la curva de supervivencia de este grupo fue altamente significativa. En el resto de los grupos experimentales, el recuento de parásitos fue similar al grupo control no inmunizado con una reducción en el número de parásitos no mayor al 12,5%. El daño hepático se estimó indirectamente mediante la determinación de los valores séricos de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA) y por análisis histopatológico de las lesiones. Los valores de las enzimas hepáticas en el grupo inmunizado con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ fueron significativamente más bajos ($p < 0,05$) que los valores registrados en el grupo control y en el resto de los grupos experimentales.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis indican que la proteína recombinante rFhGSTMu formulada con Al (OH)₃ es un candidato vacunal contra *F. hepatica* en el modelo murino.

ABSTRACT

Fasciola hepatica is the causative agent of fasciolosis, a zoonotic parasitic disease. From a productive point of view, the disease becomes relevant in the breeding of sheep and cattle in different parts of the world, including many regions of Argentina. Among the different control measures available, chemical treatment is the most used one. Although different chemical groups are known, triclabendazole (TCBZ) remains the compound of choice in sheep and cattle because it has a high efficacy against immature and mature stages of *F. hepatica*. The indiscriminate use of these chemical compounds in different regions of the world has generated an important selection pressure, and the development of strains of *F. hepatica* resistant to most fasciolicides, especially to TCBZ, has been reported. In this context, vaccination appears as an interesting tool for the control of this parasite.

The enzymes Glutathione S-Transferases (GSTs) are the main phase II detoxification system of helminth parasites. It has been demonstrated that *F. hepatica* exhibits high levels of GST with important physiological functions.

In this thesis project, the expression of the different metabolic pathways of Phase I and II detoxification enzymes involved in the metabolism of TCBZ were evaluated. Phase I enzyme carboxyl esterase (CE) and phase II enzymes Glutathione S-Transferase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase (GSR) were evaluated in different strains of *F. hepatica* susceptible and resistant to TCBZ. A multienzyme response was detected that involves the whole family of enzymes dependent on GSH. CE did not exhibit significant differences between strains. This could be due to a lack of involvement of this enzyme in the resistance phenomenon.

It was demonstrated that the cytosolic activity is approximately 50% more effective in the GST corresponding to strains resistant to TCBZ. When the different isoenzymes were analyzed, it was determined that the Mu isoenzyme is not only involved in the detoxification phenomena but also participates in the anthelmintic resistance phenomenon. In evaluating the degree of implication of this Mu isoenzyme, we have identified and genetically characterized the Mu GST gene isolated from strains of *F. hepatica* susceptible (TCBZ-S) and resistant (TCBZ-R) to TCBZ. A gene mutation was detected which modifies the amino acid 143 of the isoenzyme GST Mu in the TCBZ-R strain, which could be responsible for the overexpression of the metabolic enzyme system under study.

Given the probable relevance of GST Mu, a recombinant protein corresponding to the gene coding for said enzyme was generated. For this, the gene corresponding to GST Mu was detected by PCR, and the corresponding recombinant protein (rFhGSTMu) was then synthesized, expressed and

purified. It was evaluated electrophoretically and the enzymatic capacity of rFhGSTMu was confirmed.

In order to comply with the other objective of the Thesis, the number of metacercariae of *F. hepatica* was established to evaluate the protective activity of rFhGSTMu formulated in three different adjuvants against *F. hepatica* in Balb/c mice. The animals were immunized three times every 15 days by the subcutaneous route with the following formulations: rFhGSTMu+ Incomplete Freund's Adjuvant, rFhGSTMu+ Aluminum Hydroxide, rFhGSTMu+ Quil A and Control Group (without immunizing). Levels of IgG antibodies and sub-types (IgG1 and IgG2a), IL-4 and IFN- γ were detected. All the vaccine formulations induced specific IgG antibodies with a mixed IgG1 / IgG2a response (Th2 // Th1), however, the formulation rFhGSTMu+ Al (OH)₃ mainly stimulated a Th2 profile coincident with a higher production of IL-4 compared with IFN- γ .

The rFhGSTMu+ Al (OH)₃ formulation reduced between 75-90% the number of parasites and the difference in the survival curve of this group was highly significant. In the rest of the experimental groups, the parasite count was similar to the non-immunized control group with a reduction in the number of parasites not greater than 12.5%. Liver damage was estimated indirectly by determining the serum values of the enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (FA) and by histopathological analysis of the lesions. The liver enzyme values in the group immunized with rFhGSTMu+ Al (OH)₃ were significantly lower ($p < 0.05$) than the values recorded in the control group and in the rest of the experimental groups. The results obtained in this thesis indicate that the recombinant protein rFhGSTMu formulated with Al (OH)₃ is a vaccine candidate against *F. hepatica* in the murine model.

PALABRAS CLAVES Y ABREVIATURAS

ABZ:	Albendazole
ABTS:	Acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ADNc:	ADN codificante
ARN:	Ácido ribonucleico
Al (OH)₃ :	Hidróxido de aluminio
ALT:	Alanina Aminotransferasa
AST:	Aspartato Aminotransferasa
BZDs:	Benzimidazoles
BF:	Buffer fosfato
CE:	Carbocil Estearasas
CONA:	Concanavalina A
DE:	Desviación estándar
DO:	Densidad óptica
FA:	Fosfatasa Alcalina
FABP:	Proteínas transportadoras de ácidos grasos
FCA:	Adyuvante completo de Freund
FIA:	Adyuvante incompleto de Freund
<i>F. gigantea:</i>	<i>Fasciola gigantea</i>
<i>F.hepatica:</i>	<i>Fasciola hepática</i>
FMO:	Flavin Monooxigenasas
FhCL1:	Catepsina L1 de <i>F. hepática</i>
FhES:	Productos de excreción-secreción de <i>F. hepatica</i>
Fh-KTM:	Inhibidor de proteinasa sérica tipo Kunitz
FhHb:	Hemoglobina de <i>F. hepática</i>
GSH:	Glutación
GPX:	Glutación Peroxidasa
GST:	Glutación-S-Transferasas
GSR:	Glutación Reductasa
H-E:	Hematoxilina-eosina
IFN-γ:	Interferón-gamma
Ig G:	Inmunoglobulina G
IL-4:	Interleuquina 4
IL-10:	Interleuquina 10
IP:	Intraperitoneal
LAP:	Leucina aminopeptidasa
NEJs:	Formas juveniles recientemente desenquistadas
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
NK:	Natural Killer
ON:	Oxido Nitrico
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PBS:	Buffer fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de polimerasa
rFhGSTMu:	Proteína recombinante GST Mu de <i>Fasciola hepatica</i>
RNAm:	ARN mensajero
SC:	Subcutáneo
SOD:	Superóxido Dismutasa
Spi:	Semanas post-infección
Th:	Linfocitos T colaboradores

Th0:	Linfocitos colaboradores maduros aún no han recibido un estímulo para la respuesta
Th1:	Respuesta inmunitaria tipo 1 o celular
Th2:	Respuesta inmunitaria tipo 2 o de tipo humoral
Tc:	Linfocitos T citotóxicos
Tregs:	Linfocitos T reguladores
TCBZ:	Triclabendazole
TCBZ-S:	Cepa susceptible a triclabendazole
TCBZ-R:	Cepa resistente a triclabendazole
µg :	Microgramo
µl :	Microlitro

Palabras claves: Fasciolosis, Resistencia, Triclabendazole, Vacunas, GST Mu, Modelo ratón, Inmunogenicidad, Protección.

INDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN AL TEMA DE TESIS	13
PARASITOSIS	13
FASCIOSIS	13
CICLO BIOLÓGICO DE <i>F. HEPATICA</i>	14
HOSPEDADOR INTERMEDIARIO	15
HOSPEDADOR DEFINITIVO	15
SÍGNOS CLINICOS Y LESIONES	16
IMPORTANCIA DE LA FASCIOSIS	16
INMUNIDAD EN LAS INFESTACIONES PARASITARIAS	18
TRATAMIENTO	18
FACTORES QUE CONDICIONAN LA APARICIÓN DE LA RESISTENCIA PARASITARIA	19
RESISTENCIA: TIPOS Y CLASIFICACIÓN	21
MECANISMO DE ACCION Y COMPORTAMIENTO FARMACOCINÉTICO DE LOS ANTIHELMÍNTICOS BENZIMIDAZOLES	22
METABOLISMO DE LOS BZDS	23
ENZIMAS DE LA FASE I DE DETOXIFICACIÓN	23
ENZIMAS DE LA FASE II DE DETOXIFICACIÓN	25
RESISTENCIA A LOS ANTIHELMÍNTICOS BENZIMIDAZOLES	26
RESISTENCIA EN NEMATODOS	26
RESISTENCIA A BZDS POR PARTE DE LOS TREMATODES	27
LAS VACUNAS COMO ALTERNATIVA PREVENTIVA CONTRA LA FASCIOSIS	29
EVASION DE LA RESPUESTA INMUNITARIA	31
ADYUVANTES EN LA FORMULACIÓN DE VACUNAS SUBCELULARES	36
ASPECTOS GENERALES EN INMUNOPROFILAXIS CONTRA LA FASCIOSIS	37
OBJETIVO GENERAL	39

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
DISEÑO EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS	40
1- ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y GENÉTICOS DE LA ISOENZIMA GST MU EN CEPAS DE F. HEPATICA SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A TCBZ	40
A) OBTENCIÓN DE F. HEPATICA	40
B) OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS Y MICROSOMAS	40
C) DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA	40
D) ANÁLISIS DEL GEN PARA GST MU	41
RECOLECCIÓN DE LOS PARÁSITOS	41
EXTRACCIÓN Y RETROTRANSCRIPCIÓN DEL ARN TOTAL A CADN	41
AMPLIFICACIÓN DEL CDNA POR PCR	41
E) EVALUACIÓN DE LA PUREZA Y DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE rFhGSTMu	41
2- ENSAYOS PARA EVALUAR INMUNOGENICIDAD Y LA PROTECCIÓN EN EL MODELO MURINO	41
A) SELECCIÓN DE LAS METACERCARIAS PARA LA INFESTACIÓN	41
B) PUESTA A PUNTO DE LA INFESTACIÓN EN EL MODELO MURINO	41
C) PUESTA A PUNTO DE LA EXTRACCIÓN DE SANGRE POR LAS VÍAS SUBMANDIBULAR E INTRACARDIACA	43
D) ENSAYO DE INMUNIZACIÓN	43
E) ENSAYO DE INMUNIZACIÓN PASIVA	44
F) EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA	44
A) EVALUACIÓN DEL DAÑO HEPATICO	44
B) CURVA DE SUPERVIVENCIA	44
C) DETERMINACIÓN DE ENZIMAS HEPÁTICAS	45
D) DETERMINACIÓN DE DAÑO HEPÁTICO MEDIANTE ANÁLISIS HSTOPATOLÓGICO	45
E) EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL	45
F) EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR <i>IN VITRO</i>	46
A) CULTIVO DE ESPLENOCITOS	46

B) RECUENTO DE CÉLULAS VIABLES	46
C) PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS <i>IN VITRO</i>	46
D) DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS POR ELISA	46
E) ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
RESULTADOS	48
1) ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DE LAS PRINCIPALES ENZIMAS DE DETOXIFICACIÓN (FASE 2) EN CEPAS DE <i>F. hepatica</i> SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A TCBZ	48
2) ESTUDIOS GENÉTICOS DE LA ISOENZIMA GST MU EN CEPAS DE <i>F.</i> <i>hepatica</i> SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A TCBZ	50
3) DESARROLLO DE UN MODELO MURINO EN FASCIOLOSIS	57
3.1) PUESTA A PUNTO DE LA INFESTACIÓN EN EL MODELO MURINO	57
3.2) PUESTA A PUNTO DE LA EXTRACCIÓN DE SANGRE POR LAS VÍAS SUBMANDIBULAR E INTRACARDIACA	57
4) EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y EFICACIA DE rFhGSTMu	62
CON DISTINTOS ADYUVANTES EN EL MODELO MURINO	
4.1) EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD: RESPUESTA HUMORAL	62
4.2) EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN	65
4.2.a) ANALISIS DE LAS ENZIMAS HEPATICAS	65
4.2.b) PORCENTAJE EN LA REDUCCIÓN DEL NUMERO DE FASCIOLAS EN LOS RATONES INMUNIZADOS	66
5) EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y EFICACIA DE rFhGSTMu + Al (OH) ₃ EN EL MODELO MURINO	67
5.a) VALORES DE LA ENZIMA HEPATICA GPT Y FORMULA LEUCOCITARIA PRE Y POST INFESTACIÓN EN TODOS LOS GRUPOS EXPERIMENTALES	68
5.b) PORCENTAJE DE REDUCCIÓN EN EL NUMERO DE FASCIOLAS EN LOS RATONES INMUNIZADOS	71
5.c) CURVA DE SUPERVIVENCIA	72

5.d.1) IMÁGENES MACROSCOPICAS DE LOS HIGADOS DE RATONES CON LESIÓN	75
5.d.2) ANALISIS HISTOPATOLOGICO DE LOS HIGADOS DE RATONES CON LESION	78
6- ENSAYO DE INMUNIZACIÓN PASIVA	84
6.a) ANALISIS DE LAS ENZIMAS HEPATICAS	84
6.b) PORCENTAJE DE REDUCCIÓN EN EL NUMERO DE FASCIOLAS EN LOS RATONES INMUNIZADOS	85
DISCUSION	86
DE LOS ESTUDIOS METABÓLICOS:	88
DE LOS ESTUDIOS MOLECULARES:	89
DE LOS ESTUDIOS DEL DESARROLLO DE UN MODELO MURINO EN FASCIOLOSIS:	89
DE LOS ESTUDIOS EN LA EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y EFICACIA DE LA PROTEINA rFhGSTMu EN EL MODELO MURINO.	91
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	95

INTRODUCCIÓN AL TEMA DE TESIS

PARASITOSIS

Las infecciones causadas por helmintos constituyen un problema médico sanitario importante tanto en animales domésticos como en humanos. En el ganado, las parasitosis en general, ocasionan serias pérdidas económicas particularmente en áreas donde se practica el pastoreo extensivo (Olaechea, 2004). Si bien se han desarrollado diferentes estrategias para contrarrestar el efecto nocivo de los parásitos, tales como medidas de manejo, control biológico, selección de animales resistentes, etc., el control químico continúa siendo una herramienta fundamental en la lucha contra las parasitosis. Sin embargo, dicha estrategia ha sido ineficiente debido a la carencia de criterios técnicos para implementarla (Kaplan y Vidyashankar, 2012; Furtado *et al.*, 2016). Actualmente, la intensificación de los sistemas de producción animal ha dado lugar a una dependencia casi exclusiva de la quimioterapia, siendo una seria amenaza el desarrollo de resistencia de diferentes géneros parasitarios a la acción de diversos compuestos antihelmínticos. El fenómeno de la resistencia antihelmíntica es un problema que preocupa debido a su progresiva extensión ya que en los últimos años ha incluido la mayoría de los principios activos usados para el control de helmintos (Mishra *et al.*, 2014).

Por otro lado, desde el punto de vista económico, la resistencia parasitaria reviste una importancia notable dado los costos elevados que implica el descubrimiento de nuevos principios activos ((Kaplan y Vidyashankar, 2012), así como también los incalculables gastos para los ganaderos/productores tanto por la adquisición de compuestos ineficientes como por los efectos nocivos del parasitismo sobre el ganado (Mishra *et al.*, 2014).

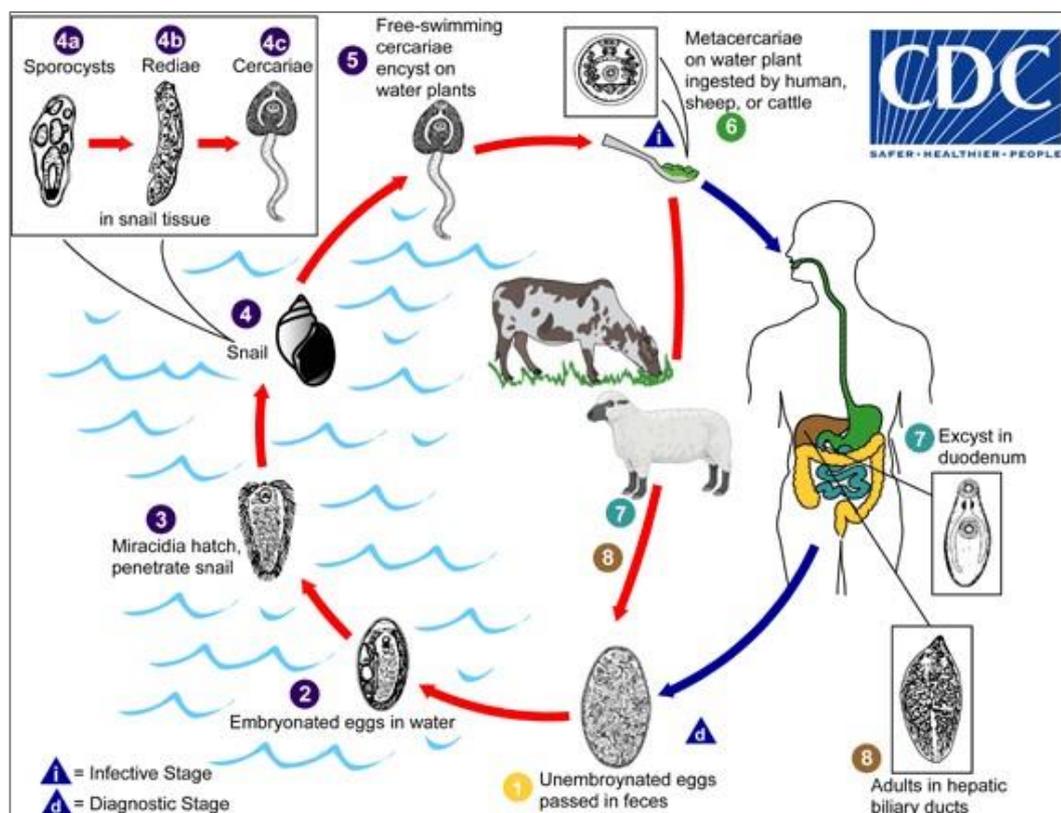
FASCIOSIS

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria zoonótica producida por el trematodo *Fasciola hepatica*. La misma está distribuida mundialmente y afecta a una gran variedad de animales herbívoros y omnívoros, así como también al hombre. Se ha estimado que un cuarto de la población total de ovinos y bovinos del mundo pastorean en áreas donde *F. hepatica* está presente y en las que el medio ambiente es favorable para su supervivencia y dispersión. Este

parásito ingresa al continente americano desde Europa con la colonización y en nuestro país se describe por primera vez dicha enfermedad en ovinos en el año 1888 (Olaechea,2004).

El trematodo *F. hepatica* es conocido en Argentina como “Saguaype”, voz guaraní que significa gusano chato o plano. También es llamado “palomilla del hígado” en zonas de la pampa húmeda, “Corrocho” en San Juan, “Chonchaco” en San Luis y en el Noroeste del país (Olaechea, 2004).

CICLO BIOLÓGICO DE *F. hepatica*



Global Salud División de Enfermedades Parasitarias, 2013

F. hepatica es un trematodo que en su etapa adulta se localiza en la vesícula biliar y en los conductos biliares del hospedador definitivo y mide de 20 a 50 mm de largo por 6 a 12 mm de ancho. Para completar su ciclo biológico, *F. hepatica* necesita dos hospedadores, un hospedador intermediario (el caracol) y otro definitivo (el mamífero) (Olaechea, 2004).

En el interior del huevo, y según las condiciones de temperatura y humedad ambientales, se desarrolla el miracidio, que será el encargado de buscar y penetrar en el hospedador intermediario,

el caracol, para evolucionar hasta el estadio de cercaria. El resultado de una infección exitosa de un miracidio en un caracol suele ser la producción de 400 a 1.000 cercarias. A continuación, se produce la expulsión de las cercarias, que se enquistan en el pasto como formas infestantes llamadas metacercarias. Estas últimas llegan al intestino al ser ingeridas por el ovino y se transforman en fasciolas jóvenes (Olaechea, 2004).

Las metacercarias atraviesan la pared intestinal y migran hacia el hígado a través de la cavidad abdominal. Finalmente, perforan la cápsula hepática y continúan su migración a través del tejido hepático hasta llegar a los conductos biliares. Una vez en su localización definitiva, los parásitos, ya adultos, inician la puesta de huevos para completar de este modo el ciclo (Olaechea, 2004). Cada parásito adulto localizado en el hospedador definitivo puede producir al menos 20.000 huevos por día, que son arrastrados por la bilis, llegan hasta el intestino y se excretan en la materia fecal. Ante un intento de invasión por parte del parásito, existe una resistencia natural entre los diferentes hospedadores, tanto intermediarios como definitivos. Dicha resistencia es diferente en cada especie y será alta, moderada o baja según el hospedador analizado (Olaechea, 2004).

Hospedador Intermediario

El hospedador intermediario de *F. hepatica* en nuestro país se encuentra limitado a caracoles del género *Limnaea* (Olaechea, 2004). Han sido identificados como responsables de la producción de metacercarias de *F. hepatica* en Sudamérica, las especies *Limnaea viatrix* y *L. columella* siendo *L. viatrix* el único reconocido en Patagonia. Estos caracoles son anfibios y viven en barro húmedo o lugares de aguas poco profundas, pero no estancadas (Olaechea, 2004).

En condiciones de sequía o frío, tanto el caracol como los estadios intermediarios, disminuyen su actividad metabólica pudiendo sobrevivir varios meses para reaparecer cuando las condiciones resulten favorables (Olaechea, 2004). Considerando que las temperaturas inferiores a los 10°C inhiben la actividad del caracol, en áreas endémicas como Esquel (Chubut), el ciclo se activa sólo en los meses de noviembre a marzo, mientras que, en otros, como Goya (Corrientes) dispone de temperaturas adecuadas durante todo el año. Esta característica climática debe ser considerada en cada región para comprender la forma de presentación del problema y la estrategia para su control. Además, el uso del riego para mejorar la calidad y cantidad de forraje a los animales, favorece el hábitat para el caracol ampliándose así el área de endemismo (Olaechea, 2004).

Hospedador Definitivo

El desarrollo de la infestación tiene marcadas diferencias entre los distintos hospedadores definitivos mientras que en los bovinos raramente ocasiona la muerte esto ocurre con mayor frecuencia en ovinos (Olaechea, 2004). La resistencia a la infestación es alta en los equinos y porcinos, moderada en los bovinos, conejos, ciervos, liebres y en el hombre mientras que es baja en los ovinos, caprinos, ratones, hámster y rata. Los estudios epidemiológicos han demostrado que los ovinos infestados son los que más contribuyen a la continua contaminación de las pasturas, llegando a tener una excreción de 2 millones de huevos por animal por día (Olaechea, 2004). Esta característica de abundante oviposición y baja resistencia a la infestación por parte del hospedador ovino, ha obligado en ciertas regiones del país tales como las áreas endémicas de Neuquén, a cambiar el tipo de especie en producción reemplazando la explotación de ovinos por bovinos (Olaechea, 2004).

SÍGNOS CLINICOS Y LESIONES

La presencia de unos pocos ejemplares de *F. hepatica* en la vesícula biliar y/o conductos biliares, no provoca ninguna manifestación clínica importante, mientras no haya un fenómeno obstructivo (Olaechea, 2004). Por otro lado, las infestaciones masivas causan sintomatología clínica evidente siendo particularmente graves en los animales jóvenes en los cuales puede ocasionar la muerte repentina por falla hepática o por una invasión clostridial secundaria (Olaechea, 2004). Si el animal sobrevive a las lesiones, la regeneración del hígado se produce con producción de tejido cicatrizal fibroso, con distorsión del órgano por las múltiples cicatrices generadas. En este estado pueden aparecer signos de anemia, debilidad, emaciación y edema en la región submandibular, cuello, pecho y abdomen (Olaechea, 2004). En la necropsia de animales parasitados, los hallazgos dependen del número de parásitos y del tiempo de infestación. En infestaciones recientes se observan marcas de perforación hepática, inflamación y focos hemorrágicos presentándose un cuadro de hepatitis aguda. En los casos crónicos, los animales están anémicos o caquéticos, hay colectas serosas en peritoneo y engrosamiento de los conductos biliares del hígado con alteraciones cirróticas (Olaechea, 2004).

IMPORTANCIA DE LA FASCIOSIS

Desde el punto de vista socio-sanitario, la fasciolosis es una zoonosis de distribución cosmopolita. La misma constituye un serio problema en el medio rural dado que los principales reservorios de estos parásitos son los ovinos, los bovinos, los caprinos y los herbívoros salvajes entre otros. La estrecha relación entre los animales de producción y el hombre, hecho que se da especialmente en países en vías de desarrollo o subdesarrollados, favorece la presencia de la enfermedad en el hombre, donde los niños son particularmente afectados, provocando retraso en el crecimiento y ocasionalmente la muerte (Mas-Coma *et al.*, 2009). Las limitaciones en el diagnóstico y el hecho de que la fasciolosis humana no sea una enfermedad de declaración obligatoria, sugieren que el número de casos humanos es mucho mayor que el reportado. Desde el punto de vista de la Salud Pública, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la fasciolosis dentro de las enfermedades desatendidas emergentes de mayor importancia (WHO, 2008) enfatizando en la necesidad de implementar medidas de control contra este parásito, teniendo en cuenta que no es posible el control de la fasciolosis humana sin un correcto control de la enfermedad en los animales (WHO, 2008).

Las estimaciones (no oficiales) de la OMS, sugieren que en las regiones andinas de Bolivia, Perú, Chile, Ecuador, Cuba y Egipto son regiones de mayor incidencia de fasciolosis en humanos y que en Rusia, China, Georgia, Vietnam y Uganda la enfermedad está expandiéndose a gran velocidad probablemente en relación con el fenómeno de cambio climático y global. En nuestro país, la Mesopotamia y la pre-cordillera patagónica son consideradas áreas endémicas (Olaechea *et al.*, 2004). En resumen, la fasciolosis es una enfermedad poco conocida pero que produce millones de muertes en humanos (Mas-Coma, 2009).

A finales del siglo pasado se habían reportado solamente 2 mil casos humanos en todo el mundo. En la actualidad hay 50 millones de personas infestadas y 180 millones tienen riesgo de infestación en todo el mundo por lo cual la fasciolosis debería englobarse dentro de las enfermedades menos estudiadas, pero de mayor impacto sanitario, fundamentalmente en poblaciones rurales y de bajos recursos (Bio Ventures para la Salud Global, 2015).

Desde el punto de vista económico, la fasciolosis es considerada mundialmente como una de las enfermedades más importantes de los rumiantes domésticos donde se manifiesta con pérdidas de peso, disminución de la producción láctea en calidad y cantidad (Reinhards, 1957), reducción de la eficiencia reproductiva y bajas conversiones de la ingesta que se reducen entre 8 y 28%

(Reinhardt, 1977) ocasionando pérdidas económicas cercanas a US\$ 100 mil millones/año en el mundo (Boray, 1985).

La fasciolosis, por sus características biológicas y por su amplia distribución entre los rumiantes domésticos y muchas especies silvestres es difícilmente erradicable, pero es indudable que es controlable (Olaechea, 2004). Se ha estimado que un cuarto de la población total de ovinos y bovinos del mundo pastorean en áreas donde *F. hepatica* está presente y en donde el medio ambiente es favorable para su mantenimiento y dispersión (Nari y Fiel, 1994) aunque varían las tasas de morbilidad y mortalidad de una región a otra (Acha y Szyfres, 1997).

INMUNIDAD EN LAS INFESTACIONES PARASITARIAS

Las consecuencias del parasitismo pueden ser, por un lado, una falta de la respuesta inmunitaria ante una parasitación masiva, y por otro lado una exagerada respuesta inmunopatológica. Para tener éxito, el parásito debe mantener un equilibrio entre ambos extremos, es decir evitar la muerte del organismo hospedador, su fuente de alimento y al mismo tiempo escapar de la acción del sistema inmunitario del mismo. A menudo, los hospedadores infestados de forma crónica resistirán la reinfestación frente a formas parasitarias “frescas”, situación que se conoce con el nombre de inmunidad concomitante (Maizels *et al.*, 1993). Este hecho se ha visto particularmente en casos de schistosomiasis y también en malaria (Fresno *et al.*, 2010).

Una característica muy marcada de la reacción inmunitaria ante las infestaciones por helmintos es la eosinofilia, la neutrofilia y los niveles elevados de IgE producida. Estos cambios se corresponden con una respuesta inmunitaria tipo Th2. Está claro que, en animales infestados con helmintos, la eosinofilia y la producción de IgE están controladas por las citoquinas IL-4 e IL-5 secretadas por las células Th2, las cuales desempeñan un papel crucial en la resistencia a la infestación (Fresno *et al.*, 2001). Las reacciones mediadas por la IgE, pueden ser vitales para recuperarse de las infestaciones, mientras que la resistencia en hospedadores vacunados depende de la producción de anticuerpos de los isotipos IgG e IgA (Fresno *et al.*, 2010).

TRATAMIENTO

El uso regular de fármacos que provocan la muerte del parásito forma parte de las medidas actuales de control. Dentro de los fármacos fasciolicidas se incluyen: closantel, nitroxinil, rafoxanide y clorsulón, y los compuestos benzimidazoles: triclabendazole (TCBZ) y albendazole

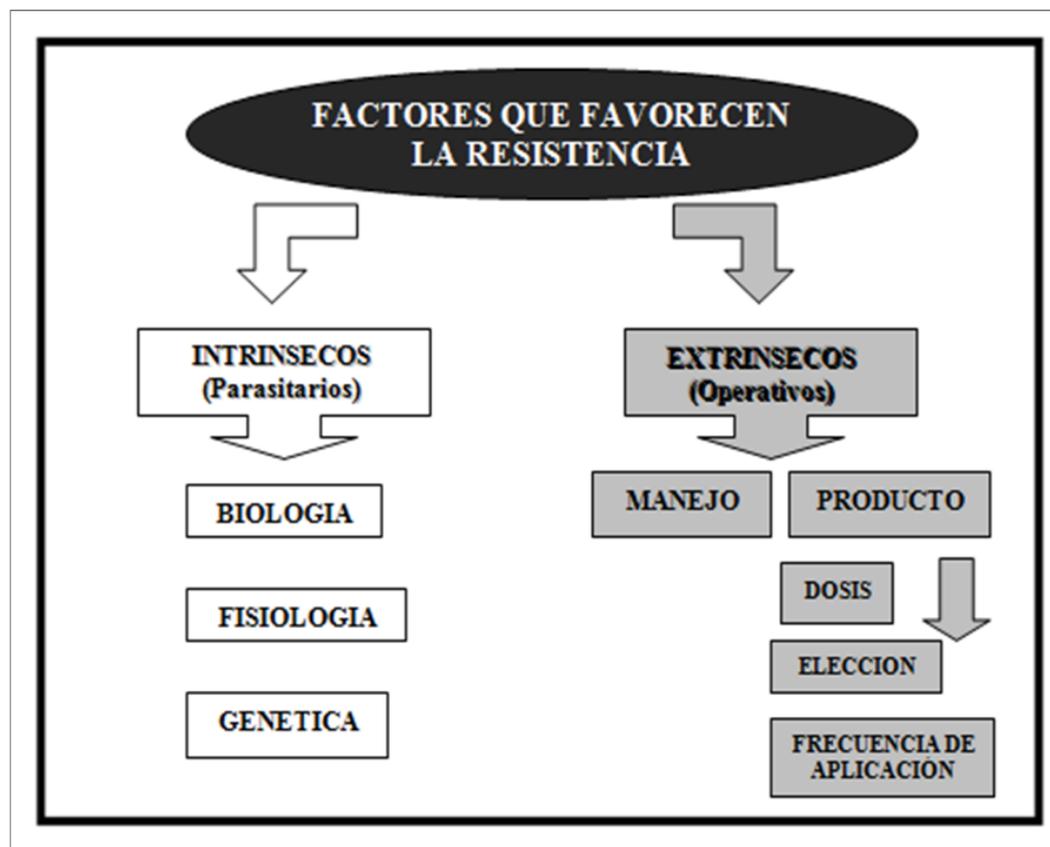
(ABZ). El TCBZ (benzimidazole halogenado) es el fasciolicida más utilizado dado que es el único eficaz contra estadios maduros e inmaduros del trematodo (Boray *et al.*, 1983) y ha mostrado eficacia en estudios realizados en ganado ovino (Maes *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1994; Ramisz *et al.*, 1997), caprino (Kinabo y Bogan, 1988; Martínez Moreno *et al.*, 1997a), vacuno (Suhardono *et al.*, 1991; Echevarría. *et al.*, 1990; Ibarra *et al.*, 2002) e incluso en la especie humana (Laird y Boray, 1992; Luz *et al.*, 1999). En zonas donde la enfermedad es endémica el tratamiento debe darse de forma ininterrumpida desde la primavera a fin del verano debido a que los fármacos permanecen activos en el organismo sólo durante uno o dos días, tras los cuales los animales pueden volver a infestarse al pastorear (Olaechea, 2004). El uso intensivo de fármacos para el control de *F. hepatica* ha ejercido una importante presión de selección, la cual determinó el desarrollo de resistencia a diferentes fármacos en aquellas regiones del mundo donde este parásito es endémico. Inicialmente, los casos de resistencia en *F. hepatica* reportados a nivel mundial estuvieron circunscriptos a TCBZ. La resistencia a TCBZ se ha reportado en regiones geográficas tan diferentes como España, Reino Unido, Australia, Perú, Holanda y Argentina (Sanabria *et al.*, 2013), la situación de resistencia a ABZ parece ser igual de compleja, con reportes en Perú (Canevari *et al.*, 2014), Uruguay (Canevari *et al.*, 2014), Tanzania (Nzalawahe *et al.*, 2015, resumen de la waavp 2015) y Suecia (Novobilský *et al.*, 2016). Además, cabe resaltar que, se han reportado casos humanos de fasciolosis en Holanda (Winkelhagen *et al.*, 2012), Chile (Gil *et al.*, 2014) y Perú (Ortiz P., comunicación personal), donde los trematodos implicados resultaron resistentes a TCBZ y/o albendazole. La gravedad de estos casos radica en el escaso número de principios activos disponibles en medicina humana para el tratamiento de *F. hepatica*.

Éste fenómeno sumado al costo que el tratamiento supone en los países en vías de desarrollo y el hecho de que la terapia química no reduce significativamente la transmisión en áreas endémicas (Henker *et al.*, 2017) debido a la reinfección, ha llevado a que las medidas llevadas a cabo para controlar la fasciolosis sean insatisfactorias. Por estos motivos, la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos o preventivos es necesaria y está altamente justificada.

FACTORES QUE CONDICIONAN LA APARICIÓN DE LA RESISTENCIA PARASITARIA

Los factores que condicionan la aparición de la resistencia parasitaria se han clasificado para su mejor comprensión en *factores intrínsecos*, aquellos que tienen que ver con la genética, la biología y la fisiología del parásito y *factores operativos*, a aquellos que de una u otra forma son controlados o dependen de la actividad del hombre, incluyendo el trabajo zootécnico y la elección

de los productos a emplear para los tratamientos antiparasitarios. La resistencia antihelmíntica como fenómeno depende para su establecimiento y desarrollo de una serie de eventos y factores que la condicionan y que pueden en algunos casos ser controlados por la acción del hombre y en otros no, aunque el conocimiento de estos permita tomar medidas adecuadas para evitar su aparición (Anziani *et al.*, 2000). Esta situación afecta sin lugar a dudas tanto la salud de los rodeos como la economía de pequeños y grandes productores, en consecuencia, representa también una problemática social ya que un gran número de familias en el mundo entero dependen de la crianza de su ganado. La evolución de la resistencia antihelmíntica está determinada por la extensión con la que los helmintos sobrevivientes al tratamiento contribuyen con sus genes a las generaciones futuras. Esta contribución está influenciada por la frecuencia y el tiempo de tratamiento, la eficacia de la droga, la fecundidad de los parásitos adultos, la tasa de larvas consumidas, la deposición de huevos, el manejo de las pasturas y de los animales y del clima (Dobson *et al.*, 1995).



En resumen, la secuencia de eventos sería la siguiente: 1) el material genético que confiere resistencia existe en una muy baja frecuencia en una población parasitaria (*estado de pre-existencia*), siendo la población mayoritariamente susceptible a la dosis recomendada de un determinado antihelmíntico, 2) tratamientos sucesivos con la misma droga o drogas con un mismo mecanismo de acción matan los genotipos susceptibles y sobreviven al tratamiento sólo los

nematodos resistentes que posean genotipos homocigota (**RR**) y quizás los heterocigota (**RS**), 3) los pocos helmintos que sobreviven están molecularmente capacitados para resistir el efecto de ese fármaco, lo cual es heredado de generación en generación aumentando la homocigosis (**RR**) y 4) la desaparición de los genotipos susceptibles lleva a que las próximas generaciones sean descendencia de la minoritaria población resistente, lo cual origina la resistencia (Scarcella, 2011). Las mayores tasas de resistencia antihelmíntica se presentan entre latitudes 10° y 30° Sur, comprendiendo parte de Argentina, Uruguay, Brasil, Paraguay, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda, donde se encuentran las mayores poblaciones de hospedadores que no desarrollan eficaces respuestas inmunitarias (cabras y ovejas) y las condiciones de manejo animal (los animales permanecen en pasturas permanentes a lo largo de todo el año) y climáticas (áreas tropicales /sub-tropicales húmedas) son favorables para la transmisión de la enfermedad parasitaria y la diseminación de las poblaciones resistentes (Waller, 1993; Prichard, 1994; Nari y Salles, 1996; Echevarría, 1996; Gimenez *et al.*, 1996; Waller y Echevarria, 1996) y a favor de los organismos resistentes por inhibir el desarrollo de los individuos susceptibles al fármaco (Pratt y Taylor, 1990). La característica más importante de la resistencia es su naturaleza genética, más que toxicológica o bioquímica, y los nematodos que poseen genes de resistencia son seleccionados por la presión ejercida por los antihelmínticos usados (presión de selección), reconociéndose que los genes resistentes existen en bajas frecuencias antes de ser usados los compuestos (Jackson *et al.*, 1992). La presión de selección es la capacidad de los antihelmínticos para elegir ciertos parásitos de una población y está determinada por la dosis del compuesto y por la población parasitaria expuesta a la droga. La presión de selección es alta cuando el tratamiento deja apenas algunos sobrevivientes y cuando hay pocos estados de vida libre que escapen a la exposición. Por el contrario, es baja cuando una gran proporción de la población de larvas no entra en contacto con compuestos químicos.

RESISTENCIA: TIPOS Y CLASIFICACIÓN

La resistencia puede clasificarse como: **1) Intrínseca o 2) Adquirida.**

1) Un ser vivo que es naturalmente insensible al efecto de una droga es **intrínsecamente resistente**. Este fenómeno puede deberse a la falta del receptor ó a que la droga no puede entrar a la célula y así llegar a su sitio de acción. Por ejemplo, los trematodos y cestodos son intrínsecamente resistentes a la acción de los fármacos endectocidas.

2) La **resistencia adquirida** se da cuando poblaciones que son inicialmente susceptibles a la acción de un fármaco, dejan de serlo tras la ocurrencia de cambios genéticos heredables de generación en generación. La resistencia adquirida es percibida cuando una droga que es inicialmente efectiva para un fin terapéutico determinado deja de serlo. Los mecanismos que operan estas modificaciones genéticas en resistencia adquirida son:

a) Por **Mutación**: el ADN de una célula susceptible sufre una alteración que induce modificaciones en la producción ó función normal de un determinado componente celular crucial para que la droga produzca su efecto farmacológico. La mutación va siempre acompañada de una **selección** hacia la población mutante ó resistente, entonces las generaciones próximas serán hijas de las resistentes.

b) Por **Amplificación Génica**: existe una multiplicación exagerada de ciertos genes que inducen a la célula a sintetizar cantidades elevadas de un producto celular normal, de relevancia en la acción de una droga, lo que las convierte en resistentes a concentraciones de dicha droga que son altamente efectivas bajo condiciones normales.

c) Por **Transferencia Génica**, una célula / microorganismo susceptible adquiere material genético de otro, que induce resistencia hacia el efecto de una droga ó grupo de drogas. Hay tres mecanismos básicos dentro de la transferencia génica en resistencia: *transformación, transducción y conjugación*.

Estas alteraciones moleculares representan las bases farmacológicas por el cual se genera el fenómeno de resistencia, pudiendo resumirse en:

1) Cambios celulares estructurales y/o funcionales que modifican la captación (*llegada*) de una droga al sitio de acción o incrementan su metabolismo/inactivación y/o eflujo celular, afectando la capacidad de la droga para acumularse intracelularmente.

2) Alteración de sistemas enzimáticos necesarios para que se produzca el efecto farmacológico de la droga.

3) Alteración de los receptores celulares por disminución en el número ó en su afinidad, lo cual afecta la unión del fármaco con su sitio de acción y, por lo tanto, su efecto farmacológico.

4) Variaciones en diferentes procesos celulares que compensan ó contrarrestan el efecto inducido por un fármaco.

MECANISMO DE ACCION y COMPORTAMIENTO FARMACOCINÉTICO DE LOS ANTIHELMÍNTICOS BENZIMIDAZOLES

Los antihelmínticos benzimidazoles (BZDs) desestabilizan el equilibrio tubulina-microtúbulo originando en el parásito una pérdida de la homeostasis celular, con el consecuente desprendimiento y muerte. Su mecanismo de acción depende de la presencia sostenida de la droga activa en contacto con su receptor intracelular, la β tubulina (Lacey, 1990; Lanusse *et al.*, 1993). La capacidad de unión de los BZD a tubulina de mamífero *in vitro* (Friedman y Platzer, 1978; Ireland., *et al.*, 1979) reafirma que su mecanismo de acción es por su efecto antimicrotúbulo, pero no responde al por qué de la naturaleza de la toxicidad selectiva de estas drogas y de la naturaleza precisa de su efecto *in vivo*. Al respecto, la inhibición de la reacción de tirosinación de α tubulina en cerebro de rata que se observa en presencia de ABZ (uno de los principales antihelmínticos benzimidazoles de amplio uso en medicina humana y veterinaria) sería debido al efecto sobre el estado de ensamblamiento alterando el equilibrio existente entre la forma polimerizada (microtúbulo) y la forma soluble (tubulina) (Solana *et al.*, 1998). Aportando en el mismo sentido, en nuestros laboratorios se demostraron en ratas, ciertos aspectos embriotóxicos del antihelmíntico benzimidazólico ABZ sulfóxido (ABZSO) manifestándose no sólo su toxicidad fetal sino también sus efectos a nivel placentario (Teruel *et al.*, 2003).

METABOLISMO DE LOS BZDs

- **Enzimas de la Fase I de detoxificación**

Es sabido que la actividad metabólica mediada por P450 es menos relevante en algunos helmintos, en comparación con mamíferos (Precious y Barrett, 1989). En consecuencia, las reacciones de fase I se llevarían a cabo fundamentalmente a través del sistema enzimático FMO (Douch y Buchanan, 1979). Utilizando ambas vías, *A. suum* (nematode), *F. hepatica* (trematode) y *M. expansa* (cestode) son capaces de biotransformar ABZ a ABZSO. El patrón metabólico de ABZ resultó de diferente magnitud dependiendo del parásito analizado pudiendo correlacionarse directamente dicho fenómeno con la eficacia farmacológica de este tipo de drogas frente a cada especie estudiada (Solana *et al.*, 2001). La eficacia antiparasitaria de todos los BZDs depende de la presencia de concentraciones tóxicas plasmáticas para el parásito. Dada la liposolubilidad de los compuestos BZDs metilcarbamatatos, un intenso proceso de biotransformación facilita su posterior

eliminación. Por esta razón, sólo muy bajas o ninguna concentración de droga madre es detectada en plasma (Marriner y Bogan, 1980; Hennessy *et al.*, 1989; Lanusse *et al.*, 1995). Desde el plasma los metabolitos se distribuyen a los diferentes compartimientos orgánicos. La distribución de los metabolitos desde el plasma hacia el tracto gastrointestinal (TGI) es relevante para el efecto antihelmíntico frente a parásitos localizados a nivel de las mucosas GI (Hennessy *et al.*, 1993). Por otro lado, los BZDs también se distribuyen desde el plasma hacia otros tejidos, como el parénquima pulmonar, hígado y conductos biliares (Alvarez *et al.*, 1999; Cristófol *et al.*, 2001), sitios de localización de parásitos como *Dictyocaulus filaria* y *F. hepatica*, respectivamente. ABZ y FBZ son moléculas de elevada liposolubilidad. En consecuencia, ambos antihelmínticos experimentan un intenso metabolismo. El hígado es el principal sitio de biotransformación para los antihelmínticos BZDs (Juskevich, 1987). En el metabolismo de los BZDs participan los sistemas de oxidasas microsomales de función mixta, fundamentalmente por reacciones de sulfoxidación e hidroxilación en la posición 5- del anillo benzimidazólico, originando compuestos más polares que las drogas madres. El proceso inicial de oxidación es seguido rápidamente por reacciones de hidroxilación como paso previo a la conjugación. Los metabolitos hidroxilados formados pueden ser conjugados con ácido glucurónico y sulfatos (Hennessy, 1985). La hidrólisis del grupo metil carbamato da origen al metabolito 2-aminosulfona. Los sistemas enzimáticos FMO y citocromo P-450 participan en la biotransformación de ambas moléculas. El sistema FMO es responsable de la oxidación de ABZ a nivel del átomo de azufre (sulfoxidación) (Galtier *et al.*, 1986), que da origen a ABZSO. Una segunda oxidación a cargo del sistema citocromo P-450, produce ABZSO₂ a partir de ABZSO (Souhaili-El Amri *et al.*, 1987). En la oxidación inicial de ABZ participa también el sistema citocromo P-450 (Souhaili-El Amri *et al.*, 1987). Mientras que el metabolito sulfóxido posee actividad farmacológica, ABZSO₂ es un metabolito inactivo (Lacey, 1988; Lubega y Prichard, 1991). FBZ es biotransformado en su metabolito activo OFZ mediante sulfoxidación (Gottschall *et al.*, 1990) que a su vez puede ser convertido en el metabolito inactivo FBZSO₂. ABZ y OFZ son potentes agentes inductores de la isoenzima citocromo P 450 1A2 que participa en la formación de los metabolitos inactivos ABZSO₂ y FBZSO₂ (Souhaili-El Amri *et al.*, 1988; Gleizes *et al.*, 1991).

La mayoría de los estudios sobre la respuesta metabólica de *F hepatica* frente al antihelmíntico TCBZ sólo se han referido a modelos de prueba *in vitro* o *ex vivo*. El aumento de la actividad de enzimas tales como Flavin Monooxigenasa (XME fase I) y GST (XME fase II) en trematodos resistentes a TCBZ (cepas *Sligo* y *Oberon*) proporciona un interesante aporte a la comprensión del fenómeno de resistencia que dichos helmintos poseen. Esta sobreexpresión confirma dicha manifestación en una respuesta multienzimática que implica más de una vía metabólica (Scarcella *et al.*, 2011).

- **Enzimas de la Fase II de detoxificación**

Las GSTs abarcan una familia de isoenzimas implicadas en la detoxificación celular de una amplia gama de sustratos químicos a través de la conjugación con el glutatión, de manera que el xenobiótico se vuelve generalmente menos tóxico y más soluble en agua siendo así más fácil su excreción. En mamíferos se conocen siete clases de GSTs diméricas (alfa, mu, pi, theta, sigma y kappa) compuestas por subunidades de 24 a 29 kDa que comparten un alto porcentaje en sus secuencias de aminoácidos (aproximadamente 70%).

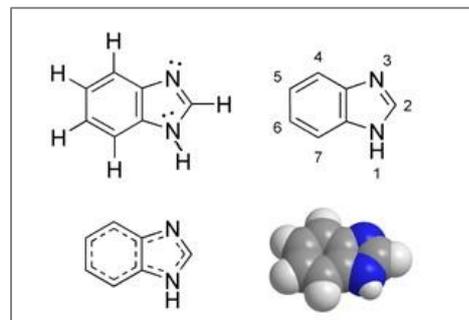
La enzima GST representa el 4 % de la proteína soluble total distribuida en varios tejidos de *F. hepática* y con importantes funciones fisiológicas. En este parásito están presentes ocho isoenzimas de la enzima GST correspondientes a GST unido a la membrana (mGST) la cual es una proteína homotrimérica que es estructuralmente e inmunológicamente distinta de la GST citosólica (cGST) y se clasifica por separado por lo tanto la GST unida a la membrana difiere de los cGSTs ya que puede activar reactivos bisulfídrico, tales como N - etilmaleimida; esta propiedad es importante para establecer que no está contaminada con GST citosólicas. La mayoría de los estudios *in vitro* o *ex vivo* sobre la respuesta metabólica de *F. hepática* frente al antihelmíntico TCBZ han demostrado una disminución significativa en la actividad Superóxido Dismutasa y un aumento en el nivel de GST en ambos trematodos juveniles y adultos después de la incubación con TCBZ sulfóxido.

En *F. hepática* la GST es identificada como FhGST y desempeña al menos tres funciones conocidas: I) está involucrada en la desintoxicación de aldehídos citotóxicos producidos durante la peroxidación lipídica, II) está implicada en la función absortiva del intestino del parásito adulto y III) interactúa con la hematina previniendo el bloqueo del intestino del parásito por cristalización de la misma (Brophy, 1990). En *F. hepática* están presentes siete isoenzimas de la proteína GST (Mannervik *et al.*, 1987).

RESISTENCIA A LOS ANTIHELMÍNTICOS BENZIMIDAZOLES

Resistencia en nematodos

La información que existe sobre la bioquímica de la resistencia a los antihelmínticos se refiere a los BZDs. Se conoce que el mecanismo de resistencia en nemátodos se basa en una alteración en la interacción tubulina benzimidazol. El mecanismo de resistencia a los BZDs parece ser común a muchas especies, desde hongos a nematodos, e involucra alteraciones en las isoformas de β tubulina, pero no en las isoformas de α tubulina. La



resistencia ocurre cuando los genes que codifican para β tubulina sufren mutaciones, lo cual causa la pérdida del receptor de alta afinidad por la molécula de BZDs (Lanusse *et al.*, 2001). Los primeros estudios sobre la manifestación del fenómeno de resistencia a los diferentes BZDs indican que los microtúbulos de ciertas cepas de helmintos nematodos resistentes son capaces de mantenerse polimerizados en presencia de concentraciones de droga que despolimerizan los microtúbulos de una cepa susceptible (Lacey, 1988). En ensayos *in vitro* utilizando preparaciones de tubulina parcialmente purificada de parásitos susceptibles y resistentes se cuantificó la unión de BZD- H^3 demostrándose una más baja afinidad de unión en la cepa resistente, similar a la obtenida en la unión a la tubulina del hospedador (Lacey, 1988). Un estudio interesante realizado con clones de *Caenorabditis elegans* resistente o no a BZDs reveló la existencia de un gen β tubulina (*gen ben-1*) que codifica una β tubulina susceptible a la acción de los BZDs. Se observó que, en algunos mutantes resistentes, este gen no se encuentra y/o no se expresa claramente. Los autores sugieren que si el fenómeno de la resistencia a los BZDs en los nemátodos fuera similar al del *C. elegans*, el proceso de selección resultaría en una población en que la mayoría de los individuos tendrían suprimido el gen para la tubulina susceptible (Jackson, 1993). Posteriormente, Prichard (1994) demostró que la resistencia a los BZDs en nemátodos está asociada a una alteración que ocurre en algunos de los genes que codifican para β -tubulina, los cuales reducen o impiden la alta afinidad de los BZDs a la tubulina en estos organismos. Es decir, la resistencia ocurre cuando los genes que codifican para β -tubulina sufren mutaciones, causando la pérdida del receptor de alta afinidad por los BZDs. Ya se han iniciado los estudios de la caracterización molecular de la β -tubulina proveniente de poblaciones de helmintos resistentes y susceptibles a los BZDs. Se ha clonado el gen que codifica para β -tubulina de una librería genómica construida

desde una población resistente y este gen fue usado como probe (sonda) para comparar las dos cepas. Mientras que para las cepas susceptibles se observó un extensivo polimorfismo de 5-10 bandas, la población resistente solamente mostró una única banda indicando selección para ese fragmento específico. En posteriores estudios *in vitro* se demostró que ese fragmento también está presente en las cepas susceptibles aunque en baja concentración indicando esto que la expresión del fenómeno de resistencia es recesiva (Roos *et al.*, 1990,1991).

Resistencia a BZDs por parte de los trematodes

En general, los mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencia antihelmíntica son principalmente el resultado de cambios conformacionales de la molécula blanco, y/o variaciones en los mecanismos de captación y eflujo de drogas y/o variaciones en su metabolismo ante un xenobiótico (Ouellette, 2001). Recientemente se ha comenzado a avanzar en el entendimiento del fenómeno de resistencia a ciertos antihelmínticos benzimidazólicos a partir del aislamiento en *F. hepatica* de una cepa resistente a TCBZ (TCBZ-R). La cepa *Sligo*, ha demostrado en estudios realizados *in vivo* e *in vitro* ser TCBZ-R en adultos y juveniles (Coles y Stafford, 2001), (Kerboeufb *et al.*, 2003). Aunque en el caso de otros helmintos la resistencia a ciertos BZDs se explica por la sustitución de tirosina por fenilalanina en la posición 167 o 200 de la β -tubulina del parásito (Kwa *et al.*, 1994; Fairweather *et al.*, 2004), es posible que la resistencia a TCBZ manifestada por la cepa *Sligo* (TCBZ-R) de *F. hepatica* sea generada por un mecanismo diferente, ya que al comparar la secuencia de la β -tubulina de las fasciolas resistentes con aquellas TCBZ-S (cepa *Cullompton*) la secuencia de aminoácidos en la posición implicada es idéntica (Fairweather *et al.*, 2007). En estudios *in vitro* se ha determinado que la entrada de TCBZ al interior del trematodo ocurre fundamentalmente por difusión vía tegumento más que por ingestión oral (Álvarez *et al.*, 2006). Hoy se sabe que dicha difusión es significativamente menor en la cepa *Sligo* (TCBZ-R) que en la cepa *Cullompton* (TCBZ-S) (Álvarez *et al.*, 2005); (Álvarez *et al.*, 2006). Interesantemente esto no se manifiesta para todos los BZDs ya que la captación de ABZ y/o sus metabolitos no manifiesta diferencias entre ambas cepas (Álvarez *et al.*, 2006) sugiriendo que en el caso de la captación de TCBZ podrían estar involucradas las bombas de eflujo (v.g. pg-P). La sobreexpresión de la pg-P ya se ha relacionado a fenómenos de resistencia antihelmíntica en otras especies de parásitos (Kerboeufb *et al.*, 2003; Fairweather *et al.*, 2004) y ya se ha demostrado su probable reversión co-incubando con inhibidores de dicha vía (Ivermectina) (Álvarez *et al.*, 2006). En contraste, mientras la Ivermectina no impacta en la captación de ABZ, la co-incubación con Verapamil (inhibidor pg-P) conduce a severas rupturas del tegumento en TCBZ-R comparables a

las obtenidas en cepas TCBZ-S expuestas a TCBZ.SO (Stitt y Fairweather, 1992). Los resultados obtenidos a la fecha siguen siendo inconclusos afianzándose el mayor involucramiento de la probable manifestación de resistencia a los BZDs dado por el metabolismo exacerbado en la sulfoxidación de TCBZ a sus metabolitos sulfóxido y sulfona (TCBZ.SO y TCBZ.SO₂) (Álvarez *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2004). Con el uso de inhibidores metabólicos se ha demostrado que el sistema FMO es la principal vía de metabolización de TCBZ y que su co-incubación impacta más sobre la metabolización de la cepa *Sligo* (TCBZ-R) (Álvarez *et al.*, 2005).

Actualmente se hace necesario aportar mayores conocimientos referidos al estudio de la verdadera participación de las vías enzimáticas de detoxificación de Fase I y Fase II involucradas.

La aparición de resistencia hacia las drogas existentes en el mercado hace que el desarrollo de una vacuna eficaz sea una necesidad que tiene un amplio consenso en la comunidad científica. Las vacunas tienen a su favor el hecho de no dejar residuos químicos eliminando así el periodo de retención del animal, no dañan al medio ambiente y serían aceptadas por los consumidores quienes ya están familiarizados para otras patologías con el concepto de vacunación en la medicina humana y veterinaria (Dalton y Mulcahy, 2001).

LAS VACUNAS COMO ALTERNATIVA PREVENTIVA CONTRA LA FASCIOSIS

En la actualidad no hay disponibles vacunas comerciales contra *F. hepatica*, principalmente debido a la alta capacidad moduladora de este parásito. Sin embargo, la búsqueda de antígenos vacunales y de distintas estrategias que protejan contra *F. hepatica* ha comenzado su desarrollo desde el año 1987. En rumiantes se utilizaron extractos somáticos crudos del parásito, mezclas de proteínas secretadas por el parásito o parásitos atenuados por irradiación (Haroun y Hillyer, 1986). Posteriormente, ha surgido información sobre la identificación y caracterización de distintas proteínas de *F. hepatica*.

Se han llevado a cabo estudios con vacunas basadas en proteínas recombinantes o en ADN plasmídico, algunas de las cuales han sido empleadas en ensayos de vacunación con resultados dispares aunque en algunos casos alentadores (Dalton *et al.*, 2003; Hillyer *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2006; Zafra, 2007; Espino *et al.*, 2010; Mota Sanchez, 2009; Jayaraj *et al.*, 2012; Wesółowska *et al.*, 2016).

RESPUESTA INMUNITARIA ESPECÍFICA A LA FASCIOSIS

En general está ampliamente aceptado que la infestación por *F. hepatica* en rumiantes muestra una *down-regulation* de la expresión IFN- γ y una *up-regulation* de la expresión de IL-4, sugiriendo una respuesta predominante Th2, como la mayoría de los helmintos (Mulcahy *et al.*, 1999; Waldvogel *et al.*, 2004; Haçariz *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2013). Así, diversos estudios han demostrado que en bovinos tanto la IgE (Bossaert *et al.*, 2000a) como los eosinófilos y las células cebadas (Bossaert *et al.*, 2000b), juegan un papel muy importante en la respuesta inmunitaria que tiene lugar en el hígado de los animales infestados con *F. hepatica*.

Se ha postulado la posibilidad de que el parásito polarice la respuesta del hospedador hacia una respuesta Th2 con el objetivo de evadir la respuesta Th1, la cual podría resultarle más dañina para el mismo (Maizels *et al.*, 1998; Maizels *et al.*, 2014). Esta modulación de la respuesta inmunitaria por el parásito le permitiría sobrevivir en el hospedador (Mulcahy *et al.*, 1999). Así, por ejemplo, el isotipo de anticuerpo dominante en terneros, ovejas y ratas en las infestaciones crónicas es la IgG1 (O'Neill *et al.*, 2000), aunque también se ha detectado IgE en estas especies (perfil tipo Th2).

En cuanto a la respuesta temprana frente a la fasciolosis, un estudio realizado en ganado vacuno por Clery *et al.* (1998), concluyó que la infestación con *F. hepatica* indujo la proliferación de linfocitos con una rápida producción de IFN- γ , lo que indica que se desarrolla un patrón Th1 en las fases iniciales del proceso. Si extrapolamos la dicotomía Th1/Th2 que tiene lugar en ratones (Pearce *et al.*, 1991; Pearce y Sher, 1991), la detección de IFN- γ en las primeras fases de la infestación y su ausencia en infestaciones crónicas, demostraría que la respuesta inmunitaria se polarizaría en función del curso de la infestación, permitiendo la supervivencia del parásito durante las fases crónicas de la enfermedad (O'Neill *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios similares realizados en ratas por Cervi *et al.* (2001) mostraron un incremento simultáneo en los niveles de IFN- γ (respuesta Th1) y de IL-4 e IL-10 (respuesta Th2) en el bazo a los 7 días post-infestación. En el caso particular de las reinfestaciones y en infestaciones crónicas, Bossaert *et al.* (2000b) constataron que bovinos reinfestados con *F. hepatica* desarrollaban una respuesta inmunitaria que no era protectora. Dicha respuesta de tipo Th2, sin un aumento en la producción de IFN- γ ni el desarrollo de una hipersensibilidad retardada, coincidiría con los resultados de investigaciones previas (Clery *et al.*, 1996).

Estudios más recientes se han centrado en el estudio de las citoquinas reguladoras y las células T reguladoras (Tregs). En varios modelos de infestaciones parasitarias se ha confirmado la participación de diferentes tipos de citoquinas y Tregs, como p.ej IL-10 y TGF- β (Doetze *et al.*, 2000) y células FoxP3+ Tregs (Belkaid *et al.*, 2006). Estas citoquinas y tipos celulares modulan el sistema inmune del hospedador y conllevan la creación de una respuesta inmunopatológica, demostrándose por ejemplo que la IL-10 ejerce una acción inmunoreguladora durante las infestaciones parasitarias, inhibiendo la respuesta inmunitaria (tanto Th1 como Th2) (Belkaid., 2012). La IL-10 también es capaz de evitar la eliminación del parásito y la producción de óxido nítrico (NO) por parte de macrófagos activados vía IFN- γ (Gazzinelli *et al.*, 1992). En terneros infestados con *F. hepatica* se ha observado que la IL-10 induce una disminución en los niveles de IFN- γ (Flynn *et al.*, 2008). Por otro lado, el TGF- β es capaz de provocar una inmunosupresión durante los procesos parasitarios (Belkaid *et al.*, 2006), induciendo una disminución de los niveles de IL-4 en terneros parasitados con *F. hepatica* (Flynn *et al.*, 2008). Por otra parte, diferentes trabajos demuestran la actividad inmunomoduladora de distintas glicoproteínas de *Fasciola* sobre la activación y función de las células dendríticas (CD) suprimiendo respuestas Th1 y Th17. (Walsh *et al.*, 2009).

EVASION DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

Al igual que otros helmintos, *F. hepatica* puede sobrevivir en sus hospedadores durante varios años. Por lo tanto, cabe pensar que las fasciolas poseen algún mecanismo para evitar el ataque del sistema inmunitario del hospedador. El destino final de los parásitos son los conductos biliares, que constituyen una zona inmunológica segura, pero previamente migran por otras localizaciones anatómicas donde el sistema inmunitario es muy activo, como la pared intestinal, peritoneo y parénquima hepático (Mulcahy *et al.*, 2005). Para evadir la respuesta del hospedador durante esta fase migratoria, *F. hepatica* despliega una serie de mecanismos:

1. LOCALIZACIÓN FINAL DEL PARÁSITO. Tanto los antígenos como los huevos liberados por los parásitos adultos llegan al intestino a través de conductos biliares y colédoco junto a la bilis, lo cual limita en gran parte la respuesta inmunitaria que deberían inducir. Por este motivo, los niveles de anticuerpos inducidos en ratones, ratas, ovejas y vacas infestados con fasciolas descienden una vez que el parásito penetra dentro de los conductos biliares (Hanna, 1980a; Meeusen y Brandon, 1994; Clery *et al.*, 1996).

Por otra parte, los niveles de inmunoglobulinas en los conductos biliares de vacas infestadas son doce veces menores que los determinados en sangre, predominando la IgA, lo que confirma la escasa actividad inmunológica a este nivel (Hughes *et al.*, 1981).

2. GLUCOCÁLIX. Es lógico asumir que la mayoría de las interacciones entre el parásito y el hospedador tendrán lugar en la superficie parasitaria, la cual va a desarrollar un papel importante en la protección contra el sistema inmunitario (Mulcahy *et al.*, 1999). No existe evidencia de que el parásito absorba macromoléculas del hospedador en su superficie para enmascararse como sucede en otros parásitos, por ejemplo, *Schistosoma spp* (Mulcahy *et al.*, 1999). El tegumento de *F. hepatica* es una membrana simple cubierta por un espeso glucocáliz polianiónico de unos 40 nm, compuesto por glucoproteínas que proyectan cadenas de oligosacáridos y gangliósidos terminados en ácido siálico (Moreno Pérez, 2015). El glucocáliz superficial de *F. hepatica* puede contribuir a la evasión inmune a través de cambios en la composición durante el desarrollo del parásito en el hospedador, lo que hace que el sistema inmunitario deba luchar contra un “blanco variable” (Hanna, 1980 a, b). El glucocáliz se encuentra en un proceso continuo de muda y es reemplazado por vesículas secretoras del parásito, así se ha observado que, en las formas inmaduras del parásito, el cambio total del glucocáliz puede permanecer sólo durante 3 horas (Hanna, 1980 b, c). Todo lo mencionado evita que los neutrófilos y eosinófilos puedan establecer un contacto estrecho y suficientemente duradero con el parásito para permitir su desgranulación y destrucción, ya que se desprenden junto al glucocáliz, además, la liberación de productos de desecho del glucocáliz puede crear un flujo circulatorio que dificulta la acción de los anticuerpos en una reacción inmunitaria potencialmente letal (Duffus y Franks, 1980; Hanna, 1980b).

3. EVASIÓN DE LA ACCIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO. Si bien existen trabajos que afirman que las larvas recién desenquistadas de *F. hepatica* son *per se* muy sensibles a la acción del sistema del complemento (Moreno Pérez, 2015), la unión del factor (C3b) del complemento a la superficie de las mismas no se ha podido demostrar (Moreno Pérez, 2015). Dicha observación podría explicarse por la presencia de ácido siálico terminal en componentes del glucocáliz, el cual sería capaz de evitar la activación del complemento por la vía alternativa (Baeza *et al.*, 1994).

4. CAMBIOS ANTIGÉNICOS DURANTE LA MIGRACIÓN PARASITARIA. Los anticuerpos desarrollados en linfonódulos mesentéricos son diferentes a los gastrohepáticos y a los del bazo, presentando diferentes patrones de reacción frente a diferentes antígenos. Igualmente, se observan distintos isotipos de anticuerpos frente al mismo antígeno. La producción de IgE es mucho mayor en los linfonódulos hepáticos que en los mesentéricos o

en el bazo. Por el contrario, la producción de IgA es mayor en los linfonódulos mesentéricos que en los gastrohepáticos o en los del bazo (Moreno Pérez, 2015). Estos hallazgos sugieren una particular regulación de las citoquinas secretadas por los LT en diferentes órganos. Algunos autores postulan que esta variación en el tipo de respuesta inmunitaria provocaría una respuesta menos efectiva comparada a la obtenida mediante un único mecanismo defensivo (Meeusen y Brandon, 1994).

5. CAPACIDAD MIGRATORIA A TRAVÉS DEL PARÉNQUIMA HEPÁTICO. Los túneles migratorios del parénquima hepático de ovinos primoinfestados con *F. hepatica* aparecen rodeados por granulocitos (eosinófilos y neutrófilos), macrófagos, y linfocitos T (LT) y B (LB) (Meeusen *et al.*, 1995). Sin embargo, mientras los parásitos jóvenes se hallan presentes en esos túneles, no se observa infiltración linfocitaria rodeándolos. En estadios posteriores el infiltrado celular se incrementa, pero sólo se observa junto a los espacios porta y zonas lesionadas, y no rodeando a las fasciolas. De esta forma, los parásitos tendrían la suficiente motilidad como para “dejar atrás” al infiltrado inflamatorio. Además, mientras los parásitos atraviesan el hígado sin obstáculos, los leucocitos tienen que abandonar los capilares sanguíneos del espacio porta y atravesar el tejido intersticial hasta llegar a los túneles en los que se encuentra el helminto (Meeusen *et al.*, 1995).

En el caso de las reinfestaciones, los parásitos podrían avanzar más rápidamente al evitar zonas previamente lesionadas y únicamente migrar por zonas sanas, lo cual explicaría que en sucesivas reinfestaciones los parásitos migren más rápidamente que en las primoinfestaciones (Meeusen *et al.*, 1995).

6. EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA POR PARTE DE LAS FORMAS INMADURAS. Es de suponer que las formas juveniles de *F. hepatica* posean algún mecanismo directo para evitar o inactivar el ataque de las células efectoras del sistema inmunitario durante su migración a través del intestino y peritoneo. Como ejemplo de respuesta inmunitaria contra estas formas deben mencionarse la acción de los radicales superóxido producidos por los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, o radicales oxígenos libres producidos por estos últimos (Moreno Pérez, 2015). Además, se ha concluido que uno de los factores que interviene en la distinción entre especie susceptible-resistente es la capacidad del sistema inmune de detener el paso de las fasciolas recientemente desenquistadas (NEJs) a nivel peritoneal (Smith *et al.*, 1992).

De acuerdo con la bibliografía, podría decirse que la evasión de la respuesta inmune por parte de estas formas juveniles del parásito se basa en dos mecanismos:

La gran resistencia que presentan las formas juveniles de *F. hepatica* a la destrucción por los compuestos de oxígeno liberados por los granulocitos y macrófagos (Doy *et al.*, 1980; Duffus *et al.*, 1980; Doy *et al.*, 1982; Glauert *et al.*, 1985; Piedrafita *et al.*, 2000). Podría estar basada en la acción de determinadas enzimas como la Superóxido Dismutasa (SOD), la Glutación Peroxidasa o la GST presentes en el producto de excreción-secreción del parásito (FhES) (Piedrafita *et al.*, 2000). Otros compuestos presentes en dicho FhES también han demostrado capacidad para impedir la liberación de sustancias activas y fagocitosis por parte de los polimorfonucleares neutrófilos (Poitoy *et al.*, 1993), así como para alterar la capacidad procesadora y presentadora de los macrófagos (Masih *et al.*, 1996). Recientemente se ha descubierto la importancia de un antioxidante de la familia de la peroxirredoxina, denominado tiorredoxina peroxidasa (Donnelly *et al.*, 2005).

Por otra parte, durante la migración transperitoneal se observa un precoz incremento de IFN- γ en el bazo, el cual podría estimular la activación de los macrófagos peritoneales y su producción de óxido nítrico NO (respuesta Th1), favoreciendo la destrucción de larvas migrantes. Sin embargo, se produce igualmente un incremento de IL-10, citoquina típica de respuestas inmunoregulatoras, la cual podría ser capaz de inhibir la producción de estos compuestos nitrogenados por parte de los macrófagos activados por IFN- γ así como la capacidad fagocítica de estas poblaciones mononucleares (Gazzinelli *et al.*, 1992). La hipótesis actual sostiene que determinados compuestos del FhES serían capaces de activar de manera alternativa los macrófagos, evitando así una respuesta eficaz de los mismos y, muy especialmente, la producción de NO (Flynn *et al.*, 2007). Así, la tiorredoxina peroxidasa presente en el FhES es capaz de activar alternativamente estos macrófagos, produciendo igualmente altos niveles de IL-10, característica de la respuesta tipo Th2 (Donnelly *et al.*, 2005). Khaznadji *et al.* (2005) demostraron que las NEJs de *F. hepatica* producen una sustancia (cistatina) la cual induce liberación de IL-10 con efectos antiinflamatorios e inhibición de la proliferación celular, favoreciendo la supervivencia de los parásitos (Hartmann *et al.*, 2003).

En cuanto a la importancia relativa de cada célula efectora contra las NEJs, Van Milligen *et al.* (1999), demostraron que la protección estaba correlacionada con el número de eosinófilos y células productoras de IgE a nivel gástrico pero la correlación sólo era moderada respecto a los leucocitos. De igual forma, la protección se relacionó con el nivel sérico de anticuerpos IgG1 pero no con los niveles de IgA o IgE.

7. LIBERACIÓN DE SUSTANCIAS CON ACCIÓN DIRECTA SOBRE EL SISTEMA INMUNE. Chauvin y Boulard, (1996) constataron que los LT sólo aparecían en la periferia

de las zonas de infiltración leucocitaria y propusieron que *F. hepatica* deprimiría la inflamación local a nivel hepático y la respuesta inmunitaria para facilitar su paso a través del parénquima.

Otros trabajos afirman que los mecanismos por lo que *F. hepatica* evade la respuesta inmunitaria del hospedador incluyen la liberación de sustancias linfotóxicas por parte de los estadios adultos (Goose, 1978), enzimas bloqueadoras de anticuerpos (como las catepsinas B y L) que separan las fracciones Fab y Fc de las inmunoglobulinas (Chapman y Mitchell, 1982; Carmona *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1993) o sustancias capaces de inhibir la quimiotaxis de leucocitos y la proliferación celular (Smith *et al.*, 1993; Meeusen *et al.*, 1995; Cervi *et al.*, 1996). Como resultado de la liberación de todas estas sustancias, las fasciolas se encuentran en hígados en los que hay una gran respuesta inmunitaria de tipo celular pero no sufren daño alguno (Smith *et al.*, 1993; Meeusen *et al.*, 1995).

Entre las sustancias con importancia en estos efectos directos sobre las células efectoras existe un inhibidor de proteinasa sérica tipo Kunitz (Fh-KTM) que se expresa en el intestino, el parénquima y el tegumento del parásito adulto y que puede inhibir la actividad de las elastasas producidas por neutrófilos e interferir con la producción de citoquinas por parte de los linfocitos (Martínez-Moreno *et al.*, 2000). Igualmente, algunos autores han comprobado que en infestaciones por *F. hepatica* existe un fallo en la respuesta oxidativa durante la fagocitosis de bacterias por parte de los polimorfonucleares neutrófilos, lo cual podría ser consecuencia de los productos liberados por el parásito o bien por la respuesta inmunitaria atípica (Martínez-Moreno *et al.*, 2000).

Otras proteinasas parasitarias del tipo de las cisteín-proteasas (catepsinas B y/o L) parecerían ejercer un efecto más importante, ya que podrían modular la respuesta inmunitaria al eliminar receptores para la IgE en LB, eosinófilos, CD, neutrófilos, macrófagos y plaquetas (Berasain *et al.*, 2000). También se ha demostrado que las catepsinas son capaces de cortar las inmunoglobulinas del hospedador, al separar las regiones Fab de la Fc (Berasain *et al.*, 2000).

Igualmente se ha constatado que, al incubar linfocitos con (FhES o con catepsinas L recombinantes, se produce una disminución en la expresión del receptor CD4 o una ruptura del co-receptor en la superficie de los LT (Prowse *et al.*, 2002). El CD4 actúa como co-receptor con el CD3 en el reconocimiento antigénico por parte de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (mMHCII) imprescindible para la activación y desarrollo de los LTh. Por lo tanto, este efecto sobre el receptor CD4 evitaría la proliferación

linfocitaria y ayudaría a la evasión de la respuesta inmunitaria de manera semejante a lo que sucede con *Leishmania spp.* o *Legionella spp* (Prowse *et al.*, 2002).

Esta inmunomodulación parasitaria producida por *F. hepatica* no ocurre sólo a nivel linfocitario. Se ha demostrado que la interacción entre el parásito y las células del sistema inmune innato como macrófagos y células dendríticas (vía receptores *Toll-like*) sería el primer paso en dicho efecto inmunomodulador (Flynn *et al.*, 2007; Flynn *et al.*, 2008).

También se ha descrito la presencia de eosinófilos con características típicas de células en apoptosis en hígados de ratas infectadas con *F. hepatica* (Martínez-Moreno *et al.*, 2000). En ensayos *in vitro*, se ha demostrado que el FhES es capaz de inducir la apoptosis temprana en eosinófilos mediante un mecanismo dependiente de las caspasas (Serradell *et al.*, 2007), siendo ésta una nueva estrategia del parásito para evitar el efecto temprano de la respuesta inmunitaria. Este fenómeno ha sido demostrado también *in vivo*, comprobándose que es dependiente de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Martínez-Moreno *et al.*, 2000).

ADYUVANTES EN LA FORMULACIÓN DE VACUNAS SUBCELULARES

Las proteínas purificadas y péptidos que actualmente se investigan como candidatos vacunales son pobremente inmunogénicos *per se*, de ahí la necesidad de formularlas en adyuvantes.

La función de los adyuvantes es potenciar la respuesta inmunitaria específica frente a los antígenos vacunales y polarizar selectivamente los diferentes componentes de la respuesta inmunitaria hacia la producción de determinados isotipos de anticuerpos o hacia una respuesta mediada por células (Zafra *et al.*, 2012).

Un problema que puede ocasionar el uso de adyuvantes es el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad que pueden dar como resultados pérdidas por decomiso. Estas reacciones pueden ser exacerbadas e incluso comprometer la salud del animal receptor de la vacuna. En la actualidad se tiende al uso de adyuvantes seguros tale como el hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Zafra *et al.*, 2012).

Los mecanismos de acción moleculares de diferentes adyuvantes permanecen aún desconocidos, sin embargo, está ampliamente aceptado que los adyuvantes favorecen la respuesta inmunitaria al antígeno mediante diferentes procesos. Algunos de ellos son:

- A) La liberación lenta del antígeno: estimula y desarrolla una respuesta inmunitaria más persistente y eficaz (Freund *et al.*, 1956; Allison *et al.*, 1986).
- B) La atracción de células mononucleares al punto de vacunación dando lugar a la formación de un granuloma, provocando igualmente una proliferación linfoide en los linfonódulos que drenan la zona, favoreciendo así la interacción entre el antígeno y las células presentadoras de antígenos (Zafra *et al.*, 2012).
- C) La activación del complemento a través de la atracción de los monocitos y su posterior activación, facilitando el depósito de antígenos a nivel de las células dendríticas foliculares de los nódulos linfáticos regionales, las cuales presentan receptores para factores del sistema del complemento, como lo hace el hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) (Rimaniol *et al.*, 2007).
- D) El efecto directo sobre los macrófagos, LT o LB. Por ejemplo, la liberación de IL-1 por parte de cultivos de macrófagos *in vitro* (Golden *et al.*, 2010).
- E) La estimulación de receptores TLR u otros receptores de la inmunidad innata o bien la generación de citólisis con liberación de moléculas endógenas (DAMP, del inglés: *Danger-Associated Molecular Patterns*) que también se unen a estos receptores y activan las CPAs (Batista-Duarte *et al.*, 2014).

Entre los adyuvantes más frecuentemente utilizados para la formulación de vacunas contra helmintos se pueden mencionar: el adyuvante de Freund completo (AFC), adyuvante de Freund incompleto (AFI), Al(OH)₃ (Bomford *et al.*, 1989), adyuvante RIBI, adyuvantes del tipo de saponinas (Quil A) y Montanide ISA 70, entre otros (Golden *et al.*, 2010).

ASPECTOS GENERALES EN INMUNOPROFILAXIS CONTRA LA FASCIOSIS

El desarrollo de vacunas preventivas es un área de interés creciente. Como ya se mencionó previamente, los distintos intentos de desarrollo han tenido resultados muy dispares (Espino *et al.*, 2010). Las vacunas irradiadas atenuadas han sido una de las estrategias que se han empleado contra la fasciolosis. La protección inducida con estas vacunas tuvo éxito en bovinos, aunque los resultados fueron variables según el protocolo de inmunización empleado. En efecto, los niveles de protección oscilaron entre el 30 y el 85,5% de reducción en la carga parasitaria (Dargie *et al.*, 1974; Nansen *et al.*, 1975; Acosta *et al.*, 1989). Sin embargo, en ratas, ratones, conejos y ovinos generalmente no han tenido éxito (Dawes *et al.*, 1964; Boray *et al.*, 1967; Dargie *et al.*, 1974; Harness *et al.*, 1976, Campbell *et al.*, 1978;

Hughes *et al.*, 1981). En el ganado ovino se han ensayado vacunas contra *F. gigantica* y *S. mattheei* utilizando metacercarias irradiadas. Éstas han reducido la carga parasitaria en un 80% y 56-78%, respectivamente, (A'Gadir *et al.*, 1987; Taylor *et al.*, 2000) pero intentos similares contra *F. hepatica* no han tenido éxito (Boray *et al.*, 1967; Dargie *et al.*, 1974; Campbell *et al.*, 1978; Creaney *et al.*, 1995; Zafra *et al.*, 2012).

Actualmente, el empleo de vacunas de ADN plasmídico es una alternativa atractiva tanto para la inmunización como para la terapia génica contra muchos procesos infecciosos (Lara y Ramírez, 2012). Este tipo de vectores contienen elementos para su replicación en el hospedero y la secuencia del gen que codifica para la proteína antigénica de interés. Estas vacunas funcionan como un sistema de transporte para el gen, resultando en la producción *in situ* del antígeno de interés (Mota Sánchez, 2009). Esta estrategia ha sido evaluada en la protección contra *F. hepatica* en roedores (Jayaraj *et al.*, 2012) y en ovinos (Wesołowska *et al.*, 2016) con resultados alentadores.

Otras vacunas utilizadas son las basadas en componentes subcelulares del agente infeccioso. La proteína GST de *F. hepatica* fue seleccionada como inmunógeno teniendo en cuenta que las GSTs homólogas de *S. mansoni* (Sm28) y de *S. japonicum* (Sj26) confirieron protección contra la infestación con metacercarias en animales de laboratorio (ratones y conejos) (Smooker *et al.*, 1999).

El primer ensayo de vacunación en ratas con la proteína GST formulada en (AFC) no confirió protección significativa. Por el contrario, ovinos vacunados con la GST nativa emulsionada en AFC, mostraron una reducción de la carga parasitaria del 57%, siendo ésta la primera vacuna experimental que utilizó GST como antígeno vacunal. En los años 90 varios investigadores realizaron distintos ensayos que involucraron el empleo de GST con el objetivo de desarrollar una vacuna eficaz pero no fue posible reproducir una respuesta protectora a pesar que se empleó el mismo protocolo de inmunización. Más recientemente, De Bont *et al.*, 2003 en el Institut Pasteur de Lille inmunizaron con GST recombinante de *S. bovis* en bovinos, utilizando Al (OH)₃, Quil A, o AFC como adyuvantes, sin embargo, ninguna de las formulaciones utilizadas confirió protección contra *F. hepatica*. Por otro lado, se han llevado a cabo ensayos de vacunación utilizando una FhGST de la clase sigma recombinante (FhGST-S1r) en cabras los cuales mostraron una reducción poco significativa en el número de parásitos recuperados de hígado y menor daño hepático asociado a la fuerte infiltración de eosinófilos alrededor de los parásitos migrantes (Zafra *et al.*, 2012).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el rol de determinadas enzimas de fase II de detoxificación en la resistencia al TCBZ y evaluar la inmunogenicidad y protección conferida por la rFhGSTMu contra *F. hepatica* en el modelo murino.

Los objetivos específicos de la presente Tesis son:

1. Determinar en *F. hepatica* las actividades metabólicas detoxificantes de la enzima GST y sus isoenzimas GST Pi y Mu, Glutation Peroxidasa, Glutation Reductasa y Nitrofenilacetato esterasa.
2. Realizar estudios moleculares y genéticos de la isoenzima GST Mu en cepas de *F. hepatica* susceptibles y resistentes a TCBZ.
3. Analizar la respuesta inmunitaria humoral y celular y la protección conferida por rFhGSTMu formulada en distintos adyuvantes en el modelo murino.
4. Evaluar el rol de los anticuerpos en la protección contra *F. hepatica*.

DISEÑO EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se describe en forma general la metodología analítica utilizada en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral con los materiales y métodos específicos utilizados en los diferentes experimentos que la integran.

1- ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y GENÉTICOS DE LA ISOENZIMA GST MU EN CEPAS DE *F. HEPATICA* SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A TCBZ

A) Obtención de *F. hepatica*: Se utilizaron *F. hepatica* adultas provenientes de aislamientos salvajes susceptibles y resistentes a fármacos. Las fasciolas adultas fueron extraídas del conducto biliar previa apertura de la cavidad abdominal, lavadas en solución fisiológica a 37-38°C y sumergidas en buffer Fosfato de Sodio (BF) (0,01 M, pH 7,4) en un recipiente térmico. Posteriormente, fueron transportadas al laboratorio.

B) Obtención de proteínas citosólicas y microsomas: Los adultos de *F. hepatica* de cada aislamiento se homogeneizaron a 4 °C en BF (1:1). El homogenato fue centrifugado a 10.000 rpm durante 20 min. a 4°C. El sobrenadante (SN) obtenido fue ultracentrifugado a 100000 rpm, 1 h. a 4°C. El sobrenadante (SN) obtenido (citosol) y el *pellet* (microsoma) se conservaron a -80°C hasta su utilización.

C) Determinación de la actividad metabólica: Todas las determinaciones enzimáticas se realizaron incubando las fracciones subcelulares (microsomas y/o citosoles) en anaerobiosis bajo condiciones que resultaran en tasas metabólicas de orden 0 con respecto a la concentración del sustrato y del cofactor empleado.

La actividad citosólica de GST total se determinó mediante el uso de 1-cloro, 2,4-dinitrobenzenueno (CDNB) como sustrato, para la actividad de GST Pi el sustrato el ácido etacrínico y para el análisis de la actividad GST Mu el sustrato 3,4-diclorobenceno. Todos los análisis fueron supervisados por el método espectrofotométrico continuo descrito por Habig *et al.* (1974).

La actividad nitrofenilacetato esterasa se determinó según el método descrito por Nousianen *et al.* (1984). La actividad de Glutacion Peroxidasa y de Glutacion Reductasa se realizó según las metodologías descritas por Nebbia (1993) y Andresen *et al.* (1997), respectivamente.

D) Análisis del gen para GST Mu

- Recolección de los parásitos

Para la obtención de ejemplares adultos de *F. hepatica*, se infectaron oralmente seis ovinos de la raza Corriedale con 200 metacercarias de la cepa susceptible (*Cullomptom*) o resistente (*Sligo*) a TCBZ (n=3 animales/grupo). Luego de 16 semanas, los animales fueron sacrificados y los ejemplares fueron recolectados del hígado y conductos biliares y fueron transferidos a RNAlater®, (Applied Biosystems, Brunn am Gebirge, Austria) para la posterior extracción del ARN.

- Extracción y retrotranscripción del ARN total a cADN

La extracción de ARN se realizó con Trizol utilizando el protocolo del fabricante (Applied Biosystems, Brunn am Gebirge, Austria). La retrotranscripción fue realizada usando el kit superscript III RNAase® (Applied Biosystems, Brunn am Gebirge, Austria). El cADN obtenido fue conservado a -20°.

- Amplificación del cDNA por PCR

El cADN proveniente de cada cepa fue utilizado como templado para la amplificación por PCR. Los *primers* utilizados fueron obtenidos de la bibliografía: FgGST-F (50-ATG CCA GCCAAA CTC GGA TAC-30) y FgGST-R (50-TCA AGC CGG TGC AGC GTCTC-30) (Jedepa *et al.*, 2010). La amplificación fue realizada con 20 mM dNTPs (2 µl), 25 mM MgCl₂ (2 µl) y 500 U de la enzima Taq DNA polimerasa (2,5 µl) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) y 10 ng/ µl de cDNA (2 mL). La reacción consistió en una desnaturalización a 94°C (1 min) seguida por 45 seg a 52°C (*annealing*) y elongación a 72°C (1 min). Dicho proceso se realizó en 35 ciclos. Los oligonucleótidos usados correspondieron a una región conservada del gen de la isoenzima GST Mu los cuales amplificaron un fragmento de 657 pb. Los oligonucleótidos fueron analizados con el *software* Oligo Tech y el DNASTar. El amplicón total (n=15) fue clonado usando el kit para secuenciación TOPO® TA Cloning kit (Invitrogen, Vienna, Austria) y el DNA recombinante proveniente de los clones individuales fue preparado con (PeqGold) Plasmid Miniprep Kit II; PeqLab, Erlangen, Germany) y secuenciado en (Macrogen, Korea).

E- Evaluación de la pureza y de la actividad enzimática de rFhGSTMu

La proteína rFhGSTMu fue sintetizada, expresada y purificada en Genscript (Korea). Ya en el laboratorio se determinó la concentración de mediante la técnica de Bradford con Albúmina Sérica Bovina (BSA) como estándar. Posteriormente la proteína rFhGSTMu se evaluó electrofóreticamente en SDS-PAGE. El análisis de actividad enzimática se realizó por el método espectrofotométrico continuo descrito por Habig *et al.* (1974).

F- Análisis de los datos

El análisis de las secuencias fue realizado utilizando el programa BLAST y Clustal 2.1. La información obtenida de la secuenciación de péptidos se llevó a cabo con el Expansy Translate tool y comparada con secuencias en el GenBank, usando el BLASTp. A partir de la secuencia de aminoácidos se analizó el dominio investigado, familias y sitios funcionales a través de la herramienta Prosite.

2- ENSAYOS PARA EVALUAR INMUNOGENICIDAD Y LA PROTECCIÓN EN EL MODELO MURINO

A) Selección de las metacercarias para la infestación

En los diferentes ensayos utilizaron metacercarias (MCs) provenientes de diferentes aislamientos, a) Susceptibles a TCBZ denominada “Cenapa Su” de México, b) Resistente a TCBZ de un aislamiento a campo “Cajamarca” de Perú y c) aislamiento resistente a ABZ y susceptible a TCBZ CEDIVE (Sanabria R *et al.*, 2013).

La selección de las MCs se llevó a cabo empleando el mismo criterio para los diferentes ensayos. Fueron utilizadas sólo aquellas que presentaban los primordios del intestino visibles utilizando un microscopio marca Leica WILD M3C (aumento 40X). Las MCs seleccionadas se colocaron en 100 µl de agua para la posterior infestación de los animales.

B) Puesta a punto de la infestación en el modelo murino

Para la puesta a punto de la infección se utilizaron ratones Balb/c hembras de 8-10 semanas de edad (n=30). Estos permanecieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, U.N.C.P.B.A., recibiendo agua y alimentación *ad libitum*, bajo las normas de cuidado y bienestar establecidas por la Comisión de Bioética y Bioseguridad de la Facultad. Los mismos fueron distribuidos al azar en 5 grupos experimentales (n=6) y fueron inoculados el día 0 por la vía oral con una sonda orogástrica con:

Grupo A: 2 MCs

Grupo B: 4 MCs

Grupo C: 6 MCs

Grupo D: 8 MCs

Grupo E: control sin infestar

Este ensayo se realizó por duplicado, utilizando tanto el aislamiento “Cenapa Su” (susceptible a TCBZ) como “Cajamarca” (resistente a TCBZ). Se evaluaron diferencias en la viabilidad de ambas cepas y la cantidad de MCs por ratón que evolucionaran hasta obtener fasciolas adultas.

C) Puesta a punto de la extracción de sangre por las vías submandibular e intracardiaca

En cada ensayo de infestación se puso a punto la extracción de sangre por la vía submandibular con agujas 21 G de inyección sin tapa y con tapa con un corte a 10 mm de la punta. Para la vía intracardiaca se utilizaron agujas 23 G.

D) Ensayo de inmunización

Se utilizaron ratones Balb/c hembras de 8-10 semanas de edad. Se evaluaron diferentes adyuvantes. Los animales (n=70) fueron distribuidos al azar en 3 grupos de inmunización (n=20) y un grupo control (n=10) como se detalla:

Grupo A: rFhGSTMu + AFI

Grupo B: rFhGSTMu + Al(OH)₃

Grupo C: rFhGSTMu + Quil A.

Grupo D: control sin inmunizar

Los animales fueron inoculados cada 15 días con 10 µg de rFhGSTMu formulada en los distintos adyuvantes por vía subcutánea (S.C.). Dos semanas después de la tercera inmunización, cada ratón fue infestado con el número de MCs seleccionado previamente. Luego de 4 semanas cada ratón fue anestesiado con xilazina (5 mg) y ketamina (100 mg) por la vía intraperitoneal. Se extrajo sangre a blanco por punción intracardiaca. Las cavidades abdominales fueron abiertas y lavadas con NaCl al 0,85% para el recuento de fasciolas y toma de muestras de hígados.

Este ensayo se realizó por duplicado de manera de evaluar la repetitividad de los resultados. La mitad de los ratones de cada grupo se usó en el ensayo de inmunización pasiva.

En función de los resultados obtenidos, se realizó un tercer ensayo con la formulación que confirió la mejor protección utilizando el mismo protocolo de inmunización y desafío.

En este ensayo se duplicó el número de animales por grupo para realizar el cultivo de esplenocitos y determinación de citoquinas *in vitro*.

E) Ensayo de inmunización pasiva

Se realizó un ensayo de inmunización pasiva para evaluar el rol de los anticuerpos en la protección. A las dos semanas de la última inmunización se les extrajo sangre a blanco al 50 % de los ratones de cada grupo de inmunización (ratones dadores) Treinta ratones de 6-8 semanas distribuidos en 3 grupos (n=10) (receptores) fueron inyectados por la vía intraperitoneal con 0,1 ml de IgG precipitada a partir de los sueros de los animales inmunizados (por grupo), siguiendo el protocolo descrito por Margni (1996).

Dos semanas más tarde los animales fueron desafiados como se indicó previamente con la metodología utilizada en el ensayo de inmunización activa. Cuatro semanas post-infestación se procedió a la recuperación de las fasciolas y se determinó el daño hepático como se describe a continuación.

F) Evaluación de la protección conferida

a) Evaluación del daño hepático

De acuerdo a lo descrito por Narin Preyavichyapugdee *et al.* (2008), se utilizó la siguiente fórmula:

$$(A-B) / A * 100$$

A: promedio de fasciolas del grupo control infestado sumado al número de ratones con lesión hepática grave (fibrosis completa); B: promedio de fasciolas de cada grupo de inmunización sumado al número de ratones con lesión hepática grave.

Además, se tomaron muestras de los hígados donde había lesiones para su posterior análisis histopatológico.

b) Curva de supervivencia

Diariamente se observaron los ratones de los diferentes grupos experimentales y se registró el día en que murieron.

Se compararon las curvas de supervivencia de los distintos grupos experimentales y se evaluó las diferencias de valores de los parámetros omega (tiempo máximo de vida) y las diferencias en los parámetros sigma (mortalidad y vitalidad) de acuerdo a lo descrito por Piantanelli, (1994).

c) Determinación de enzimas hepáticas

El examen bioquímico sérico incluyó la determinación de las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FA). Se utilizó un autoanizador (HYCELL LISA 200, Hycell Co., New York, USA. Kits Laboratorio BioSystem (España). La fórmula leucocitaria completa se determinó a partir de muestras de sangre de cada ratón preparando un frotis que fue teñido con Giemsa, y realizando el recuento de los distintos tipos celulares a través del microscopio y de esta manera se evaluó la fórmula leucocitaria.

d) Determinación de daño hepático mediante análisis histopatológico

Las muestras de hígado fueron sometidas al análisis histopatológico. Para ello, los tejidos hepáticos se fijaron en formol bufferado al 10%. Posteriormente, el tejido fue deshidratado en soluciones de concentraciones crecientes de etanol, alcohol butílico e incluido en Paraplast (Celani *et al.*, 1984). Se realizaron cortes de 4 a 5µm usando un micrótopo (RM 2125RT, Leica Microsystems®, Germany). Los cortes se montaron en portaobjetos y se colorearon con la técnica de coloración de rutina (Hematoxilina y eosina) (Zafra Leva, 2007).

e) Evaluación de la respuesta humoral

Los niveles de Ac IgG y subisotipos IgG1 e IgG2a específicos fueron evaluados mediante un ensayo de ELISA indirecto contra rFhGSTMu.

Las placas de poliestireno de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp™) se sensibilizaron con rFhGSTMu (3µg/ml) en PBS incubando 100 µl/pocillo de dicha solución toda la noche a 4°C. Luego se utilizó una solución de bloqueo (PBS con 3 % leche descremada y 0,05 % Tween 20) (200 µl/pocillo) durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween 20 (0,05%). Los sueros se diluyeron 1/20 en la solución de bloqueo, se incubaron durante 1h a 37 °C y se lavaron como se indicó anteriormente. A continuación, se agregó el anticuerpo anti-IgG de ratón (SIGMA M9637) en una dilución 1/2500 y se incubaron 1 h y 30 minutos a 37°C. Luego del lavado, se agregó la solución de revelado compuesta por tampón citrato, ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) 52 mM y H₂O₂ 1,25 % fue agregada durante 15 min. La reacción colorimétrica se detuvo y se midió a densidad óptica (DO) a 405 nm en un lector Lab Systems Multiskan MS.

Para la determinación del isotipo IgG1 se utilizó como conjugado el anticuerpo anti-IgG1 de ratón (SIGMA M063178) diluido 1/1500 y 1/2500 para el isotipo IgG2a (SIGMA M4434).

H) Evaluación de la respuesta celular *in vitro*

a) Cultivo de esplenocitos

Se determinó la producción de citoquinas luego de la estimulación de esplenocitos. Para llevar a cabo el cultivo de esplenocitos, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se practicó una incisión para abrir la cavidad peritoneal a través del flanco izquierdo y se extrajo el bazo con pinzas y tijeras en condiciones asépticas. El mismo fue colocado en placa de Petri estéril. Posteriormente, en el flujo laminar, se disgregaron las muestras de bazo y se agregó RPMI sin antibióticos. La suspensión se colocó en tubos de 15 ml y el volumen se llevó a 10 ml con RPMI. Se centrifugó a 4° C a 3000 rpm durante 15 minutos (Sorvall RC3). Luego se eliminó el SN y el *pellet* se lavó con RPMI se homogeneizó y se centrifugó nuevamente.

b) Recuento de células viables

Para determinar el número de células viables se utilizó el método de exclusión de Azul de Tripán. Los glóbulos rojos se lisaron con ácido acético al 3% para el recuento en una proporción: 10 µl de la suspensión + 190 µl de acético (dilución 1/20). Luego se tomaron 50 µl de la suspensión a contar y se agregaron 50 µl de solución de Azul de Tripán (0,4% en PBS). Se cargaron 10 µl en una cámara de Neubauer y se determinó el número de células viables al microscopio óptico con objetivo 10X.

c) Producción de citoquinas *in vitro*

Se partió de la suspensión obtenida en cada caso y se ajustó a 4×10^6 cél/ml. Las células se suspendieron en 1 ml de medio de cultivo completo (RPMI al cual se le adicionó 10 % de suero fetal bovino, suplementado con 100 U/ml de penicilina y 200 µg/ml de estreptomina). Los cultivos de esplenocitos del bazo de ratón se realizaron en placas de 24 pocillos en presencia de rFhGSTMu (5 µg/ml), Con A (5 µg/ml) y RPMI solo, según el caso descrito por Velikovsky (2003). Se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ por 48 h. Los sobrenadantes se fraccionaron por duplicado y guardaron a -70°C hasta el momento del ensayo de citoquinas.

d) Determinación de citoquinas por ELISA

La detección de IFN-γ e IL-4 en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos se realizó empleando los ELISA de captura específicos para cada citoquina (OptEIA™, PharMingen, San Diego, USA). El protocolo se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

e) Análisis estadístico

El número de fasciolas por grupo es presentado en forma individual y como media \pm desvío estándar (DE). Para evaluar las diferencias en la protección de la vacuna contra la infestación experimental con MCs de *F. hepatica* se sumaron las fasciolas/ lesiones totales de los animales en los grupos. Los valores de las enzimas hepáticas se analizaron mediante la prueba de Dunnett.

Los niveles de Ac (IgG total, IgG1 e IgG2a) y IFN- γ e IL-4 son presentados como media \pm DE. Se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis unidireccional análisis de varianza. Se utilizó el programa INFOSTAT 2008. Cualquier diferencia fue considerada significativa para valores $p \leq 0,05$.

Los datos de la supervivencia de los distintos grupos se analizaron utilizando la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov. Cualquier diferencia fue considerada significativa para valores $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

A continuación, se describen los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente Tesis. Los mismos han sido desglosados en seis secciones principales como se describe a continuación:

1) ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DE LAS PRINCIPALES ENZIMAS DE DETOXIFICACIÓN (FASE 2) EN CEPAS DE *F. hepatica* SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A TCBZ

Se evaluó en la fracción citosólica de *F. hepatica*, la actividad metabólica de diferentes enzimas de detoxificación tales como GST (total y de sus isoenzimas Mu y Pi), GPx, GSR y CE (Enzima fase I), de aislamientos de *F. hepatica* TCBZ resistentes (cepas *Sligo* y *Oberon*) y TCBZ susceptible (cepa *Cullompton*) a TCBZ.

1.a) La actividad total de la enzima GST en la fracción citosólica (cGST) en el aislamiento *Sligo* fue 1277 ± 32 nmol / min / mg de proteína, en el aislamiento *Oberon* 1216 ± 16 nmol / min / mg de proteína y en el aislamiento *Cullompton* 800 ± 60 nmol / min / mg de proteína. Dichos valores representan un significativo aumento ($p < 0,001$) en la actividad metabólica del 59 % (*Sligo*) y 52 % (*Oberon*) comparado al aislamiento TCBZ susceptible (**Tabla 1**).

1.b) Para las cepas TCBZ resistentes *Sligo* y *Oberon*, la isoenzima GST Mu expresó una actividad metabólica superior del 71% y 86% respectivamente a la observada en el aislamiento *Cullompton* susceptible a TCBZ (**Tabla 1**). Por el contrario, la isoenzima GST Pi, no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) en su actividad en los aislamientos evaluados (**Tabla 2**).

1.c) En cuanto a la actividad de GPx en el aislamiento *Sligo* fue $83 \pm 3,41$ nmol / min / mg de proteína y *Oberon* $81 \pm 2,45$ nmol / min / mg de proteína. Dichas actividades metabólicas fueron significativamente más altas ($p < 0,001$) que las observadas en el aislamiento susceptible a TCBZ ($49 \pm 2,58$ nmol / min / mg de proteína) y representan un aumento en la actividad del 69% (*Sligo*) y 65% (*Oberon*) con respecto al aislamiento TCBZ susceptible (**Tabla 1**).

1.d) Cuando se evaluó la actividad metabólica de GSH en los diferentes aislamientos analizados, la capacidad detoxificativa fue significativamente más alta ($P < 0,001$) en los aislamientos *Sligo* en

un 31 % (38 ± 2.07 nmol / min / mg de proteína) y *Oberon* en un 41% ($41 \pm 1,25$ nmol / min / mg de proteína), comparada a la actividad en el aislamiento susceptible a TCBZ (29 ± 1.22 nmol / min / mg proteína) (**Tabla 2**)

1.e) Contrariamente a lo observado en el resto de las enzimas evaluadas, la actividad metabólica de la enzima CE no mostró diferencias significativas entre los tres aislamientos evaluados (**Tabla 2**).

Tabla 1. Actividad de diferentes enzimas detoxificativas

Aislamientos	TCBZ	GST Total	GPx	GSR	CE
		nMol/Min/mg Prot.	nMol/Min/mg Prot.	nMol/Min/mg Prot.	μMol/Min/mg Prot.
<i>Cullompton</i>	Sensible	800±60	49±2,5	29±1,2	1,24±0,32
<i>Oberon</i>	Resistente	1216±16	81±2,4	41±1,25	1,24±0,31
<i>Sligo</i>	Resistente	1277±32	83±3,4	38±2,07	1,15±0,27

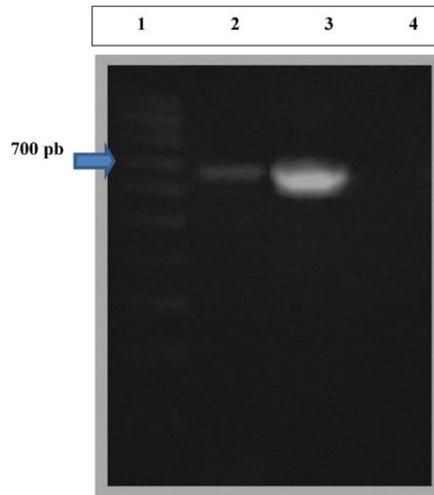
Tabla 2. Actividad de las isoenzimas GST Pi y GST Mu

Aislamientos	TCBZ	GST Pi	GST Mu
		nMol/Min/mg Prot.	nMol/Min/mg Prot.
<i>Cullompton</i>	Sensible	24,2±0,4	0,7±0,3
<i>Oberon</i>	Resistente	22,8±0,5	1,28±0,2
<i>Sligo</i>	Resistente	23,6±0,3	1,37±0,1

2) ESTUDIOS GENÉTICOS DE LA ISOENZIMA GST MU EN CEPAS DE *F. hepatica* SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A TCBZ

2.a) Se identificó y caracterizó el gen GST Mu aislado de *F. hepatica* susceptibles y resistentes a TCBZ. El ARN total se transcribió a cDNA por transcripción reversa y se obtuvo el amplicón de 657 pb correspondiente al gen GST Mu (**Figura 1**). Con el análisis genético comparativo del gen GST Mu entre la cepa susceptible (*Cullompton*) y la cepa resistente a TCBZ (*Sligo*) se detectaron tres SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (**Figura 2**). Cuando se analizó la proteína resultante, se confirmó al menos un cambio de aminoácido en la posición 143 en la isoenzima Mu de la cepa TCBZ resistente (**Figura 3**).

Figura 1: Amplificación por RT-PCR del gen GST Mu de *F. hepatica* susceptible (*Cullompton*) y resistente (*Sligo*) a TCBZ



Calles: Marcador de PM de ADN (calle 1), TCBZ-S, cepa *Cullompton* (calle 2), cepa *Sligo* (calle 3) y control negativo (calle 4).

Figura 2: CLUSTAL 2.1 múltiple alineamiento de secuencias del gen GST Mu de *F. hepatica* susceptible (*Cullompton*) y resistente (*Sligo*) a TCBZ

GST Mu cepa *Cullompton*: TATGCCAGCCCAAACCTCGGATACTGGAAAATAAGAGGG 38

GSTMu cepa *Sligo*: TATGCCAGCCCAAACCTCGGATACTGGAAAATAAGAGGG38

GST Mu cepa *Cullompton*: TATGCCAGCCCAAACCTCGGATACTGGAAAATAAGAGGG 38

GST Mu cepa *Sligo*: TATGCCAGCCCAAACCTCGGATACTGGAAAATAAGAGGG 38

GST Mu cepa *Cullompton*: CTCCAACAACCCGTTTCGACTCTCAACAACCCGTTTCGACT 78

GST Mu cepa *Sligo*: CTCCAACAACCCGTTTCGACTCTCAACAACCCGTTTCGACT 78

GST Mu cepa *Cullompton*: CTCCAACAACCCGTTTCGACTCTCAACAACCCGTTTCGACT 78

GST Mu cepa *Sligo*: CTCCAACAACCCGTTTCGACTCTCAACAACCCGTTTCGACT 78

GST Mu cepa *Cullompton*: TGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTATGAAGAACATCT118

GST Mu cepa *Sligo*: TGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTATGAAGAACATCT118

GST Mu cepa *Cullompton*: TGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTATGAAGAACATCT 118

GST Mu cepa *Sligo*: TGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTATGAAGAACATCT118

GST Mu cepa *Cullompton*: GACGGTCGTGATGATAGGGAGAAATGGTTTGGCGATA155

GST Mu cepa *Sligo*: GACGGTCGTGATGATAGGGAGAAATGGTTTGGCGATA 155

GST Mu cepa *Cullompton*: GACGGTCGTGATGATAGGGAGAAATGGTTTGGCGATA 155

GST Mu cepa *Sligo*: GACGGTCGTGATGATAGGGAGAAATGGTTTGGCGATA 155

GST Mu cepa *Cullompton*: TTCAACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTA193

GST Mu cepa *Sligo*: TTCAACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTA193

GST Mu cepa *Cullompton*: TTCAACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTA 193

GST Mu cepa *Sligo*: TTCAACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTA 193

GST Mu cepa *Cullompton*: CATTGTTCAACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCA 233

GST Mu cepa *Sligo*: CATTGTTCAACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCA 233

GST Mu cepa *Cullompton*: CATTGTTCAACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCA 233

GST Mu cepa *Sligo*: CATTGTTCAACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCA 233

GST Mu cepa *Cullompton*: ACTACATTGGCGATAAATTCAACATGGGATTGGATTTC 271

GST Mu cepa *Sligo*: ACTACATTGGCGATAAATTCAACATGGGATTGGATTTC 271

GST Mu cepa *Cullompton*: ACTACATTGGCGATAAATTCAACATGGGATTGGATTTC 271

GST Mu cepa *Sligo*: ACTACATTGGCGATAAATTCAACATGGGATTGGATTTC 271

GST Mu cepa *Cullompton*: CAAATTTACCATACTACATTGAATGGTTTGGCGATAAA 310

GST Mu cepa *Sligo*: CAAATTTACCATACTACATTTAATGGTTTGGCGATAAA 310

GST Mu cepa *Cullompton*: CAAATTTACCATACTACATTGAATGGTTTGGCGATAAA 310

GST Mu cepa *Sligo*: CAAATTTACCATACTACATTTAATGGTTTGGCGATAAA 310

GST Mu cepa *Cullompton*: TTCAACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTA 348

GST Mu cepa *Sligo*: TTCAACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTA 348

GST Mu cepa *Cullompton*: TTCAACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTA 348

GST Mu cepa *Sligo*: TTCAACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTA 348

GST Mu cepa *Cullompton*: ACGATAAGTGCAAACACTGACTCAGTCGGTGGCCATAAT 385

GST Mu cepa *Sligo*: ACGATAAGTGCAAACACTGACTCAGTCGGTGGCCATAAT 385

GST Mu cepa *Cullompton*: ACGATAAGTGCAAACACTGACTCAGTCGGTGGCCATAAT 385

GST Mu cepa *Sligo*: ACGATAAGTGCAAACACTGACTCAGTCGGTGGCCATAAT 385

GST Mu cepa *Cullompton*: GAGATTATCTGAAAGAACTGCCAACACGTTGAAGAT 425

GST Mu cepa *Sligo*: GAGATTATCTGAAAGAACTGCCAACACGTTGAAGAT 425

GST Mu cepa *Cullompton*: GAGATTATCTGAAAGAACTGCCAACACGTTGAAGAT 425

GST Mu cepa *Sligo*: GAGATTATCTGAAAGAACTGCCAACACGTTGAAGAT 425

GST Mu cepa *Cullompton*: TTTGACAGGTTCTTCAGTTAGCCATGTGGACTTTATGGT 465

GST Mu cepa *Sligo*: TTTGACAGGTTCAATCAGTTAGCCATGTGGACTTTATGGT 465

GST Mu cepa *Cullompton*: TTTGACAGGTTCTTCAGTTAGCCATGTGGACTTTATGGT 465

GST Mu cepa *Sligo*: TTTGACAGGTTCAATCAGTTAGCCATGTGGACTTTATGGT 465

GST Mu cepa *Cullompton*: ACTGTATTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACT 504

GST Mu cepa *Sligo*: ACTGTATTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACT 504

GST Mu cepa *Cullompton*: ACTGTATTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACT 504

GST Mu cepa *Sligo*: ACTGTATTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACT 504

GST Mu cepa *Cullompton* GTATTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACTTTC 544

GST Mu cepa *Sligo*: GTATTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACTTTC 544

GST Mu cepa *Cullompton* GTATTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACTTTC 544

GST Mu cepa *Sligo*: GTATTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACTTTC 544

GST Mu cepa *Cullompton*: CCAAATTGAAGGAATTCAAGAGTCGTATTGAAGATCT 571

GST Mu cepa *Sligo*: CCAAATTGAAGGAATTCAAGAGTCGTATTGAAGATCT 571

GST Mu cepa *Cullompton*: CCAAATTGAAGGAATTCAAGAGTCGTATTGAAGATCT 571

GST Mu cepa *Sligo*: CCAAATTGAAGGAATTCAAGAGTCGTATTGAAGATCT 571

GST Mu cepa *Cullompton*: AGAGTCGTATTGAAGATCTTCCAAAATCAAGGCATA 602

GST Mu cepa *Sligo*: AGAGTCGTATTGAAGATCTTCCAAAATCAAGGCATA 602

GST Mu cepa *Cullompton*: AGAGTCGTATTGAAGATCTTCCAAAATCAAGGCATA 602

GST Mu cepa *Sligo*: AGAGTCGTATTGAAGATCTTCCAAAATCAAGGCATA 602

GST Mu cepa *Cullompton*: AGTGGCCTTTGAACTCGTGGATTGCTTC.....628

GST Mu cepa *Sligo*: AGTGGCCTTTAAACTCGTGGATT..... 623

GST Mu cepa *Cullompton*: AGTGGCCTTTGAACTCGTGGATTGCTTCTTTCGGTGGT 638

GST Mu cepa *Sligo*: AGTGGCCTTTAAACTCGTGGATTGCTTCTTTCGGTGGT 638

El color rojo indica los tres cambios de nucleótidos en la cepa resistente (*Sligo*).

Figura 3: Alineación de aminoácidos de la isoenzima GST Mu de *F. hepatica* susceptible (*Cullompton*) y resistente (*Sligo*) a TCBZ

GST Mu cepa *Cullompton*:

LGYWKIRGLQQPVRLLEYLGE EYEEHLYGRDDREKWF GDKFNMGLDLPNLPYYIDDK
CKLTQSVAIMRYIADKHGMLGSTPEERARISMIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKG
DYLKELPTTLKMWSDFLGDRHYLTGSTVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLED FPKLKE
FKSRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSWIASFGGGDA

GST Mu cepa *Sligo*

CQPKLGYWKIRGLQQPVRLLEYLGE EYEEHLYGRDDREKWF GDKFNMGLDLPNLPY
YIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMLGSTPEERARISMIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFE
EVKGDY LKELPTTLKMWSDFLGDRHYLTGSSVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLED FPK
KLKEFKSRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSWIASFGGGDAD

GST Mu cepa *Cullompton*: LGYWKIRGLQQPVRLLEYLGE EYEEHLYGRDDREKWF G 39

GST Mu cepa *Sligo* LGYWKIRGLQQPVRLLEYLGE EYEEHLYGRDDREKWF G 39

GST Mu cepa *Cullompton*: DKFNMGLDLPNLPYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGML 88

GST Mu cepa *Sligo* DKFNMGLDLPNLPYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGML 88

GST Mu cepa *Cullompton*: ARISMIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKGDY LKELP.126

GST Mu cepa *Sligo* ARISMIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKGDY LKELP.126

GST Mu cepa *Cullompton*: TLKMWSDFLGDRHYLT **T**VSHVDFMVYEALDCIRYLAP 163

GST Mu cepa *Sligo* TLKMWSDFLGDRHYLT **S**VSHVDFMVYEALDCIRYLAP...163

GST Mu cepa *Cullompton*: QCLEDFPKLKEFKSRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSW..201

GST Mu cepa *Sligo* QCLEDFPKLKEFKSRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSW..201

GST Mu cepa *Cullompton*: IASFGGGDA 211

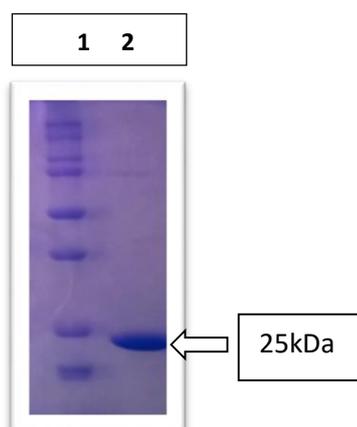
GST Mu cepa *Sligo* IASFGGGDAD 212

El color rojo indica el reemplazo de un aminoácido en la posición 143 en la cepa resistente (*Sligo*).

2.b) Análisis de pureza y de actividad enzimática de rFhGSTMu

La proteína rFhGSTMu fue sintetizada en Genscript (Korea) y analizada en nuestro laboratorio para evaluar su pureza mediante la actividad enzimática de la proteína, la cual fue de 10510 ± 32 nmol/min/mg proteína y mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como se observa en la **Imagen 1**.

Imagen 1: Evaluación de la pureza de rFhGSTMu mediante SDS-PAGE



Calles: Marcador de PM de proteína (calle 1), 10 μ g rFhGSTMu (calle 2).

3) DESARROLLO DE UN MODELO MURINO EN FASCIOLOSIS

3.1) Puesta a punto de la infestación en el modelo murino

Se realizaron dos ensayos en ratones Balb/c para evaluar la infestación con dos aislamientos de *F. hepatica*. El primer aislamiento utilizado fue una cepa susceptible a TCBZ de origen mexicano (“Cenapa Su”) y el segundo aislamiento utilizado fue una cepa resistente a TCBZ de origen peruano (Cajamarca), ambas disponibles en el laboratorio. Éstas fueron evaluadas como potenciales cepas para el desafío. Para esto se determinó la cantidad óptima de metacercarias a inocular por animal para la obtención de fasciolas.

Los ensayos con ambas cepas se repitieron en dos oportunidades para ver la reproducibilidad de los resultados.

3.1.a) En el primer ensayo se inocularon metacercarias “Cenapa Su”. A los 40 días post infestación, se recolectaron en total dos fasciolas de los ratones del grupo inoculado con 8 metacercarias (grupo D).

3.1.b) En el segundo ensayo se utilizó el aislamiento resistente de *F. hepatica* de Cajamarca. A los 40 días post infestación se registró la muerte de los ratones del grupo D. En este grupo se recolectaron dos fasciolas por ratón (en dos ratones) mientras que en los otros animales del grupo se obtuvo una fasciola por ratón. El resto de los grupos se sacrificaron el día 45 post infestación. En el grupo C se encontró que todos los ratones tenían lesión hepática (fibrosis generalizada y engrosamiento de vesícula biliar) y sólo en dos ratones del grupo se recolectó una fasciola por animal. Respecto de los grupos A y E, no se encontraron fasciolas ni lesión hepática. Por el contrario, en los ratones del grupo B se encontró una pequeña lesión focal en el hígado de cada uno de los ratones.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió infestar con 7 metacercarias del aislamiento de Cajamarca para el desafío en los ensayos de protección.

3.2) Puesta a punto de la extracción de sangre por las vías submandibular e intracardíaca

Dado que no se dispuso de las lancetas para la extracción submandibular, se optó por utilizar agujas para inyección como se observa en la **Imagen 2**. Se ensayaron dos métodos para la obtención de sangre, necesaria para analizar la respuesta humoral en los ensayos de inmunización activa y para obtener la IgG específica para el ensayo de inmunización pasiva. Los ratones fueron distribuidos al azar en 2 grupos experimentales (n=18).

Los volúmenes obtenidos mediante la extracción de sangre por la vía submandibular en el grupo P1 (aguja sin tapa) con y sin anticoagulante, fueron mayores a los observados en el grupo P2 (aguja con tapa) en cada uno de los tiempos de muestreo correspondientes a los días 0 (D0), 11 (D11) y 22 (D22) (**Gráfico 1**).

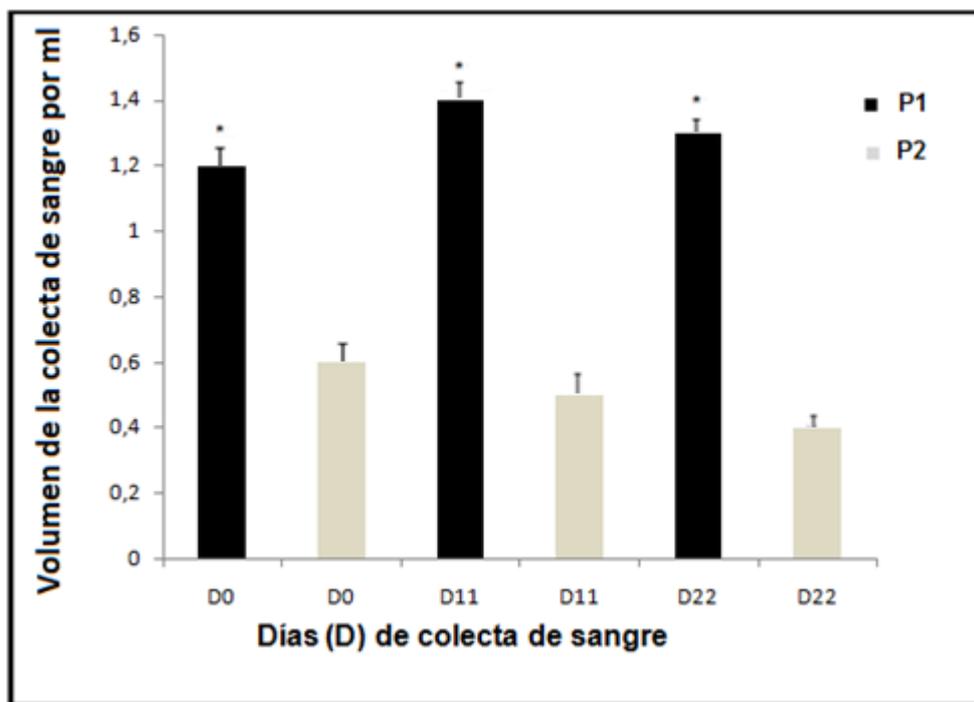
Los pesos corporales y los valores hematológicos y glucémicos se mantuvieron dentro de los valores de referencia, por lo tanto, se infirió que cualquiera de los procedimientos permitió la óptima recuperación de los animales (**Tabla 3**).

Imagen 2: Agujas utilizadas en ratones para la extracción de sangre por la vía submandibular



Agujas 21 G sin tapa (1) y con tapa con un corte a 10 mm de la punta (2)

Gráfico 1: Volúmenes sanguíneos finales recolectados de los ratones luego de la extracción de sangre por la vía submandibular con aguja 21 G sin tapa (P1) y con tapa (corte a 10 mm de la punta) (P2) los días 0, 11 y 22



Los valores se consideraron significativos con $p \leq 0,05$ (*).

Tabla 3: Datos hematológicos correspondientes a la extracción de sangre por la vía submandibular con aguja 21G con y sin tapa los días 0, 11 y 22

Parámetros evaluados	GRUPO P1: AGUJA SIN TAPA			GRUPO P2: AGUJA CON TAPA			Referencia*
	D0	D11	D22	D0	D11	D22	
Hemoglobina g/dl	13,7±0,6	15,2±0,8	12,8±0,4	13,6±0,4	14,4±0,5	13,2±0,3	12,-19,0
Hto %	46±7	47±5	25±4	44±5	44±5,7	32±6	35,0- 55,0
Eritrocitos /mm ³	7.050.000 ±5100	7.150.000 ±4500	4.740.000 ±4500	6890000 ±4800	6.850.000 ±3950	5010000 ± 4400	5500000-8500000
VCM fl	68±11	70±14	82±17	66±5	68±9	77±13	60,0-77,0
HbCM %	19,6±0,9	19,7±1,2	16,2±1,5	19,4±0,8	20,1±1,5	15,8±1,2	17,0-24,5
CHbCM g/dl	28±2	29±2,5	26±3	27±4,2	30±1,6	27±3	31,0-36,0
Prot plasm g/dl	6±1,2	6,4±1	4,7±2	5,9±2,4	6,7±1	5±2	6,0-7,8
Leucocitos /mm ³	7200±1400	9050±1800	8700±1550	6000±1300	8700 ±2100	7500±2800	6000-15000
Neutrófilos segm /mm ³	792±600	2082±1100	1218±920	1440±980	1827±850	1200±700	3000-11000
Neutrófilos segm %	11±6	23±11	14±5	24±12	21±9	16±6	60,0-77,0
Neutrófilos en banda /mm ³	72±13	181±38	0	0	87±17	75±14	0,0-300

Neutrófilos en banda, %	1±1	2±1	0	0	1±0,5	1±0,4	0,0-3,0
Linfocitos /mm³	6336±640	6787±590	7482±710	4560±520	6786±660	6225±550	1500-5000
Linfocitos %	88±11	75±13	86±19	76±10	78±12	83±28	15,0-35,0
Plaquetas /mm³	392000±1150	430000±1200	400000±1060	401000±1300	444000±2200	441000±2000	150000-500000
Proteínas totales g/dl	2,97±0,2	6,2±0,2	4,5±0,5	4,03±0,3	6,4±0,5	4,7±0,7	2,5-4,4
Albúmina g/dl	5,6±1,7	3,5±0,9	2,8±1,5	5,69±1,6	3,6±2,1	3,2±2,4	5,4-7,8

*Los valores de referencia corresponden a la bibliografía.

Para la extracción de sangre por la vía intracardiaca, los ratones fueron distribuidos al azar en 2 grupos experimentales (n=18). Se utilizaron agujas 21 G (n=9) y aguja 23 G (n=9), esta última fue la más adecuada ya que permitió obtener los volúmenes máximos de sangre en esta especie animal (0,7-1 ml/ratón).

4) EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y EFICACIA DE rFhGSTMu CON DISTINTOS ADYUVANTES EN EL MODELO MURINO

Se utilizó rFhGSTMu formulada en los siguientes adyuvantes: AFI, Al(OH)₃ y Quil A. Se empleó el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Este ensayo se repitió dos veces para evaluar la reproducibilidad de los resultados.

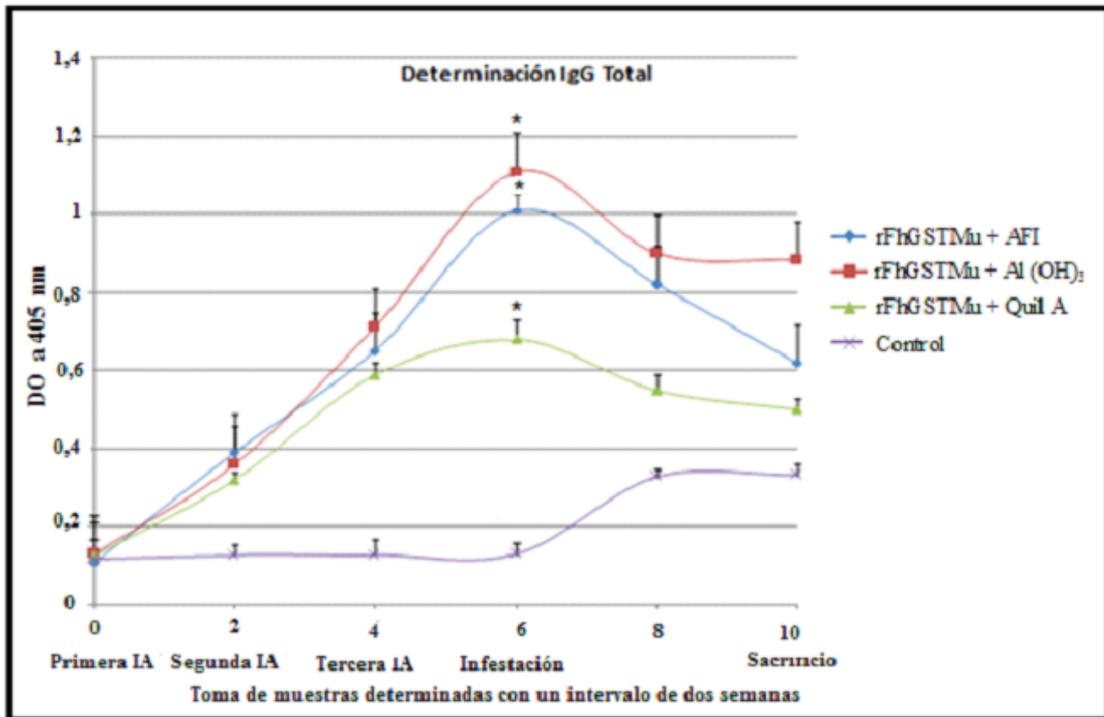
4.1) Evaluación de la inmunogenicidad: respuesta humoral

La determinación de anticuerpos IgG anti-rFhGSTMu séricos inducidos por las diferentes estrategias de inmunización se realizó mediante ELISA indirecto desde el día 0 hasta el final del ensayo.

Se detectaron anticuerpos IgG anti-rFhGSTMu en los ratones de todos los grupos inmunizados. En el **Gráfico 2** se observa que la producción de anticuerpos IgG séricos específicos aumentó tras cada refuerzo a diferencia de lo observado en el grupo control (sin inmunizar) que mantuvo niveles basales a lo largo del ensayo. Las diferencias fueron máximas y significativas ($p < 0,05$) dos semanas posteriores a la tercera inmunización.

La proteína rFhGSTMu adsorbida en Al(OH)₃ indujo los mejores títulos en los distintos tiempos del ensayo. Si bien los niveles de anticuerpos no se elevaron post infestación, en el momento del sacrificio, los títulos de anticuerpos en los grupos inmunizados fueron superiores a los del grupo control.

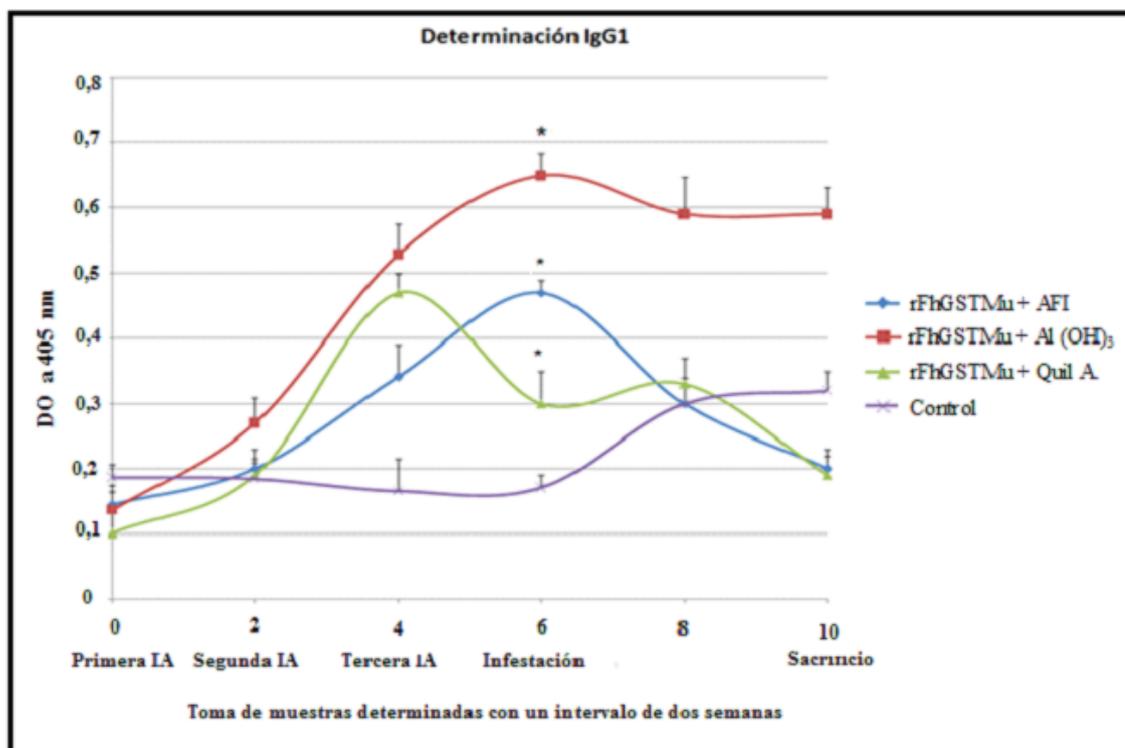
Gráfico 2: Evolución de los niveles de anticuerpos IgG post administración de rFhGSTMu formulada con distintos adyuvantes



Los niveles de Ac anti-rFhGSTMu específicos fueron determinados en ELISA indirecto y expresados como valores de absorbancia \pm DE. Los valores de las diferencias con respecto al control se consideraron significativos con $p \leq 0,05$ (*)

Se analizaron los subisotipos IgG1 e IgG2a para determinar el perfil de la respuesta (Th2 o Th1, respectivamente). En el grupo inmunizado con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en los niveles de IgG1 respecto de IgG2a comparado a lo observado en el grupo inmunizado con rFhGSTMu+ AFI y con rFhGSTMu+ Quil A. Además, los títulos de IgG1 se mantuvieron elevados en el grupo inmunizado con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ a lo largo del muestreo, a diferencia de lo observado en los otros grupos. La proporción IgG1:IgG2a en el grupo rFhGSTMu+ Al(OH)₃ fue de $2,16 \pm 0,4$ mientras que en el grupo inmunizado con rFhGSTMu+ Quil A fue de $1,6 \pm 0,3$ y en el grupo inmunizado con rFhGSTMu+ AFI fue de $1,5 \pm 0,3$ (Gráficos 3 y 4).

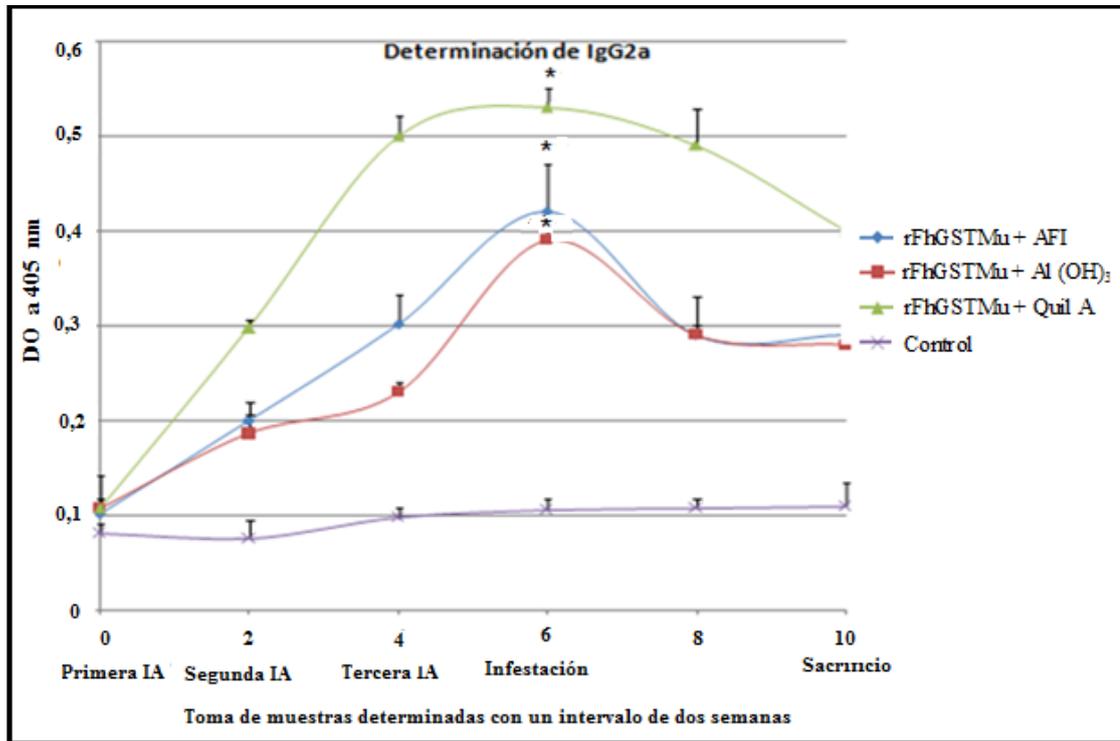
Gráfico 3: Niveles de Ac IgG1 post-inmunización con rFhGSTMu formulada en distintos adyuvantes



Los niveles de Ac específicos anti-rFhGSTMu fueron determinados en ELISA indirecto y fueron expresados como valores de absorbancia \pm DE. Los valores de las diferencias con respecto al control se consideraron significativos con $p \leq 0,05$ (*).

En contraste a lo observado con los anticuerpos IgG1 específicos, el grupo rFhGSTMu+ Quil A presentó los títulos más elevados de anticuerpos IgG2a, mientras que los títulos más bajos de este isotipo fueron observados en los grupos inmunizados con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ o con rFhGSTMu+ AFI (**Gráfico 4**).

Gráfico 4: Niveles de Ac IgG2a estimulados luego de la administración de rFhGSTMu formulada en distintos adyuvantes



Los niveles de Ac específicos anti-rFhGSTMu fueron determinados en ELISA indirecto específico y fueron expresados como valores de absorbancia \pm DE. Los valores de las diferencias con respecto al control se consideraron significativos con $p \leq 0,05$ (*).

En los dos ensayos realizados no se observaron diferencias en los niveles de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a para cada uno de los grupos de inmunización.

4.2) EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN

4.2.a) Análisis de las enzimas hepáticas

Para evaluar el daño hepático, se determinaron los valores de tres enzimas hepáticas: la enzima Aspartato AminoTransferasa (AST ó GOP), Alanina AminoTransferasa (ALT ó GPT) y Fosfatasa alcalina (FA). Los valores de las enzimas en el grupo inmunizado con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ fueron significativamente más bajos ($p < 0,05$) que los registrados en los otros grupos (Tabla 4).

Tabla 4: Valores de enzimas hepáticas en los distintos grupos de inmunización

Determinación enzimática	rFhGSTMu+ AFI	rFhGSTMu+ Al(OH) ₃	rFhGSTMu+ Quil A	Control (Infestados)	Valor de referencia U/L
AST	*576±69	*362±58	*611±77	*610±82	55-251
ALT	*968±101	*250±27	*997±104	*974±95	28-184
FA	*256±34	*251±33	*296±28	*283±40	28-94

Los valores de las enzimas hepáticas: Aspartato Amino Transferasa (AST), Alanina AminoTransferasa (ALT) y Fosfatasa alcalina (FA), fueron determinados de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

* Diferencia significativa contra los valores de referencia ($p < 0,05$)

4.2.b) Porcentaje en la reducción del número de fasciolas en los ratones inmunizados

Luego del desafío, se evaluó el número de fasciolas en los distintos grupos experimentales. La formulación rFhGSTMu+ Al(OH)₃ redujo significativamente el número de fasciolas y la presencia de lesiones (90%) ($p < 0,05$) respecto del grupo no vacunado. Por el contrario, en el resto de los grupos inmunizados utilizando los otros adyuvantes no se observaron diferencias en el recuento de fasciolas y en las lesiones hepáticas respecto del grupo control sin vacunar (0 a 10%) ($p > 0,05$) (Tabla 5).

Tabla 5: Porcentaje de reducción parasitaria establecido de acuerdo al recuento de fasciolas y a la lesión hepática en los distintos grupos de inmunización

Grupos de Inmunización	N° de ratones	Recuperación de fasciolas/ total de ratones	Media \pm DE	N° de ratones con lesión hepática	% Reducción
A: rFhGSTMu+ AFI	10	6/10	0,6\pm0,6	10	0%
B:rFhGSTMu+ Al(OH)₃	10	1/10	0,1\pm0,3	1	90%
C:rFhGSTMu+ Quil A	10	5/10	0,5\pm0,5	10	0%
D:Control	10	7/10	0,7\pm0,7	10	-

Se estableció el porcentaje de reducción parasitaria por animal y por grupo determinando la media \pm DE.

Los valores fueron determinados de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

En las dos repeticiones de este ensayo no se observaron diferencias en los resultados obtenidos.

5) EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y EFICACIA DE rFhGSTMu + Al (OH)₃ EN EL MODELO MURINO

Se realizó un último ensayo con la formulación que confirió la protección más significativa: rFhGSTMu+ Al (OH)₃ (Grupo E). Se incluyeron tres ~~des~~ grupos, uno inmunizado con la proteína (Grupo F), otro con el adyuvante (Grupo G) y un grupo control sin inmunizar (Grupo H). Se evaluaron los parámetros evaluados en los ensayos anteriores además de otros adicionales que se detallan a continuación. El ensayo se repitió para evaluar la reproducibilidad de los resultados y se decidió infestar con 7 metacercarias del aislamiento denominado CEDIVE (susceptible a Triclabendazole y resistente al Albendazole) de Chascomús, Argentina para el desafío en los ensayos de protección (gentilmente cedidas por el Dr. Rodrigo Sanabria).

5.a) Valores de la enzima hepática GPT y fórmula leucocitaria pre y post infestación en todos los grupos experimentales

Los resultados se muestran en las **Tablas 6, 7 y 8**. Previo a la infestación todos los resultados de los valores de la enzima hepática GPT y fórmula leucocitaria obtenidos en los grupos experimentales estuvieron dentro de los valores de referencia.

A los 4 días postinfestación, los valores de los grupos experimentales inmunizados con rFhGSTMu, con el adyuvante Al(OH)₃ y el grupo sin inmunizar presentaron valores de GPT que superaron a los valores de referencia establecidos por la bibliografía excepto en el grupo inmunizado con rFhGSTMu+ Al(OH)₃. Esta misma tendencia se observó a los 14 días posteriores a la infestación. En ese tiempo, el grupo inmunizado con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ presentó valores de GPT que estuvieron dentro de los valores de referencia. Por el contrario, el resto de los grupos mostró valores tres veces por encima de los valores de referencia, relacionado con la presencia de lesión hepática.

En referencia a la fórmula leucocitaria, en todos los grupos de inmunización se observó a los 4 días post infestación un aumento de linfocitos, monocitos, basófilos y eosinófilos superando los valores máximos de referencia. Sin embargo, a los 14 días post infestación en todos los grupos de inmunización, excepto en el vacunado con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ se observó un aumento de los monocitos, eosinófilos y basófilos dos veces superiores a los valores de referencia.

Tabla 6: Valores de la enzima hepática GPT y de la fórmula leucocitaria pre infestación

Parámetros evaluados	rFhGSTMu	rFhGSTM+ Al(OH) ₃	Al(OH) ₃	PBS	Valor de referencia U/L
GPT	182±25	81 ±12	117±28	168 ±21	28-184
Neutrófilos segmentados	68±7%	63±3%	62±6%	55±7%	60-77%
Neutrófilos en banda	2±0,5%	3±1	2±1%	1±0,5%	0-3%
Linfocitos	28±7%	25±9%	30±6%	24±7%	15-35%
Monocitos	5±2	6±2	3±1	5±1	2-7%
Eosinófilos	4±1	2±1	2±1	6±2	2-7%
Basófilos	0	0	0	0	0-1%

Los valores de GPT y de fórmula leucocitaria se determinaron de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

Tabla 7: Valores de la enzima hepática GPT y de la fórmula leucocitaria día 4 post infestación

Parámetros evaluados	rFhGSTMu	rFhGSTM+ Al(OH)₃	Al(OH)₃	PBS	Valor de referencia U/L
GPT	187 ±15	104 ±6	226±18	218 ±11	28-184
Neutrófilos segmentados	51±7%	57±3%	40±6%	48±7%	60-77%
Neutrófilos en banda	1±0,5%	3±1	3±1%	1±0,5%	0-3%
Linfocitos	39±5%	44±7%	36±6%	34±8%	15-35%
Monocitos	6±1%	7±2%	6±2%	8±3%	2-7%
Eosinófilos	8±2%	9±3%	10±3%	8±1%	2-7%
Basófilos	1±0,5%	2±1%	2±1%	2±0,5%	0-1%

Los valores de GPT y de fórmula leucocitaria se determinaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

Tabla 8: Valores de la enzima hepática GPT y de la fórmula leucocitaria día 14 post infestación

Parámetros evaluados	rFhGSTMu	rFhGSTM+ Al(OH)₃	Al(OH)₃	PBS	Valor de referencia U/L
GPT	605±35	175 ±36	756±48	688 ±41	28-184
Neutrófilos segmentados	51±7%	57±3%	40±6%	48±7%	60-70%
Neutrófilos en banda	2±0,5%	3±1%	2±1%	1±0,5%	0-3%
Linfocitos	71±12%	78±10%	80±17%	66±13%	15-35%
Monocitos	8±2%	6±1%	9±2%	7±2%	2-7%
Eosinófilos	12±3%	6±1%	11±3%	15±4%	2-7%
Basófilos	4±1%	1±0,5%	3±1%	5±1%	0-1%

Los valores de GPT y de fórmula leucocitaria se determinaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

5.b) Porcentaje de reducción en el número de fasciolas en los ratones inmunizados

Luego del desafío, se evaluó el número de fasciolas juveniles en los distintos grupos experimentales. La formulación rFhGSTMu+ Al(OH)₃ redujo significativamente el número de fasciolas y la presencia de lesiones (75%) ($p < 0,05$) con respecto al grupo no vacunado. Por el contrario, en el resto de los grupos inmunizados no se observaron diferencias en el recuento de fasciolas y en las lesiones hepáticas con respecto al grupo control sin vacunar (0 a 12,5%) ($p > 0,05$) (Tabla 9).

Tabla 9: Porcentaje de reducción parasitaria establecido de acuerdo al recuento de fasciolas y a la lesión hepática en los distintos grupos de inmunización

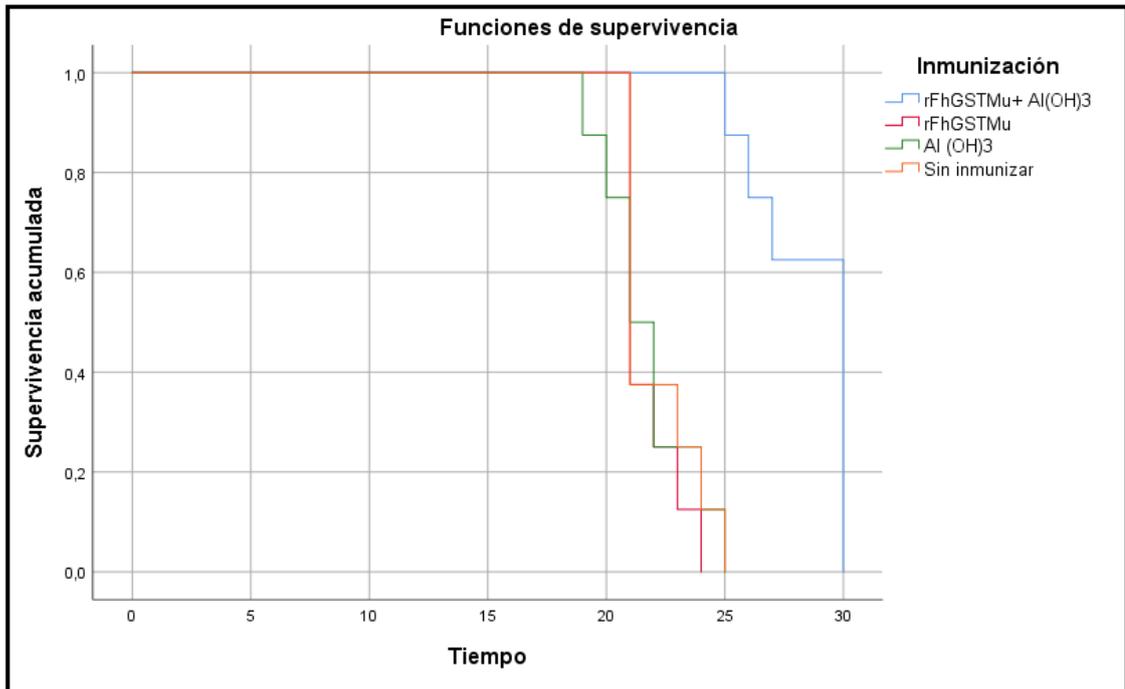
Grupos de inmunización	N° de ratones	Recuperación de fasciolas/ total de ratones	Media ±DE	N° de ratones con lesión hepática	% Reducción
E:rFhGSTMu+Al(OH)₃	10	3/10	0,3±0,3	3	70%
F:rFhGSTMu	10	3/10	0,3±0,3	7	30%
G:Al(OH)₃	10	4/10	0,4±0,4	10	0%
H:PBS	10	6/10	0,6±0,6	10	0%

Se estableció el porcentaje de reducción parasitaria por animal y por grupo determinando la media \pm DE.

Los valores fueron determinados de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

5.c) Curva de supervivencia

A partir de los 19 días post infestación, los animales de los grupos experimentales F, G y H comenzaron a morir. La supervivencia de los animales fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el grupo E inmunizado con rFhGSTMu+ Al(OH)₃, en el cual 7 ratones sobrevivieron hasta el final del ensayo y no presentaron en la necropsia lesiones en hígado. Estas diferencias fueron significativas ($p < 0,05$) respecto de los otros grupos.

Gráfico 5: Curva de supervivencia

Los valores fueron determinados de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

5.d) Evaluación de la producción de IFN- γ e IL-4 *in vitro*

Se realizó el cultivo de esplenocitos *in vitro* para evaluar la producción de IFN- γ e IL-4 en los cuatro grupos experimentales como indicadores del perfil de la respuesta inmunitaria (Th1 o Th2, respectivamente).

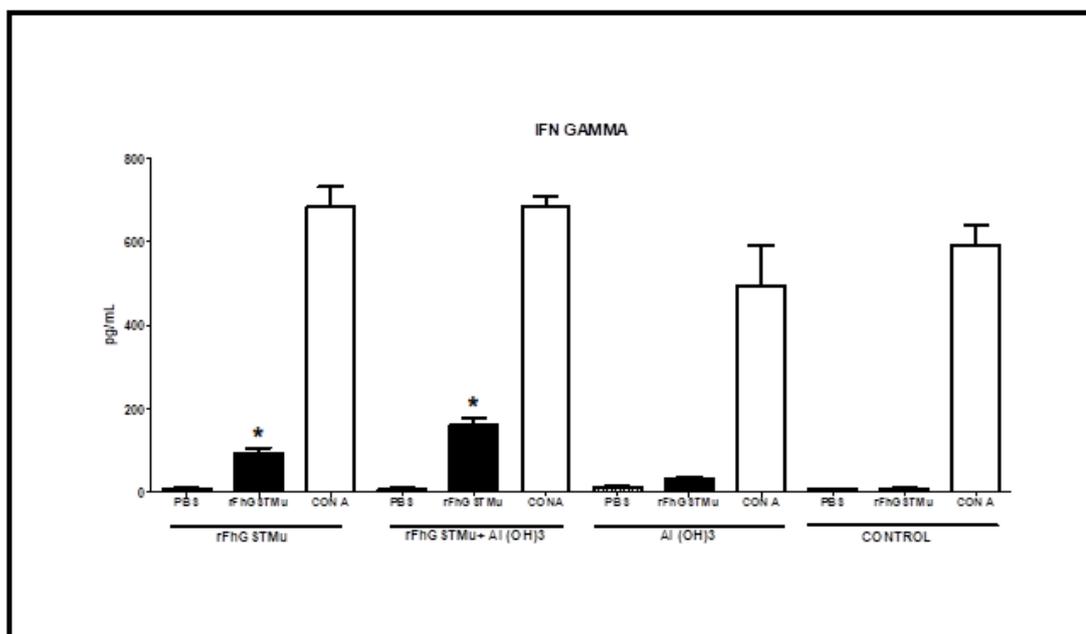
En los diferentes grupos de inmunización se detectaron niveles significativos de IFN- γ e IL-4 (Gráficos 6 y 7).

En el Gráfico 6 se observa que la inmunización con rFhGSTMu y con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ indujo a la producción de IFN- γ ; sin embargo, la producción de IFN- γ fue muy baja en los grupos restantes.

En el Gráfico 7 se puede observar que la inmunización con rFhGSTMu y con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ indujo la producción de IL-4 y la producción de IL-4 es muy baja en los grupos restantes.

Cuando se compara la producción de ambas citoquinas se observó que en el grupo inmunizado con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ la expresión de IFN- γ fue baja y la IL-4 alta, lo que indica que la respuesta permanece polarizada hacia una respuesta tipo Th2.

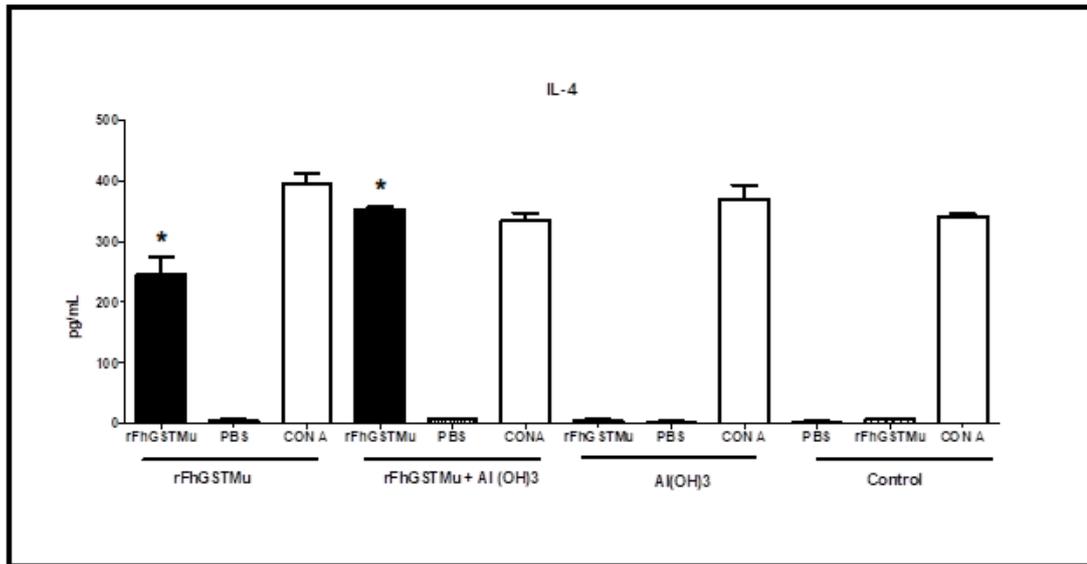
Gráfico 6: Producción de IFN- γ en los distintos grupos de inmunización



Producción de IFN- γ en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con rFhGSTMu, Con A y RPMI.

La determinación de IFN- γ se realizó con un ELISA de captura a partir del sobrenadante recolectado a las 48 h. Cada valor representa el promedio \pm DE por grupo.

*Diferencia significativa para el mismo estímulo contra el grupo control no inmunizado ($p < 0,05$)

Gráfico 7: Producción de IL-4 en los distintos grupos de inmunización

Producción de IFN- γ en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con rFhGSTMu, Con A y RPMI.

La determinación de IL-4 se realizó con un ELISA de captura a partir del sobrenadante recolectado a las 48 h. Cada valor representa el promedio \pm DE por grupo.

*Diferencia significativa para el mismo estímulo contra el grupo control no inmunizado ($p < 0,05$)

5.e.1) Imágenes macroscópicas de los hígados de ratones con lesión

A fin de determinar la infestación por las metacercarias *de F. hepatica* se evaluó el daño en los hígados de los ratones con lesión macroscópica. Los hígados de los animales del grupo E (con rFhGSTMu+ Al(OH)₃) no presentaron alteraciones macroscópicas, siendo friable al corte y de textura y color homogéneo (imagen de hígado normal) como se observa en la **Imagen 3**.

Los animales de los otros grupos presentaron lesiones con diferente grado de gravedad. Los hígados de los ratones de grupo inmunizado sólo con rFhGSTMu (**Imagen 4**) presentaron lesiones severas con una perihepatitis fibrosa con trayectos tortuosos blanquecinos sobre el lóbulo derecho. En el grupo inmunizado de ratones inmunizados con el adyuvante Al(OH)₃, los trayectos tortuosos se encontraron distribuidos en forma uniforme en la superficie (**Imagen 5**) con un aspecto similar al observado en los ratones sin inmunizar (**Imagen 6**).

Imagen 3: Aspecto macroscópico observado en los hígados de los animales inmunizados con rFhGSTMu+ Al(OH)₃



Hígado de un ratón inmunizado con **rFhGSTMu+ Al(OH)₃** sin alteraciones macroscópicas.

Imagen 4: Aspecto macroscópico de las lesiones observadas en los hígados de los animales inmunizados con rFhGSTMu



Hígado de ratón inyectado con rFhGSTMu que muestra trayectos tortuosos blanquecinos sobre el lóbulo derecho.

Imagen 5: Aspecto macroscópico de las lesiones observadas en los hígados de los animales inmunizados con $\text{Al}(\text{OH})_3$



Hígado de ratón inyectado con $\text{Al}(\text{OH})_3$ que muestra trayectos tortuosos blanquecinos uniformemente distribuidos en toda la superficie.

Imagen 6: Aspecto macroscópico de las lesiones observadas en los hígados de los animales sin inmunizar



Hígado de ratón control (sin inmunizar) que muestra trayectos tortuosos blanquecinos en toda la superficie de manera uniforme.

5.e.2) Análisis histopatológico de los hígados de ratones con lesión

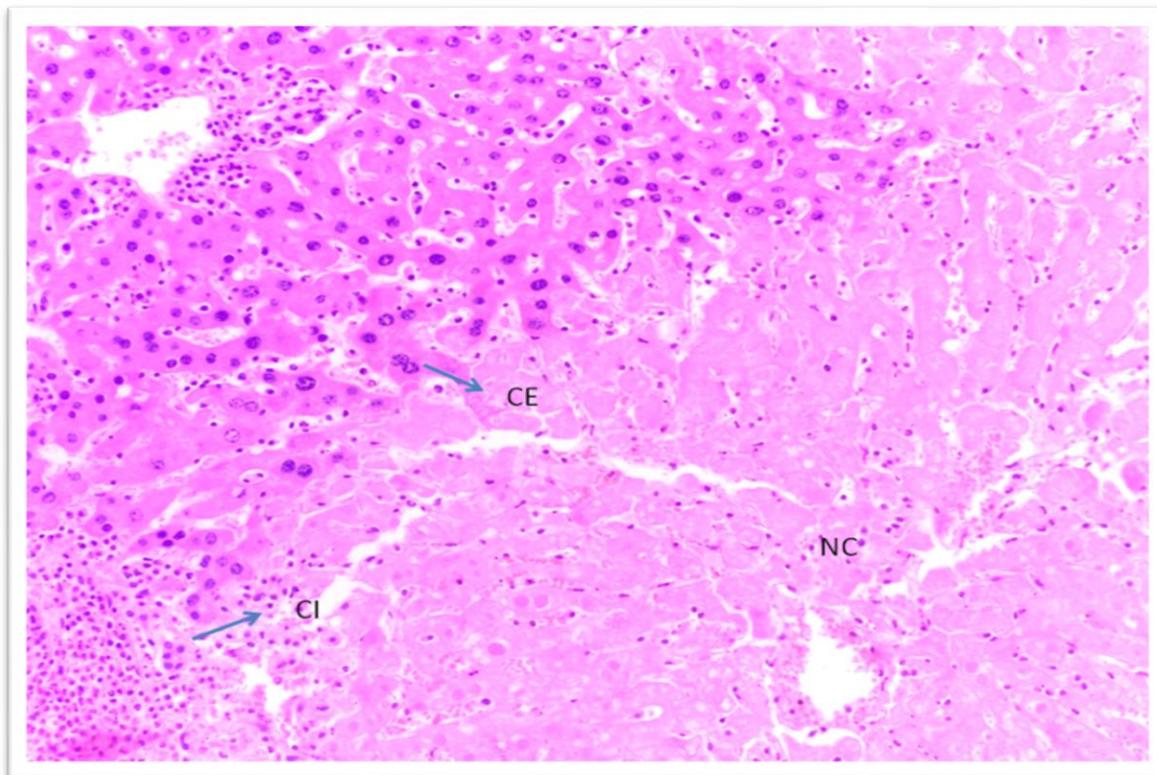
A fin de evaluar la protección parasitaria se analizó el daño histopatológico en los hígados de los ratones con lesión macroscópica de los distintos grupos.

A continuación, se describen las imágenes que corresponden a dos ratones del grupo inmunizado con rFhGSTMu (**Imágenes 7 y 8**), un ratón del grupo inmunizado con el adyuvante Al(OH)₃ (**Imagen 9**) y dos ratones infestados sin inmunizar (**Imágenes 10 y 11**), que presentaban lesiones hepáticas macroscópicas en la necropsia.

En las **Imágenes 7 y 8** se observa que el parénquima hepático se encuentra afectado con áreas de necrosis coagulativa. En las áreas periféricas se observa un infiltrado abundante de linfocitos, macrófagos y neutrófilos mezclados con una cantidad moderada de sangre. En los espacios porta hay proliferación de conductos biliares y el tejido conectivo esta infiltrado por células inflamatorias.

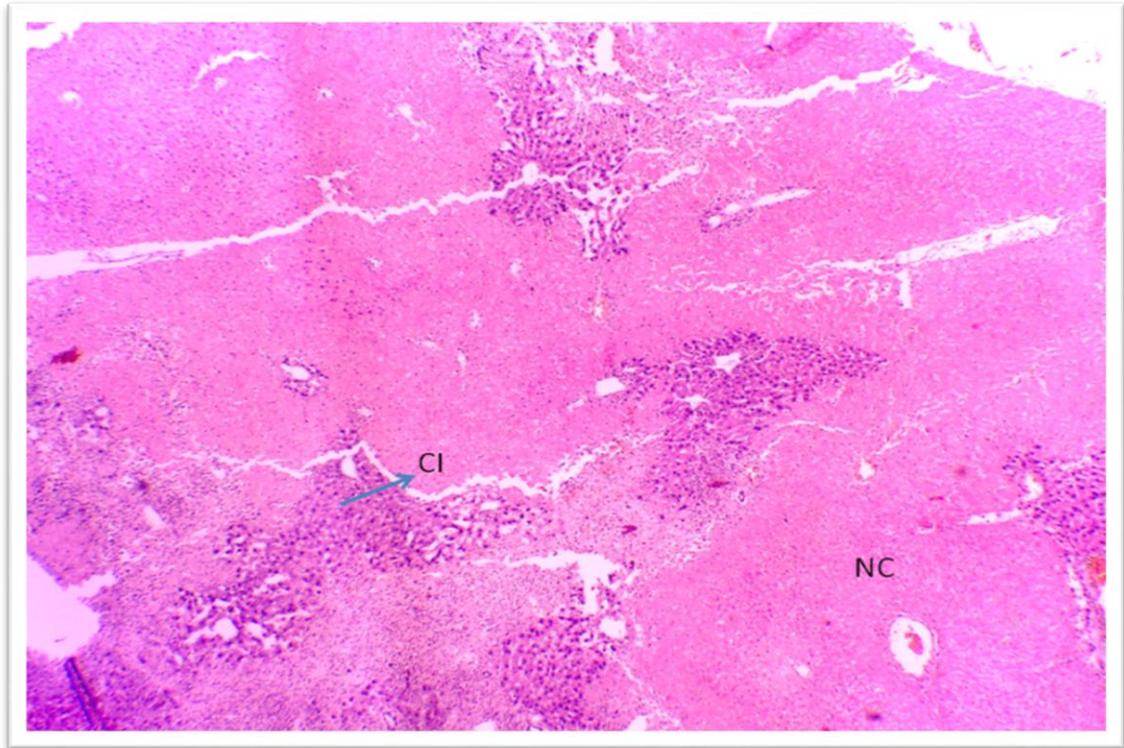
En las **Imágenes 9, 10 y 11** se encontraron fasciolas juveniles con un tamaño de 4 milímetros de largo por 1,5 milímetros de ancho, con numerosos eosinófilos alrededor. En la **Imagen 7** se observa que en el parénquima hepático las áreas de necrosis mantienen la arquitectura y presentan hepatocitos agrandados con el citoplasma hipereosinofílico y frecuentemente con mineralización. Los núcleos de los hepatocitos afectados están picnóticos o fragmentados. Los parásitos poseen un parénquima rodeado de un tegumento eosinofílico claro de aproximadamente 20 µm de espesor y sin espículas. El parénquima contiene intestino delgado, testículos en la región central del parásito, ovarios en la región externa del parénquima y el útero de forma irregular en la porción caudal del parásito, el cual está relleno por un material granular amarillo intenso como se observa en la **Imagen 9**. También se observa una abundante cantidad de tejido de granulación que rodea a los parásitos en los hepatocitos y en los espacios porta. En otras secciones existen áreas rellenas de sangre (hemorragia) mezcladas con células inflamatorias y fibrina (**Imágenes 8 y 10**).

Imagen 7: Lesiones microscópicas observadas en hígado de ratón del grupo inmunizado con rFhGSTMu



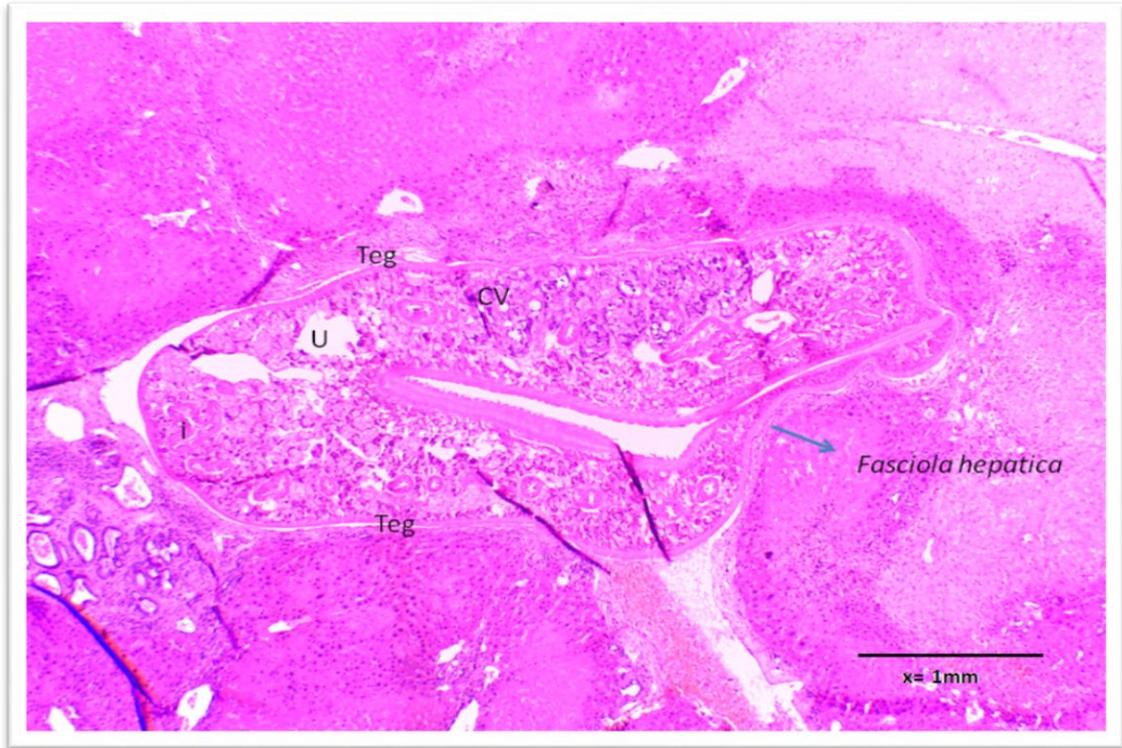
Descripción: El parénquima hepático se encuentra afectado por áreas de necrosis coagulativa. Las áreas periféricas se encuentran infiltradas por una cantidad abundante de linfocitos, macrófagos y neutrófilos (20X) **Referencias:** **CE** (cuerpo eosinofílico), **NC** (necrosis coagulativa), **CI** (células inflamatorias: macrófagos, linfocitos y neutrófilos).

Imagen 8: Lesiones microscópicas observadas en hígado de ratón del grupo inmunizado con rFhGSTMu



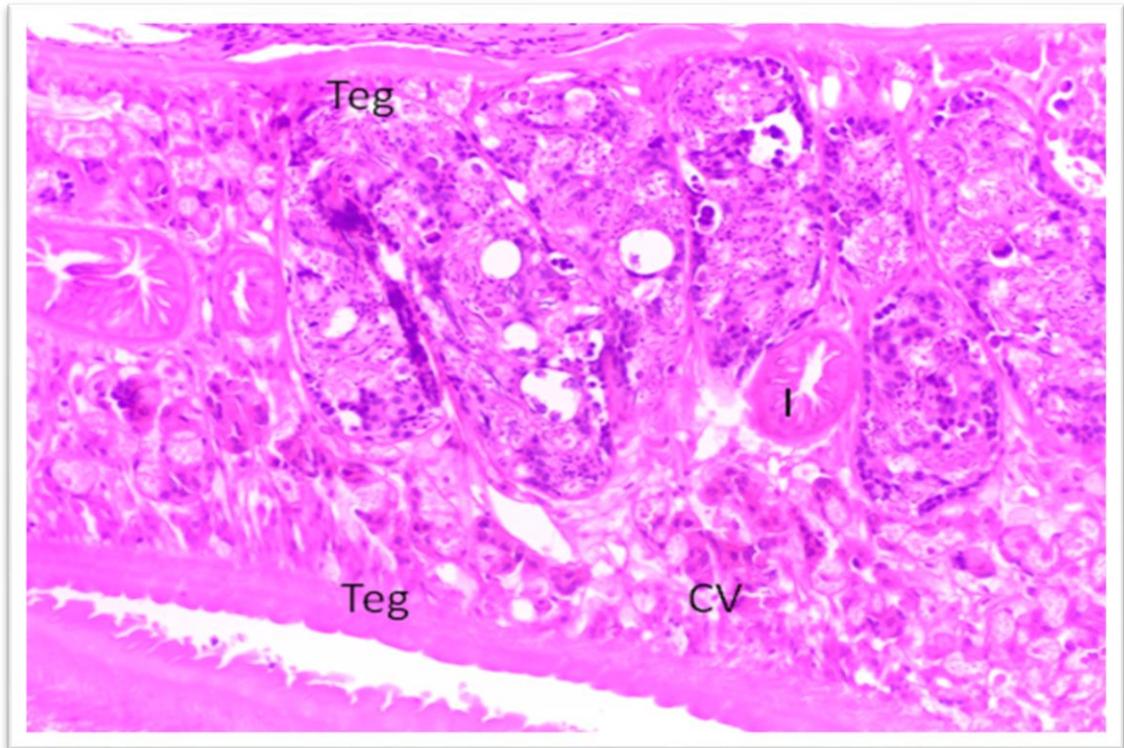
Descripción: El parénquima hepático se encuentra afectado por áreas de necrosis coagulativa. Las áreas periféricas se encuentran infiltradas por abundante cantidad de linfocitos, macrófagos y neutrófilos viables. (4X). **Referencias:** NC (necrosis coagulativa), CI (células inflamatorias: macrófagos, linfocitos y neutrófilos).

Imagen 9: Lesiones microscópicas y presencia de *Fasciola hepatica* observadas en hígado de ratón del grupo inmunizado con el adyuvante Al(OH)₃



Descripción: Localización de las diferentes estructuras de *Fasciola hepatica*. (4X). **Referencias:** **Teg.** (tegumento), **I** (intestino), **CV** (células vitelinas), **T** (testículos) y **U** (útero).

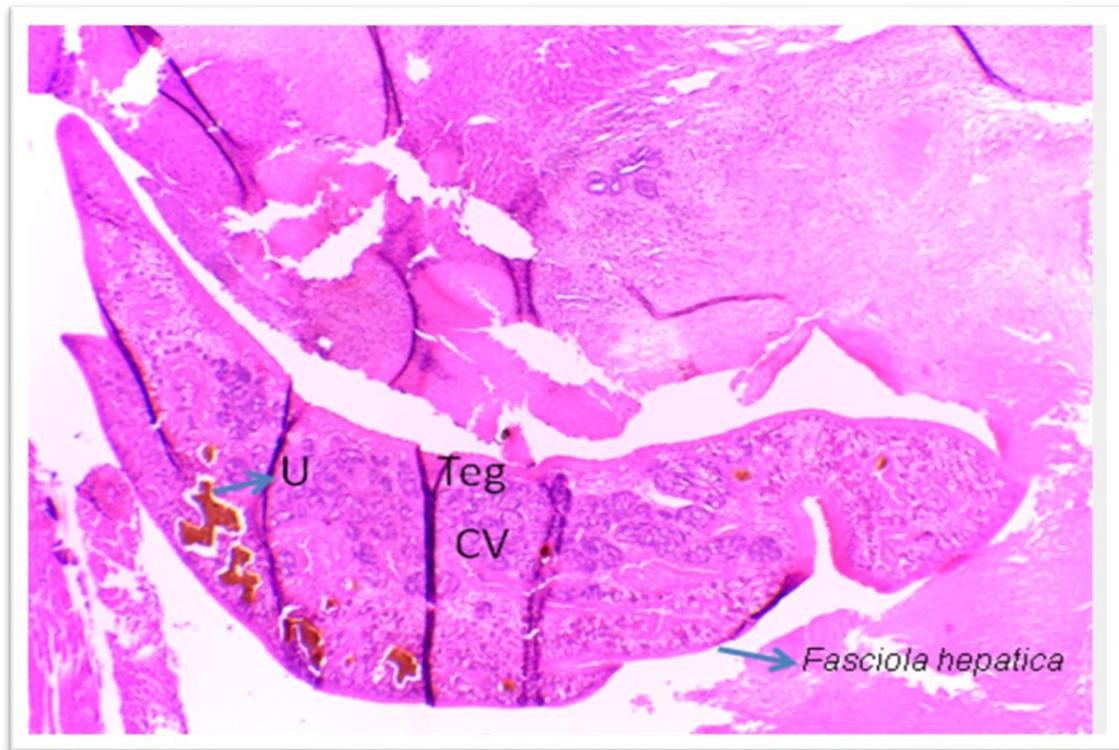
Imagen 10: Lesiones microscópicas observadas en hígado de ratón del grupo no inmunizado



Descripción: Localización de las diferentes estructuras de *Fasciola hepatica* (10X) **Referencias:**

Teg. (tegumento), **I** (intestino), **CV** (células vitelinas), **T** (testículos) y **U** (útero).

Imagen 11: Lesiones microscópicas y presencia de *Fasciola hepatica* observadas en el hígado de un ratón del grupo no inmunizado



Localización de las diferentes estructuras de *Fasciola hepatica* (10X) **Referencias:** Teg. (tegumento), CV(células vitelinas) y U (útero).

6- ENSAYO DE INMUNIZACIÓN PASIVA

Este ensayo se realizó para evaluar el rol de los anticuerpos en la protección. Se determinaron los valores de las enzimas GOT, GPT, FA y el porcentaje de reducción en el número de fasciolas en los ratones inmunizados.

6.a) Análisis de las enzimas hepáticas

Se determinaron los valores de las tres enzimas hepáticas séricas: GOT, GPT y FA de acuerdo a lo expresado en el punto 4. Los valores de las enzimas en el grupo inmunizado con rFhGSTMu+ Al (OH)₃ fueron significativamente ($p < 0,05$) más bajos que los registrados en los otros grupos (Tabla 10).

Tabla 10: Valores de enzimas hepáticas en los grupos de inmunización

Determinación enzimática	rFhGSTMu+ AFI	rFhGSTMu+ Al(OH) ₃	rFhGSTMu+ Quil A	Control Infestados	Valor de referencia U/L
GOT	*555±85	249±32	*592±76	*593±77	55-251
GPT	*883±101	207±28	*841±106	*844±123	28-184
FA	*231±38	106±22	*212±39	*256±41	28-94

Los valores de las enzimas se determinaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

6.b) Porcentaje de reducción en el número de fasciolas en los ratones inmunizados

Los resultados obtenidos luego de la inmunización pasiva se presentan en la **Tabla 11**. El grupo inmunizado con inmunoglobulinas G del grupo donador vacunado con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ redujo significativamente el número de fasciolas y de lesión hepática (70%) ($p < 0,05$) respecto del grupo no vacunado.

Tabla 11: Porcentaje de reducción parasitaria establecido de acuerdo al recuento de fasciolas y a la lesión hepática en los distintos grupos de inmunización

Grupos de inmunización	N° de ratones	Recuperación	Media \pm DE	N° de	% Reducción
		de fasciolas/total de ratones		ratones con lesión hepática	
A:rFhGSTMu+AFI	10	5/10	0,5\pm0,47	7	30%
B:rFhGSTMu+ Al(OH)₃	10	3/10	0,3\pm0,45	3	70%
C:rFhGSTMu+ Quil A	10	5/10	0,5\pm0,9	9	10%
D:Control	10	9/10	0,9\pm0,56	10	-

Se estableció el porcentaje de reducción parasitaria por animal y por grupo determinando la media \pm DE.

Los valores fueron determinados de acuerdo a lo descripto en Materiales y Métodos.

DISCUSION

La fasciolosis es una enfermedad zoonótica causada por parásitos del género *Fasciola*, el cual está distribuido mundialmente y representado por dos especies: *F. hepatica* y *F. gigantica*, la primera presenta menor tamaño respecto de la segunda y se encuentra en áreas templadas, la segunda en zonas tropicales (Olaechea, 2004).

Se han desarrollado diferentes estrategias de control de la fasciolosis. Sin embargo, el control químico a través del uso de diferentes compuestos sigue constituyendo la principal herramienta en la lucha contra este parásito. Triclabendazole (TCBZ) es el antihelmíntico más empleado debido a que el mismo presenta una elevada eficacia sobre estadios inmaduros y maduros de *F. hepatica*. El uso indiscriminado de estos compuestos químicos en diferentes regiones del mundo ha generado una importante presión de selección, reportándose el desarrollo de cepas de *F. hepatica* resistentes a la mayoría de los fasciolicidas, especialmente a TCBZ.

En general, los mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencia antihelmíntica son principalmente el resultado de cambios conformacionales de la molécula blanco, y/o variaciones en los mecanismos de captación y eflujo de drogas y/o variaciones en su metabolismo ante un xenobiótico (Ouellette, 2001). Recientemente se ha comenzado a avanzar en el entendimiento del fenómeno de resistencia a ciertos antihelmínticos benzimidazólicos a partir del aislamiento en *F. hepatica* de una cepa resistente a TCBZ (TCBZ-R). La cepa *Sligo*, ha demostrado en estudios realizados *in vivo* e *in vitro* ser TCBZ-R en adultos y juveniles (Coles y Stafford, 2001; Kerboeufb *et al.*, 2003). Aunque en el caso de otros helmintos la resistencia a ciertos BZDs se explica por la sustitución de tirosina por fenilalanina en la posición 167 o 200 de la β -tubulina del parásito (Kwa *et al.*, 1994; Fairweather *et al.*, 2004), es posible que la resistencia a TCBZ manifestada por la cepa *Sligo* (TCBZ-R) de *F. hepática* sea generada por un mecanismo diferente, ya que al comparar la secuencia de la β -tubulina de las fasciolas resistentes con aquellas TCBZ-S (cepa *Cullompton*) la secuencia de aminoácidos en la posición implicada es idéntica (Fairweather *et al.*, 2007). La entrada de TCBZ al interior del trematodo ocurre fundamentalmente por difusión vía tegumento más que por ingestión oral (Álvarez *et al.*, 2006). Hoy se sabe que dicha difusión es significativamente menor en la cepa *Sligo* (TCBZ-R) que en la cepa *Cullompton* (TCBZ-S) (Álvarez *et al.*, 2005, 2006). Interesantemente esto no se manifiesta para todos los BZDs ya que la captación de ABZ y/o sus metabolitos no manifiesta diferencias entre ambas cepas (Alvarez *et al.*, 2006) sugiriendo que en el caso de la captación de TCBZ podrían estar involucradas las

bombas de eflujo (v.g. pg-P). La sobreexpresión de la pg-P ya se ha relacionado a fenómenos de resistencia antihelmíntica en otras especies de parásitos (Kerboeuf *et al.*, 2003; Fairweather *et al.*, 2004) y ya se ha demostrado su probable reversión co-incubando con inhibidores de dicha vía (Ivermectina) (Álvarez *et al.*, 2006). En contraste, mientras la Ivermectina no impacta en la captación de ABZ, la co-incubación con Verapamilo (inhibidor pg-P) conduce a severas rupturas del tegumento en TCBZ-R comparables a las obtenidas en cepas TCBZ-S expuestas a TCBZ.SO (Stitt y Fairweather, 1992). Los resultados obtenidos a la fecha siguen siendo inconclusos afianzándose el mayor involucramiento de la probable manifestación de resistencia a los BZDs dado por el metabolismo exacerbado en la sulfoxidación de TCBZ a sus metabolitos sulfóxido y sulfona (TCBZ.SO y TCBZ.SO₂) (Álvarez *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2004). Con el uso de inhibidores metabólicos se ha demostrado que el sistema FMO es la principal vía de metabolización de TCBZ y que su co-incubación impacta más sobre la metabolización de la cepa *Sligo* (TCBZ-R) (Álvarez *et al.*, 2005). Actualmente se hace necesario aportar mayores conocimientos referidos al estudio de la verdadera participación de las vías enzimáticas de detoxificación de Fase I y Fase II involucradas.

En este contexto, el control inmunológico de la fasciolosis a través del desarrollo de vacunas, surge como una alternativa prometedora, más económica y efectiva para reducir la morbilidad y evitar pérdidas económicas en animales de producción y en otros herbívoros y de este modo evitar la transmisión al humano. En este sentido, se han llevado a cabo numerosos ensayos de vacunación que abarcan desde la evaluación de distintos extractos del parásito (Olaechea, 2004) hasta la utilización de antígenos definidos purificados de *F. hepatica* (Sexton, *et al.* 1990; Spithill y Dalton, 1998; Spithill *et al.*, 1999), antígenos recombinantes (Almeida *et al.*, 2003; Dalton *et al.*, 2006; Zafra Leva, 2012) y formulaciones que incluyen ADN plasmídico que codifica para proteínas inmunodominantes o enzimas (Kofta *et al.*, 2000; Wedrychowicz y Wisniewski, 2003).

Se han estudiado antígenos definidos que permiten su producción recombinante a gran escala. En la mayoría de los ensayos se han utilizado como inmunógenos enzimas que participan activamente en el metabolismo del parásito, tales como proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP), enzimas del metabolismo detoxificativo como las Glutathion S-Transferasa (GST), catepsinas, hemoglobina, Leucin Amino Peptidasas (LAP), entre otras (Dalton *et al.*, 2006). Sin embargo, estos inmunógenos confirieron muy baja protección y no presentaron resultados reproducibles (Toet *et al.*, 2014).

En la presente Tesis Doctoral se discuten los resultados obtenidos, haciendo énfasis en las dos áreas de interés indicadas como justificación de la Tesis. Por una parte, los estudios bioquímicos de las principales enzimas de detoxificación (fase 2) en cepas de *F. hepatica* susceptibles y resistentes a TCBZ y los correspondientes estudios moleculares del gen GST Mu, por otro lado, la evaluación de la inmunogenicidad y protección conferida por la proteína rFhGSTMu formulada en tres adyuvantes diferentes en el modelo murino.

DE LOS ESTUDIOS METABÓLICOS:

En relación a los estudios metabólicos los hallazgos más relevantes se registraron en el estudio de las enzimas Glutación Peroxidasa (GPx), Glutación Reductasa (GSR) y Glutación S-Transferasa total (GST) y su isoenzima GST Mu tanto en las cepas susceptibles y resistentes a TCBZ.

Nuestros estudios previos sobre la cepa *Sligo* (TCBZ-R) confirmaron en la Fase I de desintoxicación, una sobreexpresión de Flavin-Monooxigenasas (Scarcella, 2011). Este fenómeno no debería ser la única respuesta que el trematodo tiene. En los procesos de desintoxicación en la Fase I, la enzima Carboxil Esterasa (CE) es una serina esterasa dependiente de una amplia especificidad de sustrato. Esta familia de enzimas está involucrada en muchas funciones metabólicas, incluida la desintoxicación de xenobióticos. En la Fase II existe un sistema que usa el Glutación (GSH). Es una secuencia de ciertas enzimas que culminan agregando GSH reducido al xenobiótico aumentando su solubilidad en agua y facilitando su excreción. La adición de glutación juega un papel importante en la defensa antioxidante en diferentes tejidos catalizando la reducción de oxidado a GSH reducido que GST utilizará para reducir el peróxido y el lipoperóxido, que son oxígeno reactivo especies. Este proceso involucra Glutación Peroxidasa (GPx), Glutación Reductasa (GSR) y Glutación S-Transferasa (GST). En la presente tesis evaluamos, *in vitro*, la actividad citosólica de diferentes enzimas metabolizadoras de xenobióticos de la Fase I: CE y Fase II: GST, GPx y GSR en adultos de *F. hepatica* susceptibles a TCBZ (TCBZ-S) y resistentes a TCBZ (TCBZ-R), respectivamente la cepa *Cullompton* y las cepas *Sligo* y *Oberon*. En las cepas TCBZ-R *Sligo* y *Oberon*, la actividad de GST, GSTMu, de GPx, y de GSR fueron respectivamente, más alta que en la cepa *Cullompton*, mientras que la actividad CE no difirió entre las diferentes cepas probadas.

Con respecto a la actividad de la enzima Carboxil Esterasa no hay diferencias significativas entre las cepas, por lo tanto, esta última no estaría involucrada en el fenómeno de resistencia.

DE LOS ESTUDIOS MOLECULARES:

Por lo expresado en el ítem anterior, la isoenzima GST Mu es una enzima detoxificativa y se encuentra potenciada en los aislamientos resistentes a TCBZ, por ello realizamos la optimización de la PCR para poder identificar y caracterizar el gen de interés (GST Mu).

Anteriormente mencionamos que se ha demostrado que en una cepa resistente a TCBZ (TCBZ-R) existe una mayor actividad detoxificativa por parte de la isoenzima Glutación S-Transferasa Mu (GST Mu). En la presente Tesis se identificó y caracterizó el gen GST Mu aislado de cepas de *F. hepatica* susceptibles y resistentes a TCBZ. El ARN total se transcribió a cDNA por transcripción inversa y se obtuvo el amplicón de 657 pb correspondiente al gen GST Mu.

Cuando se analizó la proteína resultante, se confirmó al menos un cambio de aminoácido en la posición 143 en la isoenzima GST Mu de la cepa TCBZ resistente. Estos resultados contribuyen a la comprensión de los mecanismos de resistencia a TCBZ por parte del trematodo *F. hepatica*.

DE LOS ESTUDIOS DEL DESARROLLO DE UN MODELO MURINO EN FASCIOSIS:

El empleo de grandes animales para evaluar vacunas contra fasciolosis presenta dificultades relacionadas a los costos, espacio y manipulación. Por este motivo, el empleo de modelos experimentales surge como una alternativa preliminar importante para seleccionar la mejor estrategia de inmunización y al mismo tiempo evaluar la respuesta inmunitaria con mayor detalle, si bien, los datos obtenidos no serían necesariamente extrapolables a la especie susceptible. A pesar de su pequeño tamaño, el ratón es la especie de laboratorio más empleada para los ensayos preliminares de vacunas por las ventajas que representa su empleo (Pérez, 2015).

Un aspecto importante para el desarrollo de un modelo ratón es definir el número de MCs que se inocularán y evaluar el éxito en la implantación de las fasciolas, información esencial para determinar si hay significancia estadística en los ensayos de protección entre el grupo vacunado y no vacunado. Por otro lado, se debe establecer el criterio para determinar si hubo protección. En este sentido, distintos autores han evaluado la eficacia de las vacunas mediante la construcción de curvas de supervivencia o bien determinando el número de fasciolas, daño hepático a nivel macroscópico y/o curvas de anticuerpos anti-fasciola (Martinez-Fernández *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2015; Rojas Caraballo *et al.*, 2017). En la presente Tesis, se estableció un criterio de protección

basado en el número de fasciolas adultas recuperadas y en el daño hepático teniendo en cuenta el aspecto del hígado en el momento de la necropsia, excepto en el último ensayo con la proteína recombinante formulada en $Al(OH)_3$ donde además, se construyó una curva de supervivencia. En distintos estudios se han utilizado cantidades variables de MCs dependiendo de la especie o cepa de *Fasciola* y de la cepa de ratones inmunizados (Balb/c, C57Bl/6 o CD1). Rojas Caraballo *et al.* (2015) utilizaron 7 MCs de *F. hepatica* en ratones Balb/c, mientras que Espino y Rivera (2015) inocularon 10 MCs de la misma especie y Changklungmoa *et al.* (2016) emplearon 15 MCs de *F. gigantica*/ratón para los ensayos de protección. En esta Tesis, se evaluaron tres aislamientos de *F. hepatica*: una cepa susceptible a TCBZ de origen mexicano, una cepa resistente a TCBZ de origen peruano (Cajamarca) y el último, una cepa resistente a ABZ y susceptible a TCBZ de Argentina (CEDIVE, Chascomús), en función de las cepas disponibles en el laboratorio o bien, como en el último caso, para repetir el ensayo de protección con la formulación más eficaz. De acuerdo a los resultados obtenidos en la puesta a punto de la infestación, se decidió utilizar 7 MCs del aislamiento de Cajamarca para el desafío en los ensayos en los que se evaluaron las distintas formulaciones de rFhGSTMu mientras que la cepa CEDIVE se utilizó en el último ensayo.

Para estudiar la respuesta inmunitaria humoral inducida por una vacuna, se necesita extraer sangre para la obtención de suero. En todo ensayo en el que se evalúe la cinética de los anticuerpos mediante diferentes técnicas inmunológicas es importante obtener volúmenes de sangre que aseguren la recuperación de la volemia del animal conforme a las normas de bienestar animal. En el modelo ratón, la extracción de sangre por la vía submandibular es una técnica sencilla que permite conseguir suficiente cantidad de sangre sin la necesidad de usar anestesia con una adecuada y pronta recuperación del animal. Además, Nemzek *et al.* (2001); Peña *et al.* (2008) y Fernández *et al.* (2010) afirman que esta técnica contribuye al refinamiento de las 3Rs en el uso de los animales de laboratorio. En 2005, Golde *et al.* recomendaron la utilización de las lancetas Medipoint® para la extracción de sangre por esta vía. Heimann *et al.*, (2010) sugirieron el empleo de esta técnica bajo los efectos de la anestesia. Sin embargo, Holmberg *et al.* (2011) reportaron que la sangre recolectada mediante punción submandibular con lancetas sin anestesia era de excelente calidad y similar a la obtenida por la punción del plexo retroorbital para estudios de coagulación. Años más tarde, Regan *et al.* (2016) consideraron dificultosa la extracción de sangre a partir de animales anestesiados. Estos mismos autores reportaron que el uso de anestesia no permitía obtener un volumen suficiente de muestra, que la calidad de las mismas no era la óptima y que los animales estudiados presentaban letargia y hemorragias. En referencia al implemento utilizado para la punción, Peña *et al.* (2008) utilizaron agujas 21 G y 23 G en su reemplazo y

obtuvieron resultados similares. Estos autores no observaron signos evidentes de dolor ni lesiones relevantes en las sucesivas extracciones. Sin embargo, coinciden en que debido a la imprecisión en el sitio de punción, el empleo de la lanceta permitiría controlar mejor la profundidad y aportaría una mayor seguridad a la técnica. En Argentina, el costo elevado de este insumo y el tiempo de importación, motivaron a que en este trabajo de Tesis se implementara el uso de agujas 21 G en reemplazo de las lancetas. Asimismo, se incorporó una variante, el empleo del capuchón plástico cortado a 10 mm desde la punta, con el objetivo de establecer un tope/límite de profundidad que simule y/o reemplace a la lanceta descrita por Golde *et al.* (2010). De acuerdo a los resultados obtenidos, recomendamos la obtención de sangre submandibular sin anestesia mediante aguja sin capuchón para estudios que requieran el máximo volumen aceptable ya que esto no afecta la recuperación de los animales en cuanto a los hábitos de consumo e integración social.

DE LOS ESTUDIOS EN LA EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y EFICACIA DE LA PROTEINA rFhGSTMu EN EL MODELO MURINO.

Con el devenir de los años y gracias a los avances en el conocimiento de la respuesta inmunitaria y las técnicas de biología molecular, han surgido nuevas alternativas en el diseño de vacunas. Los antígenos recombinantes se producen en forma estandarizada y pueden seleccionarse de tal modo que no generen interferencia en el diagnóstico serológico.

Para el desarrollo de esta Tesis, se seleccionó como inmunógeno la proteína recombinante GST de *F. hepatica* teniendo en cuenta los antecedentes con GSTs homólogas de otros trematodos como *S. mansoni* (Sm28) y de *S. japonicum* (Sj26) (Brophy y Pritchard, 1994). Éstas protegieron contra la infestación experimental con MCs de *F. hepatica* en distintos animales de laboratorio (ratones y conejos) (Smooker, 1999). El primer ensayo en el cual se evaluó la proteína GST nativa de *F. hepatica* se realizó en ratas con la proteína formulada en Adyuvante de Freund Completo (AFC). Esta formulación no confirió protección significativa cuando se inmunizó por la vía subcutánea con dos dosis de 30 µg (Irving, 2003). Sin embargo, cuando se evaluó la eficacia en ovinos con una dosis 6 veces superior y con un esquema de tres dosis se observó una reducción en la carga parasitaria del 57% (Sexton *et al.*, 1990). De Bont *et al.*, (2003) inmunizaron bovinos con GST recombinante de *S. bovis* utilizando Al(OH)₃, Quil A o AFC. Aunque en este experimento se detectaron elevados niveles de anticuerpos, ninguna de las formulaciones utilizadas confirió protección contra *F. hepatica* en el ganado estudiado.

La proteína rFhGSTMu fue sintetizada por Genscript a partir del envío de la secuencia. Los resultados obtenidos indican que esta proteína fue estable y que además, conservó su actividad enzimática. En referencia a la dosis utilizada, se inmunizó con una dosis 10 µg para determinar la inmunogenicidad y protección obtenida con una dosis mínima. Dado que la respuesta obtenida en el primer ensayo fue eficaz, se mantuvo esta dosis en los sucesivos experimentos.

El empleo de proteínas recombinantes como inmunógenos requiere en la mayoría de los casos el uso de un adyuvante para potenciar su efecto (Batista-Duarte *et al.*, 2014). Además, es necesario que la vacuna se administre por la vía y bajo un esquema de inmunización adecuado (Hecker *et al.*, 2012). El adyuvante seleccionado debe estimular una respuesta inmunitaria potente, persistente, anamnésica y del perfil inmunitario adecuado contra el agente en cuestión (Batista-Duarte *et al.*, 2014). En la respuesta contra *F. hepatica* y contra otros nematodos, la respuesta humoral es fundamental para limitar el ciclo de vida del parásito (Berrecil Flores *et al.*, 2014; Moreno Pérez, 2015). Con el fin de desarrollar un modelo más completo y, además, de seleccionar una vacuna de referencia para estandarizar ensayos futuros de protección en ratón, se evaluó la respuesta inmunitaria estimulada por el inmunógeno rFhGSTMu formulado en tres adyuvantes diferentes: AFI, Quil A y Al(OH)₃.

La inmunización con rFhGSTMu indujo la producción de anticuerpos IgG séricos específicos que aumentó tras cada refuerzo a diferencia de lo observado en el grupo control (sin inmunizar). Si bien la vacunación generó anticuerpos con una dosis en todos los grupos, la formulación rFhGSTMu adsorbida en Al(OH)₃ indujo los mejores títulos, lo cuales permanecieron constantes hasta el momento del desafío. Esta respuesta temprana y permanente de anticuerpos IgG concuerda con los resultados obtenidos por otros autores cuando la proteína recombinante GST se administró en ratas (Zhongguo *et al.*, 2013). Aunque los niveles de anticuerpos no se elevaron post infestación, en el momento del sacrificio, los títulos de anticuerpos IgG en los grupos inmunizados fueron superiores a los del grupo control indicando que se desarrolló una respuesta anamnésica, particularmente en el grupo inmunizado con la proteína recombinante adsorbida en hidróxido de aluminio en el cual no se observó un descenso marcado de los mismos.

Distintos trabajos han demostrado que en la respuesta inmunitaria contra la infestación por MCs de *Fasciola spp.* es de perfil mixto Th1/Th2, con predominio Th2, según lo indicado por los niveles de IgG2a e IgG1 y que existe una inmunomodulación por LT reguladores, los cuales liberan IL-10 y TGF-β inhibiendo la respuesta inflamatoria (Changklungmoa *et al.*, 2016; Kueakhai *et al.*, 2013a, 2015; Chantree *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en esta Tesis indican que la inmunización con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ polarizó la respuesta hacia un perfil Th2 más marcado y

constante a lo largo del ensayo, en comparación con el tipo de respuesta observada en los grupos inmunizados con rFhGSTMu+ AFI o con rFhGSTMu+ Quil A. Esto no es sorprendente dado que el Al (OH)₃ estimula la respuesta hacia una polarización Th2 sumado a que los ratones Balb/c también manifiestan esta tendencia o desvío comparado con otras cepas de ratones (Batista-Duarte *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta que la respuesta humoral tiene un rol importante en la protección, evaluamos si la transferencia de IgG purificada a partir de los sueros inmunes obtenidos de cada uno de los grupos de inmunización (donadores) protegía contra fasciola en los grupos receptores. La IgG anti-rFhGSTMu obtenida tras la inmunización con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ redujo significativamente el número de fasciolas (70%) respecto del grupo no vacunado. Estos datos confirman que los anticuerpos específicos tienen un rol en la protección ya sea: a) inactivando la enzima en el parásito cuando éste se alimenta por la ventosa oral, b) inactivando la enzima por el pasaje de los anticuerpos a través del tegumento (difusión transtegumentaria), c) por bloqueo del poro anal o poro bucal, d) mediante la activación de la vía clásica del complemento o bien a través de la citotoxicidad celular dependiente de (ADCC) mediada por macrófagos o bien por polimorfonucleares (principalmente eosinófilos) (Moreno Pérez, 2015). La inactivación de la enzima mediante la acción de los anticuerpos inhibiría los mecanismos de detoxificación del parásito principalmente en las fasciolas recién desenquistadas (NEJs) o en las formas inmaduras, de esta manera se vulneraría la gran resistencia que tienen las formas juveniles en la fase prehepática, cortando el ciclo de vida. Por otro lado, es posible que la activación del complemento o la ADCC lesione el parénquima del parásito o los conductos secretorios afectando la supervivencia del parásito.

En el último ensayo de protección, cuando se inmunizó con la rFhGSTMu administrada con y sin adyuvante, se estudió la respuesta celular *in vitro* mediante la determinación de los niveles de IFN- γ e IL-4 como indicadores de una polarización Th1-Th2. Los esplenocitos de los ratones inmunizados con rFhGSTMu+ Al (OH)₃, luego de la estimulación con la proteína recombinante, produjeron una mayor concentración de IL-4 respecto de IFN- γ , lo cual refuerza la idea de que la respuesta inducida tuvo principalmente un perfil Th2. En este ensayo el empleo de la proteína recombinante con hidróxido de aluminio incrementó aún más los niveles de IL-4, lo cual demuestra el efecto potenciador del adyuvante. Estos resultados concuerdan con lo reportado en por otros autores quienes inmunizaron ratas con la proteína recombinante GST (Zhongguo *et al.*, 2013).

Si bien, el IFN- γ se encontró en baja concentración, la formulación de la proteína con el adyuvante indujo una mayor producción de esta citoquina, la cual también pudo haber participado activando

a los macrófagos con la consiguiente liberación de óxido nítrico, molécula letal en las primeras etapas post-infestación para distintos trematodes (Sibille *et al.*, 2004).

En los ensayos realizados, la formulación rFhGSTMu+ Al(OH)₃ confirió una protección parasitaria entre el 70%-90% respecto del grupo control no vacunado. El perfil de respuesta constante desde etapas tempranas de infestación coincide con los resultados obtenidos con la proteína recombinante GST en ratas (Zhongguo *et al.*, 2013). Por el contrario, en los grupos donde se emplearon las otras formulaciones no se observaron diferencias en el recuento de fasciolas y en las lesiones hepáticas encontradas respecto del grupo control sin vacunar (0 a 10%). Como ya se indicó, la protección se evaluó teniendo en cuenta no sólo la carga parasitaria sino también las lesiones hepáticas macroscópicas en el momento de la necropsia. Además, se analizaron los valores de las enzimas hepáticas y los datos de la histopatología para complementar la información anterior, como ya ha sido descrito por otros autores (Zafra *et al.*, 2012). En el grupo inmunizado con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ no se registraron lesiones en el momento la necropsia, establecida a los 21 días post-infestación para los primeros ensayos. A diferencia del sacrificio en tiempo fijo, en el último ensayo, se esperó a que los animales murieran con el objetivo de graficar una curva de supervivencia. Ésta indicó que todos los animales inmunizados con la proteína sola, con el adyuvante o los animales controles sin inmunizar murieron entre el día 19 y el día 25 post infestación. Respecto del grupo vacunado con rFHGSTMu+ Al (OH)₃, sólo murieron 3 ratones entre el día 25 y 60 post-infestación, por lo cual se decidió sacrificar los animales en este último punto. No se encontraron fasciolas, ni alteraciones macroscópicas o microscópicas en el hígado. En referencia a los valores de las enzimas hepáticas y formula leucocitaria completa a partir de los 14 días post infestación, la inmunización con rFHGSTMu+ Al (OH)₃ presentó los niveles más bajos (dentro de los valores de referencia), indicando indirectamente que no había daño hepático. Estos resultados demuestran que los animales del grupo inmunizado con rFhGSTMu+ Al(OH)₃ tuvieron una respuesta temprana a las larvas migratorias que contribuyó a evitar el daño hepático.

Los resultados obtenidos en esta Tesis permiten concluir que la proteína rFhGSTMu adsorbida en hidróxido de aluminio es un buen candidato vacunal en el modelo ratón y alientan a evaluar esta formulación en el ovino con el objetivo de estudiar la respuesta inmunitaria inducida y la protección conferida contra *F. hepatica*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Acha P.N. and Szyfres B.Z. (1977). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington, Organizacion Panamericana de la Salud. Publicación Científica, 354.

Acosta D., Cristina J., Uriarte G., Lanzzeri S. y Gama S. (1989). Estudio preliminar sobre la resistencia conferida a bovinos por metacercarias irradiadas de *Fasciola hepatica* en Uruguay. *Veterinaria* 25, 12-20.

A'gadir H., Haroun E.M. y Gameel A.A. (1987). The protective effect of irradiated metacercarias of *Fasciola gigantica* against homologous challenge in sheep. *Journal of Helminthology* 61, 137-142.

Allison A.C. y Byars N.E. (1986). An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity. *Journal of Immunological methods* 24: 95(2), 157-68.

Álvarez L., Sánchez S. and Lanusse C. (1999). In vivo and ex vivo uptake of albendazole and its sulphoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behaviour in sheep. *J Vet. Pharmacol. Ther.* 22(2): 77-86

Alvarez-Sánchez, M., Mainar-Jaime, R., Pérez-García, J., Rojo-Vázquez, F. (2006). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet Rec.* 23 :424-5.

Alvarez L.I., Solana H.D., Mottier M.L., Virkel G.L., Fairweather I. and Lanusse C.E. (2005). Altered drug influx/efflux and enhanced metabolic activity in triclabendazole-resistant liver flukes *Parasitol.* (131): 501–510.

Andersson C., Mosialou E., Weinander R., Morgenstern R. (1994). Enzymology of microsomal glutathione S-transferase. *Adv Pharmacol.* 27:19–35.

Anziani O., Zimmermann G., Guglielmo A., Vasquez R. and Suarez V. (2000). Resistencia a las ivermectinas de bovinos parasitados por *Cooperia* spp. Comunicación preliminar. *Vet. Arg.* 164: 280-281.

Baeza E., Poitou I., Villejoubert C. y Boulard C. (1994). Complement depletion in rats infected with *F. hepatica*: in vivo and in vitro studies. *Veterinary Parasitology* 51, 219-230.

Batista-Duharte Alexander., Lastre Miriam y Perez Oliver. (2014). Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas.

Berasain P., Carmona C., Frangione B., Dalton J.P. y Goñi F. (2000). *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Experimental Parasitology* 94(2), 99-110.

Belkaid y Sun C.M. y Bouladoux N. (2006). Parasites and immunoregulatory T cells. *Current Opinions in Immunology* 18(4), 406-12.

Becerril Flores M.A. (2014) *Parasitología médica*, cuarta edición.

Bio Ventures para la salud global. 2015

Bomford (1989). Adjuvants for anti-parasite vaccines. *Parasitology Today* 5(2), 41-6

Boray J.C. (1985). *Flukes of domestic animals*, Elsevier.

Bossaert K., Farnir F., Leclipteux T., Protz M., Lonneux J.F. y Losson B. (2000a). Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 87, 103-123.

Bossaert K., Jacquinet E., Saunders J., Farnir F. y Losson B. (2000b). Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 88, 17-34.

Brennan G.P., Fairweather I., Trudgett A., Hoey E., McCoy, McConville M., Meaney M., Robinson M., McFerran N., Ryan L., Lanusse C., Mottier L., Alvarez L., Solana H., Virkel G. y Brophy P.M. (2007). Understanding triclabendazole resistance. *Exp. Mol. Pathol.* (82): 104–109.

Brofhy P. M., Papauopoulos A., Toukaki M., Colks B., Korting W. and Barrett J. (1989). Purification of cytosolic glutathione transferases from *Schistosomus solidus* (plerocercoid): interaction with anthelmintics and products of lipid peroxidation. *Molec. Biochem. Parasitol.* 36: 187-196.

Brophy P.M., Crowley P. and Barrett J. (1990). Detoxification reactions of *Fasciola hepatica* cytosolic glutathione transferases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39(2): 155–161.

Brunsdon R.V. (1980). Principles of helminth control. *Vet. Parasitol.* 6(1-3): 185-215.

Campbell N.J., Gregg P., Kelly D.J. y Dineen J.K. (1978). Failure to induce homologous immunity to *Fasciola hepatica* in sheep vaccinated with irradiated metacercariae. *Veterinary Parasitology* 4, 143-152.

Canevari, J., Ceballos, L., Sanabria, R., Romero, J., Olaechea, F., Ortiz, P., Cabrera, M., Gayo, V., Fairweather, I., Lanusse, C., Alvarez, L. (2014). Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. *J. Helminthology.* 88, 286-292

Carmona C., Dowd A.J., Smith A.M. y Dalton J.P. (1993). Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and Biochemical Parasitology* 62, 9-17.

Campbell N.J., Gregg P., Kelly D.J. y Dineen J.K. (1978). Failure to induce homologous immunity to *Fasciola hepatica* in sheep vaccinated with irradiated metacercariae. *Veterinary Parasitology* 4, 143-152.

Cervi L., Cejas H. y Masih D.T. (2001). Cytokines involved in the immunosuppressor period in experimental fasciolosis in rats. *International Journal for Parasitology* 31(13), 1467-1473.

Changklungmoa N., Phoinok N, Yenchan C, Sobhon P, Kueakhai P. (2016). Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice *Veterinary Parasitology* 226:124-131.

Chantree P, Phatsara M, Meemon K, Chaichanasak P, Changklungmoa N, Kueakhai P, Lorsuwannarat N, Sangpairoj K, Songkoomkrong S, Wanichanon C, Itagaki T, Sobhon P. (2013). Vaccine potential of recombinant cathepsin B against *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol*. 135(1):102-9. doi: 10.1016/j.exppara.2013.06.010. Epub 2013 Jun 27

Chauvin A. y Boulard C. (1996). Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite* 3, 209-215.

Coles G.C. and Stafford K.A. (2001). Activity of oxcyclozanide, nitroxynil, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole resistant *Fasciola hepatica*. *Vet. Rec.* 9(148(23)): 723-724.

Clery D., Torgerson P.R. y Mulcahy G. (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 62, 71-82.

Creaney J., Wilson L., Dosen M., Sandeman R.M., Spithill T.W. y Parsons J.C. (1996). *Fasciola hepatica*: irradiation induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. *Experimental Parasitology* 83(2), 202-215

Dalton J.P. y Mulcahy G. (2001). Parasite vaccines. *Veterinary Parasitology* 98, 149-167.

Dalton J.P., Brindley P.J., Knox D.P., Brady C. P, Hotez P.J., Donnell y O' neill S.M., Mulcahy G. y Loukas A. (2003a). Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *International Journal of Parasitology* 33, 621-640.

Dargie J.D., Armour J., Rushton B. y Murray M. (1974). Immune mechanism and hepatic fibrosis in fascioliasis. En: Soulsby E.J.L (ed.) *Proceedings of the Sixth International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* Academic Press, Nueva York, pp. 119-122.

Dawes B. y Hughes D.L. (1964). Fascioliasis: the invasives stages of *Fasciola hepatica* in mammalian host. *Advances in Parasitology* 8, 97-168.

De Bont J, Cleerebout E, Riveau G, Schacht A M, Smets K, Conder G. (2003). Failure of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental *Fasciola hepatica* infection. *Veterinary Parasitology*. 113: 135–144.

Doetze A., Satoguina J., Burchard G., Rau T., Loliger C., Fleischer B. y Hoerauf A. (2000). Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *International Immunology* 12(5), 623-30

Donnelly S., O'neill S.M., Sekiya M., Mulcahy G. y Dalton J.P. (2005). Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and Immunity* 73(1), 166-173.

Douch P. and Buchanan L. (1979). Some properties of the sulphoxidases and sulphoxide reductases of the cestode *Moniezia expansa*, the nematode *Ascaris suum* and mouse liver. *Xenobiotica* 9(11): 675-679.

Dowling, D., Hamilton, C., Donnelly, S., La Course, J., Brophy, PM., Dalton, J. and O'Neill, S. (2009). Major Secretory Antigens of the Helminth *Fasciola hepatica* activate a Suppressive Dendritic Cell Phenotype That Attenuates Th17 Cells but Fails to Activate Th2 Immune Responses. *Infect. Immun.*, 78(2), 793-801.

Doy T.G., Hughes D.L. y Harness E. (1980). The selective adherence of rat eosinophils to newly excysted *Fasciola hepatica* in vitro. *Research in Veterinary Science* 29(1), 98-101.

Doy T.G., Hughes D.L. y Harness E. (1981). Hypersensitivity in rats infected with *Fasciola hepatica*: possible role in protection against a challenge infection. *Research in Veterinary Science* 30, 360-363.

Doy T.G. y Hughes D.L. (1982). In vitro cell adherence to newly excysted *Fasciola hepatica*: failure to affect their subsequent development in rats. *Research in Veterinary Science* 32(1), 118-120.

Duffus W.P.H. y Franks D. (1980). In vitro effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. *Clinical and Experimental Immunology* 41, 430-440.

Echevarría F. (1996). Memorias Curso-Taller Internacional de Epidemiología y Diagnóstico de Endoparásitos en Rumiantes. Santa Fé de Bogotá, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Programa Nacional de Epidemiología Veterinaria: 220.

Espino A M; Morales, A; Delgado, B; Francheska M R; Figueroa, O Suarez, E. (2010). Partial Immunity to *Fasciola hepatica* in mice after vaccination with fhSAP2 delivered as recombinant protein or DNA construct. *Ethnicity & Disease*, Vol 20.

Fairweather I. (2011a). Liver fluke isolates: a question of provenance. *Vet. Parasitol.* 176: 1-8.

Fairweather I. (2011b). Raising the bar on reporting triclabendazole resistance. *Vet. Rec.* 168: 514-515.

Fairweather I. and Boray J.C. (1999). Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. *Vet. J.* 158(2): 81-112.

Fernández I, Peña A, Del Teso N. (2010). Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. *J Am Assoc Lab Anim Sci*;49(2):202-206

Flynn R.J., Mannion C., Golden O., Hacariz O. y Mulcahy G. (2007). Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infection and Immunity* 75(3), 1373-1381.

Flynn R.J y Mulcahy G. (2008). The roles of IL-10 and TGF-beta in controlling IL 4 and IFN-gamma production during experimental *Fasciola hepatica* infection. *International Journal of Parasitology* 38(14), 1673-80.

Freund J. (1956). The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibliotheca Tuberculosae.* 10, 130-48.

- Furtado L.F.V., de Paiva Bello A.C.P., Rabelo É.M.L. (2016). Benzimidazole resistance in helminths: from problem to diagnosis, *Acta Trop.* Doi:10.1016/j.actatropica.2016.06.021.
- Galtier P, Larrieu G, Tufenkji A.E. and Franc M. (1986). Incidence of experimental fascioliasis on the activity of drug-metabolizing enzymes in lamb liver. *Metabolism and Disposition* 14: 137-141.
- Gazzinelli R.T., Oswald I.P., Hieny S., James S.L. y Sher A. (1992). The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosomacruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *European Journal of Immunology* 22(10), 2501-6.
- Gil, L., Díaz, A., Rueda, C., Martínez, C., Castillo, D., Apt, W. (2014). Fascioliasis hepática humana: resistencia al tratamiento con triclabendazol. *RevMed Chile.* 142: 1330-1333
- Goose J. (1978). Possible role of excretory/secretory products in evasion of host defences by *Fasciola hepatica*. *Nature* 275, 216-217.
- Gottschall D.W., Theodorides V.J. and Wanga R. (1990). The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitol. Today* 6(4): 115-124.
- Golde, W.T., Gollobin, P. and Rodriguez, L.L. (2005). A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Animal*, 34 (9):39-43
- Glauert A.M., Lammas D.A. y Duffus W.P. (1985). Ultrastructural observations on the interaction in vitro between bovine eosinophils and juvenile *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 91, 459-470.
- Habig W.H., Pabst M. J. and Jakoby W. B. (1974). Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249(22): 7130–7139.
- Hacariz O., Sayers G., Mccullough M., Garrett M., Odonovan J. y Mulcahy G. (2009). The effect of Quil A adjuvant on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine.* 27(1), 45-50.

Hanna R.E.B. (1980a). *Fasciola hepatica*. An immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and sheep. *Experimental Parasitology* 50, 155-170.

Hanna R.E.B. (1980b). *Fasciola hepatica*: glycojalix replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Experimental Parasitology* 50, 103-114.

Harness E., Hughes D.L. y Doy T.G. (1976). The demonstration of pre-hepatic immune response to *Fasciola hepatica* in the mouse. *International Journal of Parasitology* 6(1), 15-17.

Haroun E.M. y Hillyer G.V. (1986). Resistance to Fasciolosis a review. *Veterinary Parasitology* 20, 63-93

Hartmann S. y Lucius R. (2003). Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *International Journal of Parasitology* 33(11), 1291-1302

Heimann, M., Roth, D.R., Ledieu, D., Pfister, R. and Classen W. (2010). Sublingual and submandibular blood collection in mice: a comparison of effects on body weight, food consumption and tissue damage. *Laboratory Animals*; 44:352-358

Hennessy D.R. (1993). Pharmacokinetic disposition of benzimidazole drugs in the ruminant gastrointestinal tract. *Parasitol. Today* 9 (9): 329-333.

Hennessy D.R., Steel J.W. Lacey G., Eagleson K. and Prichard R.K. (1989). "The disposition of albendazole in sheep." *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 12(4): 421-429.

Hillyer G V. (2005). *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J Helminthology*. 79:241-247.

Holmberg, H., Kiersgaard, M.K., Mikkelsen, L.F. and Tranholm, M. (2011). Impact of blood sampling technique on blood quality and animal welfare in haemophilic mice. *Laboratory Animals*, 45:114-120

- Hughes D.L., Hanna R.E.B. y Symonds H.W. (1981). Fasciola hepatica: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. *Experimental Parasitology* 52, 271-279
- Ibarra R., Montenegro N., Vera Y., Castillo R., Hernández A. y Ochoa P. (2002). Eficacia comparativa de un fasciolicida experimental, triclabendazol y closantel e bovinos infectados en forma natural con Fasciola hepatica. *Journal of Helminthology* 75, 245-249.
- Jackson F. (1993). Anthelmintic resistance The state of play. *British Vet. J.* 149(2): 123-138
- Jackson F., Jackson E. and Coop R.L. (1992). Evidence of multiple anthelmintic resistance in a strain of *Teladorsagia circumcincta* (*Ostertagia circumcincta*) isolated from goats in Scotland *Res. in Vet. Sci.* 53(3): 371-374.
- Jayaraj R, Piedrafita D, Spithill T, Smooker P, 2012. Evaluation of the immune responses induced by four targeted DNA vaccines encoding the juvenile liver fluke antigen, cathepsin B in a mouse model. *Genet Vaccines Ther.* 31;10(1):7.
- Juskevich J.C. (1987). Comparative metabolism in food-producing animals: Programs sponsored by the Center for Veterinary Medicine. *Drug. Metab. Rev.* 18: 345-362.
- Kaplan R.M, Vidyashankar A.N, An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance, *Vet. Parasitol.* 186 (2012) 70–78. doi:10.1016/j.vet par.2011.11.048.
- Kawalek J.C., Rew R.S. and Heavner J. (1984). Glutathione S-transferase, a possible drug-metabolising enzyme, in *Haemonchus contortus*: comparative activity of a cambendazole-resistant and a susceptible strain. *Int. J. Parasitol.* (14): 173-175.
- Kennedy N.J., Spithill T.W., Tennent J., Wood P.R. y Piedrafrita D. (2006). DNA vaccines in sheep: CTLA-4 mediated targeting and CpG motifs enhance immunogenicity in a DNA prime/protein boost strategy. *Vaccine* 24 (7), 970-979.
- Kerboeuf D. and Aycardi J. (1999). Unexpected increased thiabendazole tolerance in *Haemonchus contortus* resistant to anthelmintics by modulation of glutathione activity. *Parasitol. Res.* 85(713–718).

Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill TW. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol* 2016; 32: 458–469.

Kinabo L.D. y Bogan J.A. (1988). Pharmacokinetics and efficacy of triclabendazole in goats with induced fascioliasis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 11, 254-259.

Kofta W, Mieszczanek J, Plucienniczak G, Wedrychowicz H. Successful DNA immunization of rats against fasciolosis. *Vaccine* 2000; 18, 2985- 2990.

Köhler P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* 31(4): 336345.

Khaznadji, E. (2005). A new multi-domain member of the cystatin superfamily expressed by *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology* 35(10), 1115-1125.

Kueakhai P, Changklungmoa N, Riengrojpitak S, Chaichanasak P, Meemon K, Chaithirayanon K, Chantree P, Sansri V, Itagaki T, Sobhon P. (2013) Vaccine potential of recombinant saposin-like protein 2 against *Fasciolosis gigantica* in mice. *Vaccine*. 31(47):5518-23. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.09.027. Epub 2013 Sep 27.

Kueakhai P, Changklungmoa N, Chaichanasak P, Jaikua W, Itagaki T, Sobhon P. (2015) Vaccine potential of recombinant pro- and mature cathepsinL1 against *fasciolosis gigantica* in mice. *150:71-8*. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.06.020. Epub 2015 Jun 24.

Kwa M.S., Veenstra J.G. and Roos M.H. (1994). Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63(2): 299-303.

Lacey E. (1988). The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 18(7): 885-936.

Lacey E. (1990.). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. Today* 6: 112-115.

- LaCourse, E.J., Perally, S., Morhew, R.M., Moxon, J.V., Prescott, M., Dowling, D.J., O'Neill, S.M., Kipar, A., Hetzel, U., Hoey, E., Zafra, R. and Brophy. (2012). The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(5).
- Laird P.P. y Boray J.C. (1992). Human fascioliasis successfully treated with triclabendazole. *Australian and New Zealand journal of medicine* 22, 45-47.
- Lanusse C., Nare B. and Prichard R. (2001). Comparative sulphoxidation of albendazole by sheep and cattle liver microsomes. *Xenobiotica* 23(3): 285-295.
- Lanusse C.E., Gascon L.H. and P. R.K. (1995). Comparative plasma disposition kinetics of albendazole, fenbendazole, oxfendazole and their metabolites in adult sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 18(3): 196-203.
- Lanusse C.E. and Prichard R.K. (1993). Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49(2-4): 123-158.
- Loja O.D., Alvizuri E.J., Vilca Vásquez M., Aviles Gonzaga R. and Sánchez Mercado M. (2003). Hematoma hepático subcapsular por fasciola *Rev. gastroenterol.* 23(2): 142-148.
- Lubega G. and Prichard R. (1991). Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy *Exp. Parasitol.* 73(203-209).
- Luz J.E., Focaccia Siciliano R., De Oliveira A.G., Filho y Pisani J.C. (1999). Human Fascioliasis in the Metropolitan Area of Curitiba. Brazil evaluation of the Foci of Infection and Report of Nine Cases Treated With Triclabendazole. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 3, 220-225.
- Maizels S., Gimenez A. M., Gaona C., Waller P. J. and Hansen J. W. (1993). The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Paraguay. *Vet. Parasitol.* 62: 207-212.
- Malone J.B., Gomez R., Hansen J, Yilma J.M., Slingenberg J., Snijders F., Nachtergaele F. y Ataman E. (1982). A geographic information system on the potential distribution and abundance

of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in east Africa based on Food and Agriculture Organization databases. *Veterinary Parasitology* 78(2), 87-101.

Maniatis T., Fritsch E. F. and Sambrook J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

Mannervik B. and Danielson U. H. (1988). Glutathione structure and catalytic activity. *CRC Critical Review. Biochem.* 23: 283-337.

Márquez Lara D (2003). Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. *Rev Corpoica* 4(1): 55-71.

Marriner S.E. and Bogan J.A. (1980). Pharmacokinetics of albendazole in sheep. *Am. J. Vet. Res* 41 (7): 1126-1129.

Martínez Moreno A., Jiménez V., Msrénez-Cruz M.S., Martínez Moreno F.J., Becerra C. y Hernández S. (1997a). Triclabendazole treatment in experimental goat fasciolosis: antihelmintic efficacy and influence in antibody response and pathophysiology of disease. *Veterinary Parasitology* 68, 57-67.

Martínez Moreno A., Jiménez V., Msrénez-Cruz M.S., Martínez Moreno F.J., Becerra C. y Hernández S. (1997b). Humoral and cellular immune response to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. *Parasitology Research* 83, 680-686.

Martínez Moreno A., Jiménez- Luque V., Moreno T., Redonde E.S.H., Martín de las Mulas y Pérez J. (1999). Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Veterinary Parasitology* 82, 19-33.

Martínez Moreno A., Jiménez- Luque V., Cámara S., Martínez Moreno F.J., Acosta I. y Hernández S. (2000). Oxidative responses during bacterial phagocytosis of polymorphonuclear leucocytes in primarily and secondarily *Fasciola hepatica* infected goats. *International Journal of Parasitology* 30(9),1013-1017.

- Mas-Coma S., Valero M.A. and Bargues M.D. (2009). Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Vet. Parasitol.* 163(264-280).
- Masih DT., Cervi L. y Casado J.M. (1996). Modification of accessory activity of peritoneal cells from *Fasciola hepatica* infected rats. *Veterinary Immunology Immunopathology* 53(3-4), 257-268.
- Meeusen E y Brandon M.R. (1994). The use of antibody-secreting cell probes to reveal tissue-restricted immune response during infection. *European Journal of Immunology* 24, 469-474.
- Meeusen E N T, Piedrafita D. (2003). Exploiting natural immunity to helminth parasites for the development of veterinary vaccines. *International Journal for Parasitology*; 33(11), 1285-1290.
- Mendes R.E., Pérez-Écija R.A., Zafra R., Buffoni L., Martínez-Moreno A., Dalton J.P., Mulcahy G. Y Pérez J. (2013). Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 28 (2010), 2832–2840.
- Miller C.M., Howell M.J. and Boray J.C. (1994). Glutathione S-transferases as markers of salicylanilide resistance in isolates of *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* 24(4): 533-542.
- Mitchell G. (2002). Update on fasciolosis in cattle and sheep. *In Pract.* 24: 378-385.
- Mishra, P.K. Palma M, Bleich D, Loke P. Gause W.C. (2014). Systemic impact of intestinal helminth infections., *Mucosal Immunol.* 7 753–62. doi:10.1038/mi.2014.23.
- Moreno Pérez, P (2015). Evaluación del daño hepático y respuesta inmunitaria local en cabras vacunadas con Catepsina L1 e infestadas con *Fasciola hepatica*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Mota Sanchez, J. (2009). DNA Vaccines: Induction of the immune response. *Salud Publica Mex*; 51 suppl 3:S463-S469.
- Mottier L., Alvarez L., Ceballos L. and Lanusse C. (2006). Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive diffusion of benzimidazole anthelmintics *Exp. Parasitol.* 113(1): 49-57.

Mottier L. and Lanusse C. (2001). Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. *Rev. Med.Vet.* 82(2): 74-85.

Mottier L., Virkel G., Solana H., Alvarez L., Salles J. and L. C. (2004). Triclabendazole biotransformation and comparative diffusion of the parent drug and its oxidized metabolites into *Fasciola hepatica*. *Xenobiotica* 34 1043-1057.

Mottier L., Alvarez L., Fairweather I. and Lanusse C. (2006). Resistance-induced changes in triclabendazole transport in *Fasciola hepatica*: ivermectin reversal effect. *J. Parasitol* 92(6): 1355-1360.

Mulcahy G., O'connor F., Clery D., Hogan S.F., Dowd A.J., Andrews S.J. y Dalton J.P. (1999). Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Research in Veterinary Science* 67, 27-33.

Mulcahy G. y Dalton J.P. (2001). CathepsinL proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Research in Veterinary Science* 70, 83-86.

Nansen P. (1975). Resistance in cattle to *Fasciola hepatica* induced by a gamma-ray attenuated larvae: Results from a controlled field trial. *Research in Veterinary Science*; 19, 278-283.

Nari A. y Fiel C., Eds. (1988). Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Buenos Aires, Argentina., Editorial hemisferio sur.

Nari A., Salles J., Gilb A., Waller P.J. and Hansen J.W. (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Uruguay *Vet. Parasitol.* 62(3-4): 213-222.

Nebbia C (1993) Determination of cytosolic glutathione peroxidase. In: *Pharmacology and Toxicology*

Nemzek JA, Bolgos GL, Williams BA, Remick, DG. (2001). Differences in normal values for murine white blood cells counts and other hematological parameters based on sampling site. *Inflamm Res*;50:523-7.

Nousiainen U. and Törrönen R. (1984). Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in the rat liver by in vivo and in vitro inhibition. *General Pharmacology: The Vascular System* 15(3): 223-227.

Novobilský, A., Amaya Solis, N., Skarin, M., Höglund, J. (2016). Assessment of flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep in Sweden in the absence of a standardised test. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 6:141-147.

Nzalawahe, J., Kassuku, A., Stothard, J., Coles, G., Eisler, M. (2015). Associations between trematode infections in cattle and freshwater snails in highland and lowland areas of Iringa Rural District, Tanzania. *Parasitology.* 142: 1430-9.

O'neill, SM., Brady M.T., Callanan J.J., Mulcahy G., Joyce P., Mills K.H. y Dalton J.P. (2000). *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunology* 22(3), 147-155.

Olaechea F. (2004). *Fasciola hepatica*, Red de Helminología de FAO para América Latina y el Caribe Septiembre 2004: Conferencia Electrónica 2004.

Ollerensaw C.B. and Rowlands W.T. (1959). A method of forecasting the incidence of fascioliasis in Anglesey. *Vet. Rec.* 71: 591-598.

Ouellette M. (2001). Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Trop. Med. Int. Health* 6(11): 874 - 882.

Overend D.J. and Bowen F.L. (1995). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet. J.* 22(7): 275-276.

Pearce E.J. y Sher A. (1991). Functional dichotomy in the CD4+ T-cell response to *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 73, 110-116.

Peña M, Ríos MA, Diez I. (2008). Obtención de sangre por punción mandibular en el ratón: nuestra experiencia. *Revista Española de Investigaciones Quirúrgicas*; XI (1):3-7.

Pickett C.B. and Lu A.Y.H. (1989). Glutathione S-transferases: gene structure, regulation and biological function. *Annual Rev. Biochem.* 58: 743 -764.

Piedrafita D., Spithill T.W., Dalton J.P., Brindley P.J., Sandeman M.R., Wood P.R., Pardons J.C. (2000). Juvenile *Fasciola hepatica* are resistant to killing in vitro by free radicals compared with larvae of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* 22(6), 287-95.

Pizzi H., Navarro Z., Pizzi D.R. and Benvissuto G. (1992). Estudio epidemiológico e implicancias económicas de la distomatosis hepática en la provincia de Córdoba *Gaceta Veterinaria* 44(374): 944-947.

Poitou I., Baeza E. y Boulard C. (1993). Analysis of the results obtained using a technic of experimental primary infestation with *Fasciola hepatica* in the rat. *International Journal for Parasitology* 23, 403-406

Pratt W. and Taylor P., Eds. (1990). *Principles of Drug Action*. New York, Churchill Livingstone.

Precious W.Y. and Barrett J. (1989). Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitol. Today* 5: 156-160.

Precious W.Y. and Barrett J. (1989). The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths. *Biochim. Biophys. (Acta 992)*: 215-222.

Preyavichyapugdee N, Sahaphong S, Riengrojpitak S, Grams R, Viyanant V, Sobhon P. (2008) *Fasciola gigantica* and *Schistosoma mansoni* vaccine potential of recombinant glutathione S-transferase (rFgGST26) against infections in mice *Exp Parasitol.* (2):229-37. Doi: 10.1016/j.exppara.2008.01.014.

Prichard R. (1994). Anthelmintic resistance *Vet. Parasitol.* 54(1-3.): 259-268.

Prichard R.K. and Ranjana S. (1993). Anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 46(1-4): 113-120.

Prowse R.K., Chaplin P., Robinson C. y Spithill W. (2002). *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. *Parasite Immunology* 24(2), 57-66.

Radostits O. (2002). Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Madrid, España.

Ramadan N.I. and Saber L.M. (2004). Detection of genetic variability in nonhuman isolates of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by the RAPD-PCR technique. *J Egypt Soc Parasitol* 34(2): 679-689.

Regan RD, Fenyk-Melody JE, Tran SM. (2016). Comparison of submental blood collection with the retroorbital and submandibular methods in mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*; 55: 570-576.

Reinhard E.G. (1957). "Landmarks of parasitology. The discovery of the life cycle of the liver fluke." *Exp. Parasitol.* 6(208-232).

Rimaniol A.C., Gras G. y Clayette P. (2007). In vitro interactions between macrophages and aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 25(37-38), 6784-92

Rivera F, Espino AM. (2016) Adjuvant-enhanced antibody and cellular responses to inclusion bodies expressing FhSAP2 correlates with protection of mice to *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol.* Jan;160:31-8. doi: 10.1016/j.exppara.2015.11.002.

Robinson M.W., J. Lawson, H. E. M. Trudgett A. and Fairweather I. (2004). The comparative metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* *Parasitol. Res.* 92(3): 205-210.

Robinson M.W., Trudgett A., Hoey E.M. and Fairweather I. (2002). Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: β -tubulin and response to in vitro treatment with triclabendazole. *Parasitol.* (124): 325-338.

Rojas-Caraballo J., López-Abán J., Fernández-Soto P., Vicente B., Collía F y Muro A. (2015) Gene Expression Profile in the Liver of BALB/c Mice Infected with *Fasciola hepatica*. *Plos One* 10(8): e0134910. Doi.org/10.1371/journal.pone.0134910

Roos M.H. (1990). The molecular nature of benzimidazole resistance in helminths. *Parasitol. Today* 6 (4): 125-127.

Roos M.H., Boersema J.H., Borgsteede F.H.M., Comelissen J., T. M. and Ruitenber E.J. (1991). Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in the sheep parasite *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43: 77-88.

Sanabria, R., Ceballos, L., Moreno, L., Romero, J., Lanusse, C., Alvarez, L. (2013). Identification of a field isolate of *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and susceptible to triclabendazole. *Vet. Parasitol.* 193: 105– 110.

Sangster N.C. (1994). P-glycoproteins in nematodes. *Parasitol. Today* 10(8): 319-322.

Sangster N.C. (1999). Anthelmintic resistance: past, present and future. *Int. J. Parasitol.* 29.(1): 115-124.

Scarcella S. (2011). Caracterización morfofisiológica del tremátode *Fasciola hepatica*. Su vinculación con el fenómeno de resistencia antihelmíntica. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires.

Sibille P, Tliba O, Boulard C. (2004). Early and transient cytotoxic response of peritoneal cells from *Fasciola hepatica*-infected rats. *Vet Res.*35(5):573-84.

Smith A M. Purification of a cathepsin Llike proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. (1992) *Mol Biochem Parasitol.* 62:1–8

Solana H.D., Rodriquez J.A. and Lanusse C.E. (2001). Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites. *Parasitol. Res.* (87): 275-280.

Souhaili-el Amri H, Fargetton X, Delatour P and Batt A.M. (1987). Sulphoxidation of albendazole by the FAD-containing and cytochrome P450 dependent monooxygenases from pig liver microsomes. *Xenobiotica* 17: 1159-1168.

Spithill, T.W., Smooker, P.M., and Copeman, D.B. (1999). *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In *Fasciolosis* (Dalton, J., ed.), pp. 465–525, CAB International.

Stitt A.W. and Fairweather I. (1993). *Fasciola hepatica*: tegumental surface changes in adult and juvenile flukes following treatment in vitro with the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex). *Parasitol. Res.* 79: 529-536.

Stitt A.W. and Fairweather I. (1994). The effect of the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex) on the tegument of mature and immature stages of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol.* 108: 555-567.

Stitt A.W. and Fairweather I. (1996). "*Fasciola hepatica*: disruption of the vitelline cells in vitro by the sulphoxide metabolite of triclabendazole." *Parasitol. Res.* 82(333-339).

Taylor M G. (1987). Schistosomes of domestic animals: *Schistosoma bovis* and other animals' forms. En: Soulsby E.J.L. (ed.) *Immune responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis II. Trematodes and Cestodes*.

Teruel M.T., Felipe A.E., Solana H.D., Sallovitz J.M. and Lanusse C.E. (2003). Placental and fetal toxicity of albendazole sulphoxide in Wistar rats. *Vet. Human. Toxicol.* 45(3): 131-136.

Toet, H., Piedrafita, D. and Spithill, T. (2014). Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.*, 44(12), 915-927. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.07

Toner E., Brennan G.P., Hanna R.E.B., Edgar H.W. and Fairweather I. (2010). Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* in response to treatment in vivo with triclabendazole in the sheep host. *Vet. Parasitol.* 172: 238-248.

Toner E., Brennan G.P., Hanna R.E.B., Edgar H.W.J. and Fairweather I. (2011). Disruption of egg formation by *Fasciola hepatica* following treatment in vivo with triclabendazole in the sheep host. *Vet. Parasitol.* 177: 79-89.

Van Milligen F.J., Cornelissen J.B. y Bokhout B.A. (1999). Protection against *Fasciola hepatica* immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunology* 21(5), 243-251.

Waldvogel A.S., Lepage M.F., Zakher A., Reichel M.P., Eicher R. y Heussler V.T. (2004). Expression of interleukin 4, interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 97(1-2), 53-63.

Waller P.J. (1993). Towards sustainable nematode parasite control of livestock. *Vet. Parasitol.* 48(1-4): 295-309.

Waller P.J., Dash K.M., Barger A., Le Jambre L.F. and Plant J. (1995). Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. *Vet. Rec.* 136(411-413).

Waller P.J., Echevarria F., Eddi C., Maciel S., Nari A. and Hansen J.W. (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: general overview *Vet. Parasitol.* 62: 181-187.

Wedrychowicz H., Wisniewski M. (2003). Progress in development of vaccines against most important gastrointestinal helminth parasites of humans and ruminants. *Acta Parasitologica Polonica*; 48(4), 239-245.

Wesołowska A, Zawistowska-Deniziak A, Norbury LJ, Wilkowski P, Januszkiewicz K, Pyziel AM, Zygnier W, Wędrychowicz H. (2016). Immune responses in rats and sheep induced

- bya DNA vaccine containing the phosphoglycerate kinase gene of *Fasciola hepatica* and liver fluke infection. *Acta Parasitol.* 2016 Mar;61(2):212-20),
- Welsh J. and Mc Clelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-7218.
- Williams J.C. (1997). Anthelmintic treatment strategies: current status and future. *Vet. Parasitol.* 72(3-4): 461-477.
- Winkelhagen, A., Mank, T., de Vries, P., Soetekouw, R. (2012). Apparent triclabendazole-resistant human *Fasciola hepatica* infection, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 18: 1028–1029.
- WHO (2008). Fact sheet on Fasciolosis. Action against worms. Geneva, Switzerland: World Health Organization, Headquarters, 10:1-8.
- Wolstenholme A.J., Fairweather I., Prichard R., von Samson-Himmelstjerna G. and Sangstere N. (2004). "Drug resistance in veterinary helminths " *Trends Parasitol.* 20(10): 469-476.
- Zafra Leva., R. (2012). Estudio histopatológico e inmunohistoquímico del hígado y ganglios linfáticos hepáticos en cabras inmunizadas frente a *Fasciola hepatica*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, España.
- Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. (2013) Immunogenicity analysis of recombinant GST protein of *Fasciola hepatica* in SD rats (1):46-8, 53.