



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFECTO DE LA VACUNACIÓN CONTRA
Fasciola hepatica SOBRE LA PRODUCCIÓN
Y DESARROLLO DE HUEVOS DEL PARÁSITO**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN MEDICINA VETERINARIA
Y PRODUCCION ANIMAL**

PRESENTA:

M.V.Z. ANA ISABEL SOLÍS DELGADO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ABEL EDMUNDO VILLA MANCERA

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. PEDRO MOLINA MENDOZA

ASESORES:

DR. LORENZO CARREÓN LUNA

DR. JAIME OLIVARES PÉREZ

TECAMACHALCO, PUEBLA 2015

CONTENIDO

Tema	Página
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
INTRODUCCIÓN	1
Ciclo de vida	3
Hospederos intermediarios de <i>Fasciola hepatica</i>	6
Morfología de <i>Fasciola hepatica</i>	8
Huevos y miracidios	9
Catepsinas L	11
Tecnología de despliegue en fagos (phage display)	13
Aplicaciones de la tecnología de bacteriófagos en parasitología	14
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
Obtención de hígado y vesícula biliar	19
Viabilidad de huevos	20
Clasificación de los estados de desarrollo	20
Análisis estadístico	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
BIBLIOGRAFÍA	30

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado al motor de mi vida mi hijo Santiago, por ser la motivación del día a día, para que cuando seas grande comprendas que todo lo que hago es para ser mejor y te sientas orgulloso de tu mami, pero también para enseñarte con el ejemplo que nunca debes dejar de perseguir tus sueños, todo es por ti y para ti mi pequeño.

AGRADECIMIENTOS

A padre Jesús por permitirme escalar un peldaño más de mis sueños.

Al Dr. Abel Edmundo Villa Mancera por hacer posible este trabajo de tesis con su tiempo y experiencia.

Al Dr. Lorenzo Carreón Luna por apoyarme siempre en este camino de crecimiento profesional.

Al MVZ José Alfredo Juárez Bautista por su apoyo.

A mis compañeros de generación por regalarme un poco de su alegría durante los dos años que compartimos juntos: MVZ. Aurelio Cabañas Hernández, MMVPA. Jesús Jacobo Ortiz De La Cruz, MVZ. Mariel Rosas Vivanco, MVZ. María Belén Ramos Martínez, MVZ. Marco Antonio Yllescas Santos, MVZ Julio Cesar Zarate Jiménez, MMVPA Julio César Urrea Castro.

A cada uno de los profesores que conforman el núcleo básico de la Maestría en Medicina Veterinaria y Producción Animal y que fueron parte fundamental de este crecimiento y logro personal.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la inmunización de cabras con mimotopos de catepsina L1 y L2 sobre la producción y desarrollo de huevos de *Fasciola hepatica*. Un total de 24 cabras de seis meses de edad, fueron asignadas a uno de cuatro grupos de seis animales, de acuerdo a su peso. Los grupos 1-3 recibieron 1×10^{13} partículas de fagos con la secuencia PPIRNGK (catepsina L2), DPWWLKQ (catepsina L1) y SGTFLFS (catepsina L1) con 1mg/ml del adyuvante Quil A por vía subcutánea en la semana 0. El grupo 4 (control) recibió PBS (amortiguador de fosfatos salinos) estéril. Una segunda inyección fue administrada en la semana 4. Dos semanas después de la última inmunización, cada caprino recibió oralmente 200 metacercarias de *F. hepatica*. El sacrificio de todos los animales se realizó en la semana 22 posterior a la primera inmunización y los parásitos recuperados. Los huevos colectados de la vesicular biliar fueron lavados e incubados en oscuridad a 22°C por 14 días y expuestos a un foco de 100W por 15 minutos para estimular la eclosión de los miracidios y observar uno de los seis estados de desarrollo: muerto, vacío, sin embrionar, división celular, mancha ocular y eclosionado. Los animales que fueron inmunizados con catepsina L2 (grupo 1) y L1 (grupo 2 y 3) mostraron una reducción significativa ($P < 0.05$) en la producción de huevos del 33.58%, 76.67% y 54.23%, comparado con el grupo control. Para las cabras vacunadas con mimotopos de catepsina L2 del grupo 1, se observaron diferencias significativas en 6 de 7 estados de desarrollo (excepto huevos eclosionados) cuando se les comparo con el grupo control. En el grupo 1 se observó una reducción significativa en los porcentajes de huevos sin embrionar (muerto, vacío y sin embrionar) en comparación con el grupo control. Así mismo, para el grupo 1 y 3, para los huevos embrionados (huevos que alcanzan la división celular); observándose en el grupo 1, el mayor porcentaje de huevos eclosionados (38.0%). En el grupo 3, el porcentaje de huevos que llegan a la división celular fue del 46.2%, reduciéndose a 11.5% de huevos con mancha ocular. Por el contrario, en el grupo 1, el porcentaje de huevos con división celular (9.2%), aumento hasta 29.4% en huevos con mancha ocular. El grupo control presentó un porcentaje similar entre el estado de desarrollo de división celular y mancha ocular (19.0% y 17.2%). En las cabras inmunizadas del grupo 3, el porcentaje de huevos embrionados (57.7%) se reduce hasta 5.8% para los huevos eclosionados. En conclusión, los resultados de este estudio demuestran que las cabras inmunizadas con bacteriófagos tienen un efecto sobre la producción y eclosión de huevos de *Fasciola hepatica*, influyendo sobre la incidencia de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial, ocasionada por el trematodo *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), considerándose como una de las helmintiasis más importantes en todo el mundo que afecta principalmente al ganado en pastoreo, teniendo consecuencias económicas (Kaplan, 2001). Este trematodo se localiza principalmente en el hígado y conductos biliares de ovinos, bovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados e incluso en el hombre, lo que con frecuencia es de carácter crónico y es acompañada de trastornos nutritivos.

La fasciolosis es una de las helmintiasis más importantes en todo el mundo que afecta principalmente al ganado en pastoreo debido a su amplia distribución geográfica y en consecuencia pérdidas económicas; es causada por el tramatodo *Fasciola hepatica*, así como *Fasciola gigantica* (Kaplan, 2001). Además de ser un problema de salud veterinario conocido, la fasciolosis recientemente se le ha considerado como una enfermedad parasitaria emergente en humanos, lo que implica un impacto significativo en la salud pública, provocando que millones de personas estén en riesgo de infección. Algunos reportes registran un incremento en la incidencia de fasciolosis en varios países de Latino América, África, Europa y Asia (Mas-Coma, 2005; Mas-Coma y col 2009), por lo que se la ha incluido en la lista de prioridades de la Organización Mundial de la Salud relacionada con respecto a Enfermedades Tropicales abandonadas.

La infección de rumiantes domésticos por *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica* es una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria de la ganadería en todo el mundo, que se estima en más de 3 billones de dólares anualmente (Spithill y col 1999).

El triclabendazol es el fármaco más eficaz para el tratamiento de fasciolosis, ya que elimina el parásito 2 días después de la infección y en las etapas posteriores de desarrollo en ganado ovino y bovino. Sin embargo, se ha reportado ampliamente en animales domésticos, resistencia contra triclabendazol (Boray y col 1983; Fairweather, 2011; Hanna y col 2013; Ortiz y col 2013).

La rápida evolución de la resistencia a triclabendazol en *F. hepatica* ha puesto de relieve la necesidad de aumentar el esfuerzo en investigación en relación con el control del trematodo, como es la resistencia antihelmíntica bajo condiciones de campo, desarrollo y ensayo de nuevos productos quimioterapéuticos y formulaciones, desarrollo y uso estratégico de vacunas, investigación de los mecanismos de resistencia a fármacos en parásitos; así como, manipulación genética del huésped para incrementar la resistencia al parásito.

Muchos ensayos diseñados para evaluar la eficacia de vacunas putativas o fasciolicidas han utilizado parámetros básicos y bastante limitados para monitorear los resultados de los tratamientos administrados al huésped (Hanna y col 2011), los cuales incluyen principalmente conteo de huevos del parásito en heces y conteo de fasciolas adultas e inmaduras en el hígado recuperadas en la autopsia. En ocasiones las dimensiones de los trematodos se registran, con un retraso en el crecimiento atribuido al efecto de la vacunación (Villa-Mancera y col 2008; Villa-Mancera y Méndez-Mendoza, 2012) o quimioterapia (Malone y col 1984; Maes y col 1990; Hanna y col 2006). La capacidad de los huevos de *F. hepatica* a eclosionar, dando lugar a miracidios viables, se ha considerado como un indicador importante del efecto antihelmíntico o de vacunación (Dalton y col, 1996).

Con el fin de utilizar parámetros del parásito como tamaño del cuerpo, desarrollo de los órganos reproductivos, período pre-patente, capacidad de producción de huevos y porcentaje de infección (implantación), es esencial entender todos los factores intrínsecos del

parasito y relacionados con el huésped que pueden incidir en estas variables medibles. Factores tales como genotipo del parásito y del huésped, mecanismos inmunes específicos e innatos del huésped, carga parasitaria en la infección y durante todo el desarrollo e interacciones específicas e intra parásitos, necesitan ser consideradas como influencias que pudieran interactuar con los efectos moduladores extrínsecos tales como medicamentos y vacunas. Walker y col 2006 y McConville y col 2009 registraron diferencias significativas con respecto al tamaño del parásito, fecundidad, y tiempo de patencia dependiendo del tipo de aislado. Las diferentes especies de huéspedes y razas son conocidas por influir en el éxito y la longevidad de la infección de *F. hepatica*, así como el período pre-patente (Torgerson y Claxton, 1999; Dawes y Hughes, 1970).

Ciclo de vida

El parasito adulto se reproduce sexualmente en el huésped definitivo, produciendo hasta 2,000-2,500 huevos al día, los cuales son colocados en la vesícula biliar y excretados con las heces del huésped. El número está relacionado con factores asociados al huésped o del parasito (un solo animal puede eliminar de 2.0-3.5 millones de huevos por día). La receptividad del huésped varía con las especies, la carga parasitaria y el flujo de bilis. Los animales silvestres también pueden actuar como reservorios, pero su importancia epidemiológica no está suficientemente aclarada. Existen variaciones estacionales en la excreción de huevos, con un aumento durante la primavera y el otoño. Independientemente de estas variaciones debido a los animales infectados crónicamente (la duración de la vida de un parasito puede ser de 8-11 años), los huevos se excretan todo el año, la contaminación de

los pastos es constante y las infecciones masivas son comunes en el ganado ovino (Rojo-Vázquez y col 2012).

Los huevos eliminados completan su desarrollo fuera del huésped. Inmediatamente después de la eclosión, el miracidio se mueve activamente para penetrar un caracol adecuado que servirá como huésped, donde el parásito se multiplica asexualmente (esporocistos, redias y cercarias). Las cercarias abandonan el caracol y nadan libremente hasta que se enquistan formando las metacercarias. Estos son ingeridos por un huésped vertebrado y se desenquistan en el intestino delgado, los trematodos juveniles penetran la pared del intestino, migran a través de la cavidad peritoneal y se introducen a través del parénquima hepático hasta llegar a los conductos biliares, donde alcanzan la madurez sexual (Rojo-Vázquez y col 2012).

La presencia de *F. hepatica* depende de varios factores que controlan la existencia de los caracoles (huéspedes intermediarios), un ejemplo es la existencia de hábitats adecuados y condiciones ambientales favorables, principalmente humedad y temperatura. Para desarrollarse, los huevos deben estar separados de la masa fecal y necesitan una temperatura adecuada y humedad (Harris y Charleston, 1976). Bajo estas condiciones, dentro del huevo una larva ciliada (miracidio) se desarrolla y eclosiona cuando la luz estimula la producción de una enzima proteolítica que debilita la unión fotoactiva del opérculo de la cáscara. La actividad del miracidio y la hipertonicidad del interior del huevo, presiona al opérculo para que se abra, permitiendo al miracidio salir al exterior.

En el laboratorio, a 26°C, el proceso se ha completado en 12 días, aunque en condiciones de campo requiere varias semanas (hasta 2 meses) a 10-12°C. Entonces, se necesita un molusco, en los estímulos quimiotácticos de búsqueda que involucra temperatura, pH, oxígeno, salinidad, composición iónica y turbidez del agua son factores decisivos (Rojo-Vázquez y col 2012).

El principal huésped intermediario de *F. hepatica* es el caracol ampliamente distribuido *Lymnaea* (*Galba*) *truncatula*, con una especificidad muy marcada. El potencial biótico de estos moluscos es alta y 25,000 nuevos ejemplares pueden ser formados a partir de un único caracol en aproximadamente 12 semanas, si las condiciones ambientales son favorables.

Los caracoles adecuados permiten el desarrollo de larvas del trematodo. El miracidio penetra en el caracol y provee condiciones ambientales y nutricionales favorables para los caracoles, se forman cercarias y en número son altamente variables y dependen del número de miracidios que infectan a los caracoles, que van desde 10 hasta 4,000 cercarias (media: 100 cercarias/*Lymnaea*) (Rojo -Vázquez y Ferre-Pérez, 1999). Bajo condiciones naturales, el desarrollo intramolusco generalmente dura de 8-10 semanas. No todas las poblaciones de caracoles son capaces de sostener el desarrollo larvario completo de *F. hepatica*: mortalidad del caracol, prevalencia de la infección por el caracol y número de cercarias emitidas son muy variables de acuerdo a la ubicación. Hay una periodicidad de 6-8 días en cercarías producidas, el número de cercarias alcanza un pico en la segunda oleada de emisión y posteriormente disminuye hasta la quinta oleada (Rojo-Vázquez y col 2012).

Las cercarias liberadas por los caracoles pierden su cola, se enquistan en las hierbas y plantas acuáticas (alrededor del 10 % puede estar en agua), rodeándose las metacercarias por una cubierta rugosa (Rojo-Vázquez y Ferre-Pérez, 1999). Estas metacercarias son muy sensibles a las altas temperaturas y desecación, pero pueden sobrevivir durante el invierno.

La infección de los animales se lleva a cabo durante el pastoreo, pero también es probable que se produzca en el interior, a través de beber agua o heno y ensilaje mal preparado. No todas las metacercarias ingeridas se implantan en el hígado y muchas se pierden en las heces o la migración intraorgánica, teniendo una media de implantación del 25-60 % (media del 40 %) (Rojo-Vázquez y Ferré-Pérez, 1999). La infectividad de las

metacercarias se ve influida por la temperatura ambiental durante el desarrollo intramolusco y por las condiciones climáticas después del enquistamiento de las cercarias. La mayor capacidad infectiva se produce cuando las temperaturas son de alrededor de 22 a 23°C (Rojo-Vázquez y Ferré-Pérez, 1999). Las metacercarias pierden su cubierta en el intestino delgado en un proceso que se inicia en el rumen por una alta concentración de dióxido de carbono, medio ambiente redox y una temperatura de 39°C; y después en el intestino delgado, cerca del conducto biliar común y se ve favorecida por la bilis y el propio parásito.

Después de la emergencia, los jóvenes trematodos atraviesan la pared intestinal, pasan a la cavidad abdominal y desde allí llegan al hígado. Cerca de 4 días después de la infección, comienzan a perforar la cápsula de Glisson. En esta fase, tienen una forma lanceolada y mide de 1-2 mm; en menos de 2 meses migran por todo el parénquima hepático, estableciéndose definitivamente en los conductos biliares desde los primeros 40 días de la infección en adelante, donde alcanzan la edad adulta. A los 55-56 días después de la infección, los primeros huevos aparecen en las heces de los huéspedes definitivos (Rojo-Vázquez y Ferré-Pérez, 1999). Excepcionalmente, los trematodos inmaduros pueden cruzar el peritoneo visceral o pasar a los vasos sanguíneos y alcanzar otros órganos (pulmón, nódulos linfáticos bajo la piel y del útero) (Rojo-Vázquez y Ferré-Pérez, 1999).

Hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*

Los moluscos desempeñan un papel fundamental como hospederos intermediarios de agentes causales de helmintiasis, de importancia en salud pública y veterinaria; en particular, los caracoles de la familia Lymneidae se destacan por la transmisión de *Fasciola hepatica*.

Clasificación taxonómica. El Phylum Mollusca abarca especies que difieren en organización y hábitat; es el segundo en el reino animal, en cuanto al número de especies (más de 1000,000), siendo superado por el Phylum Arthropoda, y sobrepasa el doble a las especies de los Vertebrata. Los miembros del Phylum Mollusca en la actualidad incluyen seis clases, una de ellas es la clase Gasteropoda, a la cual pertenecen los moluscos que actúan como hospederos intermediarios de trematodos (Digenea). La subclase Pulmonata se agrupa en especies terrestres y algunos anfibios, principalmente. En el superorden Basommatophora y suborden Limnophyla están incluidas las especies de agua dulce y algunas marinas.

Ciclo de vida. El ciclo de vida de los diferentes limneidos es muy variable; depende de la especie, las condiciones ambientales y el tipo de alimentación. Algunos autores señalan que el tiempo mínimo de desarrollo de los caracoles es de 21 a 25 días a 30°C y pH 7.0-7.5, presentan una estacionalidad marcada: primavera, verano y otoño; la vida media es de tres a cuatro meses y ésta es independiente de la influencia de las condiciones ambientales.

Ecología. Los factores físicos que en conjunto influyen en la presencia de limneidos en ciertos hábitats son el agua, la luz, la temperatura y posiblemente el pH, y su efecto se da de forma conjunta. Aunque los hospederos de *Fasciola hepatica* son caracoles anfibios, que viven en el lodo a orillas del agua, hay especies como *L. truncatula*, que se encuentran en aguas poco profundas, aireadas, pantanos, y praderas con agua.

En el periodo prolongado de estivación disminuyen los procesos metabólicos de los caracoles, cesando su alimentación; no suelen encontrarse en lugares oscuros ni con mucha sombra, debido a la incapacidad de las microalgas (de las que se alimenta) para crecer en estos sitios; la temperatura es el factor que rige la velocidad de desarrollo y el número de

individuos en las poblaciones; así en los meses de verano se multiplican extraordinariamente; el frío actúa indirectamente en el caracol al impedir el crecimiento de las microalgas en el hábitat. La temperatura a la que viven los caracoles oscila desde 10 y hasta 28°C; temperaturas superiores a 20°C existía un incremento de la tasa de mortalidad de los caracoles infestados (Cruz y col 2010).

Morfología de *Fasciola hepatica*

El parásito adulto mide 2-3.5 cm de largo y 1 cm de ancho, en forma de hoja con el extremo anterior cónico seguido por los hombros. A pesar de ser parásitos que se encuentran en el hígado, de vez en cuando se encuentran en otros órganos, como son los pulmones, donde se encuentran encapsulados (Rojo-Vázquez y col 2012). La ventosa oral es pequeña pero potente y está localizada en el extremo de una proyección en forma de cono en el extremo anterior. Esta combinación de un cono oral y hombros es un medio inmediato de identificación. El acetábulo es algo mayor que la ventosa oral y es bastante anterior, en torno a la altura del hombro. El tegumento está cubierto de espinas grandes, salientes y hacia atrás, semejantes a escamas (Roberts y Janovy, 2009). Los ceca intestinales son altamente dendríticos (ramificado) y se extienden hasta cerca del extremo posterior del cuerpo. Los testículos son grandes y muy ramificado, dispuestos en tándem detrás del ovario. El ovario es pequeño y dendrítico, se encuentra en el lado derecho, poco detrás del acetábulo; el útero es corto, enrollándose entre el ovario y la bolsa cirros preacetabular. Los folículos vitelinos son extensos, llenando la mayor parte del cuerpo lateral y confluyen detrás de los testículos. Los huevos operculados miden de 130 a 150 μm de largo por 63 a 90 μm de ancho (Roberts y Janovy, 2009).

Huevos y miracidios

Los hospedadores infectados por *F. hepatica* eliminan huevos del parásito al ambiente. Una fasciola adulta pone entre dos y cinco mil huevos al día, desde la vesícula biliar, pasan al intestino mezclados con la bilis y salen al exterior con las heces. Los huevos son elipsoidales, operculados, de color amarillento y miden 130-150 x 63-90 μm . El número de huevos eliminados por los vermes depende de factores relacionados con el hospedador, como se ha indicado, varía con la especie; también influyen las reinfecciones, la intensidad parasitaria (efecto multitudinario) y duración de la infección; y la actividad vesicular, que depende de la ingesta. La eliminación fecal de huevos no es constante. Existen variaciones horarias y diarias poco importantes, sin embargo, son de interés las variaciones estacionales. Se ha observado el aumento de la eliminación durante la primavera y el otoño. Independientemente de estas variaciones, se eliminan formas parasitarias al ambiente durante todo el año (Rojo y Ferre, 2000).

Los huevos en el momento de la puesta no están segmentados y su evolución requiere su separación de la masa fecal y condiciones termohigrométricas adecuadas. Los límites térmicos que permiten su desarrollo oscilan entre 10 y 30°C, siendo además indispensable, que estén recubiertos de una fina película de agua. Si existen estas condiciones, en el interior del huevo se desarrolla una larva, móvil gracias a su ectodermo ciliado y con dos características manchas oculares oscuras llamada miracidio. La eclosión del miracidio depende de la luz. La banda de 650 nm del espectro estimula la producción de una enzima proteolítica fotoactiva que debilita la unión del opérculo con la cáscara del huevo. La actividad del miracidio y la hipertonía del medio interno del huevo presionan el opérculo que se abre y permite su salida al exterior. A 26°C se completa el proceso en 12 días, aunque en

condiciones naturales se requieren varias semanas (hasta 2 meses) cuando la temperatura oscila entre 10-12°C. La vida del miracidio depende de sus reservas energéticas, debiendo encontrar un molusco hospedador adecuado antes de 24 horas. En la búsqueda del hospedador intermediario están implicados estímulos quimiotácticos e intervienen la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, la composición iónica, la salinidad y la turbidez del agua, entre otros factores (Rojo y Ferre, 2000).

Los miracidios pierden los cilios cuando penetran en el molusco y se transforman en esporocistos jóvenes. Los esporocistos constituyen el primer estadio larvario de *F. hepatica* dentro del hospedador intermediario y se encuentran en la región periesofágica del caracol. A los 15 días ya existe una generación de redias –el segundo estadio larvario intramolusco– diferenciadas de las masas germinales de células del esporocisto y que se alimenta de los tejidos del hepatopáncreas del limnea. Si las condiciones ambientales y nutritivas para los caracoles son desfavorables puede formarse una segunda generación de redias, aunque lo normal es que la primera generación de redias dé lugar a las cercarías. El número de cercarías formadas en cada caracol es muy variable y no depende del número de miracidios que lo infectaron. Se han observado emisiones desde 10 a 4,000 cercarías, siendo la media 100 cercarías por limnea. En condiciones naturales, el desarrollo intramolusco requiere, generalmente, 8-10 semanas, ampliándose a 12 semanas si se añade la formación del miracidio. Las cercarías emitidas por los caracoles se enquistan sobre hierbas y plantas acuáticas, aunque aproximadamente un 10% lo pueden hacer también en el agua, pierden la cola y se rodean de una cubierta resistente. Esta fase, que se denomina metacercaria, es la forma infectante para los hospedadores definitivos (Rojo y Ferre, 2000).

Catepsinas L

Fasciola hepatica secreta varias cisteínas o tiol proteasas durante su ciclo de vida en los hospederos definitivos (Dalton y Heffernan 1989). Las catepsinas son las principales enzimas proteolíticas secretadas por el estadio larvario infectivo para atravesar la pared intestinal del hospedero (catepsinas B y L3), estadios migratorios para invadir tejido del hígado (catepsinas L1, L2, L3, L5 y B), así como parásitos adultos maduros que residen en los conductos biliares (catepsinas L1, L2 y L5) para alimentarse de sangre del hospedero (Kasný y col 2009, Robinson y col 2009, Morpew y col 2011, Stack y col 2011). También se ha demostrado que las proteasas del parásito participan en la producción de huevos y evasión de la respuesta inmune (Dalton y col 2003, Smooker y col 2010, McVeigh y col 2012). Experimentos de vacunación en animales de laboratorio y rumiantes, utilizando moléculas purificadas nativas o recombinantes de catepsina L han demostrado inducir respuestas protectoras (McManus y Dalton 2006, Kesik y col 2007, Kašny y col 2009, Pérez-Ecija y col 2010, Golden y col 2010).

La selección de bibliotecas de DNA complementario (cDNA) de *F. hepatica* con antisuero a esas proteínas (o selección con fragmentos de PCR) confirma que la catepsina L es una proteína secretada de 326 aminoácidos, consta de 17 aminoácidos la secuencia señal, 90 aminoácidos la secuencia de activación y 219 aminoácidos la proteasa madura (Yamasaki y Aoki, 1993; Heussler y Dobbelaere, 1994; Wijffels y col 1994a; Roche y col 1999; Dowd y col 1994). La adolescencia de *Fasciola hepatica* secreta una cisteína proteasa homóloga en secuencia con catepsina B, la cual puede jugar un papel en la invasión de tejido, renovación de glicocálix o desenquistamiento de metacercarias (Wilson y col 1998).

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

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

La hemoglobina de *F. hepatica* (FHb) utilizada en combinación con FhCL1 o FhCL2 (200 µg de cada antígeno por inmunización) incrementó la eficacia de las vacunas, comparando con la FHb sola. La mejor formulación de FhCL2-FHb produjo una reducción de la carga parasitaria del 72.4% en bovinos. Los huevos de *F. hepatica* mostraron una viabilidad del 80% con preparaciones de catepsina L1-FHb, y del 0-7% para catepsina L2-FHb (Dalton y col 1996). Los medios por los cuales las vacunas median ese efecto de anti-fecundidad/anti-embriónación no se han comprendido completamente, pero esto es posible a través de un efecto directo de los anticuerpos sobre la catepsina L en las estructuras reproductivas del parásito o más probablemente un efecto indirecto en la síntesis de huevos a través de la inhibición en la adquisición de nutrientes facilitada por las proteasas en el intestino (Mulcahy y Dalton, 2001).

Tecnología de despliegue en fagos (phage display)

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

Los fagos filamentosos (género *Inovirus*) constituyen una gran familia de virus bacterianos que infectan una variedad de bacterias gram negativas. La relativa simplicidad de esos virus y la facilidad con la que pueden ser manipulados genéticamente los han hecho fructíferos modelos para estudiar estructuras macromoleculares e interacciones (Sidhu, 2001).

El bacteriófago M13 tiene un diámetro de 6.5 nm y una longitud de 930 nm. La masa molecular de la partícula es aproximadamente de 16.3 MDa, de la cual 87% es proteína. El genoma de la partícula viral consiste en una cadena sencilla de DNA covalentemente cerrada de cerca de 6,400 nucleótidos y 11 genes, que están encapsulados en un cilindro de proteína flexible. La partícula está formada por aproximadamente 2,700 copias de 50 aminoácidos de la proteína principal, llamada proteína 8 (gen VIII, pVIII) que cubre la longitud del bacteriófago. En un extremo del fago, están presentes 5 copias de 33 residuos, la proteína 7 (gen VII, pVII) y la proteína 9 (gen IX, pIX) con 32 residuos. El otro extremo contiene 5 copias, cada una de 406 residuos, la proteína 3 (gen III, pIII) y la proteína 6 (gen VI, pVI)

con 112 residuos (Kehoe y Kay, 2005). El fago filamentosos no produce una infección lítica en *E. coli*, pero puede inducir un estado lisogénico en el cual la bacteria infectada produce y secreta partículas de fago sin experimentar lisis.

La construcción de bibliotecas de péptidos combinatorios es una importante aplicación de la tecnología de phage display. Las bibliotecas de péptidos que expresan muchos millones de secuencias de péptidos aleatoriamente en la superficie del bacteriófago filamentosos fd y M13, son usadas para definir sitios de unión del ligando que son difíciles de identificar por técnicas convencionales (Szardenings, 2003).

Aplicaciones de la tecnología de bacteriófagos en parasitología

Las bibliotecas de péptidos aleatorios han sido usados exitosamente para la identificación de péptidos que mimetizan epitopos de antígenos como vacunas. Estos mimotopos son capaces de mimetizar una región conservada de la proteína de adhesión de la membrana apical del merozoito de *Plasmodium vivax* (Demangel y col 1996) y *Plasmodium yoelii* (Narum y col 2006).

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

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

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

Las metaloproteasas son importantes para la invasión e inmunoevasión de *Schistosoma*. Tang y col (2005), aislaron y caracterizaron péptidos que mimetizan epitopos de metaloproteasas para explorar su protección inmunológica contra *Schistosoma japonicum*, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-metaloproteasa. Algunos ratones Kunming hembras fueron inyectados subcutáneamente con 1×10^{12} partículas de fago, en tres ocasiones. Solamente dos clonas indujeron una reducción significativa de la carga parasitaria (31 y 31.8%) y una alta reducción en el número de huevos por gramo de hígado (52.6 y 54.9%).

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

Proteínas del estado larvario de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) fueron utilizadas para inmunizar pollos y obtener suero hiperinmune para ser empleado en la selección de mimotopos de una biblioteca combinatoria que expone aleatoriamente 12 aminoácidos en cada uno de sus filamentos. Los mimotopos seleccionados fueron utilizados para vacunar ratones y becerros. Estos péptidos generaron anticuerpos específicos en ratones y altos niveles de anticuerpos que reconocen proteínas de las garrapatas. En becerros la respuesta inmune induce cambios específicos en la fisiología de la teleogina, principalmente un posible evento hemorrágico en el tracto gastrointestinal y reproductivo (Prudencio y col 2010). Bishop-Hurley y col (2010), utilizaron mimotopos de huevos de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) para detectar blancos desconocidos en la superficie celular del ectoparásito con fines de vacunación o quimioterapia.

Aunque la infección de caprinos es menor que la fasciolosis ovina o bovina, las cabras son muy sensibles a las infecciones naturales y experimentales (Zafra y col 2009). Además, una alta prevalencia de fasciolosis caprina ha sido reportada en México (43.0 %), Turquía (41.2 %), Pakistán (40.1 %) y Argentina (32.9 y 84.0 %) (Munguía-Xochihua y col 2007;

Gül y Aydın, 2008; Issia y col 2009; Khan y col 2010; Cuervo y col 2012). Existen numerosos trabajos sobre el uso de moléculas purificadas nativas o moléculas recombinantes de *F. hepatica* incluyendo catepsinas L que inducen una respuesta protectora en animales de laboratorio y rumiantes (Hillyer, 2005; McManus y Dalton, 2006; Kasný y col 2009). Así mismo, ensayos con vacunas experimentales utilizando catepsina L1 recombinante han demostrado que esta molécula puede inducir reducciones de la carga parasitaria en ratas (78-80 %), bovinos (48.2%) y cabras (38.7 y 39.13 %) (Kesik y col 2007; Golden y col 2010; Pérez-Écija y col 2010; Buffoni y col 2012). El triclabendazol es el fármaco más eficaz para el tratamiento de fasciolosis, que sólo proporciona control provisional de la enfermedad, ya que el ganado vacuno y las ovejas se vuelven a infectar fácilmente. Resistencia contra triclabendazol se ha reportado ampliamente en animales domésticos (Boray y col 1983; Fairweather, 2011; Hanna y col 2013; Ortiz y col 2013). Por otra parte, la quimioterapia también es costosa y perjudicial para el ambiente. Otras estrategias de control basadas en la vacunación deben ser desarrolladas para reducir la prevalencia de la fascioliasis en rumiantes, pero también para reducir el riesgo de transmisión a los seres humanos.

HIPÓTESIS

La vacunación de cabras con bacteriófagos y desafiadas con metacercarias de *Fasciola hepatica* reduce la producción y desarrollo de huevos del trematodo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la vacunación de caprinos con fagos filamentosos y desafiadas con metacercarias de *Fasciola hepatica* sobre la producción y desarrollo de huevos del parásito.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cuantificar el número de huevos de *F. hepatica* en caprinos vacunados con mimotopos de catepsina L.

Observar y determinar el estado de desarrollo de los huevos del parásito recuperados de la vesícula biliar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de hígados y vesícula biliar

Las muestras biológicas de cabras infectadas con *Fasciola hepatica* fueron obtenidos de trabajos previos (Villa-Mancera y col 2014). Previamente, 24 cabras de seis meses de edad fueron estabuladas en corrales. Los animales mostraron estar libres de la infección por análisis de heces y anticuerpos en suero por ELISA (utilizando como antígeno productos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*). Las 24 cabras fueron agrupadas en cuatro grupos de seis, de acuerdo a su peso. Los grupos 1-3 recibieron 1×10^{13} partículas de fagos con la secuencia PPIRNGK (catepsina L2), DPWWLKQ (catepsina L1) y SGTFLFS (catepsina L1) con 1mg/ml del adyuvante Quil A (Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY), respectivamente. El grupo 4 (control) recibió PBS estéril. Cada animal recibió la primera inyección por vía subcutánea en la semana 0. Una segunda inyección fue administrada en la semana 4. Las metacercarias de *F. hepatica* fueron liberadas de caracoles *Lymnaea cubensis*. Las cápsulas de gelatina conteniendo las metacercarias (menos de 2 meses de edad) fueron administradas *per os* a cada animal con unas pinzas esofágicas. Cada caprino recibió oralmente 200 metacercarias en cápsulas de gelatina, 14 días después de la segunda inmunización (semana 6). El sacrificio de todos los animales vacunados y desafiados se realizó en la semana 22 posterior a la primera inmunización; el hígado y vesícula biliar fueron removidos y los parásitos recuperados.

Viabilidad de huevos

Los huevos colectados de la vesicular biliar fueron lavados con agua libre de cloro e incubados en oscuridad a 22°C y observados diariamente por 14 días (Villa-Mancera y col 2015). Los huevos fueron expuestos a un foco de 100W por 15 minutos para estimular la eclosión de los miracidios y se examinaron posteriormente en un estereomicroscopio (Zeiss Stemi DV4) para observar el grado de desarrollo.

Clasificación del estado de desarrollo

El desarrollo y eclosión de los huevos de *F. hepatica* fueron divididos en 6 distintos estados: muerto, vacío, sin embrionar, división celular, mancha ocular y eclosionado, de acuerdo a Fairweather y col 2012. Los estados y descripción son mostrados en la Figura 1 (A-F).

Análisis estadístico

Se realizó un diseño experimental completamente aleatorio, donde cada cabra fue la unidad experimental. El número de huevos por gramo de heces para los diferentes grupos fueron analizados por medio de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Para los datos obtenidos de cada observación y estado de desarrollo fueron analizados utilizando la prueba no paramétrica Mann-Whitney U empleando el programa IBM SPSS 20 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA), considerándose $P \leq 0.05$ como significativa.

A



Muerto. Los huevos se presentan en color más oscuro que los otros estados de desarrollo y no eclosionan.

B



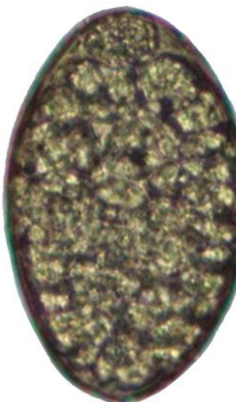
Vacío. Los huevos están sin cascara y sin contenido. La producción de un pequeño número de huevos vacíos ocurre normalmente, independientemente del tratamiento de los parásitos.

C



Sin embrionar o sin desarrollo. Los huevos contienen una masa de células (ovocitos y células del vitelo) que no han comenzado a dividirse y desarrollarse.

D



División celular. El estado de división celular se alcanza después de 7 a 8 días de incubación a 25°C. Las células embrionarias se han dividido y crecen a expensas de las células vitelinas y pueden estar moviéndose u observarse pulsaciones dentro del huevo. Siendo la etapa temprana en el desarrollo de tejido diferenciado del miracidio.

E



Mancha ocular. En este estado, la mancha ocular aparece después de 11 a 12 días de incubación; el miracidio está casi completamente formado y la mancha ocular es visible como un punto negro. Los sacos germinales pueden verse posterior a la mancha ocular dentro del miracidio. Un amortiguador viscoso se forma en un extremo del huevo, debajo del opérculo.

F



Eclosionando. El huevo eclosionado es el estado final de desarrollo. Durante la eclosión, el miracidio emerge del huevo.

G



Eclosionado. El miracidio deja atrás la cascara del huevo vacío con el opérculo abierto.

Figura 1. Microfotografías de los diferentes estados de desarrollo del huevo de *Fasciola hepatica*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de huevos

Se colectaron muestras de heces de cabras inmunizadas con mimotopos de catepsina L1 y L2 para su análisis coproparasitológico en la semana del sacrificio (semana 22). El grupo 4 (control) presentó el mayor promedio en el número de huevos por gramo de heces en la semana 22 (134 ± 23.87); mientras que el grupo 2 de cabras inmunizadas con catepsina L1 y Quil A, obtuvo el menor promedio (31.67 ± 19.21) de los tres grupos de animales vacunados (Figura 2). Para el grupo 1 y 3, el promedio de huevos por gramo de heces fue de 89.00 ± 12.12 y 61.33 ± 18.21 . El análisis de la producción de huevos de *F. hepatica* por gramo de heces muestra una reducción significativa para los tres grupos de animales inmunizados (1-3) del 33.58%, 76.67% y 54.23% ($P < 0.05$), comparado con el grupo control.

Estudios previos, realizados en nuestro laboratorio han demostrado una reducción en la producción de huevos significativa en ovinos inmunizados con mimotopos de catepsina L1 (sin adyuvante), resultados similares fueron obtenidos en este estudio para el grupo de cabras inmunizadas con clonas de catepsina L1 y el adyuvante Quil A (54.23% vs 45.55%). También, en este estudio se obtuvieron resultados diferentes para cabras vacunadas con mimotopos de catepsina L de 7 a.a. del grupo 1 y 2 (33.58% y 76.67%) y los observados en ovinos inmunizados con bacteriófagos con una secuencia de 12 a.a. en la pIII.

Villa-Mancera y col., 2014, inmunizaron cabras con mimotopos de catepsina L1 con el adyuvante Quil A, observando reducciones significativas en la producción de huevos del 67.53% y 57.09% en la semana 18 y 20 posterior a la primera inmunización, cuando se comparó con el grupo control. Así mismo, en este experimento, en la semana 22 posterior a

la primera vacunación con mimotopos de catepsina L1 y el adyuvante Quil A, la reducción en la producción de huevos por gramo de heces en el grupo 2 y 3 (76.67% y 54.23%) fueron similares a los obtenidos anteriormente. Reportes sobre el uso de moléculas nativas o recombinantes con Quil A no reducen significativamente la producción de huevos (Mendes y col 2010a, b; Buffoni y col 2010, 2012; Pérez-Ecija y col 2010; Zafra y col 2010).

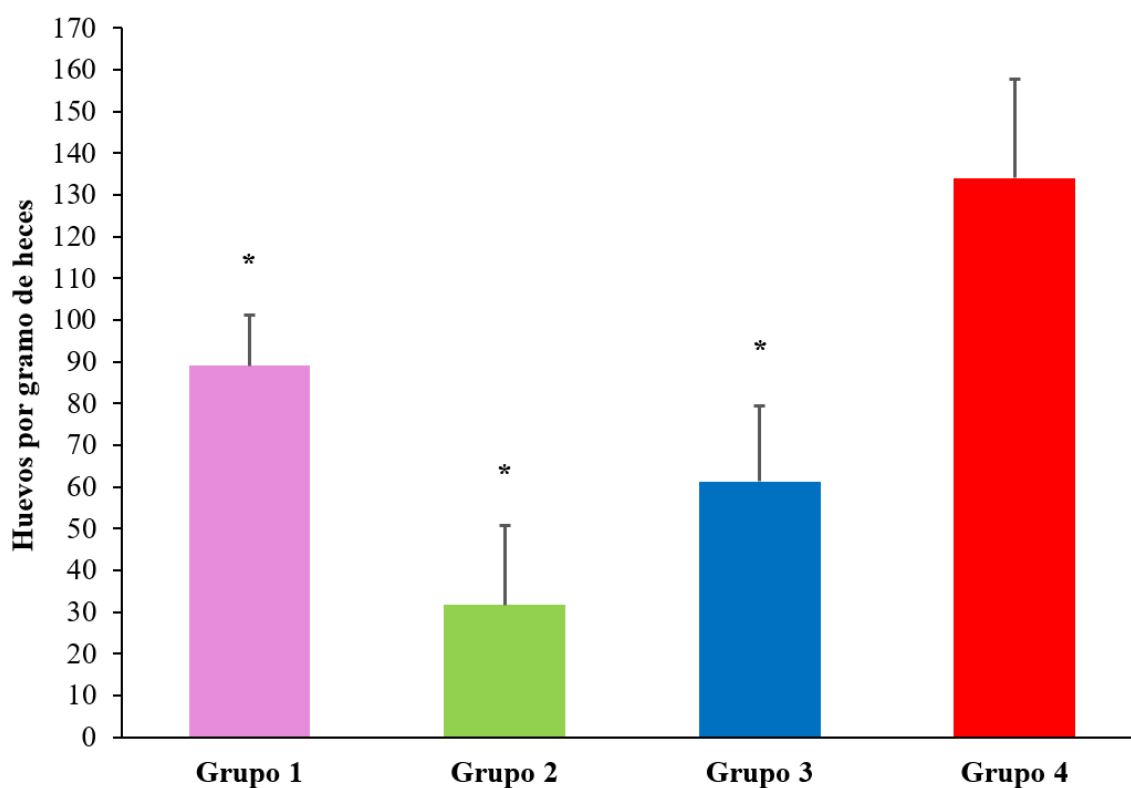


Figura 2. Promedio del número de huevos por gramo de heces de cabras inmunizadas contra *F. hepatica* con clonas de fagos filamentosos de catepsina L1 y L2. * Diferencias significativas frente al grupo control ($P < 0.05$) en la semana 22 posterior a la primera inmunización.

La inmunización de borregos con las clonas de fagos filamentosos inducen niveles de protección de 47.61 y 33.91%; así como una reducción en el número de huevos en heces de 25.85 a 45.55% en animales vacunados con los bacteriófagos (Villa-Mancera y col 2008). Por otro lado, la vacunación en borregos con catepsina L nativa, reduce 69.7% el número de huevos en heces, sin tener un efecto sobre la carga parasitaria (Wijffels y col 1994b). La inmunización de ovinos con catepsina L1 ó L2 nativa contra el trematodo indujo niveles de protección de 33 y 34% en la carga parasitaria, así como una reducción en el número de huevos producidos de 71% y 81% respectivamente; mientras que la administración en combinación de catepsina L1 y L2 indujo una reducción del 60% de la carga parasitaria (Piacenza y col 1999).

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

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

inmunohistoquímica se ha demostrado la presencia de catepsina L en los oocitos, así como en las glándulas de Mehlis y glándulas vitelinas de *F. hepatica* (Wijffels y col 1994b).

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

Estado de desarrollo del huevo de *Fasciola hepatica*

Cuatro grupos de seis cabras fueron utilizadas para determinar el desarrollo de los huevos de *Fasciola hepatica*, tres grupos (1-3) fueron inmunizados con mimotopos de catepsina L1 y L2 para determinar 22 semanas después del inicio del experimento, el grado de desarrollo de los huevos producidos e incubados del parásito

Para este estudio, el grupo de huevos sin embrionación incluyó los estados de desarrollo: muertos, vacíos y sin embrionar. Y los tres estados de desarrollo: división celular, mancha ocular y eclosionado como otro grupo diferente. Por lo que fue relevante determinar qué porcentaje del estado de desarrollo de división celular pueden diferenciarse y terminar completamente formando el miracidio.

El grupo 3 presentó el menor porcentaje de huevos muertos; mientras que el grupo 1, mostró el mayor porcentaje de huevos muertos (Figura 3). Diferencias significativas fueron observadas en el grupo 1 frente al grupo control ($P < 0.05$). Los animales del grupo 4

mostraron el menor porcentaje de huevos vacíos; así mismo, el grupo 2 presentó el mayor porcentaje de huevos vacíos. Se observaron diferencias significativas para los grupos 1-3 cuando se les comparo con el grupo 4 (control, ($P < 0.05$). Las cabras del grupo 1 presentó el menor porcentaje de huevos sin embrionar; además el grupo 3, mostró el mayor porcentaje de huevos sin embrionar. Diferencias significativas ($P < 0.05$) fueron observadas entre los grupos de cabras inmunizadas (1-3) y el grupo de animales infectados con metacercarias de *F. hepatica*.

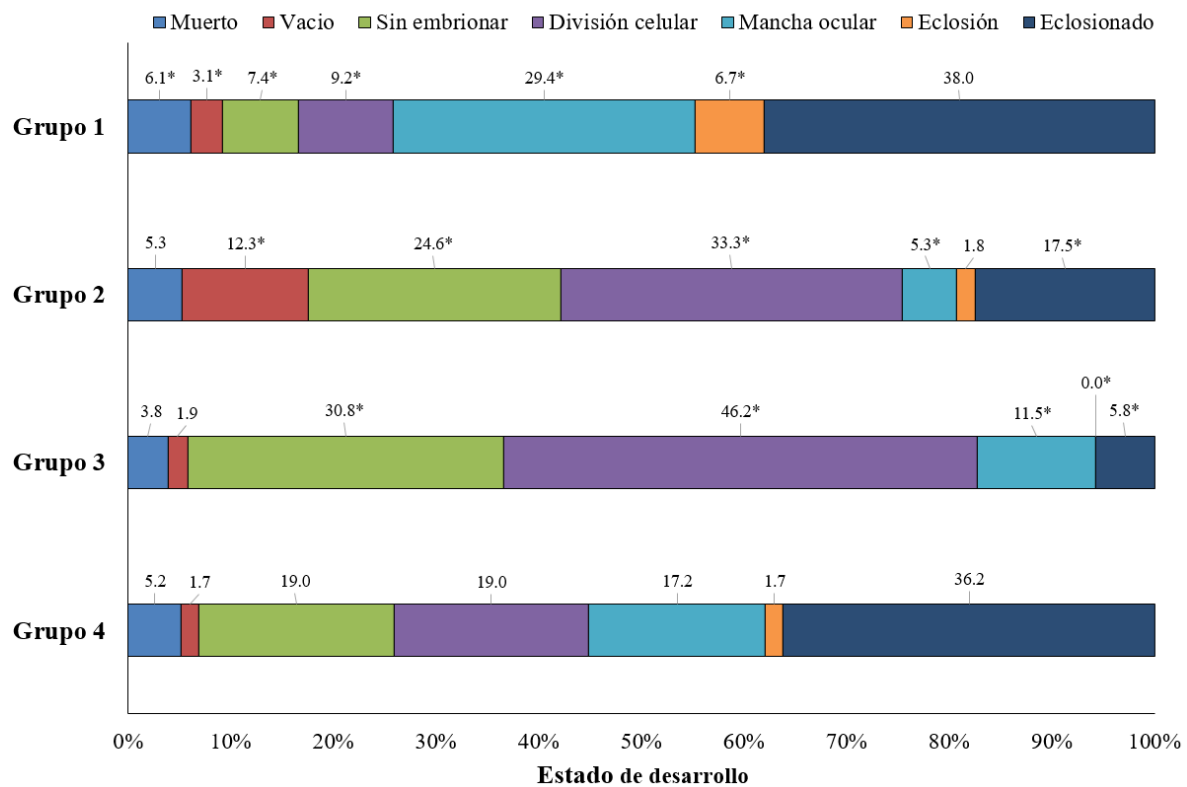


Figura 3. Porcentaje de los diferentes estados de desarrollo del huevo de *Fasciola hepatica* de cabras previamente vacunadas con bacteriófagos filamentosos y desafiadas con metacercarias del parásito. * Diferencias significativas ($P < 0.05$) frente al grupo 4 (control).

El grupo 1 presentó el menor porcentaje de huevos con división celular; así mismo, el grupo 3 mostró el mayor porcentaje de huevos con división celular. Diferencias significativas fueron observadas en los grupos 1-3 frente al grupo control ($P < 0.05$). Las cabras del grupo 2 mostraron el menor porcentaje de huevos con mancha ocular; además el grupo 1 presentó el mayor porcentaje de huevos con mancha ocular. Se observaron diferencias significativas para los grupos 1-3 cuando se les comparo con el grupo 4 (control, ($P < 0.05$). Los animales del grupo 3 presentó el menor porcentaje de huevos eclosionando; mientras que el grupo 1 mostró el mayor porcentaje de huevos eclosionando. Diferencias significativas fueron observadas entre los grupos de animales inmunizados (1 y 3) y el grupo de animales infectados con metacercarias del trematodo ($P < 0.05$). El grupo 3 mostró el menor porcentaje de huevos eclosionados; así mismo, el grupo 1 presentó el mayor porcentaje de huevos eclosionados. Diferencias significativas ($P < 0.05$) fueron observadas entre los grupos de animales vacunados (2 y 3) y el grupo de animales infectados con metacercarias del parásito.

Tomando como referencia el grupo control, las cabras vacunadas con mimotopos de catepsina L2 del grupo 1, se vieron afectados significativamente 6 de 7 estados de desarrollo (excepto huevos eclosionados). Para el grupo 1 se observó una reducción significativa en los porcentajes de huevos sin embrionar (muerto, vacío y sin embrionar) en comparación con el grupo control. Así mismo, para el grupo 1 y 3, para los huevos embrionados (huevos que alcanzan la división celular); siendo el grupo 1, el que alcanza el mayor porcentaje de huevos eclosionados (38.0%). En el grupo 3, el porcentaje de huevos que llegan a la división celular fue del 46.2%, este valor se reduce en el estado de desarrollo donde se observan huevos con mancha ocular (11.5%). Por el contrario, en el grupo 1, el porcentaje de huevos con división celular (9.2%), aumenta a 29.4% con mancha ocular. Sin embargo, el grupo control presentó un porcentaje similar entre el estado de desarrollo de división celular y mancha ocular (19.0

y 17.2%). De los tres grupos de cabras inmunizadas, para el grupo 3 el porcentaje de huevos embrionados (57.7%) se bloquearon y el número de huevos eclosionando y eclosionados se reduce hasta 5.8%.

Existe evidencia morfológica que indica la acción de anticuerpos anti-catepsina en bloquear la actividad de la enzima y su efecto sobre el desarrollo de los miracidios y la producción de huevos a través de la inhibición en la adquisición de nutrientes facilitada por las proteasas en el intestino del parásito; por otro lado, se ha demostrado la presencia de catepsina L en los oocitos, así como en las glándulas de Mehlis y glándulas vitelinas de *F. hepatica* (Wijffels y col 1994a; Tort y col 1999; Mulcahy y Dalton, 2001)

En conclusión, las cabras vacunadas con mimotopos de catepsina L1 y L2 inducen una reducción en la producción de huevos del trematodo, así como un aumento en el número de huevos sin embrionar y por lo tanto una disminución de miracidios que lleguen a eclosionar y contribuir en la transmisión e incidencia de *Fasciola hepatica*.

BIBLIOGRAFÍA

- Berasain P, Goni F, McGonigle S, Dowd A, Dalton JP, Frangione B, Carmona C. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J Parasitol* 1997; 83:1-5.
- Bishop-Hurley SL, Strachan KA, Sutherland IA. The application of phage-displayed peptide libraries to ligand detection in eggs and larvae of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Vet Parasitol* 2010; 173:173–177.
- Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schellenbaum M, Von Orelli M, Sarasin G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet Rec* 1983; 113:315-317.
- Buffoni L, Martínez-Moreno FJ, Zafra R, Mendes RE, Pérez-Écija A, Sekiya M, Mulcahy G, Pérez J, Martínez-Moreno A. Humoral immune response in goats immunised with cathepsin L1, peroxiredoxin and Sm14 antigen and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 2012; 185:315-321.
- Buffoni L, Zafra R, Pérez-Ecija A, Martínez-Moreno FJ, Martínez-Galisteo E, Moreno T, Pérez J, Martínez-Moreno A. Immune response of goats immunised with glutathione S-transferase and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Int* 2010; 59:147-153.
- Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica in vitro* prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62:9-17.

- Cruz MI, García EN, Quintero MMT, Correa D, Quiroz RH 2010. Primeras aportaciones al conocimiento de los hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en México. En: Estudios de Fasciolosis en México. Eds., Figueroa CJA. FMVZ- UNAM, 163-180.
- Cuervo P, Sidoti L, Fantozzi C, Neira G, Gerbeno L, Sierra RM. *Fasciola hepatica* infection and association with gastrointestinal parasites in Creole goats from western Argentina. Rev Bras Parasitol 2013; Vet 22:53-57
- Dalton JP, Heffernan M. Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. Mol Biochem Parasitol 1989; 35:161-166.
- Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP, Andrews SJ. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. Infect Immun 1996; 64:5066-5074.
- Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moiré N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG, Donnelly SM. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. Int J Parasitol 2003; 33:1173-1181.
- Dawes B, Hughes DL. Fascioliasis: the invasive stages in mammals. Adv Parasitol 1970; 8:259-274.
- Dowd AJ, Smith AM, McGonigle S, Dalton JP. Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. Eur J Biochem 1994; 223:91-98.
- Fairweather I. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? Vet Parasitol 2011; 180:133-143.

- Fairweather I, McShane DD, Shaw L, Ellison SE, O'Hagan NT, York EA, Trudgett A, Brennan GP. Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: proof of concept. *Vet Parasitol* 2012; 183:249-259.
- Golden O, RJ Flynn, C Read, M Sekiya, SM Donnelly, C Stack, JP Dalton, G Mulcahy. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine* 2010; 28:5551-5557.
- Gül A, Aydin A. Prevalence of liver flukes in hair goats slaughtered in Hakkari (Yüksekova) Province. *Turkiye Parazitoloj Derg* 2008; 32:334-336.
- Hanna RE, Forster FI, Brennan GP, Fairweather I. *Fasciola hepatica*: histological demonstration of apoptosis in the reproductive organs of flukes of triclabendazole-sensitive and triclabendazole-resistant isolates, and in field-derived flukes from triclabendazole-treated hosts, using in situ hybridisation to visualise endonuclease-generated DNA strand breaks. *Vet Parasitol* 2013; 191:240-251.
- Hanna RE, Gordon AW, Moffett D, Edgar HW, Oliver LF, McConnell S, Shaw L, Brennan GP, Fairweather I. *Fasciola hepatica*: comparative effects of host resistance and parasite intra-specific interactions on size and reproductive histology in flukes from rats infected with isolates differing in triclabendazole sensitivity. *Vet Parasitol* 2011; 178:251-263.
- Hanna RE, Cromie L, Taylor SM, Couper A. The effect of a parenteral ivermectin/closantel injection on the growth and reproductive development of early immature *Fasciola hepatica* in cattle. *Vet Parasitol* 2006; 142:78-90.
- Harris RE, Charleston WA. The epidemiology of *Fasciola hepatica* infections in sheep on a *Lymnaea columella* habitat in the Manawatu. *N Z Vet J* 1976; 24:11-17.

- Heussler VT, Dobbelaere DA. Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 64:11-23.
- Hillyer GV. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J Helminthol* 2005; 79:241-247
- Issia L, Pietrokovsky S, Sousa-Figueiredo J, Stothard JR, Wisnivesky-Colli C. *Fasciola hepatica* infections in livestock flock, guanacos and coypus in two wildlife reserves in Argentina. *Vet Parasitol* 2009; 165:341-344
- Kaplan RM. *Fasciola hepatica*: a review of the economic impact in cattle and considerations for control. *Vet Ther* 2001; 2:40-50.
- Kašny` M, Mikeš L, Hampl V, Dvořák J, Caffrey CR, Dalton JP, Horák P. Peptidases of trematodes (chapter 4). *Adv Parasitol* 2009; 69: 205–297.
- Kay BK, Hoess RH. Principles and applications of phage display. In: Kay BK, Winter J, McCafferty J, editors. *Phage display of peptides and proteins*. San Diego: Academic Press, 1996:21-34.
- Kehoe JW, Kay BK. Filamentous phage display in the new millennium. *Chem Rev* 2005; 105:4056-4072.
- Kesik M, L Jedlina-Panasiuk, M Kozak-Cieszczyk, A Płucienniczak, H Wedrychowicz. Enteral vaccination of rats against *Fasciola hepatica* using recombinant cysteine proteinase (cathepsin L1). *Vaccine* 2007; 25:3619-3628.
- Khan MN, Sajid MS, Khan MK, Iqbal Z, Hussain A. Gastrointestinal helminthiasis: prevalence and associated determinants in domestic ruminants of district Toba Tek Singh, Punjab, Pakistan. *Parasitol Res* 2010; 107:787-794.

- Maes L, Vanparijs O, Lauwers H, Deckers W. Comparative efficacy of closantel and triclabendazole against *Fasciola hepatica* in experimentally infected sheep. *Vet Rec* 1990; 127:450-452.
- Malone JB, Ramsey RT, Loyacano AF. Efficacy of clorsulon for treatment of mature naturally acquired and 8-week-old experimentally induced *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Am J Vet Res* 1984; 45:851-854.
- Mas-Coma S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminthol* 2005; 79:207-216.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Vet Parasitol* 2009; 163:264-280.
- Mendes RE, Pérez-Ecija RA, Zafra R, Buffoni L, Martínez-Moreno A, Dalton JP, Mulcahy G, Pérez J. Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 2010a; 28:2832-2840.
- Mendes RE, Zafra R, Pérez-Ecija RA, Buffoni L, Martínez-Moreno A, Tendler M, Pérez J. Evaluation of local immune response to *Fasciola hepatica* experimental infection in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunized with Sm14 vaccine antigen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010b; 105:698-705.
- McConville M, Brennan GP, Flanagan A, Edgar HW, Hanna RE, McCoy M, Gordon AW, Castillo R, Hernández-Campos A, Fairweather I. An evaluation of the efficacy of compound alpha and triclabendazole against two isolates of *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 2009; 162:75-88.

- McManus DP, JP Dalton. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 2006; 133:S43-S61.
- McVeigh P, AG Maule, JP Dalton, MW Robinson. *Fasciola hepatica* virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes Infect* 2012; 14:301-310.
- Morphew RM, HA Wright, EJ Lacourse, J Porter, J Barrett, DJ Woods, PM Brophy. Towards delineating functions within the fasciola secreted cathepsin 1 protease family by integrating in vivo based sub-proteomics and phylogenetics. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e937.
- Mulcahy G, Dalton JP. Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res Vet Sci* 2001; 70:83-86.
- Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, Dalton JP. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 1998; 16:932-939.
- Munguía-Xóchihua JA, Ibarra-Velarde F, Ducoing-Watty A, Montenegro-Cristino N, Quiroz-Romero H. Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and fecal analysis) in ruminants from a semi-desert area in the northwest of Mexico. *Parasitol Res* 2007; 101:127-130.
- Narum DL, Ogun SA, Batchelor AH, Holder AA. Passive immunization with a multicomponent vaccine against conserved domains of apical membrane antigen 1 and 235-kilodalton rhoptry proteins protects mice against *Plasmodium yoelii* blood-stage challenge infection. *Infect Immun* 2006; 74:5529-5536.
- Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M, Lamenza P, Solana H. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Vet Parasitol* 2013; 195:118-121.

- Pérez-Ecija RA, RE Mendes, R Zafra, L Buffonni, A Martínez-Moreno, J Pérez. Pathological and parasitological protection in goats immunised with recombinant cathepsin L1 and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet J* 2010; 18:351-353.
- Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun* 1999; 67:1954-1961.
- Prudencio CR, AO Marra, R Cardoso, LR Goulart. Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 2010, 172:122-131.
- Roberts LS, Janovy J. Digeneans: Echinostomatiformes. In: Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology. 8th ed. New York. McGraw-Hill, 1999; 268-271.
- Robinson MW, R Menon, SM Donnelly, JP Dalton, S Ranganathan. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8:1891-1907.
- Roche L, Tort J, Dalton JP. The propeptide of *Fasciola hepatica* cathepsin L is a potent and selective inhibitor of the mature enzyme. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 98:271-277.
- Rojo-Vázquez FA, Meana A, Valcárcel F, Martínez-Valladares M. Update on trematode infections in sheep. *Vet Parasitol* 2012; 189:15-38.
- Rojo VFA, Ferre PI. Fasciolosis. En: *Parasitología veterinaria*. Eds. Cordero del Campillo M, Rojo VFA, Sanchez AMC, Hernandez RS, Navarrete LCI, diez BP, Quiroz RH, Carvalho VM. McGraw-Hill Interamericana, 2000; 260-272.
- Sidhu SS. Engineering M13 for phage display. *Biomol Engin* 2001; 18:57-63.

- Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228:1315–1317.
- Smith GP, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 1993; 217:228-257.
- Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A, Dalton JP. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62:1-8.
- Smooker PM, R Jayaraj, RN Pike, TW Spithill. Cathepsin B proteases of flukes: the key to facilitating parasite control? *Trends Parasitol* 2010; 26:506-514.
- Spithill, TW, Smooker, PM, Sexton J L, Bozas E, Morrison CA, Creaney J, Parsons JC. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: *Fasciolosis*. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 1999:377–410.
- Stack C, Dalton JP, Robinson MW. The phylogeny, structure and function of trematode cysteine proteases, with particular emphasis on the *Fasciola hepatica* cathepsin L family. *Adv Exp Med Biol* 2011; 712:116-35.
- Szardenings M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J Recept Signal Transduct Res* 2003; 23:307-349.
- Tang L, Chen Y, Wang L, Zhang S, Zeng X, Yi X. Identification and characterization of peptides mimicking the epitopes of metalloprotease of *Schistosoma japonicum*. *Cell Mol Immunol* 2005; 2:219-223.
- Tang LF, Yi XY, Zeng XF, Wang LQ, Zhang SK. *Schistosoma japonicum*: isolation and identification of peptides mimicking ferritin epitopes from phage display library. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2004; 36:206-210.

- Torgerson P, Claxton J. Epidemiology and control. In: Fasciolosis. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 1999:113-149.
- Tort J, Brindley PJ, Knox D, Wolfe KH, Dalton JP. Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Adv Parasitol* 1999; 43:161-266.
- Villa-Mancera A, Méndez-Mendoza M Protection and antibody isotype responses against *Fasciola hepatica* with specific antibody to pIII-displayed peptide mimotopes of cathepsin L1 in sheep. *Vet J* 2012, 194:108-112
- Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D, Ibarra F, Reyes-Pérez H, Reyes-Vivas H, López-Velázquez G, Gazarian K, Gazarian T, Alonso RA. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology* 2008, 135:1437-1445.
- Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A, Utrera-Quintana F, Carreón-Luna L. Cathepsin L1 mimotopes with adjuvant Quil A induces a Th1/Th2 immune response and confers significant protection against *Fasciola hepatica* infection in goats. *Parasitol Res* 2014; 113:243-250.
- Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A, Olivares-Pérez J, Ortega-Vargas S, Cruz-Mendoza I, Quiroz-Romero H. Motility of *Fasciola hepatica* miracidia assessed with a computer-assisted sperm analyser. *J Helminthol* 2015; 89:453-457.
- Walker SM, Hoey E, Fletcher H, Brennan G, Fairweather I, Trudgett A. Stage-specific differences in fecundity over the life-cycle of two characterized isolates of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 2006, 2:209-216.
- Wang M, Yi XY, Zeng XF, Li XP, Zhou DM. Studies on the mimic short peptide-based vaccine: immunoprotection in mice against *Schistosoma japonicum* infection *Chin J Parasitol Parasit Dis* 2003; 21:338-341.

- Wijffels GL, Panaccio M, Salvatore L, Wilson L, Walker ID, Spithill TW. The secreted cathepsin L-like proteinases on the trematode, *Fasciola hepatica*, contain 3-hydroxyproline residues. *Biochemical J* 1994a; 299:781-790.
- Wijffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, Campbell N, Sexton J, Wicker J, Bowen F, Friedel T, Spithill TW. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol* 1994b; 78:132-148.
- Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM, Spithill TW. *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol* 1998; 88:85-94.
- Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:433-455.
- Wu HW, Hu XM, Wang Y, Kurtis JD, Zeng FJ, McGarvey ST, Wu GL, Zhang ZS, Hua ZC. Protective immunity induced by phage displayed mitochondrial related peptides of *Schistosoma japonicum*. *Acta Trop* 2006; 99:200-207.
- Yamasaki H, Aoki T. Cloning and sequence analysis of the major cysteine protease expressed in the trematode parasite *Fasciola sp.* *Biochem Mol Biol Int* 1993;31:537-42.
- Zafra R, Buffoni L, Pérez-Ecija RA, Mendes RE, Martínez-Moreno A, Martínez-Moreno FJ, Pérez J. Study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunised with a peptide of the Sm14 antigen. *Res Vet Sci* 2009; 87:226-232.
- Zafra R, Pérez-Ecija RA, Buffoni L, Mendes RE, Martínez-Moreno A, Martínez-Moreno FJ, Galisteo ME, Pérez J. Evaluation of hepatic damage and local immune response in goats immunized with native glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *J Comp Pathol* 2010; 143:110-119.

Zhou DM, Yi XY, Zeng XF, Wang M, McReynolds L. Immunity against *Schistosoma japonicum* induced by phage display peptides mimicking antigenic epitopes of *Trichinella spiralis*. Chin J Parasitol Parasit Dis 2001; 19:268-271.