

## Propuestas vacunales para el tratamiento de la fasciolosis en rumiantes, un desafío aún no resuelto

Vaccines for the prevention of fasciolosis in ruminants a challenge yet unresolved

FERNÁNDEZ, V.<sup>1,3</sup>; SOLANA, M.V.<sup>1</sup>; ESTEIN, S.M.<sup>2,4</sup>; SOLANA, H.<sup>1,3</sup>

Centro de Investigaciones Veterinarias de Tandil (CIVETAN-CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Campus Universitario, 7000 Tandil, Argentina. <sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Cs. Biológicas. <sup>2</sup>Laboratorio de Inmunología, Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva. <sup>3</sup>CICBA, Argentina, <sup>4</sup>CONICET, Argentina.

### RESUMEN

La fasciolosis producida por el trematodo *Fasciola hepatica* es una enfermedad que provoca importantes pérdidas económicas en la producción ganadera siendo además una preocupante enfermedad zoonótica. Actualmente, la única herramienta disponible para el control de dicha enfermedad es la utilización de fármacos antiparasitarios. Hoy, la aparición de fenómenos de resistencia antiparasitaria llevan a la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas. La búsqueda de antígenos vacunales para el desarrollo de una vacuna eficaz es una de las herramientas más investigadas. En el presente artículo se expone una revisión de los principales resultados obtenidos hasta el momento en la búsqueda de diversos candidatos vacunales. Se comparan diferentes intentos de vacunas experimentales: desde vacunas irradiadas atenuadas, hasta las nuevas estrategias que involucran el desarrollo de vacunas recombinantes y de ADN en el modelo ratón y en el huésped susceptible.

Palabras clave: (vacunas), (fasciolosis), (ratones), (rumiantes).

Correspondencia *e-mail*: Vanesa Fernández vanesaf@vet.unicen.edu.ar

Recibido: 21-05-2012

Aceptado: 23-11-2012

## SUMMARY

The use of an effective vaccine against fasciolosis is currently and due to advances in the field, an achievable goal. This article is a review of recent data and the main results about the search for vaccine candidates against fasciolosis. In the present work it presents the search done and results from the use of attenuated vaccines irradiated to new strategies that involve the development of recombinant vaccines and DNA.

Key words: (vaccines), (fasciolosis), (mice), (ruminants).

## INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una enfermedad zoonótica causada por parásitos del género *Fasciola*, que parasitan a diferentes especies de mamíferos incluido el hombre, aunque es en los rumiantes donde cobra mayor importancia<sup>46</sup>. El agente causal de esta enfermedad es un trematode que se localiza en los canalículos biliares del hígado del hospedador, ocasionando no solo la falla hepática sino que además puede llegar a provocar la muerte repentina por el daño hepático producido, o como consecuencia de la invasión secundaria de bacterias del género *Clostridium* spp. Si el hospedador sobrevive a las lesiones, la regeneración del hígado se produce con producción de tejido fibroso nuevo, con la consecuente distorsión del órgano originada por las múltiples cicatrices generadas. En este estado pueden aparecer: anemia, debilidad, emaciación y edemas (submandibular, cuello, pecho y abdomen) con la consecuente reducción en el potencial productivo de los rumiantes afectados y el decomiso de los hígados en los frigoríficos<sup>46</sup>. El género *Fasciola* está distribuido mundialmente y presenta 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<sup>46</sup>.

Al presente se han desarrollado diferentes estrategias de control. Sin embargo, el control químico sigue constituyendo la principal herramienta en la lucha contra este parásito<sup>46</sup>. Actualmente, el antihelmíntico más empleado es el triclabendazole (TCBZ). A pesar de que el tratamiento antihelmíntico es efectivo a corto

plazo, la emergente resistencia a estas drogas ha generado la necesidad de desarrollar nuevas estrategias. Hoy, la aparición de resistencia a los fasciolocidas, y la presencia de residuos de los mismos en los alimentos y en el ambiente han determinado que en los últimos años se investiguen nuevas alternativas de lucha contra la fasciolosis, tales como la selección genética de animales naturalmente resistentes, y el control inmunológico a través del desarrollo de vacunas, las cuales surgen como una alternativa muy prometedora pero aún sin resultados plenos<sup>46</sup>. Varias décadas de investigación se han invertido, sin embargo aún no existe una vacuna eficaz en el mercado. A pesar de ello, diferentes estudios sugieren que la vacunación puede ser un medio eficaz para el control de la fasciolosis. El punto de partida está en el hecho de que *F. hepatica* puede inducir, en determinados hospedadores, respuestas inmunitarias eficaces para la destrucción del parásito<sup>24,25,64</sup>, y por lo tanto la adquisición de resistencia frente a la enfermedad parasitaria, lo que podría permitir desarrollar protocolos de inmunización con antígenos protectores<sup>16,29,37,39</sup>. A partir de esta constatación se han realizado numerosos ensayos de vacunación, inicialmente con diversos extractos del parásito<sup>46</sup>, posteriormente con antígenos definidos de *Fasciola hepatica*<sup>54,57,58</sup>, y más recientemente, con antígenos recombinantes<sup>2,13,44,49,60</sup> así como formulaciones antigénicas de ADN cíclico (cADN)<sup>35,62</sup>.

Los cambios que se han producido actualmente en las prácticas agrícolas, el aumento del transporte de animales, y el calentamiento global han creado ambientes que

facilitan la diseminación rápida y generalizada de los parásitos que se transmiten por el alimento y el agua. Es por esto que se prevé que *F. hepatica* aumente su área de distribución debido a los cambios climáticos. Recientemente, se analizó mediante un modelo de predicción a largo plazo el efecto del cambio climático y su relación con la diseminación de este parásito en el Reino Unido demostrándose que ambos fenómenos están íntimamente ligados previniéndose el aumento de la distribución geográfica y la severidad de los casos.

La aparición de resistencia hacia las drogas existentes en el mercado hace que el desarrollo de una vacuna sea una aspiración con amplio consenso en la comunidad científica. Las vacunas tienen a su favor que no dejan residuos químicos, eliminando así el período de retención del animal, no dañan el medioambiente y serían aceptadas por los consumidores quienes ya están familiarizados con el concepto de vacunación frente a otros patógenos en medicina humana y veterinaria<sup>14</sup>.

Las vacunas contra *F. hepatica* han sido desarrolladas utilizando un rango amplio de estrategias que incluyen desde extractos crudos de todo el organismo hasta antígenos peptídicos sintéticos. Dichos esfuerzos se encuentran resumidos en varias revisiones<sup>57,58,62</sup>. Actualmente, se experimentan nuevas estrategias basadas en la biología molecular (vacunas de ADN)<sup>53, 56</sup>.

La presente revisión bibliográfica tiene como objetivo recopilar la información sobre los principales ensayos de vacunación desarrollados hasta la actualidad, en los cuales se han empleado desde metacercarias atenuadas, diferentes productos de excreción y secreción del parásito y enzimas excretadas relacionadas con el metabolismo del parásito obtenidas a partir del parásito o en forma recombinante, tales como Glutación-S-Transferasas (GST), Proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP) y las catepsinas-L1 (Cat-L) entre otras. En general, los diferentes abordajes para el desarrollo de vacunas contra la infección de *F. hepatica* examinaron en sus comienzos el uso de cuatro tipos de antígenos: trematodos vivos, atenuados por irradiación, extractos somáticos del parásito y antígenos metabólicos o de excreción/secreción.

### Ensayos vacunales con metacercarias irradiadas atenuadas

La inmunización de las especies hospedadoras susceptibles utilizando metacercarias de *Fasciola* spp atenuadas fue una de las primeras estrategias ensayadas en un intento por identificar antígenos protectores del trematodo y experimentar la respuesta inmunitaria en el hospedador. La protección obtenida con estas vacunas en bovinos ha tenido una eficacia relativa de acuerdo al protocolo vacunal utilizado, obteniéndose niveles de protección que oscilaron entre el 30 y el 85,5% en la reducción de la carga parasitaria<sup>1,15,45</sup>. Las ovejas y vacas pueden ser protegidas frente a *F. gigantica* mediante la inmunización con metacercarias irradiadas, obteniéndose porcentajes de hasta el 98% y del 80% de reducción en la carga parasitaria en bovinos y ovinos, respectivamente<sup>3, 4</sup>. Sin embargo, otros intentos similares con el fin de promover niveles de resistencia significativos frente a *F. hepatica* en ovejas no han tenido similar éxito<sup>5,10,15</sup>, no adquiriendo resistencia ante una reinfección después de una infección con metacercarias ya sean irradiadas o no<sup>6</sup>. Sumado al hecho de que en ratas, ratones y conejos generalmente no han tenido similares respuestas<sup>64</sup>. Por otro lado, los estudios realizados indican que la protección en bovinos y ratas dependería del intervalo entre la vacunación y el desafío con el trematodo<sup>64</sup>. Los ensayos en ovejas llevados a cabo por Creaney y cols., 1995 empleando tanto *Fasciola* spp. como *Schistosoma* spp., (trematodo, parásito de los seres humanos, agente causal de la esquistosomiasis), revelaron que una dosis de irradiación de alrededor de 3 krad podría representar el umbral por encima del cual se imposibilitaría el desarrollo de las formas juveniles, impidiendo, de este modo, completar el ciclo biológico de la enfermedad. Los sueros de ovejas vacunadas con metacercarias irradiadas se ensayaron en técnicas de ELISA así como en inmunotransferencias con el objetivo de compararlos con los provenientes de animales que recibían una infestación sin haber sido vacunados. La irradiación produjo alteraciones

en los carbohidratos así como en la expresión de ciertas proteasas<sup>11</sup>, las cuales contribuyeron a la generación de la respuesta inmunitaria en los ovinos hospedadores, a pesar que existen especulaciones en referencia al mecanismo de la respuesta protectora contra *Fasciola* tanto en bovinos como en ratas. Algunos autores sugieren que una pequeña población de metacercarias irradiadas que llegan al hígado podría producir una fibrosis hepática y la resistencia, en este caso, estaría determinada por una barrera de tipo fisiológico más que por un mecanismo inmunitario<sup>6, 30, 31, 51</sup>. Sin embargo, otros autores demostraron, en experimentos realizados con *F. gigantica*, que la población de metacercarias se redujo en un 98% en bovinos y que no existía daño hepático ni se recuperaban formas adultas del parásito cuando se administraban metacercarias irradiadas con 3 krad<sup>4</sup>.

A pesar de que las ovejas han sido vacunadas con éxito contra *F. gigantica* y *Schistosoma mattheei* usando metacercarias irradiadas y con 80% y 56-78%, respectivamente de reducción en la carga parasitaria<sup>3, 59</sup>, parece poco probable que éstas desarrollen protección eficaz frente a *F. hepatica* usando este tipo de vacuna, ya que varios estudios parecen sugerir que la supervivencia de *F. hepatica* en ovejas es la suma de dos variables: por un lado la variación en la falta de respuesta del hospedador, y por otro lado, la resistencia del parásito a ser destruido por el sistema inmune<sup>57</sup>.

### Ensayos vacunales con antígenos definidos

Uno de los requisitos que deben cumplir las vacunas frente a *F. hepatica* es presentar, necesariamente, un bajo costo para que pueda generalizarse su uso en rumiantes. Por este motivo durante los últimos años se ha trabajado con varios antígenos definidos que permiten su producción recombinante a gran escala<sup>13, 14</sup>. La mayoría de los intentos realizados hasta el presente fueron dirigidos a desarrollar una vacuna eficaz contra la fasciolosis a partir de la identificación de ciertos antígenos protectores, principalmente proteínas (enzimas) que participan activamente en el metabolismo del parásito. Entre ellos se

han realizado ensayos vacunales utilizando como antígeno a ciertas proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP), enzimas del metabolismo detoxificativo como las Glutathion S-Transferasa (GST), catepsinas, hemoglobina, Leucin Amino Peptidasas (LAP), entre otras.

### Proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP).

Las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP) integran una gran familia de moléculas que participan en la unión y transporte de una amplia gama de ligandos hidrofóbicos tales como el ácido oleico, palmítico, ácidos grasos de cadena larga y de sus ésteres acil-CoA, así como de los ácidos biliares<sup>61</sup>. Existe una gran variedad de FABPs descritas tanto en vertebrados como en invertebrados y cuya característica más significativa es la conservación del tamaño (14 a 16 kDa) y de la longitud (127 a 133 AA)<sup>61</sup>. De toda esta familia de proteínas la mejor caracterizada es la familia de las FABP citoplasmáticas<sup>61</sup>.

El uso potencial de las FABP como vacunas fue descubierto a mediados de los años 70 por el Dr. G. Hillyer, quien identificó un grupo de proteínas de *Fasciola* denominadas FhSmIII. Estas proteínas formuladas en Adyuvante de Freund Completo (AFC) fueron administradas en ratones BALB/c y CD-1<sup>27</sup> y en vacas<sup>28</sup>. En dichos estudios se detectaron reducciones en la carga parasitaria del 69% al 78% en ratones y del 55% en vacas. Asimismo, esta vacuna experimental protegió más del 81% de los ratones infestados con cercarias de *S. mansoni*<sup>27</sup>. Todos estos resultados demostraron que *Fasciola* y *Schistosoma* comparten epitopes protectores responsables de la protección cruzada. Además, esta identidad antigénica se observó cuando se examinaron muestras de ADNc correspondientes a la familia de FABP citoplasmáticas de *F. hepatica* y de *S. mansoni*, y se descubrió una proteína identificada como Fh15, la cual comparte un tamaño similar (14,7 kDa) y un 44% de su secuencia de aminoácidos con la Sm14 de *S. mansoni*<sup>42</sup>. Sin embargo, el candidato más idóneo de las proteínas

FABP de *S. mansoni*, es la proteína Sm14, como demuestra el estudio llevado a cabo por Tendler y cols.<sup>60</sup>, donde se utilizó una proteína recombinante de Sm14 en conejos y ratones. Los resultados en conejos revelaron una reducción de la carga parasitaria del 89% tras infectar con 1000 cercarias de *S. mansoni*. En ratones, los resultados arrojaron niveles de protección del 37% al 66% frente a *S. mansoni*, aunque el dato más interesante fue que la Sm14 recombinante mostró un porcentaje de protección del 100% frente a la infección por *F. hepatica*<sup>60</sup>. En ese mismo año, Bozas y Spithill<sup>7</sup> identificaron una tercera proteína denominada FABP3, la cual fue emulsionada en AFC y administrada en ratones, aunque la protección obtenida no fue significativa<sup>60</sup>. Sin embargo, cuando la FABP3 se administró en corderos, provocando la infestación con 80 metacercarias de *F. hepatica*, se obtuvo un porcentaje de reducción de la carga parasitaria cercano al 100%<sup>2</sup>.

En resumen, las proteínas de la familia de FABP se muestran como los candidatos vacunales más prometedores frente a la fasciolosis y schistosomiasis y, probablemente también, frente a otras enfermedades provocadas por trematodos, siendo necesario un estudio más profundo del rol protector de las proteínas Sm14 y Fh15.

### Glutación S-Transferasa

Las Glutación S-Transferasas (GST, EC 2.5.1.18) 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 al menos seis 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%) diferenciándose dentro de las de una misma clase en pequeñas secuencias (aproximadamente el 30%)<sup>38,40,48</sup>. En el caso de *F. hepatica* se identifica como FhGST

y desempeña al menos tres funciones conocidas: I) está involucrada en la desintoxicación de aldehídos citotóxicos producidos durante la peroxidación lipídica<sup>8</sup>, II) está implicada en la función absorbiva del intestino del parásito adulto<sup>9</sup>, y III) interactúa con la hematina previniendo el bloqueo del intestino del parásito por cristalización de la misma<sup>8</sup>.

La proteína GST de *F. hepatica* fue seleccionada como un candidato inmunógeno para la constitución de una vacuna subcelular teniendo en cuenta que ya se había demostrado que las GSTs homólogas de *S. mansoni* (Sm28) y de *S. japonicum* (Sj26)<sup>9</sup> confieren protección contra la infestación con metacercarias en animales de laboratorio (ratones y conejos)<sup>56</sup>.

El primer ensayo de vacunación en ratas con la proteína GST formulada en AFC no confirió protección significativa<sup>32</sup>, sin embargo, las ovejas que recibieron múltiples vacunaciones con la GST nativa emulsionada en AFC, mostraron una reducción de la carga parasitaria del 57%, constituyéndose en la primera vacuna experimental utilizando GST como antígeno vacunal<sup>54</sup>. En los años 90 varios investigadores realizaron un extenso grupo de ensayos que involucraron el empleo de GST dirigidos a desarrollar una vacuna eficaz pero no fue posible reproducir una respuesta protectora a pesar que se usó el mismo protocolo de inmunización<sup>41,56</sup>. Más recientemente, De Bont y col. (2003)<sup>17</sup> en el Institut Pasteur de Lille intentaron la inmunización con GST recombinante de *S. bovis* en bovinos, utilizando hidróxido de aluminio, saponinas (Quil A), o con AFC como adyuvantes, sin embargo, ninguna de las formulaciones utilizadas confirió protección contra *F. hepatica* en el ganado estudiado<sup>17</sup>.

### Cisteíno proteasas (catepsinas)

Las cisteíno proteasas pertenecen a una gran familia en las que se incluyen las catepsinas L y B (CatB y CatL). Estas proteasas se han estudiado como postulantes a ser antígenos vacunales debido a que cumplen un rol importante no solo en la nutrición del parásito sino que además participan activamente en la actividad invasiva

y en la evasión de la respuesta inmunitaria<sup>34,43</sup>. Estas enzimas se encuentran mayoritariamente en los productos de excreción-secreción de *F. hepatica* y pueden ser fácilmente colectadas *in vitro*<sup>54, 57</sup>. Las secuencias que codifican para CatL y CatB ya han sido aisladas a partir de librerías de cADN de *F. hepatica* adultas<sup>13, 14, 32</sup>. Por electroforesis bidimensional se ha demostrado que la CatL tiene una naturaleza heterogénea caracterizándose al menos dos formas relevantes: CatL1 y CatL2<sup>54</sup>. Estas dos enzimas tienen distintas características fisicoquímicas (tamaño molecular, pH óptimo) y especificidad de sustrato<sup>18</sup> lo que seguramente las postula como dos candidatos diferentes a generar una respuesta vacunal determinada.

Las proteínas secretadas por *F. hepatica* han sido caracterizadas en diferentes trabajos de investigación y todos los estudios concuerdan en que las catepsinas que predominan en los estadios adultos del trematodo son enzimas cisteíno proteasas homólogas a la CatL lisosomal de los mamíferos<sup>26</sup>, mientras que la CatB se encuentra principalmente en los estadios juveniles<sup>36</sup>. Por ser mayoritarias y estar involucradas en funciones biológicas esenciales del parásito ambas son consideradas promisorios candidatos vacunales y terapéuticos.

Wijffels en 1994<sup>63</sup> demostró por primera vez en ovejas la eficacia vacunal de la CatL purificada. La CatL formulada en AFC se administró en dos oportunidades con un intervalo de cuatro semanas, en la primera administración con una dosis de 120 µg y en la segunda administración con una dosis de 90 µg. La carga parasitaria no varió significativamente en relación a la determinada en los animales control no vacunados; sin embargo, hubo una reducción del 70% en la eliminación de huevos y la viabilidad de los huevos maduros obtenidos se redujo en un 80%. En un segundo experimento, el mismo autor utilizando el mismo protocolo obtuvo solo el 52% de reducción de huevos en las heces<sup>63</sup> confirmando la baja reproducibilidad de la respuesta vacunal.

La eficacia de la CatL1 como candidato vacunal fue analizada en el ganado bovino<sup>12</sup>. En este ensayo, los animales recibieron tres

inmunizaciones con distintas dosis de CatL1 purificada y formulada con AFC. Las diferentes dosis utilizadas solo confirieron una protección significativa promedio del 57,7% respecto del grupo control no vacunado. En un segundo ensayo, empleando un protocolo similar, se obtuvo un 42,5% de la protección y un 50% de la reducción en la viabilidad de los huevos<sup>12</sup>. Dalton evaluó además la eficacia de CatL1 y CatL2 empleadas en forma individual o asociadas a la hemoglobina de *F. hepatica* en el ganado vacuno<sup>12</sup>. En combinación con hemoglobina ambas catepsinas produjeron la reducción de la carga parasitaria con el valor más alto de 72% para la CatL2. Por otra parte, la CatL1 indujo reducción en la fecundación de los huevos. Posteriormente, una serie de ensayos en ovejas y bovinos con CatL1 y CatL2 nativas purificadas<sup>55</sup>, demostraron que estas enzimas solo protegían entre el 33% y el 79% frente al desafío con metacercarias<sup>13,14</sup>. Es importante aclarar que estas catepsinas mostraron un potente efecto inhibitorio sobre la embriogénesis y la fecundación, mecanismos que afectan el ciclo biológico del parásito.

## Hemoglobina

El mecanismo mediante el cual la hemoglobina de *F. hepatica* estimula al sistema inmune todavía es incierto, aunque las propiedades relativas al almacenamiento de oxígeno que tiene la hemoglobina podrían jugar un papel vital<sup>13</sup>. Experiencias previas llevadas a cabo con catepsina L1<sup>12,14</sup> y catepsina L2 combinada con hemoglobina de *F. hepatica* se desarrollaron para determinar su eficacia como vacuna. Inoculando conjuntamente con hemoglobina, los resultados de estas experiencias en bovinos arrojaron unos porcentajes de reducción en la carga parasitaria de hasta el 69% con catepsina L1 y del 72% con catepsina L2<sup>33</sup>. La reducción en la fertilidad en los huevos encontrados en heces también fue elevada, al encontrarse unos porcentajes de viabilidad de entre 40% y 65% con catepsina L1 aislada y del 0-80% cuando se inoculaba en conjunto con hemoglobina. La catepsina L2, junto con

la hemoglobina, provocó un porcentaje de viabilidad en los huevos del 0-7%.

En resumen, los resultados observados más significativos se obtuvieron cuando se usó como vacuna una mezcla de hemoglobina y catepsina L2 ya que no solo se consiguió una reducción en la viabilidad de los huevos, sino también en la carga parasitaria, convirtiéndose en un candidato idóneo para una vacuna comercial si sus resultados fueran reproducibles.

### Paramiosina

En el estudio de las proteínas tegumentales, se ha prestado especial atención a la paramiosina debido a los éxitos obtenidos en experiencias realizadas con paramiosina de *Schistosoma* en ratones<sup>23,47,50</sup>. En virtud de los fenómenos de reacción cruzada descritos entre *Fasciola* y *Schistosoma*, se han llevado a cabo algunas experiencias de vacunación con la paramiosina (94 kDa) de *Schistosoma* en ovinos y en bovinos, sin embargo los resultados fueron dispares incluso usando paramiosina procedente de *F. gigantica*<sup>22,53</sup>. Por lo tanto, el potencial de la paramiosina como candidato vacunal aún no ha sido demostrado.

### Leucin aminopeptidasa.

La leucin aminopeptidasa (LAP) es una metaloproteasa de *F. hepatica*. Esta proteína es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes y una protección del 89% contra *F. hepatica* en ovinos<sup>49</sup>. Aunque la protección más significativa fue obtenida con la LAP sola, también se emplearon en conjunto con CatL1, CatL2 y LAP. Los porcentajes de protección obtenidos al inmunizar con LAP fueron superiores a los conferidos por CatL1 o CatL2 administradas en forma individual. En todos los grupos vacunados se midieron los niveles de la enzima hepática gamma glutamil transferasa que se mantuvo en un margen normal sin aumento de su actividad lo que indica una actividad hepática normal, sin lesiones severas. El potencial de LAP se comprobó en conejos con un 81% de protección. Una vacuna elaborada con dicha enzima recombinante ya ha sido patentada y

se están comenzando los ensayos clínicos en rumiantes<sup>49</sup>.

### Proteínas del tipo saponinas

Espino y Hillyer (2003)<sup>19</sup> aislaron un producto de expresión de 436 pb procedente de una librería cADN de *F. hepatica* adulta reconocido por el suero de un conejo infectado con *Fasciola* durante 4 semanas. El marco de lectura codificó para un polipéptido de 101 aminoácidos, 11.5 kDa de peso molecular y un punto isoelectrónico de 4.63. La secuencia de aminoácidos resultante reveló una homología significativa con una lisina-NK, proteína del tipo saponina de *F. hepatica* denominada FhSAP1<sup>52</sup>. Esta proteína nuevamente descrita se identificó como FhSAP-2. Los conejos vacunados con FhSAP-2 desarrollaron 81,2% menos adultos que los controles<sup>21</sup>. Por otra parte, en los animales vacunados hubo una disminución de la cantidad de huevos presentes en las heces y en la bilis, del 83,8% y del 73%, respectivamente. La evaluación de las lesiones macroscópicas del hígado reveló que los conejos vacunados con FhSAP-2 presentaron lesiones menos severas. Estos resultados indican que esta proteína de *Fasciola* tiene un potencial inmunoprolifáctico contra la fasciolosis en conejos<sup>20</sup> aunque no se han analizado aún sus efectos en hospedadores de interés.

## CONCLUSIONES

El uso de fármacos antihelmínticos es la única herramienta que se dispone al presente frente a una Fasciolosis, aunque el fenómeno de resistencia ya es un hecho frecuente en varios lugares del mundo. Al presente, el desarrollo de una vacuna eficaz para la prevención de dicha enfermedad parasitaria es una necesidad indiscutible. Las actuales formulaciones vacunales descritas en el presente trabajo son productos potencialmente viables y los adyuvantes utilizados colaboran con los diferentes antígenos analizados en la optimización de su capacidad como inmunógenos, por lo que su selección debe contemplar las características del antígeno y los mecanismos de protección contra la

enfermedad en cuestión. Varios intentos se han desarrollado utilizando diferentes candidatos vacunales pero hasta el presente no se han obtenido resultados plenamente satisfactorios. No puede ignorarse que el huésped es crucial en los experimentos de vacunación, por ello los experimentos en animales de laboratorio solo pueden considerarse como pruebas piloto. Los resultados insatisfactorios hasta el presente son debidos, fundamentalmente, a la baja reproducibilidad que tienen las diferentes opciones postuladas sumado al hecho de que para lograr una verdadera eficacia inmunológica se requieren, en la mayoría de los experimentos descritos en la presente revisión, más de una inmunización con la consecuente dificultad que la misma conlleva en referencia al manejo de los diferentes rodeos a ser vacunados. Sumado a esto, las mayores eficacias obtenidas hasta el presente se han logrado solo a partir de combinaciones de al menos dos candidatos vacunales en simultáneo. Una opción a tener en cuenta para futuros ensayos estaría dada por la detección y prueba de nuevos candidatos vacunales y/o nuevas combinaciones incluyendo más de dos candidatos en simultáneo y modificaciones a nivel del adyuvante utilizado.

Lo imprescindible en lo inmediato es seguir optimizando los resultados con una correcta utilización de los probables antígenos y adyuvantes, eligiendo una vía de administración en función de los resultados de eficacia y seguridad que deberán ser obtenidos en los ensayos clínicos y estudios previos antes de su autorización y comercialización. A la hora de generar una nueva vacuna hay que abordar ciertos aspectos adicionales que incluyen el uso de varios adyuvantes como potenciadores de la respuesta inmune y los efectos de diferentes rutas de inmunización en el desarrollo de inmunidad protectora. De la misma forma se deberá considerar la efectividad de antígenos heterólogos como inmunógenos para poder reemplazar a aquellos antígenos homólogos inefectivos o difíciles de obtener.

Como se ha demostrado en esta revisión hay grandes avances en el estudio de diferentes

candidatos vacunales, por lo que el control de la fasciolosis mediante la vacunación es una meta alcanzable. Nuevos ensayos interrelacionando diferentes inmunógenos (ya utilizados o no) y diferentes adyuvantes seguramente llevarán a la obtención de una respuesta inmune protectora que permita el desarrollo de una vacuna eficaz.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta D, Cristina J., Uriarte G., Lanzzeri S, Gama S. Estudio preliminar sobre la resistencia conferida a bovinos por metacercarias irradiadas de *Fasciola hepatica* en Uruguay. *Veterinaria* 1989. 25, 12-20.
2. Almeida M S, Torloni H, Lee-Ho P, Vilar M M, Taumaturo N, Simpson A J, Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a Schistosoma mansoni defined recombinant antigen, Sm14. *Parasite Immunology* 2003;25:135-137.
3. A'gadir H, Haroun E M, Gameel A A. The protective effect of irradiated metacercarias of *Fasciola gigantica* against homologous challenge in sheep. *Journal of Helminthology* 1987; 61, 137-142.
4. Bitakaramire P K. Preliminary studies on the immunization of cattle against fascioliasis using gamma-irradiated metacercariae of *Fasciola gigantica*. Isotopes and Radiation in Parasitology III. *International Atomic Energy Agency*, Vienna 1973, pp. 23-32.
5. Boray J C. The effect of host reaction to experimental *F. hepatica* infections in sheep and cattle. En: Soulsby, E.J.L (ed.). The reaction of the host to parasitism. Proceedings of the Third International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology Elwert, Marburg, Germany 1967.
6. Boray J C. Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology* 1969;7, 95-209.
7. Bozas S E., Spithill T W. Identification of 3-hydroxyproline residues in several proteins of *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology* 1996; 82(1), 69-72.
8. Brophy P M, Crowley P, Barrett J. Detoxification reactions of *Fasciola hepatica* cytosolic glutathione transferases. *Mol Biochem Parasitol.* 1990;39:155-162.

9. Brophy P M, Pritchard D I. Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as target for immuno and chemotherapy. *Exp Parasitology*. 1994;79: 89-96.
10. Campbell N J, Gregg P, Kelly D J, Dineen J K. Failure to induce homologous immunity to *Fasciola hepatica* in sheep vaccinated with irradiated metacercariae. *Veterinary Parasitology* 1978;4, 143-152.
11. Creaney J, Wijffels G L, Sexton J L, Sandeman R M, Spithill T W, Parsons J C. *Fasciola hepatica*: localization of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile fluke. *Exp Parasitol*. 1995;81:106-116.
12. Dalton J P. 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.
13. Dalton J P, Brindley P J, Knox D P, Brady C P, Hotez P J, Donnelly S. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int J Parasitol*. Mayo, 2003a; 33:621-40.
14. Dalton J P, Neill S O, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology*. 2003b; 33: 1173-1181.
15. Dargie J D, Armour J, Rushton B, Murray M. 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. 1974; 119-122.
16. Dawes B, Hughes D L. Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian host. *Advances in Parasitology* 1964; 8, 97-168
17. De Bont J, Cleerebout E, Riveau G, Schacht A M, Smets K, Conder G. Failure of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental *Fasciola hepatica* infection. *Veterinary Parasitology*. 2003;113: 135-144.
18. Dowd A J. Purification of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur J Biochem*. 1994;223:91-98
19. Espino A M, Hillyer G V. Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family. *J Parasitol*. 2003; 89:545-552.
20. Espino A M, Hillyer G V. A novel *Fasciola hepatica* saponinlike recombinant protein with immunoprophylactic potential. *J Parasitol*. 2004;90:876-879.
21. Espino A M; Morales, A; Delgado, B; Francheska M R; Figueroa, O Suarez, E. Partial Immunity to *Fasciola hepatica* in mice after vaccination with fhSAP2 delivered as recombinant protein or DNA construct. *Ethnicity & Disease*, Vol 20, 2010.
22. Estuningsih S E, Smooker P M, Wiedosari E, Widjajanti. Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolosis in cattle. *International Journal for Parasitology* 1997; 27 (11), 1419-1428.
23. Flanagan T P, King C H, Lett R R, Nanduri J, Mahmoud A A. Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *The Journal of Clinical Investigation* 1989; 83(3), 1010-1014.
24. Harness E, Hughes D L, Doy T G. The demonstration of pre-hepatic immune response to *Fasciola hepatica* in the mouse. *International Journal for Parasitology* 1976; 6:15-17
25. Harness E, Doy T G, Huges D L. The early migratory behaviour of young *Fasciola hepatica* in sensitized mice. *International Journal of Parasitology* 1977; 7, 51-54.
26. Heussler V T, Dobbelaere D A. Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; 64:11-23.
27. Hillyer G V. Induction of immunity in mice to *Fasciola hepatica* with a *Fasciola/Schistosoma* cross-reactive defined immunity antigen. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1985; 34, 1127-1131.

28. Hillyer, G V. Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 37:363–369.
29. Hillyer G V. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J Helminthology.* 2005; 79:241-247.
30. Hughes D L. *Fasciola* and Fascioloides. En: Soulsby E.J.L. (ed.) *Immune responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis.* Volume II. Trematodes and Cestodes. CRC Press, Boca Raton, pp. 1987; 91-114
31. Hughes D L, Hanna R E, Symonds H W. *Fasciola hepatica*: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. *Experimental Parasitology* 1981; 52(2), 271-279.
32. Irving J A, Spithill T W, Pike R N, Whisstock J C, Smooker P M. The Evolution of Enzyme Specificity in *Fasciola* spp. *J Mol Evol.* 2003; 57:1–15.
33. Kennedy N J, Spithill T W, Tennent J, Word PR, Piedrafita D. DNA vaccines in sheep: CTLA-4 mediated targeting and CpG motifs enhance immunogenicity in a DNA prime/protein boost strategy. *Vaccine.* 2006; 24:970–979.
34. Knox D P. Parasite enzymes and the control of round and fluke infestation in domestic animals. *British Veterinary Journal.* 1994; 150:319- 337.
35. Kofta W, Mieszczanek J, Plucienniczak G, Wedrychowicz H. Successful DNA immunization of rats against fasciolosis. *Vaccine* 2000; 18, 2985- 2990.
36. Law R H, Smooker P M, Irving J A, Piedra D, Ponting R, Kennedy N J. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infect Immun.* 2003; 71(12):6921–6932.
37. Maizels M, Rick. Parasite immunomodulation and polymorphisms of the immune system. *Journal of Biology* 2009, 8:62.
38. Mannervik B, Alin et al. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Science U S A.* 1985; 82(21), 7202-7206.
39. Meeusen E N T, Piedrafita D. Exploiting natural immunity to helminth parasites for the development of veterinary vaccines. *International Journal for Parasitology* 2003; 33(11), 1285-1290.
40. Meyer D.J, Coles B., Pemble S E, Gilmore K S, Fraser GM, Ketterer B. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochemical Journal* 1991; 274 (Pt2), 409-414.
41. Morrison C A, et al. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-Transferase. *Vaccine* 1996; 14(17-18), 1603-1612
42. Moser D. A 14 kDa Schistosoma mansoni polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *J Biol Chem.* 1991; 266:8447– 8454.
43. Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Cley D G, Andrews S J. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine.* 1998; 16:93–99.
44. Mulcahy G, Dalton J P. Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res Vet Sci.* 2001;70:83–86.
45. Nansen P. Resistance in cattle to *Fasciola hepatica* induced by a gamma-ray attenuated larvae: Results from a controlled field trial. *Research in Veterinary Science* 1975; 19, 278-283.
46. Olaechea F V. *Fasciola hepatica*. Red de Helminología de FAO para América Latina y el Caribe Conferencia Electrónica Septiembre 2004.
47. Pearce E J, James S L, Hiény S, Lanar D E, Sher A. Induction of protective immunity against Schistosoma mansoni by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proceedings of the National Academy of Science U S A.* 1988; 85(15), 5678-5682.
48. Pemble S E, Wardle A F, Taylor J B. Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the

- cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochemical Journal* 1996; 319 (Pt 3), 749-754.
49. Piacenza O, 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. *Infection and Immunity*. 1999; 67:1954-1961.
50. Ramirez B L, et al. Paramyosin: a candidate vaccine antigen Against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunology* 1996; 18(1), 49-52.
51. Rickard M D, Howell M J. Comparative aspect of immunity in fascioliasis and cysticercosis in domesticated animals. En: Symons L.E.A., Donald A.D. and Dineen J.K. (eds.) *Biology and Control of Ectoparasites*. Academic Press, Sydney, pp. 1982; 343-374.
52. Reed M B, Strugnell R A, Pannacio M, Spithill T W. A novel member of the NK-lysin protein family is developmentally regulated and secreted by *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2000;105:297- 303.
53. Roberts J A, WidjavantI S, Estuningsih E, Hetzel D J. Evidence for a major gene determining the resistance of Indonesian thin tail sheep against *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology* 1997; 68, 309-314.
54. Sexton J L, Milney A R, Panaccio M, Waddington J, Wijffels D, Thompson C. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Journal of Immunology*. 1990; 145:3905-3910.
55. Smith A M. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 62:1-8.
56. Smooker P M, Steeper K R, Drew D R, Strugnell R A, Spithill T W. Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*: effects of mode of vaccination and the cellular compartment of antigen expression. *Parasite Immunology* 1999; 21, 357-364.
57. Spithill T W, Dalton J P. Progress in the development of liver fluke vaccines. *Parasitology Today*. 1998; 14:224-228.
58. Spithill T W, Smooker P M, Sexton J L, Bozas E, Nirrusib CS, Creany J. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: Dalton JP, editor. *Fasciolosis*. Ireland: Wallingford; 1999. p. 377-410.
59. Taylor M G. 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. CRC pp. 1987; 4990.12.
60. Tendler M, Vilar M M, Brito C A, Freire N M, Katz N, Simpson A. Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1995; 90(2), 255-256.
61. Veerkamp J H, Peeters R A, Maatman R G. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochimica Biophysica Acta* 1991; 1081(1), 1-24.
62. Wedrychowicz H., Wisniewski M. Progress in development of vaccines against most important gastrointestinal helminth parasites of humans and ruminants. *Acta Parasitologica Polonica* 2003; 48(4), 239-245.
63. Wijffels GL. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Exp Parasitol*. 1994; 78:132- 148.
64. Zafra Leva.,R. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico del hígado y ganglios linfáticos hepáticos en cabras inmunizadas frente a *Fasciola hepatica*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, España, 2007.

