



**UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CÓRDOBA**
JESUITAS

***“Evaluación de una vacuna contra *Fasciola hepatica* en
ovinos formulada con una proteína de tipo kunitz en una
nanoestructura de cristal líquido”***

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Agropecuarias

Méd. Vet. Mgter. María del Rosario Ahumada

Directora: Dra. Laura Cervi

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET
Dpto. de Bioquímica Clínica- Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

Codirectora: Dra. Marcela Larroza

Estación Experimental Agropecuaria Bariloche
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

Comisión de Tesis

Dr. Luis Ignacio Alvarez

Dr. Alejandro Lozano

Dr. Carlos Rossanigo

Evaluadora externa

Dra. Juliana Cassataro

2024

“EVALUACIÓN DE UNA VACUNA CONTRA FASCIOLA HEPATICA EN OVINOS FORMULADA CON UNA PROTEÍNA DE TIPO KUNITZ EN UNA NANOESTRUCTURA DE CRISTAL LÍQUIDO”

RESUMEN

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria, de distribución cosmopolita y de gran impacto en la salud animal y humana. Afecta las economías regionales y la salud de las familias rurales. La especie ovina es considerada altamente susceptible y para su control se propone el desarrollo de vacunas eficaces. El objetivo de este trabajo fue evaluar una vacuna contra *F. hepatica* en ovinos infectados experimentalmente formulada con una proteína Kunitz, asociado a un adyuvante de CpG-ODN/Coa-ASC16, en una nanoestructura de cristal líquido, de comprobada eficacia en ratones. Se utilizaron 32 corderos distribuidos al azar en 4 grupos experimentales. Se tomaron muestras seriadas de materia fecal y sangre para determinar recuento de huevos, enzimas hepáticas y producción de anticuerpos hasta la semana 16 pi, posteriormente se recolectaron los adultos de hígado y vesícula biliar. Los hígados extraídos fueron evaluados macroscópicamente e histológicamente. La fertilidad de los huevos se valoró con el test de eclosión. Los resultados indicaron un mejor desempeño de la segunda formulación de la vacuna con reducciones significativas en el conteo de adultos (49.6%), de huevos (81.4%) menor porcentaje de eclosión, aumento en la producción de anticuerpos IgG y predominio de patrón inflamatorio en la lesión hepática, complementariamente se demostró la utilidad de kunitz como herramienta de diagnóstico serológico temprano de fasciolosis. Se concluye una eficacia moderada de esta vacuna requiriendo nuevos estudios y desafíos naturales de infección que comprueben su utilidad para el control de *F.hepatica* en ovinos en el marco de un plan sanitario integral.

Palabras clave: ovinos, *Fasciola hepatica*, kunitz, vacuna

**“EVALUATION OF A VACCINE FORMULATED WITH A KUNITZ-TYPE
PROTEIN IN A LIQUID CRYSTAL NANOSTRUCTURE AGAINST
FASCIOLA HEPATICA IN SHEEP”**

ABSTRACT

Fasciolosis is a parasitic disease with a cosmopolitan distribution that has a significant impact on animal and human health. This affects regional economies and rural families' health. Sheep are considered to be highly susceptible, and the development of effective vaccines has been proposed for their control. The aim of this study was to evaluate a vaccine against *F. hepatica* in experimentally infected sheep formulated with a Kunitz protein associated with a CpG-ODN/Coa-ASC16 adjuvant in a liquid crystal nanostructure, which was proven to be effective in mice. Thirty-two lambs were randomly divided into four experimental groups. Serial samples of fecal matter and blood were collected to determine egg counts, liver enzyme levels, and antibody production up to week 16 post-infection. Adult liver flukes and bile ducts were collected. Extracted livers were macroscopically and histologically evaluated. Egg fertility was assessed using a hatching test. The results indicated better performance of the second vaccine formulation, with significant reductions in adult fluke count (49.6%) and egg count (81.4%), lower hatching percentage, increased production of IgG antibodies, and predominance of inflammatory patterns in liver lesions. Additionally, the utility of Kunitz as a tool for early serological diagnosis of fasciolosis was demonstrated. The moderate efficacy of this vaccine requires further studies and natural infection challenges to confirm its usefulness for *F. hepatica* control in sheep within the framework of a comprehensive health plan.

Keywords: sheep, *Fasciola hepatica*, kunitz, vaccine

Dedicatoria

A mi familia, mis hijos Juan Ignacio y María Victoria por entender las ausencias, a mi esposo Alberto por ser compañero siempre.

Agradecimientos

A mi directora de tesis Laura Cervi por su dedicación en todo el proceso, su paciencia por mis tiempos acotados y su esmero en cada corrección realizada,

A mi codirectora, Marcela Larroza, por recibirme con calidez, sus enseñanzas y su optimismo en cada observación y sugerencia,

A Gali, Enrique, Emilio, Ezequiel y Alejandro, generosos compañeros de trabajo en el corral con los corderos,

A los colegas docentes e investigadores de la UCC: Eduardo Frank, Oscar Anziani, Gabriel Caffè, Laura Cooper, Jordana Auad por prestarme sus laboratorios y ayudarme con sus conocimientos,

Un especial agradecimiento a Ana María Martín quien con dedicación hizo posible la interpretación histológica,

Al Dr. Barra y su equipo del CIQUIBIC por sus aportes significativos.

Al equipo del CIBICI- Facultad de Ciencias Químicas, UNC, que me hicieron sentir en casa,

A mis colaboradores estudiantes: Clara, Celina, Santiago, María y Sofía, por su compromiso y empeño,

A las instituciones donde se llevó adelante este trabajo: INTA, Universidad Católica de Córdoba y la Universidad Nacional de Córdoba, que interpretan que la ciencia es la mejor respuesta y que la manera de alcanzar los objetivos es el trabajo interinstitucional interdisciplinario y colectivo.-

INDICE GENERAL

Capítulo I. Introducción

| | |
|--|----|
| 1.1 Descripción del parásito..... | 11 |
| 1.2 Ciclo del parásito | 11 |
| 1.3 Impacto de la enfermedad | 13 |
| 1.4 Patogénesis de <i>F. hepatica</i> en la especie ovina | 15 |
| 1.5 Respuesta inmune frente a <i>F.hepatica</i> | 16 |
| 1.6 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune..... | 17 |
| 1.7 Desarrollo de vacunas como estrategia de control de la enfermedad..... | 19 |
| 1.8 La proteína Kunitz (FhKT) y su uso como inmunógeno..... | 23 |
| 1.9 Justificación de la importancia del estudio..... | 27 |
| 1.10 Hipótesis de trabajo..... | 27 |
| 1.11 Objetivos..... | 28 |
| 1.11.1 Objetivo general..... | 28 |
| 1.11.2Objetivos específicos..... | 28 |

Capítulo II. Materiales y métodos

| | |
|--|----|
| 2.1Ensayo de inmunización con sFhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 | 29 |
| 2.1.1. Material biológico empleado..... | 29 |
| 2.1.1.1Ovinos..... | 29 |
| 2.1.1.2Metacercarias..... | 30 |
| 2.1.2 Descripción de procedimientos..... | 30 |
| 2.1.2.1Diseño del ensayo experimental..... | 30 |
| 2.1.2.2 Síntesis del antígeno sintético (sFhKT) y adyuvante utilizado..... | 32 |
| 2.1.2.3. Análisis de la respuesta de anticuerpos por ensayo inmuno-enzimático (ELISA)..... | 32 |
| 2.1.2.4 Recuento de huevos de <i>Fasciola hepatica</i> en materia fecal..... | 33 |
| 2.1.2.5 Determinación de enzimas hepáticas: alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en suero..... | 34 |
| 2.1.2.6 Evaluación histopatológica de daño hepático..... | 34 |
| 2.1.2.7 Recuento de ejemplares adultos de <i>F. hepatica</i> | 35 |
| 2.1.2.8 Test de eclosión de huevos..... | 35 |
| 2.1.2.9 Análisis estadístico de los datos..... | 36 |
| 2.2 Ensayo de diagnóstico de <i>F.hepatica</i> utilizando Kunitz en sueros ovinos..... | 38 |
| 2.2.1Material biológico empleado..... | 38 |
| 2.2.1.1 Ovinos..... | 38 |
| 2.2.1.2Metacercarias..... | 38 |
| 2.2.2 Descripción de procedimientos..... | 39 |
| 2.2.2.1Construcción de los plásmidos..... | 39 |
| 2.2.2.2Expresión y purificación de proteínas kunitz recombinantes (FhKT1.1, FhT1.3, FhKT4)..... | 39 |
| 2.2.2.3 Análisis de la respuesta de anticuerpos por ensayo inmuno-enzimático (ELISA) anti sFhKT sintético (sFhKT) y recombinantes (rFhKT)..... | 40 |
| 2.2.2.4Análisis estadístico de los datos..... | 40 |

Capítulo III. Resultados

| | |
|---|-----------|
| 3.1 Reducción de número de huevos de <i>F. hepatica</i> en ovinos vacunados..... | 42 |
| 3.2 Reducción en la cantidad de adultos de <i>F.hepatica</i> recuperados en hígado y vesícula biliar en ovinos vacunados..... | 45 |
| 3.3 Reducción en el porcentaje de eclosión de huevos en ovinos vacunados..... | 46 |
| 3.4 Valoración macroscópica del daño hepático..... | 48 |
| 3.5 Análisis histopatológico del tejido hepático..... | 48 |
| 3.6 Determinación de las enzimas hepáticas en ovinos bajo ensayo..... | 53 |
| 3.7 Producción de anticuerpos IgG en ovinos de ensayo..... | 56 |
| 3.8 Comparación de la alineación de la secuencia de aminoácidos y el modelado de inhibidores de tipo Kunitz de <i>F. hepatica</i> | 58 |
| 3.9 Evaluación de las respuestas de anticuerpos anti sFhKT y anti rFhKT en ovinos infectados experimentalmente con <i>F. hepatica</i> | 61 |
| | |
| Capítulo IV. Discusión..... | 69 |
| Capítulo V. Conclusiones y perspectivas..... | 80 |
| Capítulo VI. Bibliografía..... | 83 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Eficacia de vacunas contra <i>F. hepatica</i> evaluada en ovinos (1999-2023).. | 22 |
| Tabla 2. Asignación de los animales a los grupos de ensayo experimental de inmunización..... | 29 |
| Tabla 3. Distribución de los animales a los grupos experimentales..... | 38 |
| Tabla 4. Recuento de huevos de <i>F. hepatica</i> por gramo de materia fecal según tratamiento..... | 43 |
| Tabla 5. Recuento de adultos de <i>F. hepatica</i> recuperados de hígado y vesícula biliar..... | 45 |
| Tabla 6. Extensión del daño macroscópico en hígado..... | 48 |
| Tabla 7. Indicadores de lesiones hepáticas..... | 49 |
| Tabla 8. Valores medios de DO para sFhKT y rFhKT en sueros de ovinos infectados con <i>F. hepatica</i> (CI), grupo control sanos (CS) y ovinos con otras parasitosis.... | 63 |
| Tabla 9. Precisión del test diagnóstico utilizando FhKT..... | 65 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-------|
| Figura 1. Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i> | 13 |
| Figura 2. Modelo de respuesta inmune frente a la infección crónica por <i>Fasciola hepatica</i> en ovinos..... | 19 |
| Figura 3. Formulación de OVA y CpG con la nanoestructura..... | 26 |
| Figura 4. Esquema de diseño experimental | 31 |
| Figura 5. Huevos de <i>Fasciola hepatica</i> | 33 |
| Figura 6. Valoración macroscópica del daño hepático..... | 35 |
| Figura 7. Recuento microscópico del test de eclosión de huevos..... | 36 |
| Figura 8. Recuento de huevos de <i>F. hepatica</i> según tratamiento y semanas pos infección..... | 44 |
| Figura 9. Valores medios de recuento de <i>F.hepatica</i> | 46 |
| Figura 10. Valores medios de porcentaje de eclosión de huevos..... | 47 |
| Figura 11. Análisis histopatológico de las lesiones encontradas..... | 50 |
| Figura 12. Lesión hepática según grupo..... | 51 |
| Figura 13. Biplot y ARM Lesiones hepáticas y grupos experimentales..... | 52 |
| Figura 14. Valores séricos de ALT y AST según grupo experimental y tiempo de infección..... | 54-55 |
| Figura 15. Detección de anticuerpos IgG específicos de sFhKT..... | 57 |
| Figura 16. Alineación de secuencias de aminoácidos y modelado de proteínas FhKT..... | 60 |
| Figura 17. Expresión y purificación de proteínas de fusión rFhKT..... | 61 |
| Figura 18. Respuesta de anticuerpos anti-IgG en ovinos infectados (CI) a sFhKT, FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4..... | 62-63 |
| Figura 19. Respuestas de anticuerpos de reactividad cruzada a sFhKT, FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4 de ovinos infectados con <i>F. hepatica</i> (CI) mediante ELISA en comparación con aquellas infectadas con otros parásitos..... | 64 |
| Figura 20. Capacidad discriminante del diagnóstico de <i>F. hepatica</i> en ovinos mediante el uso de FhKT..... | 67 |

Figura 21. Comparación del desempeño de Kunitz sintético (sFhKT) y recombinantes (FhKT1.1, FhKT1.3, FhKT4) en el diagnóstico de ovinos infectadas con *F. hepatica*.68

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| ADCC | Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos |
| APC | Aloficocianina |
| ALT | Alanina aminotransferasa |
| ASC16 | Ácido ascorbico |
| AST | Aspartato aminotransferasa |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| CD | Células dendríticas |
| CpG-ODN | Cytosine-phosphate-guanosine - oligodeoxynucleotide |
| DAMPs | Patrones moleculares asociados a daño tisular |
| DE | Desviación estándar |
| DO | Densidad óptica |
| DPI | Cloruro de difenilenodonio |
| ELISA | Enzimoimmunoensayo en fase sólida |
| ET | Extracto total |
| <i>F. hepatica</i> | <i>Fasciola hepatica</i> |
| FhCL1 | Catepsinas L 1 <i>F. hepatica</i> |
| FhCL2 | Catepsinas L 2 <i>F. hepatica</i> |
| FhCL3 | Catepsinas L 3 <i>F. hepatica</i> |
| NEJ | Larva migrante juvenil |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OVA | Ovoalbúmina |
| ON | Óxido nítrico |
| PAMPs | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PBS | Solución tampón de fosfatos |
| PES | Productos excreto-secretorios de <i>F. hepatica</i> |

| | |
|------|--|
| PRRs | Receptores de reconocimiento de patrones |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SFB | Suero fetal bovino |
| Th | Linfocitos T cooperadores |
| TLR | Receptor tipo Toll |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del parásito

La fasciolosis es una zoonosis parasitaria producida por el helminto *Fasciola hepatica*. *F. hepatica* es un parásito helminto clasificado en el Phylum Platyhelminthes, subphylum Neodermata, clase Trematoda, subclase Digenea, superorden Anepitheliocystida, orden Echinostoma y familia Fasciolidae. Esta familia contiene nueve especies que parasitan fundamentalmente grandes herbívoros, sin embargo: *F. hepatica*, *F. gigantica* y *Fasciolopsis buski*, son capaces de infectar a la especie humana (Lotfy et al., 2008). Además, se han descrito en regiones de Asia y África donde coexisten las dos especies *F. hepatica*, *F. gigantica*, fenómenos de hibridación e introgresión que explicarían la variabilidad genética presente en esa población de *F. hepatica* (Agatsuma et al., 2000; Flores-Velázquez et al., 2023; Nukeri et al., 2022). Morfológicamente, los vermes adultos de trematodos digeneos son planos dorsoventralmente y presentan simetría bilateral. Estos organismos son hermafroditas carecen de sistemas circulatorio y respiratorio, presentan dos ventosas de ubicación oral y ventral que le permiten la adhesión a la pared de los conductos biliares. Están recubiertos por un tegumento con una capa de glicocalix que representa la interfaz entre el parásito y el hospedador e interviene en la evasión de la respuesta inmune (Keiser & Utzinger, 2009).

1.2 Ciclo del parásito

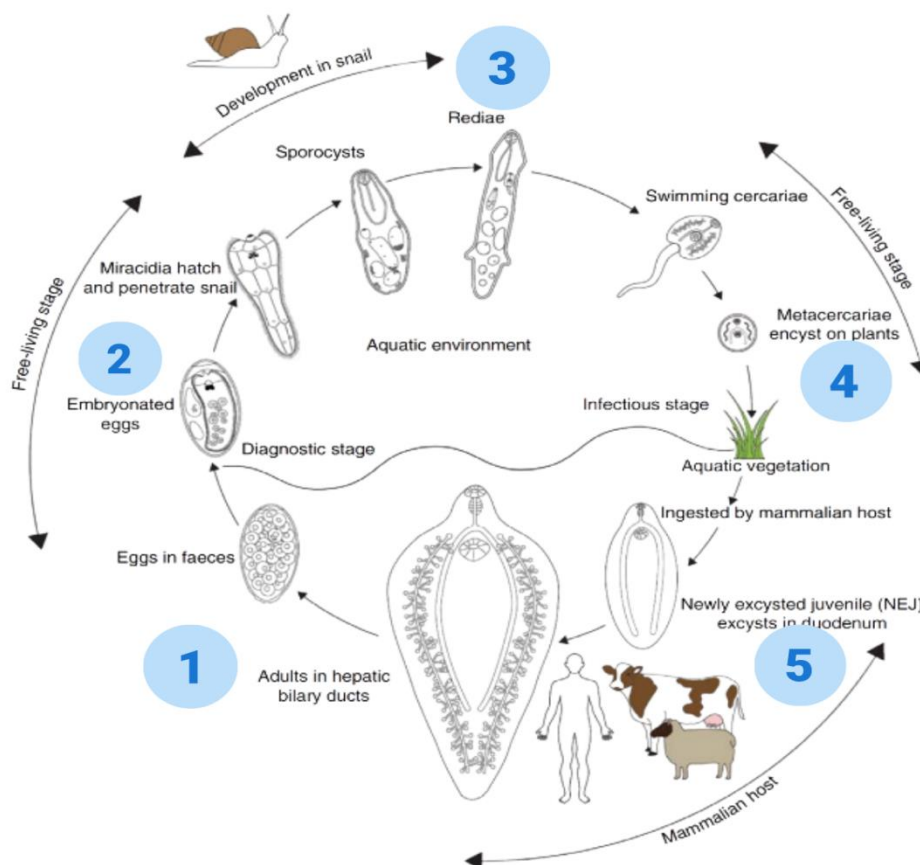
Fasciola hepatica, al igual que los otros parásitos de la subclase Digenea, presenta ciclo indirecto, necesitando un hospedador intermediario. Se han informado al menos 20 especies de la familia Lymnaeidae como posibles hospedadores intermedios en el ciclo de vida de *F. hepatica*. El de mayor distribución en Europa y Asia es un caracol molusco del género *Galba* (Dreyfuss et al., 2021). Estudios recientes de identificación molecular de caracoles presentes en el norte de la Patagonia argentina identificaron a *G. viatrix* como la especie de mayor distribución (Soler et al., 2023). En nuestro país está descrito además *Pseudosuccinea columella* en la zona noreste y en la provincia de Córdoba (Moriena et al., 2008; Zarco et al., 2011). Estudios referidos al potencial biótico de *F. hepatica* indican que el parásito presenta una alta capacidad reproductiva, con un potencial biótico, calculado por un modelo matemático de 6.7% por día pudiendo cada

caracol infectado producir un promedio de 270 cercarias (Iturbe Espinoza & Muñiz Pareja, 2013).

El ciclo completo de *F. hepatica* dura entre 14-23 semanas pudiendo describirse en cinco fases (Fig.1) La primera fase del ciclo se inicia con la liberación de huevos desde la vesícula biliar del hospedador definitivo (HD) hacia el duodeno y de allí con las heces al exterior. La fase 2 incluye el desarrollo embrionario y la eclosión del miracidio (Mas-Coma et al., 2005). La fase tres incluye la culminación del desarrollo del embrión en el hospedador intermediario (HI), desde el estadio de miracidio hasta el estadio de cercaria. El miracidio presenta una cutícula ciliada que le permite nadar y encontrar su HI, este estadio de *F. hepatica* no se puede alimentar con lo cual si no encuentra al caracol, su HI, a las 24 h muere. El ingreso al HI se realiza por acción de enzimas proteolíticas. Al ingresar a su HI, el miracidio se transforma en esporocito que migra a través de los vasos linfáticos y sanguíneos hasta la glándula digestiva donde continúa su desarrollo hasta el estadio de redias que migran dentro del caracol, produciendo daño en los tejidos y posteriormente son liberadas al medio externo. La fase 4 del ciclo incluye el pasaje de la cercaria, etapa de desarrollo adaptada al medio acuático que le permite la búsqueda y adhesión a plantas acuáticas, a metacercarias, el estadio infectante para el hospedador definitivo (HD). La fase 5 comienza con la ingestión de la metacercaria por parte del HD. El proceso de desenquistamiento de la metacercaria es rápido: comienza a la hora pos ingestión y a las dos horas migra hacia la cavidad abdominal. A partir del desenquistamiento de las metacercarias se originan las formas juveniles denominadas NEJ (new excysted juvenile) estas liberan cisteín proteasas, tales como: Catepsina L y B que les permite atravesar la pared intestinal y llegar a cavidad abdominal migrando hacia el hígado, sin embargo algunos autores indican la posibilidad de migración de las formas juveniles NEJ, a través del colédoco sin necesidad de atravesar la pared intestinal (Andrews et al., 2021; Becerro-Recio et al., 2022; Mas-Coma et al., 2005; Moazeni & Ahmadi, 2016).

Fig 1

Fig.1 Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*. 1. Eliminación de huevos al exterior con las heces. 2.



Migración activa del miracidio hasta el hospedador intermediario (HI). 3. Desarrollo dentro del HI. 4. Liberación de la redia y transformación en metacercaria 5. Ingestión de metacercaria y desarrollo de la infestación en el hospedador definitivo (HD) Modificado a partir de imagen original (Andrews et al., 2021)

1.3 Impacto de la enfermedad

La fasciolosis es cosmopolita y se encuentra en continua expansión debido a la diversidad de mamíferos hospedadores infectados, incluyendo burros, caballos, alpacas, mulas, nutrias, entre otros (Carmona & Tort, 2017), así como la adaptación de sus hospedadores intermediarios (caracoles de la familia Lymnaeidae) a una amplia gama de entornos ambientales diferentes (Mas-Coma et al., 2022; Pomé & Alim, 2016; Rodríguez-Pérez & Hillyer, 1995). A nivel mundial los ovinos y bovinos son los principales HD de *F. hepatica*. Las pérdidas económicas que produce esta enfermedad en la producción ganadera son difíciles de estimar, pero se calculan en alrededor de US\$ 3 mil millones anuales (Rashid et al., 2019).

Esta helmintiasis ha sido declarada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad emergente y en forma más reciente ha sido considerada enfermedad neotropical desatendida, debido a su alto impacto en la salud humana reportándose un incremento en el número de casos (Dalton, 2021). Esta emergencia, parece estar relacionada a la aparición de dos fenómenos que favorecen la infección: la aparición de parásitos resistentes al triclabendazol, el fármaco de primera línea para el tratamiento de esta parasitosis en el ganado y los cambios climáticos que facilitan la supervivencia del caracol, HI y del estadio infectante: las metacercarias del parásito. La resistencia a triclabendazol se ha registrado en el tratamiento de fasciolosis en animales y en medicina humana (Fairweather et al., 2020; Gil et al., 2014; Kelley et al., 2016; M. Larroza et al., 2023; Olaechea et al., 2011).

En América del Sur, las zonas endémicas para fasciolosis se han descrito en las regiones del altiplano, principalmente en las áreas de mayor altitud de países como Bolivia, Perú y Chile. En nuestro país la distribución de la enfermedad es amplia y de acuerdo a los registros de los laboratorios oficiales del INTA, la prevalencia de la enfermedad en la Región Patagónica es del 59 % en ovinos y 68 % en bovinos de la enfermedad (Abdala et al., 2022). En línea con esto, estudios desarrollados por la Universidad Católica de Córdoba de estructura poblacional en ovinos han demostrado altas prevalencias en majadas presentes en las sierras de Córdoba en particular en las áreas relacionadas con las pampas de altura: pampa de Achala, de Olaen y pampa de San Luis. En Argentina, la situación de la fasciolosis humana no ha sido objeto de un análisis adecuado a pesar de que en países vecinos como Bolivia y Chile se informaron áreas hiperendémicas hace mucho tiempo (Apt et al., 1993; Mas-Coma et al., 1999). Asimismo en un análisis de datos en el período 1980-2008 se contabilizaron para Latinoamérica 1.378.341 casos reportados de humanos infectados y se calcula que la población en riesgo mundial para esta enfermedad supera es de 1066 millones de personas (Fürst et al., 2012). Relacionado a esto, una revisión de Mera y Sierra en nuestro país, indica que el mayor número de humanos infectados con fasciolosis ha sido reportado en la provincia de Córdoba seguido por la provincia de Catamarca. (Mera y Sierra et al., 2011). Esta discordancia entre la prevalencia de fasciolosis humana y animal podría ser debida a la ausencia de informes de los casos humanos, ya que su declaración no es obligatoria, o a factores relacionados con un diagnóstico incorrecto o insuficiente relacionado a la

dificultad en el acceso a servicios de salud para los habitantes de zonas rurales (Carnevale et al., 2016; Malandrini et al., 2011; Mera y Sierra et al., 2011).

1.4 Patogénesis de *F. hepatica* en la especie ovina

La especie ovina es considerada de alta susceptibilidad sin diferencia de edad y sexo y no desarrolla resistencia para próximas infecciones. Es la especie que más contribuye a la contaminación de pasturas sumada a la alta capacidad de producción de huevos de *F. hepatica*, ya que puede diseminar 20.000-50.000 huevos diarios (Happich & Boray, 1969; Olaechea et al., 2011; Stuen & Ersdal, 2022; Toet et al., 2014). Se distinguen dos fases de la enfermedad una de tipo aguda, asociada a la migración de los juveniles por el parénquima hepático y la fase crónica vinculada a la permanencia de adultos en vesícula biliar. La presentación aguda puede provocar la muerte del animal asociado a hemorragias agudas y masivas. Los signos clínicos asociados son: palidez de mucosas, debilidad, dolor y disnea. Al análisis de sangre se evidencia una anemia macrocítica hipocrómica, hipoalbuminemia, eosinofilia y elevación de las enzimas hepáticas (ALT, AST). La presentación crónica se caracteriza por pérdida progresiva de condición corporal, anemia, mortandad asociada con alta carga parasitaria y más frecuente en la última fase de gestación, las mucosas pálidas y el edema submandibular son los signos clínicos más frecuentes de observar. También se evidencia hipoalbuminemia, enzimas hepáticas elevadas y eosinofilia (Howell & Williams, 2020; Mas-Coma et al., 2022; Stuen & Ersdal, 2022). La patogenia de la fasciolosis es un proceso complejo que se produce en dos fases diferenciadas: la fase parenquimatosa asociado a la presentación aguda y la fase biliar vinculada a la presentación crónica de la enfermedad. La fase parenquimatosa se inicia con la penetración de la cápsula hepática, cápsula de Glisson, por las formas juveniles (NEJ) del parásito. Posteriormente migran a través del parénquima hepático. Durante esta fase migratoria, el tegumento del parásito, provisto de espinas que mantienen la posición dentro del órgano, provocan daños mecánicos abrasivos. Estas espinas ayudan al parásito a mantener su posición en el hígado. El daño producido al hígado no solo es de tipo abrasivo sino causado además por la secreción de moléculas por parte de las formas juveniles. La migración produce lesiones necróticas y hemorrágicas en el hígado que desencadenan reacciones inflamatorias. Posteriormente, se produce la fase biliar, en los conductos biliares, los

parásitos ejercen una acción mecánica y química combinada. A través de su ventosa oral, los parásitos adultos causan daños mecánicos al alimentarse de la sangre y del parénquima hepático adyacente al conducto. La presencia de hepatocitos macerados en la ventosa oral y en la faringe del parásito evidencian la erosión epitelial, traumatismo, lesión focal del conducto y de pequeños vasos sanguíneos. Asimismo, se ha demostrado que *F. hepatica* libera cantidades significativas del aminoácido prolina, necesario para la síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos. Estas dos acciones, el daño mecánico y la liberación de prolina, ejecutadas por el parásito adulto, provocan una respuesta inflamatoria eosinofílica y granulomatosa grave y una marcada hiperplasia de las vías biliares (Flores-Velázquez et al., 2023; Lopez et al., 1993; Zafra et al., 2013).

1.5 Respuesta inmune frente a *F. hepatica*

El primer reconocimiento de las metacercarias y las formas juveniles (NEJ) se produce en el intestino con activación de la mucosa intestinal. Primeramente se considera el reconocimiento de antígenos tegumentales del parásito (proteínas y carbohidratos glicosilados) que inducen la proliferación de células T a partir de la activación de células dendríticas (CD) (Aldridge & O'Neill, 2016). Otras células intervinientes son los mastocitos, quienes liberan prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas tales como factor de necrosis tumoral (TNF- α) o IL-4. En la respuesta celular también se evidencia la acción de los eosinófilos y macrófagos quienes actúan a través de mecanismos de acción mediados por anticuerpos que al unirse al componente C3b del complemento liberan componentes activos de oxígeno, esta acción se demostró eficaz en ovinos de la raza indonesia de cola fina, resistentes a la infección con *F. gigantica* (Piedrafita et al., 2007; Raadsma et al., 2007). Se considera que en las etapas tempranas de la infección por *F. hepatica* la respuesta inmune es una combinación de tipo Th1/Th2 con un incremento de las citoquinas IL-4, la IL-10, IFN- γ y TGF-beta, a medida que avanza la enfermedad este perfil se modifica a un predominio de tipo TH2 dependiente de IL-4. A diferencia de los que ocurre en ratones o en bovinos donde hay una marcada eosinofilia en el peritoneo, en los ovinos se observa un proceso de apoptosis de los eosinófilos (Naranjo-Lucena et al., 2021; Ryan et al., 2020). En relación a las inmunoglobulinas (Ig), en infecciones experimentales se observó un incremento de Ig totales a partir de la tercera semana pos infección. Dentro de los isotipos, la IgG1 mostró los valores más elevados y la IgM fue detectada más tempranamente. En tanto el isotipo IgA, evidenció una respuesta bifásica y temprana en ovinos infectados (Flores-Velázquez et al., 2023; Phiri et al., 2006).

1.6 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

La persistencia de este parásito en su hospedador definitivo demuestra la eficiencia en sus mecanismos para evadir la respuesta inmune. En esta evasión intervienen diferentes estructuras y procesos metabólicos. La primera línea de defensa del parásito respecto al hospedador es el tegumento, este presenta características como su alta tasa de renovación que lo protegen contra las enzimas digestivas, las propiedades surfactantes de la bilis y la respuesta inmune del hospedador. La alta tasa de renovación sobre todo en las fases tempranas de migración (menos de 3 horas para reemplazo completo), impiden establecer un contacto duradero y efectivo contra los neutrófilos y eosinófilos que posibiliten su degranulación y destrucción ya que se desprenden conjuntamente con el glucocáliz (de la Torre-Escudero & Robinson, 2020; Wilson et al., 2011). Conjuntamente con la alta tasa de renovación del tegumento se ha demostrado la secreción de glicoproteínas como antígenos tegumentarios, principalmente N-glicanos de oligomanosa que se unen al receptor de manosa, que pueden inducir respuestas de hiporeactividad y supresión de citoquinas en células T CD4⁺ (Aldridge & O'Neill, 2016). Asimismo se ha demostrado una estrategia de evasión del sistema de complemento basada en la presencia del ácido siálico terminal en la composición del glucocáliz disminuyendo la unión de la fracción C3 a la superficie del parásito y evitando de esa manera la activación por vía alterna (Rodríguez et al., 2018). De manera más reciente se ha demostrado que *F. hepatica* expresa un ARN mitocondrial (miARN) homólogo del hospedador mamífero que regula la activación de los macrófagos, principal célula de defensa en la etapa temprana de la enfermedad (Flores-Velázquez et al., 2023; Tran et al., 2021). En el mismo sentido se constata que *F. hepatica* libera productos de distinta naturaleza que interactúan con el hospedador y son capaces de ejercer diversos efectos en las células del sistema inmune. Estos productos denominados excretos-secretos (PES) son componentes solubles o están presentes en vesículas extracelulares liberadas por el parásito que presentan actividad inmunomoduladora. Estos productos, PES, son reconocidos por células de la inmunidad innata tales como células dendríticas (CDs) y macrófagos. Estas moléculas suprimen la activación y maduración de las células dendríticas, careciendo de marcadores clásicos (CD80, CD86, MHCII, CD40) y por lo tanto una disminución en las citoquinas inflamatorias (IL-12, TNF α) (Carranza et al., 2012; Falcón et al., 2012). La liberación de productos excretos-secretos en conjunto con la expresión de antígenos tegumentales del parásito y alarminas derivadas del

hospedador, producidas por el daño en la pared intestinal promueve el reclutamiento de macrófagos. Estas células son activadas alternativamente expresando elevados niveles de actividad de arginasa a expensas de la disminución de la respuesta de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), permitiendo la diferenciación a células Th2 y células T regulatorias. Otro efecto inducido por este parásito, es el reclutamiento de mastocitos a la cavidad peritoneal que permitirán disminuir la reacción a ligandos de bacterias provenientes del lumen intestinal e inhibiendo la respuesta Th1 inducida por la traslocación bacteriana (Fig 2) (Donnelly et al., 2005). También ha sido comprobado que la maduración de CDs se ve afectada por los antígenos de este parásito, impidiendo que los agonistas de Receptores tipo Toll (TLR) puedan realizar la activación. En cuanto al fenotipo se ha visto que se genera un nuevo tipo de CDs denominada “semi-maduro” que se lo asocia con respuestas tolerogénicas (Frick et al., 2010). Es decir que los antígenos provenientes de *F. hepatica* pueden modular la respuesta inmune a través de la manipulación de la actividad y función de las CDs, promoviendo la inducción de respuestas ineficaces en la eliminación del parásito.

Fig.2

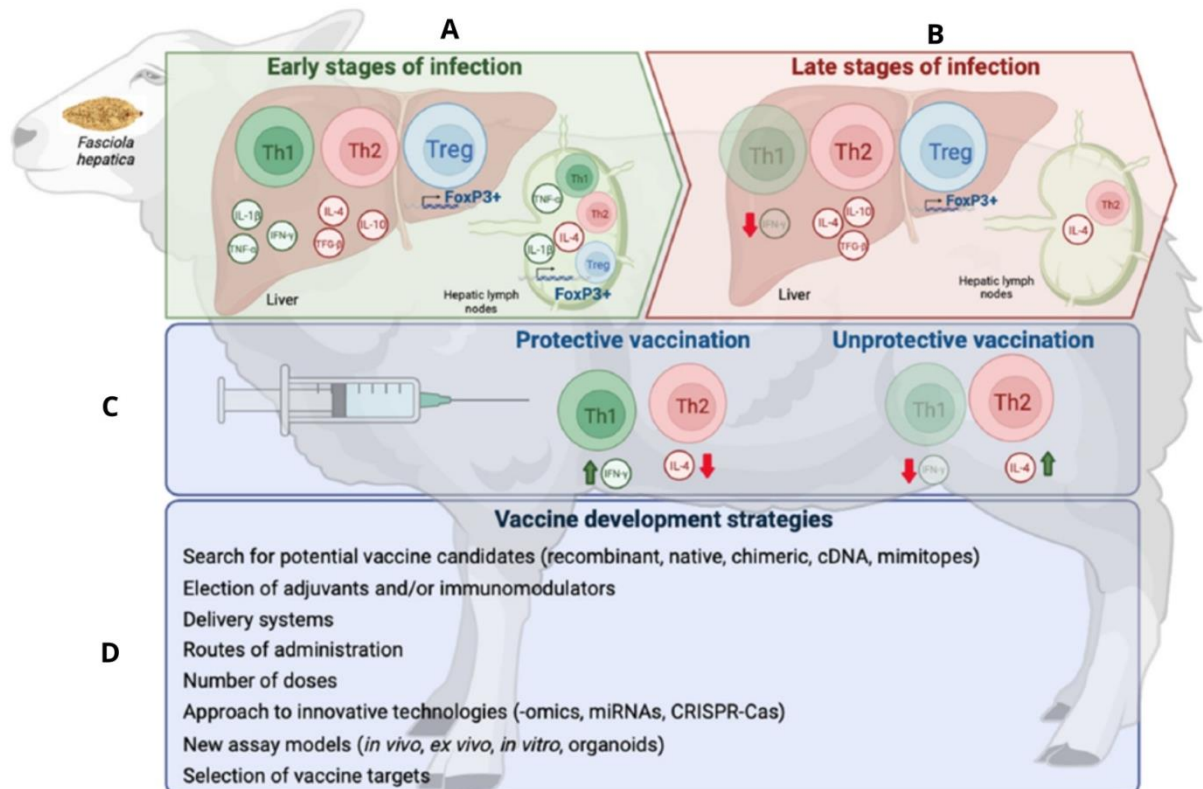


Figura 2. Modelo de respuestas inmunes en infecciones con *F. hepatica* en ovinos. (A) Etapas tempranas con respuesta mixta Th1/Th2. (B) Etapas tardías con predominio de respuesta Th2. (C) Respuestas vacunales protectoras con predominio Th1 y liberación de IFN- γ y respuestas no protectoras con predominio Th2 y liberación de IL-4. (D) Pasos a considerar en el desarrollo de vacunas. Adaptado de Flores-Velázquez et al., 2023.

1.7 Desarrollo de vacunas como estrategia de control de la enfermedad

A mediados del siglo XX el control de estas enfermedades a través de la aplicación de antiparasitarios fue una alternativa de alto beneficio. Sin embargo, esta práctica produjo una selección en las poblaciones de parásitos provocando resistencia a los medicamentos disponibles (Anziani et al., 2014; Hennessey et al., 2020; Wolstenholme et al., 2004). En ese marco se postuló la necesidad de un manejo antiparasitario sustentable basado en el diagnóstico temprano y tratamiento con drogas de comprobada eficacia, planificación del pastoreo, la selección de genotipos resistentes mediante análisis genético y finalmente el desarrollo de vacunas (Besier et al., 2016; Nari et al., 2000).

En el desarrollo de vacunas contra parásitos se aplicaron distintas tecnologías conocidas como de primera, segunda y tercera generación. En el primer caso se

mencionan aquellas que utilizan en su constitución el parásito entero que ha sido desactivado o muerto, como es el caso de la vacuna desarrollada por INTA contra la enfermedad de tristeza bovina y las utilizadas en Australia. Estas vacunas usadas contra *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* presentan limitaciones por el costo de fabricación, el riesgo de producir reacciones de anafilaxis y el estricto control de cadena de frío (Florin-Christensen et al., 2014). Las vacunas de segunda generación son aquellas elaboradas a partir de proteínas purificadas mediante técnicas de ingeniería genética y las denominadas de tercera generación son aquellas que utilizan proteínas recombinante en su constitución. En el caso de las vacunas contra *Leishmaniasis* se han desarrollado los tres tipos de vacunas con presencia en forma comercial las de segunda y tercera generación: CaniLeish, Leish-Tec respectivamente (Bongiorno et al., 2013). Para el control de hidatidosis se ha desarrollado una vacuna comercial de tercera generación con un efectividad del 98% en la reducción de quistes hidatídicos en ovinos (Heath et al., 2003; Lightowlers et al., 2000).

El inicio del desarrollo de vacunas experimentales contra *F. hepatica* se remonta a 1966, utilizando primeramente metacercarias irradiadas no observándose diferencias significativas en el conteo de trematodos adultos (Creaney et al., 1995). Posteriormente, las investigaciones se centraron en el uso de los productos de excreción-secreción (PES) como candidatos vacunales. Primeramente se utilizaron las proteínas nativas como antígenos, entre ellas se encuentran proteasas como catepsina L, glutatión transferasa (GST) leucina aminopeptida (LAP) y la proteína de unión a ácidos grasos (FABP)(Molina-Hernández et al., 2015; Toet et al., 2014). En ensayos de vacunación, estas proteínas indujeron significativos niveles de protección en el ganado, con reducción de la carga de trematodos adultos (RCA), la producción de huevos, y también de la patología en hígado. Sin embargo, informes más recientes de los ensayos de vacunas en ovinos donde se utilizó como inmunógeno a varias formas recombinantes y funcionales (con actividad enzimática) de estos antígenos tales como catepsina L1, GST y peroxirredoxina (FhPrx) de *F. hepatica* no se reportó una reducción significativa de las cargas de adultos (RCA) , pero sí del desarrollo de la patología hepática (Mendes et al., 2010; Zafra et al., 2013).

En relación a catepsina L1 (FhCL1) ha sido la proteína más estudiada como candidato vacunal, se expresa en forma temprana en *F. hepatica* y se considera que su actividad proteasa le permite atravesar la pared intestinal y además interviene en la digestión de la

hemoglobina a través de la escisión de los enlaces peptídicos interviniendo en la alimentación del parásito (Lowther et al., 2009). Estudios recientes con proteínas recombinante (rFhCL1) han demostrado una baja protección en ovinos (Pacheco et al., 2017; Zafra et al., 2013). Se ha combinado (rFhCL1) en una proteína quimérica con leucina aminopeptidasa (rFhLAP) utilizando Quil A como adyuvante revelando una reducción en la carga de *F. hepatica* de 46.5 % con la dosis mayor de la formulación (Ortega-Vargas et al., 2019). También se ha evaluado en ovinos una vacuna utilizando proteínas nativas FhCL1, FhCL2 y LAP de manera combinada que indujeron una reducción del 79% (Toet et al., 2014).

Respecto al uso de glutatión s transferasa como antígeno vacunal, esta enzima pertenece a una familia de proteínas involucradas en procesos celulares de desintoxicación y excreción. Han sido identificadas en numerosos helmintos y en *F. hepatica* se distribuye en tegumento, parénquima y en células intestinales (Mahajan & Atkins, 2005). Ensayos vacunales con la GST nativa indican una buena protección en ovinos y bovinos (Spithill et al., 2021; Toet et al., 2014).

Respecto a otros antígenos usados se ha descrito la tioredoxina glutatión reductasa (rFhTGR) la cual también posee un efecto desintoxicante en la célula del parásito (Kuntz et al., 2007) y fue evaluada como inmunógeno en conejos evidenciado una eficacia del 96.7 %. Sin embargo, la eficacia en bovinos fue del 23% (Maggioli et al., 2016). Asimismo, se han evaluado otros antígenos: molécula de defensa contra helmintos (FhHDM-1), proteína 14-3-3z, fosfolicerato quinasa (FhPGK), aunque los niveles de eficacia no fueron significativas (Spithill et al., 2021). Más recientemente se realizaron ensayos vacunales combinando grupos de antígenos con acciones complementarias: proteínas de acción antioxidantes: peroxirredoxina (rFhPrx), tioredoxina (rFhTrx) y tioredoxina-glutatión reductasa (rFhTGR) superóxido dismutasas (rFhSOD1 y rFhSOD3) y de acción inhibitoras de proteasas: inhibidor tipo Kunitz (rFhKT1), serpina (rFhSrp1) y estefina (rFhStf1) asociados a un adyuvante Montanide 61VG. Sin embargo, los resultados no indican efectividad de estas vacunas (Cwiklinski et al., 2023). El desarrollo de vacunas experimentales y su eficacia en ovinos a lo largo del tiempo se resume en la Tabla 1.

Tabla 3. Eficacia de vacunas contra *F. hepatica* evaluada en ovinos (1999-2023)

| Antígeno utilizado | Abreviatura | Síntesis | Eficacia (%) | Año de referencia |
|--|--------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------|
| <i>Proteína fijadora de ácidos grasos</i> | FABP Fh12 | nativa | 42 | 2008 |
| | FABP Fh12 | nativa | 24 | 2004 |
| | FABP Fh12 | nativa | 0 | 2001 |
| <i>FABP</i> | FABP rFh15 | recombinante | 43 | 2007 |
| | FABP rFh15 | recombinante | 0 | 2001 |
| <i>Glutathion s transferasa</i> | GST | nativa | 29-57 | 1999 |
| | FhCL | nativa | 69 | 1999 |
| <i>Catepsina L</i> | FhCL1 | nativa | 34 | 1999 |
| | FhCL2 | nativa | 0 | 1999 |
| <i>Catepsina L</i> | rFhCL1 | recombinante | 11 | 2017 |
| | rFhCL1 | recombinante | 0 | 2018 |
| | mFhCL1 | recombinante | 0 | 2016 |
| <i>Catepsina L</i> | rFhCL VO | recombinante | 35.5 | 2018 |
| | | (vía oral) | | |
| <i>Catepsina L</i> | FhCL1/FhCL2 | nativa | 47 | 2008 |
| <i>Leucina amino peptidasa</i> | FhLAP | nativa | 89 | 1999 |
| <i>Leucina amino peptidasa</i> | rFhLAP | recombinante | 49-86 | 2011 |
| <i>Molécula de defensa de helmintos</i> | MF6p/FhHDM-1 | sintética | 6 | 2018 |
| <i>Molécula de defensa de helmintos</i> | MF6p/FhHDM-1 | nativa | 15 | 2018 |
| <i>Catepsina L5 y Catepsina B2</i> | rFhCL5-FhCB2 | recombinante | 20.9 (IM)- 40.5 (IN) | 2018 |
| <i>Leucina aminopeptidasa y Catepsina L1</i> | rFhLAP-FhCL1 | recombinante | 25.5;30.7;46.5 | 2019 |

Elaboración propia a partir de revisiones de (Spithill et al., 2021; Toet et al., 2014). En todos los casos la aplicación es subcutánea excepto en los indicados VO: vía oral, IM: intramuscular, IN: intranasal.

En relación a la respuesta inmune generada por vacunas eficientes en fasciolosis, antecedentes previos demuestran que una respuesta Th1 ha sido asociada a la inducción

de protección. La producción de IFN- γ , característica de una respuesta Th1, activan macrófagos y otras células de la inmunidad innata capaces de producir reactivos derivados del oxígeno como óxido nítrico y otros que contribuirían a eliminar el parásito durante su migración por el organismo. Por otra parte el perfil Th1 favorece al isotipo de inmunoglobulinas IgG2a, IgG3 en ratón, los cuales resultan eficaces en el reclutamiento de células citotóxicas que presentan receptores Fc y podrían participar en mecanismos de citotoxicidad mediada por anticuerpos contra el parásito (Toet et al., 2014). Además, otra respuesta que podría resultar protectora en la infección con *F. hepatica* es la respuesta inducida por la acción de IL-17 la cual es quimioattractante para neutrófilos, células fundamentales en la inmunidad innata para el control del parásito durante su migración.

1.8 La proteína Kunitz (FhKT) y su uso como inmunógeno

Las serina peptidasas son enzimas que juegan un rol destacado en procesos de ataque y de defensa en diferentes organismos. Están presentes como moléculas de superficie, veneno en glándulas especializadas, enzimas digestivas, etc. Participan en diversas funciones inflamatorias, de coagulación, hemorrágicas, entre otras. Ejemplos de ella son: quimiotripsina, elastasa, colagenasa, trombina, subtilisina, etc (Patel, 2017).

Los parásitos han desarrollado la capacidad de regular tanto sus propias proteasas como las del hospedador en su propio beneficio a partir del uso de moléculas inhibitoras, entre las cuales se destacan las proteínas pertenecientes a la familia tipo kunitz. Los miembros de la familia tipo kunitz estudiados hasta ahora actúan principalmente sobre las serin-proteasas, aunque se ha observado que también pueden inhibir aspartato y cisteín-proteasas. Los inhibidores tipo kunitz pueden bloquear los canales catiónicos, modular la respuesta inmune y facilitar el establecimiento del parásito. Los estudios proteómicos han revelado que las proteasas, fundamentalmente cisteín proteasas y los inhibidores de proteasas están altamente expresadas en el parásito, en los productos (PES) y en las etapas tempranas (NEJ) de *F. hepatica*. La catepsina, es la cisteín proteasa más expresada, cumpliendo funciones vitales como la digestión de los tejidos del hospedador para la alimentación del parásito y también para permitir la migración a través de los tejidos debido a su capacidad para escindir la matriz intersticial por acción sobre las proteínas fibronectina, laminina y el colágeno. De igual manera puede escindir las inmunoglobulinas separando las regiones Fab y Fc evitando la unión mediada por anticuerpos estimulada por los eosinófilos protegiendo al parásito contra las respuestas

inmunes del hospedador. Existen evidencias además que Catepsina L (FhCL) interviene en la modulación hacia una respuesta inmune Th2 insuficiente para la destrucción del parásito (Dalton et al., 2003; Dalton, 2021). En ese sentido, se revela la importancia de las proteínas kunitz, ya que presenta una acción selectiva en la inhibición de FhCL y están altamente expresadas en etapas tempranas del parásito lo que sugiere que cumplen un rol importante en la supervivencia del mismo, protegiéndolo de la acción de la proteasa (FhCL) (Bozas et al., 1995a; Di Maggio et al., 2019; Muiño et al., 2011; Smith et al., 2016).

Además de la evaluación de los inmunógenos utilizados también se valoraron distintos tipos de adyuvantes. Los adyuvantes tienen como objetivo potenciar y estimular la respuesta inmune específica contra los antígenos inoculados y prolongar la exposición del sistema inmunológico a los antígenos. Además de ser eficaces los adyuvantes deben ser seguros, es decir, no deben provocar reacciones adversas ni generar respuestas autoinmunes, esto ha llevado a la selección y optimización de sustancias biológicas para la síntesis de adyuvantes en vacunas tanto en medicina humana como de uso veterinario (Laupèze et al., 2019).

Existen diferentes tipos de adyuvantes que fueron utilizados en las vacunas experimentales contra *F. hepatica*. Inicialmente se utilizó el adyuvante completo de Freund (FCA) una emulsión de agua y aceite mineral que contiene micobacterias muertas, es muy poderosos pero de baja seguridad, por ello se continuó con el uso del adyuvante incompleto de Freund (FIA) sin la adición de la micobacteria (Firdaus et al., 2022). También se han utilizado agentes tensoactivos como la saponina Quil A extracto de *Quillaja saponaria* la cual presenta un potente efecto adyuvante para antígenos tanto T-dependientes como T-independientes, y la estimulación de isotipos asociados a respuestas de células T auxiliaadoras de tipo 1 (Th1). Esta clase de adyuvantes induce, además, respuestas de linfocitos T citotóxicos (-CTL) CD8+. También se lo utiliza para conformar estructuras coloidales conocidas como ISCOM : complejos inmunoestimulantes (Paepenmüller & Müller-Goymann, 2014; Sun et al., 2009).

Otro adyuvante utilizado en diferentes ensayos vacunales es el Montanide, una emulsión de agua en aceite, compuesta de un aceite mineral y un tensioactivo. Incrementa los títulos de anticuerpos y las respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) debido a la liberación lenta de antígenos por la formación de depósitos y las reacciones de inflamación que estimula el reclutamiento de células presentadoras de antígenos

(CPA)(van Doorn et al., 2015). Más recientemente se menciona el uso de un adyuvante comercial del laboratorio Zoetis: Metastim®, un adyuvante de base lipídica, que provoca respuestas inmunes humorales y celulares, siendo la respuesta Th1 más efectiva que las inducidas por los adyuvantes en base de sal de aluminio. Sin embargo, no se dispone de información suficiente sobre su mecanismo de acción (Horohov et al., 2015).

Dentro de los candidatos a adyuvantes en estudio se encuentran los oligodeoxinucleótidos sintéticos que contienen secuencias específicas de citosina-fosfato-guanina (CpG). Estas secuencias imitan el patrón del ADN bacteriano y son reconocidas por el sistema inmunológico como señales de peligro, activando respuestas inmunes por interacción con el receptor intracitoplasmático tipo Toll 9 (TLR 9). Estos oligodesoxinucleótidos se han utilizado en vacunas contra el virus del papiloma humano, hepatitis B y contra influenza demostrando su capacidad de desarrollar una respuesta inmune tipo Th1 con estimulación de células T CD8+ citotóxicos (Alignani et al., 2005; Campbell, 2017; Maletto et al., 2005; Shirai et al., 2019; Wang et al., 2014).

El uso del CpG-ODN tiene como desventajas una vida media corta, baja especificidad y limitaciones en su biodistribución. En ese sentido, fórmulas mejoradas con nanopartículas permiten mejorar estos indicadores promoviendo una liberación controlada durante un mayor período (Hanagata, 2012; Mutwiri et al., 2009). , incremetan la solubilidad de los componentes y le confieren mayor estabilidad física a la formulación de la vacuna (Lin et al., 2020; Yu et al., 2017) (Fig.3). Se ha sintetizado una estructura nanoparticulada compuesta por 6-o-palmitato de ascorbilo (ASC16) la cual se ensambla en fase cristalina líquida que contiene CpG-ODN y modula su liberación. Esta estructura se sintetiza calentando una solución que contiene ASC16 hasta una temperatura crítica micelar y, tras el enfriamiento, se obtiene una dispersión tipo gel (Coa-ASC16) que contiene una fase líquida interna. Este fenómeno se debe a las porciones hidrofílicas (cadena alquil) y a los grupos polares (ácido ascórbico), que se distribuyen de manera que forman una estructura tridimensional lamelar (Sánchez Vallecillo et al., 2014).

Fig. 3

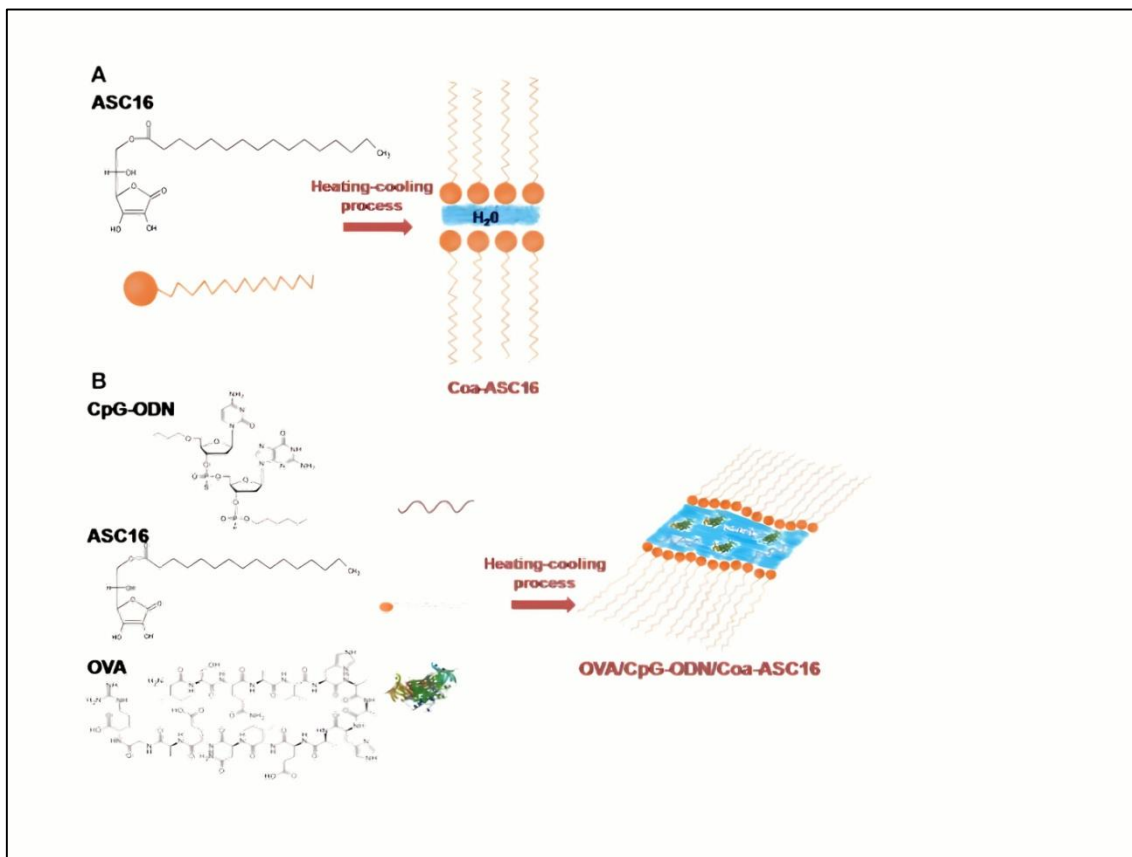


Figura 3. Formulación de OVA y CpG con la nanoestructura. (A) Representación esquemática de Coa-ASC16 (B) Esquema representación de OVA / CpG-ODN / Coa-ASC16. Adaptado de Chiodetti et al, 2018.

Estudios previos utilizando modelo OVA de antígeno y Coa-ASC16 como adyuvante han evidenciado un aumento en los títulos de anticuerpos, una respuesta Th1-Th17 y sin presentación de reacciones adversas (Chiodetti et al., 2018; Sánchez Vallecillo et al., 2015a). Se ha demostrado que la respuesta inmune efectiva contra *F. hepatica* son de tipo Th1 y Th17 con una respuesta humoral IgG1-IgG2 mixta y en los resultados obtenidos en modelo ratón con el uso de este adyuvante (CpG-ODN-Coa-ASC16) y la proteína Kunitz (FhKT) como inmunógeno indican resultados positivos respecto a la inducción de la respuesta inmune y la protección contra *F. hepatica* (Dalton et al., 2013; Dalton, 2021; Fu et al., 2016; Mulcahy & Dalton, 2001; Rojas-Caraballo et al., 2014; Silvano et al., 2020; Toet et al., 2014).

En este contexto, se propone el desafío en la especie ovina, altamente susceptible, con

una vacuna experimental contra *F. hepatica* formulada en base a FhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 basándonos en los antecedentes previos.

1.9 Justificación de la importancia del estudio

Este estudio presenta un enfoque original e innovador, de validación de una vacuna contra *F. hepatica* en ovinos, de probada eficiencia en ratones con una formulación no descripta. Siendo esta especie de alta susceptibilidad es de elección para la prueba de efectividad de la vacuna.

La misma está basada en una proteína del parásito muy poco explorada, el inhibidor de proteasa de tipo kunitz (FhKT), el cual está altamente expresado en *F. hepatica*, con una función biológica importante y se encuentra acoplado a un sistema adyuvante totalmente novedoso y muy bien caracterizado, el acetato de ascorbilo combinado con CpG, el cual forma una nano estructura, de probada capacidad para desarrollar una respuesta de tipo Th1 y Th17. Esta vacuna permitirá la potenciación de la inmunidad innata y también adquirida hacia un perfil de respuesta que ha sido demostrado como protector en contra de la infección experimental con este parásito. La eficiencia de la vacuna mostrada en datos preliminares en ratones, sugieren su capacidad para ser validada en ganado ovino. Considerando además el impacto económico que representa esta parasitosis en la ganadería a nivel mundial y en la salud humana, el desarrollo de este trabajo de tesis resulta relevante y puede considerarse como una estrategia de innovación tecnológica.

1.10 Hipótesis de trabajo

La inmunización en ovinos con una vacuna formulada usando FhKT-CpG/Coa-ASC16 induce la síntesis de anticuerpos a nivel sistémico otorgando protección a los ovinos vacunados contra *F. hepatica*.

1.11 Objetivos

1.11.1 Objetivo general

- Determinar la eficacia de la inmunización con FhKT-CpG-ODN/Coa-ASC16 para inducir protección en ovinos infestados con *F.hepatica* evaluando la respuesta inmune generada en los ovinos vacunados a los fines de dilucidar los mecanismos de protección contra el parásito.

1.11.2 Objetivos específicos:

- Determinar los niveles de infestación en ovinos inmunizados con FhKT-CpG-ODN/Coa-ASC16, mediante la evaluación de huevos en materia fecal y recuperación de adultos en hígado y vesícula biliar de los animales en ensayo.
- Valorar el grado de compromiso hepático a partir de determinación de enzimas hepáticas, grado de daño visible macroscópicamente: peso del hígado, coloración, lesiones visibles y a nivel macroscópico a partir de técnicas de histopatológicas: tipo de degeneración celular, presencia de fibrosis, cirrosis.
- Evaluar la respuesta de anticuerpos presentes en plasma, investigando la producción de los anticuerpos anti FhKT (tipo IgG) en suero de animales inmunizados e infectados.
- Determinar la aplicación del péptido Kunitz (FhKT) como diagnóstico temprano de fasciolosis en ovinos.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

Primeramente se describe la metodología empleada para el cumplimiento de los objetivos específicos referidos a: determinar los niveles de infección de *F. hepatica*,

valorar el grado de compromiso hepático y evaluar la respuesta de anticuerpos presentes en plasma en ovinos inmunizados con FhKT-CpG-ODN/Coa-ASC16.

2.1 Ensayo de inmunización con FhKT-CpG-ODN/Coa-ASC16

2.1.1 Material biológico empleado

2.1.1.1 Ovinos

Para el ensayo experimental se utilizaron treinta y dos (32) corderos de 5-7 meses de edad de biotipo criollo libres de *F. hepatica*, los cuales fueron provistos por la Cooperativa de productores Pampa de Olaen y el establecimiento La Soñada. Los animales fueron mantenidos en corrales ubicados en el campo experimental de la Universidad Católica de Córdoba, con disponibilidad *ad libitum* de agua y alimentación en base a heno de alfalfa, maíz y balanceado para rumiantes. Los corrales disponían de sombra y espacio suficiente para asegurar el bienestar de los animales. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en los grupos experimentales (Tabla 2). Cada animal fue identificado con una caravana plástica numerada en la oreja derecha marca Rototag. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Estudio (CICUAE) de la Universidad Católica de Córdoba mediante Resolución (Acta N°21/002). Se realizaron tres ensayos experimentales utilizando el mismo esquema.

Tabla 4. Asignación de los animales a los grupos de ensayo experimental de inmunización

| Grupo | Control Sano (CS) | Infectados con <i>F. hepatica</i> (CI) | Inmunizados FhKT-CpG-ODN/Coa-ASC16 (V1) | Inmunizados FhKT-CpG-ODN/Coa-ASC16 (V2) | Inmunizados CpG-ODN/Coa-ASC16 (AY) |
|--------------------|-------------------|--|---|---|------------------------------------|
| n | 5 | 9 | 5 | 8 | 5 |
| Sexo | 3M, 2H | 7M, 2H | 3M, 2H | 5M, 3H | 3M, 2H |
| Tratamiento | Control sano | Infectados no inmunizados | Infectados e inmunizados | Infectados e inmunizados | Infectados e inmunizados |

Tabla 2. Control: individuos sanos no infectados, Infectados con *F.hepatica*: individuos infectados con 100 mtc cada uno no inmunizados, Inmunizados con FhKT-CpG-ODN/Coa-ASC16 (1): individuos infectados e inmunizados con la formulación 1, Inmunizados FhKT-CpG-ODN/Coa-ASC16 (2): individuos infectados e inmunizados con la formulación 2 Inmunizados CpG-ODN/Coa-ASC16: individuos infectados e inmunizados con la formulación del adyuvante sin inmunógeno, n: cantidad de individuos por grupo, Sexo: distribución de machos (M) y hembras (H) por grupo.

2.1.1.2 Metacercarias

Se utilizaron 2.700 metacercarias (mtc) para la infección experimental, a razón de 100 mtc por individuo, provistas por el Dr. Cesar Pruzzo del Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Las mtc fueron mantenidas en tubos eppendorf cubiertas con papel de aluminio a 4°C hasta su utilización. Para establecer el número de mtc utilizadas se consideraron como referencias distintos trabajos previos de vacunación donde se informan cantidades variables de metacercarias utilizadas en ovinos con un amplio rango desde 60 hasta 250 mtc por animal (Cwiklinski et al., 2023b; Flores-Velázquez et al., 2023; Haçariz et al., 2009; Maggioli et al., 2011; Pacheco et al., 2018; Zafra et al., 2021).

2.1.2 Descripción de procedimientos

2.1.2.2 Diseño del ensayo experimental

Los corderos fueron asignados aleatoriamente en cinco (5) grupos: control sano (CS), Infectados con *F. hepatica* (CI), Inmunizados con la 1° formulación de la vacuna (V1), Inmunizados con la 2° formulación de la vacuna (V2), Inmunizados únicamente el adyuvante (AY). Previamente al ensayo se corroboró por análisis coproparasitológico la ausencia de *F. hepatica* y de otras parasitosis. Se los pesó y se los evaluó clínicamente para determinar un correcto estado sanitario inicial, se los individualizó con una caravana y se les asignó el corral de acuerdo al grupo. Las instalaciones se ubicaron en el Campus experimental de la Universidad Católica de Córdoba, con tejido romboidal y base cementada, para limitar el ingreso y/o egreso de cualquier animal. Se realizaron extracciones de sangre a todos los animales para determinar niveles basales de enzimas hepáticas (ALT y AST) valoradas como punto 0. A los animales correspondientes a los grupos de inmunización se les aplicó la fórmula correspondiente y a los 21 días se aplicó una segunda dosis. El grupo control sano y el grupo infectado recibieron 2 ml de solución fisiológica. Las inyecciones fueron por vía subcutáneas en el pliegue axilar bajo sujeción manual. A los 30 días, los grupos inmunizados e infectados fueron infectados con 100 mtc cada uno utilizando una jeringa

anexada a una sonda esofágica para su inoculación. A partir de la semana 6 pos infección se realizaron extracciones de sangre periódicas para evaluación de lesión hepática. A partir de la semana 10 pos infección y de manera semanal se extrajeron muestras de materia fecal para su posterior análisis y recuento de huevos. A la semana 16 pos infección se realizó la eutanasia de los animales con la aplicación endovenosa de pentobarbital sódico y difenilhidantoína. Posteriormente se extrajeron los hígados para su evaluación macroscópica. Se tomaron muestras para histopatología de las zonas de lesión y se realizó el recuento de *F. hepatica* presentes en canalículos y vesícula biliar. Adicionalmente se aspiró contenido de vesícula biliar para el test de eclosión de huevos (Fig 4) en el grupo de inmunizados con la segunda formulación (V2) y grupo adyuvante (AY).

Fig. 4

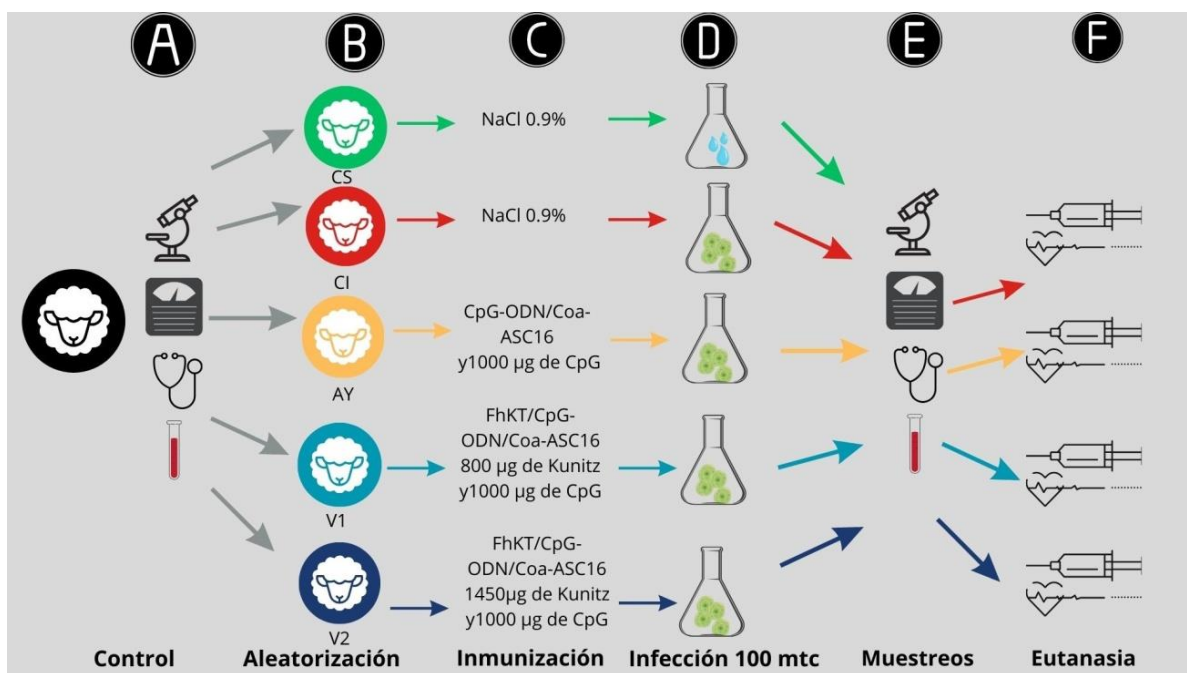


Fig. 4. Esquema de diseño experimental. (A)Control sanitario de ingreso al ensayo. (B) Designación aleatoria de los animales a los grupos: CS: control sano, CI: control infectado, AY: adyuvante, V1: vacunados fórmula 1, V2: vacunados fórmula 2. (C) Esquema de inmunización a cada grupo con dos aplicaciones con un intervalo de 21 días. (D) Infección experimental con 100 metacercarias con sonda a todos los grupos: CS, CI, AY, V1 y V2. (E) Muestreos periódicos y control clínico: 6 extracciones de sangre, pesado y 6 muestreos de materia fecal. (F) eutanasia a los grupos: CI, AY, V1 y V2.

2.1.2.2 Síntesis del antígeno sintético (sFhKT) y adyuvante utilizado

El péptido sFhKT fue sintetizado por ONTORES Biotechnologies (Zhejiang, China) a partir de la secuencia provista por el laboratorio del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI) perteneciente al CONICET y al Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. La secuencia utilizada fue: IQKRCLLVEGCLGGIRSWAWDSRRGECVFVYGGCEGNDNRFDKSSCEYNCERF correspondiente a reportes previos (Bozas et al., 1995). La identidad y la pureza del péptido se analizaron mediante cromatografía líquida analítica de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) y espectrometría de masas MALDI-TOF, alcanzando una pureza > 95% según lo reportado por el proveedor Ontores, Zhejiang, China. El CpG-ODN fue proporcionado por Operon Technologies, Alameda, CA, EE. UU. El Coa-ASC16 se preparó mezclando con palmitato de 6-O-ascorbilo al 2% (p / v) y al 5% de dextrosa en un tubo eppendorf según un diseño y evaluación de la capacidad adyuvante. La solución se llevó a la temperatura crítica micelial (72°C) y luego se homogeneizó en un baño ultrasónico durante 10 minutos y finalmente se dejó alcanzar la temperatura ambiente. La consistencia obtenida fue semisólida. FhKT y CpG-ODN se incorporaron en Coa-ASC16 como se describe en la publicación de Sánchez Vallecillo MF y col. (Sánchez Vallecillo et al., 2014).

2.1.2.3 Análisis de la respuesta de anticuerpos por ensayo inmuno-enzimático (ELISA)

La respuesta humoral desarrollada por los animales inmunizados se analizó por técnica de ELISA. Las placas de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-One) half area se sensibilizaron con 50 µL del péptido sFhKT a una concentración final de 1 µg/ml de en tampón carbonato 0,05 M (pH 9,6) y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces (10 min cada vez) con PBS-Tween. Posteriormente, se incubó con suero fetal bovino (SFB) en PBS al 5% (50 µL/pocillo) para bloquear los posibles sitios libres sobre el poliestireno incubando durante 1 h a 37° C en cámara húmeda. Luego las placas se lavaron 3 veces (10 min cada vez) con PBS-Tween. Las muestras diluidas en forma seriada en PBS-SFB 2% se incubaron 1 h a 37° C en cámara húmeda (25 µL/pocillo). Las placas se lavaron como se describió anteriormente y se agregó una solución en PBS-SFB 2% del segundo anticuerpo (anti-IgG1) conjugado a peroxidasa (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU) (50 µL/pocillo). Se incubó 1h a 37° C en cámara húmeda y se repitió la etapa de lavado. Se utilizó el 3,3',5,5'-

Tetrametilbenzidina (TMB; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU) como cromógeno (25µL/pocillo), para evidenciar la reacción antígeno anticuerpo. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1 M (25 µL/pocillo) y se midió la absorbancia a 450 nm densidad óptica (D.O.)(Silvane et al., 2020).

2.1.2.4 Recuento de huevos de *Fasciola hepatica* en materia fecal

Para el recuento de huevos de *F. hepatica* en materia fecal se obtuvieron muestras a partir de la semana 10 pos infección experimental. Las muestras fueron obtenidas directamente desde el recto del animal utilizando una bolsa de polietileno identificada con el número de caravana correspondiente. Las muestras se mantuvieron refrigeradas y se procesaron en un tiempo no superior a los cinco días (5) pos extracción en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Cs Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba siguiendo el protocolo establecido de la técnica de sedimentación con recuento en la cámara Mc Master modificada (Fiel et al., 2011) (Fig. 5).

Fig.5



Figura 5. Huevos de *Fasciola hepatica* . Muestra de materia fecal de ovinos en ensayo bajo infección experimental. Microscopio óptico (MO) aumento 10x.

2.1.2.5 Determinación de enzimas hepáticas: alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en suero

Con el fin de evaluar el nivel de daño hepático, se realizaron cinco (5) determinaciones seriadas de las enzimas hepáticas. La ALT es una enzima que ayuda a convertir la alanina, un aminoácido, en piruvato. Se encuentra principalmente en el hígado siendo más específica que la AST, esta enzima está involucrada en la conversión de aspartato en oxaloacetato y está presente en el hígado, corazón, músculo y riñón (Evia, 2019).

Para realizar la determinación de las enzimas se extrajo sangre (2 ml) por venopunción de la yugular con el animal bajo sujeción manual. Posteriormente fue centrifugada para la separación del suero y remitida al laboratorio bioquímico para su posterior análisis por método enzimático (Sookoian & Pirola, 2015).

2.1.2.6 Evaluación histopatológica de daño hepático

En la necropsia, semana 16 pos infección, se extrajeron los hígados previa ligadura de vasos sanguíneos y de la primera porción del colédoco. Fueron identificados con la caravana del animal de origen, pesados utilizando una balanza digital y registrados en planillas de trabajo. Posteriormente se cubrieron los hígados con un film de polietileno transparente dividido en 12 cuadrantes de igual tamaño para cuantificar áreas hepáticas dañadas, tomando ambas caras del órgano: visceral y diafragmática (Fig.6). Esta variable fue expresada en proporciones sobre el total de cuadrantes (N°/24). Para la evaluación histológica se procedió a la biopsia hepática del área de mayor daño visible. Estas muestras se fijaron en formol al 10%. Los cortes se realizaron en un micrótopo semiautomático marca Leica, de 4 µm de grosor, luego montados en portaobjetos. Los cortes de tejido fueron desparafinados e hidratados. Se utilizaron las tinciones de hematoxilina-Eosina (HE) y Tricrómico de Masson siguiendo métodos adecuados para su observación histológica y análisis histoquímico. Para el estudio morfológico y la toma de imágenes se utilizará un microscopio óptico marca Olympus, modelo CX31, con cámara marca Moticama, modelo 480 (Hassan et al., 2014). La valoración histopatológica se realizó en base a criterios y gradientes de presentación de cada uno: tipos celulares de infiltrado inflamatorio periportal, cambios degenerativos de los hepatocitos, nivel de regeneración hepatocitaria y canalicular, grado de desarrollo de fibrosis y presencia de cirrosis. El procesamiento de estas muestras fue efectuado por el servicio de histopatología del Hospital Veterinario de la Universidad Católica de Córdoba a cargo de la Dra. Ana María Martín.

Fig.6

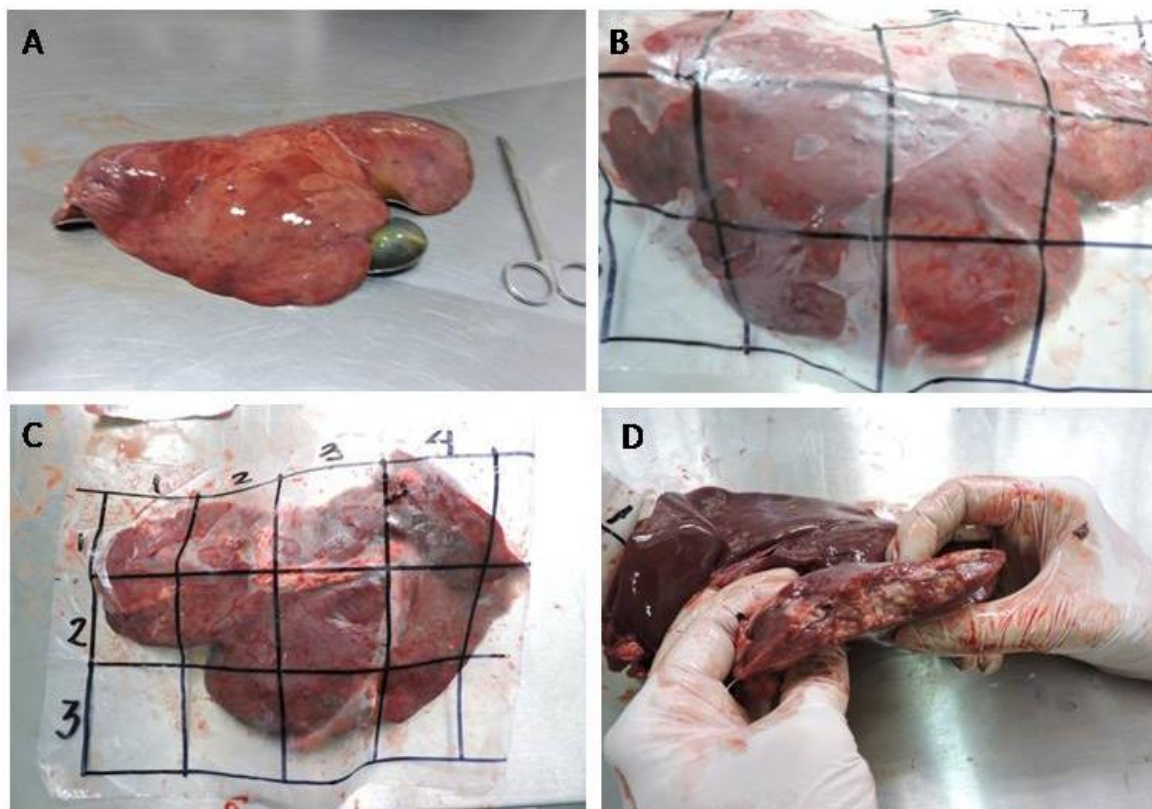


Figura 6. Valoración macroscópica del daño hepático. (A) Hepatectomía con ligadura de vasos y colédoco. (B) Cuantificación de áreas de daño visible cara diafragmática, (C) Cuantificación de áreas de daño visible cara visceral, (D) Biopsia de áreas de lesión.

2.1.2.7 Recuento de ejemplares adultos de *F. hepatica*

Para estimar el nivel de eficacia de la vacuna se procedió a contabilizar el número de adultos del parásito recuperados de vesícula biliar y del parénquima hepático realizando presión digital sobre los canalículos y posterior resección quirúrgica. Los gusanos fueron contados y reservados en formol al 10% en frascos de muestra estériles.

2.1.2.8 Test de eclosión de huevos

Para evaluar posibles efectos sobre la fertilidad de *F. hepatica* de la vacuna se utilizó el test de eclosión de huevos tomando como referencia el protocolo descrito por Ceballos et al. , 2019. Para ello, posteriormente a la inspección macroscópica del hígado se procedió a la colecta de contenido de vesícula biliar con una jeringa de 10 ml y una aguja de 40/12 y los que fueron colocados en tubo Falcón estériles identificados. A continuación se procedió al lavado tres veces con reposo de 5 minutos cada vez. Los

huevos recuperados mediante sedimentación fueron incubados en estufa a 25°C en oscuridad durante 15 días. Después de este período, los huevos fueron expuestos a luz natural durante 2 h para estimular la eclosión de miracidios. Inmediatamente después, se añadió 1 ml de formol tamponada al 10 % (v/v) a cada tubo para detener la eclosión. Luego se tomó una alícuota de 1 ml del sedimento y se observó bajo en el microscopio óptico registrando los primeros 100 huevos de observación y determinando la presencia de categorías: eclosionado (huevos vacíos) y no eclosionado (huevos embrionados y no desarrollados) (Ceballos et al., 2019). Esta variable se determinó como cantidad huevos eclosionados/100 huevos evaluados (Fig. 7).

Fig.7



Figura 7. Recuento microscópico del test de eclosión de huevos. (A) Huevo de *F. hepatica* eclosionado, (B) Huevo de *F. hepatica* no eclosionado.

2.1.2.9 Análisis estadístico de los datos

Para el procesamiento de los datos se confeccionaron tablas de cálculo en el programa Excel y luego fueron analizadas utilizando dos software estadísticos: Infostat (versión 2020; Centro de Transferencia InfoStat, FCA, UNC, Argentina; URL (<http://www.infostat.com.ar>) y el programa GraphPad Prism (version 9.0; San Diego, CA, USA). Para evaluar los supuestos de normalidad, independencia y homogeneidad de las varianzas de los datos, se realizaron pruebas tanto gráficas como formales. La normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk con un nivel de significancia de valor $p < 0,05$. Se empleó la prueba de Bartlett para verificar la

heterocedasticidad de las varianzas, con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Para el análisis de las variables referidas a conteos o mediciones repetidas en el tiempo sobre las mismas unidades de análisis se ajustó un modelo lineal mixto generalizado considerando la no independencia de los datos, según:

$$\gamma = \mu + \tau + \tau * \text{tiempo} + \text{tiempo} + \text{ensayo} + \text{EE}$$

$$\gamma \sim \lambda$$

Donde τ representa el efecto del tratamiento del modelo, tiempo indica el momento de muestreo (semana), ensayo refiere a si corresponde al ensayo 1, 2 o 3 considerando la posible variabilidad de las metacercarias utilizadas, se considera la interacción del tratamiento con el momento del muestreo y EE indica el error estándar.

Para el cálculo del porcentaje de reducción de huevos se adecuó la fórmula descripta para los test de eficacia de antiparasitarios (Coles et al., 1992; Larroza et al., 2023; Olaechea et al., 2011):

$$\% \text{ RCH} = \frac{\overline{\text{CI}} - \overline{\text{V}}_{(1,2)}}{\overline{\text{CI}}} \times 100$$

Porcentaje de reducción de conteo de huevos (%RCH)= medias de los individuos del grupo control infectados (CI) menos la media de los grupos inmunizados con la vacuna (V1 y V2) dividido por la media del grupo de control infectado (CI) expresado en porcentaje (multiplicado por 100).

Para determinar el porcentaje de reducción en adultos recolectados de hígado y vesícula biliar se procedió de igual manera, aplicando la fórmula:

$$\% \text{ RCA} = \frac{\overline{\text{CI}} - \overline{\text{V}}_{(1,2)}}{\overline{\text{CI}}} \times 100$$

Para la comparación de los datos cualitativos obtenidos en la valoración histopatológica se utilizó un análisis multivariado de tipo discriminante que permitiera verificar grados de asociación de las variables analizadas respecto a los grupos en tratamiento.

Para comparar las medias de tratamiento de densidades ópticas como medidas de respuesta de anticuerpos frente a la vacuna experimental se utilizó la prueba LSD de Fisher comparando los valores de densidad ópticas obtenidas para FhKT (valor $p < 0,05$) en cada valor de dilución (2×10^{-3} ; 1×10^{-3} ; 5×10^{-4} ; $2,5 \times 10^{-4}$; $1,25 \times 10^{-4}$; $6,25 \times 10^{-5}$).

En segundo término se describe la metodología utilizada para el cumplimiento del objetivo específico referido al uso de FhKT como diagnóstico de fasciolosis en ovinos.

2.2 Ensayo de diagnóstico utilizando Kunitz en sueros ovinos

2.2.1 Material biológico empleado

2.2.1.1 Ovinos

Se utilizaron sueros de diecinueve (19) ovinos de 5 meses a 1 año de edad, 9 de ellos provenientes del ensayo de la vacuna experimental y los diez restantes de majadas pertenecientes a la zona de Guasapampa, Córdoba. Se definieron cuatro grupos: control negativo (animales sanos y sin parásitos), infectados por vía oral con 100 metacercarias de *F. hepatica* (6 semanas pos infección experimental del ensayo vacunal) y ovinos naturalmente infectados con coccidios o nematodos. Los animales fueron identificados con caravanas y las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción de la vena yugular. Se utilizó una bolsa de polietileno para la obtención de muestras de heces del recto y se determinó la presencia de Coccidia: *Eimeria sp.* y Nematoda: *Trichuris sp.*, *Trichostrongylus sp.*, *Nematodirus sp.*, mediante técnicas de flotación (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de los animales a los grupos experimentales

| <i>Grupo</i> | Control Sano Negativo (CN) | <i>Fasciola hepatica</i> | Nematoda | Coccidia |
|--------------|----------------------------|--------------------------|----------|----------|
| N | 3 | 6 | 5 | 5 |
| Sexo | 2M, 1H | 4M, 2H | 3M, 2H | 2M, 3H |

Tabla 3. Distribución de los animales a los grupos experimentales. Control negativo: ovinos sanos sin parásitos *F. hepatica* : ovinos experimentalmente infectados Nematoda ovinos naturalmente infectados , Coccidia: ovinos naturalmente infectados . M: macho, H: hembra, N: número de animales por grupo.

2.2.1.2 Metacercarias

Se utilizaron 600 metacercarias (mtc) para la infección experimental, a razón de 100 mtc por individuo, provistas por el Dr. Cesar Pruzzo del Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Las metacercarias fueron mantenidas en tubos eppendorf cubiertas con papel de aluminio en heladera a hasta su utilización.

2.2.2 Descripción de procedimientos

2.2.2.1 Construcción de los plásmidos

Los plásmidos de expresión utilizados en este estudio fueron sintetizados en el laboratorio del Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba dependiente del CONICET y la Universidad Nacional de Córdoba, por el equipo liderado por el Dr. Barra. Los plásmidos de expresión fueron: pET26b-rFhKT 1.1, pET26b-rFhKT 1.3 y pET26b-rFhKT 4: portadores del vector pET26b (Novagen; Merck KGaA; Darmstadt, Alemania) con un segmento de ADN sintético (GenScript) que contiene el FhKT correspondiente (sin el péptido señal secretor nativo o natural), la miniinteína Ssp DnaX, un CBD (dominio de unión a quitina) y una secuencia codificante de etiqueta His ubicada aguas abajo de la secuencia señal del plásmido pelB, entre GCGATGGCCATG y GCGGCCGCACTC del plásmido pET26b (eliminando la secuencia GATATCGGAATTAATTCGGATCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTT) (Fig. 15). El uso de codones de todos los segmentos sintéticos se optimizó para la expresión en *E. coli*. Los plásmidos se transformaron en la cepa de expresión *E. coli* BL21 λ DE3 (Amaranto et al., 2021).

2.2.2.2 Expresión y purificación de proteínas kunitz recombinantes (FhKT1.1, FhKT1.3, FhKT4)

Las células de *E. coli* transformadas se cultivaron a 37 °C con agitación en 500 ml de medio LB con kanamicina añadida (25 μ g/ml) hasta un valor de DO600 de 0,6 a 0,8. La expresión de proteínas se indujo mediante la adición de IPTG 0,4 mM, seguido de una incubación durante la noche a 20 °C con agitación. Luego se recogieron las células, se resuspendieron en 25 ml de tampón de unión (Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM) y se lisaron mediante homogeneización a alta presión (Avestin Emulsiflex C3). Los sobrenadantes de los lisados centrifugados se incubaron con 0,5 ml de resina Ni-NTA Agarosa (QIAGEN Hilden, Alemania) a 4 °C con agitación. Las proteínas no unidas se eliminaron mediante lavado con 25 volúmenes de solución tamponada que contenía concentraciones aumentadas de imidazol (0, 20, 40, 60 mM). El rFhKT marcado con His se eluyó utilizando un solución tamponada que contenía imidazol 400 mM (Godino et al., 2023). Las proteínas recombinantes purificadas se cuantificaron mediante el método de

Bradford utilizando Bio-Rad Protein Assay Dye y se analizaron mediante SDS-PAGE (15%).

2.2.2.3 Análisis de la respuesta de anticuerpos por ensayo inmuno-enzimático (ELISA) anti FhKT sintético (sFhKT) y recombinantes (rFhKT)

Para la valoración de la respuesta de anticuerpos se realizó el mismo procedimiento descrito en el ensayo de vacunación para la valoración de la respuesta de anticuerpos por ensayo inmuno-enzimático (ELISA) determinando los niveles de densidad óptica en los pocillos incubados con los sueros correspondientes a cada grupo en placas de ELISA adsorbidas con las diferentes proteínas kunitz: la sintética (sFhKT) utilizada como inmunógeno en la vacuna experimental y las de síntesis recombinante de producción local (FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4). Se evaluaron los resultados de densidades ópticas de seis diluciones de suero: 2×10^{-3} ; 1×10^{-3} ; 5×10^{-4} ; 2.5×10^{-4} ; 1.25×10^{-4} ; 6.25×10^{-5} .

2.2.2.4 Análisis estadístico de los datos

Para el procesamiento de los datos se confeccionaron tablas de cálculo en el programa Excel y luego fueron analizadas utilizando dos software estadísticos: Infostat (versión 2020; Centro de Transferencia InfoStat, FCA, UNC, Argentina; URL (<http://www.infostat.com.ar>) y el programa GraphPad Prism (version 9.0; San Diego, CA, USA). Para evaluar los supuestos de normalidad, independencia y homogeneidad de las varianzas de los datos, se realizaron pruebas tanto gráficas como formales. La normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk con un nivel de significancia de valor $p < 0,05$. Se empleó la prueba de Bartlett para verificar la heterocedasticidad de las varianzas, con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Debido a la falta de homogeneidad de varianzas, se empleó un modelo lineal mixto para los análisis utilizando el programa R para fines de estimación. Se utilizó la prueba LSD de Fisher para comparar las medias de las densidades ópticas obtenidas para sFhKT y rFhKT (valor $p < 0,05$) en cada valor de dilución (2×10^{-3} ; 1×10^{-3} ; 5×10^{-4} ; $2,5 \times 10^{-4}$; $1,25 \times 10^{-4}$; $6,25 \times 10^{-5}$). Para determinar la sensibilidad y especificidad se realizó un análisis de contingencia con la prueba de Fisher, con un valor de significancia de $p < 0,05$. La razón de probabilidad (LR) se estimó en función de los valores de sensibilidad y especificidad utilizando las siguientes fórmulas: $+LR = \text{sensibilidad}/1-\text{especificidad}$ y $-LR = 1-$

sensibilidad/especificidad (Tönsing et al., 2023). La concordancia entre las pruebas diagnósticas se evaluó mediante el coeficiente *kappa* de Cohen y se interpretó según la siguiente escala: 0,81-1,00, excelente; 0,61-0,80, bueno; 0,41-0,60, moderado; 0,21-0,40, débil; y 0,0-0,20, insignificante. El índice *kappa* se calculó mediante la fórmula:

$$k = (Po - Pe) / (1 - Pe)$$

Donde k representa el índice kappa, Po la concordancia observada entre las dos pruebas (coparásitológica y ELISA), y Pe la concordancia esperada entre las dos pruebas. Po se calcula como la suma de verdaderos positivos (TP) y verdaderos negativos (TN) dividida por el número total de casos (n). Pe se determina utilizando la fórmula $P + N/n$, donde P representa los resultados positivos verdaderos (PV) más los resultados positivos falsos (PF) divididos por el número total de casos (n). N se calcula como la suma de falsos negativos (FN) y verdaderos negativos (VN) (Rezaei et al., 2022; Sim & Wright, 2005).

CAPÍTULO III. RESULTADOS

A continuación se describen los resultados obtenidos en los ensayos experimentales para dar respuesta a los objetivos específicos.

Objetivo específico: Determinar los niveles de infestación en ovinos inmunizados con *sFhKT-CpG-ODN/Coa-ASC16*, mediante la evaluación de huevos en materia fecal y recuperación de adultos en hígado y vesícula biliar de los animales en ensayo.

3.1. Reducción del número de huevos de *F. hepatica* en ovinos vacunados

F. hepatica es hermafrodita y produce 2.000-2.500 huevos por día, que son colectados en la vesícula biliar y excretados con las heces. Esto implica una contaminación de las pasturas y la continuidad del ciclo biológico. En los tres ensayos se evaluó la producción de huevos en heces a partir de la semana 10 pos infección, como un indicador de un posible efecto de la vacuna experimental sobre la fertilidad del parásito.

Como se observa en la Tabla 4 los conteos de huevos de *F. hepatica* por gramo de materia fecal (HPG) de los grupos inmunizados con ambas formulaciones de la vacuna experimental son menores. Al analizar la reducción de huevos (%RCH) se puede concluir que ambas formulaciones de la vacuna experimental inducen una disminución en el recuento de huevos, siendo del 16.6 % en la primera formulación y asciende al 81.4 % en la segunda fórmula de la vacuna.

Tabla 4. Recuento de huevos de *F. hepatica* por gramo de materia fecal según tratamiento

| Tratamiento | n | spi | Recuento | Media ±EE | % RCH |
|-------------------|----|-----|---|-------------|-------|
| Control | 9 | 10 | 110; 267; 312; 397; 75; 25; 0; 0; 0 | 489.75±0.55 | |
| Infectado (CI) | 11 | | 471; 467; 864; 2102; 125; 225; 25; 125; 75 2161; 1754; 1132; 1064; 575; 875; 175; 925; 1900 | | |

| | | | | | |
|-----------------------------|---|----|---|-------------|-------------|
| | | 12 | 2354; 3400; 1352; 2050; 800; 575; 175; 1867; 1000 | | |
| | | 13 | 5333; 3625; 1850; 2600; 1400; 1250; 175; 1867; 1725 | | |
| | | 14 | | | |
| Adyuvante (AY) | 5 | 10 | 500; 382; 225; 409; 2173 | 375.25±0.67 | 23.3 |
| | | 11 | 1875; 1176; 175; 350; 686 | | |
| | | 12 | 325; 507; 250; 1222; 318 | | |
| | | 13 | 4500; 3913; 1666; 2162; 1805 | | |
| | | 14 | 3509; 3698; 2549; 1500; 3708 | | |
| sFhKT/CpG-ODN CoaASC16 (V1) | 5 | 10 | 25; 30; 0; 75; 25 | 408.21±0.58 | 16.6 |
| | | 11 | 75; 500; 125; 125; 25 | | |
| | | 12 | 550; 1350; 1100; 725; 125 | | |
| | | 13 | 125; 925; 550; 350; 175 | | |
| | | 14 | 500; 1650; 275; 825; 500 | | |
| FhKT/CpG-ODN CoaASC16 (V2) | 8 | 10 | 181; 208; 104; 0; 0; 0; 50; 25 | 91.06±0.58 | 81.4 |
| | | 11 | 265; 357; 175; 0; 0; 0 219; 0 | | |
| | | 12 | 1141; 192; 1050; 0; 50; 50; 167; 0 | | |
| | | 13 | 1724; 1603; 1132; 75; 0; 25; 0; 0 | | |
| | | 14 | 1160; 950; 1250; 50; 0; 525; 291; 200 | | |

Tabla 4. CI: control infectado, AY: adyuvante, V1: vacunados fórmula 1, V2: vacunados fórmula 2, n: cantidad de animales por grupo, Media ±EE: medias ajustadas y error estándar por tratamiento, %RCH: = medias de los individuos del grupo control infectados (CI) menos la media de los grupos inmunizados con la vacuna (V1 y V2) dividido por la media del grupo de control infectado (CI) expresado en porcentaje (multiplicado por 100).

Cuando se analizan estadísticamente los resultados obtenidos se puede observar (Fig. 8 A) primeramente que los valores medios mayores de HPG son aquellos referidos al grupo de control de infectados (CI) a excepción del grupo de vacunados con la primera formulación que presenta un valor promedio mayor en la semana 12. Asimismo se puede

concluir que el grupo vacunado con la segunda formulación de la vacuna experimental mantiene los valores promedios inferiores durante todo el ensayo.

Fig.8

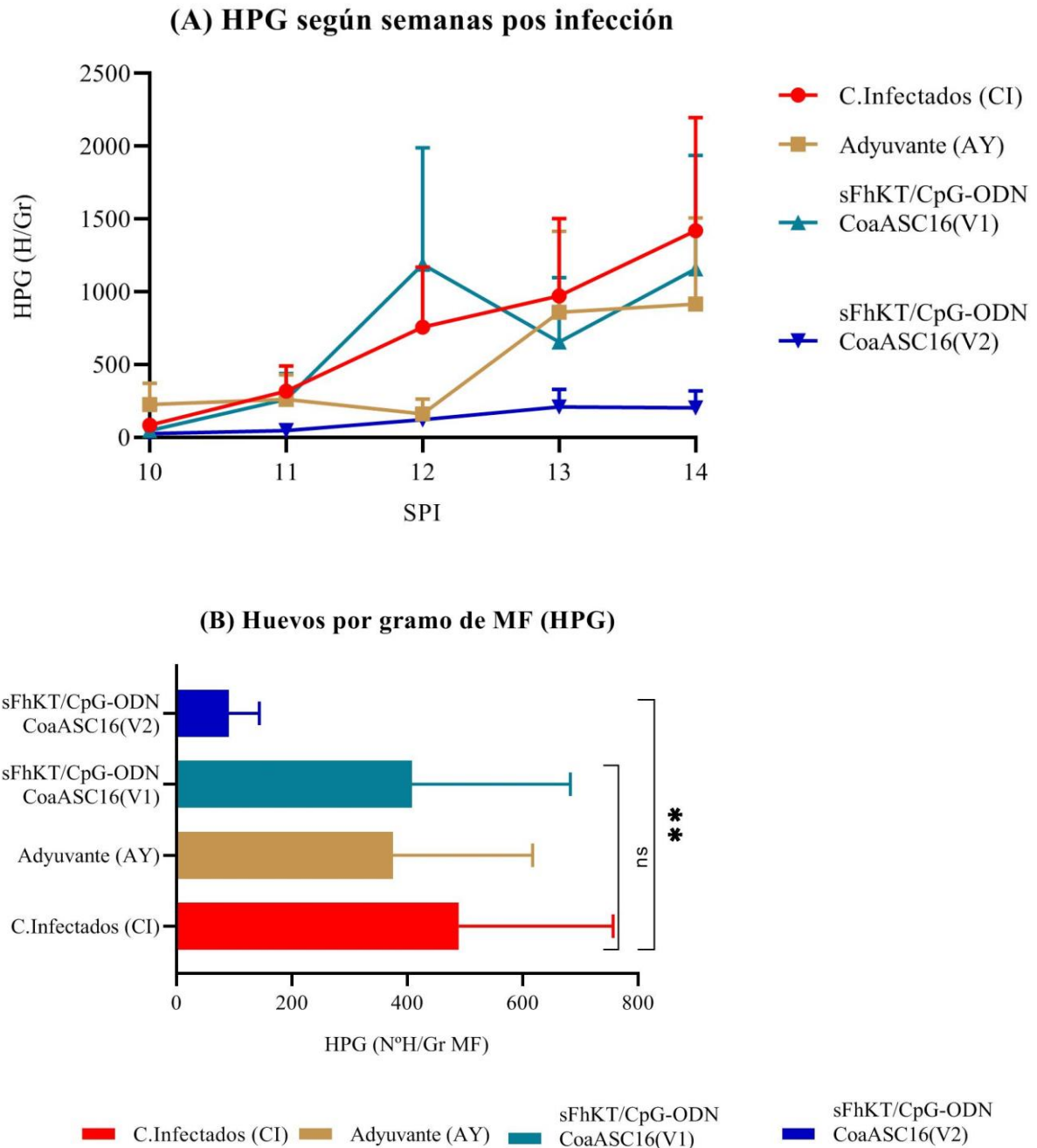


Figura 8. Recuento de huevos de *F. hepatica* según tratamiento y semanas pos infección. (A) Valores medios y error estándar por tratamiento según semanas pos infección. (B) Diferencias de medias de HPG según test LSD de Fisher $p < 0.0001$ ** indican $p < 0.001$.

Posteriormente al analizar las diferencias de medias por tratamiento (Fig. 8 B) se observa que no existen diferencias significativas entre los grupos CI, AY, y V1 y en contraste si

hay diferencias estadísticamente significativas con el grupo inmunizado con la segunda formulación (V2) con un nivel de significación $p < 0.001$.

3.2 Reducción en la cantidad de adultos de *F. hepatica* recuperados en hígado y vesícula biliar en ovinos vacunados

Como se señaló anteriormente, la determinación de la eficacia de una vacuna contra *F. hepatica* se realiza a través de la valoración en la reducción del número de parásitos recuperados por disección cuidadosa del tejido hepático y aquellos presentes en la vesícula biliar (Spithill et al., 2021; Toet et al., 2014). En ese sentido, se detallan los resultados obtenidos en los ensayos correspondientes.

Tabla 5. Recuento de adultos de *F.hepatica* recuperados de hígado y vesícula biliar

| Tratamiento | n | Recuento | Media ±EE | %RCA |
|-----------------------------|----------|-----------------------------------|------------------|-------------|
| Control Infectado (CI) | 9 | 8; 37; 48; 57; 20; 11; 31; 20; 16 | 25.8 ± 6.7 | |
| Adyuvante (AY) | 5 | 57; 30; 31; 32; 17 | 23.7 ± 8.1 | 8.1 |
| sFhKT/CpG-ODN CoaASC16 (V1) | 5 | 14; 18; 13; 15; 18 | 19.2 ± 8.5 | 25.6 |
| sFhKT/CpG-ODN CoaASC16 (V2) | 8 | 17; 0; 12; 0; 4; 27; 9; 24 | 13.0 ± 7.1 | 49.6 |

Tabla 5. CI: control infectado, AY: adyuvante, V1: vacunados fórmula 1, V2: vacunados fórmula 2, n: cantidad de animales por grupo, Media ±EE: medias ajustadas y error estándar por tratamiento, %RCA: = medias de los individuos del grupo control infectados (CI) menos la media de los grupos inmunizados con la vacuna (V1 y V2) dividido por la media del grupo de control infectado (CI) expresado en porcentaje (multiplicado por 100).

De acuerdo a lo observado (Tabla 5) ambas formulaciones de la vacuna experimental producen una reducción en el conteo de adultos, siendo la segunda más efectiva obteniendo una reducción cercana al 50% en el conteo de adultos. Posteriormente al realizar un análisis estadístico de los valores medios según la prueba LSD de Fisher se observa que no existen diferencias significativas entre grupos con un nivel de significación $p < 0.0001$ (Fig.9).

Fig.9 Valores medios de recuento de *F.hepatica*

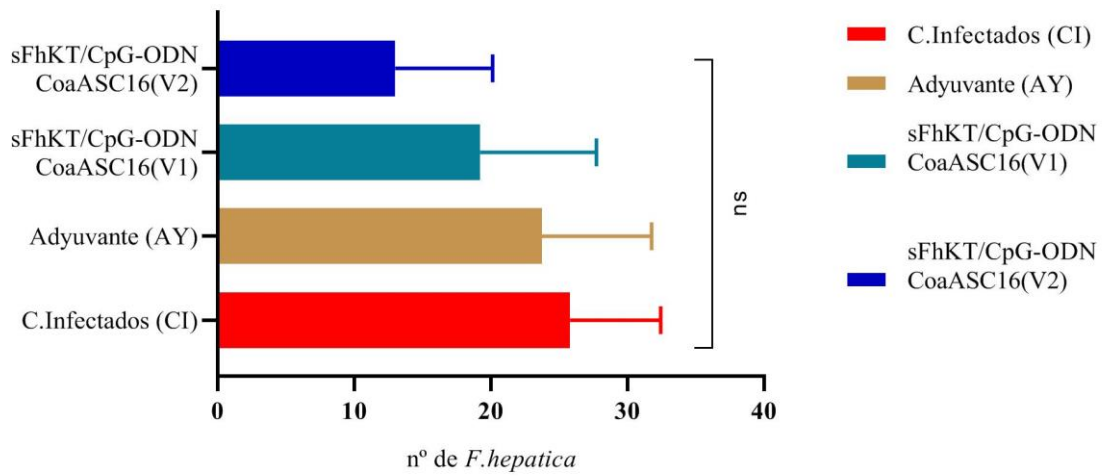


Figura 9. Valores medios de recuento de *F.hepatica*. Comparación de medias según prueba LSD de Fisher $p < 0.0001$ ns: no se observan diferencias significativas

3.3 Reducción en el porcentaje de eclosión de huevos en ovinos vacunados

La viabilidad de los huevos de *F. hepatica* puede ser valorada de acuerdo a su porcentaje de eclosión cuando son sometidos al test de eclosión de huevos (Ceballos et al., 2019). Esto fue realizado en el segundo y tercer ensayo experimental, es decir, con los ovinos que recibieron la segunda formulación de la vacuna (V2) y los grupos CI y AY.

Fig. 10 Eclosión de huevos de *F. hepatica*

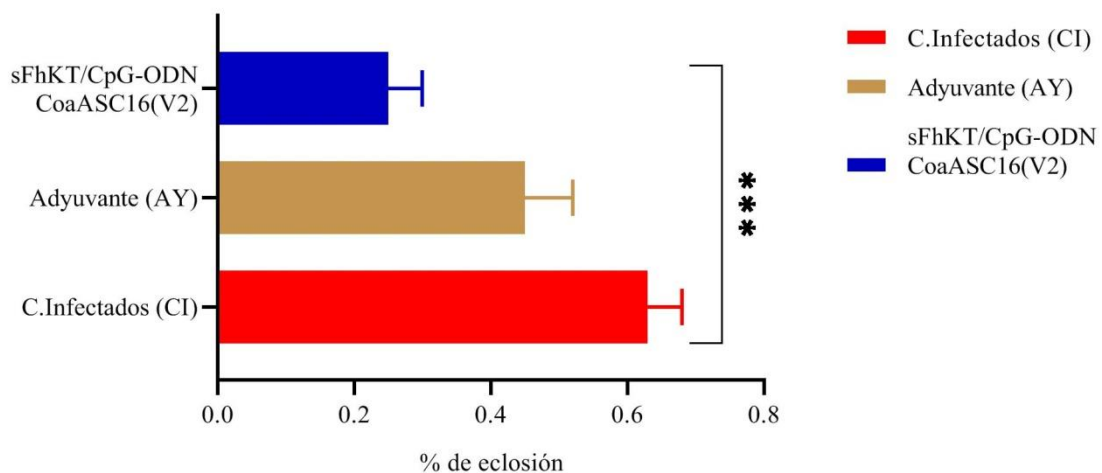


Figura 10. Valores medios de porcentaje de eclosión de huevos. Comparación de medias según prueba LSD de Fisher $p < 0.0001$ *** se observan diferencias significativas

Como puede observarse en la Fig.10 los ovinos que recibieron la segunda formulación de la vacuna mostraron valores significativamente menores que los otros grupos (CI y AY) con un nivel de significación de $p < 0.0001$.

***Objetivo específico:** Valorar el grado de compromiso hepático a partir de determinación de enzimas hepáticas, grado de daño visible macroscópicamente: peso del hígado, coloración, lesiones visibles y a nivel macroscópico a partir de técnicas de histopatológicas: tipo de degeneración celular, presencia de fibrosis, cirrosis.*

3.4 Valoración macroscópica del daño hepático

Para determinar el nivel de daño del tejido hepático a nivel macroscópico se definieron veinticuatro (24) cuadrantes para las dos caras del órgano: visceral y diafragmática (Fig 6C) y se cuantificaron las áreas dañadas en relación al total de cuadrantes. En todos los casos la cara visceral del órgano es la que evidencio mayor lesión visible lo que coincide con la proximidad de la vía de ingreso del parásito. Como se observa en la información resumida (Tabla 7) si bien los individuos de los grupos que recibieron ambas formulaciones de la vacuna (V1 y V2) presentan valores inferiores respecto a CI y AY, estas diferencias no son significativas estadísticamente.

Tabla 6. Extensión del daño macroscópico en hígado

| Tratamiento | n | Cuadrantes con lesión visible/ total de cuadrantes | Media ± EE |
|-----------------------------|----------|---|-------------------|
| Control Infectado (CI) | 9 | 8/24; 9/24; 16/24; 10/24; 6/24; 4/24; 6/24; 8/24; 3/24 | 7.5 ± 1.6 |
| Adyuvante (AY) | 5 | 12/24; 11/24; 3/24; 9/24; 9/24 | 7.2 ± 2.1 |
| sFhKT/CpG-ODN CoaASC16 (V1) | 5 | 6/24; 2/24; 10/24; 4/24; 4/24 | 5.9 ± 2.2 |
| sFhKT/CpG-ODN CoaASC16 (V2) | 8 | 6/24; 0/24; 8/24; 4/24; 7/24; 12/24; 3/24; 9/24 | 6.1 ± 1.7 |

Tabla 6. Tratamiento: distribución de los grupos de acuerdo al tratamiento recibido: CI, AY, V1 y V2 n: n° de animales por grupo. Cuadrantes con lesión: cantidad de cuadrantes sobre el total (x/24) Media ±EE: medias ajustadas por grupo.

3.5 Análisis histopatológico del tejido hepático

La evaluación del daño histológico del hígado se realizó a partir de muestras extraídas de las zonas de lesión visible. Los cambios morfológicos observados responden a procesos de regeneración hepática que intentan recuperar la funcionalidad del órgano o bien a procesos de cicatrización o de limitación de las lesiones (Torbenenson & Washington, 2020; R. Wilson & Williams, 2022; Zhao & Zhang, 2016). Se identificaron patrones de lesiones referidos a: procesos de fibrosis y cirrosis, caracterizados por deposición de colágeno y alteración de la arquitectura del hígado con formación de nódulos regenerativos en el caso de la cirrosis rodeado de tejido fibroso (Fig. 11 A y B) y otros tipos de cambios histológicos tales como la regeneración canalicular, es decir, la formación de pseudocanalículos, presencia de infiltrado inflamatorio por migración de células del sistema inmune al parénquima hepático y la degeneración hidrópica que refiere a un cambio celular caracterizado por la acumulación de vacuolas llenas de líquido dentro de las células, también se detectó la presencia de restos parasitarios en los cortes histológicos (Fig. 11 C, D, E y F).

Con el objetivo de encontrar diferencias de patrones de daño entre los grupos de los ensayos experimentales (CI, AY, V1, V2) se definieron variables descriptoras y grados de presencia/intensidad de cada una, tomando una escala para cada una de ellas

(0-5) y en el caso de cirrosis se identificó como una variable dicotómica (presencia=1, ausencia= 0). Los indicadores utilizados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 7. Indicadores de lesiones hepáticas

| Indicador | Escala e interpretación |
|--------------------------|--|
| Infiltrado inflamatorio | 0-5 (0: ausencia, 5: mayor presencia de células inflamatorias) |
| Degeneración hidrópica | 0-5 (0: ausencia de hepatocitos afectados, 5: gran cantidad de hepatocitos con lesión) |
| Regeneración canalicular | 0-5 (0: ausencia, 5: gran desarrollo de nuevos vasos) |
| Fibrosis | 0-5 (0: ausencia, 5 gran desarrollo de fibras de colágeno) |
| Cirrosis | 0,1 (0: ausencia, 1: presencia) |

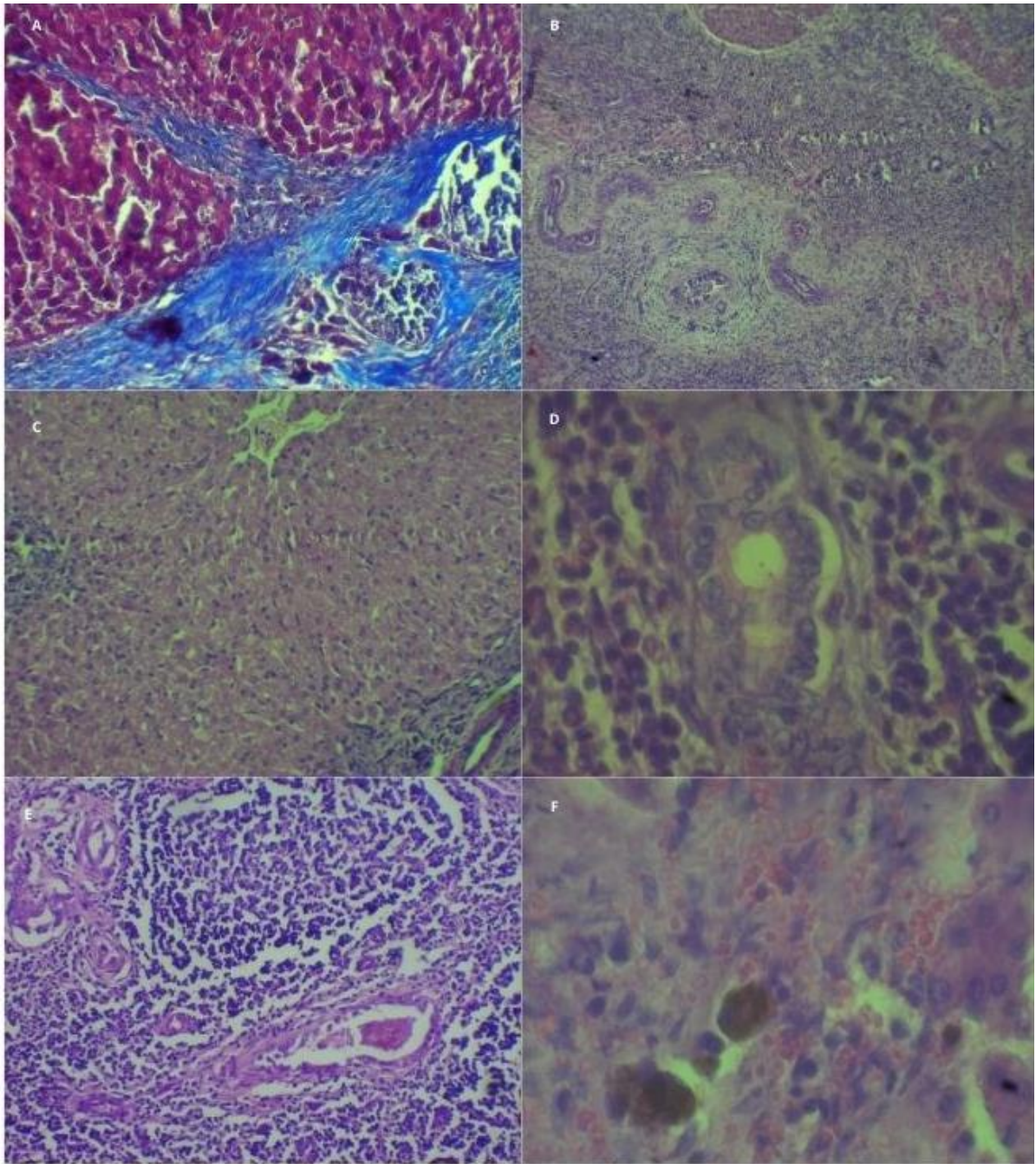
Fig.11

Figura 11. Análisis histopatológico de las lesiones encontradas. (A) Fibrosis, se evidencia en azul el tejido fibrotico, tinción tricromica de Masson, MO 10x (B) Cirrosis, evidencia de nódulo fibrotico, tinción HE, MO 10x (C) Degeneración hidróptica, tumefacción de hepatocitos, tinción HE, MO 10x (D) Regeneración canalicular, formación de pseudocanalículos, tinción HE, MO 40x (E) Infiltrado inflamatorio, tinción HE, MO 10x (F) Restos de *F. hepatica* en canaliculos, tinción HE, MO 40x.

Para poder analizar todos los indicadores en su conjunto se utilizó metodológicamente un análisis multivariado de las observaciones. Este análisis de tipo exploratorio y descriptivo permite identificar grados de relación entre las variables descriptas, se utilizaron dos herramientas gráficas: un perfil multivariado y un biplot de ARM (árbol de recorrido mínimo). De acuerdo a lo observado en el perfil multivariado (Fig. 12) las lesiones referidas a degeneración hidrópica y regeneración canalicular se comportaron de igual manera en todos los grupos de ensayo. En relación al indicador de presencia de infiltrado inflamatorio, se observa que los valores más altos de la escala (4, 5) están más presentes en los grupos de ovinos vacunados (V1 y V2) representando el 80 y el 50% de los casos respectivamente, seguido por el grupo que recibió el adyuvante (AY) con el 40% y por último el grupo de control infectados (CI) con el 33%. Lo contrario ocurre con el desarrollo de fibrosis, siendo más frecuente los valores más altos (4,5) en el grupo CI (40%) y de manera similar se observa en la cirrosis, donde los hígados que mayoritariamente presentan esta lesión corresponden a los del grupo de Control infectados (CI) representando un 80% de los casos.

Fig.12

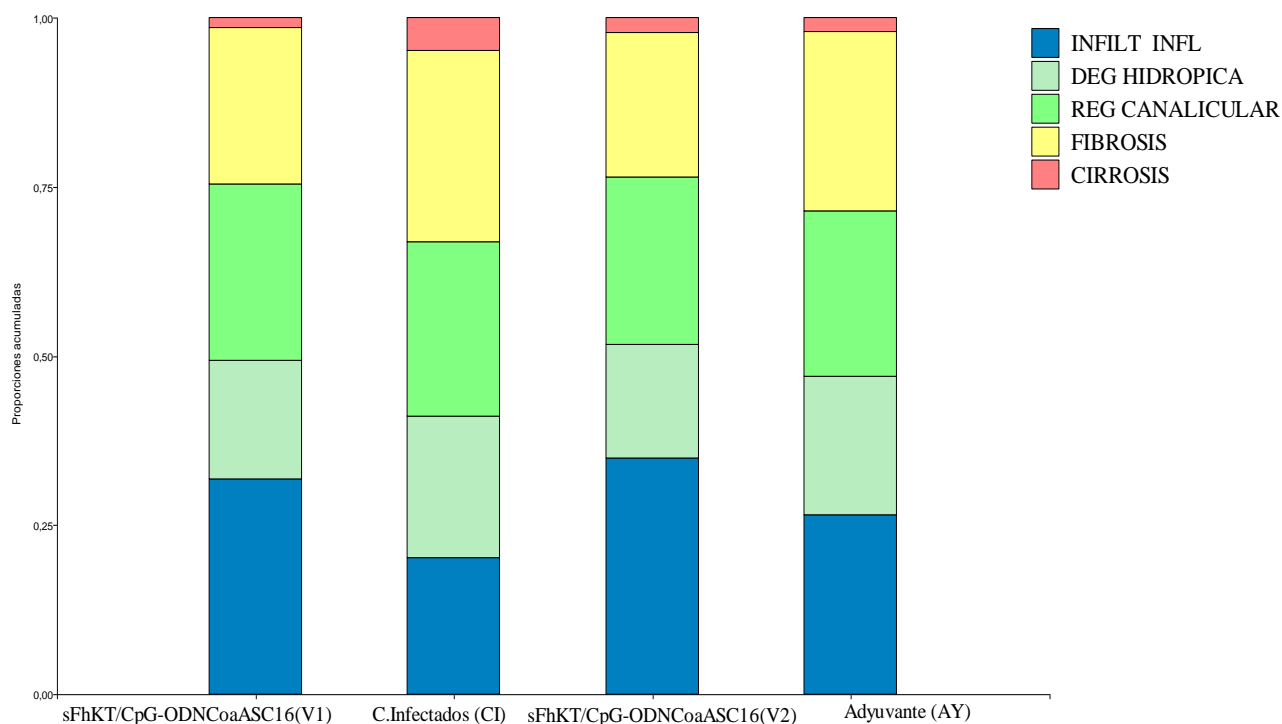


Figura 12. Lesión hepática según grupo. Tipo y desarrollo de lesiones según grupo experimental: CI, AY, V1 y V2 Gráfico de perfil multivariado box-plot, indicando valores medios (.) y EE.

Para identificar relación entre variables y observaciones se construyó un gráfico Biplot y un ARM (árbol de recorrido mínimo) que permite interpretar relaciones entre las mismas. De acuerdo a lo observado (Fig.13) se puede ver una mayor relación de los indicadores regeneración canalicular, fibrosis, degeneración hidrópica y cirrosis entre sí (distancia del ARM) que la evidenciada con el indicador de Infiltrado inflamatorio. Por otro lado, al observar los grupos podemos interpretar por mayor cercanía (distancia del ARM) del grupo C. Infectados (CI) con la lesión cirrótica y una relación más próxima de los grupos V1 y V2 con la lesión inflamatoria.

Fig. 13

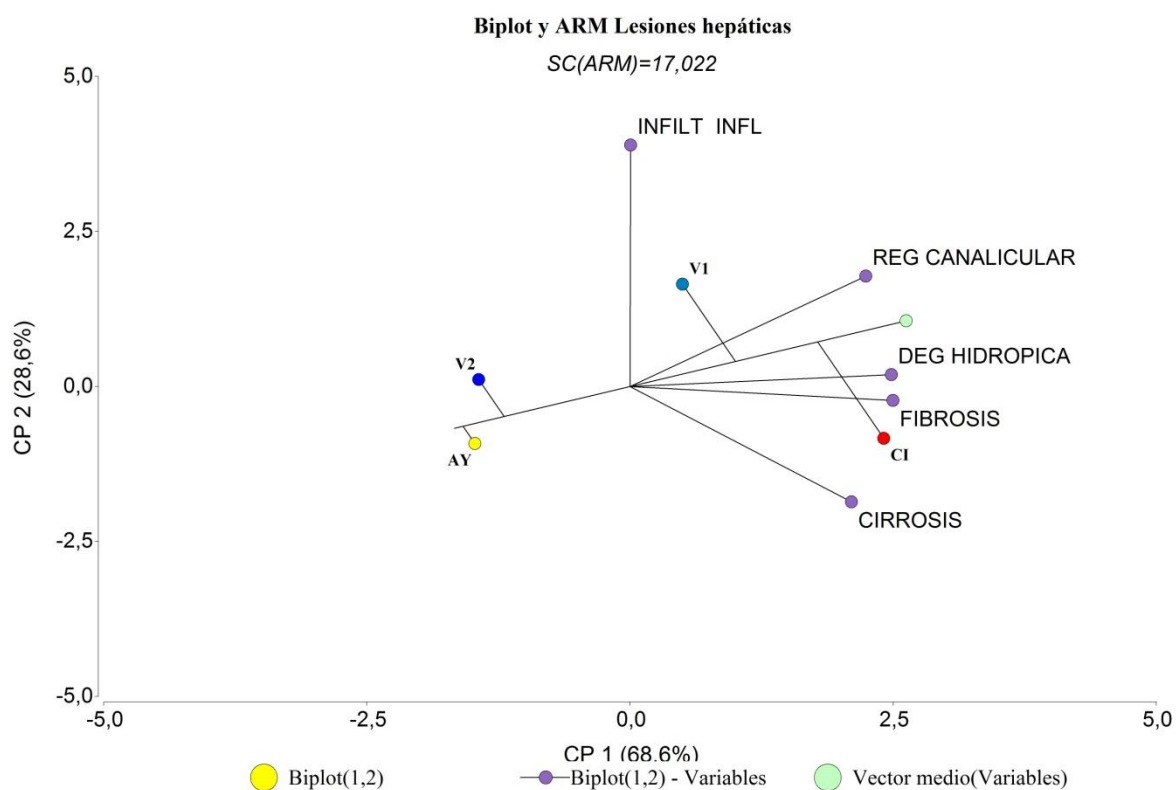


Figura 13. Biplot y ARM Lesiones hepáticas y grupos experimentales. Gráfico de análisis multivariado Biplot y Arbol de recorrido mínimo (ARM) identificando relaciones de proximidad entre indicadores y grupos experimentales: Ovinos inmunizados (V1 y V2), Grupo adyuvante (AY) y Control Infectados (CI).

3.6 Determinación de las enzimas hepáticas en ovinos bajo ensayo

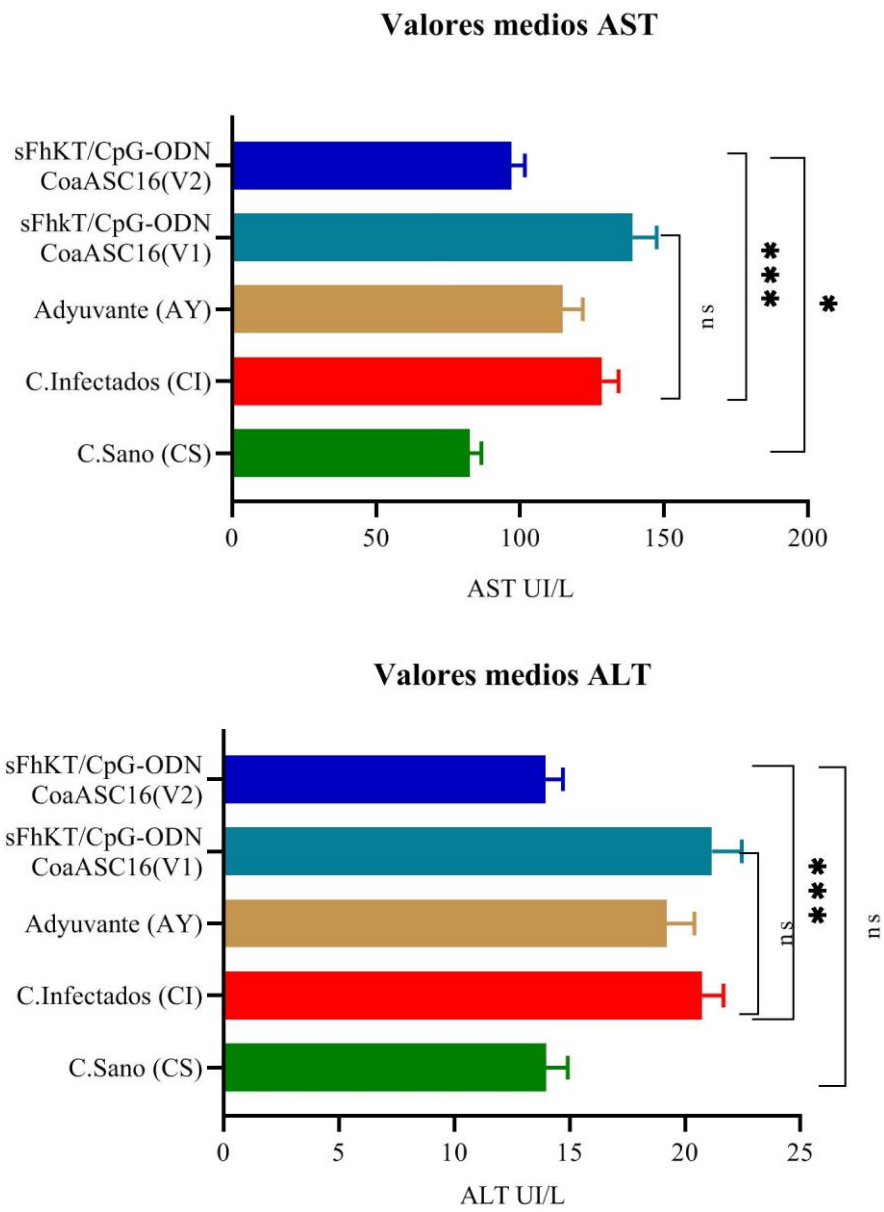
Para estimar el nivel de compromiso hepático durante el ensayo en los grupos experimentales se compararon los niveles séricos de dos enzimas hepáticas: alanina aminotransferasa (ALT) y aspartatoamino transferasa (AST). Estas enzimas son indicadores de lesión de las células hepáticas, de la actividad oxidativa y su incremento está referido en otros estudios de infección con *F. hepatica* (Değer et al., 2008). Las muestras de sangre fueron obtenidas por venopunción de la vena yugular y posteriormente centrifugadas para la separación del suero. Se utilizaron 6 muestreos seriados de cada grupo considerado en los tres (3) ensayos experimentales: control infectados (CI), ovinos inmunizados con las dos formulaciones de la vacuna experimental (V1 y V2) y aquellos que recibieron la formulación del adyuvante (AY) estos grupos se compararon con los ovinos sanos libres de infección (CS).

A partir del análisis de los datos se infiere que los niveles séricos de las enzimas hepáticas (AST y ALT) evidenciaron incrementos a medida que avanzaba el tiempo de infección mostrando los grupos CI y V1 los valores más altos, seguido por el grupo AY y posteriormente el grupo V2 con valores similares al grupo de control sano (Fig.14 B). Los valores incrementados del grupo CI, fueron sustancialmente mayores que el grupo de ovinos sanos, prácticamente duplicando el valor de referencia en la semana 10 pos infección. Al comparar los valores medios de acuerdo a la prueba de Fisher se observa que en relación a la enzima ALT el grupo V2 se diferencia significativamente con los otros grupos infectados experimentales mostrando valores cercanos al grupo CS (Fig.14 A).

Respecto a la enzima AST también se observó un valor medio inferior del grupo V2 respecto a los otros grupos infectados pero se diferencio con un valor mayor respecto al grupo control con un nivel de significancia $p < 0.05$.

Se concluye además que para ambas enzimas no se observaron diferencias significativas entre el grupo CI y el grupo AY.

Fig.14



B

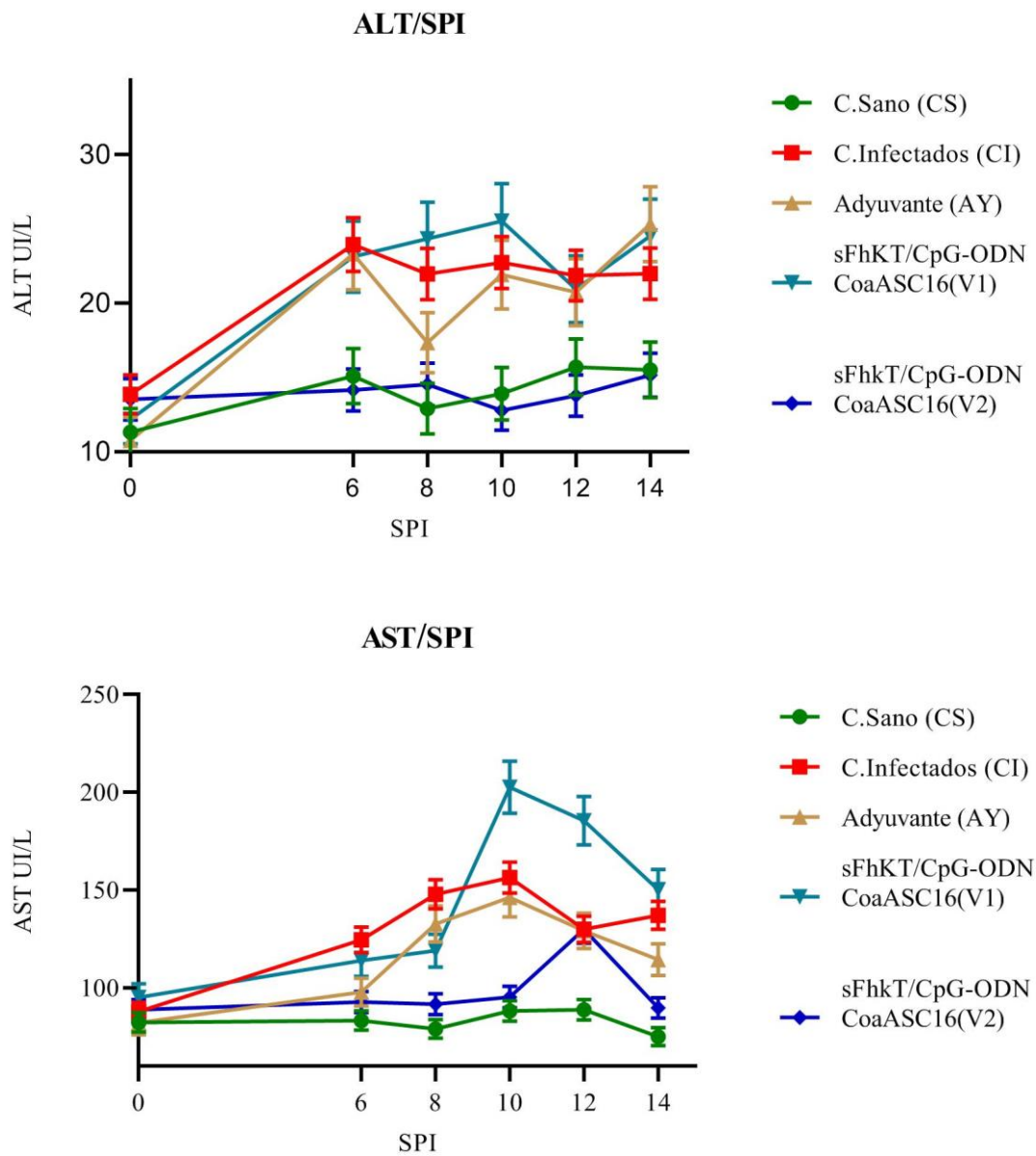


Figura 14. Valores séricos de ALT y AST según grupo experimental y tiempo de infección. (A) Comparación de medias de ALT y AST según prueba LSD de Fisher $p < 0.0001$, ***: diferencia significativa $p < 0.0001$; * diferencia significativa $p < 0.05$, ns: no se observan diferencias significativas. (B) Medias ajustadas de ALT y AST según grupo experimental en función del tiempo de infección SPI: semanas pos infección con 100 metacercarias.

Objetivo específico: *Evaluar la respuesta de anticuerpos presentes en plasma, investigando la producción de los anticuerpos anti FhKT (tipo IgG) en suero de animales inmunizados e infectados.*

3.7 Producción de anticuerpos IgG en ovinos de ensayo

Uno de los resultados más importantes en la producción de vacunas contra *F. hepatica* es la relación entre altos niveles de protección y la presencia de anticuerpos. Se determinaron los títulos de anticuerpos anti sFhKT de tipo IgG en las muestras de sueros, tomando seis diluciones: 2×10^{-3} ; 1×10^{-3} ; 5×10^{-4} ; 2.5×10^{-4} ; 1.25×10^{-4} ; 6.25×10^{-5} de los grupos de control infectado (CI), grupo adyuvante (AY), grupo control sano (CS) y los sueros provenientes de los ovinos que recibieron la segunda formulación del vacuna (V2) debido a sus mejores indicadores de protección (reducción en el conteo de adultos del 49.6%). Los resultados obtenidos a través del análisis de inmunoensayo ELISA se muestran en gráficos (Fig.14 A y B) donde se indican valores de densidades ópticas de los sueros en función del tiempo de infección y la comparación de los valores medios por grupo observados. Se evidenció una mayor respuesta de anticuerpos en la semana 6 pos infección de los ovinos infectados (CI, AY y V2) respecto a la presente en el grupo de control sano (CS), en la semana 8 hay un incremento significativo ($p < 0.0001$) de los títulos de anticuerpos, disminuyen en la semana 10 coincidente con la deposición de huevos de *F.hepatica* en vesícula biliar y luego se evidencia un incremento hacia la semana 14 pos infección. (Fig. 15 A). En la comparación de medias, se observa que los menores valores de IgG corresponden a los sueros de ovinos del grupo de control sano (CS) seguido por aquellos del grupo adyuvante (AY) entre ambos grupos no hay diferencia estadísticamente significativa. Respecto a grupo inmunizado con la segunda formulación (V2) éste demuestra los títulos más altos de anticuerpos, siendo significativamente superiores a los grupos CS y AY, sin embargo, cuando comparamos la respuesta de anticuerpos entre el grupo inmunizado (V2) y el grupo de control infectado (CI) se observa que si bien la respuesta es mayor en los inmunizados la diferencia entre ambos grupos no es estadísticamente significativa. (Fig. 15 B).

Fig 15. Detección de anticuerpos anti IgG específicos de sFhKT

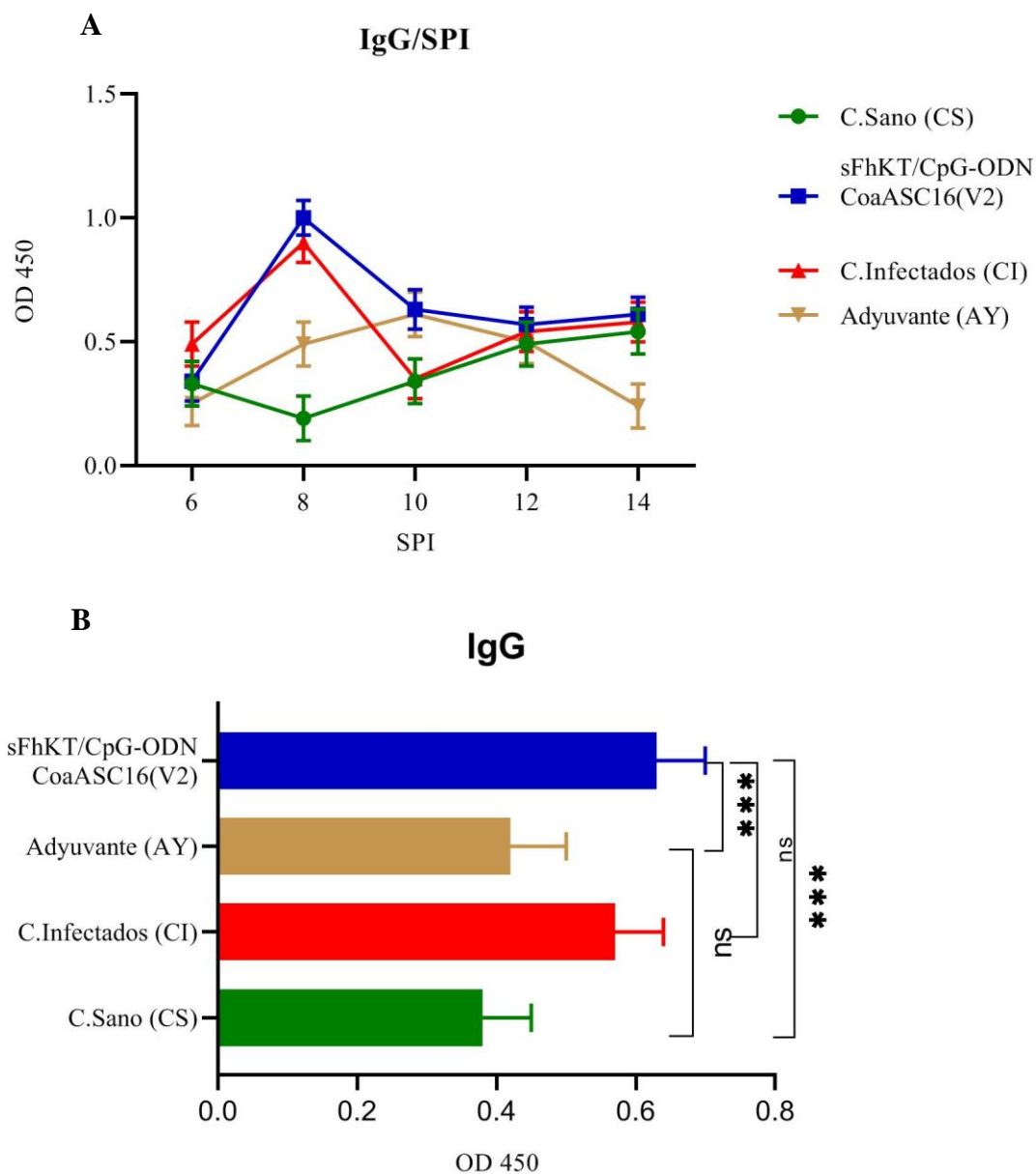


FIGURA 15. Detección de anticuerpos IgG específicos de sFhKT. Anticuerpos IgG en los sueros de ovinos inmunizados mediante ELISA. Se obtuvieron muestras de suero de los ovinos por venopunción de yugular a las 6, 8, 10, 12 y 14 semanas pos infección (SPI) de los grupos CI, V2, CS y AY. (A) Valores medios ajustados de IgG y EE por grupo experimental en relación al tiempo de infección. (B) Comparación de medias de IgG por grupo según prueba LSD de Fisher $p < 0.0001$, ***: diferencia significativa $p < 0.0001$, ns: no se observan diferencias significativas.

Objetivo específico: Determinar la aplicación del péptido Kunitz (FhKT) como diagnóstico temprano de fasciolosis en ovinos.

A partir de los datos obtenidos en los ensayos experimentales donde se evidencia una respuesta inmune en los ovinos infectados con *F.hepatica* mayor respecto a la evidenciada en los ovinos libres de la enfermedad a las seis semanas pos infección se sumó este nuevo objetivo de investigación a los fines de determinar la utilidad de este péptido como una herramienta de diagnóstico temprano. En este objetivo se trabajó en forma conjunta con el equipo del Dr. José Luis Barra del Laboratorio de Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC). El logro de este objetivo incluyó el desafío de los sueros con la proteína sintética kunitz (sFhKT) y con tres proteínas kunitz de síntesis recombinante: FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4 producidas en el CIQUIBIC de la Universidad Nacional de Córdoba. Estos resultados fueron publicados en *International journal of veterinary science and medicine*, 11(1), 126–137. <https://doi.org/10.1080/23144599.2023.2273678>, noviembre de 2023.

3.8 Comparación de la alineación de la secuencia de aminoácidos y el modelado de inhibidores de tipo Kunitz de *F. hepatica*

Se ha identificado un patrón distinto de transcripción de los diferentes genes que codifican las proteínas inhibidoras de Kunitz en *F. hepatica* dependiendo de las etapas del parásito en el huésped (Cwiklinski & Dalton, 2022). En ese sentido se evaluaron FhKT1.1, FhKT1.3 y FhK4, que se expresan en diferentes momentos durante el desarrollo del parásito. Entre el grupo FhKT1, FhKT1.1 se expresa más durante todo el ciclo del parásito, mientras que FhKT1.3 tiene una expresión tardía y FhKT4 una temprana. Estas proteínas presentan diferente especificidad como inhibidoras de proteasas. FhKT1.1 no inhibe las serina proteasas, pero sí inhibe las catepsina L cisteína proteasas. Sin embargo, FhKT1.3 inhibe las cisteína y serina proteasas.

Los alineamientos de secuencia mostraron las diferencias en el residuo en P1 (posición 15), que está relacionado con el perfil inhibidor de FhKT (Fig.16 A, flecha). La estructura secundaria predicha muestra tres enlaces disulfuro (amarillo), una hélice alfa (rosa) y láminas beta antiparalelas (azul) (Fig. 16 B). También se muestra una representación de los residuos ubicados en el pico del bucle reactivo Leu 15, Arg16 y Arg 12 (Fig. 16 B). Considerando que las proteínas FhKT tienen tres puentes disulfuro internos (Fig. 16 A), fueron expresadas como proteínas de fusión en el periplasma de *E. coli* (que es más propicio que el citosol para la formación de puentes disulfuro) fusionadas a una etiqueta

C-terminal más grande con un péptido señal periplásmico en el extremo amino de las proteínas FhKT y una etiqueta His en su extremo carboxilo (Fig. 16 C). Los esquemas de las proteínas de fusión mostraron SP (péptido señal), FhKT (proteína similar a KT de *F. hepatica*), Intein (SspDnaXintein), CBD (dominio de unión a quitina), His-tag (etiqueta de afinidad de polihistidina) y Fpro correspondientes a la proteína de fusión (Intein-CBD-His-tag) se muestra en la Fig. 16 C.

Fig. 16. Alineación de secuencias de aminoácidos y modelado de proteínas FhKT

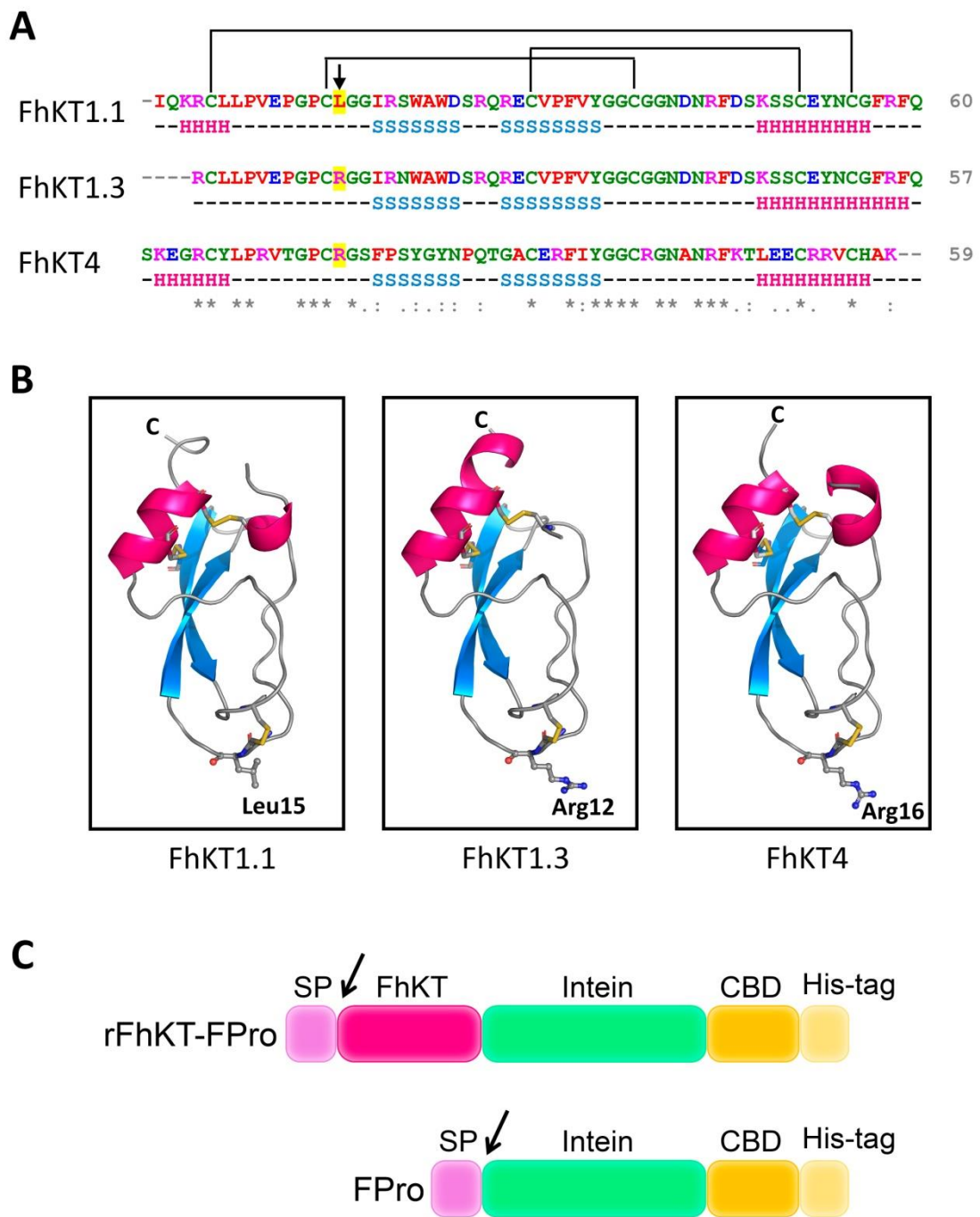


Figura 16. Alineación de secuencias de aminoácidos y modelado de proteínas FhKT. (A) Secuencia de alineación de aminoácidos de miembros pertenecientes a la familia de inhibidores tipo Kunitz de *F. hepatica*. Los aminoácidos conservados se indican con un asterisco (*), la similitud de grupo de aminoácidos fuerte con dos puntos y la similitud de grupo más débil con un solo punto. El código de colores indica los diferentes tipos de aminoácidos según Clustal Omega. El residuo P1 dentro del bucle del sitio reactivo se indica con una flecha. La estructura secundaria prevista (H = hélice, S = hebra) se muestra debajo de las secuencias. Encima de la secuencia, se dibuja el patrón del puente disulfuro. Las líneas que conectan los residuos de cisteína representan los enlaces disulfuro. (B) Representación en cinta de las estructuras FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4 predichas por AlfaFold2. Los residuos del sitio P1 se muestran como bolas y barras y los enlaces disulfuro como barras amarillas. Representación en cinta de las estructuras secundarias FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4 predicho por AlphaFold2. Los tres enlaces disulfuro (amarillo), una hélice alfa (rosa) y se muestran láminas beta antiparalelas (azul). Los residuos del sitio P1 se muestran como bolas y palos. (C) Esquemas de las proteínas de fusión. El pET26 pelB SP N-terminal (péptido señal, 2,23 kDa), el FhKT de interés (proteína similar a KT de *F. hepatica*, FhKT1.1: 6,79 kDa, o FhKT1.3: 6,49 kDa o FhKT4: 6,65 kDa), y se indican la inteína C-terminal (*SspDnaXintein*, 15,44 kDa), CBD (dominio de unión a quitina, 6,61 kDa) y la etiqueta His (etiqueta de afinidad de polihistidina, 1,44 kDa). FPro corresponde a la proteína de fusión (Intein-CBD-Histag). (Ahumada et al, 2023).

En condiciones experimentales, las proteínas recombinantes kunitz (rFhKT) se observaron como una banda proteica principal de aproximadamente 30 kDa (monómero DarFhKT de 7 kDa, DnaX de 15,5 kDa, CBD de 6,6 kDa y conector Histag de 1,4 kDa). (Fig.17)

Fig. 17. Expresión y purificación de proteínas de fusión rFhKT

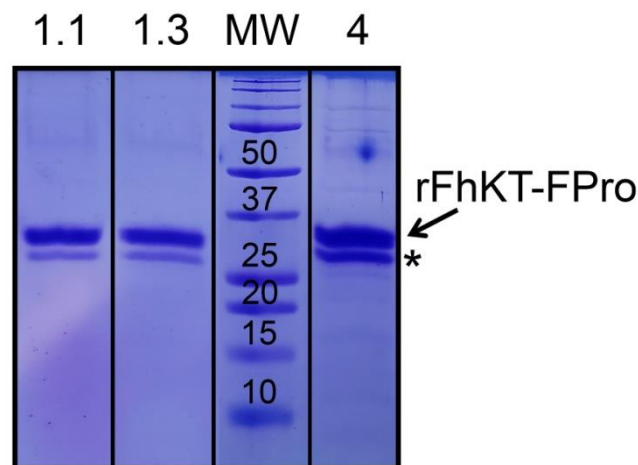


Figura 17. Expresión y purificación de proteínas de fusión rFhKT. Análisis representativo mediante SDS-PAGE de las proteínas de fusión recombinantes expresadas y purificadas de *E. coli* de inhibidores de *F. hepatica* KT, rFhKT1.1 (carril 1.1); rFhKT1.3 (carril 1.3) y rFhKT4 (carril 4). Carril MW: marcadores de peso molecular. Las bandas con un asterisco (*) corresponden a derivados más cortos de las proteínas de fusión rFhKT-FPro, en las cuales la inteína de ADN cortó un pequeño fragmento del extremo N de las proteínas FhKT durante el proceso de expresión y purificación (Ahumada et al, 2023).

3.9 Evaluación de las respuestas de anticuerpos anti sFhKT y anti rFhKT en ovinos infectados experimentalmente con *F. hepatica*.

A fines de determinar la capacidad de las respuestas específicas de anticuerpos IgG para detectar la proteína sintética (sFhKT) y las recombinantes FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4, se evaluaron sueros obtenidos de ovinos del grupo de control infectados (CI) provenientes de los ensayos de vacunación. Se utilizaron los sueros obtenidos en la semana 6 pos infección (6spi) con *F. hepatica*, momento previo al pico de detección de IgG (Fig.15 A). Se compararon los valores de densidad óptica (OD) utilizando sFhKT, así como las tres proteínas recombinantes (FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4) en el suero de ovinos infectados (6spi). Las respuestas de anticuerpos de sueros del grupo CI y ovinos libres de la enfermedad (CS) se muestran en la Figura 18 A. Se comparó la densidad óptica (DO) en seis diluciones de sueros: 2×10^{-3} ; 1×10^{-3} ; 5×10^{-4} ; 2.5×10^{-4} ; 1.25×10^{-4} ; 6.25×10^{-5} . En cuanto a las ovejas infectadas, las respuestas de anticuerpos a sFhKT, FhKT4 y FhKT1.1 fueron más altas a una dilución de 2×10^{-3} . Diluciones menores que 2×10^{-3} no fueron útiles para discriminar la DO entre sueros de diferentes grupos. Los valores más bajos de DO en todas las diluciones se obtuvieron con la proteína de fusión (Fpro) y con los sueros de ovinos del grupo de control sanos CS (Figura 18 A).

Para evaluar el desempeño de sFhKT y las rFhKTs en los sueros del grupo CI, se realizó una comparación de las medias a la dilución más baja, 1:500. FhKT1.1 mostró los valores más altos de DO en comparación con los otros antígenos. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$) (Figura 18 B).

Fig. 18. Respuesta de anticuerpos anti-IgG en ovinos infectados (CI)

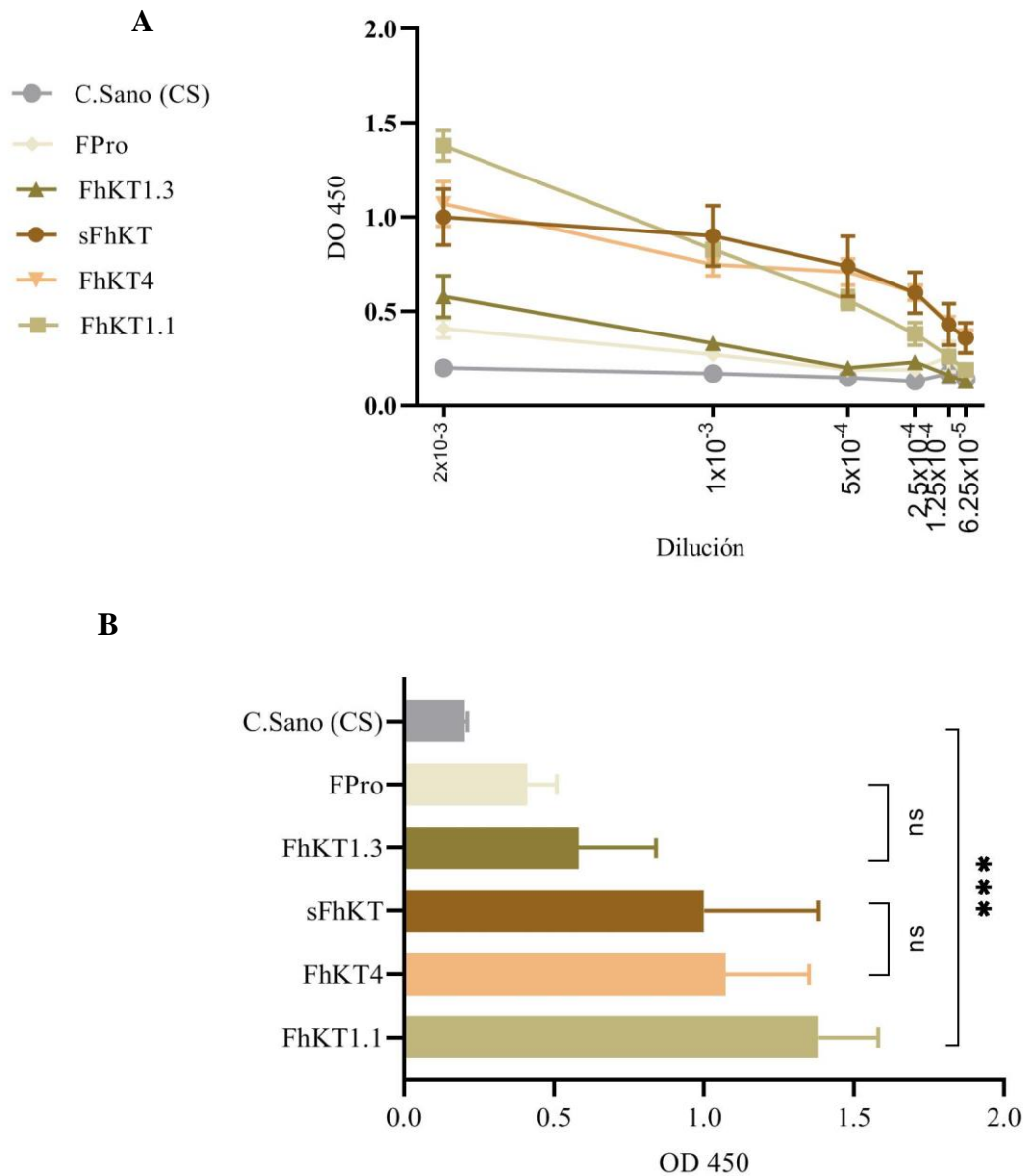


Figura 18. Respuesta de anticuerpos anti-IgG en ovinos infectados (CI) a sFhKT, FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4. (A) Media de los valores de densidad óptica (DO) para anticuerpos totales de IgG a sFhKT y rFhKTs ($n = 6$); Media \pm error estándar de la media (EE) representada en 6 diluciones seriales de sueros: 2×10^{-3} ; 1×10^{-3} ; 5×10^{-4} ; 2.5×10^{-4} ; 1.25×10^{-4} ; 6.25×10^{-5} . (B) Comparación de las medias de OD para la dilución de 2×10^{-3} obtenida para sFhKT y las proteínas recombinantes (rFhKT1.1, rFhKT1.3, rFhKT4) *** indican diferencias estadísticas $p < 0.001$.

Para evaluar la especificidad de las respuestas de IgG a sFhKT, FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4, comparamos los sueros del grupo CI con los del grupo control sanos (CS) y sueros de ovinos con otras parasitosis. Para corroborar la infección de los ovinos con otros parásitos, se realizaron análisis coparásitológicos y se determinó la presencia de

huevos (Nematoda) y/o ooquistes (Coccidia) en las heces de animales naturalmente infectados. Los valores de DO más altos correspondieron a los sueros de ovinos infectados con *F. hepatica* (CI), excepto para el valor obtenido para FhKT1.3 (Tabla 8).

Tabla 8. Valores medios de DO para sFhKT y rFhKT en sueros de ovinos infectados con *F. hepatica* (CI) , grupo control sanos (CS) y ovinos con otras parasitosis.

| | <i>F.hepatica</i> (CI) | C.Sanos (CS) | Coccidia | Nematoda |
|-----------------|------------------------|--------------|-------------|-------------|
| FhKTs | 1.00 ± 0.38 | 0.40 ± 0.23 | 0.27 ± 0.1 | 0.39 ± 0.14 |
| FhKT 1.1 | 1.24 ± 0.23 | 0.53± 0.27 | 0.66 ± 0.11 | 0.79 ± 0.33 |
| FhKT 1.3 | 0.58± 0.26 | 0.49 ± 0.25 | 0.64 ± 0.11 | 0.65 ± 0.20 |
| FhKT 4 | 1.07 ± 0.28 | 0.81± 0.23 | 1.08 ± 0.47 | 0.82 ± 0.28 |

Tabla 8. Valores medios y desvío standard de DO de sueros de ovinos en dilución 1:500: *F. hepatica* (CI) n=6, control sanos (CS) n=5, Coccidia n=3 and Nematoda n=5.

Se analizó además la reactividad cruzada de las respuestas de anticuerpos a sFhKT, FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4 de ovinos infectados con *F. hepatica* (CI) en comparación con sueros de ovinos infectados con otros parásitos. Para su análisis se ajustó un modelo mixto generalizado con un nivel de significación $p < 0.001$. Los resultados obtenidos indicaron que los sueros del grupo CI evidenciaron presencia de anticuerpos reactivos a sFhKT y FhKT1.1, con valores de DO significativamente superiores de los sueros de ovinos sanos (CS) y con otras parasitosis. (Fig. 19).

Fig. 19. Respuestas de anticuerpos de reactividad cruzada a sFhKT, FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4

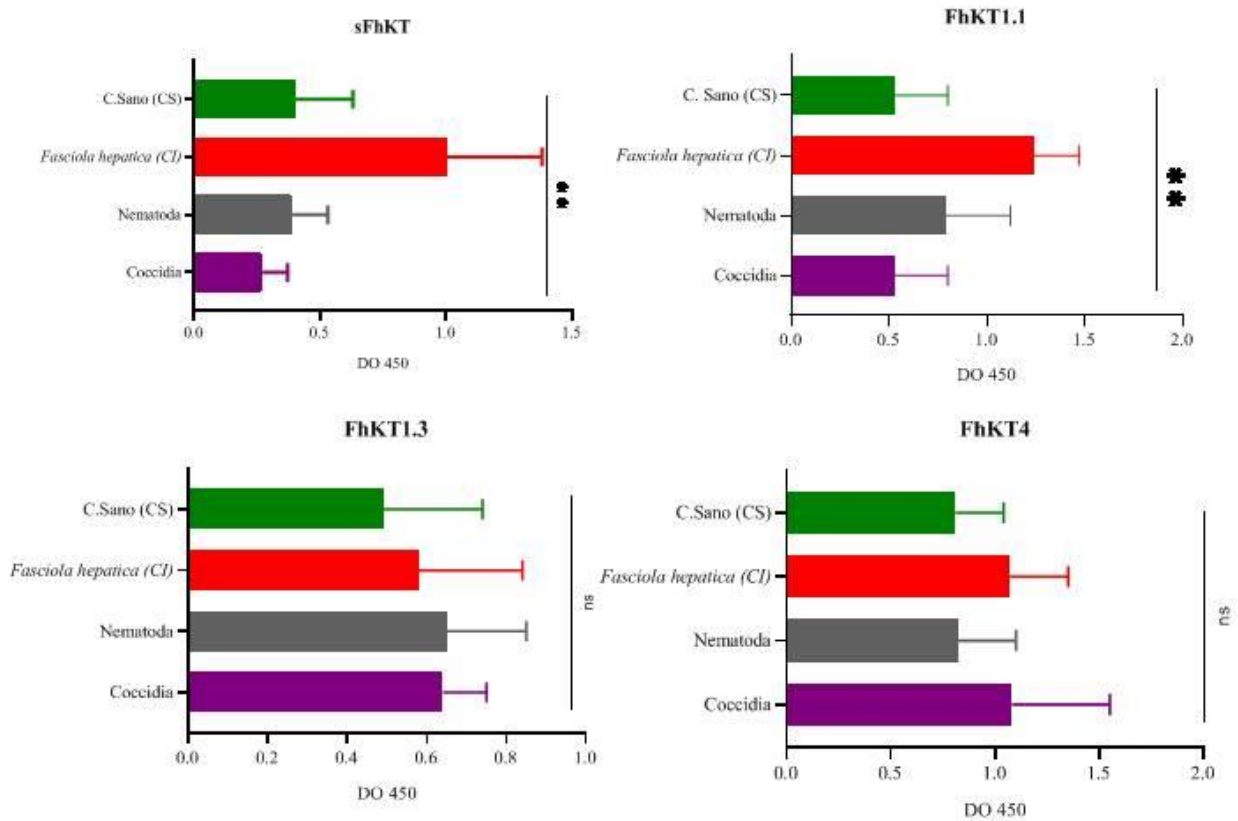


Figura 19. Respuestas de anticuerpos de reactividad cruzada a sFhKT, FhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4 de ovinos infectados con *F. hepatica* (CI) mediante ELISA en comparación con aquellas infectadas con otros parásitos. Diferencias de medias de DO en valores de dilución de suero de 2×10^{-3} utilizando la prueba LSD de Fisher con un valor de $p < 0,001$. ** indican diferencias significativas

Se evaluó la precisión del ensayo diagnóstico utilizando FhKT. La precisión se define como el grado de acuerdo entre la información proporcionada por la prueba diagnóstica evaluada y la proporcionada por la prueba de referencia. La precisión del diagnóstico se puede cuantificar utilizando varios indicadores, incluyendo niveles de sensibilidad y especificidad, prueba de verosimilitud (likelihood ratio), índice Kappa y el valor de área bajo la curva (AUC) de las curvas ROC. Como se observa en la Tabla 10, los parámetros de especificidad y sensibilidad calculados mediante el método de Wilson-Brown mostraron que la mejor combinación para ambos parámetros se obtiene utilizando FhKT1.1 (Se 0.83 y Esp 0.92), seguido por sFhKT, FhKT4 y FhKT1.3.

Se utilizó el índice Kappa para estimar la concordancia entre los resultados obtenidos por el diagnóstico coproparasitológico (estándar de oro) y ELISA utilizando sFhKT y las rFhKT recombinantes (Sim & Wright, 2005). La mayor concordancia (valor de índice Kappa = 0.91) se obtuvo para FhKT1.1, seguido por sFhKT, FhKT4 y FhKT1.3 (Tabla 9).

Se evaluó además la eficacia de la prueba diagnóstica determinando el valor del test de verosimilitud (LR). A medida que LR+ aumenta, la prueba se vuelve más útil para confirmar la presencia de la enfermedad con mayor certeza. De manera similar, un bajo valor negativo (LR-) indica una mejor eficiencia para descartar la enfermedad. La Tabla 10 ilustra que FhKT1.1 logra un equilibrio óptimo, con un alto valor de LR+ y el valor más bajo de LR-, enfatizando su utilidad diagnóstica.

Tabla 9. Precisión del test diagnóstico utilizando FhKT

| | Sensibilidad | Especificidad | +LR | -LR | Id. Kappa | p <0.05 |
|----------------|--------------|---------------|-------|------|-----------|---------|
| sFhKT | 0.67 | 1 | NP | 0.33 | 0.80 | ** |
| FhKT1.1 | 0.83 | 0.92 | 10.38 | 0.18 | 0.91 | ** |
| FhKT1.3 | 0.17 | 1 | NP | 0.83 | 0.28 | NS |
| FhKT4 | 0.33 | 0.92 | 4.1 | 0.73 | 0.49 | NS |

LR: razón de verosimilitud; Id. Kappa : índice kappa; NP: no es posible su cálculo.

Para determinar la capacidad discriminadora de los sFhKT y los rFhKT mediante ELISA se calcularon los valores de corte y el análisis de la curva ROC (Receiver-Operating-Characteristic). El punto de corte entre los grupos para cada sFhKT y rFhKT se estableció como el valor medio más dos desviaciones del suero de control sano (CS) obtenido con cada antígeno (Fig. 20 A). FhKT1.1 obtuvo el valor más alto para resultados verdaderamente positivos (TP), seguido para sFhKT y el valor más bajo para resultados falsos negativos (FN).

El análisis de la curva ROC se utilizó para determinar la precisión diagnóstica de ELISA. El área bajo la curva ROC (AUC), indica qué tan efectiva es la prueba para discriminar ovinos con y sin *F. hepatica* en todo el rango de posibles puntos de corte, mostrando que los valores más altos se obtuvieron para el ELISA utilizando FhKT1.1 y sFhKT (Fig. 20 B).

Fig.20 Capacidad discriminante del diagnóstico de *F. hepatica* en ovinos mediante el uso de FhKT.

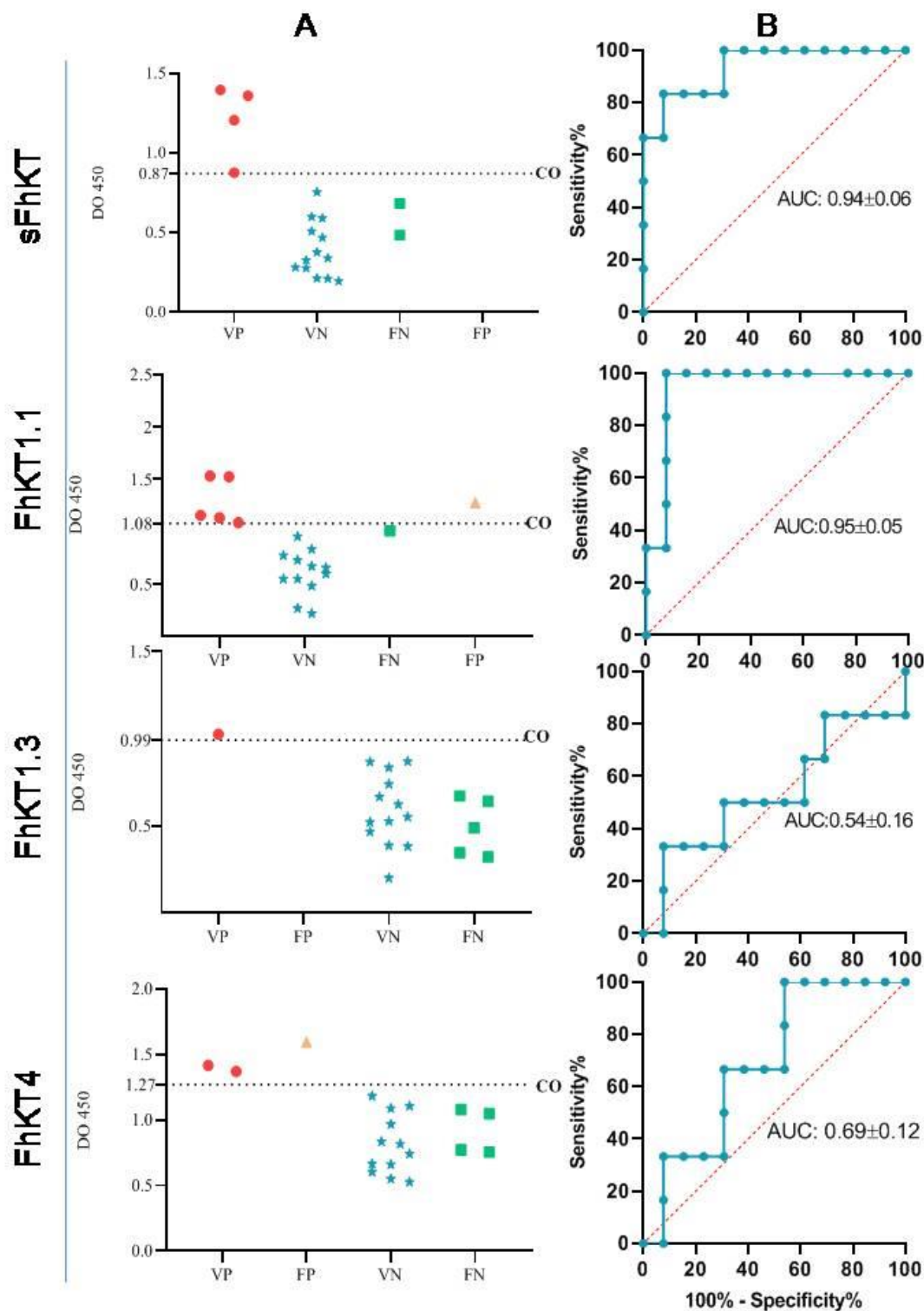


Figura 20. Capacidad discriminante del diagnóstico de *F. hepatica* en ovinos mediante el uso de FhKT. (A) Puntos de corte (CO) para cada FhKT, VP: verdadero positivo; FP: falso positivo; VN: verdadero negativo; FN: falso negativo. (B) Curvas ROC para cada FhKT, utilizando DO en sueros de dilución 2×10^{-3} de *F. hepatica* n=6, Control Sano (CS) n=5, Coccidia n=3 y Nematoda n=5, AUC: área bajo la curva.

Por último se compararon los diferentes kunitz: sintético y recombinantes en cuanto a su capacidad de diferenciar ovinos infectados con *F.hepatica* de aquellos libres de la enfermedad, para lo cual se obtuvo un valor de corte promedio (CO: 1,05 OD) a partir de valores de corte individuales para cada sFhKT o rFhKT (0,87; 1,08; 0,99; 1,27). Los resultados obtenidos, como se muestra en la Figura 19, indican que FhKT1.1 obtuvo un mejor desempeño respecto a los otros.

Fig. 21. Comparación del desempeño de Kunitz sintético (sFhKT) y recombinantes (FhKT1.1, FhKT1.3, FhKT4)

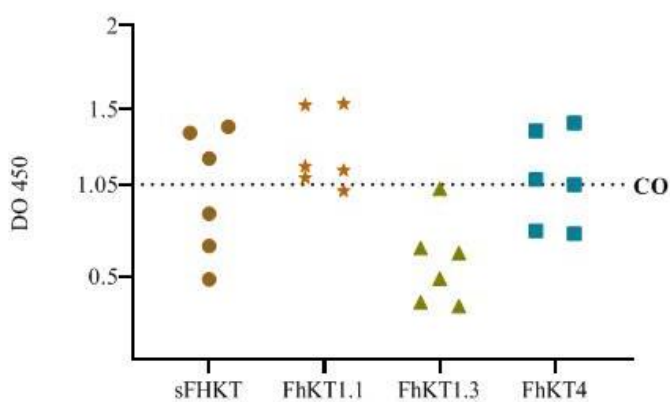


Figura 21. Comparación del desempeño de Kunitz sintético (sFhKT) y recombinantes (FhKT1.1, FhKT1.3, FhKT4) en el diagnóstico de ovinos infectadas con *F. hepatica*. (CO) Valor de corte promedio para cada antígeno (CO: 1,05 DO) obtenido a partir de valores de corte individuales para cada sFhKT o rFhKT (0,87; 1,08; 0,99; 1,27).

IV. DISCUSION

El enfoque de "Una Salud" se refiere a una estrategia integral que reconoce la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental. En este sentido, las actividades colaborativas multidisciplinarias desempeñan un papel fundamental en la prevención y control de enfermedades zoonóticas como la fasciolosis. La vacunación del ganado sería una medida efectiva para reducir la carga de parásitos en los animales, disminuyendo así la transmisión a los seres humanos. Asimismo, la implementación de enfoques mejorados de diagnóstico, como pruebas más sensibles y específicas, facilitaría la detección temprana de la enfermedad tanto en humanos como en animales. Combinado con estrategias de tratamiento efectivas, estos enfoques contribuyen significativamente a la mitigación del riesgo de fascioliasis zoonótica, protegiendo la salud de las poblaciones humanas y animales.

Las infecciones por helmintos son un problema de salud de gran relevancia en los países en vías de desarrollo. Este hecho está vinculado a condiciones socioeconómicas, la dificultad en el acceso al agua, a alimentos seguros, a insuficientes prácticas de higiene y centros de salud remotos, entre otras. Los niños suelen ser la población más afectada por este tipo de patologías causando malnutrición y posterior dificultad en su desarrollo (Almeida et al., 2020). Las consecuencias económicas también son importantes ya que las parasitosis afectan la producción ganadera, disminuyendo los índices productivos e incrementando los costos sanitarios para su control, en ese sentido la OMS incorpora como uno de los objetivos del 2030 el control y la eliminación de estos parásitos, donde se incluye a *F. hepatica*. Según informes de la OPS/OMS a escala mundial se consideran infectados 2.4 millones de personas con esta enfermedad en más de 70 países estando en riesgo de contagio varios millones de personas más, correspondientes a la población rural en contacto con animales infectados (Mas-Coma et al., 2022; Mera y Sierra et al., 2011; Nyindo & Lukumbagire, 2015; Torgerson et al., 2015). Si bien la distribución de la fasciolosis es mundial, los estudios de prevalencia indican que la mayor cantidad de personas infectadas corresponden a Sud América (9%), luego África (4.8%) y Asia (2%). Dentro de Sud América los países andinos Bolivia y Perú son lo más afectados con prevalencias de 21% y 11% respectivamente (Rosas-Hostos Infantes et al., 2023).

Las infecciones por helmintos involucran procesos inmunes complejos que explican la permanencia dentro del hospedador, es por eso que el estudio de las respuestas inmunes y los mecanismos asociados son fundamentales para el desarrollo de

vacunas eficaces. En ese sentido, se ha comprobado que la infección por *F. hepatica* desencadena una respuesta inmunitaria de tipo Th2 que no es suficiente para el control del parásito, pero al mismo tiempo, promueve mecanismos de curación antiinflamatorios, esto facilita el desarrollo de infecciones crónicas por este parásito. Asimismo la especie ovina no presenta resistencia natural innata a *F. hepatica*, solo registrándose en el caso de la raza local indonesia de cola fina resistencia a la infección con la especie *F. gigantica* pero esta no es evidente cuando se la infecta experimentalmente con *F. hepatica* (Hansen et al., 1999; Nasution et al., 2021). Se ha demostrado además en ensayos de respuesta inmune que comparan primoinfecciones con reinfecciones experimentales en ovinos, que la reiterada exposición al parásito no genera protección sino que se establece una respuesta inmunitaria más rápida con un aumento mayor de IL4 y células regulatorias FoxP3 y una disminución más marcada de IFN γ , es decir, la primoinfección se caracteriza por una respuesta mixta inicial Th1/Th2 pero en la reinfección prevalecen las citoquinas antiinflamatorias facilitando la supervivencia del parásito (Pacheco et al., 2017; Ruiz-Campillo et al., 2023). El inicio de la modulación de la respuesta inmune por parte de *F. hepatica* se registra en los primeros días pos infección cuando el parásito (NEJ) atraviesa el peritoneo para llegar al hígado, ahí se evidencia una infiltración de células inmunes y activación de los macrófagos M2 de acuerdo a lo observado en ratones (Guasconi et al., 2012; Ruiz-Campillo et al., 2018). Esto indicaría primeramente el efecto de los PES (productos de excreción y secreción) del parásito en la modulación de la respuesta inmune y en consecuencia su potencialidad como blanco para la acción de vacunas protectivas contra *F. hepatica*. Inicialmente las vacunas utilizaban componentes o subunidades proteicas del parásito resultando dificultosa la obtención de las formulaciones, en ese sentido, la utilización de un péptido sintético ofrece ventajas comparativas: producción simple y de bajo costo, mejor estabilidad que facilita su almacenamiento y al ser de cadenas más cortas menor probabilidad de producir reacciones adversas o de tipo alérgicas (De Brito et al., 2018; Karch & Burkhard, 2016; Malonis et al., 2020). En contraste, las acciones inmunes eficaces para el control de los helmintos en general y de *F. hepatica* en particular son las vinculadas a los mecanismos de inmunidad mediado por anticuerpos debido al gran tamaño de estos parásitos no pueden ser opsonizados por lo cual se requiere la acción de anticuerpos que a través de la porción Fc se unen a células efectoras (eosinófilos, macrófagos, neutrófilos) que liberan componentes activos de oxígeno (H₂O₂) u óxido nítrico (NO) (Gazzinelli-Guimaraes & Nutman, 2018; Motran et al., 2018). Se ha demostrado *in vitro* que la efectividad en la

acción del óxido nítrico para la lisis de las formas juveniles de *F. hepatica*. En ese sentido, una vacuna eficaz debería favorecer una respuesta Th1 que potencie la acción mediada por anticuerpos y de esa manera frenara la migración de las formas juveniles a través del epitelio intestinal.

Desarrollos previos de vacunas contra *F. hepatica* se han focalizado en el uso de catepsina L1, GST (ambas proteasas) y la proteína fijadora de ácidos grasos (FABP) como inmunógeno con eficacias variables valoradas en la reducción del conteo de adultos y en el conteo de huevos (RCH) (Molina-Hernández et al., 2015; Spithill et al., 2021; Toet et al., 2014). Ensayos realizados con estos péptidos nativos de catepsina L1 y L2 indicaron protección del 33% en la especie ovina con disminución en la fertilidad de los huevos de *F. hepatica* de los individuos vacunados que indicarían un efecto importante sobre la transmisión del parásito (Dalton et al., 2013). En ese sentido el objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la eficacia de la vacuna con sFhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 utilizando esas variables como indicadores de protección para poder comparar con la información disponible. Los datos obtenidos en nuestro trabajo indican niveles de protección superiores con una reducción en la segunda formulación de la vacuna del 49.6% en el recuento de adultos recuperados de hígado y vesícula biliar. En un estudio más reciente que utiliza epítopes específicos de catepsina L1, la reducción del conteo de gusanos y los títulos de anticuerpos anti IgG fueron significativamente mayores respecto a los individuos no vacunados mostrando un valor de reducción del 37.3% es decir, un valor inferior al obtenido en este ensayo con sFhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 (Buffoni et al., 2020). Otros ensayos de respuesta a inmunizaciones utilizaron combinaciones de tres antígenos recombinantes en la formulación: catepsina (rFhCl1), molécula de defensa contra helmintos (rHDM), leucina aminopeptidasa (rFhLAP) asociados a dos adyuvantes Montanide y un hidroxigel de aluminio, los resultados obtenidos indicaron una reducción de 28.71% en el conteo de huevos (RCH) y una menor lesión hepática en los individuos del grupo vacunados (Zafra et al., 2021) estos valores también son sensiblemente inferiores a los obtenidos en nuestros ensayos donde la reducción en el conteo de huevos RCH: 81.4% con la segunda formulación de la vacuna utilizando sFhKT.

Las proteínas de tipo Kunitz son un grupo de inhibidores de proteasas ubicuos y se encuentran en artrópodos, helmintos y mamíferos. La especificidad inhibidora del dominio Kunitz varía con los aminoácidos presentes en los sitios reactivos y su función depende del organismo (García-Fernández et al., 2012; Ranasinghe & McManus, 2013).

En los vertebrados, los inhibidores de Kunitz desempeñan un papel importante en los procesos inflamatorios mientras que, en los invertebrados como los escorpiones participan tanto en la actividad neurotóxica como en la inhibidora de proteasas y, en los artrópodos hematófagos, funcionan como agentes anticoagulantes (Mishra, 2020; Paesen et al., 2009). Como se señaló anteriormente las proteínas Kunitz (FhKT) están altamente expresadas en *F. hepatica*, desarrollando funciones vitales durante todo el ciclo de vida del parásito que incluyen su alimentación y la protección a la reacción del huésped mediante la regulación de las principales proteasas de *F. hepatica* y su capacidad para impedir la producción de citoquinas proinflamatorias en las células dendríticas activadas por el LPS, disminuyendo así su potencial para provocar respuestas inflamatorias (Bozas et al., 1995a; de Magalhães et al., 2018; Lalor et al., 2021; Ranasinghe & McManus, 2013; Smith et al., 2016). Además de ser secretada copiosamente por el parásito, se ha demostrado su capacidad para inducir anticuerpos y conferir protección contra la infección experimental con *F. hepatica* en ratones inmunizados con FhKT (Silvane et al., 2020). Sin embargo, estas proteínas aún no han sido evaluadas en las pruebas de diagnóstico de la fasciolosis ovina ni tampoco ensayos referidos a su uso como inmunógeno único en vacunas experimentales en ovinos. Estos descubrimientos indican el papel fundamental que desempeñan las proteínas de Kunitz en la supervivencia y la patogénesis de *F. hepatica* y su presencia en los productos excretores y secretores del parásito sugieren su rol inmunomodulador y su potencial utilización en formulaciones de vacunas.

Al focalizarnos en el uso del péptido kunitz, los antecedentes previos de su uso en ensayos de vacunas en ovinos se refieren solo con formulaciones combinadas con otros inmunógenos. Existen datos disponibles de desempeño de una vacuna formulada a partir de tres estefinas recombinantes (rfhSTF-1, rfhSTF-2 y rfhSTF-3) y un inhibidor de tipo Kunitz (rFHKT1) con Montanide 61VG como adyuvante, según lo que se informa esta vacuna no redujo el conteo de adultos, pero si se observó una reducción en la viabilidad de los mismos (36-42%) y una mejor ganancia de peso en los animales vacunados respecto al grupo control (Cwiklinski et al., 2022) estas diferencias en los valores de ganancia de peso no se presentaron en nuestros ensayos experimentales, donde no se observó diferencias significativas en los ovinos de los grupos bajo experimentación (CS, AY, V1 y V2). Los estudios realizados in silico para predecir los epítomos específicos de las células B y T para la construcción de una vacuna multiepitópica candidata contra

la fasciolosis utilizaron cuatro antígenos excretores y secretores: una proteína tipo Kunitz, la catepsina L1, molécula de defensa contra los helmintos, y la glutatión S-transferasa, Según este estudio, esta vacuna multiepitópica, elaborada con varios antígenos inmunogénicos, demostró altas propiedades inmunológicas, detectando disminución significativa en la viabilidad de los huevos, lo que sugiere que los inhibidores de la peptidasa pueden ser combinaciones vacunales eficaces para el control de fasciolosis en ovinos. Además, los análisis bioinformáticos han diseñado un antígeno que posee numerosos epítopes, incluido el inhibidor de la serina proteasa de tipo Kunitz, lo que indica su potencial como inmunógeno (Akıl et al., 2022) estos datos respaldan nuestros resultados de las formulaciones de las vacunas probadas en los ensayos experimentales donde observamos también una disminución significativa en la viabilidad de los huevos valorada a través del test de eclosión.

En el diseño de una vacuna además del inmunógeno es de gran importancia la elección de un adyuvante ya que modifica directamente la respuesta inmune, el transporte, la disponibilidad del antígeno y su protección contra el ambiente circundante, es decir, interviene sustancialmente en la eficacia de la inmunización (Apostólico et al., 2016).

Se ha demostrado que el uso de CpG-ODN como adyuvante mejora la eficacia de las vacunas contra parásitos en el caso de *Toxoplasma gondii* y *Leishmania*. En estudios previos en ratones el uso de vacunas contra *T. gondii* con CpG-ODN como adyuvante mejoro los índices de protección de la vacuna, con incremento de la respuesta de anticuerpos y células T (Kang et al., 2021). También se evidencio una mejora en la respuesta a la inmunización en vacunas contra *Leishmania* en ratones con un incremento de los títulos de anticuerpos, producción de IFN γ , disminución de IL4, menor presentación de lesiones dérmicas y una menor carga parasitaria (Keshavarzian et al., 2020). Se dispone de referencias del uso de CpG-ODN como adyuvante en vacunas de uso en aves de corral contra patógenos virales y bacterianos: enfermedad de Newcastle, gripe aviar y bursitis infecciosa (Lin et al., 2020). El adyuvante utilizado en la vacuna experimental tiene una presentación en una nanoestructura de cristal líquido asociado a palmitato de ascorbilo lo que presenta ventajas en la protección de las proteínas utilizadas como inmunógeno frente a las condiciones ambientales (luz, calor, acción enzimática) y permite hacer una liberación regulada de los componentes de la vacuna. Esto coincide con lo señalado en trabajos que utilizaron formulaciones nanoparticuladas de CpG evidenciado una mejor respuesta inmunitaria en ratones contra enfermedades infecciosas

y tumorales (Chiodetti et al., 2018; Gupta & Cooper, 2008; Qiao et al., 2022; Sánchez Vallecillo et al., 2014). Las características mencionadas anteriormente se combinaron en la plataforma CPG-ODN/CoA-ASC16. La nanoestructura del CoA-ASC16 posee un cierto nivel de rigidez, lo que le permite regular la liberación de moléculas al entorno biológico o proporcionar estabilidad a las moléculas (Sánchez Vallecillo et al., 2014, 2015b). Asimismo estudios previos *in vitro* demostraron que CoA-ASC16 libera de forma constante las proteínas OVA y CpG-ODN, lo que facilita su absorción simultánea por parte de los CD en los ganglios linfáticos drenantes adyacentes al sitio de inoculación en ratones. El CoA-ASC16 tiene un efecto protector al impedir que la proteasa del antígeno OVA y CpG-ODN degrade los antígenos OVA y CpG-ODN. Resultados previos en ratones utilizando FhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 evidenciaron una respuesta inmunitaria de tipo Th1 con elevada producción de anticuerpos específicos IgG1-IgG2a y alta concentración de IFN- γ y la IL-17A (Silvane et al., 2020). En nuestros ensayos experimentales desarrollados con una formulación similar por limitaciones de recursos analíticos no se pudo valorar la producción de citoquinas que permitiría caracterizar más precisamente el tipo de respuesta inducida.

Sin embargo, al analizar los datos obtenidos en el grupo de ovinos inmunizados únicamente con el ODN-CpG/CoaA ASC16 (AY), podemos observar que este grupo experimental tiene un desempeño intermedio respecto al grupo de C. Infectados (CI). Los valores de enzimas hepáticas son menores al grupo CI obteniendo además un valor levemente inferior en el n° de áreas de daño macroscópico en hígado respecto al grupo no inmunizado. Al referirnos a la producción de huevos, se observó una RCH: 23% y una leve disminución en el conteo de adultos RCA: 8% esto indicaría un efecto del adyuvante si lo comparamos con el grupo no inmunizado (CI) pero estas diferencias no son significativas. Cuando se analiza la producción de IgG podemos observar que inicialmente en la semanas 6 hasta la 10 pos infección los títulos de anticuerpos son mayores que el grupo de control sano (CS) pero luego disminuye a partir de la semana 12. Estos títulos de anticuerpos siempre son inferiores a los grupos CI y V2. Al analizar los valores medios se observa un título mayor en el grupo AY respecto al CS. En definitiva se puede concluir que CpG-ODN/CoA-ASC16 genera una respuesta inmune con bajos niveles de protección frente a *F. hepatica*.

Al analizar el nivel de daño del tejido hepático se evidencio una menor extensión del daño valorado macroscópicamente en los ovinos inmunizados con la vacuna, en los análisis

histológicos de las lesiones se observaron patrones característicos de las lesiones referidas por *F. hepatica* en ovinos infectados naturalmente tales como infiltrado inflamatorio, hiperplasia de los canalículos, agrandamiento de las células de Kupffer, alteración de las células parenquimatosas, presencia de abscesos, diferentes grados de fibrosis y presencia de cirrosis (Ashoor & Wakid, 2023; Pérez-Caballero et al., 2018). En ninguno de los ovinos infectados se observaron lesiones en otros órganos causadas por migración aberrante del parásito. Si bien los tipos de lesiones presentes en los grupos fueron similares, el análisis multivariado permitió identificar patrones diferenciales concluyendo que el grupo C. Infectado (CI) se caracterizaba por mayor desarrollo de lesiones fibróticas y presencia de cirrosis mientras que en los análisis histológico de los ovinos que recibieron ambas formulaciones de la vacuna (V1 y V2) prevalecían la infiltración de células inflamatorias. Esta forma de análisis de los patrones de lesión es novedoso pero si coincidente en la disminución del daño por acción de la vacuna con otros estudios previos (Zafra et al., 2021) y también concuerda la disminución del patrón de lesión de fibrosis en ovinos inmunizados en reportes de investigación usando Catepsina L como inmunógeno (Pacheco et al., 2018).

A partir de los análisis previos y con la evidencia de la respuesta de anticuerpos a sFhKT observada en los individuos infectados experimentalmente se investigó sobre la posibilidad de uso de este péptido sintético y otros de tipo recombinante de producción local como herramientas de diagnóstico de la infección a través de ELISA.

Como se ha mencionado anteriormente, *F. hepatica* es un parásito que libera abundantes productos excretor-secretorios a través de los tejidos de los mamíferos durante su ciclo vital. Entre estos productos se encuentran varias enzimas de la familia de las catepsinas que contribuyen a la digestión de los tejidos. La expresión y secreción de proteasas, como la catepsina L y B, son esenciales para la digestión tanto de la pared intestinal como del tejido hepático por parte del parásito hasta su asentamiento en las vías biliares (Barbour et al., 2021). Para resistir la acción de estas proteasas, se ha postulado que las proteínas de la familia Kunitz son capaces de inhibir la acción tanto de cisteína como de serina proteasas secretadas por el huésped y/o parásito (Cwiklinski & Dalton, 2022; Smith et al., 2016).

En ese sentido, se evaluó el desempeño de la proteína sintética sFhKT y tres proteínas recombinantes (rFhKT1.1, FhKT1.3 y FhKT4) en un test ELISA de diagnóstico para fasciolosis en ovinos. Las tres moléculas inhibitoras de tipo Kunitz se expresaron y

purificaron como una proteína de fusión recombinante en *E. coli*, basándose en un protocolo previamente descrito para la producción de la hormona del crecimiento humano recombinante (rhGH) (Amaranto et al., 2021). La cantidad de proteína recombinante era adecuada para el propósito de recubrir el ELISA. La importancia de lograr una recuperación satisfactoria de las proteínas se ve reforzada por la tendencia a utilizar antígenos recombinantes en lugar de antígenos nativos en los ensayos de inmunodiagnóstico comerciales (Beesley et al., 2018). Esta preferencia se basa en la capacidad de generar antígenos recombinantes de manera consistente y extensa, lo que facilita la fabricación a gran escala. Mediante la utilización de antígenos recombinantes, se garantiza un suministro constante y fiable, algo crucial para mantener la calidad y la reproducibilidad de los ensayos de diagnóstico.

Adicionalmente es conocido que la síntesis en fase sólida, como método de obtención del péptido de Kunitz, es costosa y, a menudo, ineficaz a la hora de producir mayores cantidades. Además, es posible que no sea económicamente viable para la producción en países como Argentina. Según los resultados de ELISA, es evidente que FhKT1.1 fue superior a las otras proteínas recombinantes utilizadas e incluso al sintético sFHKT. Esto no es sorprendente ya que FhKT1.1 es de alta expresión, particularmente en las primeras etapas infecciosas del parásito. Curiosamente, aunque rFhKT1.3, una parte del clado FhKT1, no fue eficaz para la detección de anticuerpos mediante ELISA en ovinos infectados experimentalmente, esto no puede atribuirse a la menor expresión genética de Fhkt1.3, como lo demuestra el análisis que utiliza datos de RNA-Seq que reveló que los tres miembros del clado FhKT1 (Fhkt1.1, 1.2 y 1.3) mostraron una alta expresión en todas las etapas del ciclo dentro del mamífero hospedador (Smith et al., 2016). Además, el análisis proteómico de las secreciones de las formas recientemente desenquistadas (NEJ) identificó péptidos que correspondían a proteínas derivadas de los productos genéticos de FhKT1.1, 1.2 y 1.3. Curiosamente, el análisis de alineación de secuencias de FhKT1.3 revela que la posición P1 (posición 15), ubicada dentro del bucle reactivo de los inhibidores de KT y crítica para unirse e inhibir la proteasa objetivo, está ocupada por una arginina cargada positivamente, en contraste con la residuos de leucina hidrófobos encontrados en FhKT1.1 y FhKT1.2 (Cwiklinski & Dalton, 2022).

Se desconoce si la presencia de leucina en P1 desempeña un papel en el reconocimiento de anticuerpos contra FhKT; sin embargo, FhKT4 tiene arginina en P1 y tuvo un mejor desempeño que FhKT1.3 como antígeno en ELISA, lo que sugiere la irrelevancia del

residuo presente en P1 en FhKT como antígeno diana en ELISA para el diagnóstico serológico de fasciolosis en ovinos. La estructura de la secuencia de aminoácidos afectaría a su capacidad para escindir diferentes proteasas, pero no sabemos si esto influye en su capacidad para ser reconocida por anticuerpos. Sin embargo, las diferencias observadas en las estructuras secundaria y terciaria pueden explicar el comportamiento diferencial en el reconocimiento de anticuerpos, según se observó en los resultados de ELISA.

Es importante destacar que la comparación de los diferentes FhKT como antígenos diana en ELISA utilizando variables de precisión diagnóstica nos permitió concluir que si bien el desempeño de sFhKT fue importante solo el recombinante FhKT1.1 identificó a todos los individuos infectados experimentalmente, superando a los demás (Altman & Bossuyt, 2005; Gonçalves et al., 2014; Rezaei et al., 2022; Sim & Wright, 2005; Tönsing et al., 2023).

En cuanto a la reactividad cruzada, se encontró que FhKT1.1 se desempeñó mejor cuando se desafió con sueros de ovinos parasitados con coccidios o nematodos, patógenos de alta prevalencia en las majadas; sin embargo, se recomienda desafiar con una mayor variedad de sueros, incluyendo ovinos infectados con platelmintos, para proporcionar una comprensión más completa de su especificidad y potencial aplicación en pruebas de diagnóstico o estudios de inmunidad contra *F. hepatica* en ovejas (Mavrot et al., 2015).

Además, la comparación de los valores de DO mediante un análisis de contingencia que permite evaluar el desempeño de todos los antígenos diana en ELISA demuestra que FhKT1.1 es el más eficiente para identificar individuos positivos, mientras que sFhKT identifica el 50% de estos. Estos datos en conjunto validan el uso de FhKT1.1 para el serodiagnóstico de fasciolosis en ovejas en las primeras etapas de la infección, antes de la detección de la enfermedad mediante métodos coparásitológicos.

En definitiva, a pesar de observar una reducción en la carga de adultos en el hígado (RCA) y un mayor infiltrado inflamatorio, la patología de la enfermedad no fue significativamente mitigada, con una progresión similar de la enfermedad, lo que resulta en el daño hepático comparables con los animales de control solo infectados (CI) esto puede ser explicado de diferentes maneras: la protección se produjo después que se hubiera producido daño hepático; la reducción en la cantidad de adultos fue insuficiente para impactar en la reducción de la patología o bien los mecanismos de protección inducidos por la vacuna exacerbaron los procesos de daño tisular.

Si bien se ha comprobado el desarrollo de respuesta inmune inducida por vacunas contra *F. hepatica* en ovinos (Toet et al., 2014), los mecanismos exactos de eliminación de los parásitos que confieren protección no han sido identificados aún. En otros hospedadores, una respuesta inflamatoria temprana y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) con la participación de macrófagos y/o eosinófilos ha sido eficaz (Jmel et al., 2023) contra la forma juvenil (Piedrafita et al., 2007; Sulaiman et al., 2016; Van Milligen et al., 1999). Es decir, aunque el mecanismo efector en ovinos no se ha determinado aun, una respuesta Th1 temprana se considera asociada a la protección y explicaría la eficacia de las vacunas evaluadas (Pleasance et al., 2011; Ruiz-Campillo et al., 2018, 2023)

Finalmente los resultados obtenidos a partir del ensayo de inmunización en ovinos con FhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 indican que una respuesta de anticuerpos contra la infección experimental de *F. hepatica*, es probablemente capaz de atacar al parásito, en conjunto con la respuesta celular volviéndolo más vulnerable y disminuyendo su capacidad de evadir y modular la respuesta inmune del hospedador (Norbury et al., 2018), esto traería como consecuencia una disminución en la producción de huevos y afectando la viabilidad de los mismos. Aún no se ha determinado si los anticuerpos tienen la capacidad de dañar los huevos excretados por el parásito o qué parte específica del sistema reproductivo, como las células vitelinas, se ve afectada. Los hallazgos anteriores han analizado el efecto antifecundación/antiembrionación observado en las vacunas dirigidas a *F. hepatica*, formuladas con catepsina como inmunógeno (Alcala-Canto et al., 2007; Dalton et al., 1996; Wijffels et al., 1994). Se ha sugerido que estos efectos podrían atribuirse a una inhibición directa de las proteínas implicadas en la producción de huevos o a un retraso indirecto en el desarrollo de los parásitos, por dificultades en su capacidad de alimentación (Jmel et al., 2023). Este aspecto es crucial para la propagación del parásito y, si se combina con la reducción de adultos observada, la vacuna propuesta podría resultar eficaz para controlar las tasas de transmisión del parásito. En el mismo sentido, la respuesta de anticuerpos si bien puede considerarse insuficiente para detener la migración del parásito, permitiría la utilización de FhKT y la forma recombinante FhKT1.1 como elementos de diagnóstico temprano de la enfermedad, lo que colaboraría en el control de *F. hepatica* y en el uso preciso de medicamentos antiparasitarios.

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La fasciolosis es una enfermedad cosmopolita con impacto en la economía y en la salud animal y humana. De acuerdo a los informes de FAO, el 60% de las enfermedades infecciosas que afectan a la población humana son zoonosis y más del 75% es transmisible entre especies. En el año 2019, los estados miembros de la Organización Panamericana para la Salud (OPS) aprobaron la Iniciativa para la Eliminación de Enfermedades, comprometiéndose a eliminar más de 30 enfermedades transmisibles para el 2030 donde se incluye a *F. hepatica* (OMS A72/11 Rev.1,2019). Para el alcance de este objetivo se propone como enfoque eficaz el de “Una Salud” que permite de manera integral e interdisciplinaria considerar los determinantes ambientales, la salud humana y la salud animal como un todo indisoluble. Una de las acciones prioritarias es el control

de la resistencia a los antiparasitarios y antimicrobianos, con recomendaciones de un uso controlado de los fármacos, formas integradas de control como el pastoreo selectivo o multiespecífico, la utilización de genotipos resistentes y la búsqueda de vacunas antiparasitarias eficaces. En ese sentido se enmarca el trabajo desarrollado, evaluar una vacuna experimental sFhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 contra *F.hepatica* en ovinos, especie altamente susceptible, con antecedentes de éxito en ratones. A partir de los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- La aplicación de la vacuna experimental sFhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 no provocó en ningún individuo bajo ensayo reacción anafiláctica ni tampoco reacción adversa alguna en el sitio de inoculación,
- La vacuna experimental sFhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 indujo una reducción en el conteo de huevos (RCH) del 16.6 y del 81.4% en sus dos formulaciones respectivamente,
- La vacuna experimental FhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 provocó una reducción en el conteo de adultos (RCA) del 25.6 y 49.6% en sus dos formulaciones respectivamente,
- Los ovinos que recibieron la vacuna experimental FhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentaron una extensión de daño a nivel hepático levemente menor que los no vacunados y sus lesiones a nivel histológico se caracterizan por mayor presencia de infiltrado inflamatorio,
- Los sueros de los animales que recibieron la segunda formulación de la vacuna experimental sFhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 mantuvieron niveles de AST y ALT cercanos al grupo control sano (CS),
- La vacuna experimental sFhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 afectó la viabilidad de los huevos, disminuyendo un 50% su eclosión en relación al grupo no inmunizado,
- La vacuna experimental sFhKT/CpG-ODN/Coa-ASC16 indujo respuesta de anticuerpos IgG con títulos mayores en los ovinos inmunizados respecto a los que no recibieron la vacuna, sin embargo la diferencia no es significativa estadísticamente,
- La proteína sFhKT y el recombinante FhKT1.1 son útiles para el diagnóstico temprano de fasciolosis ovina, siendo el recombinante de mayor especificidad y sensibilidad,

- La variación en la eficacia observada entre el ensayo con la formulación primera y la evidenciada en los animales inmunizados con la segunda formulación indican una respuesta positiva a la dosis de sFhKT utilizada y sugeriría la posibilidad de nuevos ensayos con dosis superiores de esta proteína.

Nuevamente desde una visión integral de “Una Salud” se debe considerar la fasciolosis como un problema multidimensional:

- Ambiental: se debe contemplar que el contexto de cambio climático favorece la propagación de fasciolosis debido a modificaciones en los ambientes naturales con un aumento en la dispersión de su huésped intermediario (Rojo-Vázquez et al., 2012; Stuen & Ersdal, 2022)
- Salud animal: el uso reiterado de antiparasitarios induce resistencia y esto ha sido evidenciado con *Fasciola hepatica* no siendo suficiente el conocimiento disponible sobre el mecanismo que la induce (Anziani et al., 2014; M. P. Larroza et al., 2023; Olaechea et al., 2011)
- Salud humana: la incidencia de esta enfermedad es importante sobre todo en Latinoamérica, afectando a la población rural, sistemas campesinos de baja incorporación tecnológica y con centros de salud asistenciales remotos.

En este escenario, la posibilidad de una vacuna que reduzca el impacto y la propagación de la enfermedad a través de una reducción de los huevos y su viabilidad en un huésped definitivo de alta susceptibilidad como los ovinos adquiere gran relevancia. Se considera que el umbral necesario de efectividad de una vacuna para ser comercialmente viable debe ser superior al 70% de eficacia. Ahora bien, considerando las dificultades en el desarrollo de inmunidad contra *F. hepatica* en ovinos, ¿cuál sería la reducción de adultos (RCA) obtenida que justificaría la inversión en la vacunación por parte del sistema productivo? Algunos autores, tales como Spithill et al., 2021 consideran que la respuesta debiera buscarse en la ecuación económica que contabilice los costos de uso de antiparasitarios y las pérdidas asociadas a la enfermedad, es decir, que el uso de la vacuna con los costos asociados, incremente la productividad en la majada para justificar su uso. Sin embargo este criterio no considera que la utilización de una vacuna con una efectividad menor (50%) podría no sólo disminuir pérdidas productivas sino disminuir la contaminación de los campos y reducir el riesgo de infección de las familias productoras que allí

habitan. En ese sentido y retomando el enfoque “Una Salud”, el control de la enfermedad en nuestros sistemas productivos extensivos, podría incluir el uso adecuado de medicamentos antiparasitarios de eficacia comprobada, planificación del pastoreo y utilización de vacunas de moderada eficacia que reduzcan progresivamente la contaminación de las pasturas.

Para poder lograr este objetivo, se requieren nuevos estudios que profundicen sobre los mecanismos de acción de FhKT sobre el parásito que impactan en la disminución de su fertilidad, también es necesario replicar ensayos con un mayor número de animales y en condiciones de infección natural para poder determinar con mayor certeza la eficacia de esta vacuna experimental. De igual manera, estos resultados generan nuevas líneas de trabajo que posibiliten el desarrollo de herramientas diagnósticas tempranas y accesibles que distingan respuestas tempranas de anticuerpos con aquellas posiblemente presentes en individuos infectados y tratados.

Por último, la capacidad demostrada del recombinante FhKT1.1 y la posibilidad de su síntesis local permitirían el desarrollo de nuevos ensayos vacunales con la utilización de esta proteína como inmunógeno, disminuyendo sensiblemente los costos de elaboración de la vacuna y acercarnos al objetivo mayor de desarrollar una vacuna eficaz y asequible para ovinos contra *F. hepatica*.

VI. BIBLIOGRAFIA

Abdala, A. M., Cabrera, F. R., Chodilef, M. M., Herrera, R., Martínez, A., Olaechea, F., ... & Zabaleta, G. (2022). *El SIRSA en la Patagonia: Principales enfermedades diagnosticadas en los últimos 10 años (2011-2021)*. EEA Bariloche, INTA.

Agatsuma, T., Arakawa, Y., Iwagami, M., Honzako, Y., Cahyaningsih, U., Kang, S. Y., & Hong, S. J. (2000). Molecular evidence of natural hybridization between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Parasitology international*, 49(3), 231–238. [https://doi.org/10.1016/s1383-5769\(00\)00051-9](https://doi.org/10.1016/s1383-5769(00)00051-9)

Akil, M., Aykur, M., Karakavuk, M., Can, H., & Döşkaya, M. (2022). Construction of a multiepitope vaccine candidate against *Fasciola hepatica*: an *in silico* design using various immunogenic excretory/secretory antigens. *Expert review of vaccines*, 21(7), 993–1006. <https://doi.org/10.1080/14760584.2022.1996233>

Alcala-Canto, Y., Ibarra-Velarde, F., Sumano-Lopez, H., Gracia-Mora, J., & Alberti-Navarro, A. (2007). Effect of a cysteine protease inhibitor on *Fasciola hepatica* (liver fluke) fecundity, egg viability, parasite burden, and size in experimentally infected sheep. *Parasitology research*, 100(3), 461–465. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0308-7>

Aldridge, A., & O'Neill, S. M. (2016). *Fasciola hepatica* tegumental antigens induce anergic-like T cells via dendritic cells in a mannose receptor-dependent manner. *European journal of immunology*, 46(5), 1180–1192. <https://doi.org/10.1002/eji.201545905>

Alignani, D., Maletto, B., Liscovsky, M., Rópolo, A., Morón, G., & Pistoiresi-Palencia, M. C. (2005). Orally administered OVA/CpG-ODN induces specific mucosal and systemic immune response in young and aged mice. *Journal of leukocyte biology*, 77(6), 898–905. <https://doi.org/10.1189/jlb.0604330>

Almeida, M. M., Monteiro, K. J. L., Bacelar, P. A. A., Santos, J. P. D., Freitas, S. P. C., Evangelista, B. B. C., Leal, D. N., Silva, D. A. E., Cardoso, A. B., Nascimento, E. F. D., Moraes Neto, A. H. A., & Carvalho-Costa, F. A. (2020). Interactions between malnutrition, soil-transmitted helminthiasis and poverty among children living in periurban communities in Maranhao State, Northeastern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 62, e73. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062073>

Altman, D. G., & Bossuyt, P. M. M. (2005). Estudios de precisión diagnóstica (STARD) y pronóstica (REMARK). *Medicina Clínica*, 125, 49-55. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(05\)72210-7](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(05)72210-7)

Amaranto, M., Vaccarello, P., Correa, E. M. E., Barra, J. L., & Godino, A. (2021). Novel intein-based self-cleaving affinity tag for recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 332, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.04.003>

Andrews, S. J., Cwiklinski, K., & Dalton, J. P. (2021). The discovery of *Fasciola hepatica* and its life cycle. *Fasciolosis*, 1-22. <https://doi.org/10.1079/9781789246162.0001>

Anziani, O. S., Caffè, G., Cooper, L. G., Cerutti, J., Cervilla, N., Muchiut, S., & Mier, A. E. (2014). Resistencia a los antihelmínticos. La necesidad de desarrollar tecnologías innovativas y sustentables para limitar su expansión y mantener la productividad, la salud y el bienestar animal. <http://pa.bibdigital.ucc.edu.ar/id/eprint/163>

Apostólico, J.deS., Lunardelli, V. A., Coirada, F. C., Boscardin, S. B., & Rosa, D. S. (2016). Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *Journal of immunology research*, 2016, 1459394. <https://doi.org/10.1155/2016/1459394>

Apt, W., Aguilera, X., Vega, F., Alcaíno, H., Zulantay, I., Apt, P., González, V., Retamal, C., Rodríguez, J., & Sandoval, J. (1993). Prevalencia de fascioliasis en humanos, caballos, cerdos y conejos silvestres, en tres provincias de Chile. *Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*;115(5),Nov. 1993. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/16292>

Ashoor, S. J., & Wakid, M. H. (2023). Prevalence and hepatic histopathological findings of fascioliasis in sheep slaughtered in Jeddah, Saudi Arabia. *Scientific reports*, 13(1), 6609. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33927-0>

Barbour, T., Cwiklinski, K., Lalor, R., Dalton, J. P., & De Marco Verissimo, C. (2021). The Zoonotic Helminth Parasite *Fasciola hepatica*: Virulence-Associated Cathepsin B and Cathepsin L Cysteine Peptidases Secreted by Infective Newly Excysted Juveniles (NEJ). *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(12), 3495. <https://doi.org/10.3390/ani11123495>

Becerro-Recio, D., Serrat, J., López-García, M., Molina-Hernández, V., Pérez-Arévalo, J., Martínez-Moreno, Á., Sotillo, J., Simón, F., González-Miguel, J., & Siles-Lucas, M.

(2022). Study of the migration of *Fasciola hepatica* juveniles across the intestinal barrier of the host by quantitative proteomics in an ex vivo model. *PLoS neglected tropical diseases*, 16(9), e0010766. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010766>

Beesley, N. J., Caminade, C., Charlier, J., Flynn, R. J., Hodgkinson, J. E., Martinez-Moreno, A., Martinez-Valladares, M., Perez, J., Rinaldi, L., & Williams, D. J. L. (2018). *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transboundary and emerging diseases*, 65 Suppl 1(Suppl 1), 199–216. <https://doi.org/10.1111/tbed.12682>

Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., & Van Wyk, J. A. (2016). Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Advances in parasitology*, 93, 181–238. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.024>

Bongiorno, G., Paparcone, R., Foglia Manzillo, V., Oliva, G., Cuisinier, A. M., & Gradoni, L. (2013). Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in Phlebotomus perniciosus fed on Leishmania infantum infected dogs--a preliminary xenodiagnosis study. *Veterinary parasitology*, 197(3-4), 691–695. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.008>

Bozas, S. E., Panaccio, M., Creaney, J., Dosen, M., Parsons, J. C., Vlasuk, G. V., Walker, I. D., & Spithill, T. W. (1995). Characterisation of a novel Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 74(1), 19–29. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)02478-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)02478-6)

Buffoni, L., Garza-Cuartero, L., Pérez-Caballero, R., Zafra, R., Javier Martínez-Moreno, F., Molina-Hernández, V., Pérez, J., Martínez-Moreno, Á., & Mulcahy, G. (2020). Identification of protective peptides of *Fasciola hepatica*-derived cathepsin L1 (FhCL1) in vaccinated sheep by a linear B-cell epitope mapping approach. *Parasites & vectors*, 13(1), 390. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04260-6>

Campbell J. D. (2017). Development of the CpG Adjuvant 1018: A Case Study. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1494, 15–27. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6445-1_2

Carnevale, S., Malandrini, J. B., Pantano, M. L., Sawicki, M., Soria, C. C., Kuo, L. H., Kamenetzky, L., Astudillo, O. G., & Velásquez, J. N. (2016). *Fasciola hepatica* infection in humans: overcoming problems for the diagnosis. *Acta parasitologica*, 61(4), 776–783. <https://doi.org/10.1515/ap-2016-0107>

Carmona, C., & Tort, J. F. (2017). Fasciolosis in South America: epidemiology and control challenges. *Journal of helminthology*, 91(2), 99–109. <https://doi.org/10.1017/S0022149X16000560>

Carranza, F., Falcón, C. R., Nuñez, N., Knubel, C., Correa, S. G., Bianco, I., Maccioni, M., Fretes, R., Triquell, M. F., Motrán, C. C., & Cervi, L. (2012). Helminth antigens enable CpG-activated dendritic cells to inhibit the symptoms of collagen-induced arthritis through Foxp3+ regulatory T cells. *PloS one*, 7(7), e40356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040356>

Ceballos, L., Canton, C., Pruzzo, C., Sanabria, R., Moreno, L., Sanchis, J., Suarez, G., Ortiz, P., Fairweather, I., Lanusse, C., Alvarez, L., & Martinez-Valladares, M. (2019). The egg hatch test: A useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola*

hepatica. *Veterinary parasitology*, 271, 7–13.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.001>

Chiodetti AL, Sánchez Vallecillo MF, Dolina JS, Crespo MI, Marin C, Schoenberger SP, Allemandi DA, Palma SD, Pistoressi-Palencia MC, Morón G, Maletto BA. Class-B CpG-ODN Formulated With a Nanostructure Induces Type I Interferons-Dependent and CD4⁺ T Cell-Independent CD8⁺ T-Cell Response Against Unconjugated Protein Antigen. *Front Immunol*. 2018 Oct 10;9:2319. doi: 10.3389/fimmu.2018.02319. PMID: 30364187; PMCID: PMC6192457.

Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., & Waller, P. J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary parasitology*, 44(1-2), 35–44.
[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-u](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-u)

Creaney, J., Spithill, T. W., Thompson, C. M., Wilson, L. R., Sandeman, R. M., & Parsons, J. C. (1995). Attempted immunisation of sheep against *Fasciola hepatica* using gamma-irradiated metacercariae. *International journal for parasitology*, 25(7), 853–856.
[https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)00204-2](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)00204-2)

Cwiklinski, K., & Dalton, J. P. (2022). Exploiting Comparative Omics to Understand the Pathogenic and Virulence-Associated Protease: Anti-Protease Relationships in the Zoonotic Parasites *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Genes*, 13(10), 1854.
<https://doi.org/10.3390/genes13101854>

Cwiklinski, K., Drysdale, O., López Corrales, J., Corripio-Miyar, Y., De Marco Verissimo, C., Jewhurst, H., Smith, D., Lalor, R., McNeilly, T. N., & Dalton, J. P. (2022). Targeting Secreted Protease/Anti-Protease Balance as a Vaccine Strategy against the Helminth *Fasciola hepatica*. *Vaccines*, 10(2), 155.
<https://doi.org/10.3390/vaccines10020155>

Cwiklinski, K., McEvoy, A., López Corrales, J., Jewhurst, H., Calvani, N. E. D., De Marco Verissimo, C., Dorey, A. L., Keane, O. M., Dalton, J. P., & Lalor, R. (2023). *Fasciola hepatica* antioxidant and protease-inhibitor cocktail recombinant vaccines administered five times elicit potent and sustained immune responses in sheep but do not confer protection. *Veterinary parasitology*, 323, 110049. Advance online publication.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.110049>

Dalton, J. P. (2021). Fasciolosis, 2nd Edition. CABI. SBN-13: 9781789246162 (hardback) 9781789246179 (ePDF) 9781789246186 (ePub)
 DOI: 10.1079/9781789246162.0000

Dalton, J. P., McGonigle, S., Rolph, T. P., & Andrews, S. J. (1996). Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infection and immunity*, 64(12), 5066–5074. <https://doi.org/10.1128/iai.64.12.5066-5074.1996>

Dalton, J. P., Neill, S. O., 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, A. G., & Donnelly, S. M. (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation

liver fluke vaccines. *International journal for parasitology*, 33(11), 1173–1181. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(03\)00171-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(03)00171-1)

Dalton, J. P., Robinson, M. W., Mulcahy, G., O'Neill, S. M., & Donnelly, S. (2013). Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Veterinary parasitology*, 195(3-4), 272–285. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.008>

De Brito, R. C. F., Cardoso, J. M. O., Reis, L. E. S., Vieira, J. F., Mathias, F. A. S., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. D. O., Ruiz, J. C., Resende, D. M., & Reis, A. B. (2018). Peptide Vaccines for Leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, 9, 1043. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01043>

OMS (2019). *Aplicación de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible: informe del Director General* (No. A72/11 Rev. 1). Organización Mundial de la Salud.

de la Torre-Escudero, E., & Robinson, M. W. (2020). Isolation of Secreted and Tegumental Surface Proteins from *Fasciola hepatica*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2137, 27–36. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0475-5_3

de Magalhães, M. T. Q., Mambelli, F. S., Santos, B. P. O., Morais, S. B., & Oliveira, S. C. (2018). Serine protease inhibitors containing a Kunitz domain: their role in modulation of host inflammatory responses and parasite survival. *Microbes and infection*, 20(9-10), 606–609. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.003>

Değer, Y., Ertekin, A., Değer, S., & Mert, H. (2008). Lipid peroxidation and antioxidant potential of sheep liver infected naturally with distomatosis. *Turkiye parazitolojii dergisi*, 32(1), 23–26.

Di Maggio, L. S., Tirloni, L., Pinto, A. F. M., Diedrich, J. K., Yates, J. R., 3rd, Carmona, C., Berasain, P., & da Silva Vaz, I., Jr (2019). Dataset supporting the proteomic differences found between excretion/secretion products from two isolates of *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles (NEJ) derived from different snail hosts. *Data in brief*, 25, 104272. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104272>

Donnelly, S., O'Neill, S. M., Sekiya, M., Mulcahy, G., & Dalton, J. P. (2005). Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and immunity*, 73(1), 166–173. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.166-173.2005>

Dreyfuss, G., Sindou, P., Hourdin, P., Vignoles, P., & Rondelaud, D. (2021). *Fasciola hepatica* larval development within the intermediate host. In *Fasciolosis* (pp. 23-64). Wallingford UK: CABI.

Evia, J. R. B. (2019). Liver disease and clinical laboratory. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 66(2), 81-99.

Falcón, C. R., Carranza, F. A., Aoki, P., Motrán, C. C., & Cervi, L. (2012). Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Fasciola hepatica* antigens and lipopolysaccharides confers protection against fasciolosis in mice. *The Journal of infectious diseases*, 205(3), 506–514. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir606>

Fairweather, I., Brennan, G. P., Hanna, R. E. B., Robinson, M. W., & Skuce, P. J. (2020). Drug resistance in liver flukes. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 12, 39–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.11.003>

Fiel, C., Steffan, P., & Ferreyra, Diego. (2011). Diagnóstico de las parasitosis más frecuentes de los rumiantes: Técnicas de diagnóstico e interpretación de resultados.

Firdaus, F. Z., Skwarczynski, M., & Toth, I. (2022). Developments in Vaccine Adjuvants. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2412, 145–178. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1892-9_8

Flores-Velázquez, L. M., Ruiz-Campillo, M. T., Herrera-Torres, G., Martínez-Moreno, Á., Martínez-Moreno, F. J., Zafra, R., Buffoni, L., Rufino-Moya, P. J., Molina-Hernández, V., & Pérez, J. (2023). Fasciolosis: pathogenesis, host-parasite interactions, and implication in vaccine development. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1270064. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1270064>

Florin-Christensen, M., Suarez, C. E., Rodriguez, A. E., Flores, D. A., & Schnittger, L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: Where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*, 141(12), 1563-1592. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000961>

Frick, J. S., Grünebach, F., & Autenrieth, I. B. (2010). Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 300(1), 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.010>

Fu, Y., Chryssafidis, A. L., Browne, J. A., O'Sullivan, J., McGettigan, P. A., & Mulcahy, G. (2016). Transcriptomic Study on Ovine Immune Responses to *Fasciola hepatica* Infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(9), e0005015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005015>

Fürst, T., Duthaler, U., Sripa, B., Utzinger, J., & Keiser, J. (2012). Trematode Infections: Liver and Lung Flukes. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 399-419. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.008>

García-Fernández, R., Pons, T., Perbandt, M., Valiente, P. A., Talavera, A., González-González, Y., Rehders, D., Chávez, M. A., Betzel, C., & Redecke, L. (2012). Structural insights into serine protease inhibition by a marine invertebrate BPTI Kunitz-type inhibitor. *Journal of structural biology*, 180(2), 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.08.009>

Gazzinelli-Guimaraes, P. H., & Nutman, T. B. (2018). Helminth parasites and immune regulation. *Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1685. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15596.1>

Gil, L. C., Díaz, A., Rueda, C., Martínez, C., Castillo, D., & Apt, W. (2014). Fascioliasis hepática humana: Resistencia al tratamiento con triclabendazol. *Revista médica de Chile*, 142(10), 1330-1333. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872014001000014>

Godino, A., Amaranto, M., Manassero, A., Comba, F., Pérez, M. A., Simonella, L., Pernigotti, M., & Barra, J. L. (2023). His-tagged lactate oxidase production for industrial applications using fed-batch fermentation. *Journal of Biotechnology*, 363, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.12.011>

Gonçalves, L., Subtil, A., Oliveira, M. R., & Bermudez, P. de Z. (2014). ROC Curve Estimation: An Overview. *REVSTAT-Statistical Journal*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.57805/revstat.v12i1.141>

- Guasconi, L., Serradell, M. C., & Masih, D. T. (2012). *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Veterinary immunology and immunopathology*, 148(3-4), 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.06.022>
- Gupta, K., & Cooper, C. (2008). A review of the role of CpG oligodeoxynucleotides as toll-like receptor 9 agonists in prophylactic and therapeutic vaccine development in infectious diseases. *Drugs in R&D*, 9(3), 137–145. <https://doi.org/10.2165/00126839-200809030-00001>
- Haçariz, O., Sayers, G., McCullough, M., Garrett, M., O'Donovan, J., & Mulcahy, G. (2009). The effect of Quil A adjuvant on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine*, 27(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.035>
- Hanagata N. (2012). Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *International journal of nanomedicine*, 7, 2181–2195. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30197>
- Hansen, D. S., Clery, D. G., Estuningsih, S. E., Widjajanti, S., Partoutomo, S., & Spithill, T. W. (1999). Immune responses in Indonesian thin tail and Merino sheep during a primary infection with *Fasciola gigantica*: lack of a specific IgG2 antibody response is associated with increased resistance to infection in Indonesian sheep. *International journal for parasitology*, 29(7), 1027–1035. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00038-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00038-7)
- Happich, F. A., & Boray, J. C. (1969). Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. 2. The estimation of daily total egg production of *Fasciola hepatica* and the number of adult flukes in sheep by faecal egg counts. *Australian veterinary journal*, 45(7), 329–331. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1969.tb05012.x>
- Hassan, S., Syed, S., & Kehar, S. I. (2014). Review of diagnostic techniques of hepatic fibrosis. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 64(8), 941–945.
- Heath, D. D., Jensen, O., & Lightowlers, M. W. (2003). Progress in control of hydatidosis using vaccination--a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. *Acta tropica*, 85(2), 133–143. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(02\)00219-x](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00219-x)
- Hennessey, M., Whatford, L., Payne-Gifford, S., Johnson, K. F., Van Winden, S., Barling, D., & Häsler, B. (2020). Antimicrobial & antiparasitic use and resistance in British sheep and cattle: a systematic review. *Preventive veterinary medicine*, 185, 105174. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105174>
- Horohov, D. W., Dunham, J., Liu, C., Betancourt, A., Stewart, J. C., Page, A. E., & Chambers, T. M. (2015). Characterization of the in situ immunological responses to vaccine adjuvants. *Veterinary immunology and immunopathology*, 164(1-2), 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.12.015>
- Howell, A. K., & Williams, D. J. L. (2020). The Epidemiology and Control of Liver Flukes in Cattle and Sheep. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 36(1), 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.002>
- Iturbe Espinoza, P., & Muñiz Pareja, F. (2013). Life cycle and biotic potential of *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula*. *Neotropical helminthology*, 7(2), 243-254.

- Jmel, M. A., Voet, H., Araújo, R. N., Tirloni, L., Sá-Nunes, A., & Kotsyfakis, M. (2023). Tick Salivary Kunitz-Type Inhibitors: Targeting Host Hemostasis and Immunity to Mediate Successful Blood Feeding. *International journal of molecular sciences*, *24*(2), 1556. <https://doi.org/10.3390/ijms24021556>
- Kang, H. J., Chu, K. B., Kim, M. J., Lee, S. H., Park, H., Jin, H., Moon, E. K., & Quan, F. S. (2021). Protective immunity induced by CpG ODN-adjuvanted virus-like particles containing *Toxoplasma gondii* proteins. *Parasite immunology*, *43*(1), e12799. <https://doi.org/10.1111/pim.12799>
- Karch, C. P., & Burkhard, P. (2016). Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochemical pharmacology*, *120*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.05.001>
- Keiser, J., & Utzinger, J. (2009). Food-borne trematodiasis. *Clinical microbiology reviews*, *22*(3), 466–483. <https://doi.org/10.1128/CMR.00012-09>
- Kelley, J. M., Elliott, T. P., Beddoe, T., Anderson, G., Skuce, P., & Spithill, T. W. (2016). Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends in parasitology*, *32*(6), 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.03.002>
- Keshavarzian, N., Noroozbeygi, M., Haji Molla Hoseini, M., & Yeganeh, F. (2020). Evaluation of Leishmanization Using Iranian Lizard *Leishmania* Mixed With CpG-ODN as a Candidate Vaccine Against Experimental Murine Leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, *11*, 1725. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01725>
- Kuntz, A. N., Davioud-Charvet, E., Sayed, A. A., Califf, L. L., Dessolin, J., Arnér, E. S., & Williams, D. L. (2007). Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target. *PLoS medicine*, *4*(6), e206. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040206>
- Lalor, R., Cwiklinski, K., Calvani, N. E. D., Dorey, A., Hamon, S., Corrales, J. L., Dalton, J. P., & De Marco Verissimo, C. (2021). Pathogenicity and virulence of the liver flukes *Fasciola hepatica* and *Fasciola Gigantica* that cause the zoonosis Fasciolosis. *Virulence*, *12*(1), 2839–2867. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996520>
- Larroza, M., Aguilar, M., Soler, P., Mora, J., Roa, M., Cabrera, R., Martinez Stanzola, J. P., Ceballos, L., & Alvarez, L. I. (2023). Triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: First report in sheep from the Santa Cruz province, Argentinian Patagonia. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, *45*, 100927. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100927>
- Laupèze, B., Hervé, C., Di Pasquale, A., & Tavares Da Silva, F. (2019). Adjuvant Systems for vaccines: 13 years of post-licensure experience in diverse populations have progressed the way adjuvanted vaccine safety is investigated and understood. *Vaccine*, *37*(38), 5670–5680. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.098>
- Lightowlers, M. W., Flisser, A., Gauci, C. G., Heath, D. D., Jensen, O., & Rolfe, R. (2000). Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. *Parasitology today (Personal ed.)*, *16*(5), 191–196. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(99\)01633-6](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(99)01633-6)
- Lin, S. Y., Yao, B. Y., Hu, C. J., & Chen, H. W. (2020). Induction of Robust Immune Responses by CpG-ODN-Loaded Hollow Polymeric Nanoparticles for Antiviral and

Vaccine Applications in Chickens. *International journal of nanomedicine*, 15, 3303–3318. <https://doi.org/10.2147/IJN.S241492>

Lopez, P., Tuñon, M. J., Gonzalez, P., Diez, N., Bravo, A. M., & Gonzalez-Gallego, J. (1993). Ductular proliferation and hepatic secretory function in experimental fascioliasis. *Experimental parasitology*, 77(1), 36–42. <https://doi.org/10.1006/expr.1993.1058>

Lotfy, W. M., Brant, S. V., DeJong, R. J., Le, T. H., Demiaszkiewicz, A., Rajapakse, R. P., Perera, V. B., Laursen, J. R., & Loker, E. S. (2008). Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 79(2), 248–255.

Lowther, J., Robinson, M. W., Donnelly, S. M., Xu, W., Stack, C. M., Matthews, J. M., & Dalton, J. P. (2009). The importance of pH in regulating the function of the *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine protease. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(1), e369. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000369>

Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basika, T., Gayo, V., Rosadilla, D., Roche, L., Tort, J., & Carmona, C. (2011). The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine*, 29(48), 9057–9063. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.020>

Maggioli, G., Bottini, G., Basika, T., Alonzo, P., Salinas, G., & Carmona, C. (2016). Immunization with *Fasciola hepatica* thioredoxin glutathione reductase failed to confer protection against fasciolosis in cattle. *Veterinary parasitology*, 224, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.007>

Mahajan, S., & Atkins, W. M. (2005). The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(11), 1221–1233. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-4524-6>

Malandrini, J. B., Carnevale, S., Soria, C. C., Velásquez, J. N., & Paladino, C. M. (2012). Seroprevalencia de fasciolosis en niños del Valle de Fiambalá, Tinogasta, Argentina.

Maletto, B. A., Rópolo, A. S., Liscovsky, M. V., Alignani, D. O., Glocker, M., & Pistoiresi-Palencia, M. C. (2005). CpG oligodeoxynucleotides functions as an effective adjuvant in aged BALB/c mice. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 117(3), 251–261. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.08.016>

Malonis, R. J., Lai, J. R., & Vergnolle, O. (2020). Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges. *Chemical reviews*, 120(6), 3210–3229. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00472>

Mas-Coma, M. S., Esteban, J. G., & Bargues, M. D. (1999). Epidemiología de la fascioliasis humana: Revisión y propuesta de nueva clasificación / M. S. Mas-Coma, J. G. Esteban y M. D. Bargues. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/57514>

Mas-Coma, S., Bargues, M. D., & Valero, M. A. (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International journal for parasitology*, 35(11-12), 1255–1278. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.010>

- Mas-Coma, S., Valero, M. A., & Bargues, M. D. (2022). Human and Animal Fascioliasis: Origins and Worldwide Evolving Scenario. *Clinical microbiology reviews*, 35(4), e0008819. <https://doi.org/10.1128/cmr.00088-19>
- Mavrot, F., Hertzberg, H., & Torgerson, P. (2015). Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & vectors*, 8, 557. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1164-z>
- Mendes, R. E., Zafra, R., Pérez-Ecija, R. A., Buffoni, L., Martínez-Moreno, A., Tendler, M., & Pérez, J. (2010). Evaluation of local immune response to *Fasciola hepatica* experimental infection in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunized with Sm14 vaccine antigen. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(5), 698-705. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000500017>
- Mera y Sierra, R., Agramunt, V. H., Cuervo, P., & Mas-Coma, S. (2011). Human fascioliasis in Argentina: Retrospective overview, critical analysis and baseline for future research. *Parasites & Vectors*, 4(1), 104. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-104>
- Mishra M. (2020). Evolutionary Aspects of the Structural Convergence and Functional Diversification of Kunitz-Domain Inhibitors. *Journal of molecular evolution*, 88(7), 537–548. <https://doi.org/10.1007/s00239-020-09959-9>
- Moazeni, M., & Ahmadi, A. (2016). Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Experimental parasitology*, 169, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.07.010>
- Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, Á., Donnelly, S., O'Neill, S. M., Dalton, J. P., & Cwiklinski, K. (2015). *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Veterinary Parasitology*, 208(1-2), 101-111. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.004>
- Moriena, R. A., Álvarez, J. D., Pietrokovsky, S. M., Rubel, D., Prepelitchi, L., Racioppi, O., & Wisnivesky, C. (2008). Presencia de *Pseudosuccinea columella* naturalmente infestada con *Fasciola hepatica* en Santo Tomé (Corrientes, Argentina). *Revista Veterinaria*, 2008, vol. 19, no. 2, p. 147-149. <http://repositorio.unne.edu.ar/xmlui/handle/123456789/49257>
- Motran, C. C., Silvano, L., Chiapello, L. S., Theumer, M. G., Ambrosio, L. F., Volpini, X., Celias, D. P., & Cervi, L. (2018). Helminth Infections: Recognition and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells. *Frontiers in immunology*, 9, 664. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00664>
- Muiño, L., Perteguer, M. J., Gárate, T., Martínez-Sernández, V., Beltrán, A., Romarís, F., Mezo, M., González-Warleta, M., & Ubeira, F. M. (2011). Molecular and immunological characterization of *Fasciola* antigens recognized by the MM3 monoclonal antibody. *Molecular and biochemical parasitology*, 179(2), 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.06.003>
- Mulcahy, G., & Dalton, J. P. (2001). Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Research in veterinary science*, 70(1), 83–86. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2000.0425>
- Mutwiri, G., van Drunen Littel-van den Hurk, S., & Babiuk, L. A. (2009). Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Advanced drug delivery reviews*, 61(3), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.12.004>

Naranjo-Lucena, A., Correia, C. N., Molina-Hernández, V., Martínez-Moreno, Á., Browne, J. A., Pérez, J., MacHugh, D. E., & Mulcahy, G. (2021). Transcriptomic Analysis of Ovine Hepatic Lymph Node Following *Fasciola hepatica* Infection - Inhibition of NK Cell and IgE-Mediated Signaling. *Frontiers in immunology*, *12*, 687579. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.687579>

Nari, A., Hansen, J. H., & Eddi, C. (2000). Control de la resistencia a los antiparasitarios a la luz de los conocimientos actuales.

Nasution, D., Putra, W., Gushairiyanto, G., Alwi, Y., & Suryani, H. (2021). Morphometrics Characterization of Thin-Tail Sheep in Lowland and Highland Areas. *Tropical Animal Science Journal*, *44*, 386-398. <https://doi.org/10.5398/tasj.2021.44.4.386>

Norbury, L. J., Basałaj, K., Zawistowska-Deniziak, A., Sielicka, A., Wilkowski, P., Wesołowska, A., Smooker, P. M., & Wędrychowicz, H. (2018). Intranasal delivery of a formulation containing stage-specific recombinant proteins of *Fasciola hepatica* cathepsin L5 and cathepsin B2 triggers an anti-fecundity effect and an adjuvant-mediated reduction in fluke burden in sheep. *Veterinary parasitology*, *258*, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.05.008>

Nukeri, S., Malatji, M. P., Sengupta, M. E., Vennervald, B. J., Stensgaard, A. S., Chaisi, M., & Mukaratirwa, S. (2022). Potential Hybridization of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in Africa-A Scoping Review. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *11*(11), 1303. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111303>

Nyindo, M., & Lukambagire, A. H. (2015). Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. *BioMed research international*, *2015*, 786195. <https://doi.org/10.1155/2015/786195>

Olaechea, F., Lovera, V., Larroza, M., Raffo, F., & Cabrera, R. (2011). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Veterinary Parasitology*, *178*(3), 364-366. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.047>

Ortega-Vargas, S., Espitia, C., Sahagún-Ruiz, A., Parada, C., Balderas-Loeza, A., Villa-Mancera, A., & Quiroz-Romero, H. (2019). Moderate protection is induced by a chimeric protein composed of leucine aminopeptidase and cathepsin L1 against *Fasciola hepatica* challenge in sheep. *Vaccine*, *37*(24), 3234–3240. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.067>

Pacheco, I. L., Abril, N., Morales-Prieto, N., Bautista, M. J., Zafra, R., Escamilla, A., Ruiz, M. T., Martínez-Moreno, A., & Pérez, J. (2017). Th1/Th2 balance in the liver and hepatic lymph nodes of vaccinated and unvaccinated sheep during acute stages of infection with *Fasciola hepatica*. *Veterinary parasitology*, *238*, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.022>

Pacheco, I. L., Abril, N., Zafra, R., Molina-Hernández, V., Morales-Prieto, N., Bautista, M. J., Ruiz-Campillo, M. T., Pérez-Caballero, R., Martínez-Moreno, A., & Pérez, J. (2018). *Fasciola hepatica* induces Foxp3 T cell, proinflammatory and regulatory cytokine overexpression in liver from infected sheep during early stages of infection. *Veterinary research*, *49*(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0550-x>

- Paepenmüller, T., & Müller-Goymann, C. C. (2014). Influence of Quil A on liposomal membranes. *International journal of pharmaceutics*, 475(1-2), 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.007>
- Paesen, G. C., Siebold, C., Dallas, M. L., Peers, C., Harlos, K., Nuttall, P. A., Nunn, M. A., Stuart, D. I., & Esnouf, R. M. (2009). An Ion-channel Modulator from the Saliva of the Brown Ear Tick has a Highly Modified Kunitz/BPTI Structure. *Journal of Molecular Biology*, 389(4), 734-747. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.045>
- Patel S. (2017). A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator. *Allergologia et immunopathologia*, 45(6), 579–591. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.10.011>
- Pérez-Caballero, R., Siles-Lucas, M., González-Miguel, J., Martínez-Moreno, F. J., Escamilla, A., Pérez, J., Martínez-Moreno, A., & Buffoni, L. (2018). Pathological, immunological and parasitological study of sheep vaccinated with the recombinant protein 14-3-3z and experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 202, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.07.006>
- Phiri, I. K., Phiri, A. M., & Harrison, L. J. (2006). Serum antibody isotype responses of *Fasciola*-infected sheep and cattle to excretory and secretory products of *Fasciola* species. *Veterinary parasitology*, 141(3-4), 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.019>
- Piedrafita, D., Estuningsih, E., Pleasance, J., Prowse, R., Raadsma, H. W., Meeusen, E. N., & Spithill, T. W. (2007). Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity in vitro against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infection and immunity*, 75(4), 1954–1963. <https://doi.org/10.1128/IAI.01034-06>
- Pleasance, J., Raadsma, H. W., Estuningsih, S. E., Widjajanti, S., Meeusen, E., & Piedrafita, D. (2011). Innate and adaptive resistance of Indonesian Thin Tail sheep to liver fluke: a comparative analysis of *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* infection. *Veterinary parasitology*, 178(3-4), 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.037>
- Pomé, V., & Alim, A. (2016). Prevalence of fascioliosis in polygastric animals in Peru, 1985-2015. *Revista de Medicina Veterinaria*, 32, 121-129. <https://doi.org/10.19052/mv.3861>
- Qiao, D., Li, L., Liu, L., & Chen, Y. (2022). Universal and Translational Nanoparticulate CpG Adjuvant. *ACS applied materials & interfaces*, 14(45), 50592–50600. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c15644>
- Raadsma, H. W., Kingsford, N. M., Suharyanta, Spithill, T. W., & Piedrafita, D. (2007). Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. *Veterinary parasitology*, 143(3-4), 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.008>
- Ranasinghe, S., & McManus, D. P. (2013). Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. *Developmental and comparative immunology*, 39(3), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.10.005>

- Rashid, M., Rashid, M. I., Akbar, H., Ahmad, L., Hassan, M. A., Ashraf, K., Saeed, K., & Gharbi, M. (2019). A systematic review on modelling approaches for economic losses studies caused by parasites and their associated diseases in cattle. *Parasitology*, 146(2), 129-141. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001282>
- Rezaei, F., Seif, M., Gandomkar, A., Fattahi, M. R., Malekzadeh, F., Sepanlou, S. G., & Hasanzadeh, J. (2022). Comparison of laboratory-based and non-laboratory-based WHO cardiovascular disease risk charts: A population-based study. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03336-4>
- Rodríguez, E., Francia, K., Brossard, N., García Vallejo, J. J., Kalay, H., van Kooyk, Y., Freire, T., & Giacomini, C. (2018). Immobilization of β -galactosidase and α -mannosidase onto magnetic nanoparticles: A strategy for increasing the potentiality of valuable glycomic tools for glycosylation analysis and biological role determination of glycoconjugates. *Enzyme and microbial technology*, 117, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.05.012>
- Rodríguez-Pérez, J., & Hillyer, G. V. (1995). Detection of excretory-secretory circulating antigens in sheep infected with *Fasciola hepatica* and with *Schistosoma mansoni* and *F. hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 56(1), 57-66. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00666-Z](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)00666-Z)
- Rojas-Caraballo, J., López-Abán, J., Pérez del Villar, L., Vizcaíno, C., Vicente, B., Fernández-Soto, P., del Olmo, E., Patarroyo, M. A., & Muro, A. (2014). In vitro and in vivo studies for assessing the immune response and protection-inducing ability conferred by *Fasciola hepatica*-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes. *PLoS one*, 9(8), e105323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105323>
- Rojo-Vázquez, F. A., Meana, A., Valcárcel, F., & Martínez-Valladares, M. (2012). Update on trematode infections in sheep. *Veterinary parasitology*, 189(1), 15–38. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.029>
- Rosas-Hostos Infantes, L. R., Paredes Yataco, G. A., Ortiz-Martínez, Y., Mayer, T., Terashima, A., Franco-Paredes, C., Gonzalez-Diaz, E., Rodriguez-Morales, A. J., Bonilla-Aldana, D. K., Vargas Barahona, L., Grimshaw, A. A., Chastain, D. B., Sillau, S., Marcos, L. A., & Henao-Martínez, A. F. (2023). The global prevalence of human fascioliasis: a systematic review and meta-analysis. *Therapeutic advances in infectious disease*, 10, 20499361231185413. <https://doi.org/10.1177/20499361231185413>
- Ruiz-Campillo, M. T., Barrero-Torres, D. M., Abril, N., Pérez, J., Zafra, R., Buffoni, L., Martínez-Moreno, Á., Martínez-Moreno, F. J., & Molina-Hernández, V. (2023). *Fasciola hepatica* primoinfections and reinfections in sheep drive distinct Th1/Th2/Treg immune responses in liver and hepatic lymph node at early and late stages. *Veterinary research*, 54(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13567-022-01129-7>
- Ruiz-Campillo, M. T., Molina-Hernández, V., Pérez, J., Pacheco, I. L., Pérez, R., Escamilla, A., Martínez-Moreno, F. J., Martínez-Moreno, A., & Zafra, R. (2018). Study of peritoneal macrophage immunophenotype in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary parasitology*, 257, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.05.019>
- Ryan, S., Shiels, J., Taggart, C. C., Dalton, J. P., & Weldon, S. (2020). *Fasciola hepatica*-Derived Molecules as Regulators of the Host Immune Response. *Frontiers in immunology*, 11, 2182. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02182>

Sánchez Vallecillo, M. F., Minguito de la Escalera, M. M., Aguirre, M. V., Ullio Gamboa, G. V., Palma, S. D., González-Cintado, L., Chiodetti, A. L., Soldano, G., Morón, G., Allemandi, D. A., Ardavín, C., Pistoiresi-Palencia, M. C., & Maletto, B. A. (2015). A liquid crystal of ascorbyl palmitate, used as vaccine platform, provides sustained release of antigen and has intrinsic pro-inflammatory and adjuvant activities which are dependent on MyD88 adaptor protein. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 214, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.07.008>

Sánchez Vallecillo, M. F., Ullio Gamboa, G. V., Palma, S. D., Harman, M. F., Chiodetti, A. L., Morón, G., Allemandi, D. A., Pistoiresi-Palencia, M. C., & Maletto, B. A. (2014). Adjuvant activity of CpG-ODN formulated as a liquid crystal. *Biomaterials*, 35(8), 2529–2542. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.002>

Shirai, S., Shibuya, M., Kawai, A., Tamiya, S., Munakata, L., Omata, D., Suzuki, R., Aoshi, T., & Yoshioka, Y. (2020). Lipid Nanoparticles Potentiate CpG-Oligodeoxynucleotide-Based Vaccine for Influenza Virus. *Frontiers in immunology*, 10, 3018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03018>

Silvane, L., Celas, D. P., Romagnoli, P. A., Maletto, B. A., Sanchez Vallecillo, M. F., Chiapello, L. S., Palma, S. D., Allemandi, D. A., Sanabria, R. E. F., Pruzzo, C. I., Motrán, C. C., & Cervi, L. (2020). A Vaccine Based on Kunitz-Type Molecule Confers Protection Against *Fasciola hepatica* Challenge by Inducing IFN- γ and Antibody Immune Responses Through IL-17A Production. *Frontiers in Immunology*, 11, 2087. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02087>

Sim, J., & Wright, C. C. (2005). The Kappa Statistic in Reliability Studies: Use, Interpretation, and Sample Size Requirements. *Physical Therapy*, 85(3), 257–268. <https://doi.org/10.1093/ptj/85.3.257>

Smith, D., Tikhonova, I. G., Jewhurst, H. L., Drysdale, O. C., Dvořák, J., Robinson, M. W., Cwiklinski, K., & Dalton, J. P. (2016). Unexpected Activity of a Novel Kunitz-type Inhibitor: inhibition of cysteine proteases but not serine proteases. *The Journal of biological chemistry*, 291(37), 19220–19234. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.724344>

Soler, P., Abdala, A. M., & Larroza, M. (2023). Genetic characterization and regional distribution of lymnaeid snails in northern Patagonia, Argentina. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 44, 100919. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100919>

Sookoian, S., & Pirola, C. J. (2015). Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine. *World journal of gastroenterology*, 21(3), 711–725. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i3.711>

Spithill, T. W., Toet, H., Rathinasamy, V., Zerna, G., Swan, J., Cameron, T. C., ... & Beddoe, T. (2021). Vaccines for *Fasciola*: new thinking for an old problem.. *Fasciolosis*, 379–422. <https://doi.org/10.1079/9781789246162.0012>

Stuen, S., & Ersdal, C. (2022). Fasciolosis-An Increasing Challenge in the Sheep Industry. *Animals : an open access journal from MDPI*, 12(12), 1491. <https://doi.org/10.3390/ani12121491>

Suarez, V., Rossanigo, C., & C., D. (2013). Epidemiología e impacto productivo de nematodos en la Pampa Central Argentina (pp. 59–88). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3798.4240>

- Sulaiman, A. A., Zolnierczyk, K., Japa, O., Owen, J. P., Maddison, B. C., Emes, R. D., Hodgkinson, J. E., Gough, K. C., & Flynn, R. J. (2016). A Trematode Parasite Derived Growth Factor Binds and Exerts Influences on Host Immune Functions via Host Cytokine Receptor Complexes. *PLoS pathogens*, *12*(11), e1005991. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005991>
- Sun, H. X., Xie, Y., & Ye, Y. P. (2009). ISCOMs and ISCOMATRIX. *Vaccine*, *27*(33), 4388–4401. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.032>
- Toet, H., Piedrafita, D. M., & Spithill, T. W. (2014). Liver fluke vaccines in ruminants: Strategies, progress and future opportunities. *International Journal for Parasitology*, *44*(12), 915–927. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.07.011>
- Tönsing, C., Steiert, B., Timmer, J., & Kreutz, C. (2023). Likelihood-ratio test statistic for the finite-sample case in nonlinear ordinary differential equation models. *PLoS Computational Biology*, *19*(9), e1011417. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1011417>
- Torbenson, M., & Washington, K. (2020). Pathology of liver disease: advances in the last 50 years. *Human pathology*, *95*, 78–98. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2019.08.023>
- Torgerson, P. R., Devleeschauwer, B., Praet, N., Speybroeck, N., Willingham, A. L., Kasuga, F., Rokni, M. B., Zhou, X. N., Fèvre, E. M., Sripa, B., Gargouri, N., Fürst, T., Budke, C. M., Carabin, H., Kirk, M. D., Angulo, F. J., Havelaar, A., & de Silva, N. (2015). World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS medicine*, *12*(12), e1001920. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001920>
- Tran, N., Ricafrente, A., To, J., Lund, M., Marques, T. M., Gama-Carvalho, M., Cwiklinski, K., Dalton, J. P., & Donnelly, S. (2021). *Fasciola hepatica* hijacks host macrophage miRNA machinery to modulate early innate immune responses. *Scientific reports*, *11*(1), 6712. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86125-1>
- van Doorn E, Liu H, Huckriede A, Hak E. Safety and tolerability evaluation of the use of Montanide ISA™51 as vaccine adjuvant: A systematic review. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(1):159-69. doi: 10.1080/21645515.2015.1071455. Epub 2015 Sep 17. PMID: 26378866; PMCID: PMC4962750.
- Van Milligen, F. J., Cornelissen, J. B., & Bokhout, B. A. (1999). Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite immunology*, *21*(5), 243–251. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00226.x>
- Wang, H. L., Xu, H., Lu, W. H., Zhu, L., Yu, Y. H., & Hong, F. Z. (2014). In vitro and in vivo evaluations of human papillomavirus type 16 (HPV16)-derived peptide-loaded dendritic cells (DCs) with a CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) adjuvant as tumor vaccines for immunotherapy of cervical cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*, *289*(1), 155–162. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-2938-1>
- Wijffels, G. L., Salvatore, L., Dosen, M., Waddington, J., Wilson, L., Thompson, C., Campbell, N., Sexton, J., Wicker, J., & Bowen, F. (1994). Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Experimental parasitology*, *78*(2), 132–148. <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1014>

- Wilson, R. A., Wright, J. M., de Castro-Borges, W., Parker-Manuel, S. J., Dowle, A. A., Ashton, P. D., Young, N. D., Gasser, R. B., & Spithill, T. W. (2011). Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. *International journal for parasitology*, *41*(13-14), 1347–1359. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.08.003>
- Wilson, R., & Williams, D. M. (2022). Cirrhosis. *The Medical clinics of North America*, *106*(3), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2021.12.001>
- Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., & Sangster, N. C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in parasitology*, *20*(10), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.010>
- Yu, C., An, M., Li, M., & Liu, H. (2017). Immunostimulatory Properties of Lipid Modified CpG Oligonucleotides. *Molecular pharmaceutics*, *14*(8), 2815–2823. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00335>
- Zafra, R., Buffoni, L., Pérez-Caballero, R., Molina-Hernández, V., Ruiz-Campillo, M. T., Pérez, J., Martínez-Moreno, Á., & Martínez Moreno, F. J. (2021). Efficacy of a multivalent vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Veterinary research*, *52*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00895-0>
- Zafra, R., Pérez-Écija, R. A., Buffoni, L., Pacheco, I. L., Martínez-Moreno, A., LaCourse, E. J., Perally, S., Brophy, P. M., & Pérez, J. (2013). Early hepatic and peritoneal changes and immune response in goats vaccinated with a recombinant glutathione transferase sigma class and challenged with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science*, *94*(3), 602-609. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.10.026>
- Zarco, A., Fantozzi, M. C., & Cuervo, P. F. (2011). Gastropoda, Pulmonata, Lymnaeidae, *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817): First record in Córdoba province, central Argentina. *Check List*, *7*(4), Article 4. <https://doi.org/10.15560/7.4.391>
- Zhao, M., & Zhang, W. (2016). Focally Increased FDG Activity in the Liver Related to Hydropic Degeneration. *Clinical nuclear medicine*, *41*(3), 259–260. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000001054>