



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Vacunas experimentales frente a trematodosis
hepáticas**

Autor: Rocío Talavera Soriano

Tutor: Juan José Nogal Ruíz

Convocatoria: Junio 2017

Índice de contenidos

Resumen.....	3
1. Introducción.....	4
1.1. Objetivos.....	4
1.2. Ciclo biológico.....	4
1.3. Epidemiología.....	5
1.4. Patogenia.....	6
1.4.1. Mecanismos de agresión.....	6
1.4.2. Inmunorregulación.....	6
1.5. Vacunas experimentales.....	7
1.5.1. Adyuvantes e inmunomoduladores.....	8
1.5.2. Antígenos.....	8
1.5.3. Vacunas derivadas de FABPs con el sistema ADAD.....	10
2. Metodología.....	14
3. Resultados y discusión.....	15
4. Conclusión.....	16
5. Referencias bibliográficas.....	17

Resumen

La fasciolosis es una enfermedad producida por el trematodo *Fasciola hepatica*. Provoca importantes pérdidas económicas en la producción ganadera, siendo además una preocupante enfermedad zoonótica. Actualmente, la única herramienta disponible para el control de dicha enfermedad es la utilización de fármacos antiparasitarios. Hoy, la aparición de fenómenos de resistencia antiparasitaria lleva a la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas. La búsqueda de antígenos vacunales para el desarrollo de una vacuna eficaz es una de las herramientas más investigadas. En este trabajo se expone una revisión de los principales resultados obtenidos hasta el momento en la búsqueda de diversos candidatos vacunales. Entre los diversos antígenos de *F. hepatica*, encontramos las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs), en inglés *Fatty Acids Binding Proteins*. Estas proteínas purificadas fueron las primeras en utilizarse en ensayos de protección frente a la fasciolosis y la esquistosomosis.

En concreto se utilizó la proteína nativa FABP Fh12 en diversos sistemas adyuvantes. En 2004 se empleó el sistema ADAD formado inicialmente por un adyuvante, un inmunomodulador, y un excipiente que permite la supervivencia del antígeno durante un largo período. Durante este ensayo se pudo observar una cierta eficacia.

En 2006, el mismo grupo que desarrolló la vacuna con Fh12, utilizó un antígeno recombinante Fh15, también con el sistema ADAD, y cambiando el sistema adyuvante inmunomodulador.

En 2008, volvieron a utilizar la FABP Fh12, con un nuevo sistema adyuvante y vía de presentación.

En los dos últimos estudios, los resultados fueron mejorando, demostrando que las vacunas experimentales derivadas de FABPs podrían ser un buen punto de partida para conseguir una vacuna eficaz contra *F. hepatica*.

1. Introducción

Fasciola hepatica es uno de los parásitos más importantes en el mundo. Produce la conocida fasciolosis, y se puede encontrar en más de 50 países. Diversos grupos multidisciplinares de todo el mundo han intentado desarrollar una vacuna como profilaxis para erradicar este trematodo.

Este trabajo recoge una revisión bibliográfica sobre el desarrollo de vacunas experimentales frente a *Fasciola hepatica*. Esta especie, junto con *Fasciola gigantica*, constituyen las dos especies comúnmente implicadas como agentes etiológicos de las fasciolosis.

En concreto nos centraremos en el desarrollo de vacunas derivadas de FABPs con el sistema adyuvante ADAD, en el cual ha participado el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

1.1. Objetivos

- Profundizar en el conocimiento de los antígenos utilizados en la vacunación frente a *F. hepatica*.
- Conocer el proceso de desarrollo de una vacuna experimental frente a la fasciolosis.

1.2. Ciclo biológico

El ciclo biológico de *F. hepatica* comienza con el paso de huevos desde el hospedador al exterior donde tendrá lugar su desarrollo. Una vez formado el miracidio, buscará un hospedador intermediario (un caracol, normalmente *Lymnaea truncatula*) en el que penetrará. En él se forman las cercarias tras haber pasado por diferentes fases larvarias. Estas abandonan al caracol y se enquistan como metacercarias. El hospedador definitivo (hombre o animal) ingiere la metacercaria infecciosa y se produce el desarrollo de la larva adulta. ^[1]

Una hora después de la infección, las metacercarias se desenquistan en el intestino delgado. Pasada otra hora perforan la pared intestinal y migran a la cavidad peritoneal, perforando la cápsula de Glisson y penetrando en el parénquima hepático. Después

migran hacia el interior del hígado, causando hemorragia y fibrosis. El mayor crecimiento del parásito tiene lugar durante este tiempo.

Los parásitos alcanzan los conductos biliares aproximadamente siete semanas después de la infección, donde se van a establecer hasta completar su madurez; y tras otra semana se pueden encontrar huevos en la bilis y posteriormente en las heces, completando de esta forma el ciclo de vida. Un adulto de *F. hepatica* puede vivir durante varios años en el hígado del hospedador definitivo y producir cerca de 20.000 huevos cada día. Las diferentes fases del ciclo biológico descrito se pueden apreciar en la Figura 1. ^{[1] [2] [3] [4] [5]}

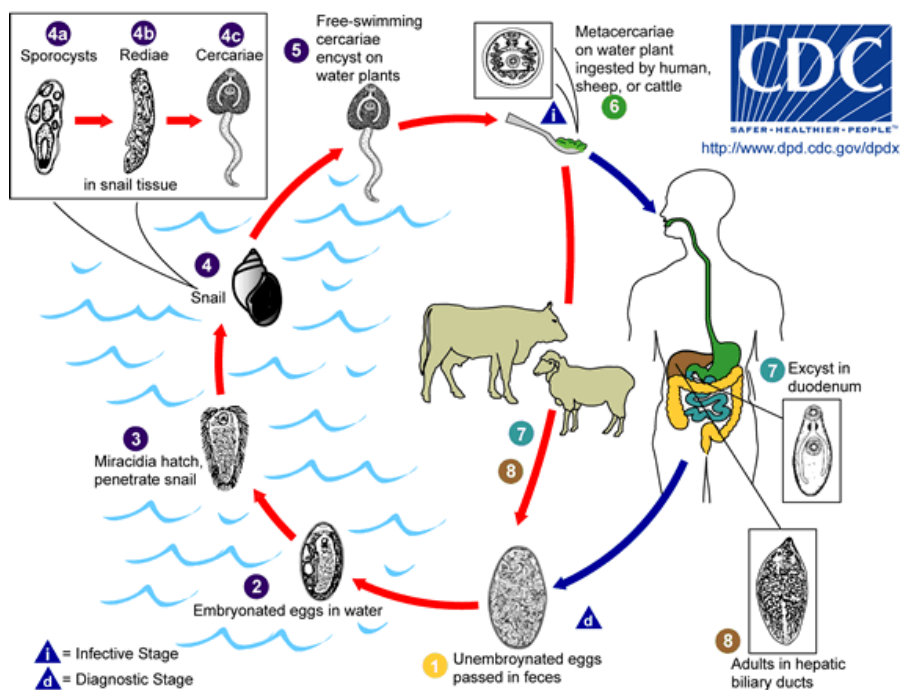


Figura 1. Ciclo biológico de *F. hepatica*. (Tomado de C.D.C.- Center for Diseases Control and Prevention)

1.3. Epidemiología

Desde 1990 han aumentado los casos de fasciolosis humana. A pesar de ser más común entre animales, el número de personas infectadas en todo el mundo excede los 2 millones, y cerca de 180 millones están en riesgo de infección. *Fasciola hepatica* se puede encontrar en más de 50 países, distribuidos a nivel mundial. Sin embargo, para que la fasciolosis se produzca en un área determinada se requieren una suficiente humedad y unas temperaturas favorables (sobre 10°C) que permitan el desarrollo del

miracidio, la reproducción de los caracoles, y el desarrollo larvario fuera de los caracoles.

En España los casos de fasciolosis registrados afectan mayoritariamente a animales de granja (ovinos, bovinos y caprinos). La infección de rumiantes domésticos con *Fasciola hepatica* causa pérdidas económicas significativas estimadas en 2000 millones de dólares por año para el sector agrícola, con unos 600 millones de animales infectados. Los casos de fasciolosis humana son tan escasos que esta enfermedad ha sido incluida en la lista de enfermedades raras descritas por el Instituto de Investigación de Enfermedades Raras perteneciente al Instituto de Salud Carlos III. [6], [7]

1.4. Patogenia

1.4.1. Mecanismos de agresión

Como se ha descrito en el ciclo biológico, tras la ingestión de las metacercarias, las formas juveniles atraviesan la pared intestinal para migrar a través del parénquima hepático y llegar a su localización definitiva en los conductos biliares. Esta migración junto con la reacción inflamatoria e inmunológica desencadenada, produce lesiones y hemorragias. Además se pueden producir infecciones bacterianas secundarias que pueden originar peritonitis. Los conductos biliares interlobulares se dilatan y esclerosan, produciéndose una obstrucción del flujo biliar. [8], [9]

1.4.2. Inmunorregulación

El tipo de respuesta inmunológica inducida tras la infección ha permitido a los parásitos adaptarse a los hospedadores definitivos, siendo capaces tanto de vivir en ellos durante prolongados períodos de tiempo, como de evadir la respuesta inmunitaria generada contra ellos.

Una de las claves para la supervivencia de los helmintos en el interior de los tejidos del hospedador definitivo es que inmunomodulan la respuesta inmune de este.

En el caso de *F. hepatica*, una vez que el parásito atraviesa la pared intestinal se producen una serie de complejas interacciones moleculares entre el parásito y diferentes células del sistema inmune del hospedador definitivo. El parásito es capaz de secretar una gran cantidad de moléculas encargadas de producir una respuesta inmunitaria no-

protectora del hospedador definitivo del tipo Th2 y Tr reguladora, que favorece su supervivencia y adaptación. ^{[1], [10]}

En el modelo murino se ha visto que cuando se produce el desenquistamiento de la metacercaria en el duodeno ocurre el primer ataque del sistema inmune del hospedador al parásito, mediante la generación de inmunoglobulinas. Sin embargo, el parásito libera una serie de cisteína-proteasas que son capaces de romper a las inmunoglobulinas, evitando de esta forma su acción efectora. ^[11]

Transcurridas 24 horas tras la infección, se ha visto que los macrófagos peritoneales expresan marcadores del fenotipo Th2, acompañados con una reducción en la respuesta del tipo Th1. Además, los parásitos liberan una serie de moléculas inmunomoduladoras que afectan a la función de las células del sistema inmune innato, como son las células dendríticas y macrófagos que se encuentran en la pared intestinal y en la cavidad peritoneal. ^[12]

Una vez que la infección se ha establecido, se produce la secreción de las citoquinas del tipo Th2, IL-4, IL-5 e IL-13 en los esplenocitos. Pasadas tres semanas tras la infección, se producen las citoquinas reguladoras IL-10 y TGF- β por los macrófagos, e IL-10 por las células dendríticas. También se ha demostrado que en el peritoneo, la gran mayoría de células T CD4⁺ secretan solamente IL-10, con ausencia de IL-4 e IFN- γ . La secreción de esta citoquina reguladora hace que haya una supresión de las respuestas de tipo Th1 y Th2, ineficaces contra el parásito. ^[13]

1.5. Vacunas experimentales

A pesar de que el triclabendazol es un antihelmíntico efectivo para el tratamiento de ambas especies de *Fasciola*, su coste elevado es una barrera para su adquisición por parte de los ganaderos en los países en vías de desarrollo. Además se han observado resistencias a este antihelmíntico en ovejas infectadas con *F. hepatica*.

El desarrollo de una vacuna proporcionaría una estrategia alternativa, respetuosa con el medio ambiente, rentable y sostenible para el control de la fasciolosis. Este campo se encuentra en constante evolución debido a la identificación y preparación de antígenos protectores, el desarrollo de nuevas tecnologías de presentación, identificación de inmunomoduladores y construcciones y formulaciones de adyuvantes.

Para el diseño de una vacuna antiparasitaria, hacen falta tres factores: antígenos protectores, sistemas adyuvantes, y un modelo experimental adecuado. ^[1]

1.5.1. Adyuvantes e inmunomoduladores

Los adyuvantes son toda sustancia, proceso o combinación de sustancias que aumentan no específicamente la respuesta específica a un inmunógeno cuando son coadministrados en el mismo lugar. Sus funciones son: ^[14]

- ✓ Utilizar menores dosis de antígeno.
- ✓ Disminuir la toxicidad.
- ✓ Aumentar de la inmunogenicidad.
- ✓ Dirigir la respuesta del sistema inmunitario.
- ✓ Inducir una respuesta inmunitaria: temprana, potente y duradera.
- ✓ Establecer formulaciones estables y polivalentes.

1.5.2. Antígenos

En los ensayos vacunales frente a *Fasciola hepatica* se han utilizado tres grupos de moléculas antigénicas: las proteínas detoxificantes GST (glutation-S-transferasa) homólogas y heterólogas, las proteasas extracelulares como la Catepsina L, y la familia de proteínas que se unen a ácidos grasos inhibiendo su transporte, denominadas FABP.

1. Glutación S-Transferasa

Las Glutation S-Transferasas son una familia de isoenzimas implicadas en la detoxificación celular a través de la conjugación con el glutatión. La proteína GST de *F. hepatica* fue seleccionada como un candidato para la constitución de una vacuna subcelular). El primer ensayo de vacunación en ratas con la proteína GST formulada en AFC no confirió protección significativa, sin embargo, las ovejas que recibieron múltiples vacunaciones con la GST nativa emulsionada en AFC, mostraron una reducción de la carga parasitaria del 57%. En los años 90 varios investigadores realizaron un extenso grupo de ensayos que involucraron el empleo de GST dirigidos a desarrollar una vacuna eficaz pero no fue posible reproducir una respuesta protectora. Más recientemente, De Bont y col. (2003) intentaron la inmunización con GST recombinante de *S. bovis* en bovinos, utilizando hidroxido de aluminio, saponinas (Quil A), o con AFC como adyuvantes, sin embargo, ninguna de las formulaciones utilizadas confirió protección contra *F. hepatica* en el ganado estudiado. ^[1]

2. Catepsinas

Las catepsinas L y B (CatB y CatL) se han estudiado como postulantes a ser antígenos vacunales debido a que cumplen un rol importante en la nutrición del parásito, y además participan en la actividad invasiva y en la evasión de la respuesta inmunitaria. Wijffels en 1994 demostró por primera vez en ovejas la eficacia vacunal de la CatL purificada. La carga parasitaria no varió significativamente pero hubo una reducción del 70% en la eliminación de huevos y la viabilidad de los huevos maduros obtenidos se redujo en un 80%. En un segundo experimento, el mismo autor obtuvo solo el 52% de reducción de huevos en las heces confirmándose la baja reproducibilidad de la respuesta vacunal. Dalton evaluó además la eficacia de CatL1 y CatL2. En combinación con hemoglobina ambas catepsinas produjeron la reducción de la carga parasitaria en ganado vacuno con el valor más alto de 72% para la CatL2. Posteriormente, una serie de ensayos en ovejas y bovinos con CatL1 y CatL2 nativas purificadas⁵⁵, demostraron que estas enzimas solo protegían entre el 33% y el 79%. Es importante aclarar que estas catepsinas mostraron un potente efecto inhibitorio sobre la embriogénesis y la fecundación, mecanismos que afectan el ciclo biológico del parásito.

[1]

3. Proteínas transportadoras de ácidos grasos

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

El uso potencial de las FABP como vacunas fue descubierto a mediados de los años 70 por el Dr. G. Hillyer, quien identificó un grupo de proteínas de *Fasciola* denominadas FhSmIII. Estas proteínas formuladas en Adyuvante de Freund Completo (AFC) fueron administradas en ratones BALB/c y CD-127 y en vacas. En dichos estudios se detectaron reducciones en la carga parasitaria del 69% al 78% en ratones y del 55% en vacas. Asimismo, esta vacuna experimental protegió más del 81% de los

ratones infestados con cercarias de *S. mansoni*. Todos estos resultados demostraron que *Fasciola* y *Schistosoma* comparten epitopos protectores responsables de la protección cruzada. Además, esta identidad antigénica se observó cuando se examinaron muestras de ADNc correspondientes a la familia de FABP citoplasmáticas de *F. hepatica* y de *S. mansoni*, y se descubrió una proteína identificada como Fh15, la cual comparte un tamaño similar (14,7 kDa) y un 44% de su secuencia de aminoácidos con la Sm14 de *S. mansoni*. Sin embargo, el candidato más idóneo de las proteínas FABP de *S. mansoni*, es la proteína Sm14, como demuestra el estudio llevado a cabo por Tendler y cols., donde se utilizó una proteína recombinante de Sm14 en conejos y ratones. Los resultados en conejos revelaron una reducción de la carga parasitaria del 89% tras infectar con 1000 cercarias de *S. mansoni*. En ratones, los resultados arrojaron niveles de protección del 37% al 66% frente a *S. mansoni*, aunque el dato más interesante fue que la Sm14 recombinante mostró un porcentaje de protección del 100% frente a la infección por *F. hepatica*. En ese mismo año, Bozas y Spithill identificaron una tercera proteína denominada FABP3, la cual fue emulsionada en AFC y administrada en ratones, aunque la protección obtenida no fue significativa. Sin embargo, cuando la FABP3 se administró en corderos, provocando la infestación con 80 metacercarias de *F. hepatica*, se obtuvo un porcentaje de reducción de la carga parasitaria cercano al 100%. En resumen, las proteínas de la familia de FABP se muestran como los candidatos vacunales más prometedores frente a la fasciolosis y schistosomiasis y, probablemente también, frente a otras enfermedades provocadas por trematodos, siendo necesario un estudio más profundo del rol protector de las proteínas Sm14 y Fh15. ^[1]

1.5.3. Vacunas derivadas de FABPs con el sistema ADAD

En cuanto a los antecedentes del sistema vacunal ADAD, este se basa en estudios la actividad inmunomoduladora de productos naturales. En particular del:

- Extracto hidroalcohólico del rizoma de *Phlebodium pseudoaureum* (o *Polypodium leucotomos*), denominado PAL[®]: este extracto vegetal en modelos experimentales ha demostrado su efecto neurotrófico e inmunomodulador induciendo un aumento significativo de IFN γ e IL-2 en ratas ^[15]. En células mononucleares de sangre periférica humana, co-cultivadas con el extracto, en

presencia de mitógenos, ocasiona la proliferación de linfocitos T y NK inducidos por citocinas Th1 como IFN γ e IL-2 ^[16]. Se ha observado que inhibe la respuesta Th2 inducida por *Anisakis simplex* ^[17] o *Trichinella spiralis* ^[18] En un modelo de tricomonosis intraperitoneal el tratamiento preinfección inhibe la respuesta Th1 dominante y estimula la respuesta Th2, incrementando los niveles de IL-4 ^[19]. En los modelos experimentales parasitarios, parece inducir una respuesta inmunomoduladora *sensu stricto*, mediante la regulación del balance Th1/Th2. Asimismo constatamos un sinergismo inmunomodulador con ciertas saponinas de *Quillaja saponaria*.

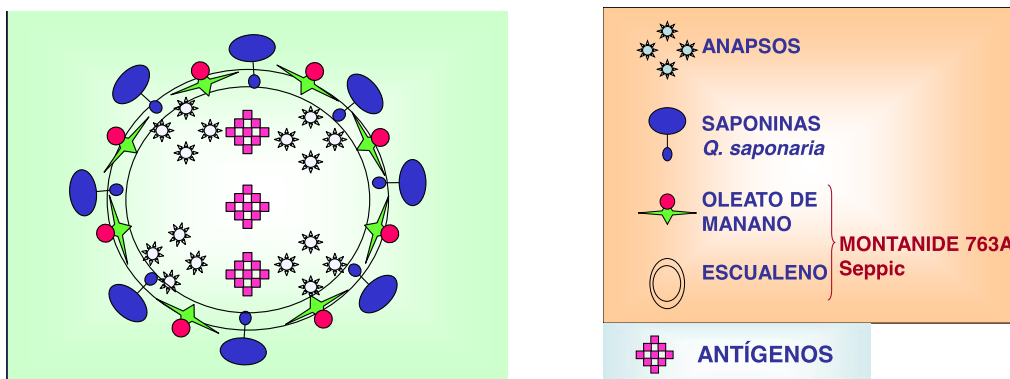
- Actividad adyuvante de PAL[®] incorporado en el sistema ADAD: el sistema ADAD soporta asimismo la incorporación de inmunomoduladores de síntesis análogos de lípidos o de sus metabolitos. Moléculas similares actúan en el reconocimiento celular y en la transducción de señales a través de membrana, con actividades inhibitoras de fosfolipasa A2, antiinflamatorias, apoptóticas, antitumorales, antiparasitarias e inmunomoduladoras. En el proyecto anterior llevado a cabo por varios de los grupos que colaboran en éste, sobre inmunomoduladores y adyuvantes de vacunas, se ensayó la efectividad *in vitro* e *in vivo* de una veintena de diaminas y aminoalcoholes lipídicos. Sobre la base de los resultados observados con estos compuestos, se seleccionaron los dos compuestos que resultaron más eficaces, denominados CUO-14004 y CUA-14029.

En 2004 un grupo de investigadores procedentes de distintas universidades estudiaron el efecto de una vacuna experimental contra la infección de *F. hepatica*, derivada del antígeno FABP (Fh12) con el sistema adyuvante ADAD. ^[20]

El sistema adyuvante ADAD constituye un sistema adyuvante inmunomodulador de cesión sostenida y retardada e incluye:

- 1) Una fracción no hemolítica de *Quillaja saponaria* como adyuvante
- 2) Un extracto natural procedente de los helechos *Polypodium leucotomos* (Anapsos o PAL[®]), como inmunomodulador.
- 3) Un aceite no mineral (Montanide[®] 763A) que permite la formulación de la vacuna en una emulsión de agua en aceite para conseguir la cesión retardada y sostenida. ^[39]

En este sistema adyuvante ADAD se incorporan los antígenos para obtener la vacuna que utilizaremos en los ensayos:



Para el ensayo de esta vacuna fueron empleados ratones y corderos. Los animales con alimentación *ad libitum*, procedían de una granja libre de fasciolosis. Los ratones eran hembras BALB/c y CD-1 de 7 semanas de edad. Durante todo el período experimental se mantuvieron en condiciones adecuadas y controladas de temperatura y humedad, además de un ciclo compuesto por 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los corderos de la raza Castellana tenían 6 semanas de edad y 15 kg de peso.

Además también se obtuvieron antígenos nativos de *F. hepatica* (Fh12) de 12 kDa a partir de metacercarias.

Lo primero de todo fue adaptar el antígeno al sistema ADAD. Para ello la proteína Fh12 se incluye en una micela compuesta por la saponina procedente de *Q. Saponaria* (Qs) y Anapsos (A). Esta micela se emulsifica en un aceite no mineral para dar lugar a una emulsión de fase externa oleosa (A/O) que es administrada por vía subcutánea.

La vacunación consiste en un “set” de dos inyecciones subcutáneas. La primera llamada “adaptación”, que contiene Qs y/o A emulsificadas en el aceite no mineral, pero sin Fh12. La segunda inyección, administrada 5 días después de la adaptación, contiene el antígeno Fh12 con Qs y/o A en la emulsión de fase externa oleosa.

Se llevaron a cabo tres experimentos:

-Experimento A: con ratones BALB/c, divididos en 8 grupos de 10 ratones cada uno. En cada grupo se inyectó algo distinto menos en los dos primeros que eran el grupo control sin infección y el grupo control infectado. Pasadas seis semanas, se les administró por vía oral cinco metacercarias por animal. Los que sobrevivieron sufrieron necrosis 42 días después de la inyección.

-Experimento B: con ratones CD-1 divididos en 6 grupos de 10 animales cada uno, en cada grupo se inyectó algo distinto menos en los dos primeros que eran el grupo control sin infección y el grupo control infectado. Pasadas ocho semanas, se les administró por vía oral cinco metacercarias por animal. Los que sobrevivieron sufrieron necrosis 42 días después de la inyección.

-Experimento C: con corderos castellanos divididos en 3 grupos de 7 animales cada uno. En cada grupo se inyectó algo distinto, excepto en el primero que era un grupo control infectado. Seis semanas después se les administró por vía oral un total de 100 metacercarias por animal. Sufrieron necrosis 98 días después de la inyección.

La evaluación de la eficacia de la vacunación se realizó de la siguiente manera:

- En los ratones, se estudiaron las curvas de supervivencia de los grupos vacunados en comparación con los grupos control infectados. Los ratones infectados en los que no fueron detectados inmunoglobulinas G contra el antígeno durante la tercera semana de la infección fueron excluidos del experimento. Además fueron analizadas macroscópicamente las lesiones hepáticas.
- En los corderos, los vermes de *F. hepatica* se recuperaron a partir del hígado y los conductos biliares. Los huevos se obtuvieron a partir de las heces, mediante una técnica de concentración por sedimentación (Bailenger).

Los resultados obtenidos fueron que:

- En los ratones BALB/c vacunados con A + Qs + Fh12 que posteriormente se infectaron con metacercarias se observó una reducción del 35 % en los parásitos con respecto al grupo c infectado. Por el contrario, en el caso de los ratones CD1 vacunados con el sistema ADAD completo no se observó ninguna reducción. Los ratones que murieron durante el experimento presentaban lesiones graves mientras que los ratones que sobrevivieron presentaron lesiones leves o ningún daño.
- En los corderos vacunados con A+ Qs + Fh12, que posteriormente se infectaron con metacercarias se observó una reducción del 24,5 % en los parásitos recuperados.

Los corderos inmunizados con Fh12 produjeron altos niveles de anticuerpos a partir de la primera semana de post-inmunización. En los ratones, los anticuerpos contra Fh12 fueron detectados a partir de la tercera semana.

El mecanismo de acción inmunoprotector de FABP aún no está claro pero probablemente esté relacionado con la inhibición de los nutrientes captados por los vermes ^[27], y específicamente con el bloqueo de la captura y transporte de ácidos grasos. ^[40] Además, la alta homología del antígeno Fh12 con 14 kDa de FABP de *Schistosoma mansoni* sugiere una potente cualidad de protección cruzada del antígeno Fh12 contra otros nematodos de interés médico.

En 2006, algunos de los miembros de este mismo grupo de investigadores junto con nuevas incorporaciones, proponían otra vacuna, de nuevo, derivada de un FABP, esta vez de Fh15, con el sistema adyuvante ADAD.

Evaluaron su acción inmunoproliférica utilizando ratones y ovejas. El sistema ADAD combinaba el antígeno Fh15, un inmunomodulador (extracto hidroalcohólico de *Polypodium leucotomos*; PAL) y/o un adyuvante (saponinas de *Quillaja saponaria*; Qs) en una emulsión de fase externa oleosa (A/O) con un aceite no mineral (Montanide). ^[41]

En 2008, este grupo presentó un nuevo trabajo a partir de los anteriores, pero empleando esta vez la proteína Fh12 y un nuevo inmunomodulador, aminoalcohol lipídico OA0012 en el sistema ADAD en ratones y ovejas, este inmunomodulador empleado o no en combinación con extracto hidroalcohólico de *Phlebodium pseudoaureum*; PAL. ^[21]

2. Metodología

Este trabajo es una revisión bibliográfica. En primer lugar me centré en la búsqueda de libros sobre *Fasciola hepatica* en la biblioteca del Departamento de Parasitología, donde se pueden consultar libros y revistas. Un libro que me sirvió al principio como toma de contacto fue Fasciolosis, editado por J. P. Dalton. Todo el libro contenía amplia información sobre la fasciolosis, pero me centré más en el capítulo que trataba las distintas formas de vacunación contra *F. hepatica*. Además sus referencias bibliográficas me sirvieron para seguir documentándome.

También he utilizado la página web [Science Direct](#) que recoge un catálogo de las revistas científicas indexadas por especialidades asociadas a un consorcio editorial que tiene un convenio con la Universidad Complutense, donde pude encontrar los trabajos sobre las vacunas derivadas de FABP con el sistema ADAD. Utilizando en la búsqueda la palabra clave: ADAD, aparecían todos los artículos referentes a ese tema. También puse *F. hepatica*, para recopilar información más general y centrar el trabajo.

A partir de toda la bibliografía encontrada fui seleccionando la información más útil que me ayudase a enfocar el tema del trabajo hacia las vacunas experimentales derivadas de FABP con el sistema ADAD. La mayoría de la bibliografía sobre este tema se encuentra en inglés, así que ha requerido una traducción adaptada al castellano.

3. Resultados y discusión

Los resultados de los estudios experimentales demostraron que las ovejas inmunizadas con la proteína Fh12 en el sistema ADAD presentaron una reducción en el número de vermes (24,5%), menor número de huevos en la bilis (58,1%) y en heces (40,3%), comparado con el grupo testigo. Además, la proteína Fh12 fue administrada en ovejas, empleando distintos inmunomoduladores, como el OA0012 (aminoalcohol), en cuyo caso presentaron menor número de vermes, menores lesiones hepáticas y un aumento de peso después de la infección. Los resultados mostraron que los ratones inmunizados con la proteína Fh12 y formulados tanto con el inmunomodulador de síntesis química OA0012 como con PAL, presentaron un porcentaje de supervivencia de entre el 40% y el 50% en sistemas ADAD, comparado con el grupo testigo de infección.^[21]

En los estudios similares llevados a cabo con la proteína Fh15, los resultados mostraron que los ratones presentaron porcentajes de supervivencia del 40%, y el 50%; cuando se utilizó el inmunomodulador PAL solamente. Sin embargo, al utilizar PAL y Fh15 se obtuvieron porcentajes de supervivencia del 50% al 63%. En ovejas inmunizadas se presentó una reducción en el número de vermes (43%), menores lesiones hepáticas y un aumento de peso después de la infección.^[22]

4. Conclusión

El desarrollo de una vacuna experimental requiere la colaboración de investigadores pertenecientes a las distintas disciplinas científicas para poder realizar un trabajo completo y adecuado. Es un trabajo complejo y más tratándose de una vacuna frente a un helminto, ya que inmunomodulan la respuesta del organismo hospedador.

Hasta el momento no se conoce una vacuna frente a *F. hepatica* a la que se esté dando un uso a nivel mundial como inmunoprofilaxis, pero hay muchas vacunas experimentales que han utilizado los distintos antígenos de este trematodo en su desarrollo. Este trabajo se ha centrado en una de las posibles opciones que ha presentado mayor eficacia hasta el momento.

Las vacunas derivadas de FABPs en el sistema adyuvante ADAD podrían ser una buena opción para llevar a cabo la profilaxis frente a la fasciolosis. Sin embargo, en los ensayos descritos, la vía de administración era subcutánea, por lo que habría que plantearse si esta administración pudiese llegar a todos los animales. Buscar otra vía más adecuada, implicaría volver a empezar, buscando un vehículo que de estabilidad al antígeno, volviendo a realizar los ensayos, y cambiando de excipientes, es decir, el desarrollo de una nueva vacuna experimental.

El desarrollo de una vacuna que emplea un antígeno genéticamente común a varios parásitos; como es en este caso, en el que el antígeno presenta una homología con el de *Schistosoma mansoni*, puede ser de gran utilidad.

5. Referencias bibliográficas

- [1] Andrews, S. J. (1999). The Life Cycle of *Fasciola hepatica*. FASCIOSIS. J.P. Dalton, CABI: 1-43.
- [2] Kendall, S. B. (1970). “Relationships between the species of *Fasciola* and their molluscan hosts.” Adv Parasitol 8: 251-258.
- [3] Wilford, O. (1986). Phylum Platyhelminthes. Animal Parasites: Their Life Cycles and Ecology, General Publishing Company: 199-273.
- [4] Galaktionov, K. V. y A. Dobrovolskij (2004). The trematode life cycle as a system of adaptations. The Biology and Evolution of Trematodes, Kluwer Academic Publishers: 215-258.
- [5] Gunn, A. y S. Jane (2012), Helminth Parasites. Parasitology: An integrated Approach, Wiley: 86-114.
- [6] Mas-Coma, S., M. A. Valero y M. D. Bargues (2009). “Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fasciolosis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control.” Adv. Parasitol 69: 41-146.
- [7] Rojo-Vazquez, F. A., A. Meana, F. Valcarcel y M. Martinez-Valladares (2012). “Update on trematode infections in sheep.” Vet Parasitol 189(1): 15-28.
- [8] López-Abán, J., J. Pardo L, J. L. Pérez-Arellano y A. Muro (2012). Infecciones difícilmente transmisibles en el inmigrante V: Otras trematodosis. Manual de Enfermedades Importadas. Elsevier: 493-502.
- [9] Muro, A., L. Pérez del Villar, V. Velasco y J. L. Pérez-Arellano (2010). “Infecciones por trematodos.” Medicine 10(55): 3717-3728.
- [10] Dalton, J. P., M. W. Robinson, G. Mulcahy, S. M. O’Neill y S. Donnelly (2013). “Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development.” Vet Parasitol 195(3-4): 272-285.
- [11] Carmona, C., A. J. Dowd, A. M. Smith y J. P. Dalton (1993). “Capthesin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excyted juveniles.” Mol Biochem Parasitol 62(1): 9-17.

- [12] Donnelly, S., S. M. O'Neill, M. Sekiya, G. Mulcahy y J. P. Dalton (2005). "Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages." Infect Immun 73(1): 166-173.
- [13] Walsh, K. P., M. T. Brady, C. M. Finlay, L. Boon y K. H. Mills (2009). "Infection with helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses." J Immunol 183(3): 1577-1586.
- [14] Edelman, R., (1989). "Vaccine adjuvants." Rev. Infect. Dis. 2: 370-83.
- [15] Álvarez et al. (1992) Annals Psychiatry 3: 329-341.
- [16] Sempere et al (1997) J Clin Pharmacol 43: 85-89.
- [17] Cuéllar del Hoyo, C., Rodero-Martínez, M., Bolás-Fernández, F., Martínez-Fernández, A.R., (1997). "The effects of *Polypodium leucotomos* extract on the specific antibody production patterns in BALB/c mice immunized with third stage larvae antigens of *Anisakis simplex*." Int. J. Pharmacognosy 35: 153-160.
- [18] Dea-Ayuela et al. (1999) Phytotherapy Research 13: 1-5.
- [19] Nogal-Ruiz, J. J., Gómez- Barrio, A., Escario, J. A., Martínez-Fernández, A.R., (2003b). "Effect of Anapsos in a murine model of experimental trichomoniasis." Parasite 11: 23-31.
- Nogal-Ruiz, J. J., Gómez- Barrio, A., Escario, J. A., Martínez-Fernández, A.R., (2003a). "Effect of Anapsos in a murine model of experimental trichomoniasis." Parasite 10: 73-78.
- [20] Martínez-Fernández, A.R et al. (2004) J Ethnopharmacol (submitted).
- [21] López-Abán, J., Nogal-Ruiz, J. J., Vicente, B, Morrondo, P., Díez-Baños, P., Hillyer, G. V., Martínez-Fernández, A. R., San Feliciano, A., Muro, A., (2008). "The addition of a new immunomodulator with the adjuvant adaptation ADAD system using fatty acid binding proteins increases the protection against *Fasciola hepatica*." Vet. Parasitol. 153: 176-181.
- [22] López-Abán, J., Casanueva, P., Nogal, J., Arias, M., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Hillyer, G. V., Martínez-Fernández, A. R., Muro, A. (2006). "Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD." Vet. Parasitol. 145: 287-298.