



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA, ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y
QUÍMICA AGRÍCOLA**

ÁREA DE PARASITOLOGÍA

**Tesis presentada como requisito para optar al título de Doctor
de la Universidad de Salamanca**

**“Desarrollo de una vacuna contra *Fasciola hepatica* basado
en el empleo de herramientas de bioinformática”**

JOSÉ VICENTE ROJAS CARABALLO

Directores

Dr. Antonio Muro Álvarez

Dr. Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez

Dr. Julio López Abán

Salamanca, 2014



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA, ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y
QUÍMICA AGRÍCOLA**

ÁREA DE PARASITOLOGÍA

**Tesis presentada como requisito para optar al título de Doctor
de la Universidad De Salamanca**

**“Desarrollo de una vacuna contra *Fasciola hepatica* basado
en el empleo de herramientas de bioinformática”**

JOSÉ VICENTE ROJAS CARABALLO

Salamanca, 2014

*Dedicado a mis padres por su constante ayuda,
amor y apoyo incondicional...Gracias!!!*

Certificación

Dr. Antonio Muro Álvarez, Catedrático de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca, Dr. Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez, Jefe del Departamento de Biología Molecular e Inmunología de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) y Profesor Titular de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario y Dr. Julio López Abán, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Farmacia

Certifican:

*Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Desarrollo de una vacuna contra Fasciola hepatica basado en el empleo de herramientas de bioinformática**” que se presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada por D. **José Vicente Rojas Caraballo** bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Farmacia. Consideramos que la presente tesis reúne los requisitos necesarios por lo que autorizamos su presentación para ser evaluada.*

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a 17 de marzo de 2014

Antonio Muro Álvarez

Manuel A. Patarroyo Gutiérrez

Julio López-Abán

Agradecimientos

Quiero agradecer muy comedidamente a los directores de este trabajo de tesis. Dr. Antonio Muro Álvarez, por darme la oportunidad de realizar mi tesis de Doctorado en el CIETUS, así como por su valiosa orientación, aportes, enseñanzas y dedicación durante la realización de la presente tesis. También quiero agradecer su amistad, facilidad de trato y confianza. Dr. Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez, por su dedicación, consejo y aportes científicos durante la realización de este proyecto, así como su invaluable ayuda en la revisión de los artículos científicos derivados de este trabajo. Dr. Julio López Abán, especialmente por su profunda implicación en el desarrollo de los procedimientos experimentales, así como por su confianza, amistad y facilidad de trato, lo cual ha hecho verdaderamente agradable el trabajo diario de laboratorio. También quiero hacer una mención especial al Dr. Manuel Elkin Patarroyo Murillo, fundador y director de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia -FIDIC-, por sus valiosas enseñanzas, consejo y sobretodo por la excelente formación académica e investigativa, la cual ha sido fundamental para mi desarrollo profesional y científico; por el enorme orgullo que ha supuesto para mi ser miembro de su equipo científico e investigador.

Agradezco especialmente a mis padres por el constante apoyo recibido durante mi estancia en España. Por soportar estoicamente la amargura que supone ver partir a un hijo a tierras lejanas durante un tiempo indeterminado. Agradezco a la Fundación Ramón Areces por financiar este proyecto dentro del marco del "XV Concurso Nacional para la adjudicación de ayudas a la investigación científica y técnica 2008". Al Banco Santander por la concesión de una Beca para realizar estudios de Doctorado en la Universidad de Salamanca destinadas a estudiantes latinoamericanos, según convocatoria de 29 de mayo de 2013.

Agradezco al Dr. Luis Pérez del Villar por sus valiosas aportaciones en la interpretación de los resultados de este proyecto, así como por su implicación en la escritura de los artículos científicos. También le agradezco su confianza y valiosa amistad. A Belén Vicente Santiago por su implicación en el desarrollo de este proyecto, especialmente en los experimentos con animales, así como por su disponibilidad, facilidad de trato, confianza, consejo y amistad. Al investigador Darwin Andrés Moreno Pérez por sus aportaciones científicas y técnicas, así como por su gran implicación y dedicación en la interpretación de los resultados. También le agradezco su confianza y amistad. Al Departamento de Química de la FIDIC, en especial a la Dra. Magnolia Vanegas por coordinar la síntesis de los péptidos. Dra. Esther del Olmo quien nos proporcionó el inmunomodulador AA0029; le agradezco su confianza y amistad.

A todos y cada uno de los miembros del CIETUS que de alguna u otra forma han hecho sus aportaciones al desarrollo de este trabajo. Especialmente a Ana Lucya y Edward. Les agradezco su amistad, confianza y todos los buenos momentos compartidos. A todos los estudiantes con los que he tenido el privilegio de trabajar y ser parte en el desarrollo de sus Trabajos de Fin de Máster y Trabajos de Fin de grado, especialmente a Ricardo Plaza, Mayte Conejero Muriel, Daniel Hormaechea y Laura Sánchez Amador, de quienes también

aprendí gran variedad de nuevas cosas. Agradezco especialmente a Ana Belén Gómez San Miguel por su gran amistad, por su excesiva confianza y por su valiosa ayuda en momentos de dificultad: "hija mía estoy absolutamente seguro que de no haber sido por tu ayuda, seguramente no hubiera escrito estas líneas; para ti todo mi reconocimiento y un enorme sentimiento de verdadera amistad".

Finalmente quiero agradecer a todos mis amigos, de diferentes nacionalidades, a todos aquellos quienes he conocido durante este tiempo y quienes no han hecho aportaciones intelectuales a este trabajo, pero con quienes compartí diversos e inolvidables momentos de mi vida personal. Quiero expresar un agradecimiento muy especial a mi amigo Luis Bustos González, por todos los momentos compartidos, por su confianza, su consejo y su disponibilidad de ayuda en todo momento.

A ti Yami, por todo lo que ha significado el conocerte. Por todo lo vivido en este corto pero magnífico tiempo, gracias por tu amistad, tu confianza, tus deseos y tus ilusiones, pero también por tu valiosa ayuda en momentos difíciles y sobretodo por la paciencia que tienes conmigo!!!.

ABREVIATURAS

ADAD:	Adaptación / adyuvante
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico complementario
APC:	Aloficocianina; del inglés <i>Allophycocyanin</i>
ARN:	Ácido ribonucleico
BCG:	Bacilo de Calmette-Guerín
BLAST:	Herramienta de alineamiento de secuencias; del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CBSA:	Centro para el análisis de secuencias biológicas; del inglés <i>Center for Biological Sequences Analysis</i>
CTLA:	Antígeno citotóxico de linfocitos T; del inglés: <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen</i>
DCC:	Diciclohexilcarbodiimida; del inglés <i>Dicyclohexylcarbodiimide</i>
DCM:	Diclorometano
DEAE-D:	Dietilaminoetil-dextrano
DEPC:	Dietilpirocarbonato; del inglés <i>Diethylpyrocarbonate</i>
DIEA:	Diisopropiletilamina; del inglés <i>Diisopropylethylamine</i>
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF:	Dimetilformamida; del inglés <i>Dimethylformamide</i>
DMSO:	Dimetilsulfóxido; del inglés <i>Dimethylsulfoxide</i>
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético; del inglés <i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i>
ELISA:	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas; del inglés <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> .
FABP:	Proteína de unión a ácidos grasos; del inglés <i>Fatty Acid Binding Protein</i>
FCS:	Suero fetal bovino; del inglés <i>Fetal Calf Serum</i>
FhES:	Antígeno de excreción/secreción de <i>F. hepatica</i>
FIDIC:	Fundación Instituto de Inmunología de Colombia
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína; del inglés <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; del inglés <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GO:	Ontología de genes; del inglés <i>Gene Ontology</i>
GSK:	<i>Glaxo Smith Klein</i>
GST:	Glutación -S- transferasa; del inglés <i>Glutathione S-Transferase</i>
Hb:	Hemoglobina
HEPES:	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaethanosulfónico; del inglés <i>4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HMM:	Modelos ocultos de Markov; del inglés <i>Hidden Markov Models</i>
HOBt:	Hidroxibenzotriazol; del inglés <i>Hydroxibenzotriazole</i>
IEDB:	Base de datos de inmuno-epítomos; del inglés <i>Immune Epitope DataBase</i>
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleucina; del inglés <i>Interleukin</i>
IPA:	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
ISCOMs:	Complejos inmuno-estimulantes; del inglés <i>Immune Stimulating Complex</i>

KEGG:	Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto; del inglés <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LAP:	Leucina-aminopeptidasa
LAMP:	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
LPS:	Lipopolisacárido
MBHA:	Hidrocloreuro de metilbenzildrilamina; del inglés <i>methylbenzidrilamine hydrochloride</i>
MHC:	Moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad; del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MPLA:	Monofosforil-lípido A; del inglés <i>Monophosphoryl Lipid A</i>
MS:	Espectrometría de masas; del inglés <i>Mass Spectrometry</i>
MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazolio; del inglés <i>(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)</i>
NCBI:	Centro Nacional de Información Biotecnológica; del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- κ B:	Factor nuclear κ B; del inglés <i>Nuclear Factor-κB</i>
NN:	Redes neuronales; del inglés <i>Neural Networks</i>
NOD:	dominio de oligomerización de nucleótidos; del inglés <i>Nucleotide Oligomerization Domain</i>
NUSE:	<i>Normalised Unscaled Standar Error</i>
OPD:	Dihidrocloreuro de o-fenilendiamina; del inglés <i>Ortho - phenylendiamine</i>
ORF:	Marcos de lectura abiertos; del inglés <i>Open Reading Frame</i>
PAL:	Extracto alcohólico de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>
PAMP:	Patrón molecular asociado a patógenos; del inglés <i>Pathogen - Associated Molecular Pattern</i>
PBS:	Tampón salino de fosfato; del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa; del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE:	Ficoeritrina; del inglés <i>Phycoerythrin</i>
PerCP:	Proteína peridinina de la clorofila; del inglés <i>Peridinin chlorophyll protein</i>
PLGA:	Ácido poli-láctico-co-glicólico; del inglés <i>Poly (lactic-co-glycolic) acid</i>
RIN:	Valor de integridad del ARN; del inglés <i>RNA Integrity Number</i>
RMA:	Análisis robusto de <i>microarrays</i> ; del inglés <i>Robust Microarray Analysis</i>
RP-HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa; del inglés <i>Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography</i>
RPM:	Revoluciones por minuto
Qs:	Saponinas de <i>Quillaja saponaria</i> ; del inglés <i>Quillaja saponaria saponin</i>
SAM:	Significancia del análisis del <i>microarray</i> ; del inglés <i>Significance Analysis of Microarrays</i>
SOD:	Superóxido dismutasa
SP:	Péptido señal; del inglés <i>Signal Peptide</i>
SPPS:	Síntesis de péptidos en fase sólida; del inglés <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
TFA:	Ácido trifluoroacético; del inglés <i>trifluoroacetic acid</i>
TGF- β :	Factor de transformación tumoral beta; del inglés; <i>Transforming Growth Factor-Beta</i>

Th: Respuesta del tipo T ayudadora; del inglés *T-helper*
TLR: Receptor de tipo Toll; del inglés *Toll-Like Receptor*
TMHMM: Predicción de regiones transmembrana mediante modelos ocultos de Markov; del inglés *TransMembrane prediction using Hidden Markov Models*
TNF: Factor de necrosis tumoral; del inglés *Tumor Necrosis Factor*
UPLC: Cromatografía líquida de ultra-alta resolución; del inglés *Ultra-high Performance Liquid Chromatography*
VIH: Virus de inmunodeficiencia humana
WB: *Western Blot*
2D-E: Electroforesis bidimensional; del inglés *Two-dimensional Electrophoresis*

LISTADO DE TABLAS

- Tabla 1.** Principales acontecimientos históricos en el descubrimiento de *F. hepatica*.
- Tabla 2.** Clasificación de los fármacos con actividad fasciolicida de acuerdo a su estructura química.
- Tabla 3.** Eficacia de fármacos con actividad fasciolicida en distintas etapas de la enfermedad.
- Tabla 4.** Tratamiento de elección frente a la fasciolosis en cepas resistentes al triclabendazol.
- Tabla 5.** Principales grupos de adyuvantes utilizados para el desarrollo de vacunas.
- Tabla 6.** Combinación de adyuvantes empleadas en el desarrollo de vacunas.
- Tabla 7.** Distribución de ratones CD1 en grupos de inmunización para evaluar la eficacia protectora de los péptidos sintéticos seleccionados.
- Tabla 8.** Oligonucleótidos diseñados para la validación del *microarray*.
- Tabla 9.** Análisis bioinformático de las proteínas de *F. hepatica* seleccionadas para el diseño de péptidos con epítomos B y T.
- Tabla 10.** Secuencia de aminoácidos de los péptidos sintetizados.
- Tabla 11.** Determinación del efecto principal del inmunomodulador.
- Tabla 12.** Determinación del efecto principal del tipo de epítomo.
- Tabla 13.** Evaluación de la recuperación de vermes adultos y determinación de las lesiones hepáticas.
- Tabla 14.** Genes *up-regulated* y *down-regulated* más representativos de las funciones inmunológicas.
- Tabla 15.** Redes analizadas en este estudio.
- Tabla 16.** Genes *up-regulated* y *down-regulated* más representativos de las redes analizadas.

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico de *F. hepatica*.
- Figura 2.** Fasciolosis en el mundo: países con la incidencia más elevada en humanos.
- Figura 3.** Algunos ejemplos de nanopartículas empleadas como adyuvantes.
- Figura 4.** Mecanismos por los cuales las nanopartículas alteran la inducción de la respuesta inmune.
- Figura 5.** Predicción de la presencia de péptido señal empleando el algoritmo de redes neuronales
- Figura 6.** Predicción de la presencia de péptido señal empleando el algoritmo de modelos ocultos de Markov
- Figura 7.** Predicción de la presencia de región transmembrana mediante la herramienta TMHMM2.0..
- Figura 8.** Predicción de epítomos B
- Figura 9.** Predicción de epítomos T
- Figura 10.** Localización de los péptidos B y T de la proteína cathepsina B
- Figura 11.** Control de calidad de la síntesis y purificación del péptido 36493
- Figura 12.** Viabilidad celular en macrófagos tratados con los péptidos
- Figura 13.** Producción de óxido nítrico en macrófagos preestimulados con LPS
- Figura 14.** Niveles de IgG totales producidos durante el procedimiento de inmunización
- Figura 15.** Niveles de anticuerpos IgG totales en ratones inmunizados
- Figura 16.** Niveles de anticuerpos IgG1 en ratones inmunizados
- Figura 17.** Niveles de anticuerpos IgG2a en ratones inmunizados
- Figura 18.** Comparación mediante regresión lineal del efecto del AA0029 y el PAL en las subclases de IgG.
- Figura 19.** Niveles de anticuerpos IgE en ratones inmunizados
- Figura 20.** Detección del nivel de anticuerpos IgM en ratones inmunizados
- Figura 21.** Comparación de los niveles de citocinas entre el grupo de ratones vacunados con el sistema ADAD de vacunación y el grupo control sano
- Figura 22.** Diagramas de dispersión en 3 dimensiones de los niveles de citocinas para los ratones inmunizados con los péptidos con epítomos B
- Figura 23.** Diagramas de dispersión en 3 dimensiones de los niveles de citocinas para los ratones inmunizados con los péptidos con epítomos T
- Figura 24.** Gráfico de interacciones para las citocinas analizadas
- Figura 25.** Representación gráfica para analizar las interacciones
- Figura 26.** Diagrama de dispersión para comparar el efecto de PAL y AA0029 en los niveles de citocinas
- Figura 27.** Niveles de IL-4 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos
- Figura 28.** Niveles de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos
- Figura 29.** Niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos
- Figura 30.** Niveles de IL-17 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos
- Figura 31.** Análisis de *bicluster* para correlacionar los niveles de expresión de las citocinas

- Figura 32.** Gráfico de interacción para las subpoblaciones linfocitarias en ratones inmunizados
- Figura 33.** Gráfico de coordinación paralela para las subpoblaciones linfocitarias.
- Figura 34.** Perfil inmunológico obtenido en ratones inmunizados
- Figura 35.** Curvas de supervivencia de Kaplan Meier de los ratones inmunizados con los péptidos de forma individual e infectados con metacercarias de *F. hepatica*
- Figura 36.** Curvas de supervivencia de Kaplan Meier de los ratones inmunizados con combinaciones de los péptidos sintéticos e infectados con metacercarias de *F. hepatica*
- Figura 37.** Comparación de la protección en ratones no-supervivientes y ratones supervivientes inmunizados con los péptidos sintéticos
- Figura 38.** Detección de anticuerpos específicos IgG para cada grupo de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos
- Figura 39.** Detección de anticuerpos específicos contra el antígeno ES de *F. hepatica* en ratones infectados
- Figura 40.** Niveles de anticuerpos en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos e infectados con metacercarias de *F. hepatica*
- Figura 41.** Niveles de citocinas en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos e infectados con metacercarias de *F. hepatica*
- Figura 42.** Gráfico de dispersión que correlaciona los niveles de IL-4 y de IFN- γ en los ratones protegidos
- Figura 43.** Detección de anticuerpos específicos IgG en ratones inmunizados con la combinación de péptidos T14, T15 y T16
- Figura 44.** Análisis de la integridad del ARN obtenido de los esplenocitos de ratones inmunizados
- Figura 45.** Normalización de los datos de los *microarrays* mediante NUSE y control de calidad de la señal obtenida
- Figura 46.** Rutas de señalización asociadas a la respuesta inmunológica
- Figura 47.** Genes *up-regulated* y *down-regulated* que presentan la mayor expresión diferencial en las rutas de señalización con mayor número de genes diferencialmente expresados
- Figura 48.** Simbología empleada para la generación de rutas de señalización mediante IPA
- Figura 49.** Ruta de señalización de IL-8
- Figura 50.** Funciones inmunológicas que presentan el mayor número de genes diferencialmente expresados
- Figura 51.** Representación gráfica de la red denominada *Cell to cell signaling and interaction, Inflammatory response, Protein synthesis*
- Figura 52.** Representación mediante diagrama de Venn del número de genes diferencialmente expresados que participan en los tres grandes grupos de funciones inmunológicas
- Figura 53.** Amplificación de genes para la validación del *microarray*

LISTADO DE ANEXOS

- Anexo 1:** Secuencia de aminoácidos en formato FASTA de las proteínas seleccionadas mediante herramientas de bioinformática para el diseño de los péptidos que contienen epítopos B y T
- Anexo 2:** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de proteínas de familias comunes
- Anexo 3:** Control de calidad de la síntesis y purificación de los péptidos
- Anexo 4:** Síntesis del ADNc e hibridación en el *Array Mouse Gene 1.0 ST* de *Affymetrix*
- Anexo 5:** Genes diferencialmente expresados tras la inmunización de ratones BALB/c con la combinación de péptidos con epítopos T
- Anexo 6:** Subfunciones asociadas a funciones de la respuesta inmunológica
- Anexo 7:** Participación de los genes diferencialmente expresados en funciones y subfunciones de la respuesta inmunológica
- Anexo 8:** Participación de los genes diferencialmente expresados en las redes
- Anexo 9:** Artículo de investigación 1
- Anexo 10:** Artículo de investigación 2
- Anexo 11:** Solicitud de patente
- Anexo 12:** Presentación de resultados en congresos

Resumen

La infección causada por *Fasciola hepatica* es una trematodosis ampliamente distribuida en el mundo, causando importantes pérdidas económicas a nivel veterinario. Se estima que hay 17 millones de personas infectadas y que entre 91 a 170 millones de personas residen en zonas con posibilidad de adquirir la enfermedad. El triclabendazol continúa siendo el fármaco de elección para el tratamiento de la fasciolosis tanto a nivel veterinario como en humanos. La aparición de estirpes resistentes al triclabendazol hacen que la vacunación sea una prioridad para la prevención de la enfermedad.

En el presente estudio, inicialmente realizamos una búsqueda de todas las proteínas de *Fasciola hepatica* que se encontraban descritas en el servidor web del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI). Una vez obtenidas la secuencia de aminoácidos de las proteínas encontradas, seleccionamos aquellas que presentaban péptido señal y ausencia de regiones transmembrana. A partir de su secuencia de aminoácidos y haciendo uso de las herramientas de bioinformática *BepiPred* y *SYFPEITHI* diseñamos 12 péptidos con epítomos B y 12 péptidos con epítomos T, los cuales fueron sintetizados químicamente empleando una metodología de síntesis de péptidos en fase sólida.

Los estudios *in vitro* utilizando macrófagos peritoneales de ratón mostraron que los péptidos sintéticos no presentan citotoxicidad en el rango de concentraciones utilizadas en este estudio. Estudiamos la respuesta inmunológica inducida en ratones BALB/c inmunizados con los péptidos sintéticos utilizando el sistema ADAD de vacunación, previamente descrito y utilizado en nuestro grupo de investigación. Analizamos la producción de anticuerpos de los tipos IgG, IgG1, IgG2a, IgE e IgM en diferentes tiempos durante el procedimiento de inmunización, comparando el efecto tanto de los péptidos (B o T) como del inmunomodulador utilizado (AA0029 o PAL). Evaluamos los niveles de citocinas de los tipos Th1, Th2, Treg y Th17 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos, así como cambios en los niveles de subpoblaciones de linfocitos B y T y subpoblaciones linfocitarias asociadas a la generación de memoria inmunológica.

Aplicando un análisis estadístico univariante y multivariante seleccionamos los péptidos denominados B1, B2, B5, B6, T14, T15 y T16 que pertenecen a proteínas de amebaporo y catepsina B de *F. hepatica*. Además, el análisis estadístico demostró que el uso del inmunomodulador AA0029 induce, en general, una respuesta inmunológica más potente que el inmunomodulador PAL. Para los estudios de protección, los péptidos fueron administrados individualmente y, de acuerdo al tipo de respuesta inmunológica inducida, se realizaron combinaciones de los péptidos. Cuando los ratones inmunizados fueron infectados con metacercarias de *F. hepatica*, obtuvimos diferentes niveles de protección medidos como porcentaje de supervivencia, recuperación de vermes y magnitud del daño hepático. La inmunización de ratones con la combinación de los péptidos T14, T15 y T16 produjo una supervivencia del 71,4%, así como una reducción significativa en el número de vermes y en la magnitud de las lesiones hepáticas. Estos datos indican que el uso de múltiples antígenos es necesario para obtener mejores resultados de protección.

Finalmente, analizamos el transcriptoma en esplenocitos de ratones inmunizados con dicha combinación de péptidos mediante la tecnología de *microarrays* de *Affymetrix*, encontrando que la inmunización aumenta la expresión de genes implicados en rutas de señalización sobre producción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, así como de rutas de señalización de IL-12 e IL-8. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el uso de péptidos sintéticos procedentes de diferentes moléculas del parásito pueden ser posibles candidatos vacunales contra la fasciolosis causada por *F. hepatica*. Sin embargo, futuros estudios de inmunización en modelos naturales de fasciolosis deben ser realizados para validar nuestros resultados.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo I: INTRODUCCIÓN

1. Fasciolosis	3
1.1. Introducción	3
1.2. Ciclo biológico	5
1.3. Genoma, transcriptoma y proteoma	7
1.4. Epidemiología	9
1.5. Patogenia	12
1.5.1. Mecanismos de agresión	12
1.5.2. Respuesta inmune e inmunoregulación	12
1.5.3. Evasión de la respuesta inmune	15
1.6. Manifestaciones clínicas	16
1.6.1. Fase aguda	16
1.6.2. Fase crónica	16
1.7. Diagnóstico	16
1.7.1. Técnicas parasitológicas	16
1.7.2. Técnicas inmunológicas	17
1.7.3. Técnicas moleculares	17
1.8. Tratamiento	18
2. Vacunas	21
2.1. Aspectos generales	21
2.2. Adyuvantes: clasificación y mecanismo de acción	21
2.2.1. Adyuvantes derivados de productos bacterianos	23
2.2.1.1. Agonistas de TLR4	23
2.2.1.2. Agonistas de TLR9	24
2.2.1.3. Agonistas de TLR5	24
2.2.1.4. Agonistas de receptores tipo NOD	25
2.2.1.5. Toxinas de bacterias	25
2.2.2. Adyuvantes con agentes de superficie activa	25
2.2.2.1. Saponinas	25
2.2.2.2. Complejos inmunoestimulantes	26
2.2.2.3. Polímeros no iónicos	26
2.2.3. Sales de aluminio	27
2.2.4. Citocinas como adyuvantes	27
2.2.5. Emulsiones derivadas de aceites	28
2.2.5.1. Emulsiones de agua en aceite	28
2.2.5.2. Emulsiones de aceite en agua	28
2.2.6. Nanopartículas	29
2.2.6.1. Partículas similares a virus	30
2.2.6.2. Nanopartículas utilizadas como vehículos	31

2.2.6.3. Nanoemulsiones	32
2.2.6.4. Liposomas catiónicos	32
2.2.7. Combinación de adyuvantes	33
2.3. Clases de vacunas	34
2.3.1. Vacunas derivadas de patógenos inactivados	34
2.3.2. Vacunas derivadas de patógenos vivos atenuados	35
2.3.3. Vacunas basadas en subunidades	35
2.3.4. Vacunas recombinantes	36
2.3.5. Vacunas de ADN	37
2.3.6. Vacunas basadas en péptidos sintéticos	38
3. Vacunas contra <i>F. hepatica</i>	39
3.1. Vacunas derivadas de FABP's	39
3.2. Vacunas derivadas de GST's	41
3.3. Vacunas derivadas de catepsinas	42
3.4. Vacunas derivadas de LAP	44
4. Vacunas antihelmínticas derivadas de péptidos sintéticos	45
4.1. Vacunas frente a nematodos	45
4.2. Vacunas frente a cestodos	46
4.3. Vacunas frente a trematodos	47
4.3.1. Vacunas frente a <i>S. mansoni</i>	47
4.3.2. Vacunas frente a <i>F. hepatica</i>	48
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	51
Capítulo II: MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Diseño de péptidos	55
1.1. Selección de proteínas	55
1.2. Péptidos con epítomos B	55
1.3. Péptidos con epítomos T	56
1.4. Síntesis de péptidos	56
2. Estudios <i>in vitro</i>	57
2.1. Cultivo de macrófagos	57
2.2. Evaluación de la citotoxicidad	58
2.3. Producción de óxido nítrico	58
3. Inmunización de ratones BALB/c	59
3.1. Declaración ética	59
3.2. Animales de experimentación	59
3.3. Sistema ADAD de vacunación	60
3.4. Experimento de inmunización	60

3.5. Muestras	60
4. Valoración de la respuesta inmune	61
4.1. Respuesta inmune humoral	61
4.2. Respuesta inmune celular	61
4.2.1. Cuantificación de citocinas	61
4.2.2. Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias	62
4.3. Análisis estadístico	63
4.4. Selección de péptidos	64
5. Estudios de protección <i>in vivo</i>	64
5.1. Inmunización e infección experimental	64
5.2. Evaluación de la protección	65
6. Estudio de rutas metabólicas	66
6.1. Selección de antígenos	66
6.1. Inmunización de ratones BALB/c	66
6.3. Extracción de ARN de esplenocitos	66
6.4. Síntesis del ADNc y elaboración del <i>microarray</i>	67
6.5. Normalización, expresión diferencial y perfil funcional	67
6.6. Validación del <i>microarray</i>	67
6.6.1. Síntesis de ADNc	67
6.6.2. Amplificación de genes por PCR	68
Capítulo III: RESULTADOS	
1. Diseño de péptidos	71
1.1. Selección de proteínas	71
1.2. Péptidos con epítomos B	74
1.3. Péptidos con epítomos T	75
1.4. Síntesis de péptidos	77
2. Estudios <i>in vitro</i>	78
2.1. Evaluación de la citotoxicidad	78
2.2. Producción de óxido nítrico	79
3. Valoración de la respuesta inmune	80
3.1. Respuesta inmune humoral	80
3.2. Respuesta inmune celular	86
3.2.1. Cuantificación de citocinas	86
3.2.2. Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias	98
3.3. Selección de péptidos	100

4. Estudios de protección <i>in vivo</i>	101
4.1. Supervivencia de ratones CD1	101
4.2. Recuperación de vermes y lesiones hepáticas	103
4.3. Respuesta inmune humoral	105
4.4. Niveles de citocinas	107
5. Estudio de rutas metabólicas	109
5.1. Inmunización de ratones BALB/c	109
5.2. Extracción de ARN de esplenocitos	110
5.3. Normalización, expresión diferencial y perfil funcional	111
5.4. Análisis con <i>Ingenuity Pathway Analysis</i>	112
5.5. Validación del <i>microarray</i>	125
Capítulo IV: DISCUSIÓN	127
CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFÍA	143
ANEXOS	165

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

1. Fasciolosis

1.1. Introducción

Fasciola hepatica está clasificada dentro del phylum Platyhelminthes, Sub-phylum Neodermata, Clase Trematoda, Subclase Digenea, Superorden Anepitheliocystida, Orden Echinostomida y Familia Fasciolidae. Las dos especies comunmente implicadas como agentes etiológicos de la fasciolosis son: *F. hepatica* y *Fasciola gigantica*.

El conocimiento y descripción de la existencia de *F. hepatica* (conocida principalmente en la literatura como *liver fluke*) data de tiempos antiguos. Ya en el año 1379, Jean DeBrie fue el primero en advertir de la enfermedad de la putrefacción del hígado de las ovejas, mientras elaboraba un tratado sobre la gestión y producción de lana de oveja. Sin embargo, no se hace una asociación de esta enfermedad con el trematodo *F. hepatica*. Por el contrario, en esa época se especulaba que la enfermedad podía ser producida por sustancias tóxicas presentes en ciertas plantas que comían los animales (Andrews 1999).

El descubrimiento de *F. hepatica*, así como su ciclo vital en el hospedador intermediario (*Galba truncatula*) fue el producto de una serie de observaciones realizadas por varios investigadores en diferentes partes del mundo, cada uno de ellos haciendo pequeñas aportaciones, hasta llegar a comprender definitivamente el complejo y a su vez, fascinante ciclo de vida. Las primeras observaciones descritas relacionadas con la fasciolosis fueron realizadas por Sir Anthony Fitzherbert (1523) y por el físico italiano Fanensi Gabucin (1549), donde se describe la presencia de gusanos parecidos a semillas de calabaza en los vasos sanguíneos de ovejas y cabras. En esta época se creía que la aparición de la enfermedad era espontánea. El físico italiano Francesco Redi demostró en el año 1688 que la presencia de la enfermedad no era producto de la espontaneidad, sino que era debido a la puesta de huevos por parte de gusanos adultos que generaban la enfermedad. El profesor de anatomía Govert Bidloo (1686), detectó la presencia de gusanos en los conductos biliares de ovejas, ciervos y terneros y describe por primera vez la presencia de gusanos similares en el hígado de los humanos. Él también observó huevos en el interior del gusano vivo y pensó que los animales se infectaban al ingerir los gusanos o sus huevos y que estos gusanos alcanzaban el hígado a través de la sangre en vez de pasar por el intestino delgado. A finales del siglo XVIII se citaron por primera vez en la literatura las fases intermedias en el ciclo de vida del parásito. Las observaciones fueron realizadas por Johann Swammerdam (1758) mientras diseccionaba un caracol (*Paludina vivipara*), en el que observó organismos vivos que no eran originarios de éste; claramente se trataba de cercarias de algún trematodo. Posteriormente, Otto Müller (1798) encontró formas vivientes microscópicas similares a renacuajos en aguas estancadas y las denominó cercarias.

En los años posteriores se realizaron descripciones de diferentes tipos de cercarias, pero el ciclo de vida de estos gusanos aún era un misterio y nadie llegaba a imaginarse que era necesaria la presencia de más de un hospedador.

Johann Zeder en el año 1803 observó la eclosión de huevos de diferentes especies de trematodos y la liberación de un embrión ciliado en el agua. Christian Nitzsch (1807) describe por primera vez el enquistamiento de una cercaria. Él observó cómo las cercarias nadaban en el agua y después de un periodo de tiempo estas se unían a las plantas acuáticas, para luego perder su cola y posteriormente se cubrían de una sustancia gelatinosa. A pesar de todas estas observaciones realizadas por diferentes investigadores, en esta época seguía sin conocerse exactamente la relación de estas formas larvianas de los trematodos y los gusanos del hígado, debido principalmente a que la mayoría de los investigadores no trabajaban con el caracol *G. truncatula*, lo cual impedía observar los estadios larvianos de *F. hepatica* que se desarrollan en este hospedador.

Guido Wagener (1857) observó la penetración de miracidios en un caracol y el posterior desarrollo de las redias. En el año 1875 el helmintólogo alemán David Weinlad fue el primero en sugerir que los estadios larvianos del gusano del hígado se desarrollaban en el caracol *L. truncatula*, al observar dichas cercarias en el interior de este caracol. También describió por primera vez que la cercaria se enquista en las plantas acuáticas para ser comidas posteriormente por las ovejas y que estas cercarias eran, de hecho, formas juveniles del gusano del hígado. Ahora surgía la pregunta de cómo llegaban estas cercarias enquistadas al hígado y conductos biliares de los animales infectados. En 1914 el helmintólogo ruso Dimitry Sinitsin demostró que en los conejos, las formas juveniles de los gusanos, una vez liberadas en el intestino delgado, penetraban la pared intestinal y migraban hasta el hígado por la cavidad peritoneal.

Estas observaciones fueron además comprobadas por otros investigadores, entre ellos, Shirahi (1927), Susuki (1931), Shaw (1932), Schumacher (1932) y Krull y Jackson (1943). A raíz de todos estos estudios quedó claramente establecido el origen y el ciclo vital en el hospedador intermediario de *F. hepatica* como causante de la enfermedad conocida como la putrefacción del hígado, ahora fasciolosis (Kendall 1970, Wilford 1986, Andrews 1999, Kumar 1999, Galaktionov y Dobrovolski 2004, Dawes 2011, Gunn y Jane 2012).

En la tabla 1 se muestra un resumen de los principales acontecimientos históricos relacionados con el descubrimiento de *F. hepatica* y su ciclo de vida.

Año	Autor	Observación
1379	De Brie, J.	Fue el primero en observar el gusano de <i>F. hepatica</i>
1688	Redi, F.	Rechaza la teoría de la generación espontánea de la enfermedad
1737	Swammerdam, J.	Primero en observar una cercaria en un caracol
1773	Müller, O.	Observó cercarias nadando en el agua
1803	Zeder, J.	Describió la eclosión de un miracidio
1807	Nietzsch, C.	Observó el enquistamiento de una cercaria
1818	Bojanus, L.	Describió las redias y el desarrollo de cercarias
1842	Streenstrup,	Publicó la teoría de alternación de generaciones
1855	La Vellete, G.	Observó la infección de un caracol por un miracidio
1857	Wagener, G.	Observó la penetración de un caracol por un miracidio y el posterior desarrollo de la redia
1875	Weinland, D.	Sugiere que los estadios larvianos del parásito ocurren en <i>L. truncatula</i>

Año	Autor	Observación
1882	Leuckart, R. y Thomas, A.	Confirmaron que <i>L. truncatula</i> es el hospedador intermediario y es necesario para el mantenimiento del ciclo vital
1892 1893	Lutz, A.	Confirmó que los animales hervíboros adquieren la infección por la ingesta de metacercarias
1914	Sinitsin, D.	Confirmó la ruta de migración de <i>F. hepatica</i> al hígado

Tabla 1. Principales acontecimientos históricos en el descubrimiento de *F. hepatica*. (Adaptado de Andrews 1999).

1.2. Ciclo biológico

Se describen cinco etapas fundamentales durante el ciclo biológico de *F. hepatica*: *i*). Liberación de los huevos por el hospedador vertebrado y desarrollo de estos; *ii*). Eclosión de los miracidios y su posterior penetración en el caracol; *iii*). Desarrollo y multiplicación de los parásitos en el caracol; *iv*). Liberación de las cercarias y enquistamiento y; *v*). Ingestión de las metacercarias infectivas por los hospedadores definitivos y desarrollo de los gusanos adultos (Figura 1).

Cuando un hospedador definitivo está infectado con *F. hepatica*, elimina los huevos del parásito al medio ambiente a través de las heces. Los huevos de *F. hepatica* son de forma ovoide, presentan una coloración amarillo-café, miden aproximadamente 130 - 145 µm de largo por 70 - 90 µm de ancho y presentan un opérculo. El desarrollo y eclosión de los huevos se ve afectado por diferentes factores físicos y químicos, principalmente temperatura, humedad, presencia de oxígeno y pH. Se ha demostrado que la temperatura más favorable para el desarrollo de los huevos es de 23°C - 26°C y bajo estas condiciones los huevos son embrionados durante 2 - 3 semanas a un pH de 7,0. La eclosión de los huevos está fuertemente influenciada por las condiciones de luz y de temperatura, sin embargo, los mecanismos precisos por los cuales estos dos factores facilitan la eclosión permanecen inciertos. Los miracidios que eclosionan de los huevos miden aproximadamente 130 µm y presentan una gran movilidad gracias al tegumento ciliado. Estos miracidios nadan a una gran velocidad y deben encontrar los hospedadores intermediarios (caracoles) en un tiempo no mayor de 24 horas, de lo contrario morirán.

Los mecanismos que intervienen en la localización y penetración del miracidio en el caracol son múltiples. Entre los más destacados se encuentra la presencia de moléculas estimulantes en la mucosa de los caracoles, tales como glucosa, aminoácidos y varios lípidos. El miracidio penetra en el molusco, pierde los cilios y se transforma en esporocisto. A partir de los esporocistos se desarrollan las redias y estas a su vez se transforman en cercarias. Se estima que a partir de un miracidio se pueden desarrollar cerca de 600 cercarias, mediante multiplicación partenogenética. Las cercarias poseen una cola propulsora con la que nadan activamente al principio y al poco tiempo pierden la cola y se enquistan, dando lugar a las metacercarias, que se fijan a las plantas acuáticas. Sus glándulas cistógenas segregan una sustancia que las cubre y protege del medio hasta que son ingeridas por el hospedador definitivo. La infección del hospedador definitivo se adquiere al ingerir metacercarias adheridas a plantas comestibles o flotantes en el agua.

En el tiempo de una hora después de la infección, las metacercarias se desenquistan en el intestino delgado. Una hora más tarde, estas metacercarias han perforado la pared intestinal para migrar a la cavidad peritoneal y perforando la cápsula de Glisson penetran en el parénquima hepático. Luego migran hacia el interior del hígado causando hemorragia y fibrosis. Durante esta etapa ocurre el mayor crecimiento del parásito.

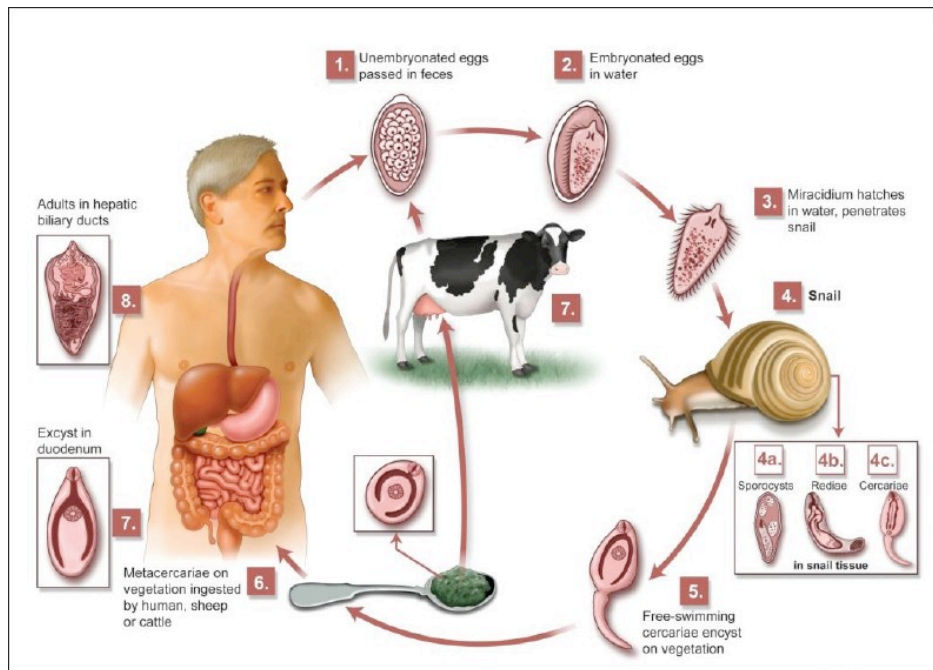


Figura 1. Ciclo biológico de *F. hepatica*. (Tomado de Dusak *et al* 2012).

Los parásitos alcanzan los conductos biliares aproximadamente siete semanas después de la infección, sitio en el cual se establecen hasta completar su madurez. En algunas ocasiones, los parásitos juveniles pueden ser encontrados en localizaciones anatómicas no comunes a la infección por *F. hepatica*, tales como pulmones, páncreas, ganglios linfáticos y timo. Ocho semanas después de la infección, los huevos se pueden encontrar en la bilis y posteriormente en las heces, completando de esta forma el ciclo de vida. Un adulto de *F. hepatica* puede vivir, inclusive, por varios años en el hígado del hospedador definitivo y producir cerca de 20.000 huevos cada día (Kendal 1970, Wilford 1986, Andrews 1999, Galaktionov y Dobrovolskij 2004, Gunn y Jane 2012, López-Abán *et al* 2012).

1.3. Genoma, transcriptoma y proteoma

La secuencia de los genomas de diferentes agentes patógenos, entre ellos varios helmintos, ha sido descrita en los últimos años. Esta valiosa información ha permitido hacer un avance significativo en el entendimiento de las relaciones existentes entre el parásito y su hospedador, así como en la búsqueda e identificación de moléculas implicadas en los procesos de invasión, moléculas implicadas en la generación de resistencia a los fármacos y moléculas que puedan ser utilizadas como candidatas a vacuna para prevenir su transmisión (Berriman *et al* 2009, Kikuchi *et al* 2011, Tsai *et al* 2013, Zheng *et al* 2013).

El genoma de *F. hepatica* no se ha completado todavía, sin embargo, numerosos esfuerzos se están realizando actualmente para conseguirlo. El instituto *The Wellcome Trust Sanger Institute*, está llevando a cabo un enorme proyecto con el fin de secuenciar los genomas de 50 helmintos, incluyendo *F. hepatica* (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Helminths>). Este mismo instituto también ha reportado datos preliminares del transcriptoma de *F. hepatica*, encontrando un total de 6.819 secuencias de ADN complementario (ADNc) que pueden ser transcritas. Sin embargo, este número puede resultar irrisorio si se compara con las 310.000 secuencias de ADNc encontradas para *S. mansoni* en la base de datos SchistoDB (Zerlotini *et al* 2009). El transcriptoma de *F. hepatica* ha sido más ampliamente estudiado en los últimos años (Young *et al* 2010). Empleando una tecnología de secuenciación denominada 454-Roche (Margulies *et al* 2005), a partir de ácido ribonucleico (ARN) de *F. hepatica* obtenido de gusanos adultos extraídos de los conductos biliares de una oveja infectada naturalmente, se lograron identificar 44.597 secuencias con marcos de lectura abiertos (ORF's) que codifican para proteínas de *F. hepatica*.

Este transcriptoma fue posteriormente anotado, y se realizó un análisis de secuencias mediante la herramienta de alineamiento de secuencias (BLAST), empleando las secuencias disponibles en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) y en SchistoDB (<http://schistodb.net/schistodb20/>) para *S. mansoni*, así como para *S. japonicum* (<http://lifecenter.sgst.cn/sjapathdb/data.html>), para encontrar proteínas ortólogas y parálogas con estos organismos. Las proteínas también fueron agrupadas de acuerdo a su perfil funcional empleando Ontología de Genes (GO) (<http://geneontology.org>) y su participación en rutas de señalización se realizó empleando la Enciclopedia de Genes y Genomas Kyoto (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Este estudio evidenció la gran similitud en las proteínas de *F. hepatica* y de *S. mansoni*, tanto a nivel de la secuencia de aminoácidos, como a nivel estructural y funcional. Además, este estudio proporciona las bases para un mejor entendimiento de la biología de este parásito, así como su conocimiento a nivel molecular.

Aunque los datos del genoma y del transcriptoma de *F. hepatica* siguen siendo escasos, en lo que al proteoma se refiere, diversos estudios han sido llevados a cabo y en la actualidad éste se encuentra bien descrito. Los estudios del proteoma de *F. hepatica* se han realizado empleando diferentes fases del ciclo biológico. La técnica más comúnmente utilizada para el estudio de los proteomas es la separación de las proteínas por electroforesis

bidimensional (2D-E) y posterior análisis por espectrometría de masas (MS). Recientemente se ha llevado a cabo la caracterización del proteoma de la superficie del tegumento de adultos de *F. hepatica*, empleando técnicas de obtención de proteínas previamente descritas para *S. mansoni*. De esta forma, se han obtenido diferentes extractos de proteínas de acuerdo a su solubilidad en diferentes tampones, tales como el ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaethanosulfónico) (HEPES), urea y tiourea. Se encontró que la organización celular del tegumento de *F. hepatica* y de *S. mansoni* son similares, aunque se evidencian algunas diferencias morfológicas importantes. Así, se lograron identificar un total de 229 proteínas. Un análisis del perfil funcional de estas proteínas, permitió su clasificación en los siguientes grupos principales: citoesqueleto (18), defensa (12), metabolismo (12), función desconocida (11), proteínas de unión a calcio (12), chaperonas (7), proteasas e inhibidores (7), mitocondria (3), membrana (2), secreción (2) y nuclear (1) (Wilson et al 2011). En otro estudio también se analizaron las proteínas presentes en la superficie y proteínas internas del parásito, así como su abundancia relativa, empleando una técnica de cromatografía líquida de ultra-alta resolución a escala nano (UPLC) acoplada a MS. En este estudio se identificaron un total de 64 proteínas en las dos preparaciones utilizadas. Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP's) se encontraron de forma mayoritaria en la superficie del parásito, siendo la FABP1 la más abundante. También se identificó la proteína glutatión S-transferasa (GST) como componente mayoritaria del tegumento, siendo estas proteínas consideradas como candidatos a vacuna contra la fasciolosis (Hacariz et al 2012).

También se ha caracterizado el proteoma de las formas juveniles del parásito, encontrándose que la mayoría de ellas son proteínas que participan en proteólisis (44%), siendo la mayoría de estas proteínas pertenecientes al grupo de las catepsinas y legumaina. El siguiente grupo de proteínas más abundantes corresponde a agentes de detoxificación, energía y metabolismo (16.9%). En este grupo se encuentran mayoritariamente la enolasa, tioredoxina y malato deshidrogenasa (Hernández-González et al 2010). Los productos de excreción/secreción de *F. hepatica* también han sido estudiados utilizando cultivos *in vitro* en diferentes tiempos, empleando electroforesis bidimensional. Con esta técnica se lograron identificar 25 proteínas principales que tienen un peso molecular aproximado a los 30 kDa y un punto isoeléctrico entre 5 y 6. La mayoría de las proteínas identificadas corresponden a catepsinas.

Como en estudios anteriores, también se identificó la enolasa, GST, tioredoxina y proteínas de unión a ácidos grasos como componentes mayoritarios del proteoma (Morphew et al 2007). Como es bien sabido, *F. hepatica* y *S. mansoni* tienen antígenos que son comunes entre estas especies y algunos de ellos han mostrado reactividad cruzada y eficacia protectora combinada. Por esta razón, también ha despertado un gran interés el utilizar herramientas de proteómica para caracterizar los antígenos que son comunes a estas dos especies parasitarias, a fin de proponer nuevos candidatos vacunales. La caracterización de los proteomas de estas dos especies parasitarias a partir de gusanos adultos permitió la identificación de 361 proteínas de *F. hepatica* y 433 de *S. mansoni*. El análisis electroforético bidimensional reconoció 28 proteínas que son comunes a ambos parásitos, de las cuales 10 proteínas estaban mayormente expresadas en *S. mansoni*, 9 en *F. hepatica*

y las otras 9 presentaban niveles de expresión similares. La identificación de estas proteínas por MS produjo resultados similares a los obtenidos en estudios previos, siendo las proteínas de unión a ácidos grasos, catepsinas, tioredoxina y GST's las proteínas mayoritarias presentes en ambos proteomas. Un análisis por Western Blot (WB) permitió establecer que las 28 proteínas comunes entre *F. hepatica* y *S. mansoni* presentan reactividad cruzada y por consiguiente son importantes dianas para el desarrollo de vacunas comunes frente a estas parasitosis (Boukli *et al* 2011).

1.4. Epidemiología

En el periodo comprendido entre 1970 - 1990 sólo se describieron 2.000 casos de fasciolosis humana a nivel mundial (Chen y Mott 1990). Sin embargo, durante los últimos años la epidemiología de la fasciolosis humana ha cambiado considerablemente y el número de casos registrados se ha incrementado desde 1990 y ahora es considerada como una enfermedad reemergente a nivel mundial.

En España, los casos de fasciolosis humana son esporádicos, hasta tal punto que esta enfermedad estuvo incluida en la lista de enfermedades raras descritas por el Instituto de Investigación de Enfermedades Raras perteneciente al Instituto de Salud Carlos III. Al contrario, la fasciolosis que afecta a animales de granja (ovinos, bovinos y caprinos) es más prevalente en España (Rojo-Vásquez *et al* 2012) (Mas-Coma *et al* 2009). La distribución geográfica de las dos especies de *Fasciola* es bien distinta, estando *F. hepatica* distribuida más ampliamente en el mundo, principalmente en Europa, África, Asia, América y Oceanía; mientras que *F. gigantica* concentra su distribución geográfica en África y Asia, aunque también se ha detectado su presencia en zonas de Europa y Rusia (Mas-Coma y Bargues 1997). Si bien es conocido el origen europeo de *F. hepatica*, la incidencia de casos de fasciolosis humana ha sido puesta de manifiesto en 51 países de los cinco continentes, estimándose en más de 17 millones de personas infectadas y existiendo cerca de 90 millones de personas que viven en zonas de riesgo de contraer la enfermedad.

La expansión de *F. hepatica* alrededor del mundo se ha debido principalmente a la exportación de ganado a otros continentes, donde los gusanos de *F. hepatica* se han adaptado fácilmente a otras especies de mamíferos propias de esas zonas.

Así, por ejemplo, *F. hepatica* se ha adaptado a camélidos en África y el Sur de América y algunos marsupiales en Australia. Esta capacidad de *F. hepatica* para adaptarse a otras especies, se ha puesto de manifiesto encontrándose en ratas negras (Valero *et al* 1998, 2002), nutrias (Menard *et al* 2001) y cerdos (Mas-Coma *et al* 1997). Todo esto hace que los reservorios de la enfermedad sean cada vez mayores, aumentando de esta forma la transmisión de la fasciolosis. Otro factor importante en la distribución mundial de la fasciolosis se debe al hecho de que el parásito también ha sido capaz de adaptarse fácilmente a diferentes especies de caracoles lymneidos. En este sentido, la especie principal responsable para la transmisión de *F. hepatica* es *Galba truncatula*, desempeñando un papel muy importante en la distribución mundial de la fasciolosis, ya que estos caracoles habitan en charcas o aguas que se forman, por ejemplo, en la sesión

de lluvias, y se ha detectado su presencia en los cinco continentes. Por otra parte, el lymneido responsable para la transmisión de *F. gigantica* (caracoles del género *Radix*) vive preferiblemente en aguas estancadas y profundas, ricas en vegetación acuática y su presencia se limita a determinadas localizaciones geográficas. La prevalencia de los casos de fasciolosis humana hay que interpretarlos teniendo en cuenta algunas consideraciones muy importantes; en primer lugar, no todos los casos de fasciolosis humana diagnosticados son descritos en la literatura internacional, muchos de ellos quedan consignados simplemente en reportes internos, tesis o publicados en revistas locales de limitada difusión internacional. También se debe tener en cuenta el hecho de que la fasciolosis no es una enfermedad de declaración obligatoria en varios países del mundo (Mas-Coma 2005). No se debe olvidar que la infección por *F. hepatica* puede llegar a ser asintomática, dando como resultado que muchos casos de fasciolosis no sean diagnosticados.

Además, algunos pacientes no acuden oportunamente a los servicios médicos. Por lo tanto, el número de casos de fasciolosis puede ser mucho mayor que el descritos en la bibliografía. De acuerdo a la prevalencia de la fasciolosis humana, se ha realizado la siguiente clasificación epidemiológica (Mas-Coma *et al* 1999):

Fasciolosis importada: Corresponde a aquellos casos humanos que son diagnosticados en una zona donde no hay presencia de *F. hepatica*, pero que adquirieron la infección en un área donde existe la transmisión por *F. hepatica*.

Fasciolosis autóctona: Están incluidos los casos humanos que adquirieron la infección en la zona donde viven regularmente y donde también hay presencia de fasciolosis animal. Se caracteriza porque los casos humanos sólo aparecen esporádicamente y no son constantes.

Fasciolosis endémica: Este tipo de fasciolosis se clasifica además en tres grupos diferentes de acuerdo a su prevalencia en la población total diagnosticada por métodos parasitológicos directos:

Fasciolosis hipoendémica: Cuando la prevalencia es menor del 1% y se observan menos de 50 huevos por gramo de heces. La participación de la población humana en la distribución de la enfermedad es casi despreciable.

Fasciolosis mesoendémica: Cuando la prevalencia de la enfermedad se encuentra entre el 1% – 10% y la parasitemia oscila entre 50 – 300 huevos por gramo de heces. La participación del ser humano en la distribución de la enfermedad está asegurada. Las condiciones sanitarias de estas zonas pueden incluir o no letrinas y las personas pueden defecar en zonas de campo abiertas.

Fasciolosis hiperendémica: Ocurre cuando la prevalencia de la enfermedad supera el 10% y se encuentran más de 300 huevos por gramo de heces, aunque también es frecuente encontrar cantidades mayores de 1.000 huevos por gramo de heces. En este caso la distribución de la enfermedad en personas es relevante. Estas zonas carecen de servicios sanitarios adecuados y la defecación en campos abiertos es una práctica muy común.

Hablando en términos de la prevalencia de la fasciolosis en el mundo, los países más afectados son los Andinos (Bolivia, Perú, Chile y Ecuador), Caribe (Cuba), Norte de África (Egipto), Europa Occidental (Portugal, Francia y España) y los del Mar Caspio (Irán y países vecinos). Específicamente, la zona más afectada de Bolivia con fasciolosis humana corresponde al Altiplano Norte (Mas-Coma *et al* 1995), donde la prevalencia es superior al 72%, y en donde se han encontrado mas de 5.000 huevos por gramo de heces (Hillyer *et al* 1992, Esteban *et al* 1997). También se han descrito prevalencias muy altas en Perú, en el Altiplano Puno (Esteban *et al* 2002), el Valle de Cajamarca y el Valle Mantaro (Marcos-Raymundo *et al* 2004). En la figura 2 se muestra la distribución geográfica de *F. hepatica*, donde se muestran las áreas de mayor endemicidad en humanos (López-Abán *et al* 2012).

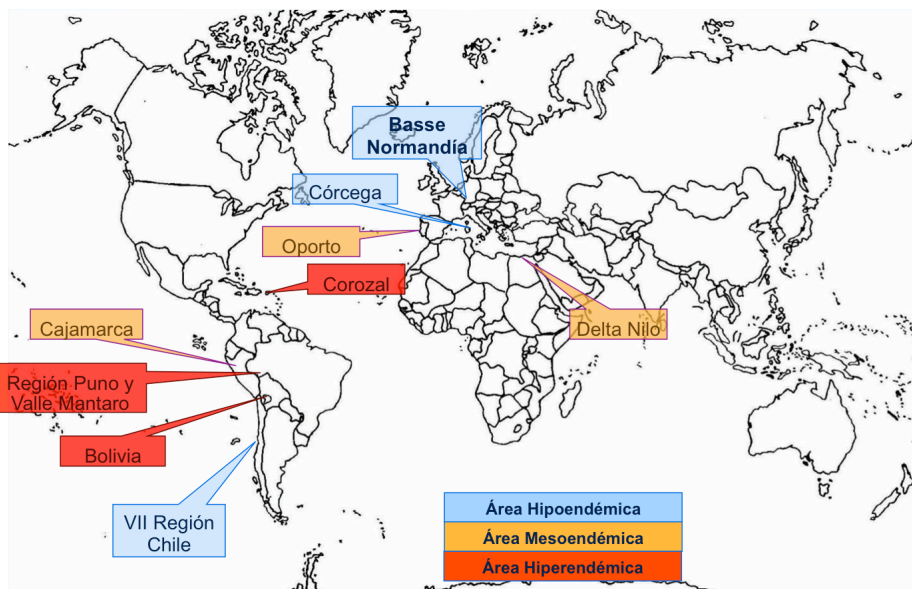


Figura 2. Fasciolosis en el mundo: países con la incidencia más elevada en humanos. (Tomado de López-Abán *et al* 2012).

Respecto a los países europeos, Francia está considerado como el país con la mayor incidencia de fasciolosis. El número de casos puede variar por razones que se han mencionado anteriormente, pero lo cierto es que el número de casos publicados es mucho menor a los que realmente ocurren. Portugal ocupa el segundo lugar de acuerdo al número de casos registrados. Se estima que en la zona Norte del país es donde se presenta la mayoría de los casos. En España, se cree que los casos de fasciolosis humana también son mayores a los descritos. Los casos de fasciolosis se concentran principalmente en la zona norte del país, en las comunidades del País Vasco, Castilla y León, Cantabria, Navarra y La Rioja (Mas-Coma 2005). En los últimos años el número de casos importados también ha aumentado, principalmente por los movimientos migratorios poblacionales.

Además, se ha visto que los casos de fasciolosis humana no se relacionan con la presencia de fasciolosis animal en zonas hiperendémicas. En el continente africano, Egipto se encuentra como el país con el mayor número de casos de fasciolosis, específicamente en el Delta del Nilo, de acuerdo con un estudio de campo realizado entre los años 1996 - 2000, siendo los distritos de Abu El Matamir, Abu Homos y Delengat los más afectados, con una prevalencia media cercana al 8% (Curtale *et al* 2000, 2003). En los países del continente asiático, el mayor número de casos de fasciolosis se encuentra en Irán, específicamente en las provincias de Kurdistan, Zandjan, Kermanshah, Manzadaran, Tehran, Azarbaijan y Gilan (Mas-Coma 2005).

1.5. Patogenia

1.5.1. Mecanismos de agresión

Tras la ingestión de las metacercarias, los vermes juveniles liberados atraviesan la pared intestinal para migrar a través del parénquima hepático y llegar a su localización definitiva en los conductos biliares. El daño durante su proceso migratorio se debe a factores mecánicos como la abrasión que causan sus espículas o la succión originada por sus ventosas. Durante este proceso el parénquima hepático sufre una extensa destrucción con intensas lesiones y hemorragias causadas tanto por los vermes inmaduros como por la reacción inflamatoria e inmunológica desencadenada. Además se pueden producir infecciones bacterianas secundarias que pueden originar peritonitis. Los vermes adultos se localizan principalmente en los conductos biliares, pero pueden encontrarse en el conducto cístico, la vesícula biliar, la ampolla de Vater o el colédoco. Los conductos biliares interlobulares se observan dilatados y esclerosados, presentan hiperplasia y obstrucción del flujo biliar (Muro *et al* 2010, López-Abán *et al* 2012).

1.5.2. Respuesta inmune e inmunoregulación

A pesar de que uno de los grandes retos en el estudio y el entendimiento de la inmunología de las infecciones causadas por parásitos sigue siendo el desarrollo de vacunas, no se puede olvidar la importancia que tiene el estudio de la función y regulación de los diferentes subtipos de linfocitos T, así como las citocinas que estos producen, a fin de comprender más claramente las interacciones inmunológicas que existen entre el hospedador y el parásito y así poder definir el tipo de respuesta inmunológica inducida tras la infección, lo cual ha permitido a los parásitos adaptarse a los hospedadores definitivos, siendo capaces de vivir en ellos durante prolongados periodos de tiempo, así como de evadir la respuesta inmunitaria generada contra ellos por el hospedador definitivo. Los helmintos son organismos macroscópicos, que pueden medir desde unos pocos centímetros hasta inclusive metros. Debido a esto, estos organismos no invaden células, por el contrario, los helmintos se unen a los tejidos e incluso los invaden, lo cual hace que

la respuesta inmune generada por el hospedador sea diferente de aquella producida por infecciones con microorganismos. 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 del hospedador definitivo, a fin de favorecer su propia supervivencia. En infecciones causadas por helmintos, las células del sistema inmune innato son activadas y generan una respuesta inmunitaria que se ve claramente influenciada por la presencia del parásito, dando como resultado la generación de fenotipos celulares que favorecen la diferenciación de células del tipo Th2, que producen principalmente las citocinas IL-4, IL-5, IL-13, las cuales a su vez estimulan la producción de anticuerpos del tipo IgG1, IgE e IgA. Al mismo tiempo, la diferenciación de células del tipo Th1 que producen IFN- γ , las cuales deberían inducir respuestas protectoras se ven altamente suprimidas (van Riet *et al* 2007, Allen y Maizels 2011, McSorley *et al* 2013).

Cuando la infección por helmintos alcanza etapas más avanzadas y se establece en el tiempo, se produce la denominada infección crónica. En ese momento, el fenotipo Th2 aún permanece mediante la secreción de IL-4 y de la misma forma lo hace el fenotipo T regulador (Treg), mediante la secreción de IL-10. El fenotipo Treg se ve favorecido y se genera otra serie de subpoblaciones celulares encargadas de secretar IL-10, TGF- β , que a su vez expresan el antígeno citotóxico de linfocitos T (CTLA) (Dalton *et al* 2013). Las células Treg juegan un importante papel, ya que suprimen el desarrollo de células tipo Th1 y además regulan la magnitud de la respuesta Th2, que previene los daños en los tejidos del hospedador (Hill *et al* 2007), principalmente por la migración y alimentación de los helmintos.

También se ha propuesto que en infecciones por helmintos, el hospedador definitivo prefiere suprimir las respuestas destructivas para el parásito del tipo Th1, a cambio de generar una respuesta Th2 que eficazmente previene el daño y cura los tejidos (Allen y Maizels 2011, Allen y Wynn 2011). A pesar de lo mencionado anteriormente, no en todas las infecciones por helmintos se genera una respuesta del tipo Th2 en fases tempranas de la infección y se encuentran algunas excepciones (Maizels y Yazdanbakhsh 2003). En infecciones producidas por *Schistosoma spp*, la infección temprana producida por la fase larvaria de cercaria estimula respuestas del tipo Th1 en el modelo de ratón. Solamente cuando la infección ha progresado y ocurre la liberación de huevos por los gusanos adultos, se produce un cambio en la respuesta, favoreciendo ahora la diferenciación del fenotipo Th2, la cual es inducida por los antígenos del huevo del parásito (Pearce y MacDonald 2002). También se ha observado un comportamiento similar en la infección causada por *Brugia malayi* en el modelo de ratón, donde las microfilarias recién producidas inducen una respuesta Th1 y posteriormente los adultos hembra promueven la diferenciación del fenotipo Th2 (Lawrence *et al* 1994). En el caso de *F. hepatica*, una vez que el parásito atraviesa la pared intestinal ocurre una compleja red de interacciones moleculares entre el parásito y diferentes células del sistema inmune del hospedador definitivo, como lo son las células dendríticas, macrófagos y mastocitos. 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 T reguladora, que favorece la supervivencia y adaptación del parásito.

Un adulto de *F. hepatica* puede vivir en sus hospedadores entre uno y dos años, y hasta 20 años en las ovejas (Andrews 1999, Dalton *et al* 2013). En el modelo de ratón se ha visto que en un periodo aproximado de 4 horas después de la infección, ocurre el desenquistamiento de la metacercaria en el duodeno. En este momento ocurre el primer ataque del sistema inmune del hospedador al parásito, mediante la generación de inmunoglobulinas que intentan ejercer un mecanismo efector. 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 (Carmona *et al* 1993, Berasain *et al* 1997, 2000). Cuando han transcurrido 24 horas después de la infección, se ha visto que los macrófagos peritoneales expresan marcadores del fenotipo Th2, acompañados con una reducción en la respuesta del tipo Th1. Simultáneamente, en esta fase temprana de la infección, los parásitos liberan una serie de moléculas inmunomoduladoras que tienen influencia en la función de las células del sistema inmune innato, como son células dendríticas y macrófagos que se encuentran en la pared intestinal y en la cavidad peritoneal (Donnelly *et al* 2005, 2008).

Una vez que la infección se ha establecido, se produce la secreción de las citocinas del tipo Th2 IL-4, IL-5 e IL-13 en los esplenocitos y en etapas más avanzadas de la infección (3 semanas), se producen las citocinas regulatorias IL-10 y TGF- β por los macrófagos, así como IL-10 producida por 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 citocina reguladora hace que haya una supresión de las respuestas del tipo Th1 y Th2 que son ineficaces contra el parásito (Walsh *et al* 2009).

Al igual que en el modelo de fasciolosis en ratón, la fasciolosis crónica en el ganado también presenta una respuesta inmunológica preferente del tipo Th2 con supresión de la respuesta del tipo Th1. Los estudios serológicos han demostrado que el ganado presenta elevados niveles de IgG1 y poco o nada de IgG2a (Mulcahy *et al* 1998, 1999, Hoyle y Taylor 2003) y la susceptibilidad a *F. hepatica* estaba relacionada con un aumento en la proporción de IgG1/IgG2a, así como de IL-4/IFN- γ (Pleasant *et al* 2011). Una consecuencia directa de la inmunoregulación/inmunosupresión del hospedador definitivo infectado con *F. hepatica* es su elevada susceptibilidad a desarrollar nuevas patologías causadas por otros agentes infecciosos oportunistas, al ser incapaz de generar una respuesta inmune eficaz. Por ejemplo, en infecciones donde se requiere una respuesta tipo Th1 para controlar o eliminar un agente infeccioso. Específicamente, se ha visto que ratones infectados con *F. hepatica* y coinfectados con *Bordetella pertussis* no son capaces de desarrollar una respuesta del tipo Th1, los cuales en ausencia de una infección con *F. hepatica* controlarían eficazmente la infección en un periodo aproximado de seis semanas. Estos ratones coinfectados con *F. hepatica* tampoco son capaces de generar una respuesta del tipo Th1 tras la inmunización con los componentes de la pared celular de la bacteria *B. pertussis* (Brady *et al* 1999, O'Neill *et al* 2000). Recientemente también se ha demostrado que los antígenos del tegumento de *F. hepatica* inhiben la generación de una respuesta Th1 protectora por parte de los mastocitos frente a la infección con *B. pertussis* (Vukman *et al* 2013).

Este comportamiento no se puede extrapolar a coinfecciones con todos los patógenos. La infección con *F. hepatica* no es capaz de inhibir la respuesta del tipo Th1, con elevada producción de IFN- γ que es producida por el protozoo *Toxoplasma gondii*, produciéndose así una ausencia de la respuesta típica Th2 producida por infecciones con helmintos (Miller *et al* 2009). Finalmente, en estudios de campo realizados en Irlanda para determinar la tasa de infección del ganado por *Mycobacterium bovis*, se encontró que en los animales coinfectados con *F. hepatica*, el test basado en la producción de IFN- γ en células de sangre periférica reportó un falso negativo debido a la incapacidad de estas células para producir IFN- γ (Flynn *et al* 2009). En algunos casos de pacientes humanos, la infección con helmintos puede ser beneficiosa si existe coinfección con otros microorganismos. Se ha visto que pacientes infectados con helmintos reducen considerablemente los procesos inflamatorios en infecciones con *Helicobacter pylori* (Fox *et al* 2000) y *Plasmodium falciparum* (Nacher *et al* 2001). También se ha descrito una disminución en la reactividad de muchos alérgenos que afectan la piel en niños que están infectados con *Schistosoma haematobium* (van den Biggelaar *et al* 2010).

1.5.3. Evasión de la respuesta inmune

F. hepatica ha desarrollado diferentes mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedador. La ubicación final de los gusanos adultos en los conductos biliares se puede interpretar como una estrategia de evasión parasitaria, ya que son sitios inmunológicamente inaccesibles. Sus antígenos y huevos son excretados con la bilis, lo que también los protege de una eventual respuesta. El tegumento desempeña un papel vital en la evasión del parásito y está formado principalmente por el glucocálix. Este cambia su composición química durante las etapas de maduración y migración del gusano.

En la adolescencia, el cambio ocurre aproximadamente cada 3 horas y esto lleva a que las células efectoras ligadas a anticuerpos, como los eosinófilos y neutrófilos no tengan suficiente contacto con el parásito, y por lo tanto no puedan atacarlo. Las formas juveniles son altamente resistentes a ser destruidas por el complemento. Esto puede deberse a la presencia de residuos terminales de ácido siálico en las glicoproteínas de superficie, los cuales inactivan la vía alterna del complemento. *F. hepatica* también posee mecanismos para neutralizar el óxido nítrico y los radicales libres de oxígeno, enzimas como super-óxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y GST están implicadas. *F. hepatica* produce moléculas que suprimen o modulan las respuestas inmunológicas del hospedador. Se ha demostrado que catepsinas L y B rompen inmunoglobulinas, lo que evita la respuesta de las células efectoras mediada por anticuerpos (Muro *et al* 2010, López-Abán *et al* 2012).

1.6. Manifestaciones clínicas

1.6.1. Fase aguda

La fase aguda o invasiva se debe principalmente a la migración de los vermes por el peritoneo y por el parénquima hepático, causando destrucción mecánica, reacciones alérgicas y tóxicas que duran entre dos y cuatro meses. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son fiebre, dolor abdominal generalmente localizado en el hipocondrio derecho, trastornos gastrointestinales con pérdida del apetito, flatulencia, náuseas, diarrea y a veces estreñimiento, asociados a urticaria y síntomas respiratorios como tos, disnea y dolor torácico. En la exploración física se puede observar hepatomegalia, ascitis e ictericia. Los datos analíticos revelan leucocitosis, eosinofilia, anemia y aumento de la actividad sérica de enzimas hepáticas (Muro *et al* 2010, López-Abán *et al* 2012).

1.6.2. Fase crónica

La fase crónica u obstructiva se puede desarrollar en meses o años después de la infección. En ella los vermes adultos se alojan en los conductos biliares provocando inflamación e hiperplasia del epitelio y engrosamiento y dilatación de los conductos biliares y la vesícula biliar, causando colangitis, colecistitis y generalmente obstrucción de los conductos biliares. Se puede observar hepatoesplenomegalia y ascitis. Los datos analíticos muestran leucocitosis, eosinofilia, anemia leve, aumento de la actividad de las enzimas hepáticas, hipoalbuminemia e hipergammaglobulinemia (Muro *et al* 2010, López-Abán *et al* 2012).

1.7. Diagnóstico

El diagnóstico de la fasciolosis humana presenta importantes inconvenientes, debidos principalmente a la falta de síntomas específicos y a un largo periodo de latencia en el que no se detecta la presencia de huevos del parásito. Los métodos más comúnmente utilizados para la detección de *F. hepatica* son dos: parasitológicos e inmunológicos. Sin embargo, también existen métodos moleculares basados en la detección del ADN parasitario mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cuales no se utilizan de forma rutinaria.

1.7.1. Técnicas parasitológicas

El método más utilizado para el diagnóstico de *F. hepatica* en el hospedador definitivo es la detección de huevos de esta especie parasitaria en muestras de heces mediante examen coproparasitario, utilizando métodos de sedimentación (López-Abán *et al* 2012).

F. hepatica presenta una fase de huevo con morfología ovoide, generalmente de color verde-amarillento, debido al contacto previo con la bilis, y de un tamaño medio entre 60 – 80 µm de ancho por 130 – 150 µm de largo. El método de diagnóstico parasitológico tiene la ventaja de que es rápido y barato. Sin embargo, el principal inconveniente que presenta es que sólo es de utilidad en la fase crónica de la enfermedad, ya que *F. hepatica* sólo produce y elimina huevos en las heces del hospedador definitivo 3 – 4 meses después de la infección. En zonas de alta prevalencia de fasciolosis animal se puede producir además, la detección de una falsa fasciolosis debido a la ingesta de hígado de bovinos con huevos de *F. hepatica* (Taira *et al* 1997).

1.7.2. Técnicas inmunológicas

La detección de anticuerpos frente a antígenos de *F. hepatica* presenta una elevada sensibilidad y la ventaja de hacer un diagnóstico en la fase aguda de la enfermedad. La detección de anticuerpos se realiza principalmente por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El diagnóstico de la fasciolosis tanto en humanos como en ganado se ha realizado de forma convencional mediante el uso de diferentes antígenos de *F. hepatica*, como lo son el antígeno excretor/secretor (Espino *et al* 19879, el-Aziz *et al* 2001), catepsina L1 (O'Neill *et al* 1998, Rokni *et al* 2002), proteínas del tegumento (Morales y Espino 2012), proteínas similares a saposina (Figuroa-Santiago *et al* 2011), leucina aminopeptidasa (LAP) (Marcilla *et al* 2008) y antígenos recombinantes (Cabán-Hernández *et al* 2013, González-Santana *et al* 2013) para la detección de anticuerpos en suero. A pesar de la gran variedad de antígenos disponibles para hacer el diagnóstico de la fasciolosis, mayoritariamente se hace uso de las catepsinas para la detección de anticuerpos circulantes (Cordova *et al* 1997). También se han empleado anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos en muestras de suero y detección de coproantígenos, mediante el uso del anticuerpo monoclonal ES78 (Espino y Finlay 1994) y M33 (Ubeira *et al* 2009).

1.7.3. Técnicas moleculares

Aunque las técnicas moleculares para la detección de ADN parasitario mediante reacción de PCR presentan la mayor especificidad y sensibilidad, no es la técnica más comúnmente utilizada, sobre todo en zonas de alta endemicidad, debido a los altos costes que presenta y a la necesidad de personal altamente capacitado. Sin embargo, es una técnica que permite la diferenciación de especies de fasciola tanto en el hospedador intermediario como en los hospedadores definitivos. Dentro de las técnicas moleculares más utilizadas para el diagnóstico de la infección por *Fasciola spp* se encuentran: *i*). Reacciones convencionales de PCR (Ai *et al* 2010a, Rokni *et al* 2010); *ii*). Reacciones de PCR en tiempo real (Alasaad *et al* 2011, Caron *et al* 2011); *iii*). LAMP (loop-mediated isothermal amplification) (Ai *et al* 2010b) y; *iv*). Multiplex PCR (Magalhaes *et al* 2004, 2008).

1.8. Tratamiento

Actualmente, el número de fármacos disponibles para el tratamiento eficaz de la fasciolosis es limitado. Esto se debe, principalmente, a que los fármacos fasciolicidas en su gran mayoría son efectivos solamente contra los gusanos adultos, siendo ineficaces, o parcialmente eficaces, frente a las formas inmaduras del parásito. El fármaco de elección para el tratamiento de la fasciolosis es el triclabendazol debido a su alta eficacia tanto frente a las formas adultas del parásito, como a las formas inmaduras. Además, es un compuesto seguro y se tolera bastante bien (Boray *et al* 1985). En la tabla 2 se muestra una clasificación de los fármacos con actividad fasciolicida de acuerdo a su estructura química.

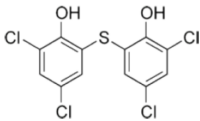
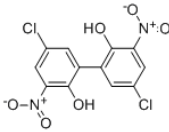
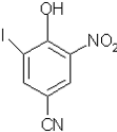
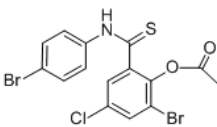
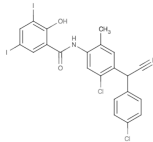
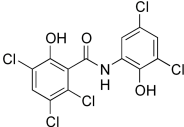
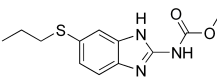
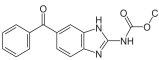
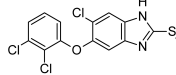
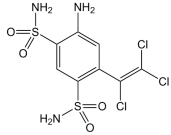
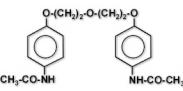
Fenoles halogenados			Referencias
			(Stammers 1976) (Eckhardt y Heckers 1981) (Bacq <i>et al</i> 1991)
Bitionol	Niclofolan	Nitroxinil	
Salicilanilidas			
			(Lammler y Thyssen 1971) (Maes <i>et al</i> 1988) (Richards <i>et al</i> 1990)
Brotianida	Closantel	Oxiclozanida	
Benzimidazoles			
			(Kelly <i>et al</i> 1975) (Malone <i>et al</i> 1982) (Boray <i>et al</i> 1985)
Albendazol	Mebendazol	Triclabendazol	
Sulfonamidas	Fenoxialcanos		
			(Rew <i>et al</i> 1978) (Meaney <i>et al</i> 2003)
Clorsulón	Diamfenetida		

Tabla 2. Clasificación de los fármacos con actividad fasciolicida de acuerdo a su estructura química.

Sin embargo, desde hace mucho tiempo se conoce la actividad fasciolicida de diversos fármacos, entre los que se encuentran el bitionol (Bacq *et al* 1991), albendazol (Malone *et al* 1982), mebendazol (Kelly *et al* 1975), clorsulón (Meaney *et al* 2003), nitroxinil (Stammers 1976), closantel (Maes *et al* 1988), rafoxanida (Campbell y Brotowidjoyo 1975), diamfenetida (Rew *et al* 1978), brotianida (Lammler y Thyssen 1971), oxiclozanida (Richards *et al* 1990), netobomin (Richards *et al* 1987) y niclofolan (Eckhardt y Heckers 1981). En la tabla 3 se describe la eficacia de algunos fármacos con actividad fasciolicida, dependiendo si se trata de una fasciolosis aguda (semanas 1-4 post-infección), subaguda (semanas 5-8 post-infección) o crónica (semanas 9-14 post-infección). El triclabendazol es el único fármaco que presenta una gran efectividad contra fases inmaduras de *F. hepatica* en el parénquima hepático (fase aguda), así como contra fases maduras en los conductos biliares (fase crónica). También es el fármaco que presenta la menor toxicidad respecto a otros tratamientos. El triclabendazol ha sido utilizado en animales desde el año 1983 y en humanos desde 1989. En aquella ocasión, las autoridades sanitarias de Irán permitieron el uso de un fármaco que era utilizado con fines veterinarios para tratar una epidemia de fasciolosis en humanos (WHO 2006).

Fármaco / Semana	Fase aguda				Fase subaguda				Fase crónica					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Bitionol Oxiclozanida Albendazol										50 – 99%				91 – 99%
Clorsulón														91 – 99%
Nitroxinil Closantel								50 – 99%						91 – 99%
Rafoxanida							50 – 99%							91 – 99%
Dianfenetida														91 – 100%
Triclabendazol														90 – 99%

Tabla 3. Eficacia de fármacos con actividad fasciolicida en distintas etapas de la enfermedad.

Para tratar la fasciolosis en humanos, se debe administrar una dosis de 10 mg/ Kg / día, durante dos días consecutivos. Con este régimen se obtiene una tasa de curación entre el 92,2% y el 93,9%. Las reacciones adversas al uso del triclabendazol son generalmente mínimas, siendo las más frecuentes dolor abdominal y sudoración. En algunos casos, se puede presentar náusea, vómitos, escalofríos, tos, fiebre y prurito. En animales, la pauta posológica puede variar dependiendo de las especies; en el caso de los bovinos, se suele administrar una dosis única de 12 mg/Kg y en el caso de ovinos y caprinos se suele administrar una dosis única de 10 mg/Kg en la mayoría de los tratamientos. En el tratamiento de animales destinados para el consumo humano, no se debe aplicar el tratamiento 28 días antes del sacrificio y no se puede consumir la leche de animales tratados hasta 4 días después de la última aplicación del triclabendazol (Ibarra-Velarde *et al* 2001).

El triclabendazol es un compuesto que pertenece a la familia de los benzimidazoles, y de lo que se sabe del mecanismo de acción de los benzimidazoles, se presume entonces que el triclabendazol se puede unir a la molécula de β -tubulina y por lo tanto interrumpir todos los procesos asociados a los microtúbulos (Brennan *et al* 2007). Existe evidencia experimental que soporta esta hipótesis, principalmente mediante el estudio de cambios morfológicos en el tegumento de parásitos tratados con triclabendazol.

Específicamente, se ha observado inhibición de la mitosis en la capa vitelina y células espermatogénicas (Stitt *et al* 1992, 1996). También se han realizado estudios de inmunofluorescencia sobre el tegumento de parásitos tratados con triclabendazol, dando como resultado la pérdida de la intensidad de la señal fluorescente, causada por daños en el tegumento (McConville *et al* 2006). La resistencia al triclabendazol apareció por primera vez en el campo en Australia a mediados de 1990 (Overend y Bowen, 1995). Desde entonces se han encontrado resistencias también en países de Europa, tales como Irlanda, Escocia, Gales, España y Holanda (Brockwell *et al* 2014, Martínez-Valladares *et al* 2014, Fairweather 2005). Se han utilizado principalmente -pero no exclusivamente- compuestos derivados de la artemisina para el tratamiento de la fasciolosis en cepas resistentes al triclabendazol. En la tabla 4 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos, así como su pauta de administración y la fase del parásito contra la cual son activos.

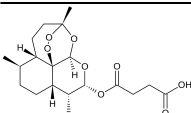
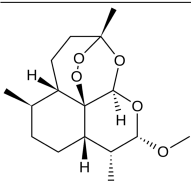
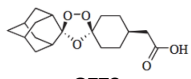
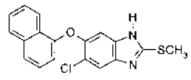
Compuesto	Fase de actuación	Hospedador	Posología	Referencia
 Artesunato	Huevos	Humanos	4 mg/Kg/10 días	(Duthaler <i>et al</i> 2010) (Keiser <i>et al</i> 2010)
 Artemeter	Adulto	Ovino	Vía oral: 40-80 mg/Kg Vía intramuscular: 160 mg/Kg Dosis únicas	(Duthaler <i>et al</i> 2010) (Keiser <i>et al</i> 2008)
 OZ78	Adulto	Rata	Vía oral: 100 mg/Kg. Dosis única	(Duthaler <i>et al</i> 2010) (Kirchhofer <i>et al</i> 2011)
 Compuesto alfa	Huevos	Ovino	Vía oral 15 mg/Kg. Dosis única	(McConville <i>et al</i> 2009)

Tabla 4. Tratamiento de elección frente a la fasciolosis en cepas resistentes al triclabendazol.

Los estudios que se han llevado a cabo para entender un poco mejor los mecanismos de resistencia al triclabendazol se han realizado con la estirpe Sligo de *F. hepatica*. Estudios *in vivo* han demostrado que esta estirpe es resistente a la acción del triclabendazol (Coles y Stafford 2001), y estudios *in vitro* también lo han demostrado (Robinson *et al* 2002). En los mecanismos de resistencia se han estudiado principalmente tres factores: *i*). Cambios en la molécula a la cual va dirigida el fármaco (β -tubulina); *ii*). Toma y expulsión del fármaco y; *iii*). Metabolismo del fármaco (Ouellette *et al* 2001). En humanos se ha descrito un caso de aparente resistencia a *F. hepatica* en un hombre de 72 años en Holanda (Wonkelhagen *et al* 2012).

2. Vacunas

2.1. Aspectos generales

A pesar de que muchas de las enfermedades producidas por diferentes agentes patógenos tienen un tratamiento eficaz, el uso prolongado de los diferentes medicamentos utilizados para combatir dichos patógenos ha causado que se generen resistencias a estos medicamentos, teniéndose que buscar nuevas estrategias de tratamiento, que no en todos los casos han tenido éxito. Es por esto que la vacunación es una alternativa muy prometedora para la prevención de enfermedades causadas por agentes infecciosos. La vacunación consiste en administrar al ser humano o a los animales unos componentes activos (de los cuales se hablará más detalladamente en el siguiente capítulo), que son derivados del agente infeccioso, junto con otras moléculas inmunomoduladoras o potenciadoras de la respuesta inmunitaria (adyuvantes), con el objeto de inducir una respuesta inmunitaria en el individuo que lo proteja de la enfermedad.

En este capítulo estudiaremos principalmente cuáles son los componentes fundamentales de una vacuna, los adyuvantes utilizados, sus mecanismos de acción y los tipos de vacunas más comúnmente utilizados para la prevención de las enfermedades. Además, analizaremos cuál es el estado de avance en el desarrollo de vacunas contra parásitos, especialmente contra parásitos helmintos.

2.2. Adyuvantes: clasificación y mecanismo de acción

Los adyuvantes son componentes utilizados en las formulaciones vacunales para lograr varios objetivos, entre los cuales están incluidos: *i*). Aumentar la inmunogenicidad de antígenos purificados o productos recombinantes; *ii*). Reducir la cantidad de antígeno aplicada, así como el número de dosis de inmunización requeridas para obtener una respuesta inmune protectora eficaz; *iii*). Mejorar la eficacia de las vacunas en poblaciones especiales, como lo son los recién nacidos, adultos mayores e inmunodeprimidos; *iv*). Incrementar la respuesta inmune celular y; *iv*).

Como sistemas de liberación del antígeno . Cuando se quiere seleccionar el adyuvante utilizado para una formulación antigénica determinada, se deben tener en cuenta, entre otros aspectos, los siguientes: *i)*. Determinar cuál o cuáles especies se quieren inmunizar; *ii)*. Ruta de administración y; *iii)*. Evaluación de los efectos colaterales que pueda tener el adyuvante en la respuesta inmunológica inducida (Reed *et al* 2013).

Los adyuvantes se pueden clasificar en los siguientes grandes grupos: *i)*. Productos derivados de bacterias; *ii)*. Agentes de superficie activa; *iii)*. Sales minerales; *iv)*. Citocinas; *v)*. Polímeros; *vi)*. Compuestos sintéticos y; *vii)*. Nanopartículas (Dey y Srivastava 2011, Smith *et al* 2013). En la tabla 5 se muestran los principales tipos de compuestos que pertenecen a los principales grupos de adyuvantes.

Tipo de adyuvante	Compuestos utilizados
Productos bacterianos	<i>M. tuberculosis</i> muerta Monofosforil-lípido A (MPLA) Agonistas de receptores de tipo Toll (TLR) Di- y tri-péptidos de muramil Tóxina del cólera Subunidad B del cólera Toxina termolabil de <i>Escherichia coli</i> Ácidos nucleicos (CpG)
Agentes de superficie activa	Saponinas Complejos inmuno-estimulantes (ISCOMs) Polímeros no-iónicos Virosomas
Sales minerales	Hidróxido de aluminio Fosfato de aluminio y calcio
Citocinas	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) IFN- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-12 Liposomas que contienen citocinas Hormonas de crecimiento humano
Emulsiones	MF59 Montanide Escualeno
Nanopartículas	Partículas similares a virus Nanoemulsiones Ácido poli-láctico-co-glicólido (PLGA) Nanogel Liposomas catiónicos

Tabla 5. Principales grupos de adyuvantes utilizados para el desarrollo de vacunas (Adaptado de Dey y Srivastava 2011).

2.2.1. Adyuvantes derivados de productos bacterianos

Los productos derivados de bacterias, ya sean purificados o extractos crudos, han sido usados como adyuvantes durante mucho tiempo, debido a su gran poder inmunoestimulante. Se han utilizado principalmente cepas inactivadas o atenuadas de *M. tuberculosis* y *Salmonella* formulados en aceites no-minerales. Sin embargo, el principal inconveniente de estas formulaciones está basado en su elevada toxicidad y la fuerte reacción local en el sitio de administración. Debido a esto, su uso ahora es limitado y a cambio se utilizan componentes activos purificados o moléculas sintéticas.

2.2.1.1. Agonistas de TLR4

Uno de los principales productos derivados de bacterias que estimula específicamente el TLR4 es el lipopolisacárido (LPS). Sin embargo, debido a su elevada toxicidad, este compuesto no es ampliamente utilizado en formulaciones de vacunas como adyuvante.

Se han realizado modificaciones químicas sobre este compuesto para intentar conseguir una molécula altamente estimulante del sistema inmune, pero que fuera menos tóxica. En un primer intento por conseguirlo, se eliminó la parte estructural correspondiente al carbohidrato, generando un compuesto denominado Lipido A que resultó ser menos tóxico que el LPS y que aún conservaba sus propiedades inmunoestimulantes (Alving *et al* 1992).

Una posterior modificación de este compuesto aislado de la bacteria *Salmonella minnesota* RC595, produjo una molécula conocida como monofosforil lípido A (MPLA), que era mucho menos tóxica que los dos compuestos anteriores y aún conservaba sus propiedades inmunogénicas. Finalmente, una última modificación del compuesto MPLA dió como resultado el compuesto MPLA-deacetilado, conocido como MPL que era menos tóxico que el MPLA y aún conservaba sus excelentes propiedades inmunogénicas. De hecho, la compañía farmacéutica Glaxo Smith Klein (GSK) desarrolló una combinación de adyuvantes denominada AS04, en el cual el MPL es formulado con sales de aluminio y se ha utilizado en dos vacunas aprobadas para su uso en humanos. En la activación del sistema inmune a través de los agonistas de TLR4, están involucrados varios mecanismos de reconocimiento y de señalización intracelular. Inicialmente, las unidades monoméricas de LPS o MPL son transferidas a una proteína accesoria, denominada CD14, la cual a su vez transfiere el LPS a MD2, una glicoproteína secretada que se asocia con el dominio extracelular de TLR4 para formar un receptor heterodimérico que es responsable del reconocimiento fisiológico del LPS (Descamps *et al* 2009). El lípido A unido al complejo TLR4/MD2 activa dos rutas de señalización diferentes, conocidas como MyD88 y TRIF.

La ruta de señalización MyD88 produce la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos y del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) dependiente de respuestas proinflamatorias. Por su parte la ruta de señalización TRIF activa quinasas que son responsables de las respuestas mediadas por interferón de tipo I (Barton y Kagan 2009).

2.2.1.2. Agonistas de TLR9

El ADN bacteriano es reconocido por especies de mamíferos como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) y actúa como un potente activador del sistema inmune innato a través de la interacción con el TLR9 intracelular. Se ha demostrado que muchos fragmentos de ADN bacteriano y oligodeoxinucleótidos sintéticos de cadena simple que contienen el dominio CpG (CpG ODNs) sin metilar, poseen buena actividad de adyuvante. El dominio CpG se refiere a la presencia de citosina trifosfato deoxinucleótido "C", seguido por una guanina trifosfato deoxinucleótido "G", y la letra "p" se refiere al enlace fosfodiéster entre los dos deoxinucleótidos. Uno de los principales inconvenientes en el desarrollo de vacunas que contengan CpG como adyuvante radica en su variabilidad en especies, con lo cual los estudios realizados en ratón no son del todo extrapolables a humanos. En humanos, los motivos CpG son reconocidos por TLR9 de células NK, células B y células dendríticas. En ambas especies, los motivos CpG inducen la activación de células B e inducen directa o indirectamente la producción de citocinas Th1 y proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α e IFN- γ . El CpG se ha utilizado como adyuvante en estudios de vacunas contra la malaria, neumonía, hepatitis B y VIH (Ellis *et al* 2009, Sogaard *et al* 2010, Sablan *et al* 2012).

2.2.1.3. Agonistas de TLR5

Uno de los productos bacterianos que estimulan fuertemente el TLR5 es la flagelina, el cual es un potente estimulador de células T y es considerado como un potencial candidato para ser utilizado como adyuvante en formulaciones vacunales. A diferencia de otros agonistas de TLR's, la flagelina se caracteriza por producir una respuesta inmune tanto del tipo Th1 como Th2. El TLR5 de los mamíferos reconoce la flagelina de bacterias gram positivas y gram negativas y activa la ruta de señalización NF- κ B con producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). También tiene efecto en la expresión de la molécula CD80 y en la producción de IL-6. Se ha demostrado que la flagelina, acoplada a proteínas recombinantes principalmente, son rápidamente transportadas y acumuladas en ganglios linfáticos durante varias horas, lo cual contribuye a su gran efecto adyuvante y a la estimulación tan potente del sistema inmune. La mayoría de los estudios *in vivo* que han utilizado la flagelina como adyuvante se han realizado en ratones. Estudios *in vitro* han demostrado que la flagelina puede estimular directamente las poblaciones celulares humanas CD4 y CD8. También se ha demostrado que la combinación de flagelina con otros agonistas de TLR7/8 inducen la estimulación de células T de memoria, así como la sobre expresión de células T reguladoras. Otros aspectos que hacen que la flagelina sea considerada como adyuvante son: *i*). Se requieren dosis muy bajas para la inmunización; *ii*). No estimula respuestas de tipo IgE; *iii*). Los antígenos vacunales pueden ser fácilmente insertados en su región amino o carboxilo terminal, sin pérdida del reconocimiento vía TLR5 y; *iv*). No ha presentado toxicidad al ser administrada por vía intranasal o intramuscular (Mizel y Bates 2010).

2.2.1.4. Agonistas de receptores tipo NOD

Uno de los componentes de la pared celular de micobacterias que ha sido ampliamente estudiado por su capacidad adyuvante es el denominado muramil dipéptido (N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, MPD). Una vez que el MPD ha sido reconocido por el dominio de oligomerización de nucleótidos-2 (NOD2), se activan las rutas de señalización NF- κ B y MAP quinasas, las cuales producen moléculas proinflamatorias que modulan tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa. Los agonistas de receptores tipo NOD no han sido tan ampliamente estudiados como los agonistas de TLR en su uso como adyuvantes (Wischke *et al* 2012).

2.2.1.5. Toxinas de bacterias

Los adyuvantes basados en toxinas derivadas de bacterias cada vez generan más interés en el desarrollo de vacunas, debido principalmente a que su ruta de administración es por vía de mucosas. La inducción de inmunidad vía mucosa se adquiere con facilidad en las formulaciones vacunales que incluyen organismos atenuados y principalmente se han utilizado en vacunas contra el virus de la influenza. Sin embargo, su utilización como adyuvantes para antígenos independientes de organismos vivos o atenuados, sigue siendo un reto. Las exotoxinas y enterotoxinas de algunas bacterias han mostrado su enorme capacidad adyuvante al administrarse por vía nasal. Sin embargo, su elevada toxicidad ha sido un impedimento para su inclusión en formulaciones vacunales en humanos. El desarrollo de mejores formulaciones de adyuvantes para aplicación de vacunas vía mucosas basados en exotoxinas bacterianas sigue en desarrollo, aunque se han hecho algunos ensayos pre-clínicos sin mucho éxito (Pizza *et al* 2001, da Hora *et al* 2011).

2.2.2. Adyuvantes con agentes de superficie activa

2.2.2.1. Saponinas

Las saponinas son moléculas triterpenoides que tienen además una compleja estructura de carbohidratos. Las saponinas son extraídas principalmente del árbol *Quillaja saponaria* (Qs) y han sido utilizadas como adyuvantes durante mucho tiempo, principalmente a nivel veterinario. Sin embargo, se ha visto que las saponinas son bastante tóxicas para su uso en humanos. A pesar de esto, se han desarrollado dos adyuvantes para uso en humanos basados en el uso de saponinas de Qs: ISCOMs y AS01. La otra formulación denominada Qs21, corresponde a una fracción purificada del conjunto de saponinas de Qs, que demostró baja toxicidad y buena capacidad adyuvante. Sin embargo, presentaba problemas de estabilidad con el antígeno, lo cual fue solucionado al combinarlo con liposomas que contenían colesterol (Garçon *et al* 2007).

La combinación de esta nueva formulación adyuvante junto con el agonista MLP de TLR4 es lo que se conoce como AS01 y fue desarrollada por la compañía GSK. Esta combinación de adyuvantes ha sido evaluada en estudios clínicos de fase III para la selección de candidatos a vacuna contra la malaria (Lell *et al* 2009, Cohen *et al* 2010). El mecanismo de acción de los adyuvantes basados en extractos de Qs no ha sido bien establecido, pero se cree que la capacidad adyuvante depende de la estructura química del triterpeno. Se han sintetizado químicamente varios análogos de este compuesto a fin de poder dilucidar su mecanismo de acción (Ragupathi *et al* 2011, Adams *et al* 2010).

2.2.2.2. Complejos inmunoestimulantes

Estos complejos están formados por la combinación de Quil A, colesterol, fosfolípidos y el inmunógeno, los cuales forman una estructura definida con un tamaño de aproximadamente 40 nm. Estos complejos han producido elevados títulos de anticuerpos y respuestas de linfocitos T citotóxicos frente a antígenos de virus. También se ha demostrado que estos complejos inducen inmunidad en las mucosas en ratones al ser inmunizados por vía intranasal, parenteral o intravaginal, por lo cual son además considerados como buenos adyuvantes para su uso en vacunas contra patógenos de mucosas. Hasta hace muy poco este tipo de adyuvantes han sido evaluados en ensayos clínicos, debido a la toxicidad mostrada en ratones, principalmente causada por Quil A. Actualmente solo una vacuna basada en ISCOM's contra la influenza equina ha sido licenciada en Suecia y otra formulación para la influenza humana está en desarrollo (Dey y Srivastava 2011).

2.2.2.3. Polímeros no iónicos

Este tipo de adyuvantes está compuesto por cadenas de polímeros lineales o bloques de polímeros de polioxietileno hidrofóbico, flanqueado por dos cadenas de polioxietileno hidrofílico. Estos polímeros son resistentes a la degradación, son secretados de forma intacta por el organismo y además son seguros y bien tolerados. El mecanismo de acción por el cual estos polímeros presentan una actividad de adyuvante no están del todo claros. Sin embargo, estos polímeros pueden actuar como moléculas de adhesión que unen antígenos a superficies hidrofóbicas, tales como gotas de aceite o células. El antígeno puede conservar gran parte de su estructura conformacional para ser presentado a macrófagos y células dendríticas para inducir respuestas potentes dependientes de anticuerpos. También es conocido que estos polímeros aumentan la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo-II (MHC-II), mediante un mecanismo aún desconocido. La influencia de este tipo de adyuvante en la estimulación de células T no ha sido muy bien estudiado. Actualmente, su uso como adyuvante se limita a la generación de antisuero en animales y se plantea como una alternativa al uso del adyuvante de Freund (Dey y Srivastava 2011).

2.2.3. Sales de aluminio

Del grupo de adyuvantes mencionados anteriormente, los compuestos minerales basados en sales de aluminio han sido los más ampliamente utilizados en formulaciones vacunales para uso en humanos. Se utilizan comúnmente como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de aluminio y potasio. Debido a las características físicas y químicas de las sales de aluminio utilizadas como adyuvantes, el más utilizado es el hidróxido de aluminio en su forma cristalizada, conocido como el oxihidróxido de aluminio cristalizado. El principal mecanismo responsable para la adsorción de antígenos en las sales de aluminio se debe principalmente a interacciones electrostáticas y fuerzas hidrofóbicas. Debido a esto, cuando se utiliza este tipo de adyuvante se deben conocer muy bien algunas propiedades físicas del antígeno, como por ejemplo el punto isoeléctrico. Normalmente, este adyuvante tiene un punto isoeléctrico de 11,4 a pH 7,4, por lo que resultaría muy eficaz adsorbiendo antígenos que tengan puntos isoeléctricos menores.

La alternativa a su uso es el fosfato de aluminio que tiene un punto isoeléctrico de 4,0 a pH 7,4 y resultaría muy eficaz adsorbiendo antígenos con elevados valores de punto isoeléctrico a pH 7,4 (Shirodkar *et al* 1990). En cuanto al mecanismo por el cual las sales de aluminio potencian la respuesta inmune, hay todavía controversia y no se acepta un único mecanismo. Por el contrario, se han propuesto varias hipótesis y se cree que cada una de ellas contribuyen a la estimulación del sistema inmune:

i) La generación de un depósito en el sitio de la inyección que contiene el antígeno adsorbido en las sales de aluminio, generando una liberación lenta y controlada del antígeno en el tiempo, lo cual resulta en la generación de una fuerte respuesta inmunitaria (Marrack *et al* 2009); *ii)* La adsorción del antígeno a las sales de aluminio, hace que éste se convierta en una forma de partícula que puede ser tomada de una manera más eficiente por las células presentadoras de antígenos, principalmente células dendríticas y macrófagos (Morefiel *et al* 2005) y; *iii)* Algunos grupos de investigación han propuesto que las sales de aluminio estimulan directamente las células del sistema inmune innato, a través del receptor Nalp3 (Eisenbarth *et al* 2008). Las vacunas que emplean sales de aluminio como adyuvante son generalmente seguras y bien toleradas. Comúnmente se suelen encontrar granulomas cuando la ruta de administración es subcutánea o intradérmica. Estos efectos son ampliamente disminuidos cuando se usa una ruta de administración intramuscular.

2.2.4. Citocinas como adyuvantes

Una alternativa para el uso de adyuvantes que inducen la producción de citocinas, es el uso de citocinas como adyuvantes. La mayoría de las citocinas tienen la capacidad de modificar y redirigir un tipo de respuesta inmune determinado. En general, las citocinas IL-1, IFN- γ , IL-12 y GM-CSF han sido ampliamente evaluadas como adyuvantes (Heath 1995).

El principal inconveniente en el uso de estas moléculas es que todas presentan una toxicidad dependiente de la dosis utilizada. Además, debido a su naturaleza proteica, pueden llegar a ser un poco inestables y son costosas de producir. Este tipo de adyuvantes han sido utilizados principalmente en vacunas contra el cáncer. Estas citocinas han sido encapsuladas en diferentes micropartículas como sistemas de liberación, especialmente IL-12 y GM-CSF (Pettit *et al* 1997).

2.2.5. Emulsiones derivadas de aceites

2.2.5.1. Emulsiones de agua en aceite

Este tipo de adyuvantes se utilizó por primera vez en humanos en el año 1960 en una formulación vacunal contra la gripe en el Reino Unido. En esa ocasión, el adyuvante de elección fue el adyuvante de Freund. El principal inconveniente con este adyuvante fue su elevada toxicidad y sus efectos secundarios, como lo demostró un estudio llevado a cabo en el año 1953 en un grupo de aproximadamente 18.000 voluntarios. Un estudio posterior realizado en el año 1972 empleando ratones Swiss demostró que al ser inyectados con emulsiones basadas en aceites no minerales, desarrollaban tumores, con lo cual su uso en humanos no fue permitido nunca más (Murray *et al* 1972). A raíz de esto, el desarrollo de adyuvantes basados en emulsiones derivadas de aceites se centró en la utilización de aceites metabolizables usando escualeno en vez de aceites minerales. El más conocido es el Montanide que es producido por la compañía Seppic. Este adyuvante ha sido ampliamente utilizado en ensayos clínicos e induce buenas respuestas inmunológicas. Sin embargo, al igual que con los aceites no minerales, sus efectos secundarios siguen estando presentes, los cuales se ven aumentados cuando se requieren dosis de refuerzo.

2.2.5.2. Emulsiones de aceite en agua

Este tipo de formulaciones surgió como una alternativa al uso de las emulsiones de agua en aceite, donde su elevada viscosidad hace difícil su manipulación e inyección. El primer adyuvante en ser desarrollado fue el denominado SAF por la corporación Syntex. Sin embargo, su uso como adyuvante no tuvo éxito y fue retirado del mercado. El siguiente adyuvante de este tipo en ser desarrollado fue el MF59, el cual estaba basado en el uso de escualeno y su uso en humanos fue aprobado en una vacuna contra la influenza (Flaud) para aplicación en adultos. La investigación en el desarrollo de estos adyuvantes ha seguido avanzando y recientemente las autoridades regulatorias Europeas aprobaron tres formulaciones vacunales contra la gripe, basadas en formulaciones de adyuvantes de aceite en agua utilizando escualeno y denominadas MF59, AS03 y AF03. Otras vacunas que utilizan adyuvantes derivados de escualeno están en desarrollo para la elaboración de una vacuna contra *Leishmania* y el virus de la influenza H5N1 (Bodewes *et al* 2010, Llanos-Cuentas *et al* 2010).

Respecto al mecanismo de acción de los adyuvantes de emulsiones derivadas de aceites, se ha de tener en cuenta que estos adyuvantes han sido clasificados como vehículos que conducen y aumentan la liberación del antígeno a las células presentadoras de antígenos o nódulos linfoides. Sin embargo, recientemente se ha visto que estos adyuvantes estimulan el sistema inmune indirectamente. Diferentes estudios han demostrado que estos adyuvantes estimulan la producción de citocinas, tales como TNF- α , IL-1B e IL-6 (Mosca *et al* 2008, Morel *et al* 2011).

2.2.6. Nanopartículas

Aunque hasta ahora se ha hecho referencia a los adyuvantes más comúnmente utilizados en el desarrollo de vacunas contra agentes infecciosos, en este apartado discutiremos algunos aspectos que también influyen enormemente en la estimulación de la respuesta inmunológica. Tales compuestos incluyen el tamaño, carga, forma e hidrofobicidad de las biomoléculas utilizadas como antígenos, así como de los diferentes compuestos utilizados como adyuvantes. En la figura 3 se observan los principales tipos de compuestos y estructuras utilizadas como adyuvantes en vacunas.

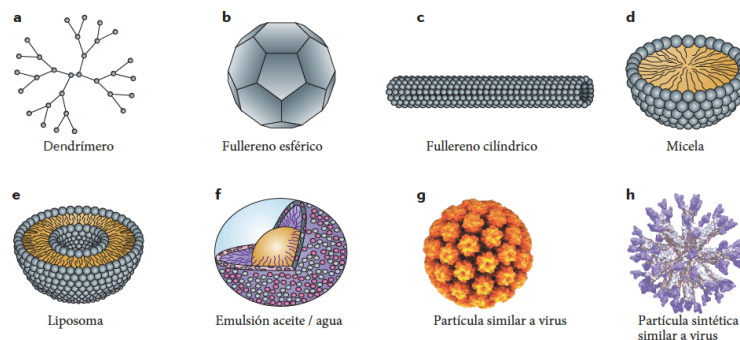


Figura 3. Algunos ejemplos de nanopartículas empleadas como adyuvantes (Adaptado de Smith *et al* 2013).

Los compuestos utilizados para el desarrollo de nanopartículas como adyuvantes se pueden clasificar en nanopartículas (Figura 3a-c), nanoemulsiones (Figura 3d-f) y partículas similares a virus (Figura 3g-h). Generalmente los dendrímeros tienen un tamaño <5 nm, los polímeros entre 10-20 nm y los liposomas >150 nm. Los principales mecanismos por los cuales las nanopartículas alteran la inducción de la respuesta inmune se muestran en la figura 4.

En cuanto a la liberación de antígenos, la penetración y acceso a los ganglios linfáticos es dependiente del tamaño de la partícula. Los tamaños de partícula menores de 20 nm pueden alcanzar fácilmente los ganglios linfáticos, sin la participación de otras células como lo son las células dendríticas (Figura 4a).

Las nanoemulsiones normalmente presentan un efecto de depósito, el cual promueve la persistencia, estabilidad, integridad conformacional y la liberación gradual de los antígenos, para luego ser fagocitados y presentados por las células presentadoras de antígenos (Figura 4b). Las nanopartículas sintéticas permiten una adecuada distribución espacial de los antígenos sobre su superficie, lo cual favorece la coagregación y activación del receptor de células B (BCR), favoreciendo la generación de anticuerpos (Figura 4c) (Smith *et al* 2013). Finalmente, también se puede producir una presentación cruzada en la cual los antígenos son presentados vía moléculas MHC de clase I, después de que estos han sido procesados en el fagosoma (Figura 4d).

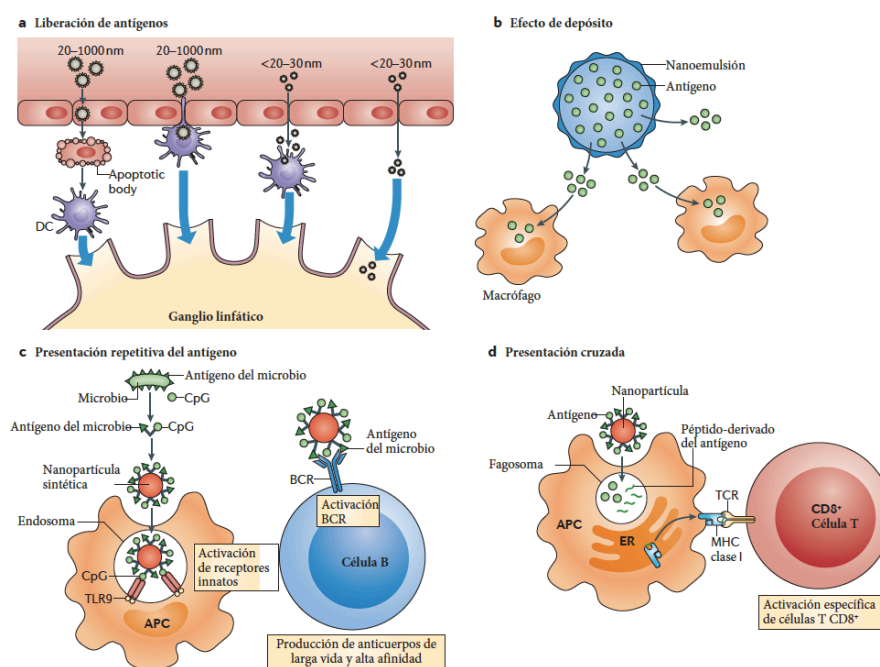


Figura 4. Mecanismos por los cuales las nanopartículas alteran la inducción de la respuesta inmune (Adaptado de Smith *et al* 2013).

2.2.6.1. Partículas similares a virus

Este tipo de nanopartículas han sido utilizadas como adyuvantes en vacunas frente a varias enfermedades infecciosas y cáncer. Tienen un tamaño que puede variar entre 20-100 nm. Recientemente, estas partículas han sido empleadas en enfermedades crónicas como hipertensión, Alzheimer, artritis reumatoidea y adicción a drogas (Jennings y Bachmann 2009, Buonaguro *et al* 2011a). Existen dos tipos principales de partículas similares a virus. El primer tipo corresponde a aquellas partículas que contienen subunidades de la proteína de un virus que conforma la cápside, mientras que el otro grupo corresponde a aquellas

partículas que contienen subunidades del virus obtenidas de forma sintética. Estas partículas pueden estar acopladas también a otras moléculas inmunoestimulantes como pueden ser oligonucleótidos CpG o epítomos basados en péptidos sintéticos, los cuales pueden activar células T de memoria y linfocitos T citotóxicos que producen IFN- γ , TNF- α e IL-12 (Goldinger *et al* 2012). Las principales ventajas en el uso de partículas similares a virus y otras nanopartículas en el desarrollo de vacunas, radica en que los productos obtenidos son uniformes en tamaño, forma, simetría y son muy estables. Además, las nanopartículas de menor tamaño (25-40 nm) penetran en los tejidos y se dirigen a ganglios linfáticos de una forma más rápida y eficiente que las micropartículas de mayor tamaño (100 nm), las cuales son típicamente retenidas por algunas células en el sitio de la inyección y necesitan ser tomadas por las células dendríticas para su transporte a ganglios linfáticos (Manolova *et al* 2008). Otra de las ventajas es que estas partículas promueven la activación de células dendríticas y la presentación de antígenos vía moléculas MHC de clase I y MHC de clase II, lo cual conduce a la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺. Existen dos vacunas profilácticas basadas en el empleo de partículas similares a virus; la primera de ellas previene de la infección por el virus de la hepatitis B y la segunda previene de la infección con el virus del papiloma humano (Buonaguro *et al* 2011b, No *et al* 2011).

2.2.6.2. Nanopartículas utilizadas como vehículos

Los principales tipos de nanopartículas que han sido utilizados como vehículos en el desarrollo de vacunas son: *i*). Nanopartículas derivadas del ácido poli-láctido-co-glicólido (PLGA); *ii*). Hidrogeles co-polímeros o nanogeles y; *iii*). Liposomas catiónicos. De todos estos, el más ampliamente estudiado, caracterizado y utilizado en aplicaciones clínicas para encapsular y liberar fármacos ha sido el PLGA (Mundargi *et al* 2008). Se han utilizado micropartículas de PLGA para encapsular el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, encontrándose que se promueve una rápida toma y posterior localización endosómica del antígeno en células dendríticas, así como la posterior producción de altos títulos de anticuerpos.

También se han realizado modificaciones químicas sobre esta estructura, con el fin de obtener un tamaño de partícula de 100 nm, utilizada para encapsular un antígeno del virus de la hepatitis B. Los ensayos de inmunización mostraron un incremento en el número de células dendríticas en el sitio de la inyección, así como una elevada respuesta de anticuerpos y de células T en el modelo de ratón. Estos resultados son muy importantes debido a que los ratones normalmente no generan una respuesta inmune contra antígenos del virus de la hepatitis B y cuando lo hacen, necesitan mayores cantidades de antígeno. Este tipo de nanopartículas biodegradables también han mostrado ser muy seguras y compatibles para el desarrollo de vacunas (Bharali *et al* 2008).

2.2.6.3. Nanoemulsiones

Los adyuvantes basados en este tipo de nanopartículas son emulsiones de aceite en agua y que además tienen solventes y surfactantes. La nanoemulsión que ha sido más ampliamente estudiada ha sido la denominada MF59, que está compuesta por el aceite escualeno en combinación con polisorbato 80 y trioleato de sorbitan.

La nanoemulsión MF59 está permitida en Europa como adyuvante en una vacuna contra la influenza (Vogel *et al* 2009). La actividad adyuvante de esta nanoemulsión presenta una combinación de mecanismos, entre los que se encuentran: *i*). Mayor captación del antígeno por células dendríticas; *ii*). Mayor liberación de citocinas y quimiocinas; *iii*). Mayor número de monocitos y granulocitos en el sitio de la inyección y; *iv*). Aumento en la expresión del receptor CCR7, involucrado en la generación de memoria inmunológica por células T. La otra nanoemulsión que ha sido ampliamente estudiada es la denominada W₈₀5EC, la cual en vez de escualeno contiene el aceite soybean. Diferentes estudios han demostrado la seguridad de este adyuvante, así como su gran capacidad de inducir una respuesta inmune humoral y celular cuando es administrado vía mucosa. Su actividad adyuvante es dependiente de la estructura del antígeno en las nanogotas de emulsión y en la carga neta positiva de esta estructura que facilita su unión a proteínas cargadas negativamente, como las mucinas. El tamaño de estas nanopartículas y su carga neta positiva, hacen que esta estructura penetre fácilmente las capas de la mucosa, se una a membranas celulares y sea tomada por células presentadoras de antígenos para inducir una respuesta inmune innata y adaptativa. Las nanoemulsiones presentan un gran interés para ser utilizadas en formulaciones vacunales que se quieran administrar por vía de las mucosas (Makidon *et al* 2008, Stanberry *et al* 2012).

2.2.6.4. Liposomas catiónicos

Este tipo de partículas normalmente tienen un tamaño que oscila entre 200 - 1.000 nm, dependiendo de la formulación vacunal. Estas nanopartículas encapsulan, protegen y liberan lentamente el antígeno en el sitio de la inyección, permitiendo así su toma por las células profesionales presentadoras de antígenos. La carga neta positiva de esta estructura, así como la composición de la cadena hidrofóbica lipídica son determinantes para la correcta adsorción del antígeno durante la preparación de las vacunas, para poder inducir una correcta y potente respuesta inmunitaria. Se han incorporado diferentes cationes lipídicos a las formulaciones vacunales, como por ejemplo, compuestos cuaternarios de amonio, derivados del colesterol, imidazoles y otros inmunoestimulantes que promueven la activación de la respuesta inmunitaria, por la activación de TLR's. En este sentido, los liposomas catiónicos han sido utilizados para realizar formulaciones vacunales que incluyen inmunoestimulantes tóxicos como el MPL y otros ligandos de TLR's. Algunas de estas formulaciones han sido empleadas en algunas enfermedades infecciosas y cáncer (Kamath *et al* 2009, Christensen *et al* 2011).

2.2.7. Combinación de adyuvantes

A pesar de que los adyuvantes inducen características inmunológicas definidas, un adyuvante individual no puede inducir todos los tipos de respuesta inmune protectoras que se requieren para el desarrollo de diferentes vacunas. Por esta razón, actualmente se están realizando estudios de vacunación empleando combinaciones de adyuvantes, con el fin de inducir diferentes tipos de respuesta inmunitaria que favorezcan la inmunidad protectora. Algunas combinaciones de adyuvantes que han sido ensayadas son las siguientes: *i*). Combinación de agonistas de TLR's; *ii*). Combinación de sistemas de liberación y moléculas inmunoestimulantes; *iii*). Combinación de agonistas de TLR y sales de aluminio; *iv*). Biopolímeros y agonistas de TLR's; *v*). Combinación de adyuvantes basados en citocinas y; *vi*). Combinación de nanopartículas con agonistas de TLR's y moléculas inmunoestimulantes (Mutwiri et al., 2011).

En la tabla 6 se muestra un resumen con los estudios de inmunización que se han llevado a cabo en los últimos años, utilizando mezclas de adyuvantes y el efecto que han tenido en la respuesta inmune inducida.

Adyuvantes	Especies	Antígeno	Efecto	Referencia
Aluminio MPL	Ratón Humanos	HPV, HBsAg, HSV-2	↑ Acs ↑ Memoria ↑ Duración	(Giannini et al., 2006; Didierlaurent et al., 2009)
Aluminio CpG ODN	Ratón	HBsAg	↑ Acs	(Davis et al., 1998)
Aluminio MPL	Humanos Monos	HPV	↑ Acs ↑ Memoria ↑ Duración	(Giannini et al., 2006; Didierlaurent et al., 2009)
MDP Aluminio	Ratón	Ureasa de <i>H. pylori</i>	↑ Th1 ↑ IFN-γ ↑ IL-2	(Moschos et al., 2006)
CpG MF59	Ratón	Virus influenza	↑ IgG2a ↑ IFN-γ	(Wack et al., 2008)
MDP Quitosan	Ratón	Ureasa de <i>H. pylori</i>	↑ IFN-γ	(Moschos et al., 2005)
MDP Liposomas	Ratón	HBsAg	↑ IFN-γ	(Jain et al., 2009)
CpG Liposomas	Ratón	BHV	↑ Acs en mucosa	(Mitchel et al., 2006)
CpG Polifosfazeno	Ratón	HBsAg, RSV	↑ IgG1 ↑ IgG2a	(Mutwiri et al., 2008)
CpG Poli I:C	Ratón	HIV Gag	↑ CD8 ⁺	(Grossmann et al., 2009)
CpG HDP	Ratón	Influenza-OVA	↑ IgG2a ↑ IFN-γ	(Riedl et al., 2008)
CPG CT	Ratón	<i>Helicobacter felis</i>	↑ Protección	(Jiang et al., 2003)

Adyuvantes	Especies	Antígeno	Efecto	Referencia
CpG	Ratón	HEL	↑ Acs	(Kovacs-Nolan et al., 2009)
Polifosfazeno	Ganado	BRSV-F	↑ Th1	
HDP	Cerdos			
Liposomas	Ratón	Malaria CSP	↑ Acs	(Garcon et al., 2007)
MPL	Monos		↑ IC	
Qs21	Humanos		↑ Protección	
MALP2	Ratón	Péptido de VIH	↑ Protección	(Zhu et al., 2010)
Poli I:C				
CpG				

BHV: Virus de la hepatitis B; BRSV: Virus sinucital respiratorio bovino; CSP: Proteína del circumsporozoito; CT: Tóxina del cólera; HBsAg: Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; HEL: Lisozima de huevo de gallina; HPV: Virus del papiloma humano; HSV: Virus del herpes simplex; IC: Inmunidad celular; MDP: Dipéptido muramil; MPL: Monofosforil lípido A; ODN: Oligodeoxinucleótido; OVA: Ovoalbumina; RSV: Virus sinucital respiratorio

Tabla 6. Combinación de adyuvantes empleadas en el desarrollo de vacunas (Adaptado de Mutwiri *et al* 2011).

2.3. Clases de vacunas

El desarrollo de vacunas a lo largo de la historia ha ido cambiando en cuanto a la complejidad de los antígenos vacunales. Inicialmente, las vacunas estuvieron basadas en el empleo de agentes patógenos muertos o atenuados, lo cual presentaba muchas ventajas en cuanto a protección y potenciamiento de la respuesta inmune, pero igualmente producía grandes efectos secundarios debido a la gran cantidad de componentes tóxicos que estaban presente en estos organismos. Con el paso del tiempo las preparaciones antigénicas fueron simplificándose y las posteriores generaciones de vacunas estuvieron basadas ya sea en antígenos purificados del agente patógeno, antígenos expresados de forma recombinante y también fueron administradas las preparaciones antigénicas como vacunas de ADN.

En todos los casos, se busca que una vacuna tenga las siguientes características: *i*). Que sea capaz de conferir protección duradera en el tiempo; *ii*). Que induzca una respuesta inmune potente, tanto a nivel humoral como celular; *iii*). Que no induzca autoinmunidad o hipersensibilidad; *iv*). Que sea fácil tanto de producir como de administrar y; *v*). Que sean bien toleradas y seguras en los individuos. En este apartado explicaremos brevemente los principales tipos de vacunas que se han desarrollado para la prevención de diferentes enfermedades que afectan al ser humano.

2.3.1. Vacunas derivadas de patógenos inactivados

En este tipo de vacunas, se emplea normalmente el agente patógeno que ha sido inactivado empleando técnicas físicas como el calor o químicas como el tratamiento con diferentes solventes orgánicos, de tal forma que no se puedan replicar y que pierdan su patogenicidad. Estas vacunas tienen la ventaja de que normalmente son seguras y pueden ser administradas a personas inmunocomprometidas y embarazadas, además de que son

más baratas que las que contienen patógenos vivos inactivados. Sin embargo, presenta algunas desventajas, entre las que destacan las siguientes: *i)*. Debido a que los microorganismos no se pueden multiplicar, se requieren grandes cantidades iniciales de los mismos para obtener una adecuada estimulación del sistema inmune; *ii)*. Se requieren varias dosis de refuerzo para mantener la inmunidad; *iii)*. La respuesta inmune celular inducida es deficiente y; *iv)*. En algunos casos, la presencia del agente patógeno puede causar la enfermedad. Algunos ejemplos de vacunas que han utilizado virus y/o bacterias inactivadas son los siguientes: polio, gripe, hepatitis A, rabia, encefalitis japonesa, tos ferina, difteria, tétanos, meningococo y neumococo (Arnon 2011).

2.3.2. Vacunas derivadas de patógenos vivos atenuados

Este tipo de vacunas están compuestas por agentes patógenos vivos que han sido atenuados con el fin de que sean capaces de generar una potente y eficaz respuesta inmune, pero que no puedan producir la enfermedad. Además, estas vacunas pueden ser administradas por vía oral sin perder su elevada inmunogenicidad. Son muchas las ventajas que ofrecen este tipo de vacunas. Entre las más destacadas se encuentran: *i)*. Inducen una potente respuesta inmune humoral y celular; *ii)*. Debido a que el patógeno se puede reproducir, se necesita inyectar muy poca cantidad y las dosis de refuerzo en la mayoría de los casos no son necesarias y; *iii)*. Se puede inducir una respuesta inmunitaria en las mucosas, que es el sitio de entrada de muchos patógenos. A pesar de esto, las vacunas basadas en la administración de patógenos vivos atenuados también presentan algunas desventajas, entre las que se encuentran principalmente: *i)*. En algunas ocasiones, el agente patógeno puede adquirir su patogenicidad y causar la enfermedad; *ii)*. Su uso está restringido en personas inmunosuprimidas y; *iii)*. Debido a que se trata de microorganismos vivos, las condiciones de almacenamiento y transporte hace que en ocasiones sea difícil de administrarse en zonas de bajos recursos.

Algunos ejemplos de vacunas basadas en el empleo de agentes patógenos (virus y bacterias) vivos atenuados son: polio, varicela, sarampión, rubéola, parotiditis, fiebre amarilla, bacilo de Calmette-Guerín (BCG), tifoidea, cólera (Arnon 2011).

2.3.3. Vacunas basadas en subunidades

Este tipo de vacunas emplean sólo una parte del agente patógeno, que normalmente, pero no exclusivamente son antígenos purificados. Los antígenos seleccionados para estas preparaciones vacunales son aquellos que mejor estimulan el sistema inmune. Estas vacunas pueden estar formadas por más de un antígeno e inclusive, en algunas ocasiones solamente se emplean epítomos, es decir, pequeñas partes o regiones de un antígeno determinado que aún logra estimular el sistema inmune.

Este tipo de vacunas requiere el uso de adyuvantes para poder conseguir una adecuada estimulación del sistema inmune, así como la necesidad de incluir dosis de refuerzo para mantener la inmunidad en un periodo de tiempo más largo. Una de las principales ventajas de este tipo de vacunas es que son menos tóxicas, los efectos secundarios son casi inexistentes y pueden ser administradas a personas inmunosuprimidas. El principal inconveniente de este tipo de vacunas es que los antígenos aislados pueden perder su estructura conformacional, con lo cual los anticuerpos generados frente a ellos podrían no inducir inmunidad protectora y la respuesta inmune celular inducida es pobre. Algunas vacunas basadas en subunidades utilizan, en vez de antígenos derivados de proteínas de bacterias, sus polisacáridos. Estos polisacáridos estimulan de forma efectiva las respuestas de anticuerpos IgM, pero la estimulación de la respuesta inmune celular es deficiente. Algunas vacunas basadas en el empleo de polisacáridos bacterianos son aquellas empleadas para prevenir infecciones producidas por *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* tipo B. Sin embargo, tienen el principal inconveniente que no se pueden utilizar en recién nacidos o menores de un año (Arnon 2011, Vila-Corcoles *et al* 2009). Actualmente, los polisacáridos empleados como vacunas contra agentes infecciosos se unen a otras proteínas con el fin de aumentar significativamente su inmunogenicidad, y a este tipo de vacunas se les conoce como vacunas conjugadas. Como ejemplo, los polisacáridos empleados para la prevención de la gripe causada por *H. influenzae* tipo B se encuentra conjugada con toxoide tetánico, lo cual ha permitido su uso en recién nacidos .

2.3.4. Vacunas recombinantes

Este tipo de vacunas emplean la tecnología del ADN recombinante para la producción de antígenos candidatos a vacuna. De esta forma se pueden identificar y clonar individualmente los antígenos inmunodominantes de los patógenos. Esta tecnología consiste en identificar el gen que codifica la proteína de interés, posterior amplificación por PCR a partir de ADN del parásito, su clonación en un sistema de expresión, que puede ser basado en levaduras, en bacterias y más recientemente se ha hecho uso del sistema de células de insecto (baculovirus) y finalmente su purificación que suele hacerse por cromatografía de afinidad. Con esta tecnología, se pueden obtener grandes cantidades de antígenos, de una forma más fácil comparado con aquellas cantidades obtenidas mediante purificación a partir del agente patógeno.

Además, se trabaja de una forma más segura, al eliminar el contacto directo con los agentes patógenos durante su fabricación. Su principal desventaja radica en el hecho de que es una tecnología relativamente costosa. Un ejemplo de una vacuna mediante esta tecnología es la desarrollada para el virus de la hepatitis B, que es una proteína recombinante de la superficie del virus, expresada en el sistema de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Arnon 2011).

2.3.5. Vacunas de ADN

Se denomina vacuna de ADN a aquellas en las cuales un ADN plasmídico puede transfectarse directamente a células animales *in vivo*, con lo cual este plásmido que contiene la secuencia de ADN que codifica para una proteína determinada se introduce directamente en un organismo vivo con el propósito de llevar a cabo la inmunización, que inducirá estimulación del sistema inmunitario con la proteína recientemente expresada (Tang *et al* 1992). Estas vacunas tienen la ventaja de que se pueden obtener de una manera simple, rápida y lo que es más importante, inducen una potente respuesta inmune tanto a nivel celular y humoral. Diversos métodos son empleados para la administración de estas vacunas de ADN, entre los que se encuentran: inyección con una aguja, inyección seguida de electroporación, bombardeo con partículas de oro cargadas con el ADN y administración tópica en varios sitios de mucosa, como por ejemplo intestino, tracto respiratorio, piel y ojos. Los estudios clínicos que se han llevado a cabo con este tipo de vacunas han demostrado que son seguras y bien toleradas cuando se administran vía intramuscular o intradérmica. Sin embargo, la respuesta inmune inducida no es tan potente como la producida por otros tipos de vacunas, por esto las vacunas de ADN ahora incluyen algunos potenciadores de la respuesta inmunitaria, como pueden ser algunas citocinas (Ohlschlager *et al* 2009, Arnon 2011).

En resumen, hemos visto los tipos de vacunas más comúnmente utilizados hasta el día de hoy, y sobre las cuales están basadas las vacunas que tenemos a disposición actualmente en el mercado. Sin embargo, algunos inconvenientes durante su elaboración y administración siguen estando presentes, siendo los más importantes el manejo de agentes patógenos vivos o atenuados, altos costes en los procesos de purificación y eliminación de productos tóxicos de antígenos purificados o recombinantes y el constante cambio genético que sufren los diferentes microorganismos, los cuales hacen que la búsqueda de antígenos apropiados para el desarrollo de vacunas se haga cada vez más difícil. También hemos visto que hay una tendencia a desarrollar vacunas con componentes cada vez más simples, pero que produzcan una elevada y específica respuesta inmunitaria. En este sentido y gracias al avance en la secuenciación de genomas de diferentes agentes patógenos y al elevado número de herramientas de bioinformática que se han desarrollado, se ha generado una nueva y valiosa disciplina denominada inmunoinformática. Gracias a esta disciplina, el enfoque en el diseño de vacunas también ha cambiado enormemente. Actualmente, las investigaciones en el desarrollo de vacunas están enfocadas en la predicción de determinantes antigénicos o epítomos que potencialmente podrían ser utilizados como candidatos a vacuna frente a las enfermedades infecciosas. Esta metodología se denomina vacunología reversa y a partir de esta se pueden diseñar rápidamente una gran cantidad de epítomos que son evaluados en modelos *in vitro* e *in vivo* para validar sus propiedades inmunogénicas y finalmente su potencial protector frente a agentes patógenos.

Además, los péptidos pueden ser diseñados específicamente para que produzcan una respuesta de anticuerpos (epítomos B), o bien que estén diseñados para que puedan ser presentados al sistema inmunitario por las células presentadoras de antígenos en contexto de las moléculas MHC-II (epítomos T) y que se genere una respuesta inmune celular. Otro aspecto, también muy importante, es que la producción de estos epítomos se puede llevar a cabo mediante síntesis química en un laboratorio que no requiere sofisticados equipos y se elimina completamente el riesgo de trabajar con agentes patógenos vivos.

2.3.6. Vacunas basadas en péptidos sintéticos

Este tipo de vacunas está basado en el empleo de epítomos de entre 15 y 20 aminoácidos de longitud, que generalmente han sido seleccionados haciendo uso de herramientas de bioinformática y sintetizados químicamente mediante procedimientos estandarizados. Estos epítomos están diseñados para estimular una alta y específica respuesta tanto a nivel humoral como celular. Normalmente, las vacunas basadas en subunidades peptídicas presentan baja inmunogenicidad, por lo cual, estas vacunas generalmente contienen más de un epítomo y además requieren el uso de un sistema de adyuvante que potencie su inmunogenicidad. La utilización de péptidos sintéticos como candidatos a vacuna se ha empleado en el desarrollo de vacunas frente a diferentes agentes infecciosos, entre los cuales se encuentran bacterias, virus y algunos protozoos.

En bacterias, la observación de que los péptidos derivados de una proteína podían inducir una respuesta inmune protectora fue realizada en el año 1982. En esa ocasión, se descubrió que un pequeño fragmento de la proteína M de *Streptococcus pyogenes*, involucrada en virulencia e inmunidad protectora, confería protección frente a la enfermedad, mediante la generación de anticuerpos opsonizantes protectores (Dale y Beachey 1982). Otros estudios también desarrollados con péptidos derivados de toxinas bacterianas demostraron su eficacia en la neutralización de la actividad biológica de estas toxinas (Jacob *et al* 1983, Harari *et al* 1988).

Las observaciones de la eficacia protectora de subunidades peptídicas en virus también fue demostrada hace ya mucho tiempo. En 1983 se demostró que dos péptidos sintéticos derivados de la proteína HBsAg del virus de la hepatitis B producían anticuerpos neutralizantes que protegían del virus en el modelo de primate no humano de chimpancé.

También se ha evidenciado la eficacia protectora de péptidos derivados de las proteínas antigénicas del virus de hepatitis A y de la influenza (Gerin *et al* 1983, Levi y Arnon 1996, Arnon 2011). En el desarrollo de vacunas contra parásitos, el empleo de péptidos sintéticos se limita a unas pocas parasitosis y aún se encuentran en fases de desarrollo. La mayor parte de la investigación en el desarrollo de vacunas contra parásitos utilizando péptidos sintéticos se ha hecho en malaria (Patarroyo *et al* 2011).

3. Vacunas contra *F. hepatica*

En la actualidad no se dispone de una vacuna eficaz para la prevención de la fasciolosis. Existen diversos factores que han impedido su desarrollo, entre ellos, problemas asociados con la formulación de la vacuna, en términos de selección del adyuvante idóneo, la ruta de administración y la dosis adecuada. Además, se debe tener en cuenta que cada modelo experimental responde de forma diferente frente a un mismo antígeno. La selección del antígeno o de los antígenos que deberían contener una hipotética vacuna contra *F. hepatica* también es de especial interés. Hasta la fecha actual, se han identificado varias proteínas que han demostrado ser importantes marcadores para el desarrollo de vacunas contra *F. hepatica* (Spithill y Dalton 1998, Hillyer 2005), las cuales se pueden clasificar en: *i*). FABP's; *ii*). GST's; *iii*). Catepsinas y; *iv*). (LAP). A continuación, se muestra un breve resumen con los experimentos que se han realizado para evaluar la eficacia protectora de estas moléculas cuando se administran solas o en combinación, en diferentes sistemas de adyuvantes con diferentes modelos experimentales de fasciolosis.

3.1. Vacunas derivadas de FABP's

Las proteínas de unión a ácidos grasos fueron inicialmente descritas en el año 1972 (Ockner *et al* 1972). Estas proteínas están involucradas, principalmente, en la unión y transporte de una variedad de ligandos hidrofóbicos. Todos los miembros conocidos de esta familia de proteínas presentan un peso molecular de entre 14 a 16 kDa y un tamaño de entre 127 a 133 aminoácidos. Además, estas proteínas purificadas fueron las primeras en utilizarse en ensayos de protección frente a la fasciolosis y a la esquistosomosis (Hillyer 1985).

Inicialmente, la purificación de estos antígenos se realizó empleando anticuerpos contra *S. mansoni* que presentaban reactividad cruzada con *F. hepatica*. A esta fracción de antígenos purificados se denominó Fh/SmIII(M), siendo las FABP's el componente mayoritario. Posteriores ensayos de protección frente a *F. hepatica* demostraron que esta fracción presenta un porcentaje de protección del 78% en ratones (Hillyer 1985) y 55% en terneros (Hillyer *et al* 1987). La proteína FABP que protege en modelo murino frente a la fasciolosis y también frente a la esquistosomosis fue identificada como una proteína de 12 kDa se denominó Fh12 (Hillyer *et al* 1988). Posteriormente, a partir de una librería de cDNA se logró identificar y producir de forma recombinante una FABP de 14,7 kDa, denominada Fh15 (Rodríguez-Pérez *et al* 1992), con gran homología a la FABP de 14,8 kDa de *S. mansoni* (Moser *et al* 1991). Se han realizado estudios de protección contra *F. hepatica* utilizando el antígeno de 14 kDa de *S. mansoni*, los cuales han mostrado protección total en modelo murino (Tendler *et al* 1996). Además, estudios realizados en ovejas y ratones también mostraron alta protección frente a la infección experimental, así como ausencia de daño hepático mediante estudios histopatológicos en estos animales (Almeida *et al* 2003).

La eficacia protectora de la proteína nativa nFh12 también ha sido evaluada en la esquistosomosis causada por *Schistosoma bovis*, en el modelo de ratón, encontrándose una reducción en el número de gusanos entre el 87% y el 96%, comparado con el grupo control y también con la proteína recombinante rFh15, donde se encontró un 72% de reducción en el número de gusanos recuperados (Abán *et al* 1999, Abané *et al* 2000). Adicionalmente, se han identificado péptidos dentro de la secuencia de Sm14 que protegen frente a la fasciolosis y la esquistosomosis de una forma similar a como lo hace la proteína nativa (Vilar *et al* 2003). También se han realizado estudios con la FABP nativa (nFh12) y se ha comparado su eficacia protectora con su correspondiente antígeno recombinante (rFh15) en conejos infectados 4 semanas después de la última inmunización. Estos estudios demostraron que la proteína nativa indujo un 40% de reducción en el número de vermes recuperados, siendo mayor a la inducida por el antígeno recombinante, sugiriendo que estos antígenos pueden tener diferente conformación estructural, produciendo diferentes resultados. Sin embargo, todos los animales inmunizados con cualquiera de las proteínas (nFh12 o rFh15) desarrollaron vermes más pequeños y menores lesiones hepáticas, comparado con el grupo control (Muro *et al* 1997). Posteriores experimentos de inmunización se llevaron a cabo con las proteínas nFh12 y rFh15, para evaluar su eficacia protectora en ovejas, empleando el adyuvante de Freund. Aunque los resultados demostraron que no se encontraron diferencias en la reducción del número de vermes, el tamaño de los mismos y el conteo del número de huevos en heces fueron significativamente menores que el grupo control (Ramajo *et al* 2001).

En estudios posteriores, se introdujo un nuevo sistema de adyuvante, denominando ADAD (adaptación - adyuvante) para evaluar la eficacia protectora del antígeno nFh12 en ovejas frente a la infección experimental. Los resultados demostraron que las ovejas inmunizadas con la proteína nFh12 presentaron una reducción en el número de vermes (24.5%), menor número de huevos en fluido biliar (58.1%) y en heces (40.3%), comparado con el grupo control (Martínez-Fernández *et al* 2004).

Posteriores estudios utilizando el sistema de vacunación adaptación/adyuvante (ADAD) han sido llevados a cabo en modelos de fasciolosis de oveja y en ratones. Específicamente, la proteína nFh12 fue administrada en ovejas, empleando distintos inmunomoduladores. Los resultados mostraron que los ratones inmunizados con la proteína nFh12 y formulados, ya sea con el inmunomodulador de síntesis química OA0012 o con este mismo inmunomodulador más Qs como adyuvante, presentaron un porcentaje de supervivencia de entre el 40% al 50%, comparado con el grupo control de infección. Por otro lado, las ovejas inmunizadas con este antígeno y el inmunomodulador OA0012 más la Qs, presentaron menor número de vermes, menores lesiones hepáticas y un aumento de peso después de la infección, comparado con el grupo control de infección (López-Abán *et al* 2008).

Otra serie de estudios similares han sido llevados a cabo con la proteína rFh15. En estos estudios se ha utilizado el sistema ADAD con un inmunomodulador natural obtenido mediante extracción alcohólica del helecho *Phlebodium pseudoaureum* (PAL) y la Qs, y se ha utilizado el modelo de ratón y ovejas. Los resultados demostraron que los ratones

presentaron porcentajes de supervivencia de entre el 40% al 50% cuando se utilizó el inmunomodulador PAL solamente. Sin embargo, al utilizar PAL en combinación con Qs se obtuvieron porcentajes de supervivencia del 50% al 63%. En ovejas inmunizadas utilizando una combinación de PAL y Qs se presentó una reducción en el número de vermes (43%), menores lesiones hepáticas y un aumento de peso después de la infección (López-Abán *et al* 2007a).

3.2. Vacunas derivadas de GST's

Este tipo de proteínas corresponden a una familia de isoenzimas, cuya función principal está asociada a la destoxificación de compuestos endógenos tóxicos y xenobióticos. Se encuentran distribuidas en diferentes tejidos del parásito, principalmente en el tegumento y parénquima, y tienen un peso molecular aproximado de 25 kDa (Wijffels *et al* 1992). Estas proteínas han sido propuestas como candidatos a vacuna contra la infección causada por *F. hepatica*, basados en el hecho de que sus homólogas en *S. mansoni* y *Schistosoma japonicum* protegen frente a la infección experimental (Brophy y Pritchard 1994). También se han realizado diversos estudios para evaluar la eficacia protectora de estas moléculas en diferentes modelos experimentales de fasciolosis.

Cuando se inmunizaron ovejas con la proteína nativa, purificada de vermes adultos, se obtuvo una reducción en el número de vermes del 78%, comparado con el grupo control de infección. Además, se observó menor daño hepático y una disminución en el número de huevos en heces (Sexton *et al* 1990). En otros experimentos de inmunización de terneros con la proteína GST purificada del parásito, se emplearon diferentes sistemas de adyuvantes. Estos ensayos demostraron que la proteína GST reduce el número de vermes adultos recuperados y se obtuvo una protección que osciló entre el 19% y el 69%. En este estudio se concluyó, además, que la protección es dependiente del tipo de adyuvante utilizado y la mayor protección se obtuvo cuando la GST fue formulada en Quil A / Escualeno Montanide 80 (Morrison *et al* 1996).

En un estudio más reciente utilizando cabras, se evaluó la eficacia protectora de una GST recombinante (rFhGST-S1), formulada en Quil A, frente a una infección experimental con metacercarias de *F. hepatica*. Los resultados obtenidos mostraron que no hubo una reducción significativa en el número de vermes recuperados, tampoco en el tamaño ni en el número de huevos en heces. Sin embargo, las lesiones hepáticas evaluadas macroscópicamente estaban reducidas en el grupo de cabras inmunizadas con la GST, comparado con el grupo control, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (LaCourse *et al* 2012).

3.3. Vacunas derivadas de catepsinas

Las catepsinas son un grupo de enzimas proteolíticas (cisteína-proteasas) que son secretadas por el parásito *F. hepatica* y que conforman una gran familia. Estas proteínas son expresadas durante todos los estadios del ciclo biológico y existen dos tipos principales: catepsinas B y catepsinas L, las cuales han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas. Dentro de las funciones principales de estas proteínas, se encuentran: *i*). Participación en procesos de invasión del parásito al hospedador definitivo; *ii*). Toma de nutrientes; *iii*). Puede romper inmunoglobulinas del hospedador definitivo, evadiendo de esta forma la respuesta inmunitaria; *iv*). Puede romper fibrinógeno, previniendo el sangrado excesivo en los sitios donde se alimenta y; *v*). Participan en la modulación de la respuesta inmunológica y presentan un enorme potencial como candidatos a vacuna contra *F. hepatica* (Halton 1967, Chapman y Mitchell 1982, Dalton y Heffernan 1989, Carmona *et al* 1993, Smith *et al* 1993, Berasain *et al* 1997, Dalton *et al* 2003).

Los estudios más recientes de protección contra la fasciolosis utilizando estos antígenos, se describen a continuación. Utilizando el modelo de ratas, se hizo la inmunización con una vacuna de ADN que expresa una catepsina de *F. hepatica*, encontrándose que sólo las ratas macho presentaron una reducción significativa en el número de vermes, comparado con el grupo control de infección. También se observó una reducción estadísticamente significativa en la puntuación del daño hepático en el grupo de ratas inmunizadas con el antígeno vacunal (Wesolowska *et al* 2003a).

Cuando se utilizó la proteína recombinante rCatL1, empleando el modelo de cabras, se demostró que no hubo una reducción estadísticamente significativa en el número de vermes recuperados, comparado con el grupo control de infección. Sin embargo, se encontró una reducción estadísticamente significativa en las lesiones hepáticas. En este estudio también se demostró que no hay una correlación entre los niveles de protección y los títulos de anticuerpos (Zafra *et al* 2013). La eficacia protectora de la proteína recombinante catepsina L1 (rFhCatL1) utilizando el adyuvante Quil A, también fue evaluada en el modelo experimental de cabras. Este estudio demostró que hay una reducción en el número de vermes recuperados de 38.7%, comparado con el grupo control de infección.

Cuando la proteína rFhCatL1 fue inmunizada junto con la proteína peroxiredoxina y el antígeno de 14 KDa de *S. mansoni*, la eficacia de la inmunización se vio disminuida y solamente se obtuvo un porcentaje de reducción en el número de vermes del 10.1%. Aunque los animales utilizados en este estudio presentaron altos niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a, no existe una correlación con la reducción en el número de vermes y tampoco con el número de huevos en heces (Buffoni *et al* 2012). Otro experimento llevado a cabo en terneros inmunizados con la proteína recombinante (rFhCL1) utilizando los adyuvantes Montanide ISA70VG e ISA206VG demostró que hay una reducción estadísticamente significativa del 48.2% en el número de vermes recuperados, comparado con el grupo control de infección. No se encontraron diferencias entre el tipo de adyuvante utilizado y la reducción del número de vermes. Tampoco se encontró una correlación entre los niveles de anticuerpos y la reducción del número de vermes en este estudio (Golden *et*

al 2010). Los resultados de protección con este antígeno no son reproducibles cuando se emplea otro modelo experimental. En cabras inmunizadas con la proteína recombinante rFhCL1 empleando Quil A como adyuvante, se encontró que hay una reducción aunque no significativa en el número de vermes. También se encontró una reducción en el número de huevos en heces y en las medidas morfológicas de los vermes recuperados. Sin embargo, estas reducciones no fueron estadísticamente significativas (Pérez-Écija *et al* 2010).

En otro estudio se utilizaron diferentes catepsinas (catL5, catL1g y catB), las cuales fueron administradas individualmente o en combinación utilizando el adyuvante Quil A y el modelo experimental de ratas. Cuando las proteínas catB y catL5 fueron administradas individualmente, se encontró una reducción significativa en la magnitud de las lesiones hepáticas, lo cual no ocurrió con la proteína catL1g. Sin embargo, cuando las proteínas fueron administradas en combinación, se encontró un comportamiento bien diferenciado; por un lado, la combinación de las proteínas catB y catL5 mostró la menor puntuación en el daño hepático, siendo mejor que cuando se empleó cualquiera de los antígenos individualmente. Sin embargo, cuando se utilizaron en combinación las tres proteínas, no se encontró una reducción significativa. En cuanto al número de vermes, la combinación de catB y catL5 también presentó los mejores resultados. En general, se obtuvieron mejores resultados cuando las proteínas fueron administradas en combinación (Jayaraj *et al* 2009). Haciendo uso del modelo experimental de ratas, se evaluó la eficacia protectora de la proteína catepsina L1 de *F. hepatica* expresada de forma recombinante como cuerpos de inclusión en *E. coli* y administrada por vía oral o intragástrica. En este estudio se encontró un porcentaje de reducción de vermes entre el 60% y el 80%, comparado con el grupo control. Aunque se estudiaron los niveles de anticuerpos producidos tras la inmunización, no se encontró una relación con protección (Kesik *et al* 2007).

La forma inmadura de la catepsina L3 de *F. hepatica*, conocida como procatepsina L3 (FheCL3) fue expresada de forma recombinante en el sistema de baculovirus y de levaduras y su eficacia protectora frente a la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica* fue evaluada en el modelo experimental de ratas. Los resultados de este estudio mostraron que hubo una reducción significativa en el número de vermes recuperados del 52%, comparado con el grupo control de infección, cuando se utilizó la proteína recombinante expresada en el sistema de baculovirus (Reszka *et al* 2005). En terneros inmunizados con la proteína catepsina L1, se observó un porcentaje de protección del 53.7%. La inmunización de terneros con la catepsina L2 en combinación con la hemoglobina (Hb), indujo un porcentaje de protección del 72.4%. Además, los animales inmunizados con una combinación de catL1 y Hb, mostraron una reducción en el daño hepático, así como una reducción en el número de huevos en heces (Dalton *et al* 1996). En otro estudio de inmunización en ovejas, se demostró que la inmunización con catepsina L no redujo el número de vermes. Sin embargo, se evidenció una reducción en el número de huevos por gramo de heces del 70% (Wijffels *et al* 1994).

3.4. Vacunas derivadas de LAP

Estas proteínas también son consideradas de gran importancia durante el ciclo biológico de *F. hepatica* y su uso como candidato a vacuna también ha sido puesto de manifiesto. Son metaloproteasas y su actividad es dependiente de la presencia de cationes divalentes como Zn^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{+2} . Su principal función es la de catalizar la eliminación de residuos de leucina de péptidos y proteínas, además de participar en procesos asociados con procesamiento, maduración y activación de diferentes sustratos (Matsui *et al* 2006).

En la malaria causada por *P. falciparum* se ha demostrado su importancia durante el catabolismo de hemoglobina. Además, cuando esta proteína se encuentra sobreexpresada, el parásito *P. falciparum* se vuelve menos susceptible a la acción de una gran variedad de inhibidores de aminopeptidasas. En infecciones causadas por helmintos, estas proteínas no han sido muy ampliamente estudiadas. En *S. mansoni* se ha evidenciado su presencia en intestino, tegumento y huevos. También se ha demostrado que en presencia del inhibidor de LAP se inhibe la eclosión de los miracidios. En infecciones causadas por el nematodo gastrointestinal *Haemonchus contortus*, también se ha relacionado la proteína LAP con la eclosión de los huevos (McCarthy *et al* 2004). En *F. hepatica* también se ha detectado la presencia de esta proteína en diferentes estadios del ciclo de vida, incluyendo las fases de adulto, miracidio, metacercaria y juveniles recién desenquistados (Acosta *et al* 2008). Esta proteína ha sido utilizada en estudios de protección frente a la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica*.

Recientemente, se evaluó la eficacia protectora de la proteína recombinante rFhLAP administrada en diferentes formulaciones de adyuvantes, incluyendo el adyuvante de Freund, sales de aluminio, aceite no-mineral, dietilaminoetil dextrano (DEAE-D) y el adyuvante Ribi que es una mezcla de monofosforil lipido A (MPL) + tetralosa dicorinomicolato (TDM) + escualeno, en el modelo experimental de ovejas. Los resultados de este estudio demostraron que la inmunización de ovejas con la proteína rFhLAP redujo significativamente el número de vermes adultos recuperados al emplear cualquiera de las formulaciones mencionadas anteriormente. Los mejores resultados se obtuvieron con la formulación vacunal hecha en sales de aluminio donde se obtuvo un 86,9% de reducción en el número de vermes, seguido de la formulación en adyuvante de Freund y aceite no-mineral (adyuvac 50), donde se obtuvieron reducciones en el número de vermes de 83,8% y 74,4%, respectivamente. La formulación vacunal hecha con el adyuvante DEAE-D y Ribi mostraron reducciones en el número de vermes de 51% y 50%, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el tamaño de los vermes recuperados en ovejas inmunizadas con la proteína rFhLAP y el grupo control de adyuvante (Maggioli *et al* 2011).

En otro experimento se expresó la proteína FhLAP de forma recombinante como una proteína de fusión con tioredoxina, posteriormente esta proteína fue administrada en conejos empleando el adyuvante de Freund y se encontró un 78% de protección, medida como reducción de vermes. Aunque la inmunización de conejos con la proteína rFhLAP indujo elevados títulos de anticuerpos, no se encontró una correlación con la disminución de la carga parasitaria (Acosta *et al* 2008).

En el modelo de ovejas, se utilizó la proteína nativa nFhLAP formulada con el adyuvante de Freund, ya sea inmunizada sola o en combinación con catepsinas de *F. hepatica*. Estos estudios demostraron que la inmunización de ovejas con la proteína FhLAP redujo en un 89% la carga parasitaria comparada con el grupo control no inmunizado. Además, cuanto esta proteína se usó en combinación con catepsinas L1 y L2 de *F. hepatica* se observó una reducción del 79% en la carga parasitaria. Este estudio demostró además que las ovejas inmunizadas con la proteína FhLAP presentaron niveles de γ -glutamil transferasa iguales a los niveles de ovejas sanas, sugiriendo así que no existe daño en los conductos biliares y por tanto la vacunación basada en FhLAP induce una respuesta inmune efectiva contra los parásitos inmaduros, impidiendo de esta forma que estos alcancen los conductos biliares (Piacenza *et al* 1999).

4. Vacunas antihelmínticas derivadas de péptidos sintéticos

El desarrollo de vacunas contra parásitos basados en la utilización de péptidos sintéticos es bastante limitada. La mayoría de las investigaciones realizadas centran sus esfuerzos en el desarrollo de vacunas contra parásitos protozoos, principalmente malaria y leishmania. En cuanto a las infecciones por helmintos nematodos, se han empleado péptidos sintéticos como candidatos vacunales frente a *Trichinella spiralis*, y *B. malayi*.

En infecciones por cestodos se han utilizado péptidos sintéticos frente a *Taenia solium* y *Echinococcus granulosus*. En lo concerniente a las infecciones causadas por helmintos trematodos, se han ensayado péptidos sintéticos frente a la infección causada por *S. mansoni* y *F. hepatica*.

4.1. Vacunas frente a nematodos

El primer estudio del uso de péptidos sintéticos para prevenir la infección causada por *T. spiralis* ocurrió en el año 1995. En aquella ocasión, se emplearon tres péptidos sintéticos de 40 aminoácidos de longitud denominados p48-80, p81-120 y p121-160, los cuales son derivados de una glicoproteína secretada de 43KDa. Estos péptidos fueron formulados empleando el adyuvante de Freund y se utilizaron para inmunizar ratones que posteriormente fueron infectados experimentalmente con larvas de *T. spiralis*. Los resultados de este estudio demostraron que el péptido denominado p40-80 resultó ser protector, observándose una reducción en el número de larvas del 64,3%, así como una estimulación específica de células T (Robinson *et al* 1995).

En otro estudio se empleó un péptido sintético de 30 aminoácidos de longitud, derivado de una proteína de 43 KDa de *T. spiralis*, junto con la toxina B del cólera, para inmunizar ratones por vía intranasal. Se observó una reducción estadísticamente significativa en la carga parasitaria de los ratones inmunizados con el péptido sintético, así como una elevada

y específica respuesta inmune frente a la inmunización del tipo Th2 y también un incremento significativo de los niveles de IgA (McGuire *et al* 2002).

En filariosis linfáticas causadas por el nematodo *B. malayi*, también se ha puesto de manifiesto la eficacia protectora de péptidos sintéticos derivados de proteínas inmunodominantes del parásito y la evidencia experimental de que el desarrollo de vacunas con múltiples epítomos pueden ser una realidad. Se identificaron dos péptidos con epítomos B, derivados de la proteína tioredoxina de *B. malayi*, denominados TRXP1 y TRXP2; además, se sintetizó un péptido conjugado con las dos secuencias peptídicas anteriormente descritas. El péptido resultante de 44 aminoácidos de longitud fue formulado en micropartículas del polímero poli-láctido-glicólido (PLG) y utilizado para inmunizar ratones *Mastomys coucha*. Este estudio demostró que después de la inmunización de los ratones y posterior infección, se produjo una reducción estadísticamente significativa del 75.14% en el número de parásitos, comparado con el grupo control (Madhumathi *et al* 2010).

4.2. Vacunas frente a cestodos

En cuanto a las infecciones causadas por cestodos, se ha demostrado que tres péptidos sintéticos derivados de proteínas de *Taenia crassiceps*, denominados GK-1 (17 aminoácidos de longitud), KETc1 (13 aminoácidos de longitud) y KETc2 (9 aminoácidos de longitud) protegen parcialmente a cerdos infectados con *T. solium*. En este estudio se demostró que la vacunación con los péptidos sintéticos produjo un 52,6% de eficiencia, medida como la reducción del número de cerdos infectados y un 97,9% de reducción de la carga parasitaria total (Huerta *et al* 2001). En otros estudios llevados a cabo con la combinación de estos péptidos, se inmunizaron cerdos y se infectaron experimentalmente con *T. solium*. Los resultados de estos estudios evidenciaron resultados de protección similares que aquellos obtenidos con los péptidos sintéticos inmunizados individualmente (de Aluja *et al* 2005).

En la infección causada por el cestodo *E. granulosus*, se han realizado estudios de inmunización en el modelo de ovejas con péptidos derivados de la proteína EG95, la cual es altamente protectora frente a la hidatidosis. Estos péptidos presentan secuencias comunes y se encuentran en las posiciones 1-70 (EG95-1), 51-106 (EG95-2) y 89-153 (EG95-3). En estudios de protección *in vivo* en el modelo de ovejas inmunizadas con cada péptido individual e infectadas experimentalmente con *E. granulosus* no se observó una protección significativa y los anticuerpos generados frente a cada antígeno tampoco tuvieron actividad *in vitro* para matar al parásito. Sin embargo, anticuerpos generados contra la combinación de estos péptidos sí tuvieron actividad antiparasitaria (Woollard *et al* 1999).

4.3. Vacunas frente a trematodos

4.3.1. Vacunas frente a *S. mansoni*

El primer estudio en el que se usaron péptidos sintéticos frente a la infección por *S. mansoni* se realizó en el año 1998. En aquella ocasión, se sintetizaron dos péptidos de la región N-terminal de la subunidad 45 KDa del antígeno 9B de *S. mansoni*. Los péptidos fueron denominados 9B-1 y 9B-2 y presentaban una longitud de 14 aminoácidos. Estos péptidos fueron acoplados a la proteína BSA, formulados en adyuvante de Freund y utilizados para inmunizar ratones BALB/c que posteriormente fueron infectados experimentalmente con metacercarias de *S. mansoni*. Los resultados de este estudio demostraron que el péptido 9B-1 redujo en un 45% la cantidad de vermes, comparado con el grupo control de infección. Estudios *in vitro* también demostraron la capacidad de los anticuerpos frente al péptido 9B-1 de producir un efecto tóxico frente a las esquistosomas de *S. mansoni* (Tarrab-Hazdai *et al* 1998, Arnon *et al* 2000).

En otro estudio se utilizaron péptidos sintéticos derivados de la proteína Sm14, formulados en el adyuvante Ribi e hidróxido de aluminio. Estos péptidos fueron administrados en ratones Swiss y posteriormente infectados experimentalmente con cercarias de *S. mansoni*. Los resultados de este estudio mostraron que los péptidos denominados 1.1, 1.3, 1.4 y 2.1 presentaron similares niveles de protección, medidos como reducción en el número de vermes y que estaba cerca de 50% en todos los casos, lo cual es un resultado bastante similar que cuando se utiliza la proteína recombinante Sm14 (Vilar *et al* 2003). También se han utilizado seis péptidos sintéticos derivados de la proteína gliceraldehído - 3 - fosfato deshidrogenasa como candidatos a vacuna frente a la infección con *S. mansoni*. Estos péptidos resultaron ser protectores cuando se utilizaron en combinación, ya que redujeron significativamente el número de vermes recuperados, induciendo una específica respuesta inmune celular y también presentaron una reducción en la fertilidad de los huevos producidos por los vermes adultos (El-Ridi *et al* 2004).

En otro estudio se utilizaron péptidos sintéticos derivados de la proteína GST de 28 KDa de *S. mansoni*, denominados P26 (26-43) y P116 (116-131). A partir de estos péptidos se sintetizaron dos polipéptidos que contenían 4 monómeros de cada péptido, los cuales fueron utilizados para inmunizar ratones y evaluar su eficacia protectora frente a la infección experimental. Los resultados mostraron que la inmunización de ratones BALB/c con el polipéptido derivado del monómero P26 redujo la carga parasitaria en un 37,5% y el número de huevos en hígado en 35,1%. Por otro lado, los ratones inmunizados con el polipéptido derivado del monómero P166 redujeron en 62,5% la carga parasitaria y en 54,0% el número de huevos en hígado (Huang *et al* 2005).

4.3.2. Vacunas frente a *F. hepatica*

En la infección causada por *F. hepatica* se han utilizado péptidos sintéticos derivados de la región C-terminal conservada de las proteínas Sm14 de *S. mansoni* y Fh15 de *F. hepatica*. Estos péptidos fueron formulados en el adyuvante Ribí e hidróxido de aluminio y posteriormente se inmunizaron ratones Swiss y se evaluó su eficacia protectora frente a la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica* y también frente a *S. mansoni*. Los péptidos fueron formulados individualmente y también se administró una combinación de ellos. Los resultados de protección de este experimento son difíciles de interpretar, principalmente por la limitación en el número de metacercarias utilizadas para hacer la infección (3 por cada ratón) y debido al hecho de que no en todos los animales del grupo control no-inmunizados se produjo una correcta infección, encontrándose en algunos casos solamente un verme adulto. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se reportó un 100% de protección al emplear los péptidos sintéticos denominados 1.4 y 2.1, mientras que los péptidos denominados 1.1 y 1.3, presentaron porcentajes de protección de 66,7% y 50,0%, respectivamente. El péptido denominado 2.5 fue el menos efectivo, presentando un porcentaje de protección del 12.5%. La protección fue calculada como la relación entre el número de animales que presentaban ausencia de vermes adultos en el momento de la necropsia y el número de animales pertenecientes a cada grupo experimental (Vilar *et al* 2003).

En otro estudio se identificaron dos péptidos con epítomos T derivados de la proteína de unión a ácidos grasos de 15 KDa de *F. hepatica*. Estos péptidos fueron denominados Fh15Ta (IKMVSSLKTKIT) y Fh15Tb (VKAVTLLKA). Sin embargo, los péptidos no fueron sintetizados químicamente; por el contrario, se expresaron de forma recombinante como una proteína de fusión a GST, los cuales fueron formulados en adyuvante de Freund y utilizados para inmunizar conejos, empleando el sistema ADAD de vacunación.

Posteriormente, los conejos fueron infectados experimentalmente con metacercarias de *F. hepatica*. Este estudio demostró que la inmunización de conejos con estos antígenos indujo niveles de protección de 48,2% y 59,1% con los péptidos recombinantes Fh15Ta y Fh15Tb, respectivamente, medidos como reducción en el número de vermes. Estos péptidos también fueron utilizados para inmunizar ratones BALB/c y CD1 y evaluar los niveles de supervivencia frente a la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica*. Los resultados de este estudio mostraron que los ratones BALB/c y CD1 inmunizados con el péptido Fh15Ta presentaron el mayor porcentaje de supervivencia (40%). Aunque los niveles de anticuerpos mostraron la presencia de las subclases IgG1 e IgG2a, no se relaciona en este estudio con la disminución en el número de vermes o en el porcentaje de supervivencia (Muro *et al* 2007).

Hasta aquí hemos visto que el desarrollo de vacunas frente a parásitos es posible, específicamente frente a parásitos helmintos y concretamente frente al parásito trematodo *F. hepatica*. También se ha puesto de manifiesto que la evolución de las ciencias -ómicas- (genómica, transcriptómica y proteómica) han constituido un avance importante para la identificación de péptidos que puedan ser utilizados como candidatos a vacuna

mediante vacunología reversa y que la obtención de estos péptidos mediante síntesis química presenta una alternativa con muchas ventajas a los métodos convencionales de obtención de antígenos. Por esta razón en el presente estudio haremos uso de todos los elementos mencionados anteriormente para proponer el diseño, la caracterización de la respuesta inmune y evaluación protectora frente a la infección experimental de ratones con metacercarias de *F. hepatica* de péptidos que contengan epítomos B y epítomos T, a fin de postular la generación de una vacuna multiantigénica, químicamente sintetizada y basada en subunidades peptídicas como herramienta profiláctica para la prevención de la fasciolosis causada por *F. hepatica*.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El empleo de herramientas de bioinformática nos proporcionará una valiosa ayuda en la metodología para la identificación y el diseño de péptidos que puedan ser utilizados como candidatos a vacuna contra la infección causada por *F. hepatica*. Estos péptidos inducirán una respuesta inmune específica tras su administración en ratones BALB/c y de acuerdo a esta respuesta se seleccionarán algunos péptidos para los ensayos de protección *in vivo*. Los péptidos seleccionados al ser inmunizados en ratones BALB/c, solos o en combinación, empleando el sistema ADAD de vacunación, inducirán una respuesta inmunoprotectora, sugiriendo de esta forma el uso de péptidos sintéticos derivados de proteínas de *F. hepatica* como posibles candidatos a vacuna contra la fasciolosis causada por *F. hepatica*.

Objetivo general

1. Identificación de nuevas moléculas candidatas a vacuna contra la fasciolosis causada por *Fasciola hepatica* y ensayo de las mismas en combinación con modernos adyuvantes e inmunomoduladores.

Objetivos específicos

1. Selección de proteínas mediante herramientas de bioinformática procedentes de las moléculas publicadas de *F. hepatica* que presentan péptido señal y ausencia de dominio de unión transmembranal.
2. Identificación de péptidos entre las secuencias anteriormente elegidas que contengan epítomos B y T.
3. Síntesis química de los péptidos seleccionados.
4. Estudio de la respuesta inmune inducida por los péptidos tras su administración en ratones BALB/c empleando el sistema ADAD de vacunación.
5. Elección de péptidos candidatos a vacuna y evaluación de la protección *in vivo* frente a la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica*.
6. Valoración del perfil de expresión génica inducida por la vacuna y su implicación en rutas metabólicas mediante la tecnología de *microarrays* de *Affymetrix*.

Capítulo II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño de péptidos

1.1. Selección de proteínas

En la actualidad no se encuentra reportado el genoma completo de *F. hepatica*, estando disponibles solamente un número limitado de secuencias de genes y proteínas en las bases de datos. Todas las secuencias de proteínas disponibles para *F. hepatica* fueron recogidas de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) al comienzo de este estudio. Para seleccionar aquellas proteínas que posiblemente son secretadas, cada secuencia obtenida fue individualmente analizada para detectar la presencia de un péptido señal (SP), así como la ausencia de regiones transmembrana (TM). El péptido señal fue predicho mediante el servidor *SignalP 3.0* (Bendtsen *et al* 2004) del Centro para el Análisis de Secuencias Biológicas (CBSA), disponible en (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y la predicción de la región transmembrana utilizando la herramienta de predicción de regiones transmembrana mediante modelos ocultos de Markov (TMHMM), mediante el servidor TMHMM2.0 (Krogh *et al* 2001) disponible en (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Solamente aquellas proteínas que presentaron SP y ausencia de TM fueron finalmente seleccionadas y agrupadas en familias comunes. Todas las proteínas seleccionadas fueron sometidas a un alineamiento de aminoácidos mediante ClustalW (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) para que en lo posible las secuencias peptídicas a sintetizar correspondiesen a regiones conservadas o semiconservadas de las proteínas.

1.2. Péptidos con epítomos B

Las herramientas de bioinformática *BepiPred* (Larsen *et al* 2006), del CBSA y disponible en (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) y *Antheprot* (Deleage *et al* 2001), disponible en (<http://antheprot-pbil.ibcp.fr/>) fueron utilizadas para la predicción de epítomos B lineales. En el método empleado por *BepiPred*, a partir de una secuencia de aminoácidos de una proteína en formato *FASTA* como entrada, cada aminoácido recibe un puntaje usando algoritmos basados en Modelos Ocultos de Markov (HMM) y de Redes Neuronales (NN) e incorpora métodos de propensión escalar basados en la hidrofobicidad y en la predicción de estructuras secundarias. Los valores adquiridos por este método fueron comparados con aquellos obtenidos con el programa *Antheprot 3D*, el cual se basa en propiedades físicas y químicas de los aminoácidos, tales como antigenicidad, hidrofobicidad, flexibilidad y acceso al solvente.

Las secuencias de aminoácidos con los mayores valores de probabilidad de contener epítomos B fueron agrupadas en secuencias de 20 aminoácidos y solamente aquellas regiones que mostraron los mayores valores (≥ 0.5 de acuerdo al resultado HMM) fueron seleccionadas como epítomos B lineales (Kolaskar y Tongaonkar 1990, Larsen *et al* 2006).

1.3. Péptidos con epítomos T

Las herramientas bioinformáticas de predicción de epítomos T, *SYFPEITHI* (Rammensee *et al* 1999), disponible en (<http://www.syfpeithi.de>) e Immune Epitope Database (IEDB) (Peters *et al* 2005), disponible en (<http://www.iedb.org/>) fueron usadas para predecir la unión de péptidos derivados de las proteínas seleccionadas al MHC-II. La predicción de epítomos T fue realizada usando como referencia las moléculas MHC-II de ratón (H2-IA_d y H2-IE_d). Los péptidos diseñados siguiendo esta metodología correspondían a secuencias de 15 aminoácidos de longitud.

1.4. Síntesis de péptidos

El procedimiento de síntesis y purificación de péptidos fue llevado a cabo en el Departamento de Química de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). Se utilizó la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) desarrollada por Merrifield (Merrifield 1969) y modificada por Houghten (Houghten 1985). En este procedimiento se distinguen cuatro pasos fundamentales para la síntesis de los péptidos:

- i*). Acople del primer aminoácido protegido (t-Boc) por el extremo carboxilo – terminal a una resina sólida, inerte y estable que va a soportar los polipéptidos sintetizados mediante un enlace covalente de tipo éter.
- ii*). Desprotección (eliminación del grupo t-Boc) del aminoácido acoplado en el paso anterior, exponiendo así el grupo funcional amino del extremo amino-terminal.
- iii*). Activación del grupo carboxílico del aminoácido t-Boc que va a ser acoplado.
- iv*). Acople del aminoácido t-Boc activado en el paso anterior al aminoácido que está unido covalentemente a la resina (formación del enlace amida peptídico).

Estos pasos son repetidos sucesivamente dependiendo del número de aminoácidos que se deseen acoplar a la cadena peptídica. Al final del último acople y desprotección, se sigue un procedimiento para retirar el polipéptido de la resina, así como para eliminar grupos protectores adicionales que eventualmente pudieran tener algunos aminoácidos que contengan en su estructura grupos funcionales reactivos, por ejemplo, aminoácidos con grupos -OH, -COOH y -SH libres.

Cada vez que se realiza el acople de un aminoácido y la desprotección del mismo, se debe hacer una prueba analítica cualitativa para verificar que estos pasos han sido correctamente desarrollados. La prueba cualitativa empleada es el test de Kaiser (Kaiser *et al* 1970), que detecta la presencia de grupos amino libres en aminas primarias y secundarias.

Cuando el test de Kaiser resulta positivo se produce una coloración azul de la resina y es debido a las siguientes posibilidades:

- i*). El acople de un aminoácido a otro ha sido incompleto y se detecta la presencia de grupos amino libres.

ii). La desprotección ha sido completa y los grupos amino del último aminoácido acoplado están libres para formar el enlace peptídico con el siguiente aminoácido t-Boc.

Cuando el test de Kaiser resulta negativo NO se produce una coloración azul de la resina y es debido a las siguientes posibilidades:

i). El acople de los péptidos ha sido completo y no hay grupos amino libres.

ii). La desprotección no ha sido eficiente y no se detectan grupos amino libres para formar el acople con el siguiente aminoácido t-Boc.

Para la síntesis de los péptidos, a partir de una resina de hidrocloreuro de metilbenzildrilamina (MBHA) con una sustitución de 0.50 meq/g, la cual se neutraliza con N,N – diisopropiletilamina (DIEA) al 5% en diclorometano (DCM), los aminoácidos t-Boc son acoplados utilizando diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) como activadores del grupo alfa carboxílico en dimetilformamida (DMF). Para confirmar el acople exitoso del aminoácido se realiza el test de Kaiser. Una vez acoplado el aminoácido, el grupo protector t-Boc se remueve con ácido trifluoroacético (TFA) al 55% en DCM por 25 minutos. Antes del siguiente acople, el péptido-resina se neutraliza con DIEA al 5% en DCM.

Al finalizar la síntesis del péptido, la eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el desacople del polipéptido de la resina se realizó utilizando ácido fluorhídrico (HF) a bajas concentraciones (25% v/v) y posteriormente con HF a altas concentraciones (>95% v/v). Finalmente, se añadió un residuo de glicina y uno de cisteína en los extremos amino y carboxilo-terminal de cada polipéptido para permitir su polimerización por oxidación (Lioy *et al* 2001), dando como resultado la generación de polipéptidos formados mayoritariamente por trímeros de cada monómero. Los péptidos fueron purificados por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) y caracterizados por MS.

2. Estudios *in vitro*

2.1. Cultivo de macrófagos

Se estableció un cultivo continuo *in vitro* de la línea celular J774.2 (Sigma–Aldrich) derivada de macrófagos peritoneales de ratón. Brevemente, el vial que contenía los macrófagos fue descongelado rápidamente en un baño de agua a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, en un frasco de cultivo de 75 cm² de área superficial, se añadieron 10 mL de medio completo de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Sigma–Aldrich) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FCS) (Sigma–Aldrich) inactivado por calor, 2 mM de L-glutamina (Gibco-Invitrogen) y 5 mL de una mezcla de penicilina (10,000 UI) y estreptomina (10 mg/mL) (Sigma–Aldrich). Se añadió el contenido del vial con los macrófagos y se incubó por un periodo de entre 48-72 h a 37 °C con 5% CO₂.

Pasado este tiempo, el sobrenadante de cultivo fue retirado y los macrófagos adheridos a la superficie del frasco de cultivo fueron removidos después de añadir 5 mL de Versene (Gibco-Invitrogen) e incubados durante 10 minutos a 37°C y 5% CO₂. Los macrófagos fueron recuperados por centrifugación a 1,200 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y los macrófagos fueron resuspendidos en 10 mL de medio completo de cultivo DMEM con el fin de ser contados en cámara de Neubauer.

2.2. Evaluación de la citotoxicidad

La reacción de reducción del colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por macrófagos tratados con los péptidos sintéticos, fue utilizada para determinar la citotoxicidad, dando como resultado la formación de unos cristales insolubles de formazán, los cuales son posteriormente solubilizados por la adición de dimetilsulfóxido, de acuerdo a la metodología descrita por Mosmann (Mosmann 1983). Un millón de macrófagos fueron incubados en placas de cultivo de 6 pocillos (Costar, Corning Costar Corp) durante 2 h a 37 °C y 5% CO₂. Posteriormente, todos los péptidos sintéticos fueron añadidos por triplicado en un rango de concentraciones entre 1 hasta 100 µg/mL por un periodo de 48 h a 37 °C y 5% CO₂.

Después de este tiempo, el sobrenadante de cultivo fue recuperado y almacenado a -20° C para la posterior cuantificación de la producción de óxido nítrico. Los macrófagos adheridos a la superficie de la placa fueron incubados junto con 200 µL del colorante MTT durante 20 minutos. Después, el colorante fue retirado y se añadieron 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para llevar a cabo la reacción de coloración. Finalmente se leyó la absorbancia de las placas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. La viabilidad celular fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = \left[\frac{\text{Abs macrófagos basales}}{\text{Abs macrófagos tratados}} \right]_{550\text{nm}} * 100$$

2.3. Producción de óxido nítrico

La producción de óxido nítrico se determinó siguiendo la metodología descrita por Miranda (Miranda *et al* 2001), mediante la utilización del reactivo de Griess para la detección de nitritos en solución acuosa. El reactivo de Griess contiene 0.2% p/v de dihidrocloruro de N-(1-naftil) etilendiamina (solución A) y 2% p/v de sulfanilamida (solución B) en una solución de ácido fosfórico al 5% v/v.

Los nitritos presentes en una muestra biológica reaccionan con el reactivo de Griess, dando como resultado la formación de una sal de diazonio, la cual toma una coloración rosada cuando entra en contacto con la N-(1-naftil) etilendiamina. La cuantificación de nitritos presente en la muestra se realiza mediante una curva de calibración de nitritos de concentración conocida. Brevemente, se mezclan en partes iguales el contenido de las soluciones A y B, de acuerdo al número de muestras a analizar y se ponen 50 µL en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Posteriormente, se añadieron 50 µL de los

sobrenadantes de cultivo de macrófagos tratados con los péptidos sintéticos obtenidos en el paso anterior y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 550 nm y se calculó la concentración de nitritos presentes en la muestra.

En un segundo experimento, los macrófagos incubados en las placas de cultivo fueron tratados inicialmente con 10 µg de LPS bacteriano de *E. coli* (Sigma-Aldrich) durante dos horas a 37 °C y 5% CO₂. Posteriormente, los péptidos sintéticos fueron añadidos en un rango de concentraciones desde 1 hasta 100 µg/mL por un periodo de 48 h a 37 °C y 5% CO₂. Una vez finalizado el tiempo de incubación, el sobrenadante de cultivo fue recuperado y utilizado para cuantificar la producción de óxido nítrico. Como control positivo para la producción de óxido nítrico se empleó LPS y como control negativo, macrófagos basales sin ningún tratamiento.

3. Inmunización de ratones BALB/c

3.1. Declaración ética

Todos los procedimientos con animales en este estudio cumplen con las regulaciones nacionales (Real Decreto 53/2013) e internacionales (Directiva Europea 2010/63/EU) en cuanto a la protección y al uso humano de animales de laboratorio. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (número de registro: PAE/SA/001) y los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Salamanca (número de registro: 8402). Los animales fueron tratados de acuerdo a las disposiciones de la Unión Europea, recogidas en el Real Decreto 1201/2005 del 10 de octubre del Ministerio de Agricultura, Pesca y Ganadería “Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines específicos”. Todos los esfuerzos fueron llevados a cabo para minimizar el sufrimiento de los animales.

3.2. Animales de experimentación

En este estudio, se utilizó un total de 174 ratones hembra de la cepa BALB/c, de seis semanas de edad y con un peso comprendido entre 20-35 g, provenientes de laboratorios Charles River (Charles River Laboratories, Barcelona, España). Los animales fueron mantenidos en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca en jaulas de plástico con comida y bebida *ad libitum*. Los animales fueron usados en los experimentos después de un periodo de siete días de adaptación en nuestro centro, con periodos regulares de 12 h de luz / oscuridad y una temperatura constante de 20 °C.

3.3. Sistema ADAD de vacunación

El sistema ADAD de vacunación, inicialmente descrito por (Martínez-Fernández *et al* 2004), se utilizó para los experimentos de inmunización, utilizando dos inmunomoduladores: uno de origen natural y otro de síntesis química. Brevemente, el sistema ADAD presenta la siguiente composición: *i*). Extracto no-tóxico de QS como adyuvante; *ii*). Inmunomodulador (natural o sintético); *iii*). Aceite no-mineral Montanide que forma una emulsión aceite/agua (70/30, v/v) y permite una liberación lenta del antígeno y ; *iv*). El antígeno (péptidos sintéticos).

Como inmunomodulador natural se utilizó PAL y la dosis empleada fue de 600 µg por cada ratón. Como inmunomodulador sintético, se utilizó la diamina alifática AA0029 descrita y sintetizada por del Olmo (del Olmo *et al* 2006), en una dosis de 100 µg por cada ratón. El protocolo de vacunación con el sistema ADAD consta de dos inyecciones: la primera está compuesta por el adyuvante, el inmunomodulador y el aceite no-mineral Montanide, administrada por vía subcutánea como un primer paso de adaptación del sistema inmune. Cinco días después de la inyección de adaptación, se realiza la primera dosis de inmunización que incluye el antígeno vacunal, además de los componentes anteriormente mencionados.

3.4. Experimento de inmunización

Se utilizaron para este estudio 168 ratones hembra de la cepa BALB/c de seis semanas de edad. En los estudios de inmunización y valoración de la respuesta inmunológica, se establecieron dos experimentos: A y B. Experimento A: grupo 1 (grupo control sin tratamiento; n=6), grupo 2 (ADAD con el inmunomodulador natural PAL [ADADn]; n=6), grupos 3-14 (ADADn junto con los péptidos que tienen epítomos B [B1-B12]; n=36) y grupos 15-26 (ADADn junto con péptidos que tienen epítomos T [T13-T24]; n=36). Experimento B: grupo 1 (grupo control sin tratamiento; n=6), grupo 2 (ADAD con el inmunomodulador de síntesis química AA0029 [ADADs]; n=6), grupos 3-14 (ADADs junto con los péptidos que tienen epítomos B [B1-B12]; n=36) y grupos 15-26 (ADADs junto con péptidos que tienen epítomos T [T13-T24]; n=36). Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea con 10 µg de cada péptido sintético formulado en el sistema ADAD en el día 0. Dos dosis de refuerzo fueron aplicadas con la misma cantidad de antígeno en los días 14 y 28, respectivamente.

3.5. Muestras

Se tomaron muestras de sangre antes de cada dosis de inmunización y en el momento de la necropsia. Los ratones fueron necropsiados dos semanas después de la última inmunización y Los esplenocitos fueron obtenidos de los bazo de acuerdo a la metodología descrita por López-Abán (López-Abán *et al* 2007b), para estudios *in vitro* de la respuesta inmunológica.

4. Valoración de la respuesta inmune

4.1. Respuesta inmune humoral

El suero de cada uno de los ratones utilizados en este experimento fue analizado por la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos específicos para cada péptido, mediante el análisis de IgG total, IgE, IgM y de las subclases IgG1 e IgG2a. Se usaron placas de 96 pocillos (Costar, Corning Costar Corp) y cada pocillo fue tapizado con 1 µg de cada péptido sintético en un volumen final de 100 µL en tampón carbonato de pH 9.6 e incubado durante 1 h a 37 °C, 12 h a 4 °C y finalmente 1 h más a 37 °C. Las placas fueron lavadas tres veces con PBS-0.05% Tween (PBS-T) y bloqueadas con 200 µL por pocillo de una solución de leche desnatada al 5% (p/v) en PBS-T durante 1 h a 37 °C y lavadas como en el paso anterior. Las muestras de suero obtenidas de cada ratón fueron incubadas en una dilución 1:100 en leche desnatada al 5% en PBS-T durante 1 h a 37°C. Posteriormente, las placas fueron lavadas como en los pasos anteriores y los anticuerpos secundarios de ratón generados en cabra y acoplados a peroxidasa anti-IgG, IgE, IgM, así como de las subclases IgG1 e IgG2a, fueron incubados durante 1 h a 37 °C en una dilución 1:1,000 en leche desnatada al 5% en PBS-T. Las placas fueron lavadas y la reacción de coloración se realizó empleando dihidrocloruro de *o*-fenilendiamina (OPD) como substrato de la peroxidasa en buffer citrato de pH 5.0, la cual da como resultado una coloración amarillo-naranja que se mide a una longitud de onda de 492 nm en un espectrofotómetro (Anthos 2010).

4.2. Respuesta inmune celular

4.2.1. Cuantificación de citocinas

Las cantidades relativas de IFN-γ, IL-1α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF-α fueron cuantificadas en esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos por citometría de flujo. Brevemente, los bazo de los ratones fueron extraídos y puestos en una caja de Petri que contenía 10 mL de PBS 1X estéril. Los bazo fueron perfundidos con PBS 1X estéril con el fin de obtener una suspensión de esplenocitos.

Posteriormente, los esplenocitos fueron recuperados por centrifugación a 1,200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego los glóbulos rojos fueron lisados después de añadir 1 mL de solución de lisis que contenía cloruro de amonio (NH₄Cl) 154 mM, bicarbonato de potasio (KHCO₃) 10 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.082 mM durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante que contenía los glóbulos rojos lisados fue descartado y los esplenocitos fueron lavados con 5 mL de PBS 1X que contenía 2% (v/v) de SFB (PBS-SFB) para eliminar restos de la solución de lisis. Finalmente, los esplenocitos fueron resuspendidos en 1 mL de PBS-SFB y contados en cámara de Neubauer. Para la cuantificación de las citocinas, un millón de esplenocitos fueron

incubados en placas de cultivo de 6 pocillos en un volumen final de 1 mL de medio completo de cultivo DMEM durante 2 h a 37 °C y 5% CO₂. Pasado este tiempo, los esplenocitos de cada ratón fueron reestimulados con 10 µg/mL del péptido con el que fueron inmunizados por un periodo de 72 h bajo las mismas condiciones de cultivo. El sobrenadante de cultivo fue recuperado y las citocinas fueron cuantificadas empleando el kit *FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10plex* (eBioscience) por citometría de flujo, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Brevemente, se disponía de unas esferas tapizadas con anticuerpos específicos contra cada citocina que fue cuantificada. Las esferas fueron diferenciadas en un citómetro de flujo al tener dos tamaños diferentes, 4 y 5 µm , respectivamente, y emitir diferentes intensidades de fluorescencia. De esta forma, se pudieron distinguir 10 subpoblaciones de esferas diferentes, cada una correspondiente con la citocina a cuantificar. Posteriormente, una mezcla de todas las esferas cargadas con cada anticuerpo para las diferentes citocinas fueron incubadas con 25 µL de sobrenadante de cultivo de esplenocitos, dando como resultado la unión de las citocinas a su anticuerpo correspondiente. Después, se añadió una mezcla de anticuerpos secundarios conjugados con biotina, los cuales se unen a las citocinas que previamente se habían unido a las esferas marcadas con anticuerpo primario. Finalmente, el conjugado de estreptavidina-ficoeritrina fue añadido y se unió al anticuerpo secundario conjugado con biotina, emitiendo señales fluorescentes que fueron detectadas en el citómetro de flujo Becton Dickinson FACScalibur del Servicio de Citometría de Flujo del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca -CIC- y posteriormente analizadas con el software *FlowCytomix Pro* de Bender MedSystems. La compensación del citómetro de flujo, así como la elaboración de las plantillas correspondientes para cada experimento fueron realizadas por el Dr. Martín Pérez Andrés del Servicio de Citometría de Flujo del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca -CIC-. La concentración de cada citocina fue determinada a partir de curvas de calibración usando citocinas recombinantes de ratón de concentración conocida.

4.2.2. Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias

Los esplenocitos de cada ratón obtenidos en el apartado anterior, fueron utilizados para este estudio. A partir de 100 µL de la suspensión de esplenocitos, se añadió anticuerpo de bloqueo CD16/CD32 (BD Biosciences) en un volumen final de 25 µL por pocillo y en una dilución de 0.1 µL anticuerpo/25 µL muestra en solución de PBS-SFB. Los anticuerpos monoclonales (BD Biosciences) empleados fueron los siguientes: CD4 marcado con isotiocianato de fluoresceína (CD4-FITC); CD8 marcado con ficoeritrina (CD8-PE); CD197 marcado con ficoeritrina (CD197-PE); B220 marcado con alofococianina (B220-APC); CD27 marcado con alofococianina (B220-APC); CD62L marcado con alofococianina (CD62L-APC) y CD45 marcado con la proteína peridina de la clorofila y colorante de cianina (CD45-PerCP-Cy5.5).

Posteriormente, los esplenocitos fueron incubados con los anticuerpos mencionados anteriormente en una dilución 1/50 (v/v) en buffer PBS-SFB durante 0.5 h a 4 °C. Diferentes preparaciones de esplenocitos de la misma muestra fueron realizadas para aquellos anticuerpos monoclonales que están marcados con el mismo fluorocromo. Después del periodo de incubación, las células fueron lavadas con PBS-SFB, centrifugadas a 1,200 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante fue descartado. Los esplenocitos fueron fijados tras añadir 100 µL de una solución al 2% (p/v) de p-formaldehído en PBS-SFB por un periodo máximo de 12 h hasta la adquisición de los datos. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScalibur de cuatro colores del Servicio de Citometría de Flujo del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca -CIC-. La compensación del citómetro de flujo, así como la elaboración de las plantillas correspondientes para cada experimento fueron realizadas por el Dr. Martín Pérez Andrés del Servicio de Citometría de Flujo del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca -CIC-. Los datos fueron analizados utilizando el software *Gatelogic Flow Cytometry Analysis* (Inivai Technologies Pty Ltd).

4.3. Análisis estadístico

Un análisis descriptivo inicial para cada grupo de ratones explorando patrones de citocinas, inmunoglobulinas y expresión de linfocitos fue llevado a cabo. Un modelo lineal con interacciones fue utilizado para evaluar los niveles de citocinas y la expresión de subpoblaciones linfocitarias, incluyendo dos factores: el tipo de epítipo (B o T) y el inmunomodulador utilizado (PAL o AA0029). La representación gráfica de estas interacciones fueron realizadas utilizando el paquete *Plotrix* en R (Lemon 2006). Los grupos de péptidos fueron comparados usando un test de Kruskal Wallis , seguido por un test de comparación múltiple de Dunn. Aquellas diferencias con un valor de $p < 0.005$ fueron consideradas estadísticamente significativas. Se realizó una correlación de Spearman entre las diferentes magnitudes inmunológicas para determinar relaciones entre citocinas, inmunoglobulinas y expresión de linfocitos. Los resultados fueron reportados como el promedio de cada grupo y la desviación estándar. El software SPSS 20.0 (SPSS Inc., USA) fue utilizado para el análisis de los datos.

Los análisis de *clusters* se utilizaron para identificar conjuntos de citocinas cuyos niveles de expresión estén correlacionadas con péptidos con epítipos B y T. El *heatmap* se visualizó usando la función *heatmap.2* del paquete *gplots* en R. Los análisis multivariantes, tales como diagramas de *Trellis* y el plano de coordenadas paralelas, fueron generados con el paquete *lattice* en R (Sarkar 2008).

4.4. Selección de péptidos

Una vez valorada la respuesta inmunológica en ratones BALB/c inmunizados con los péptidos sintéticos formulados en el sistema ADAD de vacunación, empleando dos inmunomoduladores diferentes (PAL y AA0029), se realizó un análisis estadístico univariante y multivariante con el fin de seleccionar péptidos que presentasen una alta y específica respuesta inmune para evaluar su eficacia protectora frente a la infección con metacercarias de *F. hepatica*.

Respecto a la respuesta inmune humoral, se seleccionaron aquellos péptidos que presentaron altos niveles de IgG1 y de IgG2a. En lo referente a la respuesta inmune celular, se seleccionaron péptidos que presentaron altos niveles de las citocinas más representativas de los perfiles inmunológicos del tipo Th1, mediante el estudio de la producción de IFN- γ ; Th2 mediante el estudio de los niveles de IL-4; Treg mediante la producción de IL-10; y Th17 mediante el estudio de los niveles de IL-17.

Además, se seleccionaron aquellos péptidos que presentaron un aumento en la expresión de marcadores de subpoblaciones linfocitarias asociadas a la generación de memoria inmunológica, mediante el estudio de los marcadores CD27, CD62L y CD197. Debido a que en la infección causada por *F. hepatica*, no se conocen plenamente los mecanismos inmunológicos asociados con una respuesta inmunitaria protectora, no disponemos de un criterio inmunológico definido para la selección de péptidos promisorios como candidatos a vacuna. Respecto al tipo de inmunomodulador empleado en el sistema ADAD de vacunación, se estableció cuál de los dos inmunomoduladores (PAL o AA0029) produjo un mayor aumento en la respuesta inmunológica, de acuerdo a las magnitudes inmunológicas evaluadas previamente.

5. Estudios de protección *in vivo*

5.1. Inmunización e infección experimental

Se utilizaron para este estudio 98 ratones hembra de la cepa CD1 de seis semanas de edad. Los ratones se dividieron en 14 grupos (7 ratones por grupo) para ser inmunizados con los péptidos seleccionados. Cada uno de los péptidos fue administrado individualmente a cada grupo de ratones. Además, se realizaron combinaciones de estos péptidos de acuerdo a la respuesta inmunológica inducida. Los péptidos fueron administrados utilizando el sistema ADAD de vacunación empleando el inmunomodulador de síntesis química AA0029. La distribución de los ratones en los diferentes grupos de inmunización se muestra en la tabla 7.

Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea con 10 µg de cada péptido sintético individualmente, o con 10 µg totales cuando se realizaron combinaciones de ellos, formulados en el sistema ADAD de vacunación en el día 0. Dos dosis de refuerzo fueron aplicadas con la misma cantidad de antígeno en los días 14 y 28, respectivamente. Todos los ratones (excepto los del grupo 1) fueron infectados por vía oral con siete metacercarias de *F. hepatica* dos semanas después de la última inmunización (Ridgeway Research, Gloucestershire, UK). Se tomaron muestras de sangre de todos los ratones utilizados en este estudio antes de cada dosis de inmunización, en el momento de la infección y 21 días después de la infección. Si se detectaba la presencia de algún signo de angustia, estrés, sufrimiento o dolor excesivo en alguno de los ratones, se procedía a hacer eutanasia mediante la inyección intraperitoneal de pentobarbital (60 mg / Kg).

Grupo	Antígeno	Grupo	Antígeno
1	Sano	8	T14
2	Infección	9	T15
3	Adyuvante	10	T16
4	B1	11	B6+T14
5	B2	12	B1+B5+B6
6	B5	13	T14+T15+T16
7	B6	14	B+T

Tabla 7. Distribución de ratones CD1 en grupos de inmunización para evaluar la eficacia protectora de los péptidos sintéticos seleccionados.

5.2. Evaluación de la protección

Todos los ratones supervivientes fueron necropsiados en el día 42 después de la infección y se realizó la recuperación de vermes adultos y la valoración de las lesiones hepáticas de acuerdo a los siguientes criterios: variación en el tamaño, variación en el color, variación en la consistencia, presencia de heridas y cicatrices. Se asignaron las siguientes puntuaciones dependiendo de la extensión: no alterado (0); afecta hasta un tercio del hígado (1); afecta entre uno y dos tercios (2); afecta a más de dos tercios del hígado (3). También se consideró la ectasia de los vasos sanguíneos y la alteración en los conductos biliares que fueron puntuados de la siguiente forma: no alterado (0), alteración evidente (1).

Se calculó el porcentaje de supervivencia de cada grupo de ratones inmunizados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ supervivencia} = (nv_{42} / n) * 100$$

donde nv_{42} representa el número de ratones que sobrevivieron hasta el día 42 después de la infección y n es el número de ratones incluido en cada grupo de inmunización.

6. Estudio de rutas metabólicas

6.1. Selección de antígenos

Una vez finalizado el experimento de protección en ratones CD1 inmunizados con los péptidos descritos, solamente se seleccionó para el estudio del efecto de la vacuna en las rutas metabólicas, el péptido o combinación de péptidos con el (los) cual(es) los ratones alcanzaron el mayor nivel de supervivencia frente a la infección experimental.

6.2. Inmunización de ratones BALB/c

Se utilizaron en este estudio seis ratones hembra de la cepa BALB/c de seis semanas de edad. Tres ratones fueron asignados al grupo control, los cuales no recibieron ningún tratamiento durante el experimento y los otros tres ratones fueron inmunizados con 10 µg de la mezcla de péptidos T14, T15 y T16 empleando el sistema ADAD de vacunación con el inmunomodulador de síntesis química AA0029. El esquema de inmunización fue el mismo que el indicado en experimentos anteriores.

6.3. Extracción de ARN de esplenocitos

Dos semanas después de la última dosis de inmunización de ratones BALB/c con la combinación de los péptidos sintéticos que contienen epítomos T, se realizó la extracción de ARN de esplenocitos de todos los ratones empleados en este experimento. En el momento de la necropsia se retiró asépticamente el bazo de cada ratón y se procedió a obtener los esplenocitos siguiendo la metodología descrita en experimentos anteriores. La extracción y purificación del ARN se realizó mediante el kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

Brevemente, los esplenocitos fueron lisados después de añadir 650 µL de la solución de lisis del kit y posterior homogenizado del lisado, haciendo pasar esta solución a través de una jeringa estéril y libre de ARNasas. Posteriormente, se añadieron 650 µL de etanol al 70% (v/v) en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se homogenizó muy bien mediante pipeteo exhaustivo. Después, se añadieron 700 µL de este homogenizado a una columna de purificación del kit y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 s, se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 µL de la solución 1 de lavado del kit; nuevamente se centrifugó durante 15 s y se descartó el sobrenadante. Luego, se realizaron dos lavados de la columna de purificación con 500 µL de la solución 2 de lavado del kit. En el primer lavado la columna se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 s y en el segundo se añadió el mismo volumen, pero se centrifugó durante 2 minutos. Finalmente, se añadieron a la columna 50 µL de agua ultrapura libre de ARNasas y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto para eluir el ARN purificado.

La integridad del ARN fue determinada mediante el bioanalizador Agilent 2100. Solamente aquellas muestras de ARN con valores de Integridad de ARN (RIN) iguales a 10 (en una escala de 1 a 10, donde 10 representa la máxima calidad) fueron utilizadas para la posterior elaboración de los *microarrays*.

6.4. Síntesis del ADNc y elaboración del *microarray*

Los procedimientos de síntesis del ADNc y elaboración de los *microarrays* fueron llevados a cabo en el Servicio de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca -CIC-, empleando protocolos establecidos de *Affymetrix*. Entre 100 – 300 ng del ARN total fueron amplificados usando el kit Ambion® WT Expression Kit (Ambion, Santa Clara, CA, USA) y posteriormente hibridados al Array *Mouse Gene 1.0 ST* de *Affymetrix*. Los resultados nos fueron proporcionados en formato electrónico mediante archivos *.CEL*, los cuales fueron posteriormente introducidos en bases de datos para sus análisis.

6.5. Normalización, expresión diferencial y perfil funcional

El algoritmo de análisis robusto de *microarrays* (RMA) fue utilizado para la corrección del ruido de fondo, así como para la normalización intra- e inter-*microarrays* y el cálculo de la intensidad de la señal, de acuerdo a los métodos descritos por (Bolstad *et al* 2003, Irizarry *et al* 2003a, Irizarry *et al* 2003b).

Una vez calculada para cada gen la señal de expresión absoluta, un método denominado significado del análisis del *microarray* (SAM) (Tusher *et al* 2001), fue aplicado para calcular la expresión diferencial de cada gen del *microarray*. El método usa permutaciones para proveer una inferencia robusta de los genes significativos y calcula un valor de *p* ajustado a múltiples tests (Benjamini y Hochberg 1995).

Finalmente, los genes diferencialmente expresados, junto con sus identificadores (*ID*) y sus valores relativos de expresión (*fold change*) fueron analizados mediante la aplicación de *Ingenuity Pathway Analysis* (www.ingenuity.com) para anotar funciones, rutas metabólicas y construir y visualizar redes de interacción molecular.

6.6. Validación del *microarray*

6.6.1. Síntesis de ADNc

0.75 µg de cada ARN extraído del bazo de 6 ratones BALB/c hembras fueron tratados con DNasa I (Roche, Germany) durante 20 minutos a 37°C y posteriormente usados para realizar la síntesis de ADN complementario (ADNc) con el kit *First Strand cDNA Synthesis* para RT-PCR (Roche, USA).

En resumen, cada reacción de 20 μ L contenía 1x de Buffer, 5mM de MgCl₂, 1 mM de dNTP's, 0.08 A₂₆₀ unidades de primers random p(dN)₆, 2,5 U/ μ L de inhibidor de RNasa, 1 U/ μ L de enzima transcriptasa reversa AMW y agua ultra pura para completar el volumen de reacción. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 25°C por 10 min, 42°C por 1 h y 99°C por 5 minutos. Una síntesis adicional de ADNc sin la enzima transcriptasa reversa AMW (RT-) fue hecha para cada muestra con el fin de usarla como control de contaminación. Los productos fueron almacenados a -20°C y antes de su uso se realizó un *pool* de acuerdo a los grupos de ratones (sanos y tratados).

6.6.2. Amplificación de genes por PCR

2ng de ADNc RT+ y RT- fueron usados como molde para amplificar por PCR 6 genes seleccionados al azar (*cxcr2*, *ifitm1*, *s100a8*, *cd40lg*, *ikbke* y *plcg1*) con sus respectivos cebadores específicos (Tabla 8). Cabe destacar que el juego de primers del gen *plcg1* fue diseñado para evaluar la posible contaminación del ADNc con ADNg. La reacción de PCR contenía 1x Buffer, 1 mM de dNTP's, 5 pM de cada primer, 2.5 U/ μ L de la enzima i-taq DNA Polymerase y agua libre de DNasa para completar el volumen a 20 μ L. La PCR involucró un paso de denaturación de 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 10s y 72°C por 30s. Los ácidos nucleicos fueron marcados con bromuro de etidio y posteriormente separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% a 90V durante 45 minutos usando la fuente de poder *Electrophoresis Power Supply* modelo 3000xi (BIO-RAD). Una vez evaluada la amplificación del ADN en el equipo UV transiluminador, se tomaron imágenes con el software UVP BioDoc-It.

Nombre del gen	Código ensambl	Secuencia primer
CxCR2	ENSMUSG00000026180	D: ACTCCTTGGTGATGCTGGTC R: ACAGGGTTGAGCCAAAAGT
IFITM1	ENSMUSG00000025291	D: GGTGGTTGTACTGGGGTCAC R: CCAGGCAGCAGAAGTTCATG
S100A8	ENSMUSG00000056054	D: ATGCCGTCTGAAGTGGAGAA R: TGCACAACTGAGGACACTC
CD40LG	ENSMUSG00000031132	D: CAGTGGGCCAAGAAAGGATA R: GGTATTTGCCGCTTGAGTA
IKBKE	ENSMUSG00000042349	D: TGTACAAGGCCCGAAACAAG R: CGCAGCACTACTAGGAAGT
PLCG1	ENSMUSG00000016933	D: GACAGCCTGGTTGACCTCAT R: CTCTCTGGGCCTTGTAGTCG

Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para la validación del *microarray*. *D y R corresponde a primer directo y reverso respectivamente.

Capítulo III

RESULTADOS

1. Diseño de péptidos

1.1. Selección de proteínas

En la actualidad no se encuentra anotado el genoma completo de *F. hepatica*, estando disponibles solamente un número limitado de secuencias de genes y proteínas en las bases de datos. Todas las secuencias de proteínas disponibles para *F. hepatica* fueron recogidas de la base de datos del NCBI, mediante el cual se lograron identificar 269 secuencias de aminoácidos de proteínas de *F. hepatica*.

Cada una de las secuencias de aminoácidos descritas fueron sometidas a un análisis de bioinformática a fin de seleccionar aquellas proteínas que presentasen péptido señal utilizando la herramienta SignalP 3.0 y que no presentasen una región transmembrana empleando la herramienta TMHMM 2.0. En la predicción de la presencia del péptido señal, se emplearon dos métodos diferentes; en un primer ensayo, el algoritmo empleado fue el de Redes Neuronales (NN), el cual calcula tres valores:

- i). El valor S predice el conjunto de aminoácidos que pueden formar el péptido señal.
- ii). El valor C asigna un valor a cada enlace peptídico prediciendo la posible región de hidrólisis del péptido.
- iii). El valor Y es una combinación de los valores S y C para dar un valor más exacto del sitio de hidrólisis.

Para confirmar estos resultados, se utilizó un segundo método que emplea el algoritmo de Modelos Ocultos de Markov (HMM). Empleando esta metodología, se describen tres regiones del péptido señal: una primera región N (N-terminal) que comprende una longitud de entre 2 y 15 aminoácidos; una segunda región H (hidrofóbica) que comprende entre 14 y 20 aminoácidos generalmente apolares, y una tercera región denominada C (C-terminal) de 6 aminoácidos de longitud, en la que se encuentra una secuencia específica para una enzima señal peptidasa, que llevará a cabo la hidrólisis en ese sitio.

En las figuras 5, 6 y 7 se muestra la representación gráfica de la predicción de péptido señal y región transmembrana, utilizando la metodología descrita anteriormente.

Los resultados de las figuras 5 y 6 muestran que los dos métodos utilizados confirman la presencia de un péptido señal en la proteína catepsina B (GenBank: ABU62925.1) de *F. hepatica*. El mismo análisis se realizó para cada una de las secuencias de proteínas reportadas para *F. hepatica*.

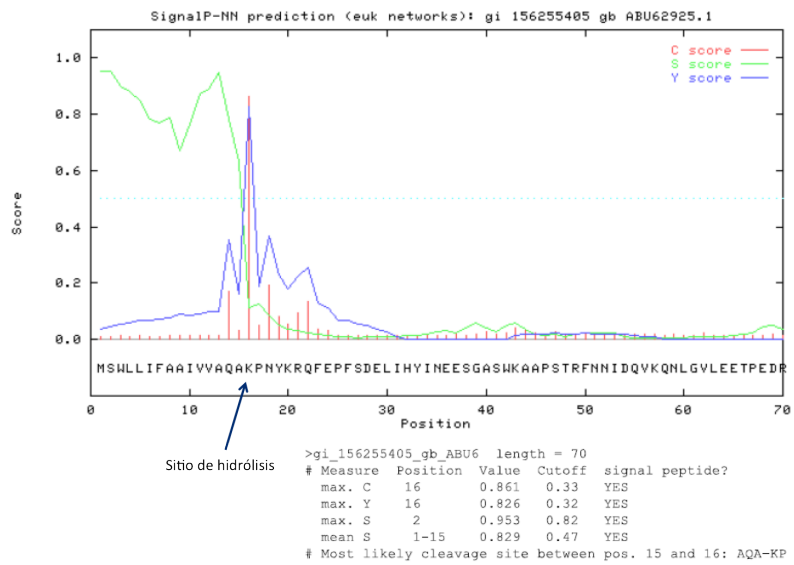


Figura 5. Predicción de la presencia de péptido señal empleando el algoritmo de redes neuronales y la proteína catepsina B (GenBank: ABU62925.1) de *F. hepatica*.

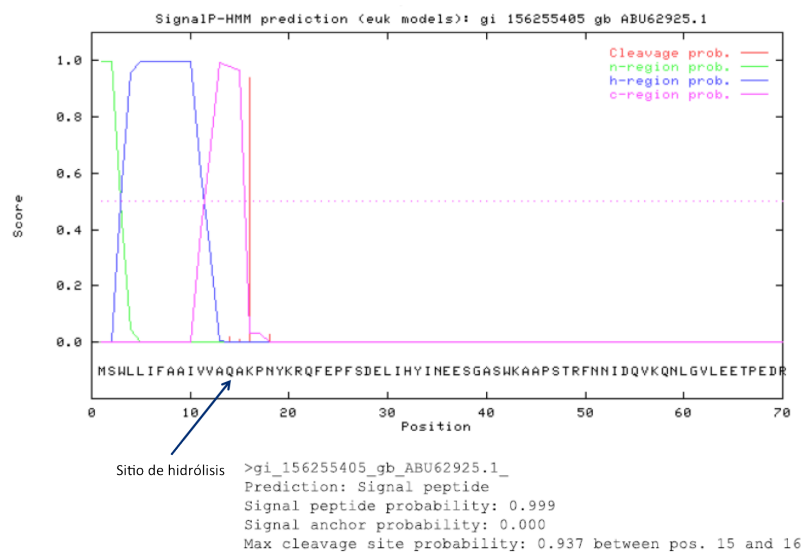


Figura 6. Predicción de la presencia de péptido señal empleando el algoritmo de modelos ocultos de Markov y la proteína catepsina B (GenBank: ABU62925.1) de *F. hepatica*.

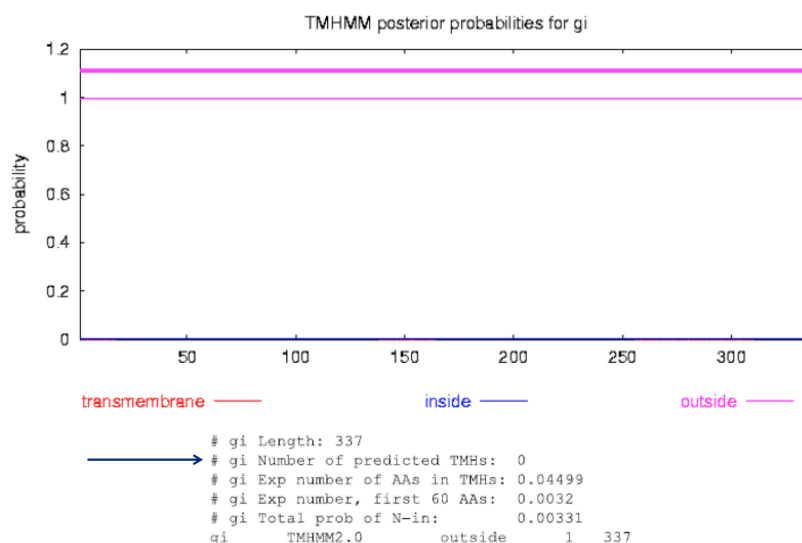


Figura 7. Predicción de la presencia de región transmembrana mediante la herramienta TMHMM2.0 con la proteína catepsina B (GenBank: ABU62925.1) de *F. hepatica*.

Los resultados mostrados en la figura 7 muestran que no hay regiones transmembrana predichas, de acuerdo a los parámetros estadísticos calculados. Generalmente, ante la ausencia de regiones transmembrana, si la proteína tiene predicho un péptido señal, la herramienta mostrará la proteína como secretada al medio extracelular. Siguiendo esta metodología, se lograron identificar un conjunto de 33 proteínas que cumplen con los criterios de selección, a partir de las cuales se diseñaron las secuencias peptídicas con epítomos B y T.

Los resultados del análisis bioinformático realizado a cada una de las secuencias de aminoácidos de las proteínas seleccionadas se muestra en la tabla 9. Las secuencias de aminoácidos de las mismas se muestran en el anexo 1.

Acceso GenBank	Descripción	Péptido señal				Tamaño proteína (aa)	Proteínas por grupo	% ID Alineamiento múltiple	Cisteínas conservadas	Posición cisteínas			
		NN		HMM									
		Probabilidad	Sitio	Probabilidad	Sitio								
AAB02579.1	Amebaporo	0.981	21-22	1	21-22	102	2	58.82	6	31, 34, 62, 72, 96, 102			
AAF88069.1	Amebaporo	0.981	15-16	0.991	15-16	101							
AAB41670.2	Catepsina secretada L1	0.983	15-16	0.999	15-16	326	20	65.95	7	129, 132, 163, 172, 204, 262, 311			
AAC47721.1	Catepsina secretada L2	0.963	15-16	0.999	15-16	326							
ABQ95351.1	Catepsina secretada L2	0.979	15-16	0.999	15-16	326							
AAA29136.1	Catepsina	0.986	15-16	0.999	15-16	326							
AAA29137.1	Catepsina	0.991	15-16	1	15-16	326							
AAF76330.1	Catepsina L	0.991	15-16	1	15-16	326							
ABN50361.2	Catepsina L	0.989	15-16	0.999	15-16	326							
AAP49831.1	Catepsina L	0.991	15-16	0.999	15-16	326							
BAA23743.1	Catepsina L	0.987	15-16	0.999	15-16	325							
AAR99518.1	Catepsina L	0.986	15-16	0.999	15-16	326							
CAA80446.1	Catepsina L	0.981	15-16	0.999	15-16	326							
AAT76664.1	Catepsina L1	0.986	15-16	0.999	15-16	326							
Q24940.1	Catepsina L	0.986	15-16	0.999	15-16	326							
CAA80448.1	Catepsina L	0.729	0.764	18-19	166					40.36	6	4, 7, 38, 47, 79, 137
CAA80444.1	Catepsina L	0.805	0.619	18-19	166							
CAA80445.1	Catepsina L	0.768	0.744	18-19	166							
CAA80449.1	Catepsina B	0.749	0.709	16-17	166					25.75	8	4, 7, 20, 40, 41, 44, 48, 97
CAA80451.1	Catepsina B	0.675	0.775	17-18	104							
ABJ97285.1	Catepsina D	0.979	16-17	1	16-17	429				
ABU62925.1	Catepsina B	0.971	15-16	0.999	15-16	337				
AAA29144.1	Vitelina	0.992	19-20	1	19-20	272	2	86.4	NA	...			
AAA29143.1	Vitelina	0.991	19-20	1	19-20	272							
AAA31753.2	NADH deshidrogenasa 3	0.997	23-24	0.886	23-24	118	5	98.31	1	45			
Q34522.1	NADH deshidrogenasa 3	0.997	23-24	0.886	23-24	118							
AAG13152.2	NADH deshidrogenasa 3	0.998	23-24	0.969	23-24	118							
AAG13156.2	NADH deshidrogenasa 5	0.994	24-25	0.842	24-25	522							
AAG13150.2	NADH deshidrogenasa 2	0.990	44-45	0.868	63-64	288	16.03				
BAE44988.1	Citocromo oxidasa	0.998	29-30	0.707	21-22	177	3	99.31	2	96, 98			
BAE45005.1	Citocromo oxidasa	0.998	29-30	0.707	21-22	145							
AAB01231.3	Citocromo oxidasa	0.972	22-23	0.926	24-25	215	...	2	73, 185				
AAV88752.1	Cistatina	0.973	16-17	0.990	20-21	116	1				
CAC85636	Legumaina	0.991	17-18	0.995	17-18	419	1				

Tabla 9. Análisis bioinformático de las proteínas de *F. hepatica* seleccionadas para el diseño de péptidos con epítomos B y T.

1.2. Péptidos con epítomos B

Cada una de las secuencias seleccionadas en el apartado anterior fue analizada mediante las herramientas Bepipred y Antheprot, a fin de encontrar secuencias peptídicas que fuesen potenciales epítomos B. Estas herramientas combinan los algoritmos de Redes NN y HMM, basándose en propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos. Los resultados de *Antheprot* se muestran como índices positivos de diferentes propiedades, como accesibilidad al solvente e hidrofobicidad.

Cuando utilizamos la herramienta BepiPred, la presencia de una letra E (que significa que ese aminoácido puede formar parte de un epítomo lineal) y un valor de puntaje positivo para un aminoácido o un conjunto de aminoácidos, nos indica una mayor probabilidad de presentar un epítomo B. Estos resultados, en combinación con los obtenidos por Antheprot, nos indican finalmente la presencia de epítomos B. Los epítomos B diseñados correspondieron a secuencias de 20 aminoácidos de longitud.

En la figura 8, se muestra una representación gráfica de la predicción de aminoácidos que pueden ser potenciales epítomos B.

BepiPred 1.0b Server - prediction results						
Technical University of Denmark						
#	seqname	start	end	score	N/A	?
AA41670.2		98	98	0.149	.	E
AA41670.2		99	99	0.426	.	E
AA41670.2		100	100	0.897	.	E
AA41670.2		101	101	1.023	.	E
AA41670.2		102	102	1.112	.	E
AA41670.2		103	103	0.992	.	E
AA41670.2		104	104	1.018	.	E
AA41670.2		105	105	1.017	.	E
AA41670.2		106	106	1.231	.	E
AA41670.2		107	107	1.178	.	E
AA41670.2		108	108	0.969	.	E
AA41670.2		109	109	0.950	.	E
AA41670.2		110	110	0.565	.	E
AA41670.2		111	111	0.638	.	E
AA41670.2		112	112	0.766	.	E
AA41670.2		113	113	0.931	.	E
AA41670.2		114	114	0.914	.	E
AA41670.2		115	115	0.632	.	E
AA41670.2		116	116	0.337	.	E
AA41670.2		117	117	0.533	.	E
AA41670.2		118	118	0.487	.	E
AA41670.2		119	119	0.652	.	E
AA41670.2		120	120	0.661	.	E
AA41670.2		121	121	0.691	.	E
AA41670.2		122	122	0.734	.	E
AA41670.2		123	123	0.742	.	E
AA41670.2		124	124	0.942	.	E
AA41670.2		125	125	1.065	.	E

Figura 8. Predicción de epítos B mediante BepiPred para la proteína catepsina B (GenBank: ABU62925.1) de *F. hepatica*.

Una vez determinadas las secuencias de aminoácidos como potenciales epítos B, se realizó un alineamiento de los aminoácidos de las proteínas pertenecientes a familias comunes empleando ClustalW, con el fin de asegurarse de que los posibles epítos B estuviesen presentes en lo posible en regiones conservadas o semiconservadas de las proteínas. Los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las familias de proteínas se muestran en el anexo 2.

1.3. Péptidos con epítos T

Para el diseño de péptidos que contuviesen epítos T, se tuvo en cuenta la predicción de un correcto anclaje de los péptidos a las moléculas MHC-II, con la finalidad de que el complejo péptido-MHC pudiese presentarse adecuadamente al receptor de células T (TCR), y de desencadenar una respuesta inmunitaria adecuada. El diseño de los péptidos con epítos T se hizo en base a las moléculas MHC-II de ratón (H2), debido a que este era el modelo experimental escogido para la caracterización de la respuesta inmune inducida tras la inmunización con los péptidos. La predicción de epítos T se hizo con las herramientas SYFPEITHI e IEDB, encontrándose resultados bastante reproducibles.

Las secuencias de aminoácidos finalmente escogidas fueron aquellas que presentaron los mayores valores de predicción, además de no solaparse con los péptidos B diseñados anteriormente y que se encontrasen distantes el uno del otro en la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Los epítos T diseñados corresponden a secuencias de 15 aminoácidos de longitud. En la figura 9, se observa gráficamente la forma como se presentan los resultados de predicción con las herramientas *SYFPEITHI* e *IEDB* para la proteína Catepsina B (GenBank: ABU62925.1) de *F. hepatica*.

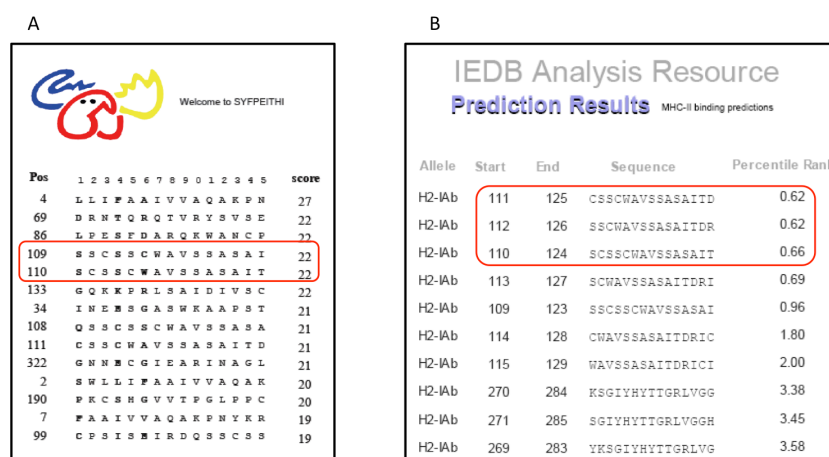


Figura 9. Predicción de epítos T utilizando las herramientas *SYFPEITHI* (A) e *IEDB* (B).

En la figura 10 se muestra la localización de los péptidos B y T diseñados utilizando la secuencia de aminoácidos de la proteína catepsina B.

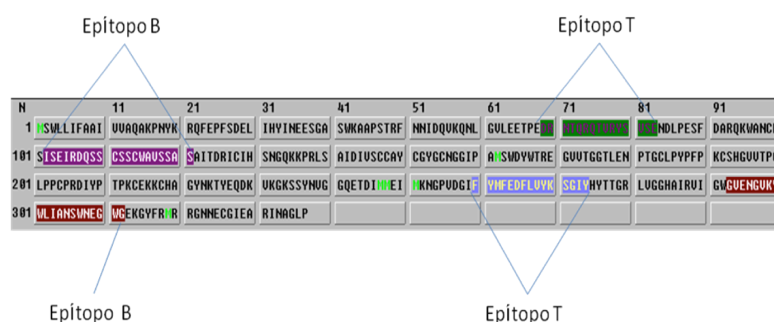


Figura 10. Localización de los péptidos B y T diseñados en la secuencia de aminoácidos de la proteína catepsina B (GenBank: ABU62925.1) de *F. hepatica*.

Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se seleccionaron y se diseñaron 24 péptidos; 12 con epítomos B y 12 con epítomos T.

1.4. Síntesis de péptidos

Siguiendo la metodología descrita, se lograron obtener los péptidos en cantidad suficiente para los experimentos de inmunización, siendo ésta una de las principales ventajas de obtener moléculas sintetizadas químicamente. Cada uno de los péptidos fue purificado por RP-HPLC y posteriormente caracterizado por espectrometría de masas para verificar su peso molecular. Todos los péptidos se obtuvieron con una pureza mayor del 90%.

En la figura 11 se observan los cromatogramas de la purificación y espectrometría de masas del péptido 36493 derivado de la proteína de amebaporo (GenBank: AAF88069.1).

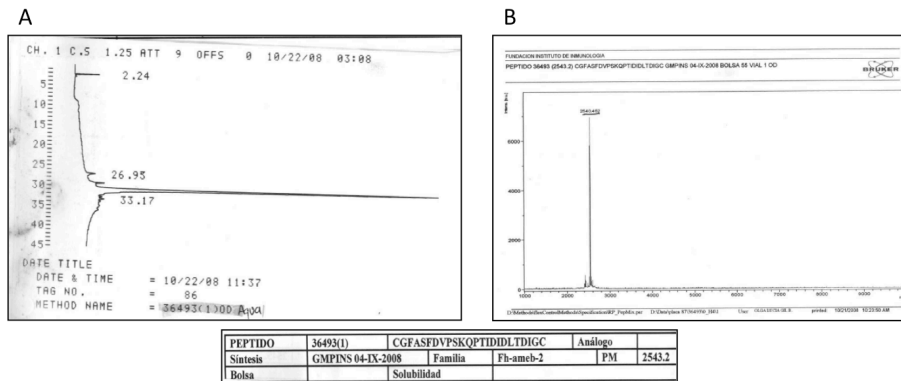


Figura 11. Control de calidad de la síntesis y purificación del péptido 36493 derivado de la proteína de amebaporo (GenBank: AAF88069.1). A). Purificación por RP-HPLC. B). Espectro de masas.

En el anexo 3 se muestran los cromatogramas para evaluar el control de calidad de cada uno de los péptidos sintetizados.

En la tabla 10 se muestra la secuencia de aminoácidos de todos los péptidos diseñados siguiendo la metodología indicada anteriormente, así como el peso molecular y la cantidad obtenida después del procedimiento de síntesis y purificación.

Código	Familia	Epítipo	Secuencia de aminoácidos	Peso molecular (Da)	Cantidad (mg)	Posición (aa)
36490	Amebaporo	B1	KGAGSSQDACIKFIQYEVDG	2437.10	50.71	63 - 82
36491	Amebaporo	B2	KGAGSSQDATIKFIQYEVDG	2435.00	50.70	63 - 82
36492	Amebaporo	B3	FASFDVPSKQPTIDIDLCDI	2545.30	50.10	14 - 33
36493	Amebaporo	B4	FASFDVPSKQPTIDIDLTDI	2543.20	30.10	14 - 33
36495	Catepsina B	B5	ISEIRDQSSTSSTWAVSSAS	2419.90	50.95	79 - 98
36496	Catepsina B	B6	GVENGVKYWLIANSWNEGWVG	2600.30	50.51	293 - 312
36497	Catepsina L	B7	QTCSPLRVNHAVLAVGYGTQ	2435.00	49.96	260 - 279
36498	Catepsina L	B8	QTCSPLRVNHAVLAVGYGTQ	2432.90	50.03	260 - 279
36500	Cistatina	B9	YTEPRSVTPEERSVFQPMIL	2700.20	50.05	27 - 46
36501	Cistatina	B10	FVPLYSSKSATSVGTPTRVS	2405.10	7.13	95 - 114
36503	Legumaina	B11	VTTNGPPNGKHNDKHTYVEC	2532.20	50.84	350 - 369
36504	Legumaina	B12	VTTNGPPNGKHNDKHTYVET	2530.10	6.74	350 - 369
37881	Amebaporo	T13	TVNLVKRLLQNSVVE	2032.50	10.35	37 - 51
37882	Amebaporo	T14	DYIIDHVDQHNATEI	2103.60	9.88	80 - 94
37883	Catepsina B	T15	DRNTQRQTVRYSVSE	2159.30	10.50	46 - 60
37884	Catepsina B	T16	FYMFEDFLVYKSGIY	2243.10	10.03	260 - 274
37885	Catepsina L	T17	KYLTEMSRASDILSH	2071.90	9.63	83 - 97
37886	Catepsina L	T18	ISFSEQQLVDTSGPW	2014.30	4.99	153 - 167
37887	Catepsina L	T19	ENAYEYLNKHNGLTE	2130.70	12.48	178 - 192
37888	Citocromo oxidasa	T20	LDPYFNLVSPVYNY	2153.70	10.19	27 - 41
37889	Citocromo oxidasa	T21	DLNLPRLNALSAWLL	2029.90	9.99	76 - 90
37890	Vitelina	T22	FAGHGKAYLHGSFDK	1955.90	9.12	56 - 70
37891	Vitelina	T23	YEKYEDDYARETPYD	2276.70	10.50	254 - 268
37893	NADH	T24	LGIGFLVEVRRGYVR	2054.90	5.93	101 - 115

Tabla 10. Secuencia de aminoácidos de los péptidos sintetizados. Para cada péptido se indica un código, familia, tipo de epítipo, peso molecular y cantidad obtenida.

2. Estudios *in vitro*

2.1. Evaluación de la citotoxicidad

Los resultados de este experimento mostraron que ninguno de los péptidos fue tóxico para los macrófagos peritoneales de ratón en el rango de las concentraciones evaluadas, de acuerdo al ensayo colorimétrico de MTT y en todos los casos la viabilidad celular fue superior a 80%, como se puede observar en la figura 12. Se evaluó también la citotoxicidad generada por el solvente utilizado para solubilizar los péptidos (PBS 1X/DMSO, 80/20), encontrándose que éste no presenta toxicidad para los macrófagos (datos no mostrados).

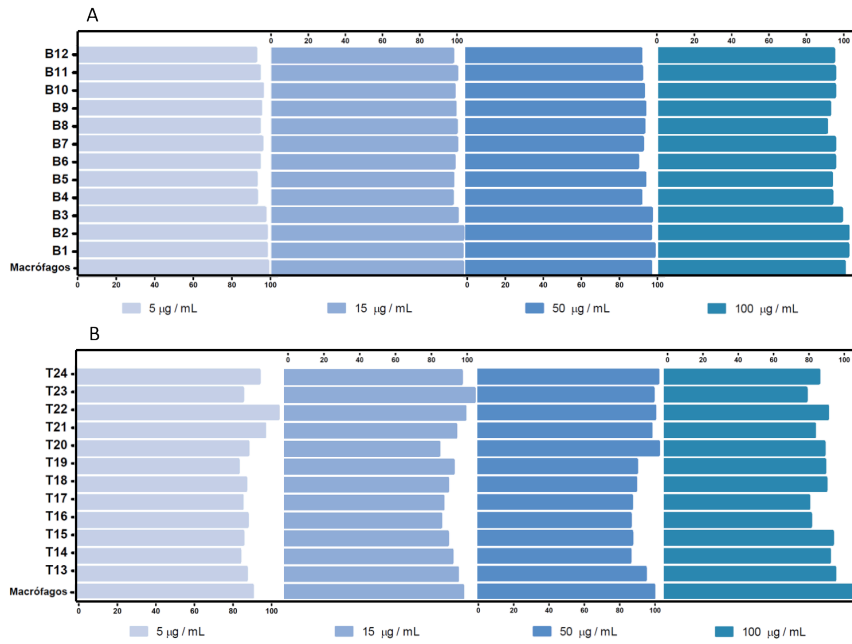


Figura 12. Viabilidad celular en macrófagos tratados con los péptidos. A). Tratamiento con los péptidos B. B). Tratamiento con los péptidos T.

2.2. Producción de óxido nítrico

Los resultados mostraron que los péptidos sintéticos no estimulan la producción de óxido nítrico en macrófagos basales sin ningún tratamiento (datos no mostrados). Sin embargo, en macrófagos preestimulados con LPS, se observa que algunos péptidos con epítomos B disminuyen la producción de óxido nítrico, mientras que algunos péptidos con epítomos T, la aumentan (Figura 13).

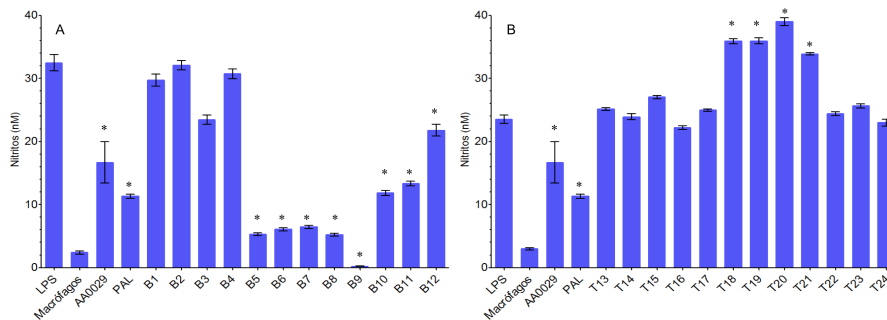


Figura 13. Producción de óxido nítrico en macrófagos preestimulados con LPS. A). Tratamiento con los péptidos B. B). Tratamiento con los péptidos T.

Los péptidos con epítomos B presentaron una tendencia hacia una disminución en la producción de óxido nítrico, principalmente los péptidos B3, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11 y B12. Por el contrario, los péptidos con epítomos T mostraron una tendencia al aumento de la producción de óxido nítrico, mayoritariamente con los péptidos T18, T19, T20 y T21.

3. Valoración de la respuesta inmune

3.1. Respuesta inmune humoral

La respuesta inmune humoral se determinó mediante la producción de anticuerpos del tipo IgG total, IgE e IgM, así como de las subclases IgG1 e IgG2a durante todo el proceso de inmunización. Los niveles de anticuerpos de cualquiera de las clases estudiadas aumentaron con cada dosis de inmunización, siendo mayores los niveles de IgG total, seguidos por IgG1 e IgG2a. Los anticuerpos del tipo IgE e IgM presentaron niveles muy bajos comparados con las otras clases (figura 14).

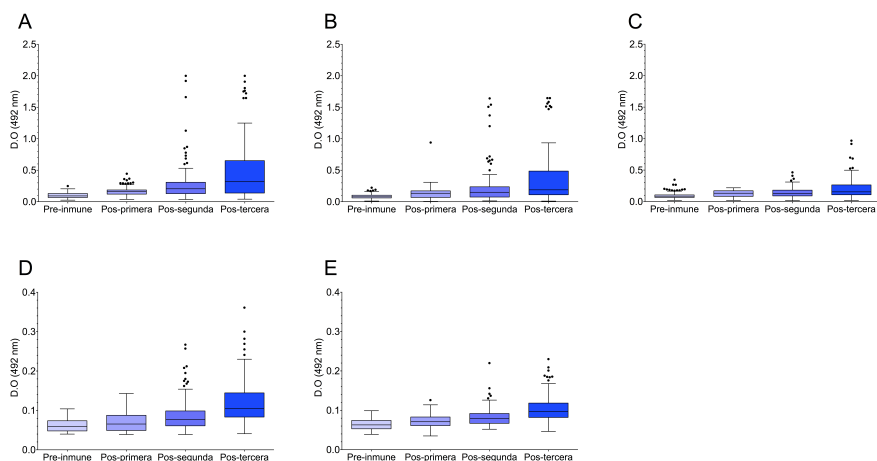


Figura 14. Niveles de IgG totales producidos durante el procedimiento de inmunización. A). IgG total. B). IgG1. C). IgG2a. D). IgE. E). IgM.

Cuando se estudiaron de forma individual los niveles de IgG totales producidos tras la inmunización de cada péptido sintético (figura 15), se observó que en general los péptidos B resultaron ser más inmunogénicos que los péptidos T, independiente del inmunomodulador utilizado ([0.528] vs [0.4332] $p=0.05$). Respecto al efecto del inmunomodulador, se observó que el uso de PAL produjo niveles más altos de IgG que los producidos por AA0029 ([0.5267] vs [0.4332] $p=0.003$).

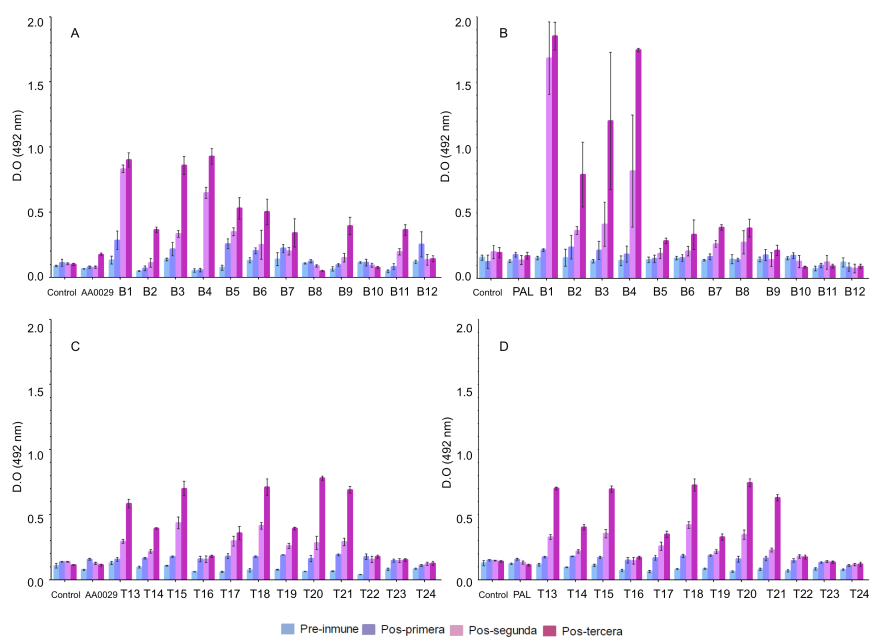


Figura 15. Niveles de anticuerpos IgG totales en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos. A). Péptidos B y AA0029. B). Péptidos B y PAL. C). Péptidos T y AA0029. D). Péptidos T y PAL.

Los péptidos denominados B1, B3 y B4 indujeron los mayores niveles de anticuerpos dos semanas después de la última dosis de inmunización y medidos como IgG totales, siendo estos estadísticamente significativos ($p < 0.05$) cuando se compararon con el grupo control, al usar cualquiera de los inmunomoduladores, como se puede observar en las figuras 15A y 15B. Sin embargo, no todos los péptidos produjeron altos niveles de anticuerpos y se pueden distinguir péptidos moderadamente inmunogénicos (B5, B6, B7 y B9) y péptidos pobremente inmunogénicos (B10, B11 y B12).

Los niveles de anticuerpos inducidos por los péptidos que contienen epítomos T (figuras 15C y 15D) resultaron ser menores que aquellos generados por los péptidos con epítomos B, al utilizar cualquiera de los dos inmunomoduladores. Los péptidos con epítomos T que indujeron los mayores niveles de anticuerpos ($p < 0.05$) fueron los denominados T13, T15, T18, T20 y T21, utilizando cualquiera de los dos inmunomoduladores. Los péptidos denominados T14, T17 y T19 resultaron ser moderadamente inmunogénicos y los péptidos T16, T22, T23 y T24 pobremente inmunogénicos, presentando los menores niveles de IgG total.

Cuando se hizo un análisis de las diferentes subclases de anticuerpos, encontramos que las inmunoglobulinas totales de tipo G (IgG) resultaron ser las más abundantes, seguidas por las inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a. Se obtuvieron resultados bastante reproducibles, obteniéndose mayores niveles de anticuerpos con el inmunomodulador PAL (figuras 16 y 17).

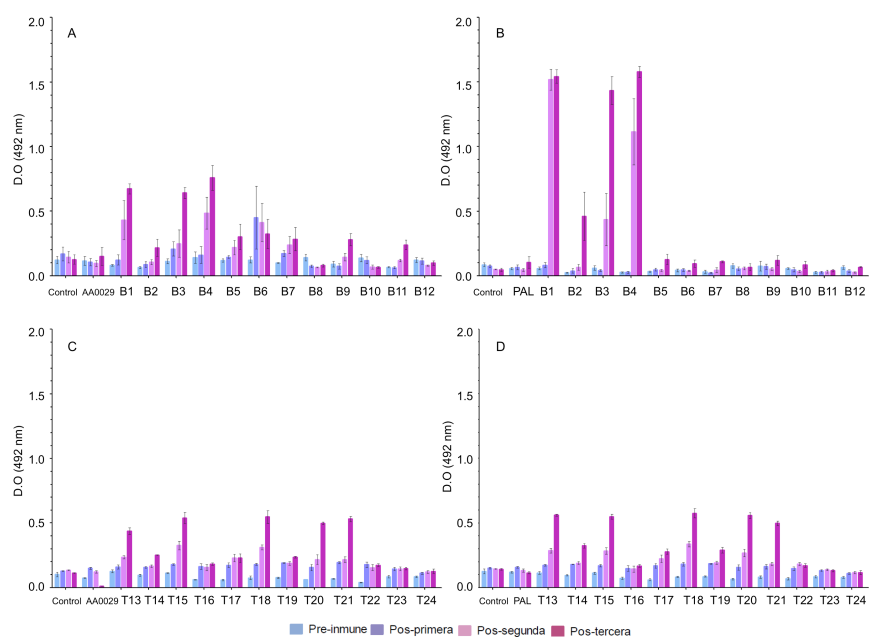


Figura 16. Niveles de anticuerpos IgG1 en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos. A). Péptidos B y AA0029. B). Péptidos B y PAL. C). Péptidos T y AA0029. D). Péptidos T y PAL.

El análisis de los resultados mostró que se obtienen mayores niveles de IgG1 cuando se emplea el inmunomodulador PAL. Los péptidos denominados B1, B3 y B4 indujeron los mayores niveles con cualquiera de los dos inmunomoduladores, siendo mayores con el PAL (figura 16B). Cuando se utilizaron péptidos con epítotos T, los mayores niveles de IgG1 fueron inducidos por los péptidos T13, T15, T18, T20 y T21 al utilizar cualquiera de los inmunomoduladores (figuras 16 C y 16D).

En cuanto a los niveles de IgG2a, nuevamente se observa que el inmunomodulador PAL indujo mayores niveles cuando se utilizaron los péptidos con epítotos B. Los péptidos B1, B3 y B4 indujeron los mayores niveles de IgG2a con cualquiera de los dos inmunomoduladores (figuras 17A y 17B).

Cuando se utilizaron los péptidos con epítotos T se observan menores niveles de IgG2a con cualquiera de los dos inmunomoduladores, comparado con los epítotos B ($p < 0.05$). Los péptidos T15, T18, T19, T20 y T21 indujeron los mayores niveles de IgG2a con el AA0029 (figura 17C), mientras que los péptidos T13, T14, T15, T18 y T20 lo hicieron con el PAL (figura 17D).

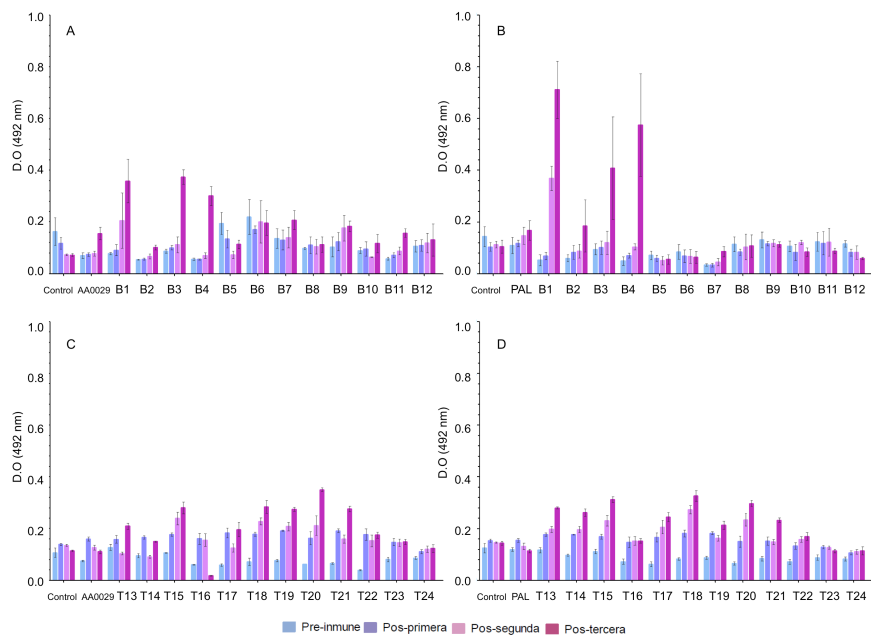


Figura 17. Niveles de anticuerpos IgG2a en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos. A). Péptidos B y AA0029. B). Péptidos B y PAL. C). Péptidos T y AA0029. D). Péptidos T y PAL.

Al aplicar un test de correlación de Spearman para establecer si existe o no relación entre los títulos de anticuerpos del tipo IgG, se encontró que hubo una correlación directa entre los títulos de anticuerpos obtenidos medidos como IgG totales, IgG1 e IgG2a cuando se emplea cualquiera de los inmunomoduladores (figura 18). Cuando se compararon las pendientes de estas rectas para los dos inmunomoduladores (PAL y AA0029), observamos que el PAL induce niveles de IgG significativamente más altos ($p < 0.05$) comparado con el AA0029 (figura 18A). Sin embargo, los niveles de IgG2a no estuvieron influenciados por el tipo de inmunomodulador utilizado y no hay diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de estas rectas (figura 18B). La pendiente positiva de estas rectas nos indica que los isotipos IgG1 e IgG2a aumentan cuando las IgG totales también aumentan. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

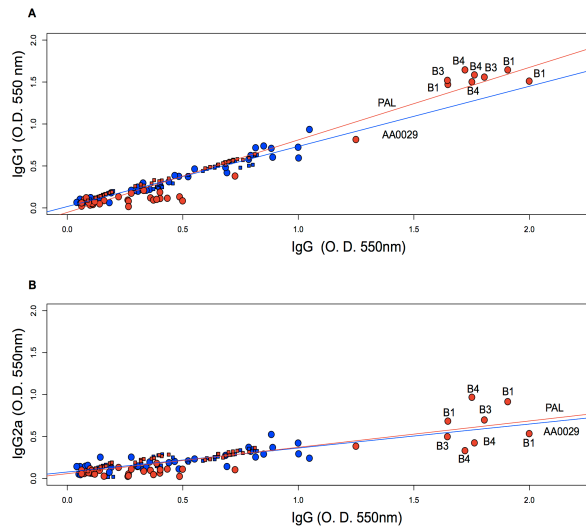


Figura 18. Comparación mediante regresión lineal del efecto del AA0029 y PAL en las subclases de IgG. A). IgG1 en función de IgG. B). IgG2a en función de IgG. El color azul indica el AA0029 y el rojo el PAL. Los círculos y cuadrados representan los péptidos B y T, respectivamente.

Cuando se estudiaron los niveles de IgE, se encontró que estos niveles no se ven influenciados por el tipo de inmunomodulador utilizado, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Además, los péptidos con epítopos B mostraron una respuesta mayor de IgE que los péptidos con epítopos T ([0.1588] vs [0.0952] $p < 0.01$) (figura 19). Los péptidos B1, B3, B4 y B5 presentaron los mayores niveles de IgE ($p < 0.05$) con el inmunomodulador PAL y los péptidos B1, B2, B3, B4, B5, B6 y B9 lo hicieron con el AA0029 (figuras 19A y 19B).

Un comportamiento similar se observó en los niveles de IgM, donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se evaluó cualquiera de los inmunomoduladores. Además, los péptidos B indujeron mayores niveles que los péptidos T ([0.1161] vs [0.0952] $p < 0.05$) (figura 20). Los péptidos B1, B3, B4 y B5 indujeron los mayores niveles de IgM con el inmunomodulador PAL ($p < 0.05$) (figura 20B) y los péptidos B1, B3, B4 y T20 lo hicieron con el inmunomodulador AA0029 ($p < 0.05$) (figuras 20C y 20D).

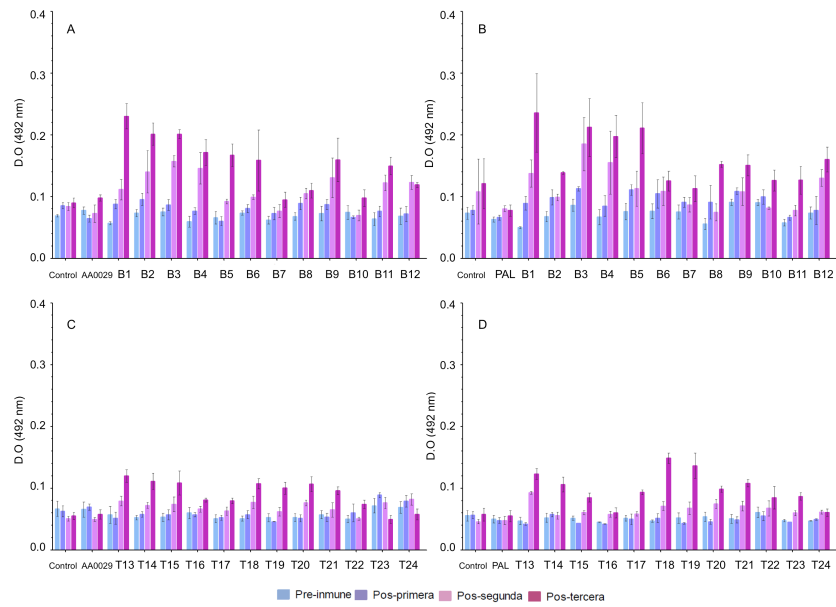


Figura 19. Niveles de anticuerpos IgE en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos. A). Péptidos B y AA0029. B). Péptidos B y PAL. C). Péptidos T y AA0029. D). Péptidos T y PAL.

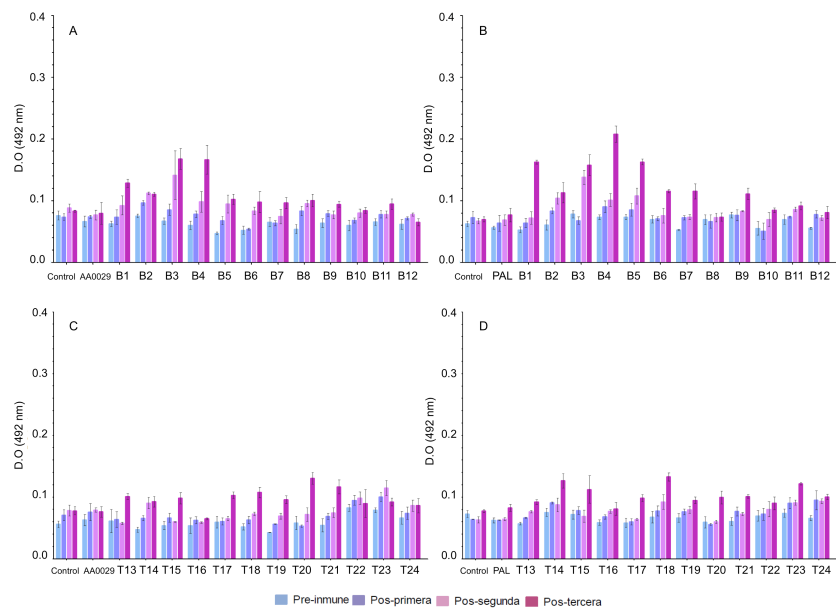


Figura 20. Niveles de anticuerpos IgM en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos. A). Péptidos B y AA0029. B). Péptidos B y PAL. C). Péptidos T y AA0029. D). Péptidos T y PAL.

3.2. Respuesta inmune celular

3.2.1. Cuantificación de citocinas

Dado que el sistema ADAD de vacunación contiene elementos que modulan la respuesta inmune, es necesario determinar el efecto que tiene en los niveles de citocinas ante la inmunización de ratones. Por esto, se realizó una comparación entre los niveles de citocinas de los ratones inmunizados solamente con los componentes del sistema ADAD de vacunación, empleando los inmunomoduladores AA0029 y PAL, y los niveles de citocinas del grupo de ratones utilizados como control (figura 21).

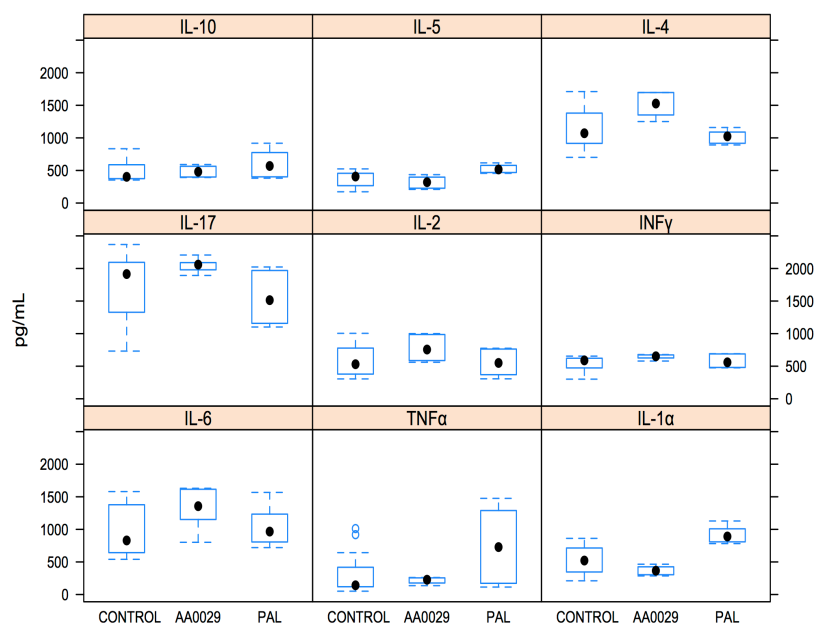


Figura 21. Comparación de los niveles de citocinas entre el grupo de ratones vacunados con el sistema ADAD, utilizando los inmunomoduladores AA0029 y PAL, y el grupo control sano.

Los resultados mostraron que solamente el inmunomodulador AA0029 fue capaz de inducir altos niveles de IL-4 comparado con el PAL o el grupo control ($p < 0.05$). Sin embargo, como se ilustra en la figura 21, la inmunización de los ratones con los componentes del sistema ADAD de vacunación induce cambios moderados en los niveles de citocinas comparados con el grupo control.

Con el fin de entender mejor el efecto del inmunomodulador respecto a los niveles de citocinas en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos, se realizó una comparación mediante diagramas de dispersión en 3D, entre los niveles de las citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 en ratones inmunizados con los péptidos B, respecto a aquellos inmunizados con los péptidos T. Como se muestra en la figura 22, cuando los ratones fueron inmunizados con los péptidos B, se producen mayores niveles de cada una de las citocinas analizadas cuando se utiliza el inmunomodulador AA0029. En esta representación gráfica están incluidos todos los grupos de ratones utilizados en este estudio.

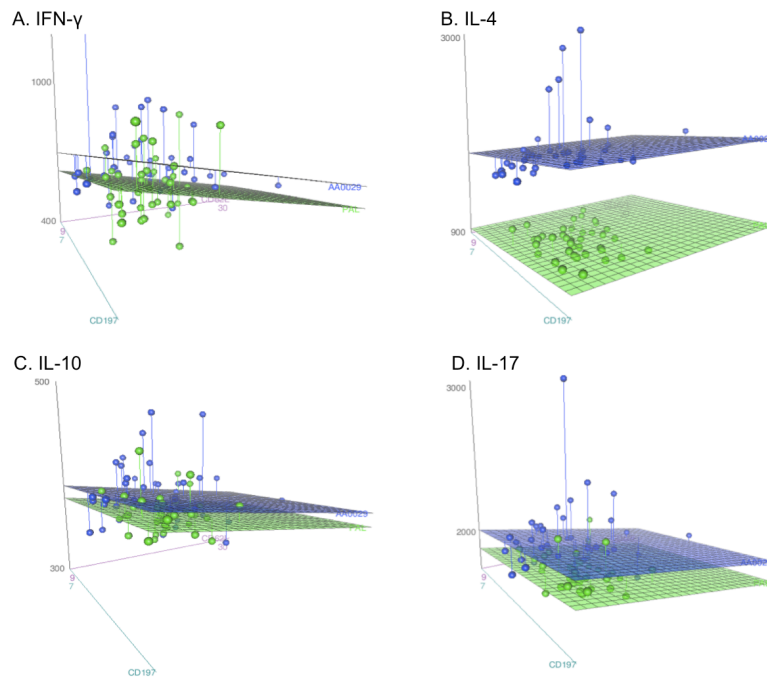


Figura 22. Diagramas de dispersión en 3 dimensiones de los niveles de citocinas para los ratones inmunizados con los péptidos con epítomos B. El eje Z representa los niveles de IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 en los paneles A, B, C y D, respectivamente. Los planos azules representan el inmunomodulador AA0029 y los planos verdes el PAL.

Cuando los ratones fueron inmunizados con los péptidos que tienen epítomos T, se observó que el uso del inmunomodulador AA0029 indujo mayores niveles de las citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-17 (figuras 23A, 23B y 23D). Sin embargo, cuando se estudiaron los niveles de IL-10, se observó un comportamiento diferente. En este caso, se obtuvieron mayores niveles de IL-10 con el inmunomodulador PAL (figura 23C).

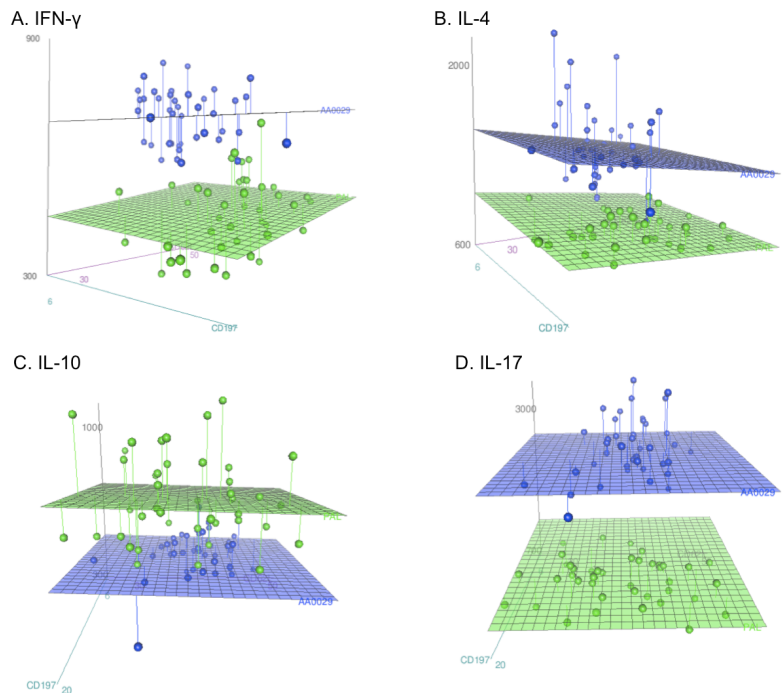


Figura 23. Diagramas de dispersión en 3 dimensiones de los niveles de citocinas para los ratones inmunizados con los péptidos con epítomos T. El eje Z representa los niveles de IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 en los paneles A, B, C y D, respectivamente. Los planos azules representan el inmunomodulador AA0029 y los planos verdes el PAL.

De acuerdo a lo anterior, se sugiere que cambios en los niveles de citocinas pueden resultar de la interacción entre dos factores: el inmunomodulador (AA0029 o PAL) y el epítomo utilizado (B o T). Por esta razón, se realizó un modelo de regresión lineal considerando los datos de los niveles de citocinas en conjunto, el cual se puede visualizar como un gráfico de interacciones en la figura 24.

Este tipo de representación gráfica es muy comúnmente utilizada cuando se quiere describir la relación existente entre una variable dependiente (que en nuestro caso corresponde a los niveles de citocinas obtenidos) y más de una variable independiente (que en nuestro caso se refiere al uso de dos inmunomoduladores diferentes (AA0029 y PAL), así como el uso de péptidos con dos características diferentes (péptidos con epítomos B y péptidos con epítomos T)).

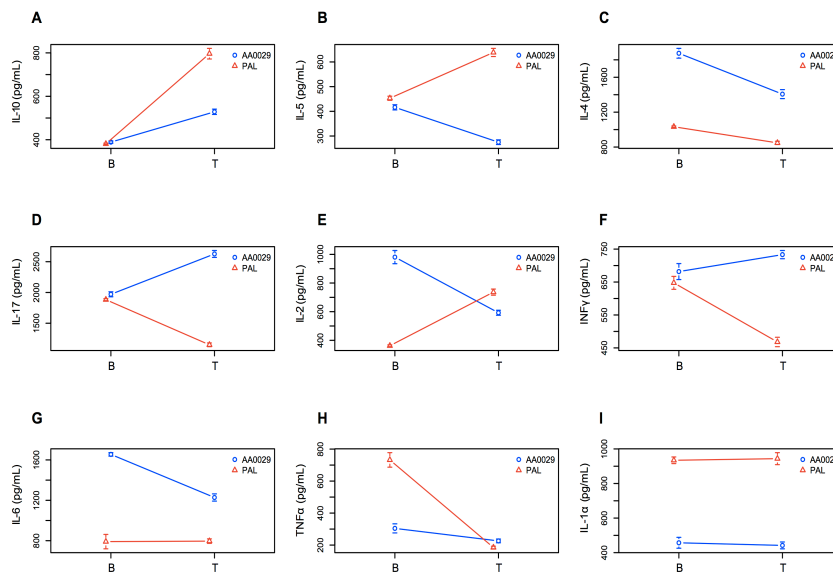


Figura 24. Gráfico de interacciones para las citocinas analizadas en este estudio. A). IL-10. B). IL-5. C). IL-4. D. IL-17. E). IL-2. F). IFN- γ . G). IL-6. H). TNF α . I). IL-1 α , representadas por dos factores: efecto del epítipo (B o T) y efecto del inmunomodulador (AA0029 o PAL).

Interacciones: una interacción estadísticamente significativa ocurre cuando el efecto de una variable independiente sobre la variable dependiente cambia dependiendo del nivel de la otra variable independiente. Tomando como ejemplo los niveles de IL-10 obtenidos (figura 24), analizamos los efectos principales de forma individual (figura 25):

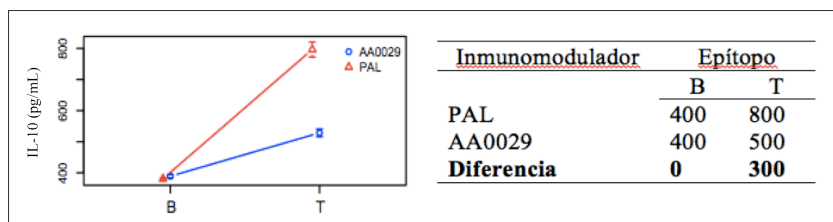


Figura 25. Representación gráfica para analizar las interacciones.

El efecto del inmunomodulador para los péptidos B es de cero puntos, mientras que el efecto del inmunomodulador para los péptidos T es de 300 puntos. Por tanto, el efecto del inmunomodulador cambia dependiendo del tipo de epítipo utilizado. De esta forma podemos afirmar que hay una interacción, y gráficamente se representa como dos líneas que no son paralelas.

Efectos principales: Un efecto principal es el efecto de una de las variables independientes sobre la variable dependiente, ignorando el efecto de las otras variables independientes. Se analizan de forma independiente los efectos principales de cada variable. A partir de los datos contenidos en la tabla 11, se estudia el efecto principal del inmunomodulador para los niveles de IL-10:

Inmunomodulador	Epítipo		Promedio
	B	T	
PAL	400	800	600
AA0029	400	500	450

Tabla 11. Determinación del efecto principal del inmunomodulador.

Debido a que se encuentra una diferencia en el promedio de los valores obtenidos, entonces afirmamos que hay un efecto principal del inmunomodulador en los niveles de citocinas. Para determinar el efecto principal del tipo de epítipo, en la tabla 12 se muestran los datos para realizar su análisis:

Inmunomodulador	Epítipo	
	B	T
PAL	400	800
AA0029	400	500
Promedio	400	650

Tabla 12. Determinación del efecto principal del tipo de epítipo.

En este caso también encontramos que hay diferencias en los valores de los promedios obtenidos, por lo cual afirmamos que hay un efecto principal del tipo de epítipo utilizado en los niveles de citocinas.

Respecto a los niveles de IL-10 (figura 24A), se observa que hay un efecto tanto del inmunomodulador como del epítipo utilizado. El inmunomodulador AA0029 indujo menores niveles estadísticamente significativos de IL-10 que el PAL ($p < 0.0001$). Además, también observamos mayores niveles de IL-10 cuando se utilizaron los péptidos con epítipos T comparado con los epítipos B independientemente del inmunomodulador utilizado ($p < 0.001$). En ambos casos, los niveles de IL-10 alcanzados por los péptidos B mostraron casi siempre el mismo valor. Sin embargo, los niveles de IL-10 producidos por los péptidos con epítipos T son bien diferentes.

El mismo patrón de respuesta fue observado en los niveles de IL-5, donde se obtuvieron menores niveles con el AA0029 comparado con el PAL, independiente del epítipo utilizado ($p < 0.001$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre epítipos B y T en

los niveles de IL-5 ($p = 0.06$). Como se observa en la figura 24B, las líneas generadas en el gráfico no son paralelas, por lo cual existe una interacción significativa entre el inmunomodulador y el epítipo utilizado ($p < 0.001$). De hecho, se alcanzaron mayores niveles de IL-5 cuando se utilizaron los péptidos con epítipos T y el inmunomodulador PAL. Respecto a los niveles de IL-4 (figura 24C), el uso del AA0029 indujo mayores niveles que el PAL, independiente del tipo de epítipo utilizado ($p < 0.001$). Además, los niveles de IL-4 para péptidos con epítipos B son significativamente mayores que los obtenidos con los péptidos T ($p < 0.001$), indicando que también hay un efecto principal del tipo de epítipo utilizado. También encontramos una interacción significativa entre el tipo de epítipo y el inmunomodulador utilizado ($p < 0.001$). En contraste con los niveles de IL-5, los péptidos con epítipos B y el inmunomodulador AA0029 indujeron mayores niveles de IL-4.

Posteriormente, evaluamos los niveles de IL-17 como citocina determinante del perfil Th17. Como se ilustra en la figura 24D, las líneas resultantes en el gráfico de interacciones no son paralelas y, por consiguiente, hay una interacción significativa. Por un lado, cuando se evalúa el efecto principal del inmunomodulador, se puede observar que el inmunomodulador AA0029 produce niveles mayores estadísticamente significativos que el PAL ($p < 0.001$). Por otro lado, no se observan diferencias significativas entre los niveles de IL-17 al utilizar los péptidos B o los péptidos T ($p = 0.313$). También se observa que el AA0029 aumenta los niveles de IL-17 con los péptidos T, mientras que el PAL los disminuye. Por lo tanto, existe un efecto de interacción significativa entre los inmunomoduladores y el tipo de epítipo utilizado ($p < 0.001$).

También se observó que las citocinas IFN- γ , IL-6 y TNF- α presentaron un efecto principal del tipo de epítipo utilizado (figuras 24F, 24G, 24H). Los péptidos con epítipos B produjeron mayores niveles de estas citocinas con respecto a aquello que contienen epítipos T ($p < 0.001$ en todos los casos). No se detectó un efecto significativo entre el tipo de epítipo utilizado en los niveles de IL-2 e IL-1 α (figuras 24E, 24I), pero existe un efecto principal en el tipo de inmunomodulador utilizado; específicamente, el inmunomodulador AA0029 indujo mayores niveles de IL-2, IFN- γ e IL-6 que el PAL ($p < 0.001$) (figura 24G).

Como se puede observar en las figuras 24H y 24I, el uso del PAL indujo mayores niveles de TNF- α e IL-1 α ($p < 0.001$) independientemente del tipo de epítipo utilizado. Además, las líneas generadas en las figuras 24E, 24F, 24G y 24H no son paralelas, y por tanto, existe una interacción significativa en los niveles de las citocinas IL-2, IFN- γ , IL-6 y TNF- α ($p < 0.001$ en todos los casos). Finalmente, se observa que los niveles de IL-2 y de IL-6 se incrementan cuando los péptidos B son utilizados junto con el AA0029 (figuras 24E y 24G). Además, el uso de péptidos con epítipos B y PAL indujo los mayores niveles de TNF- α .

Posteriormente, cada péptido fue individualmente estudiado para analizar su efecto directo en los niveles de cada citocina estudiada. Específicamente, nosotros estudiamos las relaciones existentes entre citocinas del perfil Th2 (IL-4, IL-5) con la citocina del perfil Treg (IL-10). La figura 26 muestra un modelo de regresión lineal comparando las relaciones entre IL-4 e IL10 (figura 26A), así como las relaciones entre IL-5 e IL-10 (figura 26B) con cada uno de los ratones utilizados en este estudio.

Como se puede observar en la figura 26A, la mayoría de los péptidos con epítomos T indujeron mayores niveles de IL-10 y menores de IL-4 respecto a los péptidos con epítomos B. La figura 26B muestra que los péptidos con epítomos T indujeron altos niveles tanto de IL-10 como de IL-5.

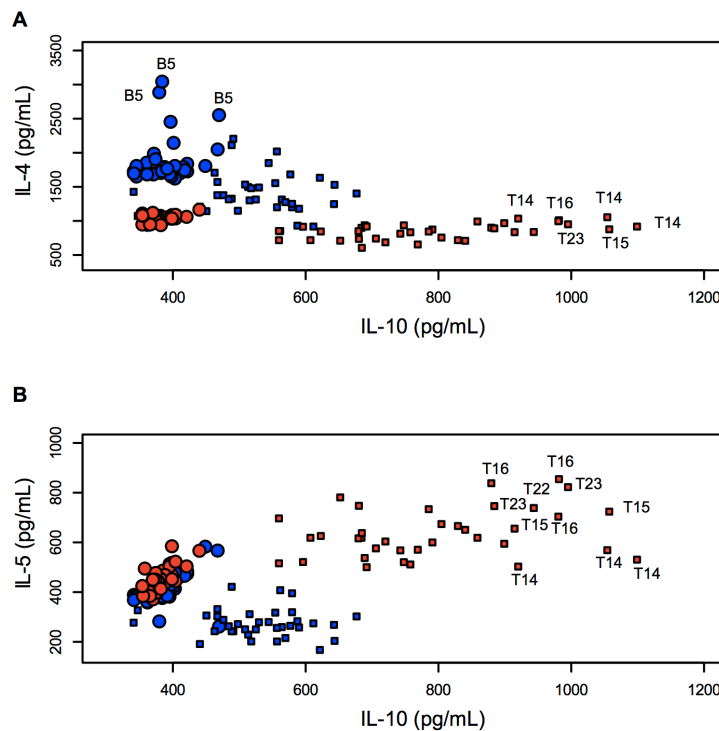


Figura 26. Diagrama de dispersión para comparar el efecto de AA0029 y PAL en los niveles de citocinas. A). IL-4 en función de IL-10. B). IL-5 en función de IL-10. El color rojo indica el inmunomodulador PAL y el azul el AA0029. Los círculos y los cuadrados representan los péptidos B y T, respectivamente.

Al evaluar los niveles de citocinas inducidos por los péptidos individualmente, se observó un incremento en los niveles de IL-4 en ratones inmunizados con los péptidos B5, B6, T14 y T15 comparado con el grupo control vacunado con el sistema ADAD y el inmunomodulador AA0029 (figura 27A), como también ocurrió con los péptidos B5, B6 y B12 al utilizar el inmunomodulador PAL (figura 27B).

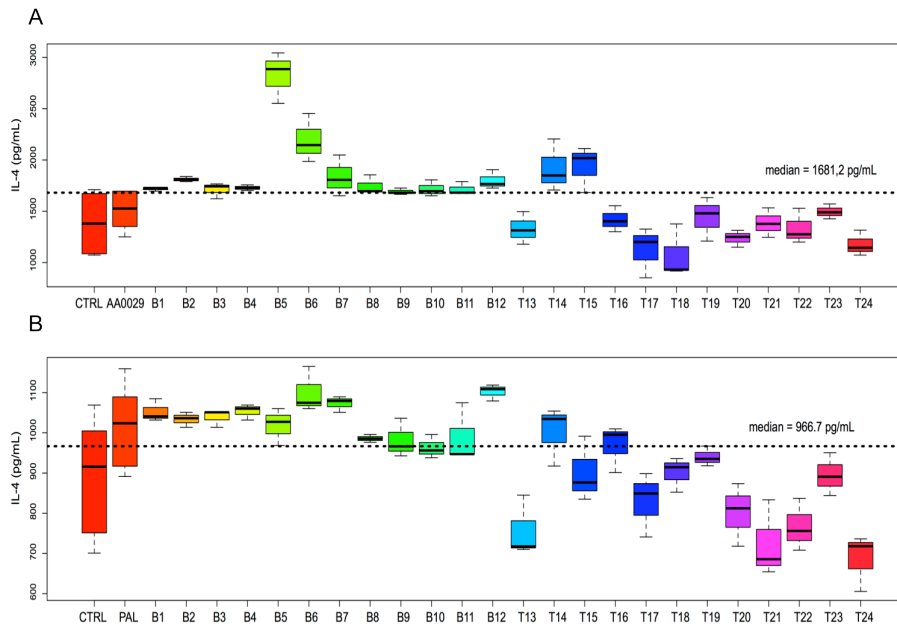


Figura 27. Niveles de IL-4 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos. A). Ratones inmunizados empleando el inmunomodulador AA0029. B). Ratones inmunizados empleando el inmunomodulador PAL.

Al analizar de forma individual los niveles de IL-10, se observa un comportamiento bastante reproducible al emplear los inmunomoduladores AA0029 y PAL. En ambos casos, los péptidos con epítopos T indujeron mayores niveles de IL-10 que los péptidos con epítopos B ($p < 0.05$). Ninguno de los péptidos con epítopos B indujeron niveles estadísticamente significativos comparados con el grupo control. Sin embargo, los péptidos T13 hasta T22 indujeron los mayores niveles con el AA0029 (figura 28A) y los péptidos T14, T15 y T16 con el PAL (figura 28B).

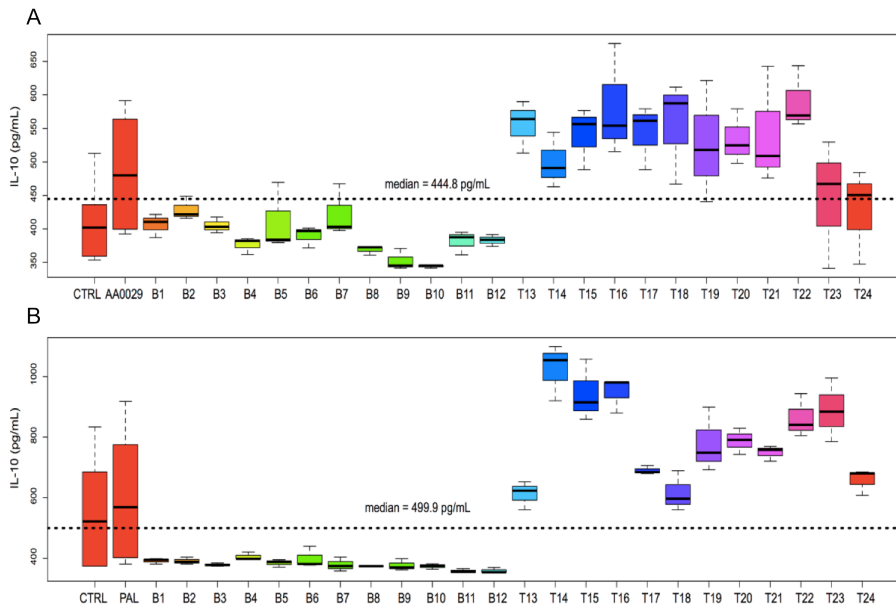


Figura 28. Niveles de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos. A). Ratones inmunizados empleando el inmunomodulador AA0029. B). Ratones inmunizados empleando el inmunomodulador PAL.

En cuanto a los niveles de IFN- γ , se observa que en general, los péptidos con epítotos B indujeron menores niveles con el AA0029, mientras que los péptidos con epítotos T indujeron mayores niveles con este inmunomodulador, comparado con los niveles obtenidos con el PAL (figura 29A y 29B). Por otro lado, los péptidos B1, B5, T15 y T16 indujeron un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en los niveles de IFN- γ comparado con el grupo adyuvante control empleando el inmunomodulador AA0029 (figura 29A), mientras que los péptidos B1, B5, B8, B9 y B12 lo hicieron con el PAL (figura 29B).

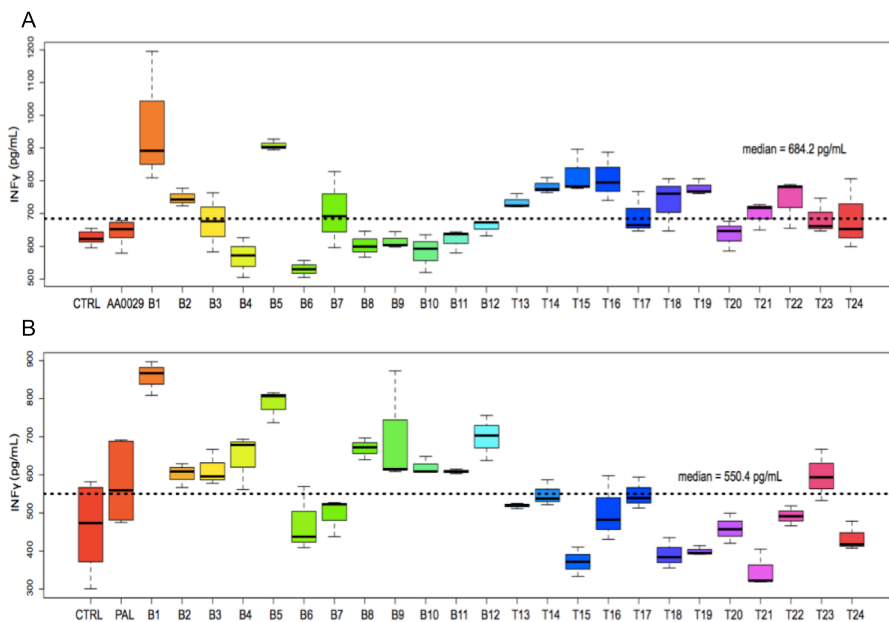


Figura 29. Niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos. A). Ratones inmunizados empleando el inmunomodulador AA0029. B). Ratones inmunizados empleando el inmunomodulador PAL.

El análisis de los niveles de IL-17 mostró un comportamiento muy particular, como se puede observar en la figura 30. Cuando los péptidos fueron formulados en el sistema ADAD con el inmunomodulador AA0029, aquellos con epítomos B indujeron menores niveles que aquellos con epítomos T ($p < 0.05$) (figura 30A). Sin embargo, cuando los péptidos se administraron con el PAL, los péptidos con epítomos B presentaron menores niveles de IL-17 que los péptidos con epítomos T ($p < 0.05$) (figura 30B).

Un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en los niveles de IL-17 se indujo con los péptidos T14, T16 y T22 con el inmunomodulador AA0029 (figura 30A) y con los péptidos B1, B3, B4, B6 y B7 con el inmunomodulador PAL (figura 30B).

Estos resultados demuestran claramente que algunos péptidos estimulan la producción de citocinas asociadas con diferentes perfiles de respuesta inmunológica.

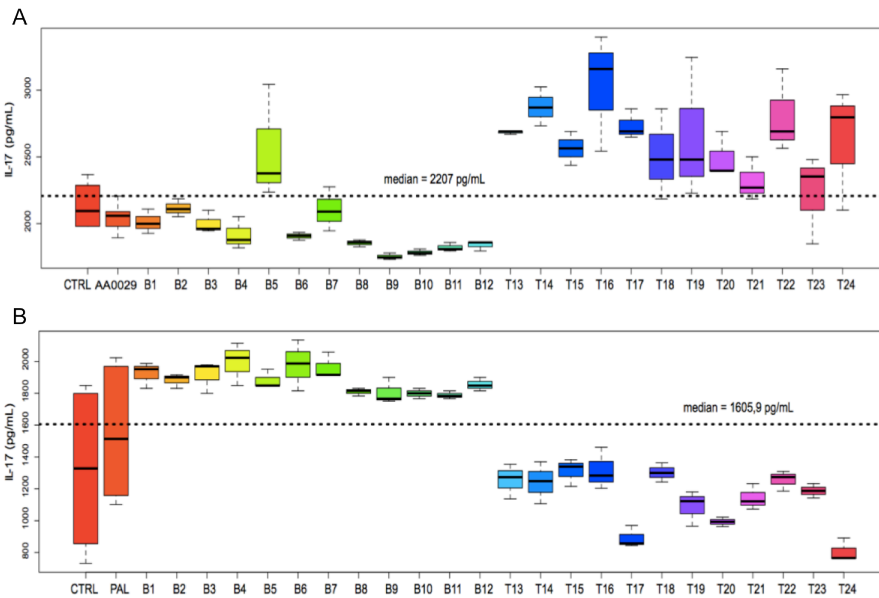


Figura 30. Niveles de IL-17 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos. A). Ratones inmunizados empleando el inmunomodulador AA0029. B). Ratones inmunizados empleando el inmunomodulador PAL.

En vista de los resultados obtenidos, se llevó a cabo un análisis de *cluster* bidimensional para identificar grupos de citocinas que puedan estar coordinadamente expresadas ante la inducción con péptidos y correlacionar estos datos de una forma más robusta con una respuesta inmune efectiva. Las figuras 31A y 31B muestran el análisis de *bicluster* de cada uno de los péptidos formulados utilizando los inmunomoduladores AA0029 y PAL, respectivamente.

En ambos casos, se puede observar que los péptidos con epítopos B y aquellos con epítopos T se agrupan en *clusters* bien diferenciados. Cuando se utilizó el AA0029, los péptidos B se agruparon en los *clusters* 1 hasta 4 (figura 31A), mientras que cuando se utilizó PAL, los péptidos B se agruparon en los *clusters* 1 y 2 (figura 31B). Los péptidos T se agruparon en los *clusters* 5, 6 y 7 con el AA0029 (figura 31A) y en los *clusters* 3,4 y 5 con el PAL (figura 31B).

También se observa que la correlación de las citocinas está influenciada por el tipo de inmunomodulador utilizado en la formulación de los antígenos. En aquellas formulaciones que contienen AA0029, indujeron diferentes patrones de coexpresión de citocinas; de hecho, las citocinas IL-1 α , IFN- γ , IL-10 y IL-17 se agruparon separadamente de TNF- α , IL-4, IL-6, IL-5 e IL-2. En aquellas formulaciones que contienen PAL, se agruparon separadamente las citocinas IL-17, IL-4, IFN- γ y TNF- α de las citocinas IL-1 α , IL-6, IL-5, IL-10 e IL-2.

Estos resultados confirman el fuerte efecto inmunomodulador de las formulaciones empleadas en este estudio. En relación a las agrupaciones de los péptidos B con el AAO029 (figura 31A), el *cluster* 4 también contiene dos de las tres réplicas del péptido B6, el cual indujo altos niveles de IL-4 e IL-5. Además, el *cluster* 3 en la figura 31B incluye el péptido B1 que indujo altos niveles de IL-4, IFN- γ y TNF- α , y el péptido B5 que indujo altos niveles de IL-4 e IFN- γ , sugiriendo un efecto inmunológico diferente inducido por estos péptidos con epítomos B, respecto a los *clusters* que agrupan los péptidos T al usar PAL (figura 31B). Respecto a las agrupaciones de los péptidos B con el PAL (figura 31B), los análisis revelaron que el *cluster* 1 fue capaz de agrupar cada uno de los péptidos con epítomos B, excepto el péptido B6. El *cluster* 2 representa la agrupación más interesante en la figura 31B, ya que este *cluster* agrupa las tres réplicas del péptido B6 que induce altos niveles de IL-4, IL-6 e IL-1 α .

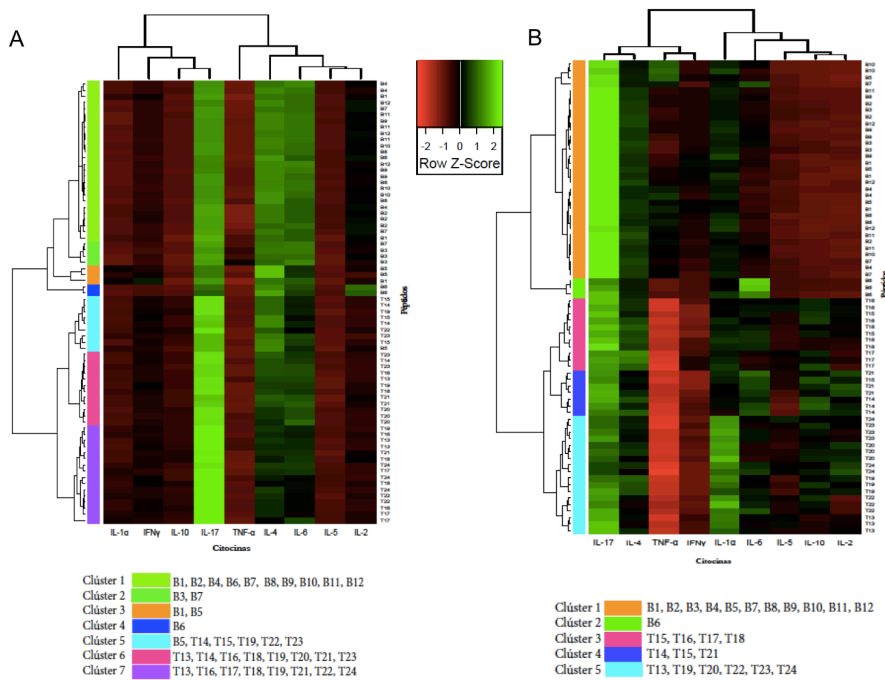


Figura 31. Análisis de *bicluster* para correlacionar los niveles de expresión de las citocinas. A). Análisis para los péptidos B y T utilizando AAO029. B). Análisis para los péptidos B y T utilizando PAL. Los niveles de expresión de las citocinas individuales están representados por colores (de rojo a verde) en el *heatmap*, con altos valores de expresión en verde y bajos en rojo. En el lado derecho, se representa el nombre de los péptidos. Las filas y columnas corresponden a agrupaciones de citocinas y péptidos con respuesta inmunológica similar.

Los péptidos T14, T15 y T16 están incluidos en los *clusters* 3 y 4, los cuales fueron capaces de inducir altos niveles de IL-10, IL-5 e IL-2. Por otro lado, respecto a las agrupaciones de los péptidos T con el AA0029 (figura 31B), ellos están mucho más dispersos en los diferentes *clusters*, aunque T14 y T15 se agrupan en el *cluster* 5, induciendo altos niveles de IL-4 e IFN- γ .

3.2.2. Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias

En un intento de entender y evaluar mejor la respuesta inmune celular producida por los péptidos sintéticos con epítomos B y T, formulados en el sistema ADAD con dos inmunomoduladores diferentes, en este estudio analizamos diferentes grupos de poblaciones de linfocitos: subpoblaciones de linfocitos B mediante análisis del marcador B220⁺, subpoblaciones de linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺), linfocitos B memoria (CD27⁺) y linfocitos T memoria (CD197⁺ y CD62L⁺). Después de la vacunación de los ratones con los componentes del sistema ADAD, no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los inmunofenotipos estudiados comparado con el grupo control. Sin embargo, llevamos a cabo un modelo de regresión lineal para determinar la presencia de alguna interacción existente entre el péptido (B o T) y el inmunomodulador (AA0029 o PAL) utilizado (figura 32).

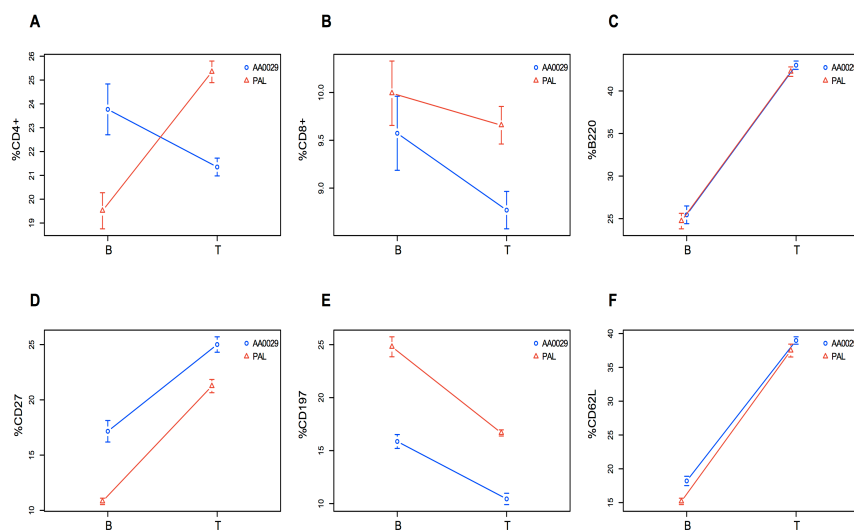


Figura 32. Gráfico de interacción para las subpoblaciones linfocitarias en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos. A). CD4⁺. B). CD8⁺. C). B220⁺. D). CD27⁺. E). CD197⁺. F). CD62L⁺, teniendo en cuenta dos factores: efecto del epítomo (B o T) y el inmunomodulador (AA0029 o PAL).

Los péptidos con epítomos T fueron capaces de inducir un mayor número de linfocitos T CD4⁺, B220⁺, CD27⁺ y CD62L⁺ comparados con los péptidos que tienen epítomos B ($p < 0.001$). Por el contrario, los péptidos con epítomos B indujeron mayores porcentajes de CD197⁺ ($p < 0.001$). No se encontraron diferencias significativas en el tipo de epítomo utilizado en la determinación de linfocitos T CD8. Curiosamente, el efecto del inmunomodulador fue detectado solamente en los linfocitos T memoria.

Se observaron mayores niveles de poblaciones CD27⁺ y CD62L⁺ cuando los péptidos fueron formulados con el AA0029 ($p < 0.001$), por lo que el nivel de células CD197⁺ parece ser mayor con los péptidos B y PAL, mientras que el porcentaje de células CD27⁺ y CD62L⁺ parece ser mayor con los péptidos T y el AA0029 (figura 32).

Como se observa en la figura 32A, solo una interacción significativa fue detectada en los LT CD4⁺ entre el péptido (B o T) y el inmunomodulador (AA0029 o PAL) ($p < 0.001$). Además, cuando los péptidos fueron individualmente analizados, se observaron diferentes patrones de expresión en los linfocitos.

La figura 33 muestra un gráfico de coordenadas paralelas donde cada péptido es representado por una línea continua. No se observaron diferencias en las poblaciones de LT CD4⁺ y LT CD8⁺, y solamente los péptidos B11 y T14 fueron capaces de inducir cambios significativos en la expresión de estos marcadores celulares ($p < 0.05$). Los péptidos con epítomos B indujeron altos porcentajes de células B220⁺, especialmente los péptidos B2 - B8, B11 y B12 formulados con PAL.

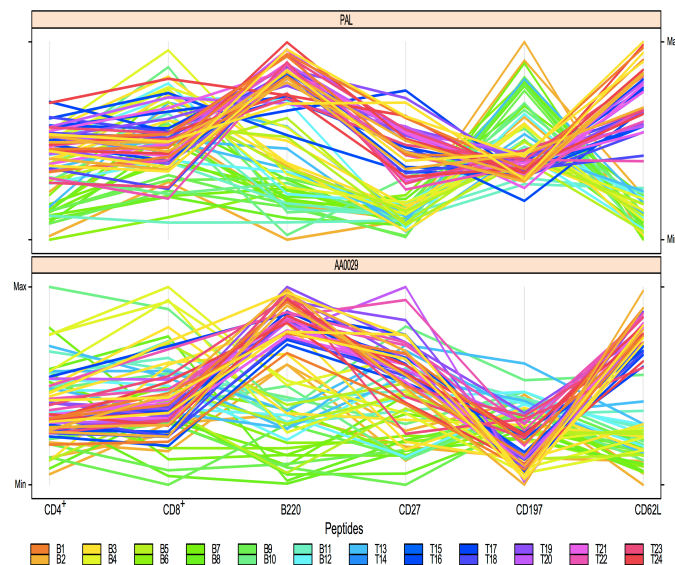


Figura 33. Gráfico de coordinación paralelas para las subpoblaciones linfocitarias. Linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺), linfocitos B (B220⁺), linfocitos B de memoria (CD27⁺) y linfocitos T de memoria (CD197⁺ y CD62L⁺). Las líneas representan cada péptido incluido en este experimento, con los inmunomoduladores PAL y AA0029.

Los linfocitos T memoria sufrieron cambios significativos ante el estímulo con los péptidos con epítomos T utilizando AA0029. Particularmente, los péptidos T15 – T24 con AA0029 indujeron mayor nivel de células CD62L⁺ respecto al grupo control. Por otro lado, los péptidos T14, T18, T23 y T24 indujeron mayores niveles de células CD197⁺ comparado con el grupo control. Los péptidos B1, B4, B5 y T14 fueron capaces de inducir mayores niveles de células CD197⁺ solo con PAL. En relación a los linfocitos CD27⁺, solamente el péptido B7 y el T16 indujeron mayores niveles con AA0029 y PAL, respectivamente.

3.3. Selección de péptidos

Aquellos péptidos que presentaron un aumento en la respuesta inmune adaptativa mediante el estudio de la respuesta inmune humoral y celular, fueron seleccionados para usarse en los estudios de protección frente a la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica*. En lo referente a la respuesta inmune humoral se seleccionaron aquellos péptidos que indujeron altos niveles de IgG1 y de IgG2a. En cuanto a la respuesta inmune celular, se seleccionaron péptidos que indujeron las citocinas más representativas de los perfiles inmunológicos del tipo Th1 (mediante el estudio de la producción de IFN- γ); Th2 (mediante el estudio de los niveles de IL-4); Treg (mediante la producción de IL-10) y Th17 (mediante el estudio de los niveles de IL-17). Además, se seleccionaron aquellos péptidos que indujeran un aumento en los niveles de células expresando marcadores de subpoblaciones linfocitarias asociadas a la generación de memoria inmunológica, mediante el estudio de los marcadores CD27, CD62L y CD197. Debido a que en la infección causada por *F. hepatica* no se conoce en profundidad los mecanismos inmunológicos asociados con una respuesta inmune protectora, no disponemos de un criterio inmunológico definido para la selección de péptidos como posibles candidatos a vacuna. Siete péptidos fueron finalmente seleccionados para los estudios de protección frente a la infección experimental con *F. hepatica*. Los péptidos seleccionados se denominaron B1, B2, B5, B6, T14, T15 y T16.

Respecto al inmunomodulador, el análisis estadístico univariante y multivariante reveló que el AA0029 induce en general una mayor respuesta inmunológica que PAL, por lo cual se escogió para los posteriores ensayos de protección *in vivo*.

En la figura 34 se muestra un resumen donde se indica la presencia de diferencias estadísticamente significativas en los niveles de anticuerpos, citocinas y subpoblaciones linfocitarias, inducidas por la inmunización de cada uno de los péptidos sintéticos, formulados en el sistema ADAD de vacunación empleando los inmunomoduladores PAL y AA0029.

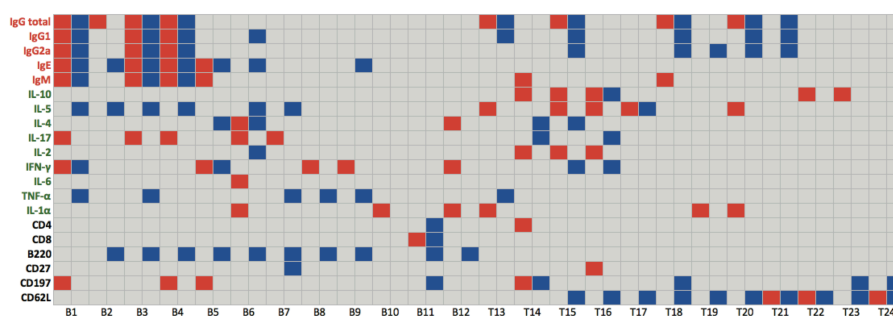


Figura 34. Perfil inmunológico obtenido en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos. El color rojo y azul indican la presencia de diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la variable estudiada, cuando se emplean los inmunomoduladores AA0029 y PAL, respectivamente. El color gris indica ausencia.

4. Estudios de protección *in vivo*

4.1. Supervivencia de ratones CD1

La inmunización de ratones con los péptidos sintéticos que contienen epítomos B y T aumentaron el porcentaje de supervivencia cuando se compara con el grupo control de infección. En este estudio se obtuvo un porcentaje de supervivencia global de 58% en los ratones que recibieron alguna formulación con los péptidos sintéticos. En el grupo control de infección todos los ratones murieron entre los días 24 y 34 después de la infección. En nuestro estudio, todos los ratones que murieron antes del día 42 fueron considerados como no protegidos. Como se puede observar en las figuras 35 y 36, todos los grupos de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos presentaron algún nivel de protección frente a la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica*.

De acuerdo a las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, cuando los ratones fueron inmunizados con los péptidos individuales, el mayor porcentaje de supervivencia fue obtenido con los péptidos B2, B5, B6 y T15 (grupos 5, 6, 7 y 9, respectivamente), los cuales alcanzaron un 66.7% de supervivencia en cada grupo (figuras 35A y 35B). Por otro lado, los ratones inmunizados con los péptidos B1 y T14 (grupos 4 y 8, respectivamente), alcanzaron un porcentaje de supervivencia de 57.1% (figuras 35A y 35B). El grupo de ratones inmunizados con el péptido T16 (grupo 10) presentó el menor porcentaje de supervivencia. En este grupo se obtuvo un 42.9% de supervivencia (Figura 35B).

Estos resultados soportan claramente nuestra idea de considerar estos péptidos como potenciales candidatos a vacuna contra la fasciolosis. También merece la pena destacar que el grupo de ratones vacunados solamente con los componentes del sistema ADAD alcanzó un porcentaje de supervivencia del 33.3% (Figura 35A).

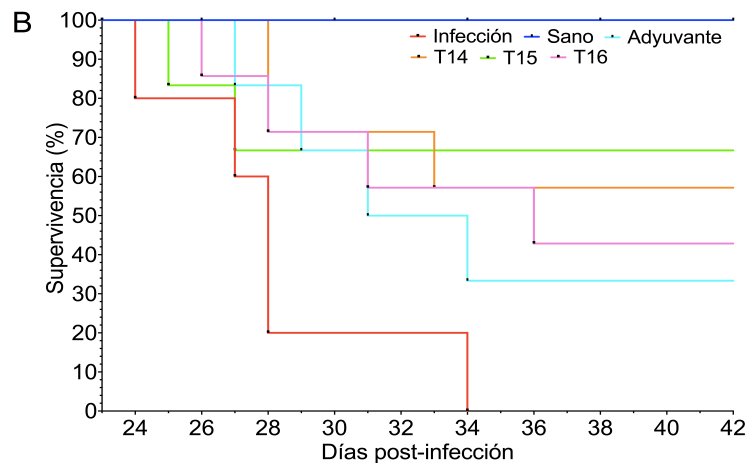
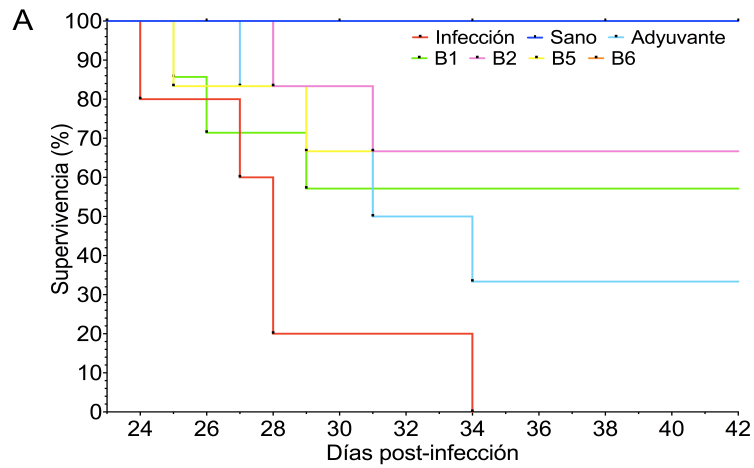


Figura 35. Curvas de supervivencia de Kaplan Meier de los ratones inmunizados con los péptidos sintéticos individuales e infectados con metacercarias de *F. hepatica*. A). Ratones inmunizados con los péptidos con epítopos B. B). Ratones inmunizados con los péptidos con epítopos T.

El porcentaje de supervivencia en los grupos de ratones inmunizados con alguna combinación de péptidos se incrementó solamente cuando se hizo la combinación de péptidos con epítopos T. El grupo de ratones inmunizados con la combinación de péptidos B6+T14 (grupo 11) alcanzó un porcentaje de supervivencia de 57.1% (Figura 36). En este grupo se observó un efecto antagonista, ya que el porcentaje de supervivencia alcanzado por el péptido individual B6 fue de 66.7%, mientras que al usarlo en combinación con el péptido T14, se disminuyó hasta un 57.1%.

Un comportamiento similar se observó en el grupo de ratones inmunizados con la combinación de péptidos con epítomos B (grupo 12). En este grupo, se obtuvo un porcentaje de supervivencia de 57.1% (Figura 36), evidenciándose una reducción en el porcentaje de supervivencia mostrado por los péptidos individuales B5 y B6.

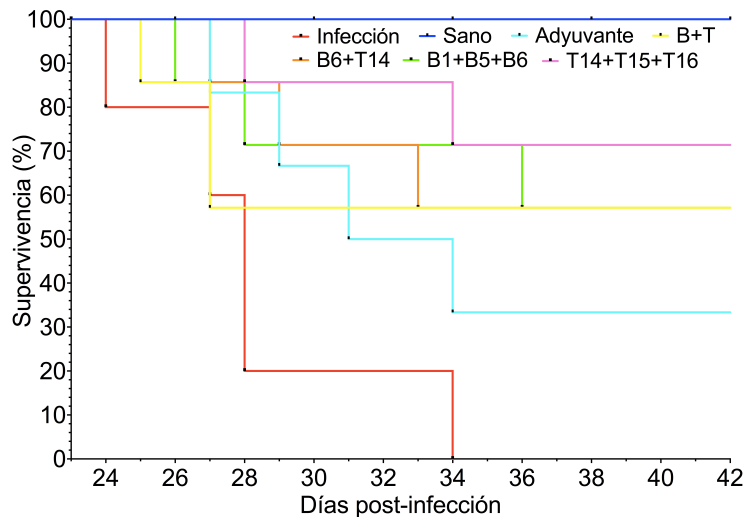


Figura 36. Curvas de supervivencia de Kaplan Meier de los ratones inmunizados con la combinación de péptidos sintéticos e infectados con metacercarias de *F. hepatica*.

Sin embargo, se observó un efecto sinérgico cuando los ratones fueron inmunizados con la combinación de péptidos con epítomos T. En este grupo se obtuvo un porcentaje de supervivencia de 71.4% (Figura 36), siendo mayor que el obtenido por cualquiera de los péptidos individuales T14, T15 o T16. De acuerdo a las curvas de Kaplan-Meier, los porcentajes de supervivencia obtenidos por los péptidos B2 y la combinación de péptidos con epítomos T (grupos 5 y 13, respectivamente), fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) comparados con el grupo control de infección.

4.2. Recuperación de vermes y lesiones hepáticas

Cuarenta y dos días después de la infección experimental todos los animales supervivientes fueron humanamente necropsiados para realizar la recuperación de vermes y la valoración de las lesiones hepáticas. La reducción en el número de vermes adultos, así como en la magnitud de las lesiones hepáticas son consideradas como importantes parámetros para evaluar la eficacia protectora de candidatos vacunales en el modelo de fasciolosis.

En este trabajo se demostró que el número de vermes adultos recuperados en los ratones supervivientes fue menor que en aquellos obtenidos en los ratones no-supervivientes ($[0.7 \pm 0.1]$ vs $[1.7 \pm 0.1]$) ($p < 0.05$). Como se puede observar en la figura 37A, el número de ratones que tenían dos vermes adultos fue mayor en los animales no-supervivientes (33%) que en los ratones supervivientes (13%).

También se observa que el número de ratones que no presentaron vermes adultos fue mayor en ratones supervivientes (41%) que en los ratones no-supervivientes (18%), lo cual demuestra la relación directa existente entre protección y recuperación de vermes.

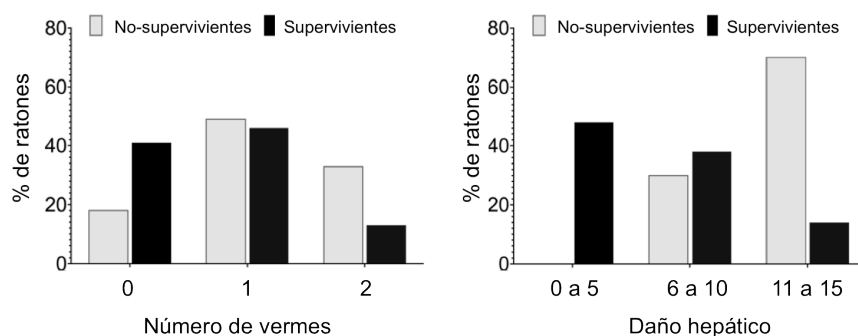


Figura 37. Comparación de la protección en ratones no-supervivientes y ratones supervivientes inmunizados con los péptidos sintéticos. A). Recuento del número de vermes. B). Magnitud de las lesiones hepáticas.

Respecto a la magnitud de las lesiones hepáticas, en este estudio también se demuestra que los ratones supervivientes presentaron menores lesiones hepáticas que los ratones no-supervivientes ($[6.3 \pm 0.5]$ vs $[12.2 \pm 0.4]$) ($p < 0.05$). Se estableció una clasificación de acuerdo a la magnitud de las lesiones hepáticas de acuerdo a los siguientes criterios:

- i). Ratones con una magnitud de las lesiones hepáticas entre 0-5 (lesiones menores)
- ii). Ratones con una magnitud de las lesiones hepáticas entre 6-10 (lesiones moderadas)
- iii). Ratones con una magnitud de las lesiones hepáticas entre 11-14 (lesiones graves)

En la figura 37B se puede observar que los ratones no-supervivientes presentaron solamente lesiones moderadas (30%) y graves (70%), mientras que los ratones supervivientes presentaron mayoritariamente lesiones menores (48%) y moderadas (38%). Estos resultados evidencian nuevamente la relación directa que existe entre protección y la magnitud de las lesiones hepáticas.

En el grupo de ratones inmunizados con el péptido individual B5 (grupo 6) se obtuvo la menor recuperación de vermes comparado con el grupo control de infección ($[0.7 \pm 0.3]$ vs $[2.0 \pm 0.3]$) ($p < 0.05$). Las menores lesiones hepáticas se obtuvieron en el grupo de ratones inmunizados con la combinación de péptidos con epítomos T (grupo 13). En este grupo, se alcanzó una reducción de la magnitud de las lesiones hepáticas del 45% comparado con el grupo control de infección, evidenciando una vez más el potencial de esta combinación de péptidos como candidatos a vacuna frente a la infección por *F. hepatica*.

El grupo de ratones vacunados con los componentes del sistema ADAD de vacunación, también presentó reducción en el daño hepático, sin embargo, no fue estadísticamente significativo. La recuperación de vermes, así como la magnitud de las lesiones hepáticas de cada uno de los ratones incluidos en este estudio se muestra en la tabla 13. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se evidencia una relación directa entre el porcentaje de supervivencia de los ratones con el número de vermes recuperados y la magnitud de las lesiones hepáticas.

Grupo	Antígeno	# de vermes en cada ratón	Promedio ± ES	% Reducción	Daño hepático de cada ratón	Promedio ± SE	% Reducción
1	Sano						
2	Control infección	3, 1, 2, 2, 2	2.0 ± 0.3		14, 14, 14, 13, 5	12.0 ± 1.8	
3	Control adyuvante	0, 2, 0, 2, 2, 0	1.0 ± 0.4	50.0	10, 14, 5, 11, 14, 2	9.3 ± 2.0	22.2
4	B1	1, 0, 1, 2, 1, 1	1.0 ± 0.3	50.0	10, 14, 5, 14, 4, 9	9.3 ± 1.7	22.2
5	B2	0, 1, 1, 1, 1, 1	0.8 ± 0.3	58.3	6, 14, 5, 9, 9, 5	8.0 ± 1.4	33.3
6	B5	1, 0, 1, 0, 2	0.8 ± 0.4	60.0	4, 1, 14, 14, 7	8.0 ± 2.4	33.3
7	B6	2, 0, 2, 1, 0	1.0 ± 0.4	50.0	13, 2, 8, 10, 14	9.4 ± 1.9	21.7
8	B1, B5, B6	1, 1, 2, 1, 0, 0	0.8 ± 0.3	58.3	5, 8, 5, 14, 14, 14	10.0 ± 1.8	16.7
9	B6, T14	1, 1, 2, 1, 2, 0	1.2 ± 0.3	41.7	10, 10, 2, 13, 14, 3	8.7 ± 2.1	27.8
10	T14	0, 1, 2, 1, 1	1.0 ± 0.3	50.0	0, 7, 10, 13, 14	8.8 ± 2.3	26.4
11	T15	0, 2, 0, 1, 2, 0	0.8 ± 0.4	58.3	6, 14, 5, 4, 14, 10	8.8 ± 1.8	26.4
12	T16	1, 0, 0, 1, 2, 1, 1	0.9 ± 0.3	57.1	10, 10, 11, 5, 13, 12, 14	10.7 ± 1.2	10.7
13	T14, T15, T16	2, 0, 1, 1, 0	0.8 ± 0.4	60.0	6, 5, 10, 5, 6	6.4 ± 0.8	46.7
14	B1, B2, B5, B6, T14, T15, T16	1, 1, 2, 0, 1, 0, 2	1.0 ± 0.3	50.0	5, 10, 4, 3, 10, 7, 12	7.3 ± 1.4	39.3

Tabla 13. Evaluación de la recuperación de vermes adultos y determinación de las lesiones hepáticas.

4.3. Respuesta inmune humoral

Como se puede observar en la figura 38, la mayoría de los animales utilizados en este estudio presentaron altos niveles de IgG después de la inmunización con los péptidos sintéticos. Los ratones inmunizados con el péptido B1 presentaron los mayores niveles de IgG, mientras que aquellos inmunizados con el péptido T16 resultaron ser los menos inmunogénicos.

Cuando se realizó la combinación de péptidos, aquellos que contenían epítopos B indujeron los mayores niveles de anticuerpos, mientras que la combinación de péptidos con epítopos T indujeron menores niveles de anticuerpos IgG. En esta figura también se observa que en 9 ratones inmunizados no se detectó la presencia de IgG específicos para el péptido con el que fueron inmunizados.

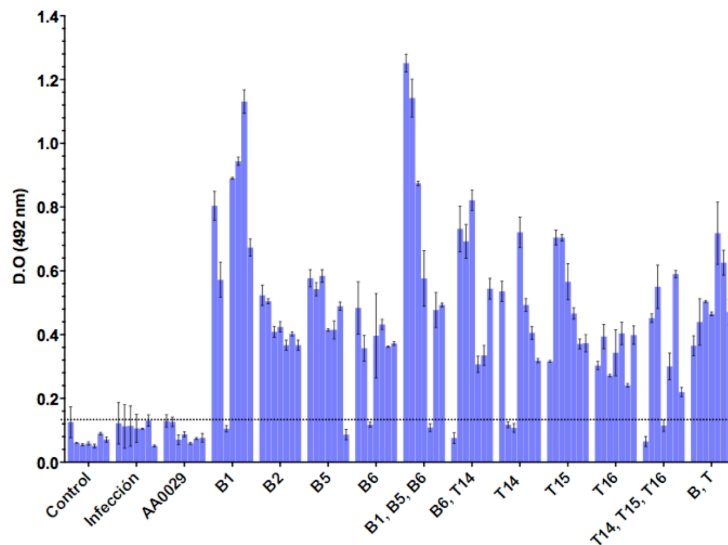


Figura 38. Detección de anticuerpos específicos IgG para cada grupo de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos.

Como se observa en la figura 39, no se detectó la presencia de anticuerpos IgG en 7 de los ratones que fueron infectados y estos fueron excluidos del estudio, ya que podrían conducir a errores en la interpretación de los resultados de protección.

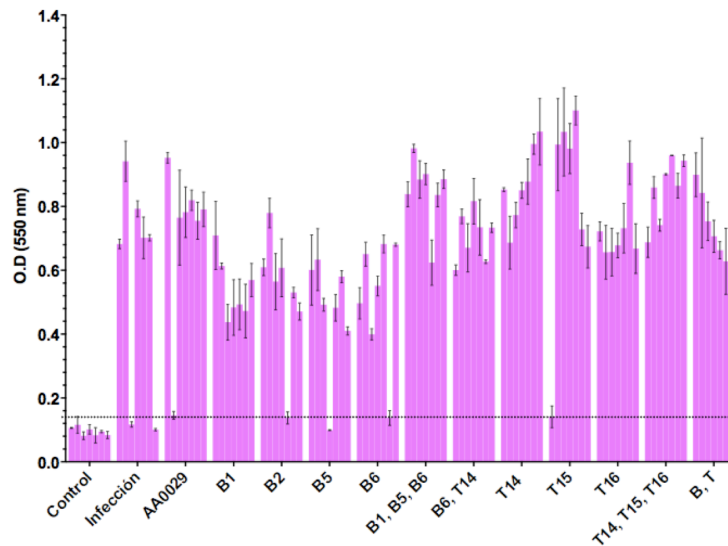


Figura 39. Detección de anticuerpos específicos contra el antígeno ES de *F. hepatica* en ratones infectados con metacercarias de *F. hepatica*.

Con el fin de tratar de entender un poco mejor las relaciones existentes entre protección y niveles de anticuerpos, los niveles de IgG totales, así como los de IgG1, IgG2a, IgE e IgM fueron analizados en el grupo de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos donde se obtuvieron los mayores porcentajes de supervivencia (grupos 5 y 13). Como se observa en la figura 40A, los niveles de IgG fueron mayores ($p < 0.05$) en el grupo de ratones inmunizados con la combinación de péptidos con epítomos T (grupo 13) comparado con el grupo control de infección. También se encontró que los niveles de IgG1 fueron mayores ($p < 0.05$) en este mismo grupo. En cuanto a los niveles de IgG2a, se encontraron mayores niveles ($p < 0.05$) en los dos grupos de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos (grupos 5 y 13, respectivamente).

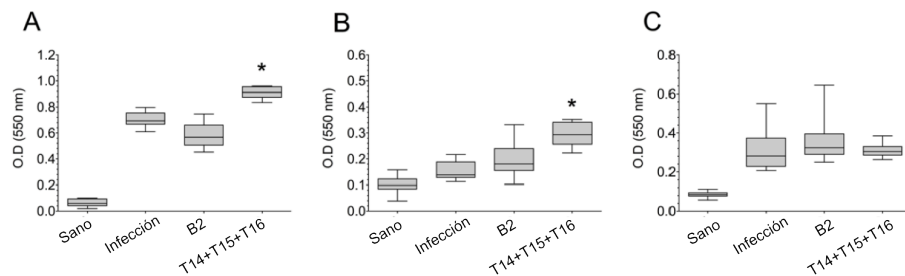


Figura 40. Niveles de anticuerpos en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos e infectados con metacercarias de *F. hepatica*. A). IgG. B). IgE. C). IgM.

Respecto a los niveles de IgE, solamente el grupo de ratones inmunizados con la combinación de péptidos con epítomos T presentó mayores niveles ($p < 0.05$) que el grupo control de infección (Figura 40B). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IgM en ninguno de los grupos de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos (Figura 40C).

4.4. Niveles de citocinas

Los niveles de citocinas de los perfiles inmunológicos del tipo Th2 (IL-4), Th1 (IFN- γ), Th10 (IL-10) y Th17 (IL-17) fueron cuantificados en el grupo de ratones con los mayores porcentajes de supervivencia (grupos 5 y 13, respectivamente), con el fin de poder establecer las relaciones existentes entre protección y respuesta inmune asociada con protección en la infección con *F. hepatica*. Como se observa en la figura 41A, se obtuvieron mayores niveles de IL-4 en los ratones inmunizados con los péptidos sintéticos, comparado con el grupo control de infección. Sin embargo, solamente los niveles de IL-4 del grupo de ratones inmunizados con el péptido B2 resultaron ser estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Respecto a los niveles de IFN- γ , en la figura 41B se muestra que la inmunización de ratones con los péptidos sintéticos produce una disminución en los niveles de esta citocina cuando se compara con los niveles obtenidos en el grupo control de infección ($p < 0.05$).

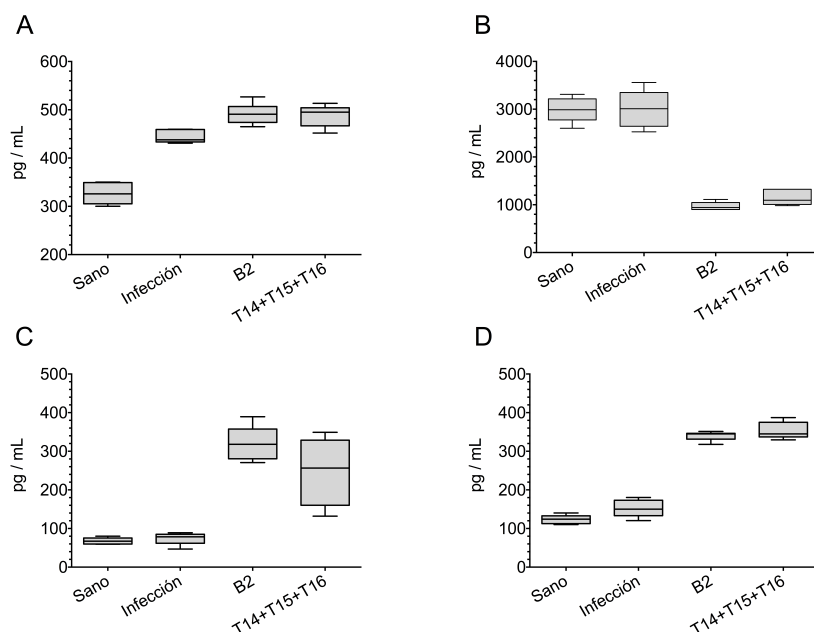


Figura 41. Niveles de citocinas en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos e infectados con metacercarias de *F. hepatica*. A). IL-4. B). IFN- γ . C). IL-10. D). IL-17.

La inmunización de ratones con los péptidos sintéticos B2 y con la combinación de péptidos con epítopos T también indujo un incremento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de IL-10 e IL-17 (Figuras 41C y 41D), comparado con el grupo control de infección. Estos resultados soportan nuestra idea que la inmunización de ratones con los péptidos sintéticos formulados en el sistema ADAD de vacunación produce una inmunomodulación de la respuesta inmune, generando una respuesta diferente a aquella inducida por una infección con *F. hepatica*, lo cual parece estar relacionado con una respuesta inmunoprotectora.

En este estudio también se encontró una correlación negativa ($p < 0.05$), de acuerdo al coeficiente de correlación de Spearman, entre los niveles de IL-4 e IFN- γ en el grupo de ratones inmunizados con el péptido B2 y la combinación de péptidos con epítopos T (grupos 5 y 13, respectivamente) (Figura 42), lo cual indica la participación de una respuesta del tipo Th2 predominante como mediadora de la protección. También se encontró una correlación negativa ($p = 0.076$) entre los niveles de IFN- γ e IL-10 en el grupo de ratones protegidos, además de una correlación positiva entre los niveles de IL-4 y la magnitud de las lesiones hepáticas.

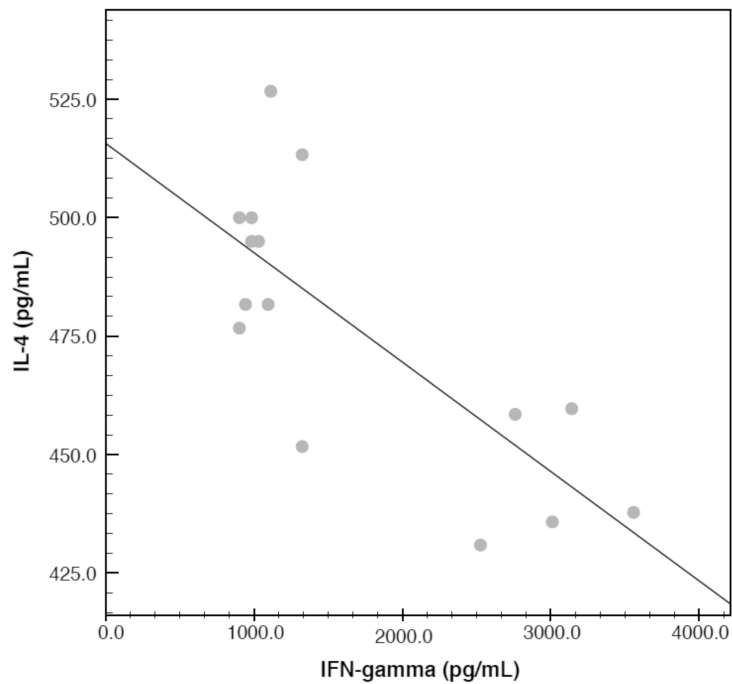


Figura 42. Gráfico de dispersión que correlaciona los niveles de IL-4 y de IFN- γ en los ratones inmunizados con los péptidos sintéticos B2 y la combinación de péptidos con epítomos T.

5. Estudio de rutas metabólicas

5.1. Inmunización de ratones BALB/c

Inicialmente se confirmó que todos los ratones empleados en este experimento estuvieran correctamente inmunizados con la mezcla de péptidos que contienen epítomos T (T14, T15 y T16), mediante la detección de la presencia de anticuerpos específicos IgG totales por la técnica de ELISA (figura 43). En esta figura se observa que se detectó la presencia de anticuerpos en los tres ratones inmunizados, con buenos títulos de anticuerpos. Como era de esperar, no se detectó la presencia de anticuerpos en los ratones del grupo control.

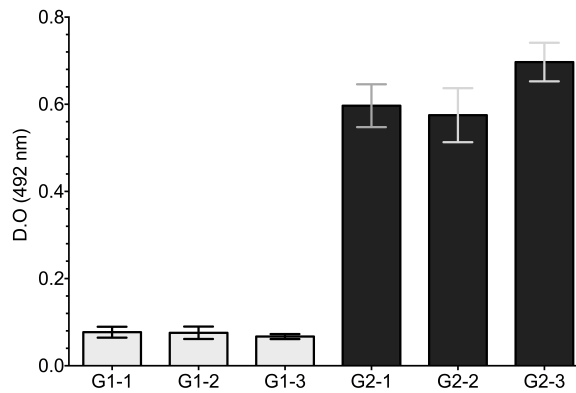


Figura 43. Detección de anticuerpos específicos en ratones inmunizados con la combinación de péptidos T14, T15 y T16.

5.2. Extracción de ARN de esplenocitos

Una vez extraído y purificado el ARN de esplenocitos de ratones inmunizados con la combinación de péptidos con epítomos T, el análisis de la integridad de ARN mostró que todos los ARN obtenidos presentaron valores de integridad iguales a 10 (en una escala de 1 a 10, donde 10 representa la máxima calidad) (figura 44), con lo cual se procedió a la elaboración de los posteriores *microarrays*.

La síntesis del ADNc y los *microarrays* fueron realizados en el Centro de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca. Los resultados correspondientes a la síntesis del ADNc y su posterior hibridación en el array *Mouse Gene 1.0 ST* se muestran en el anexo 4.

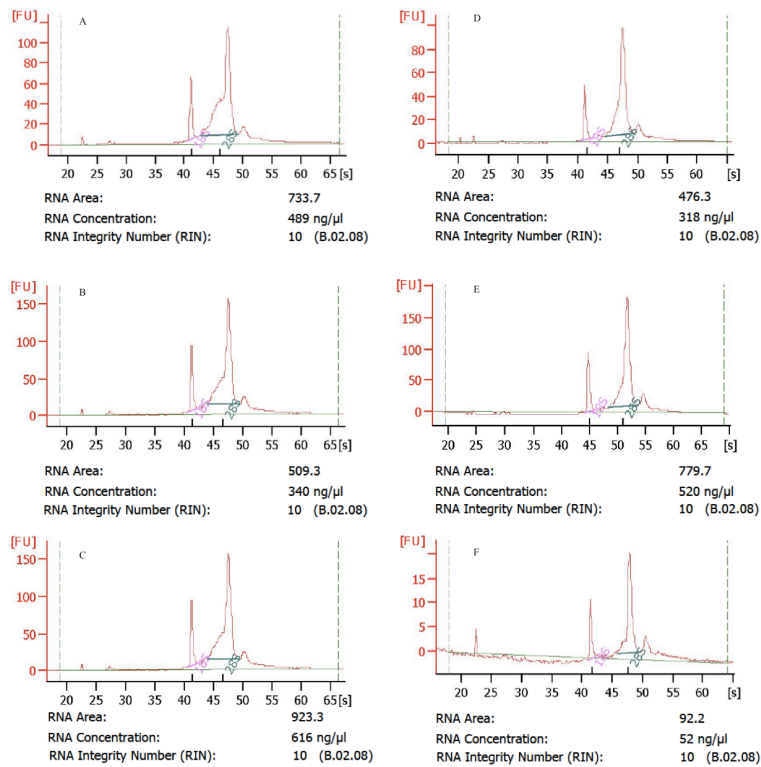


Figura 44. Análisis de la integridad del ARN obtenido de los esplenocitos de ratones inmunizados. A, B, C): ARN de ratones del grupo control. D, E, F): ARN de ratones del grupo inmunizado con la combinación de péptidos con epítomos T.

5.3. Normalización, expresión diferencial y perfil funcional

En la figura 45 se muestra la corrección del ruido de fondo (*background*), la normalización de los datos mediante NUSE para poder determinar su expresión diferencial, así como un control de calidad adicional de la señal obtenida de cada uno de los ensayos.

Estos resultados demuestran que los datos obtenidos de cada ratón son bastante reproducibles, permitiendo de esta forma su posterior interpretación de una forma adecuada.

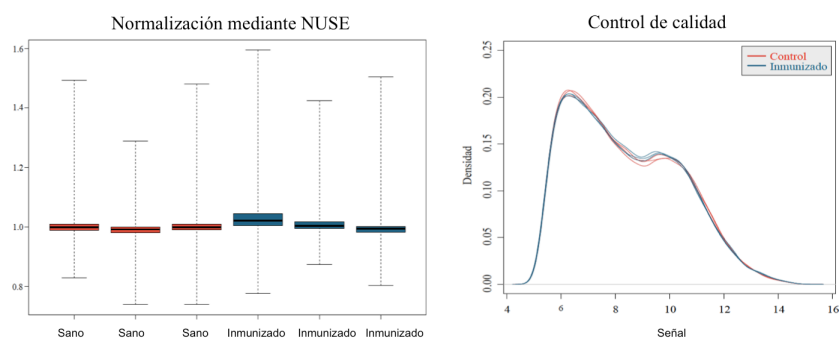


Figura 45. Normalización de los datos de los *microarrays* mediante NUSE y control de calidad de la señal obtenida.

Una vez normalizados los datos y aplicado el correspondiente algoritmo para calcular la expresión diferencial de genes, se obtuvieron los resultados correspondientes en forma de tablas en archivos de formato *excel* (.xls). El estudio de la expresión diferencial de genes reveló que el proceso de inmunización de ratones con la combinación de péptidos con epítopos T indujo la expresión diferencial de 820 genes comparado con el grupo control. De estos 820 genes, 168 aumentaron su expresión (*up-regulated*), mientras que 652 la disminuyeron (*down-regulated*). Por convención, los genes que están *up-regulated* se representarán en color rojo, mientras aquellos que se encuentran *down-regulated* se representarán en color verde. En el anexo 5 se muestra una lista con todos los genes (*up-regulated* y *down-regulated*) obtenidos en este experimento. También se indica el número de identificación (*ID*) de la base de datos *Ensembl*, así como su valor de expresión diferencial expresado como *fold change* y el correspondiente valor estadístico de *p*.

5.4. Análisis con *Ingenuity Pathway Analysis*

Los resultados obtenidos en formato archivo .xls fueron cargados en *Ingenuity Pathway Analysis* de acuerdo a las recomendaciones de la herramienta de análisis. Primero se identificó el tipo de *ID* que tiene cada muestra, puesto que existen diferentes *ID*'s para un mismo gen, de acuerdo a la base de datos con la cual se esté trabajando.

Los *ID*'s más comúnmente utilizados son los de *Affymetrix*, *Agilent*, *Applied Biosystems*, *Ensembl*, *Gene Bank*, *Illumina*, *Unigene*, *UniProt/SwissProt*. En nuestro estudio, el tipo de *ID* utilizado fue el de *Ensembl*. También se debe tener muy claro el tipo de valor asignado a la expresión diferencial de cada gen. Los más comúnmente utilizados son los siguientes:

- i). *Ratio*: Expresa los valores de expresión diferencial en un rango desde 0 hasta infinito (0, +INF).
- ii). *Fold change*: Muestra los valores de expresión diferencial entre (-INF, -1) para genes *down-regulated* y valores de (1, +INF) para genes *up-regulated*.
- iii). *Log Ratio*: Muestra los valores de expresión diferencial en el rango de (-INF, +INF) para genes *down-regulated* y *up-regulated*, respectivamente.

En nuestro estudio, los resultados de expresión diferencial de genes fueron obtenidos como *ratio*. Sin embargo, la herramienta de IPA convierte estos valores a *fold change* utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{fold change} = - (1/\text{ratio}),$$

y sólo se aplica para los genes *down-regulated*. Así, un gen que tenga una expresión diferencial de 0.5 *ratio*, equivaldrá a un valor de -2.0 *fold change*. Como dato adicional, la herramienta IPA admite que los datos también contengan el valor estadístico de *p*, que siempre será menor de 0.05.

Una vez que el archivo *.xls* que contiene los resultados de la expresión diferencial de genes satisfaga los *items* enunciados anteriormente, se procede a cargarlos en el IPA. Una vez cargados, la herramienta hace un análisis preliminar para confirmar que reconoce todos los *ID's* que están en la lista. En nuestro estudio, el análisis preliminar con IPA encontró que hay 47 *ID's* que no se corresponden con la base de datos de *Ensembl* y por lo tanto fueron excluidos de los posteriores análisis informáticos.

Seguidamente, y con el fin de obtener datos más precisos y específicos, se debe acotar el análisis sólo a la especie estudiada. El IPA tiene por defecto bases de datos y análisis integradas de humano, ratón y rata. También se debe seleccionar únicamente el órgano de donde proviene el ARN. En nuestro caso solamente seleccionamos el bazo.

El análisis de los datos mediante IPA nos proporcionó tres grupos principales de resultados. En primer lugar, un grupo de rutas de señalización, en las cuales participan los genes que se encuentran diferencialmente expresados. En total existen 121 rutas de señalización diferentes que presentan un valor estadístico de $p < 0.05$. Sin embargo, sólo hay 37 rutas de señalización que están asociadas con la respuesta inmune.

En la figura 46 se muestran las rutas de señalización asociadas con la respuesta inmune, así como el número de genes diferencialmente expresados que participan en cada una de ellas.

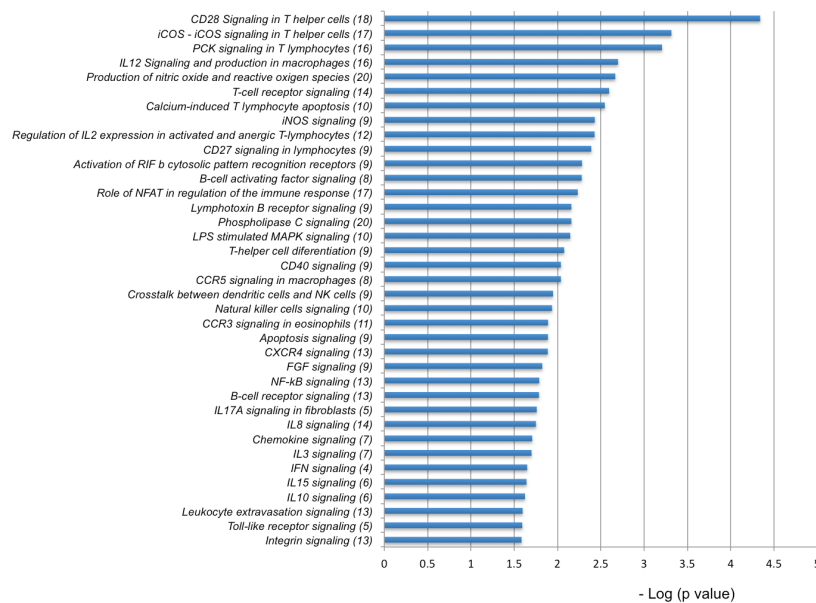


Figura 46. Rutas de señalización asociadas a la respuesta inmunológica. El número de genes diferencialmente expresados en cada ruta se muestra entre paréntesis.

Las rutas de señalización que presentaron el mayor número de genes diferencialmente expresados son de especial interés, ya que son las rutas que estuvieron mayoritariamente influenciadas por el proceso de inmunización de ratones con la combinación de péptidos con epítomos T, formulados en el sistema ADAD con el inmunomodulador AA0029. Estas rutas de señalización son:

Producción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (20 genes); señalización de fosfolipasa C (20 genes); señalización de CD28 en células T ayudadoras (18 genes); Señalización de iCOS - iCOS en células T ayudadoras (17 genes); Rol de NFAT en la regulación de la respuesta inmune (17 genes); Señalización de PCK en linfocitos T (16 genes); señalización de IL-12 y producción en macrófagos (16 genes); señalización del receptor de células T (14 genes); señalización de IL-8 (14 genes).

El análisis de los genes diferencialmente expresados en las rutas de señalización mencionadas anteriormente demostró que hay 3 genes *up-regulated* y 42 genes *down-regulated*. Solamente las rutas de señalización “producción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, señalización de IL-12 y producción en macrófagos y señalización de IL-8” presentaron al menos un gen que estaba *up-regulated*. Las demás rutas de señalización celular sólo presentaron genes diferencialmente expresados que estaban *down-regulated*.

Los genes *up-regulated*, con sus respectivos valores de *fold change*, se muestran a continuación:

S100A8 (5.93), **MMP9** (4.50), **CXCR2** (3.40).

Los genes *down-regulated* que presentaron los mayores valores de expresión diferencial fueron los siguientes:

CD40LG (-1.73), JUN (-1.58), PLCG1 (-1.54), IKBKE (-1.47), FYN (-1.45), PRKCQ (-1.46), PRKD3 (-1.44), ATM (-1.42), IFNG (-1.41), LCK (-1.41), NFAT5 (-1.38), ITRP3 (-1.37), ITRP1 (-1.37), IKBKB (-1.36), MAPK12 (-1.32).

Una breve descripción de cada uno de estos genes y las proteínas que codifican, se muestra a continuación:

S100A8 (ENSMUSG00000056054): El gen abarca 963 pares de bases (pb) y se encuentra en el cromosoma 3, entre las posiciones 90669071 - 90670034. Tiene un transcrito y un total de 3 exones. El gen presenta 49 poliformismos simples de nucleótidos (SNP's), 40 ortólogos y un elemento de regulación. Codifica para una proteína de unión a Calcio y Zinc. Se expresa en bazo, pulmones, hígado y médula osea. Juega un importante rol en la regulación de procesos inflamatorios y de la respuesta inmune. Puede inducir quimiotaxis de neutrófilos y adhesión. Normalmente se encuentra como un heterodimero con S100A9 y se conoce como calprotectina. Interviene en procesos intra y extra - celulares. Su actividad proinflamatoria incluye reclutamiento de leucocitos, promueve la producción de citocinas y quimiocinas. Estimula células de la respuesta inmune innata a través de TLR-4 y el receptor AGER (*Receptor for advanced glycation endproducts*). El enlace a TLR4 y AGER activa las rutas de señalización de MAP-kinasa y NF- κ B, resultando en la amplificación de la cascada proinflamatoria. La proteína tiene 89 aminoácidos y un peso molecular de 10295 Da.

MMP9 (ENSMUSG00000017737): El gen abarca 15070 pb y se encuentra en el cromosoma 2, desde la posición 164940780 a 164955850. MMP9 tiene 4 transcritos y un total de 20 exones. Tiene 473 SNP, 78 ortólogos, 5 parálogos y 7 elementos reguladores. El gen codifica para una metalopeptidasa de matriz 9, que se expresa en bazo, médula osea y retina. Puede degradar colágeno del tipo IV y V en 4 fragmentos. Tres de ellos en el extremo C-terminal y uno muy corto hacia el N-terminal. Es una proteína secretada.

CXCR2 (ENSMUSG00000026180): Quimiocina (C-X-C *motif*) receptor 2. El gen comprende 7249 pb en el cromosoma 1, desde la posición 74153989 - 74161238. Tiene 2 transcritos y contiene 5 exones. Tiene 190 SNP's, 79 ortólogos, 21 parálogos y 1 elemento de regulación. Codifica para un receptor de la IL-8, la cual es un importante factor quimiotáctico de neutrófilos. La unión de la IL-8 a su receptor causa la activación de neutrófilos. Se localiza en la membrana celular. esta proteína tiene 359 aminoácidos y un peso molecular de 40425 Da.

CD40LG (ENSMUSG00000031132): Ligando para CD40. El gen CD40LG comprende 11899 pb en el cromosoma X, en las posiciones 57212143 - 57224042. Tiene 1 transcrito y un total de 5 exones. El gen tiene 196 SNP's y 44 ortólogos. La proteína codificada es una citocina que se une a TNFRSF5, interviene en la proliferación de células B en ausencia de coestímulos, así como en la producción de IgE en presencia de IL-4. También está involucrado en la diferenciación de las subclases de inmunoglobulinas. El ligando CD40 es una molécula secretada en su forma soluble. La proteína presenta 260 aminoácidos y un peso molecular de 29370 Da.

JUN (ENSMUSG00000052684): Oncogen JUN. El gen presenta 3188 pb en el cromosoma 4, en las posiciones 95049034 - 95052222. Tiene 2 transcritos y un total de 3 exones. Tiene 33 SNP's, 49 Ortólogos, 2 parálogos y 5 elementos de regulación. Codifica para el factor de transcripción AP-1. Está involucrado en angiogénesis, regeneración de axones, respuesta celular al ión calcio, diferenciación de monocitos, regulación negativa de la proliferación celular y regulación positiva de la diferenciación de monocitos. La proteína tiene 334 aminoácidos y un peso molecular de 35944 Da.

PLCG1 (ENSMUSG00000016933): Fosfolipasa C, gamma 1. El gen abarca 44460 pb en el cromosoma 2, en las posiciones 160731300 - 160775760. Tiene 12 transcritos en un total de 90 exones. El gen tiene 862 SNP's, 85 ortólogos, 1 parálogo y 11 elementos de regulación. El gen codifica para la proteína 1-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato fosfodiesterasa gamma 1, la cual media la producción de moléculas de diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y juega un papel muy importante en la regulación de cascadas de señalización intracelular. La proteína tiene 1302 aminoácidos y un peso molecular de 149668 Da.

IKBKE (ENSMUSG00000042349): Inhibidor de la quinasa kappa β , epsilon. Este gen abarca 25263 pb en el cromosoma 1, en las posiciones 131254343 - 131279606. Tiene un total de 7 transcritos y 44 exones. Además, tiene 767 SNP's, 59 ortólogos, 3 parálogos y 8 elementos de regulación. Codifica para un inhibidor del factor nuclear kappa B quinasa, subunidad epsilon. Fosforila los inhibidores NF-kappa-B y produce la disociación del complejo inhibidor/NF-kappa-B y posteriormente la degradación del inhibidor. Juega un rol especial en la respuesta inmunitaria. La proteína tiene 717 aminoácidos y un peso molecular de 80953 Da.

FYN (ENSMUSG00000019843): Oncogen FYN. El gen abarca 196526 pb en el cromosoma 10, en las posiciones 39368855 to 39565381. FYN tiene 9 transcritos y un total de 31 exones, además de 6309 SNP's, 77 ortólogos, 17 parálogos y 31 elementos de regulación. Codifica para una tirosina proteína quinasa FYN, que juega un rol en diversos procesos biológicos, incluyendo la regulación del crecimiento celular, adhesión celular, señalización mediada por integrinas, motilidad celular y respuesta inmune, proliferación de células T activadas. Esta proteína tiene 2 isoformas, 537 aminoácidos y un peso molecular de 60675 Da.

PRKCQ (ENSMUSG00000026778): Proteína quinasa C, *theta*. Este gen abarca 129113 pb en el cromosoma 2, en las posiciones 11172113 - 11301226. Tiene 3 transcritos y un total de 22 exones, además de 3969 SNP's, 60 ortólogos, 11 parálogos y 19 elementos de regulación. La proteína media funciones en la señalización del TCR, además de activación de células T, proliferación, diferenciación y activación de múltiples factores de transcripción, tales como NF-kappa-B, JUN, NFATC1 y NFATC2. Durante la diferenciación de células T, juega un rol muy importante en el desarrollo de células Th2 y en el desarrollo de enfermedades autoinmunes inflamatorias es necesaria para la activación de células Th17. La proteína tiene 707 aminoácidos y un peso molecular de 81573 Da.

PRKD3 (ENSMUSG00000024070): Proteína quinasa D3. El gen comprende 71411 pb en el cromosoma 17, en las posiciones 78949405 - 79020816. El gen tiene 8 transcritos y un total de 39 exones. Además, posee 2295 SNP's, 80 ortólogos, 7 parálogos y 4 elementos de regulación. Codifica para una serina/treonina proteína quinasa D3 y participa principalmente en el estrés oxidativo, así como en transducción intracelular de señales. La proteína tiene 889 aminoácidos y un peso molecular de 100078 Da.

ATM (ENSMUSG00000034218): *Ataxia telangiectasia mutated homolog* (human). El gen consta de 97591 pb en el cromosoma 9, en las posiciones 53439149 - 53536740. Tiene 5 transcritos y un total de 80 exones, además de 2879 SNP's, 82 ortólogos y 4 elementos de regulación. Codifica para una serina/treonina quinasa ATM, juega un papel en transducción de señales y control del ciclo celular. Puede participar en el desarrollo de células T. La proteína tiene 3066 aminoácidos y un peso molecular de 349418 Da.

IFNG (ENSMUSG00000055170): Interferon gamma. El gen comprende 4845 pb en el cromosoma 10, en las posiciones 118441047 - 118445892. Tiene 1 transcritos y un total de 4 exones, además de 108 SNP's, 43 ortólogos y 1 elemento de regulación. El interferón gamma es producido por linfocitos activados por un antígeno o mitógeno. Además de tener actividad antiviral, tiene importantes funciones inmunoregulatorias. Es un potente activador de macrófagos y tiene efectos antiproliferativos en células transformadas y potencia la actividad antitumoral y antiviral de interferones de tipo I. Está implicado en la respuesta inmune adaptativa, procesamiento y presentación de antígenos, respuesta inmune humoral, regulación negativa de la producción de IL-17, entre otras funciones. La proteína tiene 155 aminoácidos y un peso molecular de 17907 Da.

LCK (ENSMUSG0000000409): Tirosina proteína quinasa asociada a linfocitos. El gen abarca 25297 pb en el cromosoma 4, en las posiciones 129548344 - 129573641. Presenta 8 transcritos y un total de 34 exones. Además, tiene 772 SNP's, 51 ortólogos, 17 parálogos y 7 elementos de regulación. Codifica para una tirosina proteína quinasa, que juega un rol esencial en la selección, maduración y desarrollo de células T y en las rutas de señalización asociadas al receptor de células T (TCR). También juega un rol en la ruta de señalización asociada al receptor de IL-2 que controla las respuestas proliferativas de células T. La proteína tiene 509 aminoácidos y un peso molecular de 57943 Da.

NFAT5 (ENSMUSG00000003847): Factor nuclear 5 de células T activadas. El gen comprende 86047 pb en el cromosoma 8, en las posiciones 107293470 - 107379517. Presenta 14 transcritos y un total de 50 exones. Además, tiene 1333 SNP's, 65 ortólogos, 4 parálogos y 9 elementos de regulación. Juega un rol en la expresión inducible de genes y está involucrado en la producción de citocinas. La proteína tiene 1552 aminoácidos y un peso molecular de 132192 Da.

ITPR3 (ENSMUSG00000042644): Receptor 3 de inositol 1,4,5-trifosfato. El gen abarca 64919 pb en el cromosoma 17, en las posiciones 27057304 - 27122223. Tiene un transcritos y un total de 58 exones. Además, tiene 1904 SNP's, 66 ortólogos, 5 parálogos y 28 elementos de regulación. Este receptor media la liberación del ión calcio intracelular. La proteína tiene 2670 aminoácidos y un peso molecular de 304275 Da.

ITPR1 (ENSMUSG00000030102): Receptor 1 de inositol 1,4,5-trifosfato. El gen comprende 337991 pb en el cromosoma 6, en las posiciones 108213118 - 108551109. Tiene un transcrito y un total de 62 exones. Además, posee 10389 SNP's, 87 ortólogos, 5 parálogos y 52 elementos de regulación. Canal intracelular que media en la liberación de calcio desde el retículo endoplasmático después de estimulación con 1,4,5-trifosfato. La proteína tiene 8 isoformas, 2749 aminoácidos y un peso molecular de 313167 Da.

IKBKB (ENSMUSG00000031537): Inhibitor de la quinasa $\kappa\beta$. El gen abarca 47377 pb en el cromosoma 8, en las posiciones 22659212 - 22706589. Tiene 14 transcritos y un total de 66 exones. Posee 1487 SNP's, 62 ortólogos, 3 parálogos y 10 elementos de regulación. Codifica para una serina proteína quinasa que juega un rol esencial en la ruta de señalización NF- κ B el cual es activado por múltiples estímulos, tales como citocinas inflamatorias y productos bacterianos y virales. Está implicado en la activación de la transcripción de cientos de genes involucrados en respuesta inmune. Tiene 757 aminoácidos y un peso molecular de 86690 Da.

MAPK12 (ENSMUSG00000022610): Proteína quinasa 12 activada por mitógenos. El gen comprende 10118 pb en el cromosoma 5, en las posiciones 89130585 - 89140703. Presenta 1 transcrito y un total de 12 exones. Además, 174 SNP's, 75 ortólogos, 6 parálogos y 4 elementos de regulación. La proteína con actividad de serina proteína quinasa es un componente esencial de la vía de señalización de MAP quinasa. También juega un importante rol en cascadas celulares activadas por el estímulo de citocinas inflamatorias y activa diversos factores de transcripción. La proteína tiene 367 aminoácidos y un peso de 42043 Da.

En la figura 47 se muestra un resumen de los genes *up-regulated* y *down-regulated* más representativos y su participación en las diferentes rutas de señalización que presentan los valores de p más bajos.

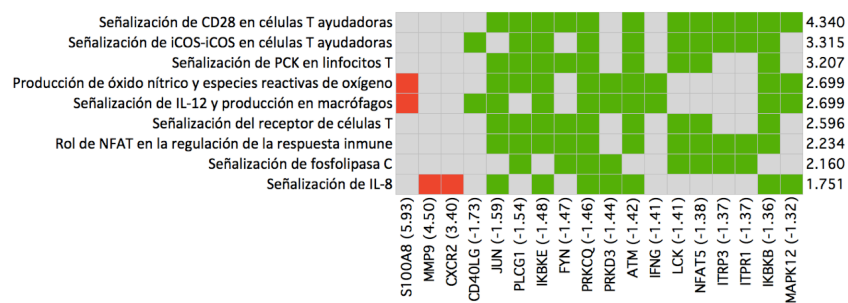


Figura 47. Genes *up-regulated* y *down-regulated* que presentan la mayor expresión diferencial en las rutas de señalización con mayor número de genes diferencialmente expresados. El color rojo indica presencia de genes *up-regulated*, el color verde la presencia de genes *down-regulated* y el color gris indica ausencia del gen. Entre paréntesis se muestra el valor de *fold change* de cada gen y la escala de la derecha muestra el valor de $-\log(p)$ de cada ruta de señalización.

Cada una de las rutas de señalización tiene una representación gráfica que nos permite visualizar todos los genes involucrados en cada ruta, así como aquellos que están diferencialmente expresados y su respectiva localización celular. En la figura 48 se muestra la simbología empleada en la generación de dichas rutas mediante IPA. En esta figura se distingue claramente los diferentes componentes que interaccionan directa o indirectamente unos con otros en las rutas de señalización. De la misma forma, estos símbolos pueden estar de color rojo (indicando genes *up-regulated*) o de color verde (*down-regulated*). La intensidad del color también es proporcional a la magnitud de la expresión diferencial de cada gen.

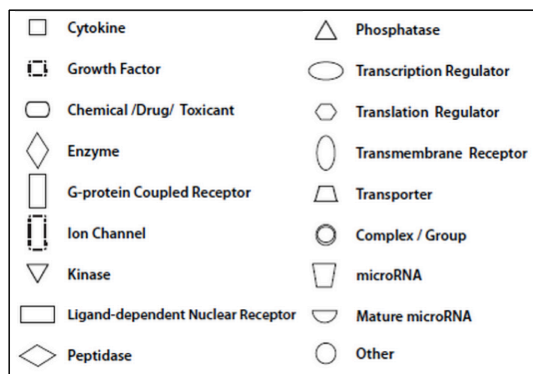


Figura 48. Simbología empleada para la generación de rutas de señalización mediante IPA.

A continuación se muestra la representación gráfica de la ruta de señalización de la IL-8:

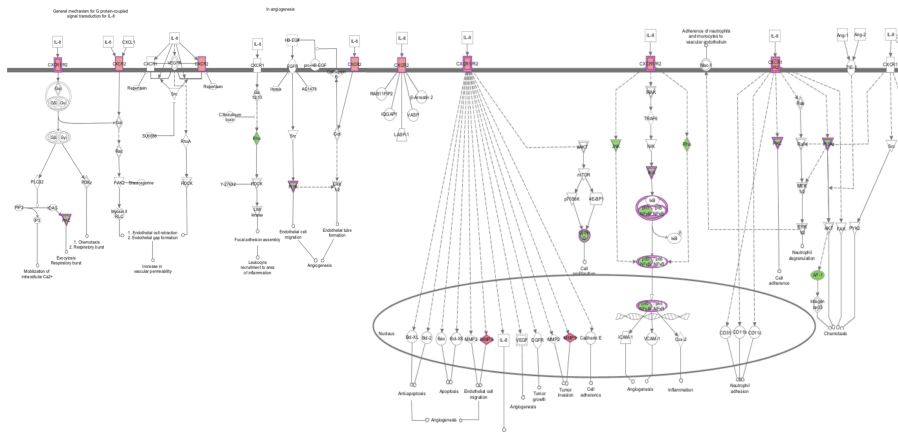


Figura 49. Ruta de señalización de IL-8.

La ruta de señalización de la IL-8 tiene un papel muy importante en la respuesta inmune. Cabe recordar que esta citocina está asociada con la activación de neutrófilos y eosinófilos. Como se mencionó en apartados anteriores, los eosinófilos pueden llegar a tener un papel muy importante en la eliminación de los helmintos de sus hospedadores definitivos, en un proceso que también es dependiente de IgE. En nuestro estudio encontramos que la inmunización de ratones BALB/c con los péptidos sintéticos que contienen epítopos T inducen una modificación en la ruta de señalización de la IL-8, encontrándose esta *up-regulated* (figura 49), aunque también se puede observar que hay varios genes de esta ruta que también están *down-regulated*. En este estudio también encontramos que los receptores para IL-8, CXCR1 y CXCR2 se encuentran *up-regulated* como resultado de la inmunización.

En el segundo grupo de resultados, se encuentran las denominadas funciones. En total se encuentran 67 funciones con un valor de $p < 0.05$, de las cuales sólo 8 están directamente relacionadas con la respuesta inmune. Las funciones, así como el número de genes diferencialmente expresados asociadas se encuentran descritas en la figura 50.

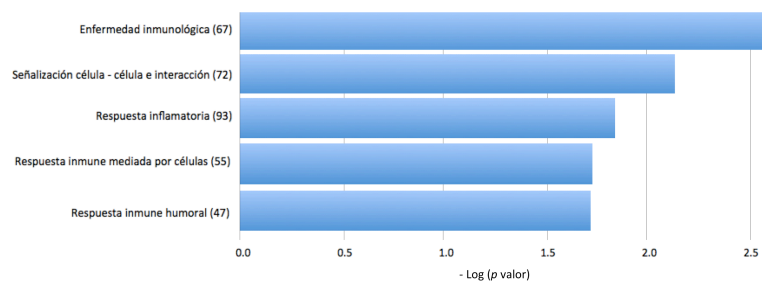


Figura 50. Funciones inmunológicas que presentan el mayor número de genes diferencialmente expresados. El número de genes implicados en cada ruta se muestra entre paréntesis.

Cada función estudiada tiene a su vez un conjunto de subfunciones en donde también están implicados los genes diferencialmente expresados. En el anexo 6 se muestran las subfunciones que están asociadas a cada función inmunológica estudiada.

El estudio de las funciones reveló que hay 35 genes *up-regulated* y 91 genes *down-regulated* diferencialmente expresados asociados con alguna de estas funciones y subfunciones. En la tabla 14 se muestran los genes diferencialmente expresados que presentaron los mayores valores de *fold change*.

ID Ensembl	Fold change	Símbolo	Descripción*
ENSMUSG00000064246	7.441	Chi3l1	chitinase 3-like 1
ENSMUSG00000020125	6.728	Elane	elastase, neutrophil expressed
ENSMUSG00000031722	6.133	Hp	haptoglobin Gene
ENSMUSG00000056054	5.934	S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
ENSMUSG00000024659	5.510	Anxa1	annexin A1
ENSMUSG00000056071	5.286	S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)
ENSMUSG00000017737	4.501	Mmp9	matrix metalloproteinase 9
ENSMUSG00000039109	4.478	F13a1	coagulation factor XIII, A1 subunit
ENSMUSG00000030142	4.446	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member
ENSMUSG00000032739	3.956	Pram1	PML-RAR alpha-regulated adaptor molecule 1
ENSMUSG00000025701	3.444	Alox5	arachidonate 5-lipoxygenase
ENSMUSG00000026180	3.402	Cxcr2	chemokine (C-X-C motif) receptor 2
ENSMUSG00000045551	3.246	Fpr1	formyl peptide receptor 1
ENSMUSG00000049130	3.189	C5ar1	complement component 5a receptor 1
ENSMUSG00000062593	3.168	Gp49a	glycoprotein 49 A
ENSMUSG00000027360	2.995	Hdc	histidine decarboxylase
ENSMUSG00000024164	2.945	C3	complement component 3
ENSMUSG00000055782	2.557	Abcd2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2
ENSMUSG00000030144	2.432	Clec4d	C-type lectin domain family 4, member d
ENSMUSG00000030589	2.199	Rasgrp4	RAS guanyl releasing protein 4
ENSMUSG00000029657	-2.642	Hsph1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1
ENSMUSG00000030775	-2.259	Trat1	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1
ENSMUSG00000031132	-1.740	Cd40lg	CD40 ligand
ENSMUSG00000037523	-1.694	Mavs	mitochondrial antiviral signaling protein
ENSMUSG00000027111	-1.593	Itga6	integrin alpha 6
ENSMUSG00000027985	-1.573	Lef1	lymphoid enhancer binding factor 1
ENSMUSG00000048251	-1.556	Bcl11b	B-cell leukemia/lymphoma 11B
ENSMUSG00000001444	-1.544	Tbx21	T-box 21
ENSMUSG00000016933	-1.541	Plcg1	phospholipase C, gamma 1
ENSMUSG00000037202	-1.536	Prf1	perforin 1 (pore forming protein)
ENSMUSG00000019843	-1.476	Fyn	Fyn proto-oncogene
ENSMUSG00000038855	-1.467	Itpkb	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B
ENSMUSG00000026778	-1.462	Prkcq	protein kinase C, theta
ENSMUSG00000024399	-1.439	Ltb	lymphotoxin B
ENSMUSG00000005696	-1.428	Sh2d1a	SH2 domain protein 1A
ENSMUSG00000034218	-1.425	Atm	ataxia telangiectasia mutated homolog
ENSMUSG00000024381	-1.424	Bin1	bridging integrator 1
ENSMUSG00000026637	-1.423	Traf5	TNF receptor-associated factor 5
ENSMUSG00000015619	-1.420	Gata3	GATA binding protein 3
ENSMUSG00000055170	-1.412	Ifng	interferon gamma

Tabla 14. Genes *up-regulated* (rojo) y *down-regulated* (verde) más representativos de las funciones inmunológicas. *Debido al amplio número de genes, rutas de señalización y funciones inmunológicas producidas en el análisis de los *microarrays*, esta parte de los resultados será presentada en inglés, salvo cuando sea estrictamente necesaria su mención en español.

Se observa que varios de los genes que estaban implicados en las rutas de señalización, también son los que presentan una mayor participación en el número de funciones y subfunciones asociadas con la respuesta inmunológica. Así, los genes *up-regulated* C3, ANXA1, CXCR2, LTBR y MMP9 son los que presentan una mayor implicación en las funciones inmunológicas. Por otro lado, los genes *down-regulated* que presentan mayor participación en las funciones inmunológicas son: IFNG, CD40LG, PRKCO, IKBKE. El análisis detallado de la participación de los genes más representativos en cada función y subfunción se encuentra descrito en el anexo 7.

Finalmente, el tercer grupo de resultados corresponde a las denominadas redes. Las redes analizadas en este estudio, así como el número de moléculas asociadas a cada una se describen en la tabla 15. El análisis de estas redes demostró que hay 31 genes *up-regulated* y 109 genes *down-regulated* diferencialmente expresados que participan en estas redes.

Un análisis más detallado de todos los genes diferencialmente expresados que participan en cada una de estas redes se muestra en el anexo 8.

Red	Genes
Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function	30
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	26
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	25
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	25
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	18
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	16
Cellular Movement, Immune Cell Trafficking, Hematological System Development and Function	16

Tabla 15. Redes analizadas en este estudio.

En la tabla 16 se muestran los genes que presentaron los mayores niveles de expresión diferencial y que participan en las redes mencionadas anteriormente.

ID Ensembl	Fold change	Símbolo	Descripción
ENSMUSG00000031722	6.133	Hp	haptoglobin
ENSMUSG00000056054	5.934	S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
ENSMUSG00000030142	4.446	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e
ENSMUSG00000025701	3.444	Alox5	arachidonate 5-lipoxygenase
ENSMUSG00000062593	3.168	Gp49a	glycoprotein 49 A
ENSMUSG00000024164	2.945	C3	complement component 3
ENSMUSG00000055782	2.557	Abcd2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD)
ENSMUSG00000068747	2.427	Sort1	sortilin 1
ENSMUSG00000036768	2.172	Kif15	kinesin family member 15

ENSMUSG00000066682	2.154	Pilrb2	paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta 2
ENSMUSG00000029657	-2.642	Hsph1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1
ENSMUSG00000030775	-2.259	Trat1	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1
ENSMUSG00000029416	-1.804	Slc15a4	solute carrier family 15, member 4
ENSMUSG00000030671	-1.773	Pde3b	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited
ENSMUSG00000031132	-1.740	Cd40lg	CD40 ligand
ENSMUSG00000030357	-1.639	Fkbp4	FK506 binding protein 4
ENSMUSG00000032528	-1.637	Vipr1	vasoactive intestinal peptide receptor 1
ENSMUSG00000029298	-1.628	Gbp9	guanylate-binding protein 9
ENSMUSG00000032009	-1.562	Sesn3	sestrin 3
ENSMUSG00000048251	-1.556	Bcl11b	B-cell leukemia/lymphoma 11B

Tabla 16. Genes *up-regulated* (rojo) y *down-regulated* (verde) más representativos de las redes analizadas.

En la figura 51 se muestra la representación gráfica de la red denominada *Cell to cell signaling and interaction, Inflammatory response, Protein synthesis*. En esta figura se aprecia que existen interacciones directas (líneas continuas) e indirectas (líneas punteadas) entre enzimas, citocinas, reguladores de la transcripción y receptores transmembranales. También se observa la interacción existente entre los diferentes genes *up-regulated* y *down-regulated*, las cuales, de manera sistemática cooperan para aumentar o disminuir la expresión de otros genes.

Un análisis integrado de todos los resultados (rutas de señalización, funciones y redes) demostró que hay 68 genes *up-regulated* y 268 genes *down-regulated* diferencialmente expresados. En el diagrama de Venn representado en la figura 52 se observa el número de genes diferencialmente expresados que están involucrados en los tres grandes grupos de funciones inmunológicas. De esta forma, se observa que hay 3 genes *up-regulated* y 40 genes *down-regulated* que participan en los tres grandes grupos de funciones inmunológicas.

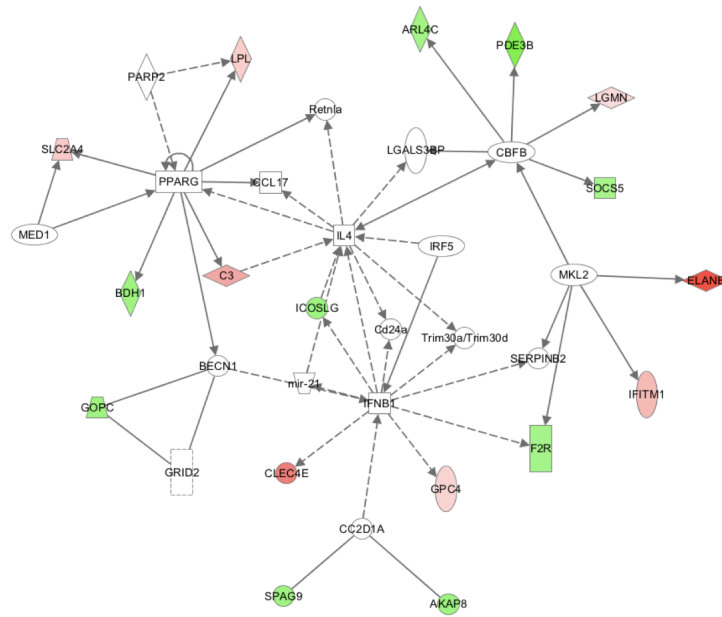


Figura 51. Representación gráfica de la red denominada *Cell to cell signaling and interaction, Inflammatory response, Protein synthesis*.

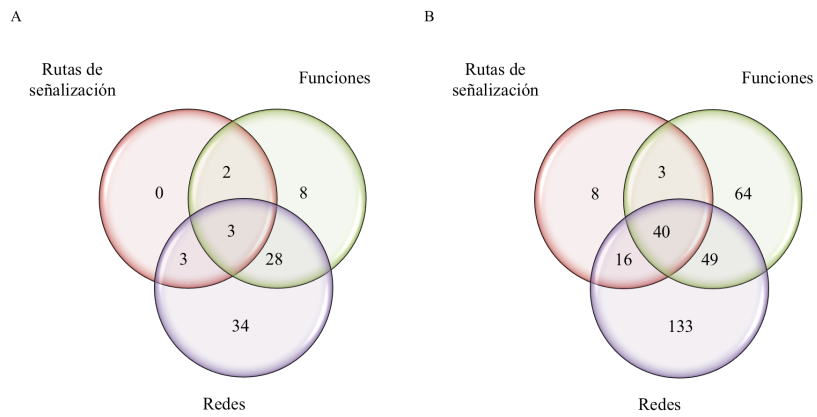


Figura 52. Representación mediante diagrama de Venn del número de genes diferencialmente expresados que participan en los tres grandes grupos de funciones inmunológicas. A). Genes *up-regulated*. B). Genes *down-regulated*.

5.5. Validación del *microarray*

Los resultados obtenidos de la expresión diferencial de genes usando la metodología descrita en apartados anteriores, fueron confirmados mediante reacciones de PCR. Los genes escogidos aleatoriamente para dicha confirmación fueron los siguientes: genes *up-regulated*: CxCR2, IFITM1y S100A8 y genes *down-regulated*: CD40LG, IKBKE y PLCG1. En un primer ensayo se obtuvo amplificación de bandas a partir de muestras de ARN, lo cual nos indicaba claramente la contaminación del ARN con ADN genómico (ADNg), por lo cual fue necesario hacer tratamiento de todas las muestras de ARN con ADNasa y posterior síntesis de ADNc. La presencia de una única banda de ≈ 140 pb en la PCR del gen PLCG1 (figura 53B, carril 5) indica que el ADNc no presentaba contaminación con ADNg dado que el producto esperado para este último correspondía a ≈ 1747 pb (figura 53B, carril 9), lo cual indica que el tratamiento del ARN con ADNasa fue efectivo. Adicionalmente, no hubo ninguna contaminación en los controles respectivos de cada PCR.

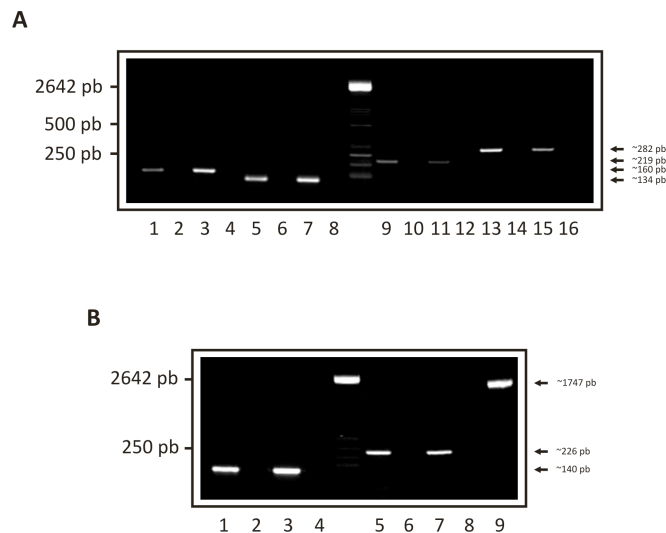


Figura 53. Amplificación de genes para la validación del *microarray*. A) Muestra los productos de PCR para los genes CxCR2 (carril 1-4), IFITM1 (Carril 5-8), CD40LG (Carril 9-12) e IKBKB (Carril 13-16). B) Amplificación de los genes S100A8 (carril 1-4) y PLCG1 (carril 5-8). El orden del ensayo corresponde a la amplificación de cada gen a partir de ADNc RT+ (carriles impares) y ADNc RT- (carriles pares) provenientes de los ratones sanos (figura 53A: carriles 1, 5, 9, 13; Figura 53B: carriles 1 y 5) e inmunizados con la combinación de péptidos con epitopos T (figura 53A: carriles 3, 7, 11, 15; Figura 53B: carriles 3 y 7). El carril 9 de la figura 53B muestra la amplificación del gen PLCG1 a partir de ADNg. Las bandas características del marcador de peso molecular XIII (escala de 50 pb) son mostradas en el centro de cada imagen.

En la figura 53A se puede observar que la intensidad de la banda obtenida en el grupo de ratones sanos es mayor que la obtenida en el grupo de ratones inmunizados con la combinación de péptidos con epítomos T, para los 3 genes *down-regulated*, lo cual confirma los resultados obtenidos en el *microarray*. Igualmente, se puede observar en la figura 53B que la intensidad de la banda de los genes *up-regulated* es menor en el grupo de ratones sanos que en el grupo de ratones inmunizados, confirmando nuevamente los resultados del *microarray*.

Capítulo IV

DISCUSIÓN

En la primera parte de este estudio se identificaron proteínas de *F. hepatica* que preferentemente fueran secretadas por el parásito. Para este propósito, a partir de las secuencias de aminoácidos de proteínas de *F. hepatica* que se encontraban disponibles en el NCBI seleccionamos aquellas que tuvieran péptido señal y ausencia de región transmembrana, encontrando que la mayoría de estas proteínas pertenecían a la familia de las catepsinas y proteínas similares a amebaporo (saposinas), las cuales han sido ampliamente utilizadas como candidatos a vacuna contra la fasciolosis (Golden *et al* 2010, Pérez-Ecija *et al* 2010, Buffoni *et al* 2012, Zafra *et al* 2013, Hernández y Espino 2013, Wesolowska *et al* 2013). Se ha descrito la gran importancia de las proteínas de excreción / secreción de *F. hepatica*, debido a su gran implicación durante la invasión a sus hospedadores definitivos, así como su gran utilidad como candidatos a vacuna frente a la fasciolosis (Dalton *et al* 2013), ya que se encuentran expuestas de forma extracelular y son susceptibles a un ataque inmunológico, ya sea mediante anticuerpos neutralizantes o mediante la acción efectora de citocinas.

Posteriormente, a partir de las proteínas identificadas que pudieran ser secretadas se realizó la identificación de péptidos que tuvieran epítomos B y T, con el fin de caracterizar la respuesta inmune inducida tras su administración en ratones BALB/c utilizando el sistema ADAD de vacunación y de acuerdo a un amplio y pormenorizado estudio de esta, seleccionar péptidos que pudieran tener potencial inmunoprotector frente a la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica*. Para este propósito se utilizaron diversas herramientas de bioinformática e inmunoinformática y se utilizó una metodología de vacunología reversa, la cual ha sido ampliamente utilizada en el desarrollo de vacunas basadas en péptidos sintéticos, principalmente contra la malaria, pero también contra otros parásitos helmintos (Robinson *et al* 1995, McGuire *et al* 2002, Vilar *et al* 2003, El-Ridi *et al* 2004, de Aluja *et al* 2005, Huang *et al* 2005, Muro *et al* 2007, Madhumanthi *et al* 2010). El desarrollo de herramientas de bioinformática, cada vez más potentes y precisas, junto con modernas técnicas de secuenciación han llevado a una rápida identificación de epítomos que pueden ser evaluados utilizando técnicas tanto *in vitro* como *in vivo*, para la prevención de enfermedades de afectación humana y animal. Nosotros encontramos que los péptidos diseñados eran derivados de antígenos que han sido ampliamente utilizados como candidatos a vacuna, como son las catepsinas y proteínas similares a amebaporo, principalmente, por lo cual nuestra aproximación bioinformática resultó ser muy eficaz. Además, debido a que las catepsinas han sido las proteínas más ampliamente utilizadas en la búsqueda de una vacuna eficaz contra *F. hepatica*, resultaría de especial interés poder obtener otra alternativa de obtención de antígenos, diferente a la habitualmente utilizada tecnología del ADN recombinante. También tendremos la posibilidad de hacer diferentes combinaciones de epítomos para ser incluidos en la misma formulación vacunal.

Una vez definidas las secuencias peptídicas y sintetizados mediante procedimientos estandarizados de síntesis de péptidos en fase sólida, la inmunización de ratones BALB/c con estos péptidos, formulados en el sistema ADAD de vacunación utilizando dos inmunomoduladores diferentes, indujo una elevada y específica respuesta inmune. El efecto de los dos inmunomoduladores quedó claramente estudiado de acuerdo a las magnitudes de la respuesta inmune inducidas. Por un lado, se observó que el AA0029

indujo altas respuestas de tipo celular, mientras que el PAL indujo una mayor respuesta de anticuerpos. De todas formas, los dos inmunomoduladores indujeron respuestas del tipo Th1/Th2, lo cual puede resultar de especial interés en ensayos de inmunización y protección donde se requiera la participación de diferentes tipos de respuesta inmune. Además, la utilización del inmunomodulador AA0029 también indujo la producción de altos niveles de IL-17 y de citocinas proinflamatorias, mientras que al inmunomodulador PAL se le asocia preferentemente con la producción de altos niveles de citocinas del tipo Th2, lo cual está en concordancia con los altos niveles de anticuerpos específicos inducidos por el uso de PAL.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que, además del tipo de inmunomodulador utilizado, el tipo de epítipo utilizado también va a influir directamente en la respuesta inducida. En nuestro estudio se observó claramente que, la magnitud de la respuesta inmune inducida era completamente diferente cuando se utilizaban péptidos con epítipos B que cuando se utilizaban péptidos con epítipos T. Por lo cual existen interacciones y efectos principales entre el inmunomodulador (AA0029 o PAL) y el tipo de epítipo utilizado (B o T). Prueba de esto es que en nuestro estudio, la inmunización de ratones con los péptidos que contienen epítipos T y el inmunomodulador PAL indujo altos niveles de las citocinas IL-10 e IL-5, mientras que la utilización de los péptidos con epítipos B y PAL indujeron altos niveles de IgG1, clásicamente asociados a un perfil inmunológico tipo Th2.

También ha de tenerse en cuenta la influencia de los componentes del sistema ADAD de vacunación en la modulación de la respuesta inmune inducida, como es el caso del adyuvante Qs21 y el aceite no-mineral Montanide, pues como se indicó en apartados anteriores, el adyuvante Qs21 posee actividad inmunoestimulante con la inducción de altos niveles de IL-2, IFN- γ e IgG2a. Por otro lado la emulsión formada por el Montanide estimula la producción de citocinas, tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Dey y Srivastava 2011, Moret *et al* 2011, Mosca *et al* 2011, Smith *et al* 2013).

La combinación de todos estos factores hizo que la interpretación de los resultados fuera compleja, requiriendo herramientas avanzadas de estadística para su mejor entendimiento y por eso en muchos casos se obtienen, para un mismo antígeno, diferentes perfiles de respuesta inmune, haciendo que la posterior selección de péptidos como candidatos a vacuna resultara de la combinación de varios factores.

Existe evidencia de que el desarrollo de vacunas contra *F. hepatica* es posible, ya que el ganado, por ejemplo, es altamente susceptible a una infección primaria con *F. hepatica*, pero este puede generar una infección crónica y silente cuando se produce una reinfección, es decir, adquiere resistencia (Haroun y Hillyer 1986). Los mecanismos asociados con dicha tolerancia están mediados tanto por una respuesta inmune humoral como celular del hospedador, encontrándose en la fase aguda de la infección altos niveles de IFN- γ , mientras que las citocinas del tipo Th2 (IL-4) y Treg (IL-10) son producidas y mantenidas durante las etapas finales de la infección (Andrews 1999, Flynn y Mulcahy 2008, Dalton *et al* 2013).

Por esto, se puede argumentar que la respuesta prolongada en el tiempo del tipo Th2 no es protectora y por el contrario, permite la supervivencia del parásito en el hospedador, encontrándose en la infección crónica altos niveles de IgG1 y muy poco o nada de IgG2a (Mulcahy *et al* 1999, Hoyle y Taylor 2003). Sin embargo, la evidencia experimental sugiere que la inmunoprotección contra *F. hepatica* puede estar mediada por una respuesta mixta de los tipos Th1/Th2, ya que la inmunización de ganado con la proteína catepsina L que confiere protección parcial, induce la producción de anticuerpos tanto del tipo IgG1 como IgG2a (Mulcahy *et al* 1998, 1999). Es por esto que en nuestro estudio nosotros seleccionamos péptidos que indujeran diferentes tipos de respuesta inmune. La mayoría de los péptidos sintéticos con epítopos B y T indujeron altos niveles de IgG1 y también, aunque en menor medida, niveles de IgG2a, generando por tanto respuestas inmunitarias de los tipos Th1 y Th2. Sin embargo, algunos péptidos mostraron un comportamiento diferente. El péptido T14 indujo sólo altos niveles de IgG1, mientras que el péptido T16 sólo IgG2a.

En los posteriores estudios de protección se muestra el efecto de utilizar péptidos que presentan un tipo de respuesta definida y combinación de diferentes respuestas, mediante la combinación de péptidos. En cuanto a los niveles de IgE e IgM, la inmunización de los ratones con los péptidos sintéticos indujo bajos niveles de estos tipos de inmunoglobulinas. Las infecciones con helmintos han sido asociadas con anticuerpos del tipo IgE. Sin embargo, su papel en el desarrollo de inmunidad protectora no está bien esclarecido, aunque se acepta que los anticuerpos del tipo IgE se unen a los vermes adultos y se promueve la unión de eosinófilos que ejercen un ataque directo sobre el gusano (Negrao-Correa 2001). En infecciones causadas por *S. mansoni* y *S. haematobium* se ha comprobado una correlación positiva entre los niveles de IgE y la protección en poblaciones humanas (Hagan 1993). Antígenos derivados de adultos de *S. haematobium* que son reconocidos por anticuerpos de los tipos IgE e IgG1 son de especial interés ya que pueden estar asociados con el desarrollo de resistencia a la esquistosomosis (Mutapi *et al* 2011). De hecho, muchos de estos antígenos son actualmente considerados como importantes candidatos a vacuna (Al-Sherbiny *et al* 2003).

En nuestro estudio, aunque se obtuvieron bajos niveles de IgE en ratones inmunizados con los péptidos con epítopos B y T, sí que se encontraron mayores niveles con algunos de los péptidos y utilizando el AA0029. Por esta razón, estos péptidos también fueron estudiados en posteriores estudios de protección *in vivo*. En la infección con *F. hepatica* se ha descrito la participación de anticuerpos del tipo IgM que actúan como anticuerpos de bloqueo, previniendo la unión de los eosinófilos a los vermes adultos y su posterior eliminación (Moreau y Chauvin 2010). La inmunización de ratones BALB/c con los péptidos sintéticos también indujo, en algunos casos, mayores niveles de IgM con el AA0029. En modelos experimentales se han observado altos niveles de IgM frente a antígenos de excreción/secreción de *F. hepatica* (Phiri *et al* 2006).

La cuantificación de citocinas en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos, empleando cualquiera de los inmunomoduladores, evidenció la inducción de respuestas de tipo celular de los tipos Th1, Th2, Treg y Th17. En nuestro estudio, encontramos además que el proceso de inmunización con los péptidos sintéticos indujo una respuesta mayoritaria del tipo Th1, diferente a la respuesta clásica del tipo Th2 mostrada en la fase crónica de la infección por helmintos, lo cual puede tener implicaciones en los posteriores estudios de protección. Estos resultados también son consistentes con aquellos encontrados en otros experimentos de inmunización, donde también se obtuvieron altos niveles de citocinas tanto del tipo Th1 como del tipo Th2 (Mulcahy *et al* 1999, Espino *et al* 2005, Espino y Rivera 2005).

A pesar de que la respuesta del tipo Th2 parece ineficaz en la fase crónica de la infección, diferentes estudios sugieren que la IL-4 puede mediar de forma directa la expulsión de los vermes adultos y es necesaria para la amplificación de la respuesta Th2. Además, la IL-5 también juega un importante papel en mediar la respuesta protectora en el hospedador (Gause *et al* 2003). En otros parásitos helmintos como *S. mansoni*, la protección inducida por algunos antígenos candidatos a vacuna ha sido asociada con altos niveles de IFN- γ así como de TNF- α (Cardoso *et al* 2008, Farias *et al* 2010). En la infección causada por *F. hepatica*, el TNF- α puede jugar un papel importante en la expulsión de los vermes adultos a través de un aumento en la respuesta Th2 y la supresión de la producción de IFN- γ puede mediar la supervivencia del parásito (Artis *et al* 1999, Flynn y Mulcahy 2008). Un estudio reciente en ovejas de Indonesia sugirió que la inducción de una respuesta temprana de tipo Th1 puede ser responsable de su capacidad para resistir a la infección (Pleasant *et al* 2011). El presente estudio demostró que algunos péptidos indujeron una elevada y específica respuesta del tipo Th2, entre ellos el B5, B6, T14-T17 cuando fueron administrados utilizando el inmunomodulador AA0029, encontrándose altos niveles de IL-4 e IL-5. Por otro lado, los péptidos B5, T15 y T16 indujeron altos niveles de IFN- γ . También encontramos péptidos que indujeron altos niveles tanto de IFN- γ como de IL-4, como el B5 y T15 y otros como el B5 y el T16 indujeron altos niveles de IL-17. Sin embargo, el papel de esta citocina en conferir protección frente a *F. hepatica* no está muy bien entendido. En el modelo de esquistosomosis, la IL-17 ha sido asociada con una forma grave de la enfermedad (Rutitzky *et al* 2009).

En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos, es bien sabido que las células B son la principal fuente de producción de anticuerpos específicos contra patógenos multicelulares. Se cree que la respuesta de anticuerpos juega un importante papel en el control de la infección por *F. hepatica*, sin embargo poco se conoce acerca del fenotipo de las células B y su función en el diseño de una vacuna eficaz. En el presente estudio, nosotros encontramos que los péptidos que contienen epítomos B junto con el inmunomodulador AA0029 presentaron una mayor estimulación del fenotipo de células B (B-220). Este resultado está en concordancia con los mayores niveles de anticuerpos inducidos por estos péptidos tras su administración, comparado con los niveles de anticuerpos inducidos por los péptidos con epítomos T. Sin embargo, hay que dejar constancia de que la respuesta de anticuerpos resultó más eficaz cuando se utilizó PAL.

Las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ también juegan un papel importante en la generación de inmunidad protectora frente a helmintos. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales se ejerce tal papel protector no están del todo esclarecidos. Nosotros encontramos que los péptidos que contienen epítomos T estimularon mejor las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ que aquellos con epítomos B. Específicamente, solamente los péptidos T14 y B11 indujeron la estimulación de linfocitos T CD4⁺, utilizando los inmunomoduladores PAL y AA0029, respectivamente. Solamente el péptido B1 indujo altos niveles de linfocitos T CD8⁺. Este comportamiento es similar al observado en una infección natural donde la inmunosupresión/inmunoregulación es uno de los principales mecanismos que utilizan los helmintos para su supervivencia en el hospedador definitivo, induciendo una disminución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Maizels *et al* 2003). Otros estudios han demostrado que la catepsina L de *F. hepatica* induce una regulación negativa de linfocitos T CD4⁺ sobre la superficie de células T humanas (Prowse *et al* 2002). En ovejas infectadas con *F. hepatica* también se ha demostrado una disminución en la proliferación de linfocitos T. Otros autores han sugerido que existe una migración de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ desde nódulos linfáticos mesentéricos hasta el sitio de exposición del antígeno, encontrándose linfocitos T CD8⁺ en zonas fibróticas del hígado durante la fase crónica de la infección (McCole *et al* 1999).

Las células T de memoria, tanto las de memoria central como las efectoras y que expresan los marcadores CD197⁺ (CCR7) y CD62L⁺ también juegan un papel importante en la inmunoregulación y supervivencia de parásitos helmintos en el hospedador definitivo (Totte *et al* 2010, Taylor *et al* 2012). En el modelo de leishmaniosis se ha sugerido la mayor implicación de las células T de memoria central sobre las efectoras en el establecimiento de inmunidad mantenida en el tiempo. Las células T de memoria central se producen y se mantienen aún cuando el parásito es eliminado, mientras que las células T de memoria efectoras no se mantienen tras la eliminación del parásito (Zaph *et al* 2004). En el modelo murino de malaria también se ha descrito la importancia de las células T de memoria central y efectoras en la protección frente a la infección experimental (Reyes-Sandoval *et al* 2011).

En cuanto a linfocitos B de memoria, su implicación en la generación y mantenimiento de memoria inmunológica contra patógenos también ha sido descrito (Hendriks *et al* 2000, Mauri y Bosma 2012). Sin embargo, en la infección por *F. hepatica* poco ha sido descrito acerca de este fenotipo celular. En el presente estudio encontramos un aumento en los niveles de CD62L⁺ en ratones inmunizados con los péptidos T, empleando tanto el inmunomodulador AA0029 como el PAL, mientras que los niveles de CD197⁺ se vieron aumentados en ratones inmunizados con los péptidos B utilizando el inmunomodulador PAL. También encontramos mayores niveles de CD27⁺ en ratones inmunizados con los péptidos con epítomos T, comparado con aquellos que fueron inmunizados con los péptidos con epítomos B.

De manera resumida, hemos demostrado la generación de una amplia, variada y específica respuesta inmunitaria en ratones inmunizados con los péptidos sintéticos que contienen epítomos B y T, formulados en el sistema ADAD de vacunación utilizando un inmunomodulador sintético y uno natural. En algunos casos los péptidos indujeron una respuesta similar a la producida por una infección natural y otras veces se obtuvo una respuesta completamente diferente. Este hecho puede resultar de especial interés en futuros ensayos de protección donde la inducción de una respuesta inmune determinada puede ser producida por los péptidos sintéticos o combinaciones de ellos a fin de obtener mejores propuestas protectoras.

Debido a que en la infección producida por *F. hepatica* no se conoce exhaustivamente los mecanismos inmunológicos involucrados en la generación de la respuesta inmune protectora, nosotros identificamos y seleccionamos péptidos que indujeran diferentes respuestas. De esta forma identificamos el péptido T15 que indujo una respuesta del tipo Th1, los péptidos B6 y T14 que indujeron una respuesta Th2 y el péptido B2 con una respuesta Th10. Algunos péptidos indujeron respuesta variada, como es el caso de los péptidos B1 y T16, con respuestas Th1/Th2 y el péptido B5 que presentó respuestas del tipo Th1/Th2/Th10 y Th17. En cuanto a la respuesta de anticuerpos, seleccionamos péptidos altamente inmunogénicos, como lo son el B1, B2, B5, B6, T14 y T15 y de acuerdo a la respuesta de subpoblaciones linfocitarias, el péptido T14 indujo cambios en LT CD8⁺, los péptidos B2, B5 y B6 en LB B220⁺ y el péptido T16 en LT CD27⁺. En lo concerniente a LT memoria, los péptidos T15 y T16 produjeron cambios en LT CD62L⁺, y los péptidos B1, B5 y T14 lo hicieron en LT CD197⁺. Por esta razón nosotros seleccionamos los péptidos mencionados anteriormente (B1, B2, B5, B6, T14, T15, T16) para evaluar su eficacia protectora frente a la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica* en modelo murino. Intentamos de esta forma abarcar el mayor número de posibilidades de generación de respuesta inmunológica, con el fin de intentar establecer alguna relación con la protección.

En la segunda parte de este estudio evaluamos la eficacia protectora de los péptidos seleccionados de acuerdo a la respuesta inmune inducida. Además, estudiamos el efecto que tiene en la protección la combinación de péptidos de acuerdo a su respuesta inmunológica. Nosotros demostramos que la inmunización de ratones CD1 con los péptidos sintéticos que contienen epítomos B y T, formulados en el sistema ADAD de vacunación con el inmunomodulador AA0029 confiere protección parcial frente a la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica*, basados en niveles de supervivencia, disminución de la carga parasitaria y daño hepático producido.

La mayoría de los trabajos recientes en los que se evalúa la eficacia protectora frente a *F. hepatica* han sido llevados a cabo utilizando antígenos recombinantes, proteínas purificadas del parásito, productos de excreción/secreción del parásito y vacunas de ADN (Buffoni *et al* 2012, Wedrychowicz *et al* 2003, 2007, Zafra *et al* 2013).

Sin embargo, poco se ha investigado en el desarrollo de vacunas contra *F. hepatica* basadas en subunidades peptídicas y sintetizadas químicamente (Vilar *et al* 2003, Harmsen *et al* 2004). En infecciones causadas por helmintos, aunque los trabajos sobre vacunas

basados en el empleo de péptidos sintéticos sigue siendo limitado, se han realizado ensayos de protección en nematodos como *T. spiralis* y *B. malayi* (Robinson *et al* 1995, McGuire *et al* 2002), en los cestodos *T. solium* y *E. granulosus* (Woollard *et al* 2000, de Aluja *et al* 2005) y frente al trematodo *S. mansoni* (Vilar *et al* 2003, El-Ridi *et al* 2004), con resultados prometedores. Como se mencionó en apartados anteriores, muchas son las ventajas en el desarrollo de vacunas anti-helmínticas basadas en péptidos sintéticos, ya que son fáciles de producir, baratas, independientes de organismos vivos, de mayor estabilidad y de menor riesgo respecto a efectos secundarios, que otras vacunas (Ben-Yedidia y Arnon 1997, van der Burg *et al* 2006).

En el presente estudio, la inmunización de ratones CD1 con los péptidos sintéticos seleccionados confirió protección frente a la infección experimental entre el 57.1% y el 71.4%, comparado con aquellos animales que no recibieron ningún tratamiento y que fueron infectados bajo las mismas condiciones experimentales. La combinación de péptidos T14, T15 y T16 indujo los mayores niveles de supervivencia, soportando nuestra hipótesis de que una vacuna con múltiples epítomos es necesaria para obtener mejores niveles de protección. La mayor reducción en la carga parasitaria se encontró en el grupo de ratones inmunizados con el péptido individual B5 (67%), así como con los péptidos individuales B2, T14 y T16 y con la combinación de péptidos que contienen epítomos B y T, donde se obtuvo un 57% de reducción comparado con el grupo control.

Encontramos además, una reducción significativa en la magnitud del daño hepático en el grupo de ratones inmunizados con la combinación de péptidos T14, T15 y T16, demostrando nuevamente el enorme potencial de una vacuna contra *F. hepatica* basada en el empleo de subunidades peptídicas. Con el fin de investigar alguna relación existente entre la respuesta inmune inducida en ratones inmunizados e infectados y la protección, se analizaron los niveles de anticuerpos y citocinas en los grupos de ratones que presentaron los mayores porcentajes de supervivencia.

En la infección con *F. hepatica* se obtienen mayores niveles de IgG1 que de IgG2a y niveles muy bajos de IgM. Además, se han correlacionado altos niveles de IgG2a con protección y reducción en la carga parasitaria (Clery *et al* 1996, Mulcahy *et al* 1998, Raadsma *et al* 2007). En nuestro estudio encontramos mayores niveles de IgG2a en los ratones que presentaron los mayores niveles de supervivencia. Sin embargo, no detectamos una correlación significativa entre los niveles de IgG2a y el porcentaje de protección. Observamos que la respuesta inmune en los ratones inmunizados con los péptidos sintéticos e infectados con metacercarias de *F. hepatica* fue diferente que aquella inducida en ratones que fueron solamente infectados, demostrando la existencia de una modulación de la respuesta inmunitaria tras la inmunización.

En infecciones por parásitos helmintos se ha hecho una asociación con la IgE y su papel en la protección también ha sido puesto de manifiesto, particularmente frente a nematodos intestinales en los cuales el alto número de eosinófilos se ha relacionado con niveles de IgE (Bell 1996). En esquistosomosis humana se ha demostrado que la disminución en la carga parasitaria ha sido asociada con los niveles de IgE y que la administración de anticuerpos monoclonales del tipo IgE inducen protección (Verwaerde *et al* 1987, Dunne *et al* 1992).

Nosotros encontramos mayores niveles de IgE en el grupo de ratones inmunizados con la combinación de péptidos que contienen epítomos T, comparados con el grupo control de infección. Sin embargo, no encontramos evidencia experimental que correlacione los niveles de IgE con protección en los ratones inmunizados.

En cuanto a los niveles de citocinas, ya hemos mencionado anteriormente que los máximos niveles de IFN- γ se producen en la fase aguda de la infección y que posteriormente existe una inmunomodulación de la respuesta inmunitaria del hospedador que trae como consecuencia la adaptación y supervivencia del parásito, generando una respuesta del tipo Th2 (Allen y Maizels 2011, McSorley *et al* 2013). En el grupo de ratones inmunizados con el péptido B2 y con la combinación de péptidos con epítomos T se encontraron niveles de IFN- γ y menores a los producidos por los ratones del grupo control de infección. Es evidente entonces que la inmunización de ratones con los péptidos sintéticos produce un cambio en la respuesta inmunológica propia de la infección, favoreciendo la protección del hospedador.

Por otro lado, encontramos mayores niveles de IL-4 en los ratones inmunizados y protegidos, comparado con el grupo control de infección. Además, también encontramos una correlación negativa entre los niveles de IL-4 y de IFN- γ en los ratones protegidos, lo cual nos da información acerca de las implicaciones de las respuestas del tipo Th2 y Th1 en la inducción de protección contra *F. hepatica*, por lo menos en el modelo murino.

Aparte de la implicación de las respuestas del tipo Th1/Th2 en protección frente a *F. hepatica*, nuestros resultados indican que las respuestas de los tipos Treg (IL-10) y Th17 (IL-17) también están asociadas con protección. Según estudios previos, estas citocinas tienen un importante papel en la regulación de la respuesta inmune y también en minimizar la patología y la reparación de los tejidos durante las infecciones por helmintos (Anthony *et al* 2007). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales se controla la patología siguen sin estar aclarados. Algunos estudios han encontrado que existe una correlación negativa entre los niveles de IL-10 y la carga parasitaria en *F. hepatica*. Además, en infecciones con *S. mansoni* se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de IL-17 y la inmunopatología (Belkaid *et al* 2006, Belkaid 2007, Hacariz *et al* 2009, van de Veerdonk *et al* 2009). Nosotros encontramos mayores niveles de las citocinas IL-10 e IL-17 en los ratones inmunizados y que obtuvieron los mayores niveles de protección. Sin embargo, no encontramos una correlación estadísticamente significativa con la supervivencia, carga parasitaria o daño hepático.

Cuando estudiamos el efecto de la vacuna en las rutas metabólicas y en la expresión diferencial de genes, encontramos que el proceso de inmunización afecta significativamente una gran cantidad de genes que están involucrados en diversas funciones asociadas con la respuesta inmunológica, así como de diversas rutas de señalización celular. La mayoría de los genes que cambiaron su expresión diferencial lo hicieron de forma negativa, es decir, por debajo del umbral de expresión de los genes estudiados en animales sanos. La información de la literatura es escasa en cuanto a experimentos de inmunización y análisis de expresión génica mediante el uso de *microarrays* en infecciones por helmintos. No obstante, la mayoría de los estudios están

realizados en modelos de infección, principalmente en modelos murinos de esquistosomosis (Burke *et al* 2010a, Burke *et al* 2010b, Jiang *et al* 2010). En *F. hepatica* se ha descrito el uso de la tecnología de *microarrays* para evaluar la respuesta inmune en ratas inmunizadas con un antígeno candidato a vacuna (fosfoglicerato quinasa) e infectadas experimentalmente con metacercarias de *F. hepatica*. Sin embargo, en dicho estudio no se encontraron cambios en los niveles de IFN- γ e IL-4 en ratas inmunizadas. Por el contrario, los niveles de IL-12 α , TNF- α , FasL, CD40 y TRAF3 se vieron aumentados, mientras que los niveles de IL-1 α disminuyeron (Wesolowska *et al* 2013b).

En nuestro estudio, las rutas de señalización que se vieron más afectadas como resultado de la inmunización con la combinación de los péptidos T14, T15 y T16 y que presentaban al menos un gen sobreexpresado fueron: *i*). Producción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (gen S100A8); *ii*). Señalización de IL-12 y producción en macrófagos (gen S100A8) y; *iii*). Señalización de IL-8. Estas rutas de señalización son de gran importancia en infecciones parasitarias (genes MMP9 y CXCR2).

El óxido nítrico es un componente esencial en la respuesta inmune efectora (Bodgan 2001). Su papel ha sido ampliamente estudiado en infecciones parasitarias causadas por protozoos, como por ejemplo malaria, leishmaniosis y toxoplasmosis, donde se ha observado su implicación en la muerte del parásito y en la inhibición del crecimiento en el hospedador definitivo. Sin embargo, su producción puede inducir alteraciones o daños en las células del hospedador, como por ejemplo alteraciones en la función neurológica en la malaria cerebral o a nivel intestinal en infecciones con *Trichinella* spp (Brunet 2001).

En la infección producida por *S. mansoni*, la producción de óxido nítrico puede ser beneficiosa para el hospedador. El óxido nítrico interviene en la regulación de la inflamación producida por los huevos del parásito, previniendo el daño de los hepatocitos, la distribución del daño hepático en el hígado y la formación de granulomas (Brunet 2001). En *F. hepatica* se ha estudiado la producción de óxido nítrico en ratas infectadas. Se ha visto que en macrófagos peritoneales hay una disminución en la producción de óxido nítrico a los 7 y 14 días después de la infección. Esta disminución ha sido asociada con la liberación de los productos de excreción / secreción del parásito, los cuales inhiben la producción de óxido nítrico, lo cual es un sistema de defensa del parásito durante su migración por el peritoneo del hospedador definitivo. Esta hipótesis ha sido confirmada experimentalmente utilizando ensayos *in vitro* (Cervi *et al* 1998, Cervi *et al* 2001).

Por otra parte, IL-12 es una citocina inductora de respuestas tipo Th1 con producción de IFN- γ . Esta señalización es dependiente del factor de activación y transcripción STAT4. La IL-12 actúa de manera sinérgica con la IL-18 para aumentar la producción de óxido nítrico. También se ha visto que las subunidades asociadas a IL-12 y denominados IL12p40 e IL12p80 inducen la producción de TNF- α . En infecciones por helmintos, el papel de la IL-12 es muy importante ya que es un potente inhibidor de la respuesta del tipo Th2, que como se ha discutido con anterioridad es importante para la supervivencia del parásito en el hospedador definitivo (Bachmann y Jennings 2010).

En la infección causada por *S. mansoni* la IL-12 está asociada con una reducción en la inmunopatología y en la inducción de inmunidad protectora. En ratones inmunizados con la forma recombinante de la IL-12 (rIL-12) se observó un aumento en la producción de IFN- γ , con disminución de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. También se observó una reducción en los niveles de IgE e IgG1, mientras que hubo un aumento de los isotipos IgG2a e IgG2b, indicando claramente un predominio por respuestas tipo Th1. Además, se ha visto que esta citocina contribuye a la disminución en el número de eosinófilos en sangre y tejidos, los cuales son frecuentemente asociados a infecciones producidas por helmintos. Esta citocina es capaz de reducir la inmunopatología por una excesiva respuesta del tipo Th2 causada por microfilarias de *B. malayi* o por los huevos de *S. mansoni*, resultando beneficioso para el hospedador (Mountford y Pearlman 1998, Mountford *et al* 1998). En infecciones causadas por nematodos intestinales, la IL-12 no sería útil, ya que la protección está mediada por respuestas tipo Th2 (Finkelman *et al* 1997, Finkelman *et al* 1994). En *F. hepatica* se ha estudiado la secreción de IL-12 en células dendríticas estimuladas con proteínas recombinantes de los productos de excreción/secreción de *F. hepatica*, como lo son la catepsina L y la GST. Se ha visto que estas proteínas inhiben la diferenciación del fenotipo Th2, característico de la infección por *F. hepatica*.

En nuestro estudio encontramos una expresión diferencial positiva del gen S100A8 que se encuentra presente en las rutas de señalización de producción de óxido nítrico y producción de IL-12 por macrófagos. En estudios de *microarrays* en *S. japonicum* empleando un modelo murino, también encontraron aumento en la expresión del gen S100A8, el cual se asocia con la formación de granulomas y fibrosis (Burke *et al* 2010a).

La IL-8 pertenece a la familia de quimiocinas C-X-C, juega un papel importante en inflamación, angiogénesis y crecimiento de tumores. Los receptores de la superficie celular para IL-8 son CXCR1 y CXCR2, los cuales se encuentran expresados en diferentes tipos de células como neutrófilos, monocitos, células endoteliales y tumorales. En pacientes infectados con *S. mansoni*, se ha observado una baja frecuencia de CXCR1 y CXCR2 en la fase aguda de la enfermedad, pero altos niveles de IL-8 en plasma (Silveira-Lemos *et al* 2012). En otros helmintos se ha descrito su importancia en la activación de neutrófilos, los cuales generalmente están asociados con infiltrados de granulocitos (Falcone *et al* 2001). En nuestro estudio encontramos una sobreexpresión de los receptores de IL-8, CXCR1 y CXCR2, en ratones inmunizados con la combinación de péptidos T14, T15 y T16, lo cual nos puede sugerir que la inmunización de los ratones con estos antígenos induce la producción de IL-8. Sin embargo, no disponemos de evidencia experimental que soporte esta idea, como tampoco de su participación en conferir inmunidad protectora. En resumen, hemos presentado por primera vez el estudio del perfil transcripcional en esplenocitos de ratones inmunizados con un promisorio candidato a vacuna contra la fasciolosis. Se ha demostrado que hay un gran cambio en la expresión de genes de diversas rutas de señalización, las cuales están asociadas con la generación de diversos tipos de respuesta inmunitaria que pueden ser determinantes en inmunoprotección.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren el potencial inmunoprolífico de péptidos de síntesis química cuando se utilizan en combinación con el sistema ADAD de vacunación utilizando el inmunomodulador AA0029. Estos resultados claramente soportan nuestra hipótesis de que el uso de una vacuna multi-epitopo, basada en subunidades peptídicas químicamente sintetizadas produce mejores resultados de protección frente a la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica* que la inmunización con antígenos individuales. Sin embargo, un conocimiento más profundo en lo referente a las interacciones inmunológicas y moleculares entre el parásito y su hospedador que conllevan a la inducción de protección es necesaria para una mejor selección de antígenos candidatos a vacuna. Además, se requieren posteriores ensayos de inmunización y protección empleando modelos de fasciolosis natural para confirmar los resultados obtenidos en este estudio.

CONCLUSIONES

1. El uso de diferentes herramientas de bioinformática permitió la identificación de secuencias de aminoácidos de proteínas derivadas de *F. hepatica*, así como el posterior diseño de 24 péptidos; 12 con epítomos B y 12 con epítomos T, los cuales fueron sintetizados mediante procedimientos estandarizados de síntesis de péptidos en fase sólida.
2. La inmunización de ratones BALB/c con los péptidos sintéticos, formulados en el sistema ADAD de vacunación y el análisis pormenorizado de la respuesta inmune inducida permitió la selección del inmunomodulador AA0029, de siete péptidos pertenecientes a las moléculas amebaporo y catepsina B de *F. hepatica* como posibles candidatos a vacuna.
3. La inmunización de ratones CD1 con los péptidos seleccionados, ya sea de forma individual o en combinación, protegió parcialmente frente a la infección experimental con metacercarias de *F. hepatica*. La inmunización con los péptidos T14, T15 y T16 produjo los mejores resultados de protección, soportando nuestra idea de que el desarrollo de una vacuna contra *F. hepatica* debe estar basada en la combinación de subunidades peptídicas.
4. La formulación vacunal más efectiva indujo cambios en la expresión diferencial de genes en esplenocitos de ratones inmunizados, afectando principalmente a las rutas de señalización de producción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, señalización de IL-12 y producción en macrófagos y señalización de IL-8. Estos resultados nos pueden ayudar a establecer relaciones entre inmunidad y protección en *F. hepatica*, así como a esclarecer los mecanismos moleculares que median dicha protección.

BIBLIOGRAFÍA

- Aban, J. L., V. Ramajo, J. L. Arellano, A. Oleaga, G. V. Hillyer and A. Muro (1999). "A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/BL mice from challenge infection with *Schistosoma bovis*." *Vet Parasitol* **83**(2): 107-121.
- Abane, J. L., A. Oleaga, V. Ramajo, P. Casanueva, J. L. Arellano, G. V. Hillyer and A. Muro (2000). "Vaccination of mice against *Schistosoma bovis* with a recombinant fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica*." *Vet Parasitol* **91**(1-2): 33-42.
- Acosta, D., M. Cancela, L. Piacenza, L. Roche, C. Carmona and J. F. Tort (2008). "*Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis." *Mol Biochem Parasitol* **158**(1): 52-64.
- Adams, M. M., P. Damani, N. R. Perl, A. Won, F. Hong, P. O. Livingston, G. Ragupathi and D. Y. Gin (2010). "Design and synthesis of potent Quillaja saponin vaccine adjuvants." *J Am Chem Soc* **132**(6): 1939-1945.
- Ai, L., S. J. Dong, W. Y. Zhang, H. M. Elsheikha, Y. S. Mahmmod, R. Q. Lin, Z. G. Yuan, Y. L. Shi, W. Y. Huang and X. Q. Zhu (2010a). "Specific PCR-based assays for the identification of *Fasciola* species: their development, evaluation and potential usefulness in prevalence surveys." *Ann Trop Med Parasitol* **104**(1): 65-72.
- Ai, L., C. Li, H. M. Elsheikha, S. J. Hong, J. X. Chen, S. H. Chen, X. Li, X. Q. Cai, M. X. Chen and X. Q. Zhu (2010b). "Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay." *Vet Parasitol* **174**(3-4): 228-233.
- Al-Sherbiny, M., A. Osman, R. Barakat, H. El Morshedy, R. Bergquist and R. Olds (2003). "In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens." *Acta Trop* **88**(2): 117-130.
- Alasaad, S., R. C. Soriguer, M. Abu-Madi, A. El Behairy, M. J. Jowers, P. D. Banos, A. Piriz, J. Fickel and X. Q. Zhu (2011). "A TaqMan real-time PCR-based assay for the identification of *Fasciola* spp." *Vet Parasitol* **179**(1-3): 266-271.
- Allen, J. E. and R. M. Maizels (2011). "Diversity and dialogue in immunity to helminths." *Nat Rev Immunol* **11**(6): 375-388.
- Allen, J. E. and T. A. Wynn (2011). "Evolution of Th2 immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens." *PLoS Pathog* **7**(5): e1002003.
- Almeida, M. S., H. Torloni, P. Lee-Ho, M. M. Vilar, N. Thaumaturgo, A. J. Simpson and M. Tendler (2003). "Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14." *Parasite Immunol* **25**(3): 135-137.
- Alving, C. R., J. N. Verma, M. Rao, U. Krzych, S. Amselem, S. M. Green and N. M. Wassef (1992). "Liposomes containing lipid A as a potent non-toxic adjuvant." *Res Immunol* **143**(2): 197-198.
- Andrews, S. J. (1999). The Life Cycle of *Fasciola hepatica*. *FASCIOLOSIS*. J. P. Dalton, CABI: 1-43.
- Anthony, R. M., L. I. Rutitzky, J. F. Urban, Jr., M. J. Stadecker and W. C. Gause (2007). "Protective immune mechanisms in helminth infection." *Nat Rev Immunol* **7**(12): 975-987.
- Arnon, R., R. Tarrab-Hazdai and M. Steward (2000). "A mimotope peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*: synthesis and characterization." *Immunology* **101**(4): 555-562.
- Arnon, R. (2011). Overview of Vaccine Strategies. *Vaccine Design: Innovative Approaches and Novel Strategies*. R. Rappuoli and F. Bagnoli, Caister Academic Press.

- Artis, D., N. E. Humphreys, A. J. Bancroft, N. J. Rothwell, C. S. Potten and R. K. Grencis (1999). "Tumor necrosis factor alpha is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection." *J Exp Med* **190**(7): 953-962.
- Bacq, Y., J. M. Besnier, T. H. Duong, G. Pavie, E. H. Metman and P. Choutet (1991). "Successful treatment of acute fascioliasis with bithionol." *Hepatology* **14**(6): 1066-1069.
- Barton, G. M. and J. C. Kagan (2009). "A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization." *Nat Rev Immunol* **9**(8): 535-542.
- Belkaid, Y., R. B. Blank and I. Suffia (2006). "Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis." *Immunol Rev* **212**: 287-300.
- Belkaid, Y. (2007). "Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity." *Nat Rev Immunol* **7**(11): 875-888.
- Bell, R. G. (1996). "IgE, allergies and helminth parasites: a new perspective on an old conundrum." *Immunol Cell Biol* **74**(4): 337-345.
- Ben-Yedidia, T. and R. Arnon (1997). "Design of peptide and polypeptide vaccines." *Curr Opin Biotechnol* **8**(4): 442-448.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne and S. Brunak (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." *J Mol Biol* **340**(4): 783-795.
- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. ." *J. R. Statist. Soc. B* **57**(1): 289-300.
- Berasain, P., F. Goni, S. McGonigle, A. Dowd, J. P. Dalton, B. Frangione and C. Carmona (1997). "Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components." *J Parasitol* **83**(1): 1-5.
- Berasain, P., C. Carmona, B. Frangione, J. P. Dalton and F. Goni (2000). "*Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced." *Exp Parasitol* **94**(2): 99-110.
- Berriman, M., B. J. Haas, P. T. LoVerde, R. A. Wilson, G. P. Dillon, G. C. Cerqueira, S. T. Mashiyama, B. Al-Lazikani, L. F. Andrade, P. D. Ashton, M. A. Aslett, D. C. Bartholomeu, G. Blandin, C. R. Caffrey, A. Coghlan, R. Coulson, T. A. Day, A. Delcher, R. DeMarco, A. Djikeng, T. Eyre, J. A. Gamble, E. Ghedin, Y. Gu, C. Hertz-Fowler, H. Hirai, Y. Hirai, R. Houston, A. Ivens, D. A. Johnston, D. Lacerda, C. D. Macedo, P. McVeigh, Z. Ning, G. Oliveira, J. P. Overington, J. Parkhill, M. Perlea, R. J. Pierce, A. V. Protasio, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, M. Sajid, S. L. Salzberg, M. Stanke, A. R. Tivey, O. White, D. L. Williams, J. Wortman, W. Wu, M. Zamanian, A. Zerlotini, C. M. Fraser-Liggett, B. G. Barrell and N. M. El-Sayed (2009). "The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*." *Nature* **460**(7253): 352-358.
- Bharali, D. J., V. Pradhan, G. Elkin, W. Qi, A. Hutson, S. A. Mousa and Y. Thanavala (2008). "Novel nanoparticles for the delivery of recombinant hepatitis B vaccine." *Nanomedicine* **4**(4): 311-317.
- Bodewes, R., J. H. Kreijtz, G. van Amerongen, M. M. Geelhoed-Mieras, R. J. Verburgh, J. G. Heldens, J. Bedwell, J. M. van den Brand, T. Kuiken, C. A. van Baalen, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus and G. F. Rimmelzwaan (2010). "A single immunization with CoVaccine HT-adjuvanted H5N1 influenza virus vaccine induces protective cellular and humoral immune responses in ferrets." *J Virol* **84**(16): 7943-7952.

- Bolstad, B. M., R. A. Irizarry, M. Astrand and T. P. Speed (2003). "A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias." *Bioinformatics* **19**(2): 185-193.
- Boray, J. C., R. Jackson and M. B. Strong (1985). "Chemoprophylaxis of fascioliasis with triclabendazole." *N Z Vet J* **33**(11): 182-185.
- Boukli, N. M., B. Delgado, M. Ricaurte and A. M. Espino (2011). "Fasciola hepatica and Schistosoma mansoni: identification of common proteins by comparative proteomic analysis." *J Parasitol* **97**(5): 852-861.
- Brady, M. T., S. M. O'Neill, J. P. Dalton and K. H. Mills (1999). "Fasciola hepatica suppresses a protective Th1 response against Bordetella pertussis." *Infect Immun* **67**(10): 5372-5378.
- Brennan, G. P., I. Fairweather, A. Trudgett, E. Hoey, McCoy, M. McConville, M. Meaney, M. Robinson, N. McFerran, L. Ryan, C. Lanusse, L. Mottier, L. Alvarez, H. Solana, G. Virkel and P. M. Brophy (2007). "Understanding triclabendazole resistance." *Exp Mol Pathol* **82**(2): 104-109.
- Brockwell, Y. M., T. P. Elliott, G. R. Anderson, R. Stanton, T. W. Spithill and N. C. Sangster (2014). "Confirmation of Fasciola hepatica resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle." *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **4**(1): 48-54.
- Brophy, P. M. and D. I. Pritchard (1994). "Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy." *Exp Parasitol* **79**(1): 89-96.
- Brunet, L.R., D.W. Dunne and E.J. Pearce (1998). "Cytokine interaction and immune responses during Schistosoma mansoni infection." *Parasitol Today* **14**(10): 422-427.
- Brunet, L.R., M.A. Kopf and E.J. Pearce (1999). "Schistosoma mansoni: IL-4 is necessary for concomitant immunity in mice." *J Parasitol* **85**(4): 734-736.
- Brunet, L. R. (2001). "Nitric oxide in parasitic infections." *Int Immunopharmacol* **1**(8): 1457-1467.
- Buffoni, L., F. J. Martinez-Moreno, R. Zafra, R. E. Mendes, A. Perez-Ecija, M. Sekiya, G. Mulcahy, J. Perez and A. Martinez-Moreno (2012). "Humoral immune response in goats immunised with cathepsin L1, peroxiredoxin and Sm14 antigen and experimentally challenged with Fasciola hepatica." *Vet Parasitol* **185**(2-4): 315-321.
- Buonaguro, L., M. Tagliamonte, M. L. Tornesello and F. M. Buonaguro (2011a). "Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer." *Expert Rev Vaccines* **10**(11): 1569-1583.
- Buonaguro, L., A. Petrizzo, M. L. Tornesello and F. M. Buonaguro (2011b). "Translating tumor antigens into cancer vaccines." *Clin Vaccine Immunol* **18**(1): 23-34.
- Burke, M. L., D. P. McManus, G. A. Ramm, M. Duke, Y. Li, M. K. Jones and G. N. Gobert (2010a). "Co-ordinated gene expression in the liver and spleen during Schistosoma japonicum infection regulates cell migration." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(5): e686.
- Burke, M. L., D. P. McManus, G. A. Ramm, M. Duke, Y. Li, M. K. Jones and G. N. Gobert (2010b). "Temporal expression of chemokines dictates the hepatic inflammatory infiltrate in a murine model of schistosomiasis." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(2): e598.
- Caban-Hernandez, K. and A. M. Espino (2013). "Differential expression and localization of saposin-like protein 2 of Fasciola hepatica." *Acta Trop* **128**(3): 591-597.

- Caban-Hernandez, K., J. F. Gaudier, C. Ruiz-Jimenez and A. M. Espino (2013). "Development of Two Antibody-Detection ELISAs for Serodiagnosis of Human Chronic Fascioliasis." J Clin Microbiol.
- Campbell, N. J. and M. D. Brotowidjoyo (1975). "The efficiency of clixonide and rafoxanide against *Fasciola hepatica* in sheep by different routes of administration." Aust Vet J **51**(11): 500-503.
- Cardoso, F. C., G. C. Macedo, E. Gava, G. T. Kitten, V. L. Mati, A. L. de Melo, M. V. Caliar, G. T. Almeida, T. M. Venancio, S. Verjovski-Almeida and S. C. Oliveira (2008). "Schistosoma mansoni tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection." PLoS Negl Trop Dis **2**(10): e308.
- Carmona, C., A. J. Dowd, A. M. Smith and J. P. Dalton (1993). "Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles." Mol Biochem Parasitol **62**(1): 9-17.
- Cervi, L., G. Rossi, H. Cejas and D. T. Masih (1998). "Fasciola hepatica-induced immune suppression of spleen mononuclear cell proliferation: role of nitric oxide." Clin Immunol Immunopathol **87**(2): 145-154.
- Chapman, C. B. and G. F. Mitchell (1982). "Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*." Vet Parasitol **11**(2-3): 165-178.
- Chen, M. G. and K. E. Mott (1990). "Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: A review of recent literature." Trop. Dis. Bull. **87**(4): 38.
- Chensue, S. W., K. S. Warmington, J. H. Ruth, P. S. Sanghi, P. Lincoln and S. L. Kunkel (1996). "Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production." J Immunol **157**(10): 4602-4608.
- Christensen, D., K. S. Korsholm, P. Andersen and E. M. Agger (2011). "Cationic liposomes as vaccine adjuvants." Expert Rev Vaccines **10**(4): 513-521.
- Clery, D., P. Torgerson and G. Mulcahy (1996). "Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*." Vet Parasitol **62**(1-2): 71-82.
- Cohen, J., S. Benns, J. Vekemans and A. Leach (2010). "[The malaria vaccine candidate RTS,S/AS is in phase III clinical trials]." Ann Pharm Fr **68**(6): 370-379.
- Coles, G. C. and K. A. Stafford (2001). "Activity of oxyclozanide, nitroxynil, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*." Vet Rec **148**(23): 723-724.
- Cordova, M., P. Herrera, L. Nopo, J. Bellatin, C. Naquira, H. Guerra and J. R. Espinoza (1997). "Fasciola hepatica cysteine proteinases: immunodominant antigens in human fascioliasis." Am J Trop Med Hyg **57**(6): 660-666.
- Curtale, F., E. S. Hammoud, A. El Wakeel, S. Mas-Coma and L. Savioli (2000). "Human fascioliasis, an emergent public health problem in the Nile Delta, Egypt." Research and Reviews in Parasitology **60**(129-134).
- Curtale, F., Y. A. E. W. Hassanein, A. El Wakeel, S. Mas-Coma and A. Montresor (2003). "Distribution of human fascioliasis by age and gender among rural population in the Nile Delta, Egypt." Journal of Tropical Pediatrics **49**(264-268).
- da Hora, V. P., F. R. Conceicao, O. A. Dellagostin and D. L. Doolan (2011). "Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants." Vaccine **29**(8): 1538-1544.

- Dale, J. B. and E. H. Beachey (1982). "Protective antigenic determinant of streptococcal M protein shared with sarcolemmal membrane protein of human heart." *J Exp Med* **156**(4): 1165-1176.
- Dalton, J. P. and M. Heffernan (1989). "Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*." *Mol Biochem Parasitol* **35**(2): 161-166.
- Dalton, J. P., S. McGonigle, T. P. Rolph and S. J. Andrews (1996). "Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin." *Infect Immun* **64**(12): 5066-5074.
- Dalton, J. P., S. O. Neill, C. Stack, P. Collins, A. Walshe, M. Sekiya, S. Doyle, G. Mulcahy, D. Hoyle, E. Khaznadji, N. Moire, G. Brennan, A. Mousley, N. Kreshchenko, A. G. Maule and S. M. Donnelly (2003). "*Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines." *Int J Parasitol* **33**(11): 1173-1181.
- Dalton, J. P., M. W. Robinson, G. Mulcahy, S. M. O'Neill and S. Donnelly (2013). "Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development." *Vet Parasitol* **195**(3-4): 272-285.
- Dawes, B. (2011). The Phylum Platyhelminthes. *The Trematoda*, Cambridge University Press: 1-24.
- de Aluja, A. S., N. M. Villalobos, G. Nava, A. Toledo, J. J. Martinez, A. Plancarte, L. F. Rodarte, G. Fragoso and E. Sciuotto (2005). "Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs." *Vaccine* **23**(31): 4062-4069.
- del Olmo, E., A. Plaza, A. Muro, A. R. Martinez-Fernandez, J. J. Nogal-Ruiz, J. L. Lopez-Perez and A. S. Feliciano (2006). "Synthesis and evaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators." *Bioorg Med Chem Lett* **16**(23): 6091-6095.
- Deleage, G., C. Combet, C. Blanchet and C. Geourjon (2001). "ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities." *Comput Biol Med* **31**(4): 259-267.
- Descamps, D., K. Hardt, B. Spiessens, P. Izurieta, T. Verstraeten, T. Breuer and G. Dubin (2009). "Safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine for cervical cancer prevention: a pooled analysis of 11 clinical trials." *Hum Vaccin* **5**(5): 332-340.
- Dey, A. K. and I. K. Srivastava (2011). "Novel adjuvants and delivery systems for enhancing immune responses induced by immunogens." *Expert Rev Vaccines* **10**(2): 227-251.
- Donnelly, S., S. M. O'Neill, M. Sekiya, G. Mulcahy and J. P. Dalton (2005). "Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages." *Infect Immun* **73**(1): 166-173.
- Donnelly, S., C. M. Stack, S. M. O'Neill, A. A. Sayed, D. L. Williams and J. P. Dalton (2008). "Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages." *Faseb J* **22**(11): 4022-4032.
- Dowling, D. J., C. M. Hamilton, S. Donnelly, J. La Course, P. M. Brophy, J. Dalton and S. M. O'Neill (2010). "Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses." *Infect Immun* **78**(2): 793-801.
- Dunne, D. W., A. E. Butterworth, A. J. Fulford, H. C. Kariuki, J. G. Langley, J. H. Ouma, A. Capron, R. J. Pierce and R. F. Sturrock (1992). "Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection." *Eur J Immunol* **22**(6): 1483-1494.

- Duthaler, U., T. A. Smith and J. Keiser (2010). "In vivo and in vitro sensitivity of *Fasciola hepatica* to triclabendazole combined with artesunate, artemether, or OZ78." Antimicrob Agents Chemother **54**(11): 4596-4604.
- Eckhardt, T. and H. Heckers (1981). "Treatment of human fascioliasis with niclofolan." Gastroenterology **81**(4): 795-798.
- Eisenbarth, S. C., O. R. Colegio, W. O'Connor, F. S. Sutterwala and R. A. Flavell (2008). "Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants." Nature **453**(7198): 1122-1126.
- El Ridi, R., M. Montash and H. Tallima (2004). "Immunogenicity and vaccine potential of dipeptidic multiple antigen peptides from *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase." Scand J Immunol **60**(4): 392-402.
- el-Aziz, M. M., A. A. Ghazy and M. M. Effat (2001). "Immunodiagnosis of bovine fasciolosis using *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens ELISA." J Egypt Soc Parasitol **31**(1): 327-334.
- Ellis, R. D., G. E. Mullen, M. Pierce, L. B. Martin, K. Miura, M. P. Fay, C. A. Long, D. Shaffer, A. Saul, L. H. Miller and A. P. Durbin (2009). "A Phase 1 study of the blood-stage malaria vaccine candidate AMA1-C1/Alhydrogel with CPG 7909, using two different formulations and dosing intervals." Vaccine **27**(31): 4104-4109.
- Espino, A. M., B. E. Dumenigo, R. Fernandez and C. M. Finlay (1987). "Immunodiagnosis of human fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay using excretory-secretory products." Am J Trop Med Hyg **37**(3): 605-608.
- Espino, A. M. and C. M. Finlay (1994). "Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in humans with fascioliasis." J Clin Microbiol **32**(1): 190-193.
- Espino, A. M., A. Osuna, R. Gil and G. V. Hillyer (2005). "*Fasciola hepatica*: humoral and cytokine responses to a member of the saposin-like protein family following delivery as a DNA vaccine in mice." Exp Parasitol **110**(4): 374-383.
- Esteban, J. G., A. Flores, R. Angles, W. Strauss, C. Aguirre and S. Mas-Coma (1997). "A population-based coprological study of human fascioliasis in a hyperendemic area of the Bolivian Altiplano." Trop Med Int Health **2**(7): 695-699.
- Esteban, J. G., C. Gonzalez, M. D. Barges, R. Angles, C. Sanchez, C. Naquira and S. Mas-Coma (2002). "High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru." Trop Med Int Health **7**(4): 339-348.
- Fairweather, I. (2005). "Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma." J Helminthol **79**(3): 227-234.
- Falcone, F. H., A. G. Rossi, R. Sharkey, A. P. Brown, D. I. Pritchard and R. M. Maizels (2001). "Ascaris suum-derived products induce human neutrophil activation via a G protein-coupled receptor that interacts with the interleukin-8 receptor pathway." Infect Immun **69**(6): 4007-4018.
- Farias, L. P., F. C. Cardoso, P. A. Miyasato, B. O. Montoya, C. A. Tararam, H. K. Roffato, T. Kawano, A. Gazzinelli, R. Correa-Oliveira, P. S. Coulson, R. A. Wilson, S. C. Oliveira and L. C. Leite (2010). "*Schistosoma mansoni* Stomatin like protein-2 is located in the tegument and induces partial protection against challenge infection." PLoS Negl Trop Dis **4**(2): e597.
- Figueroa-Santiago, O., B. Delgado and A. M. Espino (2011). "*Fasciola hepatica* saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis." Diagn Microbiol Infect Dis **70**(3): 355-361.

- Finkelman, F. D., K. B. Madden, A. W. Cheever, I. M. Katona, S. C. Morris, M. K. Gately, B. R. Hubbard, W. C. Gause and J. F. Urban, Jr. (1994). "Effects of interleukin 12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites." *J Exp Med* **179**(5): 1563-1572.
- Finkelman, F. D., T. Shea-Donohue, J. Goldhill, C. A. Sullivan, S. C. Morris, K. B. Madden, W. C. Gause and J. F. Urban, Jr. (1997). "Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models." *Annu Rev Immunol* **15**: 505-533.
- Flynn, R. J. and G. Mulcahy (2008). "The roles of IL-10 and TGF-beta in controlling IL-4 and IFN-gamma production during experimental *Fasciola hepatica* infection." *Int J Parasitol* **38**(14): 1673-1680.
- Flynn, R. J., G. Mulcahy, M. Welsh, J. P. Cassidy, D. Corbett, C. Milligan, P. Andersen, S. Strain and J. McNair (2009). "Co-Infection of cattle with *Fasciola hepatica* and *Mycobacterium bovis*- immunological consequences." *Transbound Emerg Dis* **56**(6-7): 269-274.
- Fox, J. G., P. Beck, C. A. Dangler, M. T. Whary, T. C. Wang, H. N. Shi and C. Nagler-Anderson (2000). "Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy." *Nat Med* **6**(5): 536-542.
- Galaktionov, K. V. and A. Dobrovolskij (2004). The trematode life cycle as a system of adaptations. *The Biology and Evolution of Trematodes*, Kluwer Academic Publishers: 215-258.
- Garcon, N., P. Chomez and M. Van Mechelen (2007). "GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives." *Expert Rev Vaccines* **6**(5): 723-739.
- Gause, W. C., J. F. Urban, Jr. and M. J. Stadecker (2003). "The immune response to parasitic helminths: insights from murine models." *Trends Immunol* **24**(5): 269-277.
- Gerin, J. L., H. Alexander, J. W. Shih, R. H. Purcell, G. Dapolito, R. Engle, N. Green, J. G. Sutcliffe, T. M. Shinnick and R. A. Lerner (1983). "Chemically synthesized peptides of hepatitis B surface antigen duplicate the d/y specificities and induce subtype-specific antibodies in chimpanzees." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(8): 2365-2369.
- Golden, O., R. J. Flynn, C. Read, M. Sekiya, S. M. Donnelly, C. Stack, J. P. Dalton and G. Mulcahy (2010). "Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1)." *Vaccine* **28**(34): 5551-5557.
- Goldinger, S. M., R. Dummer, P. Baumgaertner, D. Mihic-Probst, K. Schwarz, A. Hammann-Haenni, J. Willers, C. Geldhof, J. O. Prior, T. M. Kundig, O. Michelin, M. F. Bachmann and D. E. Speiser (2012). "Nano-particle vaccination combined with TLR-7 and -9 ligands triggers memory and effector CD8(+) T-cell responses in melanoma patients." *Eur J Immunol* **42**(11): 3049-3061.
- Gonzales Santana, B., J. P. Dalton, F. Vasquez Camargo, M. Parkinson and M. Ndao (2013). "The diagnosis of human fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant cathepsin L protease." *PLoS Negl Trop Dis* **7**(9): e2414.
- Gunn, A. and S. Jane (2012). Helminth Parasites. *Parasitology: An Integrated Approach*, Wiley: 86-114.
- Hacariz, O., G. Sayers, R. J. Flynn, A. Lejeune and G. Mulcahy (2009). "IL-10 and TGF-beta1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep." *Parasite Immunol* **31**(10): 613-622.

- Hacariz, O., G. Sayers and A. T. Baykal (2012). "A proteomic approach to investigate the distribution and abundance of surface and internal *Fasciola hepatica* proteins during the chronic stage of natural liver fluke infection in cattle." J Proteome Res **11**(7): 3592-3604.
- Hagan, P. (1993). "IgE and protective immunity to helminth infections." Parasite Immunol **15**(1): 1-4.
- Halton, D. W. (1967). "Observations on the nutrition of digenetic trematodes." Parasitology **57**(4): 639-660.
- Harari, I., A. Donohue-Rolfe, G. Keusch and R. Arnon (1988). "Synthetic peptides of Shiga toxin B subunit induce antibodies which neutralize its biological activity." Infect Immun **56**(6): 1618-1624.
- Harmsen, M. M., J. B. Cornelissen, H. E. Buijs, W. J. Boersma, S. H. Jeurissen and F. J. van Milligen (2004). "Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide." Int J Parasitol **34**(6): 675-682.
- Haroun, E. T. and G. V. Hillyer (1986). "Resistance to fascioliasis--a review." Vet Parasitol **20**(1-3): 63-93.
- Heath, A. W. (1995). "Cytokines as immunological adjuvants." Pharm Biotechnol **6**: 645-658.
- Hendriks, J., L. A. Gravestien, K. Tesselaar, R. A. van Lier, T. N. Schumacher and J. Borst (2000). "CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity." Nat Immunol **1**(5): 433-440.
- Hernandez-Gonzalez, A., M. L. Valero, M. S. del Pino, A. Oleaga and M. Siles-Lucas (2010). "Proteomic analysis of in vitro newly excysted juveniles from *Fasciola hepatica*." Mol Biochem Parasitol **172**(2): 121-128.
- Hill, J. A., C. Benoist and D. Mathis (2007). "Treg cells: guardians for life." Nat Immunol **8**(2): 124-125.
- Hillyer, G. V. (1985). "Induction of immunity in mice to *Fasciola hepatica* with a *Fasciola*/*Schistosoma* cross-reactive defined immunity antigen." Am J Trop Med Hyg **34**(6): 1127-1131.
- Hillyer, G. V., E. T. Haroun, A. Hernandez and M. S. de Galanes (1987). "Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen." Am J Trop Med Hyg **37**(2): 363-369.
- Hillyer, G. V., M. I. Garcia Rosa, H. Alicea and A. Hernandez (1988). "Successful vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection with a purified 12 Kd *Fasciola hepatica* cross-reactive antigen." Am J Trop Med Hyg **38**(1): 103-110.
- Hillyer, G. V., M. Soler de Galanes, J. Rodriguez-Perez, J. Bjorland, M. Silva de Lagrava, S. Ramirez-Guzman and R. T. Bryan (1992). "Use of the Falcon Assay Screening Test - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (FAST-ELISA) and the Enzyme Linked Immuno-electrotransfer Blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **43**: 603-609.
- Hillyer, G. V. (2005). "Fasciola antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis." J Helminthol **79**(3): 241-247.
- Houghten, R. A. (1985). "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(15): 5131-5135.

- Hoyle, D. V. and D. W. Taylor (2003). "The immune response of regional lymph nodes during the early stages of *Fasciola hepatica* infection in cattle." *Parasite Immunol* **25**(4): 221-229.
- Huang, H. Q., S. C. Li, Z. H. Qin, S. L. Cao, Y. Yao, Y. S. Liu, H. Y. Li, M. S. Cai, Z. J. Li and Y. E. Shi (2005). "Synthesis and bioactivities of two multiple antigen peptides as potential vaccine against schistosoma." *Bioorg Med Chem Lett* **15**(9): 2415-2419.
- Huerta, M., A. S. de Aluja, G. Fragoso, A. Toledo, N. Villalobos, M. Hernandez, G. Gevorkian, G. Acero, A. Diaz, I. Alvarez, R. Avila, C. Beltran, G. Garcia, J. J. Martinez, C. Larralde and E. Sciuotto (2001). "Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico." *Vaccine* **20**(1-2): 262-266.
- Ibarra-Velarde, F., Y. Vera-Montenegro, R. Najera-Fuentes and A. Sanchez-Albarran (2001). "Efficacy of combined chemotherapy against gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in cattle." *Vet Parasitol* **99**(3): 199-204.
- Irizarry, R. A., B. M. Bolstad, F. Collin, L. M. Cope, B. Hobbs and T. P. Speed (2003a). "Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data." *Nucleic Acids Res* **31**(4): e15.
- Irizarry, R. A., B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay, K. J. Antonellis, U. Scherf and T. P. Speed (2003b). "Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data." *Biostatistics* **4**(2): 249-264.
- Jacob, C. O., M. Sela and R. Arnon (1983). "Antibodies against synthetic peptides of the B subunit of cholera toxin: crossreaction and neutralization of the toxin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(24): 7611-7615.
- Jayaraj, R., D. Piedrafita, K. Dynon, R. Grams, T. W. Spithill and P. M. Smooker (2009). "Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens." *Vet Parasitol* **160**(3-4): 230-236.
- Jennings, G. T. and M. F. Bachmann (2009). "Immunodrugs: therapeutic VLP-based vaccines for chronic diseases." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**: 303-326.
- Jiang, W., Y. Hong, J. Peng, Z. Fu, X. Feng, J. Liu, Y. Shi and J. Lin (2010). "Study on differences in the pathology, T cell subsets and gene expression in susceptible and non-susceptible hosts infected with *Schistosoma japonicum*." *PLoS One* **5**(10): e13494.
- Kaiser, E., R. L. Colescott, C. D. Bossinger and P. I. Cook (1970). "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides." *Anal Biochem* **34**(2): 595-598.
- Kamath, A. T., A. F. Roachat, D. Christensen, E. M. Agger, P. Andersen, P. H. Lambert and C. A. Siegrist (2009). "A liposome-based mycobacterial vaccine induces potent adult and neonatal multifunctional T cells through the exquisite targeting of dendritic cells." *PLoS One* **4**(6): e5771.
- Keiser, J., L. Rinaldi, V. Veneziano, L. Mezzino, M. Tanner, J. Utzinger and G. Cringoli (2008). "Efficacy and safety of artemether against a natural *Fasciola hepatica* infection in sheep." *Parasitol Res* **103**(3): 517-522.
- Keiser, J., V. Veneziano, L. Rinaldi, L. Mezzino, U. Duthaler and G. Cringoli (2010). "Anthelmintic activity of artesunate against *Fasciola hepatica* in naturally infected sheep." *Res Vet Sci* **88**(1): 107-110.
- Kelly, J. D., R. A. Chevis and H. V. Whitlock (1975). "The anthelmintic efficacy of mebendazole against adult *Fasciola hepatica* and a concurrent mixed nematode infection in sheep." *N Z Vet J* **23**(5): 81-84.

- Kendall, S. B. (1970). "Relationships between the species of *Fasciola* and their molluscan hosts." *Adv Parasitol* **8**: 251-258.
- Kesik, M., L. Jedlina-Panasiuk, M. Kozak-Cieszczyk, A. Plucienniczak and H. Wedrychowicz (2007). "Enteral vaccination of rats against *Fasciola hepatica* using recombinant cysteine proteinase (cathepsin L1)." *Vaccine* **25**(18): 3619-3628.
- Kikuchi, T., J. A. Cotton, J. J. Dalzell, K. Hasegawa, N. Kanzaki, P. McVeigh, T. Takanashi, I. J. Tsai, S. A. Assefa, P. J. Cock, T. D. Otto, M. Hunt, A. J. Reid, A. Sanchez-Flores, K. Tsuchihara, T. Yokoi, M. C. Larsson, J. Miwa, A. G. Maule, N. Sahashi, J. T. Jones and M. Berriman (2011). "Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*." *PLoS Pathog* **7**(9): e1002219.
- Kirchhofer, C., M. Vargas, O. Braissant, Y. Dong, X. Wang, J. L. Vennerstrom and J. Keiser (2011). "Activity of OZ78 analogues against *Fasciola hepatica* and *Echinostoma caproni*." *Acta Trop* **118**(1): 56-62.
- Kolaskar, A. S. and P. C. Tongaonkar (1990). "A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens." *FEBS Lett* **276**(1-2): 172-174.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne and E. L. Sonnhammer (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." *J Mol Biol* **305**(3): 567-580.
- Kumar, V. (1999). *Fascioliasis and Fasciolopsiasis. Trematode Infections and Diseases of Man and Animals*, Kluwer Academic Publishers: 168-208.
- LaCourse, E. J., S. Perally, R. M. Morphew, J. V. Moxon, M. Prescott, D. J. Dowling, S. M. O'Neill, A. Kipar, U. Hetzel, E. Hoey, R. Zafra, L. Buffoni, J. Perez Arevalo and P. M. Brophy (2012). "The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica*." *PLoS Negl Trop Dis* **6**(5): e1666.
- Lammler, G. and J. Thyssen (1971). "Chemotherapeutic investigations with brotiamide on the experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep." *Veterinary Medical Review* **4**: 417-423.
- Larsen, J. E., O. Lund and M. Nielsen (2006). "Improved method for predicting linear B-cell epitopes." *Immunome Res* **2**: 2.
- Lawrence, R. A., J. E. Allen, J. Osborne and R. M. Maizels (1994). "Adult and microfilarial stages of the filarial parasite *Brugia malayi* stimulate contrasting cytokine and Ig isotype responses in BALB/c mice." *J Immunol* **153**(3): 1216-1224.
- Lell, B., S. Agnandji, I. von Glasenapp, S. Haertle, S. Oyakhromen, S. Issifou, J. Vekemans, A. Leach, M. Lievens, M. C. Dubois, M. A. Demoitie, T. Carter, T. Villafana, W. R. Ballou, J. Cohen and P. G. Kremsner (2009). "A randomized trial assessing the safety and immunogenicity of AS01 and AS02 adjuvanted RTS,S malaria vaccine candidates in children in Gabon." *PLoS One* **4**(10): e7611.
- Lemon, J. (2006). "Plotrix: a package in the red light district of R." *R-News* **6**(4): 8-12.
- Levi, R. and R. Arnon (1996). "Synthetic recombinant influenza vaccine induces efficient long-term immunity and cross-strain protection." *Vaccine* **14**(1): 85-92.
- Lioy, E., J. Suarez, F. Guzman, S. Siegrist, G. Pluschke and M. E. Patarroyo (2001). "Synthesis, Biological, and Immunological Properties of Cyclic Peptides from *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-1." *Angew Chem Int Ed Engl* **40**(14): 2631-2635.
- Llanos-Cuentas, A., W. Calderon, M. Cruz, J. A. Ashman, F. P. Alves, R. N. Coler, L. Y. Bogatzki, S. Bertholet, E. M. Laughlin, S. J. Kahn, A. M. Beckmann, K. D. Cowgill, S. G. Reed and F. M. Piazza (2010). "A clinical trial to evaluate the safety and

- immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with sodium stibogluconate for the treatment of mucosal leishmaniasis." Vaccine **28**(46): 7427-7435.
- Lopez-Aban, J., P. Casanueva, J. Nogal, M. Arias, P. Morrondo, P. Diez-Banos, G. V. Hillyer, A. R. Martinez-Fernandez and A. Muro (2007a). "Progress in the development of Fasciola hepatica vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD." Vet Parasitol **145**(3-4): 287-296.
- Lopez-Aban, J., A. Andrade Mdo, J. J. Nogal-Ruiz, A. R. Martinez-Fernandez and A. Muro (2007b). "Immunomodulation of the response to excretory/secretory antigens of Fasciola hepatica by Anapsos in Balb/C mice and rat alveolar macrophages." J Parasitol **93**(2): 428-432.
- Lopez-Aban, J., J. J. Nogal-Ruiz, B. Vicente, P. Morrondo, P. Diez-Banos, G. V. Hillyer, A. R. Martinez-Fernandez, A. S. Feliciano and A. Muro (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**(1-2): 176-181.
- López-Abán, J., J. Pardo L, J. L. Pérez-Arellano and A. Muro (2012). Infecciones difícilmente transmisibles en el inmigrante V: Otras trematodos. Manual de Enfermedades Importadas. Elsevier: 493-502.
- Madhumathi, J., P. R. Prince, G. Anugraha, P. Kiran, D. N. Rao, M. V. Reddy and P. Kaliraj (2010). "Identification and characterization of nematode specific protective epitopes of Brugia malayi TRX towards development of synthetic vaccine construct for lymphatic filariasis." Vaccine **28**(31): 5038-5048.
- Maes, L., H. Lauwers, W. Deckers and O. Vanparijs (1988). "Flukicidal action of closantel against immature and mature Fasciola hepatica in experimentally infected rats and sheep." Res Vet Sci **44**(2): 229-232.
- Magalhaes, K. G., L. K. Passos and S. Carvalho Odos (2004). "Detection of Lymnaea columella infection by Fasciola hepatica through Multiplex-PCR." Mem Inst Oswaldo Cruz **99**(4): 421-424.
- Magalhaes, K. G., L. K. Jannotti-Passos, R. L. Caldeira, M. E. Berne, G. Muller, O. S. Carvalho and H. L. Lenzi (2008). "Isolation and detection of Fasciola hepatica DNA in Lymnaea viatrix from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues through multiplex-PCR." Vet Parasitol **152**(3-4): 333-338.
- Maggioli, G., D. Acosta, F. Silveira, S. Rossi, S. Giacaman, T. Basika, V. Gayo, D. Rosadilla, L. Roche, J. Tort and C. Carmona (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.
- Maizels, R. M. and M. Yazdanbakhsh (2003). "Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms." Nat Rev Immunol **3**(9): 733-744.
- Makidon, P. E., A. U. Bielinska, S. S. Nigavekar, K. W. Janczak, J. Knowlton, A. J. Scott, N. Mank, Z. Cao, S. Rathinavelu, M. R. Beer, J. E. Wilkinson, L. P. Blanco, J. J. Landers and J. R. Baker, Jr. (2008). "Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine." PLoS One **3**(8): e2954.
- Malone, J. B., P. H. Smith, A. F. Loyacano, F. G. Hembry and L. T. Brock (1982). "Efficacy of albendazole for treatment of naturally acquired fasciola hepatica in calves." Am J Vet Res **43**(5): 879-881.

- Manolova, V., A. Flace, M. Bauer, K. Schwarz, P. Saudan and M. F. Bachmann (2008). "Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size." Eur J Immunol **38**(5): 1404-1413.
- Marcilla, A., J. E. De la Rubia, J. Sotillo, D. Bernal, C. Carmona, Z. Villavicencio, D. Acosta, J. Tort, F. J. Bornay, J. G. Esteban and R. Toledo (2008). "Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections." Clin Vaccine Immunol **15**(1): 95-100.
- Marcos Raymundo, L. A., V. Maco Flores, A. Terashima, F. Samalvides, E. Miranda, M. Tantalean and J. R. Espinoza (2004). "Hiperendemicidad de fasciolosis humana en el Valle del Mantaro, Perú: factores de riesgo de la infección por *Fasciola hepatica*." Revista de gastroenterología de Perú **24**: 158-164.
- Margulies, M., M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bemben, J. Berka, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. Yu, R. F. Begley and J. M. Rothberg (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." Nature **437**(7057): 376-380.
- Marrack, P., A. S. McKee and M. W. Munks (2009). "Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium." Nat Rev Immunol **9**(4): 287-293.
- Martinez-Fernandez, A. R., J. J. Nogal-Ruiz, J. Lopez-Aban, V. Ramajo, A. Oleaga, Y. Manga-Gonzalez, G. V. Hillyer and A. Muro (2004). "Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD." Vet Parasitol **126**(3): 287-298.
- Mas-Coma, S., R. Angles, W. Strauss, J. G. Esteban, J. A. Oviedo and P. Buchon (1995). "Human fascioliasis in Bolivia: a general analysis and a critical review of existing data." Research and Reviews in Parasitology **55**: 73-93.
- Mas-Coma, S. and M. D. Bargues (1997). "Human liver flukes: A review." Research and Reviews in Parasitology **57**(3): 145 - 218.
- Mas-Coma, S., A. Rodriguez, M. D. Bargues, M. A. Valero, J. R. Coello and R. Angles (1997). "Secondary reservoir role of domestic animals other than sheep and cattle in fascioliasis transmission in the Northern Bolivian Altiplano." Research and Reviews in Parasitology **57**: 39-46.
- Mas-Coma, S., J. G. Esteban and M. D. Bargues (1999). "Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification." Bulletin of the World Health Organization **77**(4): 340-346.
- Mas-Coma, S. (2005). "Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas." J Helminthol **79**(3): 207-216.
- Mas-Coma, S., M. A. Valero and M. D. Bargues (2009). "Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control." Adv Parasitol **69**: 41-146.
- Matsui, M., J. H. Fowler and L. L. Walling (2006). "Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function." Biol Chem **387**(12): 1535-1544.

- Mauri, C. and A. Bosma (2012). "Immune regulatory function of B cells." Annu Rev Immunol **30**: 221-241.
- McCarthy, E., C. Stack, S. M. Donnelly, S. Doyle, V. H. Mann, P. J. Brindley, M. Stewart, T. A. Day, A. G. Maule and J. P. Dalton (2004). "Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*." Int J Parasitol **34**(6): 703-714.
- McCole, D. F., M. L. Doherty, A. W. Baird, W. C. Davies, K. McGill and P. R. Torgerson (1999). "T cell subset involvement in immune responses to *Fasciola hepatica* infection in cattle." Parasite Immunol **21**(1): 1-8.
- McConville, M., G. P. Brennan, M. McCoy, R. Castillo, A. Hernandez-Campos, F. Ibarra and I. Fairweather (2006). "Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: surface and subsurface tegumental responses to in vitro treatment with the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha." Parasitology **133**(Pt 2): 195-208.
- McConville, M., G. P. Brennan, A. Flanagan, H. W. Edgar, R. E. Hanna, M. McCoy, A. W. Gordon, R. Castillo, A. Hernandez-Campos and I. Fairweather (2009). "An evaluation of the efficacy of compound alpha and triclabendazole against two isolates of *Fasciola hepatica*." Vet Parasitol **162**(1-2): 75-88.
- McGuire, C., W. C. Chan and D. Wakelin (2002). "Nasal immunization with homogenate and peptide antigens induces protective immunity against *Trichinella spiralis*." Infect Immun **70**(12): 7149-7152.
- McSorley, H. J., J. P. Hewitson and R. M. Maizels (2013). "Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators." Int J Parasitol **43**(3-4): 301-310.
- Meaney, M., I. Fairweather, G. P. Brennan, L. S. McDowell and A. B. Forbes (2003). "*Fasciola hepatica*: effects of the fasciolicide clorsulon in vitro and in vivo on the tegumental surface, and a comparison of the effects on young- and old-mature flukes." Parasitol Res **91**(3): 238-250.
- Menard, A., A. Agoulon, M. L. L'Hostis, D. Rondelaud, S. Collard and A. Chauvin (2001). "*Myocastor coypus* as a reservoir host of *Fasciola hepatica* in France." Vet Res **32**(5): 499-508.
- Merrifield, R. B. (1969). "Solid-phase peptide synthesis." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **32**: 221-296.
- Miller, C. M., N. C. Smith, R. J. Ikin, N. R. Boulter, J. P. Dalton and S. Donnelly (2009). "Immunological interactions between 2 common pathogens, Th1-inducing protozoan *Toxoplasma gondii* and the Th2-inducing helminth *Fasciola hepatica*." PLoS One **4**(5): e5692.
- Miranda, K. M., M. G. Espey and D. A. Wink (2001). "A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite." Nitric Oxide **5**(1): 62-71.
- Mizel, S. B. and J. T. Bates (2010). "Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential." J Immunol **185**(10): 5677-5682.
- Mountford, A. P. and E. Pearlman (1998). "Interleukin-12 and the host response to parasitic helminths; the paradoxical effect on protective immunity and immunopathology." Parasite Immunol **20**(11): 509-517.
- Mountford, A. P., V. L. Shires and S. Anderson (1998). "Interleukin-12 and protective immunity to schistosomes." Braz J Med Biol Res **31**(1): 163-169.

- Morales, A. and A. M. Espino (2012). "Evaluation and characterization of *Fasciola hepatica* tegument protein extract for serodiagnosis of human fascioliasis." Clin Vaccine Immunol **19**(11): 1870-1878.
- Moreau, E. and A. Chauvin (2010). "Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections." J Biomed Biotechnol **2010**: 428593.
- Morefield, G. L., A. Sokolovska, D. Jiang, H. HogenEsch, J. P. Robinson and S. L. Hem (2005). "Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro." Vaccine **23**(13): 1588-1595.
- Morel, S., A. Didierlaurent, P. Bourguignon, S. Delhay, B. Baras, V. Jacob, C. Planty, A. Elouahabi, P. Harvengt, H. Carlsen, A. Kielland, P. Chomez, N. Garcon and M. Van Mechelen (2011). "Adjuvant System AS03 containing alpha-tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity." Vaccine **29**(13): 2461-2473.
- Morphew, R. M., H. A. Wright, E. J. LaCourse, D. J. Woods and P. M. Brophy (2007). "Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during in vitro culture ex host." Mol Cell Proteomics **6**(6): 963-972.
- Morrison, C. A., T. Colin, J. L. Sexton, F. Bowen, J. Wicker, T. Friedel and T. W. Spithill (1996). "Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase." Vaccine **14**(17-18): 1603-1612.
- Mosca, F., E. Tritto, A. Muzzi, E. Monaci, F. Bagnoli, C. Iavarone, D. O'Hagan, R. Rappuoli and E. De Gregorio (2008). "Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10501-10506.
- Moser, D., M. Tendler, G. Griffiths and M. Q. Klinkert (1991). "A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins." J Biol Chem **266**(13): 8447-8454.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Mulcahy, G., F. O'Connor, S. McGonigle, A. Dowd, D. G. Clery, S. J. Andrews and J. P. Dalton (1998). "Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*." Vaccine **16**(9-10): 932-939.
- Mulcahy, G., F. O'Connor, D. Clery, S. F. Hogan, A. J. Dowd, S. J. Andrews and J. P. Dalton (1999). "Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines." Res Vet Sci **67**(1): 27-33.
- Mundargi, R. C., V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel and T. M. Aminabhavi (2008). "Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives." J Control Release **125**(3): 193-209.
- Muro, A., V. Ramajo, J. Lopez, F. Simon and G. V. Hillyer (1997). "*Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins." Vet Parasitol **69**(3-4): 219-229.
- Muro, A., P. Casanueva, J. Lopez-Aban, V. Ramajo, A. R. Martinez-Fernandez and G. V. Hillyer (2007). "Identification of *Fasciola hepatica* recombinant 15-kDa fatty acid-binding protein T-cell epitopes that protect against experimental fascioliasis in rabbits and mice." J Parasitol **93**(4): 817-823.
- Muro, A., L. Pérez del Villar, V. Velasco and J. L. Pérez-Arellano (2010). "Infecciones por trematodos." Medicine **10**(55): 3717-3728.
- Murray, R., P. Cohen and M. C. Hardegree (1972). "Mineral oil adjuvants: biological and chemical studies." Ann Allergy **30**(3): 146-151.

- Mutapi, F., C. Bourke, Y. Harcus, N. Midzi, T. Mduluza, C. M. Turner, R. Burchmore and R. M. Maizels (2011). "Differential recognition patterns of *Schistosoma haematobium* adult worm antigens by the human antibodies IgA, IgE, IgG1 and IgG4." *Parasite Immunol* **33**(3): 181-192.
- Nacher, M., P. Singhasivanon, U. Silachamroon, S. Treeprasertsuk, S. Vannaphan, B. Traore, F. Gay and S. Looareesuwan (2001). "Helminth infections are associated with protection from malaria-related acute renal failure and jaundice in Thailand." *Am J Trop Med Hyg* **65**(6): 834-836.
- Negrao-Correa, D. (2001). "Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **43**(5): 291-299.
- No, J. H., M. K. Kim, Y. T. Jeon, Y. B. Kim and Y. S. Song (2011). "Human papillomavirus vaccine: widening the scope for cancer prevention." *Mol Carcinog* **50**(4): 244-253.
- O'Neill, S. M., M. Parkinson, W. Strauss, R. Angles and J. P. Dalton (1998). "Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase." *Am J Trop Med Hyg* **58**(4): 417-423.
- O'Neill, S. M., M. T. Brady, J. J. Callanan, G. Mulcahy, P. Joyce, K. H. Mills and J. P. Dalton (2000). "*Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice." *Parasite Immunol* **22**(3): 147-155.
- Ockner, R. K., J. A. Manning, R. B. Poppenhausen and W. K. Ho (1972). "A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues." *Science* **177**(4043): 56-58.
- Ohlschlager, P., M. Quetting, G. Alvarez, M. Durst, L. Gissmann and A. M. Kaufmann (2009). "Enhancement of immunogenicity of a therapeutic cervical cancer DNA-based vaccine by co-application of sequence-optimized genetic adjuvants." *Int J Cancer* **125**(1): 189-198.
- Ouellette, M. (2001). "Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites." *Trop Med Int Health* **6**(11): 874-882.
- Overend, D. J. and F. L. Bowen (1995). "Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole." *Aust Vet J* **72**(7): 275-276.
- Patarroyo, M. E., A. Bermudez and M. A. Patarroyo (2011). "Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development." *Chem Rev* **111**(5): 3459-3507.
- Pearce, E. J. and A. S. MacDonald (2002). "The immunobiology of schistosomiasis." *Nat Rev Immunol* **2**(7): 499-511.
- Perez-Ecija, R. A., R. E. Mendes, R. Zafra, L. Buffonni, A. Martinez-Moreno and J. Perez (2010). "Pathological and parasitological protection in goats immunised with recombinant cathepsin L1 and challenged with *Fasciola hepatica*." *Vet J* **185**(3): 351-353.
- Peters, B., J. Sidney, P. Bourne, H. H. Bui, S. Buus, G. Doh, W. Fleri, M. Kronenberg, R. Kubo, O. Lund, D. Nemazee, J. V. Ponomarenko, M. Sathiamurthy, S. Schoenberger, S. Stewart, P. Surko, S. Way, S. Wilson and A. Sette (2005). "The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint." *PLoS Biol* **3**(3): e91.
- Pettit, D. K., J. R. Lawter, W. J. Huang, S. C. Pankey, N. S. Nightlinger, D. H. Lynch, J. A. Schuh, P. J. Morrissey and W. R. Gombotz (1997). "Characterization of poly(glycolide-co-D,L-lactide)/poly(D,L-lactide) microspheres for controlled release of GM-CSF." *Pharm Res* **14**(10): 1422-1430.

- Phiri, I. K., A. M. Phiri and L. J. Harrison (2006). "Serum antibody isotype responses of Fasciola-infected sheep and cattle to excretory and secretory products of Fasciola species." *Vet Parasitol* **141**(3-4): 234-242.
- Piacenza, L., D. Acosta, I. Basmadjian, J. P. Dalton and C. Carmona (1999). "Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep." *Infect Immun* **67**(4): 1954-1961.
- Pizza, M., M. M. Giuliani, M. R. Fontana, E. Monaci, G. Douce, G. Dougan, K. H. Mills, R. Rappuoli and G. Del Giudice (2001). "Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants." *Vaccine* **19**(17-19): 2534-2541.
- Pleasant, J., E. Wiedosari, H. W. Raadsma, E. Meeusen and D. Piedrafita (2011). "Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response." *Parasite Immunol* **33**(9): 495-505.
- Prowse, R. K., P. Chaplin, H. C. Robinson and T. W. Spithill (2002). "Fasciola hepatica cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells." *Parasite Immunol* **24**(2): 57-66.
- Raadsma, H. W., N. M. Kingsford, Suharyanta, T. W. Spithill and D. Piedrafita (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." *Vet Parasitol* **143**(3-4): 275-286.
- Ragupathi, G., J. R. Gardner, P. O. Livingston and D. Y. Gin (2011). "Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer." *Expert Rev Vaccines* **10**(4): 463-470.
- Ramajo, V., A. Oleaga, P. Casanueva, G. V. Hillyer and A. Muro (2001). "Vaccination of sheep against Fasciola hepatica with homologous fatty acid binding proteins." *Vet Parasitol* **97**(1): 35-46.
- Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor and S. Stevanovic (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." *Immunogenetics* **50**(3-4): 213-219.
- Reed, S. G., M. T. Orr and C. B. Fox (2013). "Key roles of adjuvants in modern vaccines." *Nat Med* **19**(12): 1597-1608.
- Reszka, N., J. B. Cornelissen, M. M. Harmsen, K. Bienkowska-Szewczyk, J. de Bree, W. J. Boersma and F. A. Rijsewijk (2005). "Fasciola hepatica procathepsin L3 protein expressed by a baculovirus recombinant can partly protect rats against fasciolosis." *Vaccine* **23**(23): 2987-2993.
- Rew, R. S., Colglazier and F. D. Enzie (1978). "Effect of diamfenetide on experimental infections of Fasciola hepatica in lambs: anthelmintic and clinical investigations." *J Parasitol* **64**(2): 290-294.
- Reyes-Sandoval, A., D. H. Wyllie, K. Bauza, A. Milicic, E. K. Forbes, C. S. Rollier and A. V. Hill (2011). "CD8+ T effector memory cells protect against liver-stage malaria." *J Immunol* **187**(3): 1347-1357.
- Richards, L. S., G. L. Zimmerman, M. J. Nelson, D. J. Schons and S. W. Dawley (1987). "The anthelmintic efficacy of netobimin against experimental infections of Fasciola hepatica in sheep." *Vet Parasitol* **26**(1-2): 71-77.
- Richards, R. J., F. L. Bowen, F. Essenwein, R. F. Steiger and G. Buscher (1990). "The efficacy of triclabendazole and other anthelmintics against Fasciola hepatica in controlled studies in cattle." *Vet Rec* **126**(9): 213-216.

- Robinson, K., T. Bellaby, W. C. Chan and D. Wakelin (1995). "High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite *Trichinella spiralis*." *Immunology* **86**(4): 495-498.
- Robinson, M. W., A. Trudgett, E. M. Hoey and I. Fairweather (2002). "Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: beta-tubulin and response to in vitro treatment with triclabendazole." *Parasitology* **124**(Pt 3): 325-338.
- Rodriguez-Perez, J., J. R. Rodriguez-Medina, M. A. Garcia-Blanco and G. V. Hillyer (1992). "*Fasciola hepatica*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein." *Exp Parasitol* **74**(4): 400-407.
- Rokni, M. B., J. Massoud, S. M. O'Neill, M. Parkinson and J. P. Dalton (2002). "Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of Northern Iran: application of cathepsin L-ELISA." *Diagn Microbiol Infect Dis* **44**(2): 175-179.
- Rokni, M. B., H. Mirhendi, A. Mizani, M. Mohebbali, M. Sharbatkhori, E. B. Kia, H. Abdoli and S. Izadi (2010). "Identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using a simple PCR-restriction enzyme method." *Exp Parasitol* **124**(2): 209-213.
- Rutitzky, L. I., P. M. Smith and M. J. Stadecker (2009). "T-bet protects against exacerbation of schistosome egg-induced immunopathology by regulating Th17-mediated inflammation." *Eur J Immunol* **39**(9): 2470-2481.
- Sablan, B. P., D. J. Kim, N. G. Barzaga, W. C. Chow, M. Cho, S. H. Ahn, S. G. Hwang, J. H. Lee, H. Namini and W. L. Heyward (2012). "Demonstration of safety and enhanced seroprotection against hepatitis B with investigational HBsAg-1018 ISS vaccine compared to a licensed hepatitis B vaccine." *Vaccine* **30**(16): 2689-2696.
- Sarkar, D. (2008). *Lattice: Multivariate Data Visualization with R*. New York, Springer Science.
- Sexton, J. L., A. R. Milner, M. Panaccio, J. Waddington, G. Wijffels, D. Chandler, C. Thompson, L. Wilson, T. W. Spithill, G. F. Mitchell and et al. (1990). "Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep." *J Immunol* **145**(11): 3905-3910.
- Shirodkar, S., R. L. Hutchinson, D. L. Perry, J. L. White and S. L. Hem (1990). "Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines." *Pharm Res* **7**(12): 1282-1288.
- Silveira-Lemos, D., A. Teixeira-Carvalho, O. A. Martins-Filho, A. L. Souza-Soares, P. Castro-Silva, M. F. Costa-Silva, P. H. Guimaraes, H. B. Ferraz, L. A. Oliveira-Fraga, M. M. Teixeira and R. Correa-Oliveira (2012). "Serum chemokines and chemokine receptors in eosinophils during acute human schistosomiasis mansoni." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **105**(4): 380-386.
- Smith, A. M., A. J. Dowd, S. McGonigle, P. S. Keegan, G. Brennan, A. Trudgett and J. P. Dalton (1993). "Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*." *Mol Biochem Parasitol* **62**(1): 1-8.
- Smith, D. M., J. K. Simon and J. R. Baker, Jr. (2013). "Applications of nanotechnology for immunology." *Nat Rev Immunol* **13**(8): 592-605.
- Sogaard, O. S., N. Lohse, Z. B. Harboe, R. Offersen, A. R. Bukh, H. L. Davis, H. C. Schonheyder and L. Ostergaard (2010). "Improving the immunogenicity of pneumococcal conjugate vaccine in HIV-infected adults with a toll-like receptor 9 agonist adjuvant: a randomized, controlled trial." *Clin Infect Dis* **51**(1): 42-50.
- Spithill, T. W. and J. P. Dalton (1998). "Progress in development of liver fluke vaccines." *Parasitol Today* **14**(6): 224-228.

- Stammers, B. M. (1976). "The effects of nitroxylin on the survival, growth and morphology of *Fasciola hepatica* in sheep." Res Vet Sci **20**(2): 174-179.
- Stanberry, L. R., J. K. Simon, C. Johnson, P. L. Robinson, J. Morry, M. R. Flack, S. Gracon, A. Myc, T. Hamouda and J. R. Baker, Jr. (2012). "Safety and immunogenicity of a novel nanoemulsion mucosal adjuvant W805EC combined with approved seasonal influenza antigens." Vaccine **30**(2): 307-316.
- Stitt, A. W., I. Fairweather, A. G. Trudgett and C. F. Johnston (1992). "*Fasciola hepatica*: localization and partial characterization of tubulin." Parasitol Res **78**(2): 103-107.
- Stitt, A. W. and I. Fairweather (1996). "*Fasciola hepatica*: disruption of the vitelline cells in vitro by the sulphoxide metabolite of triclabendazole." Parasitol Res **82**(4): 333-339.
- Taira, N., H. Yoshifuji and J. C. Boray (1997). "Zoonotic potential of infection with *Fasciola* spp. by consumption of freshly prepared raw liver containing immature flukes." Int J Parasitol **27**(7): 775-779.
- Tang, D. C., M. DeVit and S. A. Johnston (1992). "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response." Nature **356**(6365): 152-154.
- Tarrab-Hazdai, R., D. Schechtman and R. Arnon (1998). "Synthesis and characterization of a protective peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*." Infect Immun **66**(9): 4526-4530.
- Taylor, M. D., N. van der Werf and R. M. Maizels (2012). "T cells in helminth infection: the regulators and the regulated." Trends Immunol **33**(4): 181-189.
- Tendler, M., C. A. Brito, M. M. Vilar, N. Serra-Freire, C. M. Diogo, M. S. Almeida, A. C. Delbem, J. F. Da Silva, W. Savino, R. C. Garratt, N. Katz and A. S. Simpson (1996). "A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 269-273.
- Totte, P., C. Duperray and L. Dedieu (2010). "CD62L defines a subset of pathogen-specific bovine CD4 with central memory cell characteristics." Dev Comp Immunol **34**(2): 177-182.
- Tsai, I. J., M. Zarowiecki, N. Holroyd, A. Garciarrubio, A. Sanchez-Flores, K. L. Brooks, A. Tracey, R. J. Bobes, G. Fragoso, E. Scitutto, M. Aslett, H. Beasley, H. M. Bennett, J. Cai, F. Camicia, R. Clark, M. Cucher, N. De Silva, T. A. Day, P. Deplazes, K. Estrada, C. Fernandez, P. W. Holland, J. Hou, S. Hu, T. Huckvale, S. S. Hung, L. Kamenetzky, J. A. Keane, F. Kiss, U. Koziol, O. Lambert, K. Liu, X. Luo, Y. Luo, N. Macchiaroli, S. Nichol, J. Paps, J. Parkinson, N. Pouchkina-Stantcheva, N. Riddiford, M. Rosenzvit, G. Salinas, J. D. Wasmuth, M. Zamanian, Y. Zheng, X. Cai, X. Soberon, P. D. Olson, J. P. Lacleste, K. Brehm and M. Berriman (2013). "The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism." Nature **496**(7443): 57-63.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani and G. Chu (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5116-5121.
- Ubeira, F. M., L. Muino, M. A. Valero, M. V. Periago, I. Perez-Crespo, M. Mezo, M. Gonzalez-Warleta, F. Romaris, E. Paniagua, S. Cortizo, J. Llovo and S. Mas-Coma (2009). "MM3-ELISA detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in preserved human stool samples." Am J Trop Med Hyg **81**(1): 156-162.
- Valero, M. A., M. D. Marcos, R. Fons and S. Mas-Coma (1998). "*Fasciola hepatica* development in the experimentally infected black rat *Rattus rattus*." Parasitol Res **84**(3): 188-194.

- Valero, M. A., M. Panova, A. M. Comes, R. Fons and S. Mas-Coma (2002). "Patterns in size and shedding of *Fasciola hepatica* eggs by naturally and experimentally infected murid rodents." *J Parasitol* **88**(2): 308-313.
- van de Veerdonk, F. L., M. S. Gresnigt, B. J. Kullberg, J. W. van der Meer, L. A. Joosten and M. G. Netea (2009). "Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview." *BMB Rep* **42**(12): 776-787.
- van den Biggelaar, A. H., R. van Ree, L. C. Rodrigues, B. Lell, A. M. Deelder, P. G. Kremsner and M. Yazdanbakhsh (2000). "Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10." *Lancet* **356**(9243): 1723-1727.
- van der Burg, S. H., M. S. Bijker, M. J. Welters, R. Offringa and C. J. Melief (2006). "Improved peptide vaccine strategies, creating synthetic artificial infections to maximize immune efficacy." *Adv Drug Deliv Rev* **58**(8): 916-930.
- van Riet, E., F. C. Hartgers and M. Yazdanbakhsh (2007). "Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms." *Immunobiology* **212**(6): 475-490.
- Verwaerde, C., M. Joseph, M. Capron, R. J. Pierce, M. Damonville, F. Velge, C. Auriault and A. Capron (1987). "Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*." *J Immunol* **138**(12): 4441-4446.
- Vila-Corcoles, A., E. Salsench, T. Rodriguez-Blanco, O. Ochoa-Gondar, C. de Diego, A. Valdivieso, I. Hospital, F. Gomez-Bertomeu and X. Raga (2009). "Clinical effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumonia in middle-aged and older adults: a matched case-control study." *Vaccine* **27**(10): 1504-1510.
- Vilar, M. M., F. Barrientos, M. Almeida, N. Thaumaturgo, A. Simpson, R. Garratt and M. Tandler (2003). "An experimental bivalent peptide vaccine against schistosomiasis and fascioliasis." *Vaccine* **22**(1): 137-144.
- Vogel, F. R., C. Caillet, I. C. Kusters and J. Haensler (2009). "Emulsion-based adjuvants for influenza vaccines." *Expert Rev Vaccines* **8**(4): 483-492.
- Vukman, K. V., P. N. Adams, D. Dowling, M. Metz, M. Maurer and S. M. O'Neill (2013). "The effects of *Fasciola hepatica* tegumental antigens on mast cell function." *Int J Parasitol* **43**(7): 531-539.
- Walsh, K. P., M. T. Brady, C. M. Finlay, L. Boon and K. H. Mills (2009). "Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses." *J Immunol* **183**(3): 1577-1586.
- Wedrychowicz, H., M. Lamparska, M. Kesik, G. Kotowski, J. Mieszczanek, L. Jedlina-Panasiuk and A. Plucienniczak (2003). "The immune response of rats to vaccination with the cDNA or protein forms of the cysteine proteinase of *Fasciola hepatica*." *Vet Immunol Immunopathol* **94**(1-2): 83-93.
- Wedrychowicz, H., M. Kesik, M. Kaliniak, M. Kozak-Cieszczyk, L. Jedlina-Panasiuk, S. Jaros and A. Plucienniczak (2007). "Vaccine potential of inclusion bodies containing cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke." *Vet Parasitol* **147**(1-2): 77-88.
- Wesolowska, A., L. J. Norbury, K. Januszkiewicz, L. Jedlina, S. Jaros, A. Zawistowska-Denziak, W. Zygnier and H. Wedrychowicz (2013a). "Evaluation of the immune response of male and female rats vaccinated with cDNA encoding a cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* (FhPcW1)." *Acta Parasitol* **58**(2): 198-206.

- Wesolowska, A., S. Jaros, L. J. Norbury, D. Jaros, W. Zygnier and H. Wedrychowicz (2013b). "Microarray analysis of rat immune responses to liver fluke infection following vaccination with *Fasciola hepatica* phosphoglycerate kinase." Exp Parasitol **134**(1): 33-38.
- WHO (2006) "Report of the WHO Informal Meeting on use of Triclabendazole in fascioliasis control. WHO headquarters, Geneva, Switzerland." **12**, 1-31.
- Wijffels, G. L., J. L. Sexton, L. Salvatore, J. M. Pettitt, D. C. Humphris, M. Panaccio and T. W. Spithill (1992). "Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica*." Exp Parasitol **74**(1): 87-99.
- Wilford, O. (1986). Phylum Platyhelminthes. Animal Parasites: Their Life Cycles and Ecology, General Publishing Company: 199-273.
- Wilson, R. A., J. M. Wright, W. de Castro-Borges, S. J. Parker-Manuel, A. A. Dowle, P. D. Ashton, N. D. Young, R. B. Gasser and T. W. Spithill (2011). "Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome." Int J Parasitol **41**(13-14): 1347-1359.
- Winkelhagen, A. J., T. Mank, P. J. de Vries and R. Soetekouw (2012). "Apparent triclabendazole-resistant human *Fasciola hepatica* infection, the Netherlands." Emerg Infect Dis **18**(6): 1028-1029.
- Wischke, C., S. Mathew, T. Roch, M. Frentsch and A. Lendlein (2012). "Potential of NOD receptor ligands as immunomodulators in particulate vaccine carriers." J Control Release **164**(3): 299-306.
- Woollard, D. J., C. G. Gauci and M. W. Lightowers (1999). "Synthetic peptides induce antibody against a host-protective antigen of *Echinococcus granulosus*." Vaccine **18**(9-10): 785-794.
- Young, N. D., R. S. Hall, A. R. Jex, C. Cantacessi and R. B. Gasser (2010). "Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* - a key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite." Biotechnol Adv **28**(2): 222-231.
- Zafra, R., R. A. Perez-Ecija, L. Buffoni, P. Moreno, M. J. Bautista, A. Martinez-Moreno, G. Mulcahy, J. P. Dalton and J. Perez (2013). "Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*." J Comp Pathol **148**(4): 373-384.
- Zaph, C., J. Uzonna, S. M. Beverley and P. Scott (2004). "Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites." Nat Med **10**(10): 1104-1110.
- Zerlotini, A., M. Heiges, H. Wang, R. L. Moraes, A. J. Doinitini, J. C. Ruiz, J. C. Kissinger and G. Oliveira (2009). "SchistoDB: a *Schistosoma mansoni* genome resource." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D579-582.
- Zheng, H., W. Zhang, L. Zhang, Z. Zhang, J. Li, G. Lu, Y. Zhu, Y. Wang, Y. Huang, J. Liu, H. Kang, J. Chen, L. Wang, A. Chen, S. Yu, Z. Gao, L. Jin, W. Gu, Z. Wang, L. Zhao, B. Shi, H. Wen, R. Lin, M. K. Jones, B. Brejova, T. Vinar, G. Zhao, D. P. McManus, Z. Chen, Y. Zhou and S. Wang (2013). "The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*." Nat Genet **45**(10): 1168-1175.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencia de aminoácidos en formato FASTA de las proteínas seleccionadas mediante herramientas de bioinformática para el diseño de los péptidos que contienen epítopos B y T

# Acceso GenBank	Descripción	Tamaño (aa)	Secuencia de aminoácidos FASTA
AAA31753.2	NADH dehydrogenase subunit 3	118	MLFFAVLGLL FFLIFFLVLV FFAFLWNLDL GIFSGERSWV SSFECGFLSQ RVTENYFSYT YFILLVFFV FDLEVSLLN MPLQGVLYKN FFSYLFFLVL LGIGFLVEVR RGYVRWAY
Q34522.1	NADH dehydrogenase subunit 3	118	MLFFAVLGLL FFLIFFLVLV FFAFLWNLDL GIFSGERSWV SSFECGFLSQ RVTENYFSYT YFILLVFFV FDLEVSLLN MPLQGVLYKN FFSYLFFLVL LGIGFLVEVR RGYVRWAY
AAG13152.2	NADH dehydrogenase subunit 3	118	MLFFAVLGLL FFLIFFLVLV LHAFLWNLDL GIFSGERSWV SSFECGFLSQ RVTENYFSYT YFILLVFFV FDLEVSLLN MPLQGVLYKN FFSYLFFLVL LGIGFLVEVR RGYVRWY
AAG13156.2	NADH dehydrogenase subunit 5	522	MLLLCFLFLG VYVFWFSGWD ELLGCFSVLG YDSYGGFEFM IDLVGVGCF MLFCCGSVAL VYCFHYFMGS FSSVLLFPLM VVFLGTMGVL VFSSLLFSL IFWEYGLVLS FFLILFYANM SSLRASLVTL FASRFGDVSV FGMLMWSWW ADVSGLVFVL FYLLVVMTKS ACFPFISWLL EAMRAPTPVS SLVHSSTLVA AGVWFFLRYG CLSSVWVDF LVFFCFLTII VTAVCSIVFM DLKKIVALST CNNVSWCIVF FVCGDLCLAL LQLITHGLCK CYLFMSVGD MSQSGSSQSS VGVLGRYSR RFLPLVQGFL VLSLCLPFL GVFFSKHSLF SLLLYGGGFG LVLVCFSLF LSYVYSVRFA LLLLGSVGG SFGVSSLFLV VCPLVFCGGV LNYLGDVSA EVVGISWWS LAVLGVCFCG CLFGWLLYWC WMGEGYWSSM LWGGEGYVSL VYSWFGFISE ICLVSFYRWE VYLLESFFGL GVWRWLLFRG SFFSISFVVL GLVCVLLVSY VL
AAG13150.2	NADH dehydrogenase subunit 2	288	MRGVVIGSFG VLGLLVFSL VFSVGNLSLF WLFLELSTLS VVPLFFLLGN PWCLSGLFNY IIASSVSSSL ILCGIMSNSL LFMLLIGLFL KFGLFPFWGW VYGVSLNSNW LVVWSLSTFL KAPIFFLPPF LAGGSYFLVN ILCCLSFVL SVLFWFYTYG WLYCWCHMML SSSAALVAMS FVLSSDVLLL VFFVYCVWSS FVISFLGCCS GSWFGSVWGY FFFCFLLSI PVSLSIFYKL VMASGIFSCW FVVLVSWVIY SVSEQCYLLK FVMSFDLPKS VFGGLAVV
AAB02579.1	Amoebapore	102	MNPLFVLVLA AVALASTGVE SEEPHLDISL CESCTNTVNL VKRLLQNSVV ETHIRYLVKY LCKGAGSSQD ACIKFIQYEV DGAVGYLIQH NATDICHVIR LC
AAF88069.1	Amoebapore protein	101	MNPLFVLMML AVTFASFDVP SKQPTIDIDL CDICTNTMDV IKKMLADQTV EEHIGYLVKY LCKIARSQDA CIEFVQQEVD YIIDHVDQHN ATEICRLIKL C

AAA29144.1	Vitelline protein B2	272	MKMKFTLVLL LAIVPLTLAR HPHGKFNRRHA SYDDREKHRG YRKENDYLNLY DLKGFAGHG KAYLHGSFDK YGNENERGRY DHRGHSLAG KSAHDGKYDM YGRMYAKANF DAHGHEKEGT KFEEYTKFRR GGGYGGYGKK KSYDDYDTKG YMKRFADKGM KSKFDLYGNV EAKGKYDAYG KMGALGKFDS YGKYDQYGKM NDQGYEEAG KYNAGNLDL YGHLRGYGGG SAASKSENYG NARESGRYEP YGRYEKYEDD YARETPYDKY SY
AAA29143.1	Vitelline protein B1	272	MKMKFTLVLL LAIVPLTLAR HPHGKFNRRHA SYDDREKHRG YRKENDYLNLY DLKGFAGRG KAYLHGSFDK YGNENERGRY DDQGYLLAG KSAHDGKYGM YGNMYAKGDF KAYGNEDEGA KFEEVTTFRR GGGYDSYGKK KSYDDYDTKG HLKKFANKGR QSKFDMYGNV KADGQAI SNG NMNAYGMFDS YGKYDQYGKM NDQGYEEAG KYNAGNLDL YGHLRGYGGG SAASKSENYG NARESGRYEP YGRYEKYEDD YARETPYDKY SY
BAE44988.1	Cytochrome oxidase subunit I	145	RVGLIYMVIG LWGGFFGLSL SVLVRLNYLD PYFNLVSPEV YNYVVTGHGI IMIFFFLMPV LIGGFGNLYL PLLLGIPDLN LPRLNALSAA LLFPACVCLS FGLIGGVGVG WTFYPPPLSSL DYSSWGVDFL MFSLHLAGVS SLLGS
BAE45005.1	Cytochrome oxidase subunit I	145	RVGLIYMVIG LWGGFFGLSL SVLVRLNYLD PYFNLVSPEV YNYVVTGHGI IMIFFFLMPV LIGGFGNLYL PLLLGIPDLN LPRLNALSAA LLFPACVCLS FGLIGGVGVG WTFYPPPLSSL DYSSWGVDFL MFSLHLAGVS SLLGS
AAB01231.3	Cytochrome C oxidase subunit I	215	ILSIVGGIVG GLFSLMLRAQ LAHLDFVMGN YQLYNVSITA HAAIMVFFML MPALIAGFGN WVPLMIGAP DMCFP SLNNI SFWVLFSLV IIVMSALIGE GPGTGWTFYP PLSGIHFHPD VSIDLAVFGL HLAGVSSILG AINFIATILN MRAPGMTLTK MPLFVWSIFV TSVLVLI VMP VLAGCLMMLL TDRNLGTAF EVAGGGDFFF FQHLF
AAV687521.1	Cystatin	116	MLRILLGICI LHFMSCDVFG EMLVGGYTEP RSVTPEERSV FQPMILSKLL TAGSVESSE LELLQVSTQV VAGINYKFKV SGGATCPGW EVVVFVPLYS SKSATS VGTPT TRVSCT
AAB41670.2	Cathepsin L 1	326	MRLFVLAVLT VGLGNSDDL WHQWKRMYNK EYNGADDQHR RNIWEKNVKH IQEHNLRHDL GLVTTYTLGLN QFTDMTFEEF KAKYLTEMSE ASDILSHGVP YEANNRAVPD KIDWRESGYV TEVKDQGNCG SCWAFSTTGT MEGQYMKNER TSISFSEQQL VDCSRPWGNN GCGGGLMENA YQYLKQFGLE TESSYPYTAV EGQCRYNKQL GVAKVTGFYT VHSGSEVELK NLVGAEGPAA VAVDVESDFM MYRSGIYQSQ TCSPLRVNHA VLAVGYGTQG GTDYWIVKNS WGLSWGERGY IRMVRNRGNM CGIASLASLP MVARFP

AAC47721.1	Cathepsin L 2	326	MRCFVLAFLT VGVYASNDDL WHQWKRIYNK EYNGADDEHR RNIWGKNVKH IQEHNLRHDL GLVTYKLGLEN QFTDLTFEEF KAKYLIEIPR SSELLSRGIP FKANKLAVPE SIDWRDYYYV TEVKNQGQCG SCWAFSTTGA VEGQFRKNER ASASFSEQQL VDCPRDLGNY GCGGGYMENA YEYLKHNGLE TESYYPYQAV EGPCQYDGRL AYAKVTGYTT VHSDEIELK NLVGTGPAA VALDADSDFM MYQSGIYQSQ TCLPDRLTHA VLAVGYGSQD GTDYWIVKNS WGTWWGEDGY IRFARNRGNM CGIASLASVP MVARFP
ABQ95351.1	Cathepsin L 2	326	MRCFVLAFLT VGVFASNDDL WHQWKRIYNK EYNGADDEHR RNIWGKNVKH IQEHNLRHDL GLVTYKLGLEN QFTDLTFEEF KAKYLIEIPR SSELLSRGIP YKANKLAVPE SIDWRDYYYV TEVKDQGQCG SCWAFSTTGA VEGQFRKNER ASASFSEQQL VDCTRDFGNY GCGGGYMENA YEYLKHNGLE TESYYPYQAV EGPCQYDGRL AYAKVTGYTT VHSDEIELK NLVGTGPAA ALDADSDFMM YQSGIYQSQT CLPDRLTHAV LAVGYGSQDG TDYWIVKNSW GTWWGEDGYI RFARNRGNM GIASLASVPM VARFP
AAA29136.1	Cathepsin L like proteinase	326	MRLFILAVLT VGVLGSNDDL WHQWKRMYNK EYNGADDQHR RNIWEKNVKH IQEHNLRHDL GLVTYTLGLEN QFTDMTFEEF KAKYLTEMSE ASDILSHGVP YEANNRAVPD KIDWRESGYV TEVKDQGNCG SCWAFSTTGT MEGQYMKNER TSISFSEQQL VDCSGPWGNN GCSGGLMENA YQYLKQFGLT TESSYPYTAV EGQCRYNKQL GVAKVTGYTT VHSSEVELK NLVGARRPAA VAVDVESDFM MYRSGIYQSQ TCSPLRVNHA VLAVGYGTQG GTDYWIVKNS WGTYWGERGY IRMARNRGNM CGIASLASLP MVARFP
AAA29137.1	Cathepsin	326	MRLVILTLLI VGVFASNDDL WHQWKRIYNK EYKGADDDHR RNIWEQNVKH IQEHNLRHDL GLVTYKLGLEN QFTDMTFEEF KAKYLTEMPR ASELLSHGIP YKANKRAVPD RIDWRESGYV TEVKDQGGCG SCWAFSTTGA MEGQYMKNEK TSISFSEQQL VDCSGPFGNY GCNGGLMENA YEYLKRFGLT TESSYPYRAV EGQCRYNEQL GVAKVTGYTT VHSDEVELQ NLVGCRRPAA VALDVESDFM MYRSGIYQSQ TCSPLRLNHG VLAVGYGIQD GTDYWIVKNS WGTWWGEDGY IRMVRKRGNM CGIASLASVP MVAQFP
AAF76330.1	Cathepsin L	326	MRLVILTLLI VGVFASNDDL WHQWKRIYNK EYNGADDDHR RNIWEQNVKH IQEHNLRHDL GLVTYKLGLEN QFTDMTFEEF KAKYLTEMPR ASELLSHGIP YKANKRAVPD RIDWRESGYV TEVKDQGGCG SCWAFSTTGA MEGQYMKNQR TSISFSEQQL VDCSRDFGNY GCNGGLMENA YEYLKRFGLT TESSYPYRAV EGQCRYNEQL GVAKVTGYTT VHSDEVELQ NLVGAEGPAA VALDVESDFM MYRSGIYQSQ TCSPLRLNHG VLAVGYGIQD GTDYWIVKNS WGTWWGEDGY IRMVRKRGNM CGIASLASVP MVAQFP

ABN50361.2	Cathepsin L	326	MWFFVLAVLT VGVFASNDDL WHQWKRIYNK EYNGADDEHR RNIWGKNVKH IQEHNLRHDL GLVITYKLGLN QFTDLTFEEF KAKYLIEIPR SSELLSRGIP YKANKLAVPE SIDWRDYYYV TEVKNQGQCG SCWAFSTTGA VEGQFRKNER ASASFSEQQL VNCTRDFGNY GCGGGYVENA YEYLNKHNGL TESSYPYQAV EGPCQYDGR AYAKVTGYT VHSDEIELK NLVGTGEPAA VALDADSDFM MYQSGIYQSQ TCLPDRLTHA VLAVGYGSQD GTDYWIVKNS WGTWWGEDGY IRFARNRGNM CGLASLASVP IGTISV
AAP49831.1	Cathepsin L	326	MWFFVLAVLT VGVLSNDDL WHQWKRMYN EYNGADDQHR RNIWEENVKH IQEHNLRHDL GLVITYTLGLN QFTDMTFEEF KAKYLTEM ASDILSHGVP YETNNRAVPD KIDWRESGYV TEVKDQGNCG SCWAFSTTGT MEGQYMKNER TSISFSEQQL VDCSGPWGNN GCSGGLMENA YQYLKQFGLE TESSYPYTAV EGQCRYNKQL GVAKVTGYT VPSGSEVELK NLVGAEGPAA VAVDVESDFM MYRSGIYQSQ TCSPLRVNHA VLAVGYGTQG GTDYWIVKNS WGLSWGERGY IRMARNRGNM CGLASLASLP IGTISV
BAA23743.1	Cystein proteasa	325	MRLFILAVLT VGVLSNDDL WHQWKRMYNK EYNGAVDEHR RNIWEENVKH IQEHNLRHDL GLVITYTLGLN QFTDMTFEEF KAKYLTEM ASDILSHGIP YEANNRAVPD KIDWRESGYV TEVKDQGNCG SCWAFSTTGT MEGQYMKNER TSISFSEQQL VDCSGPWGNY GCMGGLMENA YEYLNKQFGLE TESSYPYTAV EGQCRYNRQL GVAKVTDYTT VHSGSEVELK NLVGAEGPAA VAVDVESDFM MYSGGIYQSR TCSSLRVNHA VLAVGYGTQG GTDYWIVKNS WGSSWGERYI RMVRNRGNM CGLASLASLPM VARFP
AAR99518.1	Cathepsin L- like protease	326	MRLFILAVLT VGVLSNDDL WHQWKRMYNK EYNGADDEHR RNIWEENVKH IQEHNLRHDL GLVITYTLGLN QFTDMTFEEF KAKYLTEM ASDILSHGVP YETNNRAVPD KIDWRESGYV TEVKDQGNCG SCWAFSTTGT MEGQYMKNER TSISFSEQQL VDCSGPWGNN GCSGGLMENA YQYLKQFGLE TESSYPYTAV EGQCRYNEQL GVAKVTGYT VHSGSEVELK NLVGSSEGPAA VAVDVESDFM MYRSGIYQSQ TCSPLSVNHA VLAVGYGTQG GTDYWIVKNS WGLSWGERGY IRMVRNRGNM CGLASLASLP MVARFP
CAA80446.1	Cathepsin L- like protease	326	MRFFVLAVLT VGVFASNDDL WHQWKRIYNK EYNGADDEHR RNIWGKNVKH IQEHNLRHGL GLVITYKLGLN QFTDLTFEEF KAKYLIEIPR SSELLSRGIP YKANKLAVPE SIDWRDYYYV TEVKDQGQCG SCWAFSTTGA VEGQFRKNER ASASFSEQQL VDCRDFGNY GCGGGYMENA YEYLNKHNGL TESSYPYQAV EGPCQYDGR AYAKVTGYT VHSDEIELK NLVGTEDLPA VALDADSDFM MYQSGIYQSQ TCLPDRLTHA VLAVGYGSQD GTDYWIVKNS WGTWWGEDGY IRFARNRGNM CGLASLASVP MVARFP

AA76664.1	Cathepsin L1 proteinase	326	MRLFILAVLT VGVLGSNDDL WHQWKRMYNK EYNGADDQHR RNIWEKNVKH IQEHNLRHDL GLVYTYTLGLN QYTDLTFEEF KAKYLTEMPR ASDILSHGIP YEANNRAVPD KIDWRESGYV TGVKDQGNCG SCWAFSTTGT TEGQYMKNER TSISFSEQQL VDCSGPWGNN GCGGGLMENA YEYLYKQFGLE TESSYPYTAV EGQCRHSKQL GVARVTGYTT VHSGSEVELK NLVGAERPAA VAVDVESDFM MYRSGIYQSQ TCSPLSVNHA VLAVGYGTQG GTDYWIVKNS WGLSWGERGY IRMVNRNGNM CGIASLASLP MVARFP
Q24940.1	Cathepsin L-like proteinase	326	MRLFILAVLT VGVLGSNDDL WHQWKRMYNK EYNGADDQHR RNIWEKNVKH IQEHNLRHDL GLVYTYTLGLN QFTDMTFEEF KAKYLTEMER ASDILSHGVP YEANNRAVPD KIDWRESGYV TEVKDQGNCG SCWAFSTTGT MEGQYMKNER TSISFSEQQL VDCSGPWGNN GCSGGLMENA YQYLYKQFGLE TESSYPYTAV EGQCRYNKQL GVARVTGYTT VHSGSEVELK NLVGARRPAA VAVDVESDFM MYRSGIYQSQ TCSPLRVNHA VLAVGYGTQG GTDYWIVKNS WGTYWGERGY IRMARNRNGNM CGIASLASLP MVARFP
CAA80448.1	Cathepsin L-like protease	166	QGQCGTCWAF ATTGVEGQY SRKYGSKTGF SEQQLVDCRR RHGNEGCGG LMTSSRYRLM NNSLESEG DY PYEAMDNRCR ANRTKGIVKV KSYTVLKNES ETHSRWSGT RGPVAVGIHA DDGFQFYSHG IYVSSTCSSW PANHGVLVVG YGAEANSPYW IVKNTW
CAA80444.1	Cathepsin L-like protease	166	QGQCGWCWAF STTGALEGQY MKSQRINISF SEQQLVDCSG DFGNHGCSGG LMEKAYEYLR HFGLETESY SYRADEGPCQ YDRQLGVAQV SGYFIVHSQD EVALKNLIGV EGPAAVALDV NIDFMMYRSG IYQDEICSSR YLNHAVLAVG YGTEDGTDYW IVKNTW
CAA80445.1	Cathepsin L-like protease	166	QGQCGWCWAF STTGAVEGQF RKNERASASF SEQQLVDCTR DFGNYGCGGG YMENAYEYLYK HNGLETESY PYQAVEGPCQ YDGRLAYAKV TGYYTVHSGD EIELKNLVGT EDLPAVALDA DSDFMMYQSG IYQSQTCLPD RLTHAVLAVG YGSQDGTDYW IVKNSW
CAA80449.1	Cathepsin B-like protease	166	QGQCGWCWAF GASTMSDRIC IASQGKHTPV LSAENMVDCC TSCGMGCNGG GFPLKLG SIG KKTRSCHRWV VRIERWMPTI LVP SLRTRSD WTETPCNQDV TTPACKHTCR PGYNMTYQKD KWYARTVYKV PADEHRIMRE LLTNGPMEVS FEVYGDFFSY KSGVYQ
CAA80451.1	Cathepsin B-like protease	104	QGQCGTCWAF GAVGAMSDRV CIHSGQMKP HLSARDLLSC CEF CGRGCRG GSPALAWDYW KSSGIVTGG S LEEPTGCAPY PFPKCAHHGS SGGYKPCPEE YYP A

ABJ97285.1	Cathepsin D-like aspartic protease	429	MRPVLLICLL FSAALCDVLR IKLRPFKTTR QELSEYGSLD WESSQRLFGK YAGRNGSIPE QLNNYLDAQY YGEIGIGTPP QTFKVIKFDG SSNLWVPSKR CSYLSWACWL HNKYNYAASS TYQVNGTAFS IQYGTGSVSG FISVDSFEVG GVEVKGQPFQ EAIKEPGIVF VFAKFDGILG MGFRSISVGG LITVFENMIA QGLVPEPVFS FYLNRNASDP VGGELLGGI DPNYYTGDIT YVPVTHEAYW QFKVDKIEFP GVSICADGCQ AIADTGTSLI AGPKKEVDAL NEQIGGTWMP GGIYVVNWDK IDNLSAITFV VAGRKMVFEA KDYIMKLSNM GRTVCVTSFI GIDVPVGPLW ILGDVFIGSY YTVFDMGQKR IGFATTKRHS VSKPPLSVPM MGLKPAFRRQ EEPRSAPPRN LLSFWNLLI
ABU62925.1	Cathepsin B	337	MSWLLIFAAI VVAQAKPNYK RQFEPFSEDEL IHYINEESGA SWKAAPSTRF NNIDQVKQNL GVLEETPEDR NTQRQTVRYS VSENDLPESF DARQKWANCP SISEIRDQSS CSSCWAVSSA SAITDRICIH SNGQKKPRLS AIDIVSCCAY CGYGCNGGIP AMSWDYWTRG GVVTTGGTLEN PTGCLPYFPF KCSHGVTTPG LPPCPRDIYP TPKCEKKCHA GYNKTYEQDK VKGKSSYNVG GQETDIMMEI MKNGPVDGIF YMFEDFLVYK SGIYHYTTGR LVGGHAIRVI GWGVENGVKY WLIANSWNEG WGEKGYFRMR RGNNECGIEA RINAGLP

Anexo 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de proteínas pertenecientes a familias comunes

NADH

```

AAA31753.2      MLFFAVLGLLFFLIFFLVLFHAFWLNLDLGI FSGERSWVSSFECGFLSQRVTENYFSYT 60
Q34522.1       MLFFAVLGLLFFLIFFLVLFHAFWLNLDLGI FSGERSWVSSFECGFLSQRVTENYFSYT 60
AAG13152.2     MLFFAVLGLLFFLIFFLVLFHAFWLNLDLGI FSGERSWVSSFECGFLSQRVTENYFSYT 60
*****:*****

AAA31753.2      YFILLVFFVFDLEVSLLLNMP LQGVLK NFFSYLFFLVLLGIGFLVEVRRGYVRWAY 118
Q34522.1       YFILLVFFVFDLEVSLLLNMP LQGVLK NFFSYLFFLVLLGIGFLVEVRRGYVRWAY 118
AAG13152.2     YFILLVFFVFDLEVSLLLNMP LQGVLK NFFSYLFFLVLLGIGFLVEVRRGYVRWTY 118
*****:*****

```

Alignment data :
 Alignment length : 118
 Identity (*) : 116 is 98.31 %
 Strongly similar (.) : 2 is 1.69 %
 Weakly similar (.) : 0 is 0.00 %

```

AAG13156.2     MLLLCFLFLGVYVWFSGWDELLGCF SVLGYDSYGGFEFMIDLVGVCFFMLFCGGSVAL 60
AAG13150.2     -----MRGVVIGSFGVLGLLVFS---LLVFSVGNLSLFWLFLLELSTLS 40
                . :*:.*:**  :.  ::  **  .:* **  *.

AAG13156.2     VYCFHYFMGSFSSVLLPFLM VVFLGTMGVLVFSSLLFSLIFWEYLGLVSPFLILFYANM 120
AAG13150.2     VVPLFFLLG-----NPWCLSGLEFYI IASSVSSSLLICGIMNSLLFMLLIG--- 87
*  ::::*  *  *  :  ::*:  **  :  .  :*:*:

AAG13156.2     SSLRASLVTLFASRFGDVSVFGMLMWVSWNADVSGLVFLVFLYLLVMTKSACFFPISWLL 180
AAG13150.2     LFLKFGLPFGWVYG-VSLN--SNWLWVWLSLSTPLKAPIFFLFFLAGGSYF----- 137
*  :*..:..  :* **  *  *  :  *  :*:*  :..  : *

AAG13156.2     EAMRAPTPVSSLVHSSTLVAAGVWFFLRYGCLSSVWVDFFLVFFCFLTIIIVTAVCSIVFM 240
AAG13150.2     -----LVNILCCLSFVLSVLFWFYTYGWL-----YCWCHMMLSSSAALVAM 179
*  *  *  *  *  :  ::*  **  *  *  :*  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

AAG13156.2     DLKRIVALSTCNNVSWCIVFFVCGDLCLALLQLITHGLCKCYLFMSVGDIMSQSGSSQSS 300
AAG13150.2     SFV-----LSSDVLLLVFFVYCVWSSFVIS----- 204
.:  *  .:* *  :  *  *  :

AAG13156.2     VGVYLGRYSGRFLPLVQGFVLVSLCGLFPLGVFFSKHSLFSLLLYGGGFGLVLVCFPLSLF 360
AAG13150.2     ---FLGCCSG-----SWFGSVWGYFFFCPLLS 229
:*  **  :*  :  *  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

AAG13156.2     LSYVYSVRFALLLLGSVGGLSFGVSSLFVVCPLVFCGGVINYLGDLVSAEVLVGSWWS 420
AAG13150.2     IPVSLSIFYKLVMASGI----- 246
.:  *  :  *  :  :  :

AAG13156.2     LAVLGVQCFGLFGLWLLYWCWMEGYWSSMLWGEGYVSLVSWFGFISEICLVSPYRWE 480
AAG13150.2     -----FSCWFVVLVSWVIY-----SVSEQCYLLKFMVS 274
*  *  *  *  :  *  *  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

AAG13156.2     VYLLESFFGLGVRWLLFRGSFFSISFVVLGLVCLLVSYVL 522
AAG13150.2     FDLPKSVFG-----GLAVV----- 288
.  *  :*:*  **  *

```

Alignment data :
 Alignment length : 524
 Identity (*) : 84 is 16.03 %
 Strongly similar (.) : 70 is 13.36 %
 Weakly similar (.) : 30 is 5.73 %

Amebaporo

```

AAB02579.1      MNPLFVLVLAVALASTGVSEEPHLDISLCE SCTNTVNLVKRLQNSVVETHIRYLVKY 60
AAF88069.1      MNPLFVLMLAAVTFASFVPSKQPTIDIDLCDICTNTMDVIKRLAQTVVEEHIGYLVKY 60
*****:*:*:* *_*:* :*_** : **:*:*:*:* :_* ** ** *

AAB02579.1      LCKGAGSSQDACIKFIQYEV DGAVGLIQHNATDICHVIRLC 102
AAF88069.1      LCKIARS-QDACIEFVQEV DYYIIDHVDQHNATEICRLIKLC 101
*** * * *****:*. * ** :. : *****:*. :*. **
  
```

Alignment data :
 Alignment length : 102
 Identity (*) : 60 is 58.82 %
 Strongly similar (.) : 23 is 22.55 %
 Weakly similar (.) : 5 is 4.90 %

Vitelina

```

AAA29144.1      MKMKFTLVLLLAIVPLTLARHPHGKFN RHASYYDDREKRGYRKENDYLNVDLKGKFAHG 60
AAA29143.1      MKMKFTLVLLLAIVPLTLARHPHGKFN RHASYYDDREKRGYRKENDYLNVDLKGKFAGR 60
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*

AAA29144.1      KAYLHGSFDKYGNERGRYDHRGHSLAGKSAHDGKYDMYGRMYAKANFDAHGHEKEGT 120
AAA29143.1      KAYLHGSFDKYGNERGRYDQGGYLLAGKSAHDGKYGMGNMYAKGDFKAYGNEDEGA 120
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*. :

AAA29144.1      KFEETKFRGGGYYGKKSYYDDYDTKGYMKRFADKGMKSKFDLYGNVEAKGKYDAYG 180
AAA29143.1      KFEETVTFRRGGGYSYGKKSYYDDYDTKGLKPKFANKGRQSKFDLYGNVKAQGQAI SNG 180
*** *_*****. *****:*. :*. :*. :*. :*. :*. :*. :*. :*. :*

AAA29144.1      KMGALGKFD SYGKYDQYGMNDQKYE EAGKYN AHGNL DLYGHLR GYGGSSAASK SENYG 240
AAA29143.1      NMNAYGMFDSYGKYDQYGMNDQKYE EAGKYN AHGNL DLYGHLR GYGGSSAASK SENYG 240
:*. * *****

AAA29144.1      NARESGRYEPYGRYKYE DDIARETPYDKYSY 272
AAA29143.1      NARESGRYEPYGRYKYE DDIARETPYDKYSY 272
*****
  
```

Alignment data :
 Alignment length : 272
 Identity (*) : 235 is 86.40 %
 Strongly similar (.) : 18 is 6.62 %
 Weakly similar (.) : 11 is 4.04 %

Citocromo C oxidasa

```

BAE44988.1   RVGLIYMVIGLWGGFFGLSLSVLVRLNYLDPYFNLVSPVYNYVVVTHGIIIMIFFFLMPEV 60
BAE45005.1   RVGLIYMVIGLWGGFFGLSLSVLVRLNYLDPYFNLVSPVYNYVVVTHGIIIMIFFFLMPEV 60
AAB01231.3   ---ILSIVGGIVGGLF--SIMLRAQLAHLDFVMG--NYQLYNVSIATAHAAMVFFMLMPA 53
              :::*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
              :.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

BAE44988.1   LIGGFGNYLLPLLGI PDLNLPRLNALSAWLLFPACVCLSFGLIG-GVGVGWTFFYPPLS 118
BAE45005.1   LIGGFGNYLLPLLGI PDLNLPRLNALSAWLLFPACVCLSFGLIG-GVGVGWTFFYPPLS 118
AAB01231.3   LIAGFGNWFVPLMIGAPDMCFPSLNINISFWVLFSLVLIIVMSALIGEGFGTGWTFYPPLS 113
              **.****:.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
              :.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

BAE44988.1   SLDYS-SWGVDFLMFSLHLAGVSSLLGS----- 145
BAE45005.1   SLDYS-SWGVDFLMFSLHLAGVSSLLGS----- 145
AAB01231.3   GIHFHPDVSIDLAVFGLHLAGVSSILGAINFIATILNMRAPGMTLEPKMPLFVWSIVPTSV 173
              .:.: .:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
              :.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

BAE44988.1   -----
BAE45005.1   -----
AAB01231.3   LVLIIVMPVLAGCLMMLLTDRLNLTAFPEVAGGGDHFFFOHLP 215

```

Alignment data :
 Alignment length : 222
 Identity (*) : 65 is 29.28 %
 Strongly similar (.) : 35 is 15.77 %
 Weakly similar (:) : 14 is 6.31 %

Catepsina L-like

```

CAA80444.1   QGQCGWCWAFSTTGALEGGQYMKSQRINISFSEQLVDCSGDFGNHGCSSGLMEKAYEYLR 60
CAA80445.1   QGQCGWCWAFSTTGAVEGQFRKNERASAFSEQLVDCSTRDFGNYCGGGYMENAYEYLR 60
CAA80448.1   QGQCGTCWAFATTVGVEGQYSRKYGSKTFSEQLVDCRRRHGNEGCNGGLMTSSRYRLM 60
              *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
              :.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

CAA80444.1   HFGLETESYSYRADEGPCQYDRQLGVAQVSGYFIVHSQDEVALKNLIGVEGPAVALDV 120
CAA80445.1   HNGLETESYYPYQAVEGPCQYDGRLAYAKVTGYTVHSGDEIELKNLVGTEDLPAVALDA 120
CAA80448.1   NNSLESEGDYPYAMDNRCRANRTRGIVKVSYTVLKNSETHSRSSWGTRGPVAVGIHA 120
              :.*:*:*.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
              :.*:*:*.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

CAA80444.1   NIDFMYRSGIYQDEICSSRYLNHAVLAVGYGTEGTDYWIWKNTW 166
CAA80445.1   DSDFMYQSGIYQSQTCLPDLRTHAVLAVGYGSDGTDYWIWKNSW 166
CAA80448.1   DDGFQFYSHGIYVSSTCSSWPANHGVLVVGYGAEANSPYWIWKNTW 166
              :.*:*:*.*:*:*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*
              :.*:*:*.*:*:*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*

```

Alignment data :
 Alignment length : 166
 Identity (*) : 67 is 40.36 %
 Strongly similar (.) : 21 is 12.65 %
 Weakly similar (:) : 34 is 20.48 %

Catepsina L

```

AAP49831.1 MWFVFLAVLTGVVGSNDLLHWQKRMYNNEYNAGDDQHRRNIWEENVKHIQEHNLRHDL 60
AAR99518.1 MRLFILAVLTGVVGSNDLLHWQKRMYNKEYNAGDDEHRRNIWEENVKHIQEHNLRHDL 60
AAB41670.2 MRLFVLAVLTGVVGSNDLLHWQKRMYNKEYNAGDDQHRRNIWEKNVKHIQEHNLRHDL 60
AAA29136.1 MRLFILAVLTGVVGSNDLLHWQKRMYNKEYNAGDDQHRRNIWEKNVKHIQEHNLRHDL 60
Q24940.1 MRLFILAVLTGVVGSNDLLHWQKRMYNKEYNAGDDQHRRNIWEKNVKHIQEHNLRHDL 60
AAT76664.1 MRLFILAVLTGVVGSNDLLHWQKRMYNKEYNAGDDQHRRNIWEKNVKHIQEHNLRHDL 60
BAA23743.1 MRLVILLLIVGVFASNDLLHWQKRIYNKEYKAGDDHRRNIWEQNVKHIQEHNLRHDL 60
AAA29137.1 MRLVILLLIVGVFASNDLLHWQKRIYNKEYKAGDDHRRNIWEQNVKHIQEHNLRHDL 60
AAF76330.1 MRCFVLAVLTGVVGSNDLLHWQKRIYNKEYNAGDDEHRRNIWGNVKHIQEHNLRHDL 60
ABQ95351.1 MRFFVLAVLTGVVGSNDLLHWQKRIYNKEYNAGDDEHRRNIWGNVKHIQEHNLRHDL 60
CAA80446.1 MRFFVLAVLTGVVGSNDLLHWQKRIYNKEYNAGDDEHRRNIWGNVKHIQEHNLRHDL 60
ABN50361.2 MRFFVLAVLTGVVGSNDLLHWQKRIYNKEYNAGDDEHRRNIWGNVKHIQEHNLRHDL 60
AAC47721.1 MRFFVLAVLTGVVGSNDLLHWQKRIYNKEYNAGDDEHRRNIWGNVKHIQEHNLRHDL 60
* .:.*.* ** * .*****:*.*:.* ** *:***** :*****.*
AAP49831.1 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYETNNRAVPDKIDWRESGYV 120
AAR99518.1 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYETNNRAVPDKIDWRESGYV 120
AAB41670.2 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYEANNRAVPDKIDWRESGYV 120
AAA29136.1 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYEANNRAVPDKIDWRESGYV 120
Q24940.1 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYEANNRAVPDKIDWRESGYV 120
AAT76664.1 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYEANNRAVPDKIDWRESGYV 120
BAA23743.1 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYEANNRAVPDKIDWRESGYV 120
AAA29137.1 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYEANNRAVPDKIDWRESGYV 120
AAF76330.1 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYEANNRAVPDKIDWRESGYV 120
ABQ95351.1 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYEANNRAVPDKIDWRESGYV 120
CAA80446.1 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYEANNRAVPDKIDWRESGYV 120
ABN50361.2 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYEANNRAVPDKIDWRESGYV 120
AAC47721.1 GLVTTYLGLNQFTDMTFEEFKAKYLTEMASDILSHGVPYEANNRAVPDKIDWRESGYV 120
*****.***** *:***** *:.*:.*:.*:.*:.*:.*:.*:.*:.*:.*:.*:.*:.*:.*:.*
AAP49831.1 TEVKDQNGCGSCWAFSTTGTMEGQYMKNERTSISFSEQQLVDCSGPWGNGCGGGLMENA 180
AAR99518.1 TEVKDQNGCGSCWAFSTTGTMEGQYMKNERTSISFSEQQLVDCSGPWGNGCGGGLMENA 180
AAB41670.2 TEVKDQNGCGSCWAFSTTGTMEGQYMKNERTSISFSEQQLVDCSRPWGNGCGGGLMENA 180
AAA29136.1 TEVKDQNGCGSCWAFSTTGTMEGQYMKNERTSISFSEQQLVDCSGPWGNGCGGGLMENA 180
Q24940.1 TEVKDQNGCGSCWAFSTTGTMEGQYMKNERTSISFSEQQLVDCSGPWGNGCGGGLMENA 180
AAT76664.1 TGVKDQNGCGSCWAFSTTGTMEGQYMKNERTSISFSEQQLVDCSGPWGNGCGGGLMENA 180
BAA23743.1 TEVKDQNGCGSCWAFSTTGTMEGQYMKNERTSISFSEQQLVDCSGPWGNYGCMGGLMENA 180
AAA29137.1 TEVKDQNGCGSCWAFSTTGAMEGQYMKNEKTSISFSEQQLVDCSGPFGNYGCGGGLMENA 180
AAF76330.1 TEVKDQNGCGSCWAFSTTGAMEGQYMKNQRTSISFSEQQLVDCSRDFGNYGCGGGLMENA 180
ABQ95351.1 TEVKDQNGCGSCWAFSTTGAVEGQFRKNERASASFSEQQLVDCRTRDFGNYGCGGGYVENA 180
CAA80446.1 TEVKDQNGCGSCWAFSTTGAVEGQFRKNERASASFSEQQLVDCRTRDFGNYGCGGGYVENA 180
ABN50361.2 TEVKDQNGCGSCWAFSTTGAVEGQFRKNERASASFSEQQLVDCRTRDFGNYGCGGGYVENA 180
AAC47721.1 TEVKDQNGCGSCWAFSTTGAVEGQFRKNERASASFSEQQLVDCRTRDFGNYGCGGGYVENA 180
* **:*.* *****: ***: **:*.* *****:*. ** ** ** :***
AAP49831.1 YQYLKQFGLTESSYPYTAVEGQCRYNKQLGVAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGAEGPAA 240
AAR99518.1 YQYLKQFGLTESSYPYTAVEGQCRYNKQLGVAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGAEGPAA 240
AAB41670.2 YQYLKQFGLTESSYPYTAVEGQCRYNKQLGVAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGAEGPAA 240
AAA29136.1 YQYLKQFGLTESSYPYTAVEGQCRYNKQLGVAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGAEGPAA 240
Q24940.1 YQYLKQFGLTESSYPYTAVEGQCRYNKQLGVAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGAEGPAA 240
AAT76664.1 YEYLKQFGLTESSYPYTAVEGQCRHNSKQLGVAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGAERPAA 240
BAA23743.1 YEYLKQFGLTESSYPYTAVEGQCRYNKQLGVAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGAEGPAA 240
AAA29137.1 YEYLKRFGLTESSYPYRAVEGQCRYNKQLGVAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGAERPAA 240
AAF76330.1 YEYLKRFGLTESSYPYRAVEGQCRYNKQLGVAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGAEGPAA 240
ABQ95351.1 YEYLKHNGLETESYYPYQAVEGPCQYDGRLAYAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGTGEPAA 240
CAA80446.1 YEYLKHNGLETESYYPYQAVEGPCQYDGRLAYAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGTEDLPA 240
ABN50361.2 YEYLKHNGLETESYYPYQAVEGPCQYDGRLAYAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGTGEPAA 240
AAC47721.1 YEYLKHNGLETESYYPYQAVEGPCQYDGRLAYAKVTGYTTPVSGSEVELKNLVGTGEPAA 240

```

```

AAP49831.1 VAVDVESDFMYSRSGIYQSQTCSPLRVNHAVLAVGYGTQGGTDYWIVKNSWGLSWGGERGY 300
AAR99518.1 VAVDVESDFMYSRSGIYQSQTCSPLSVNHAVLAVGYGTQGGTDYWIVKNSWGLSWGGERGY 300
AAB41670.2 VAVDVESDFMYSRSGIYQSQTCSPLRVNHAVLAVGYGTQGGTDYWIVKNSWGLSWGGERGY 300
AAA29136.1 VAVDVESDFMYSRSGIYQSQTCSPLRVNHAVLAVGYGTQGGTDYWIVKNSWGTYWGERGY 300
Q24940.1 VAVDVESDFMYSRSGIYQSQTCSPLRVNHAVLAVGYGTQGGTDYWIVKNSWGTYWGERGY 300
AAT76664.1 VAVDVESDFMYSRSGIYQSQTCSPLSVNHAVLAVGYGTQGGTDYWIVKNSWGLSWGGERGY 300
BAA23743.1 VAVDVESDFMYSRSGIYQSRTCSSLRVNHAVLAVGYGTQGGTDYWIVKNSWSSWGER-Y 299
AAA29137.1 VALDVESDFMYSRSGIYQSQTCSPLRVNHAVLAVGYGTQGGTDYWIVKNSWGTWWGEDGY 300
AAF76330.1 VALDVESDFMYSRSGIYQSQTCSPLRVNHAVLAVGYGTQGGTDYWIVKNSWGTWWGEDGY 300
ABQ95351.1 VALDADSDFMYSRSGIYQSQTCLPDRLETHAVLAVGYGSQDGTDYWIVKNSWGTWWGEDGY 300
CAA80446.1 VALDADSDFMYSRSGIYQSQTCLPDRLETHAVLAVGYGSQDGTDYWIVKNSWGTWWGEDGY 300
ABN50361.2 VALDADSDFMYSRSGIYQSQTCLPDRLETHAVLAVGYGSQDGTDYWIVKNSWGTWWGEDGY 300
AAC47721.1 VALDADSDFMYSRSGIYQSQTCLPDRLETHAVLAVGYGSQDGTDYWIVKNSWGTWWGEDGY 300
**.:***** .*****:* . :.*.***** *.***** ** *

AAR99518.1 IRMARNRGNMCGIASLASLEPIGTISV 326
AAB41670.2 IRMVRNRGNMCGIASLASLEPMVARFP 326
AAA29136.1 IRMARNRGNMCGIASLASLEPMVARFP 326
Q24940.1 IRMARNRGNMCGIASLASLEPMVARFP 326
AAT76664.1 IRMVRNRGNMCGIASLASLEPMVARFP 326
BAA23743.1 IRMVRNRGNMCGIASLASLEPMVARFP 325
AAA29137.1 IRMVRNRGNMCGIASLASLEPMVARFP 326
AAF76330.1 IRMVRNRGNMCGIASLASLEPMVARFP 326
ABQ95351.1 IRFARNRGNMCGIASLASLEPMVARFP 326
CAA80446.1 IRFARNRGNMCGIASLASLEPMVARFP 326
ABN50361.2 IRFARNRGNMCGIASLASLEPMVARFP 326
AAC47721.1 IRFARNRGNMCGIASLASLEPMVARFP 326
**.:*****:* :

```

Alignment data :
 Alignment length : 326
 Identity (*) : 215 is 65.95 %
 Strongly similar (.) : 46 is 14.11 %
 Weakly similar (.) : 19 is 5.83 %

Catepsina B

```

CAA80449.1 QGQCGWCWAFGAS-TMSDRICIASQGHKTPVLSAENMVDCC2SCGMCGNCGGFPPLKLSI 59
CAA80451.1 QGQCGTCWAFGAVGAMSDRVCIHSGQMKPHLSARDLLSCCFGRCRGGSPALAW--- 57
***** :*****:**: . * * * . : : . * * * * . * . *

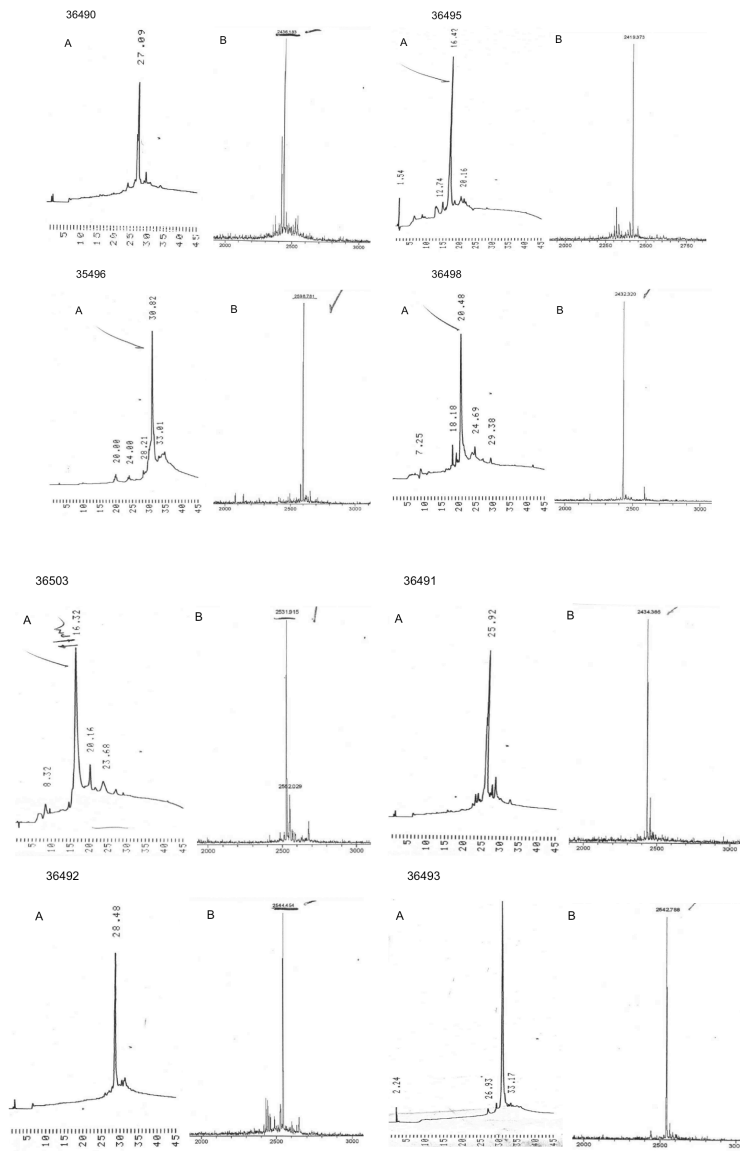
CAA80449.1 GKKTRSCHRWFEVRIERWMPITLVPISLRTSRDWTETPCNQDVTTPACKHTCRPGYNMITYOK 119
CAA80451.1 -----DYWK-----SSGIVTGGSLLEPTGCAPYFPFKCAHHGSSGGYKPCPE 99
: * . : * . * . . * * * . * . :

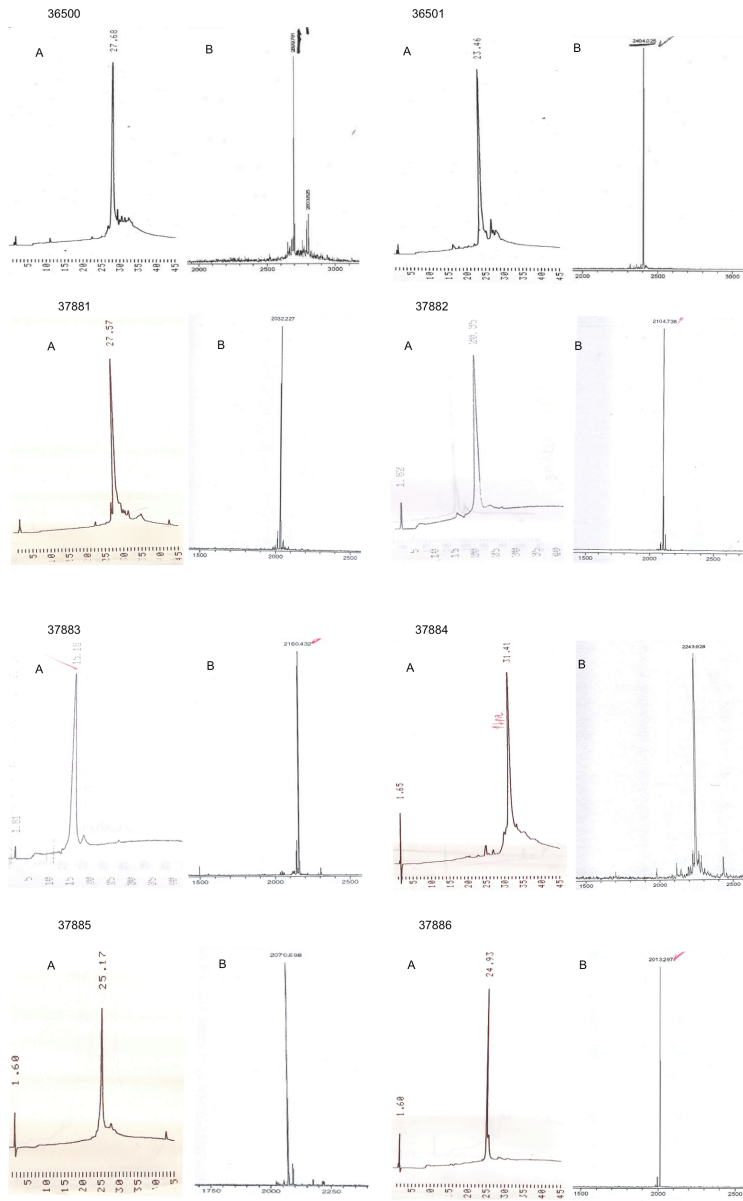
CAA80449.1 DKWYARTVYKVPADHRIMRELLTNGPMEVSEFEVYGDFFPSYKSGVYQ 166
CAA80451.1 EYYPA----- 104
: : *

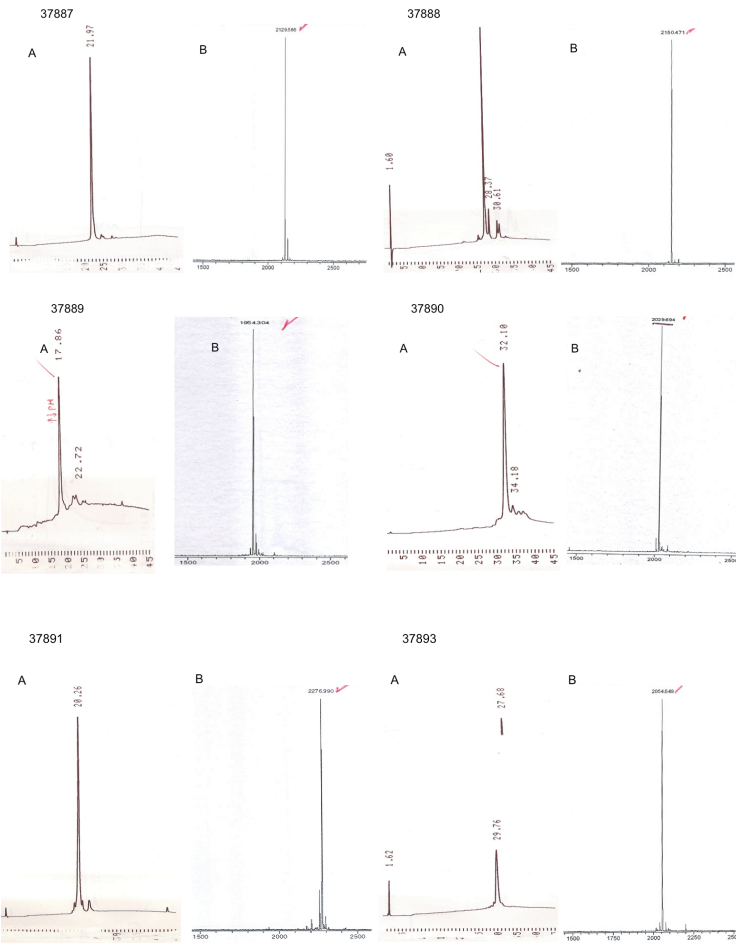
```

Alignment data :
 Alignment length : 167
 Identity (*) : 43 is 25.75 %
 Strongly similar (.) : 15 is 8.98 %
 Weakly similar (.) : 15 is 8.98 %

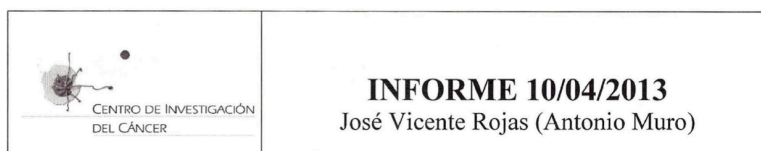
Anexo 3. Control de calidad de la síntesis y purificación de los péptidos. La letra A representa el cromatograma de RP-HPLC y la letra B el espectro de masas.







Anexo 4. Síntesis del ADNc e hibridación en el *Array Mouse Gene 1.0 ST* de *Affymetrix*



- **Análisis muestras RNA en Agilent 2100 Bioanalyzer**

Tipo de muestra: RNA total murino

(ver documento adjunto)

- **Síntesis del cDNA (1C) (Química II)**

Cantidad de RNA total de partida:

1.JV:	200,0 ng (2,0 µl dil1/5)
3.JV:	200,0 ng (1,2 µl dil1/2)
5.JV:	200,0 ng (1,2 µl dil1/2)
8 prima.JV:	200,0 ng (1,9 µl dil1/5)
12 prima.JV:	200,0 ng (3,8 µl)
10.JV:	200,0 ng (1,6 µl dil1/2)

- **Síntesis, limpieza y cuantificación del cRNA**

1.JV:	1,0 µg/µl
3.JV:	1,1 µg/µl
5.JV:	1,3 µg/µl
8 prima.JV:	0,3 µg/µl
12 prima.JV:	1,5 µg/µl
10.JV:	1,1 µg/µl

- **Síntesis del cDNA (2C)**

Cantidad de cRNA de partida:

1.JV:	10,0 µg (10,0 µl)
3.JV:	10,0 µg (9,1 µl)
5.JV:	10,0 µg (7,7 µl)
8 prima.JV:	10,0 µg (33,3 µl)
12 prima.JV:	10,0 µg (6,7 µl)
10.JV:	10,0 µg (9,1 µl)

- **Hidrólisis, purificación y cuantificación mediante Nanodrop del DNAss**

1.JV:	0,29 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
3.JV:	0,27 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
5.JV:	0,28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
8 prima.JV:	0,14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
12 prima.JV:	0,28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
10.JV:	0,27 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

- **Fragmentación y marcaje del DNAss**

Cantidad de DNAss de partida:

1.JV:	5,5 μg (19,0 μl)
3.JV:	5,5 μg (20,4 μl)
5.JV:	5,5 μg (19,6 μl)
8 prima.JV:	4,3 μg (30,0 μl)
12 prima.JV:	5,5 μg (19,6 μl)
10.JV:	5,5 μg (20,4 μl)

- **Análisis mediante Agilent 2100 Bioanalyzer del DNAss fragmentado**

(ver documento adjunto)

- **Hibridación y lavado Genechip**

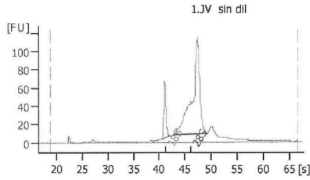
En la hibridación se han puesto 2,3 μg de DNAss fragmentado y marcado de cada muestra.

Tipo Genechip: Mouse Gene 1.0 ST Array
Lote: 4191627

Revisado por : Encarnación Ferriñán
Unidad de Genómica
Centro de Investigación del Cáncer
SALAMANCA

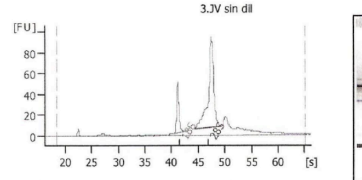
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Created: 3/20/2013 10:39:57 AM
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano DE72901998 2013-03-20 10-39-57.xad Modified: 4/9/2013 11:39:06 AM

Electropherogram Summary



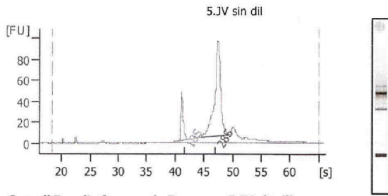
Overall Results for sample 1 : 1.JV sin dil
 RNA Area: 733.7
 RNA Concentration: 489 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 5.4
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (8.02,08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN:10
Fragment table for sample 1 : 1.JV sin dil

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.50	42.00	69.7	9.5
28S	42.82	49.35	378.7	51.6



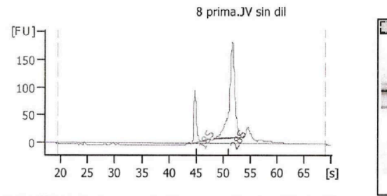
Overall Results for sample 5 : 3.JV sin dil
 RNA Area: 509.3
 RNA Concentration: 340 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 4.0
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (8.02,08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN:10
Fragment table for sample 5 : 3.JV sin dil

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.46	42.35	53.7	10.5
28S	44.29	49.35	215.8	42.4



Overall Results for sample 7 : 5.JV sin dil
 RNA Area: 476.3
 RNA Concentration: 318 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 4.3
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (8.02,08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN:10
Fragment table for sample 7 : 5.JV sin dil

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.52	42.78	55.1	11.6
28S	44.43	49.43	234.5	49.2



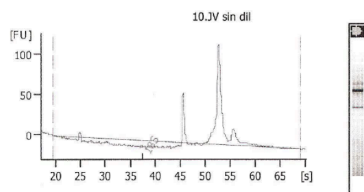
Overall Results for sample 12 : 8.prima.JV sin dil
 RNA Area: 779.7
 RNA Concentration: 520 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 3.7
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (8.02,08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN:10
Fragment table for sample 12 : 8.prima.JV sin dil

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	44.05	45.90	111.2	14.3
28S	48.40	53.60	410.4	52.6

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano DE72901998 2013-03-20 16-45-58.xad

Created: 3/20/2013 4:45:58 PM
 Modified: 4/9/2013 11:43:12 AM

Electropherogram Summary

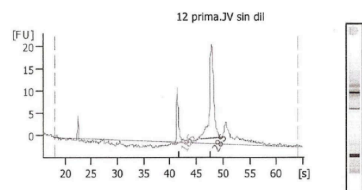


Overall Results for sample 12 : 10 JV sin dil

RNA Area: 397.9
 RNA Concentration: 252 ng/µl
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (8.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 12 : 10 JV sin dil

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	37.05	37.50	2.0	0.5



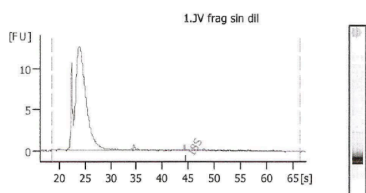
Overall Results for sample 12 : 12 prima JV sin dil

RNA Area: 92.2
 RNA Concentration: 52 ng/µl
 rRNA Ratio (28s / 18s): 3.1
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (8.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN:10

Fragment table for sample 12 : 12 prima JV sin dil

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	41.00	42.30	12.8	13.9
28S	45.79	49.58	39.6	42.9

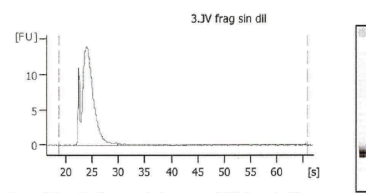
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano DE72901998 2013-04-08 10-35-31.xad
 Created: 4/8/2013 10:35:30 AM
 Modified: 4/8/2013 11:35:50 AM

Electropherogram Summary**Overall Results for sample 1 : 1.JV frag sin dil**

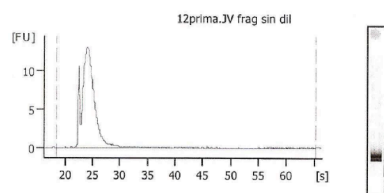
RNA Area: 129.0
 RNA Concentration: 87 ng/μl
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0
 RNA Integrity Number (RIN): 2.7 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 2.70

Fragment table for sample 1 : 1.JV frag sin dil

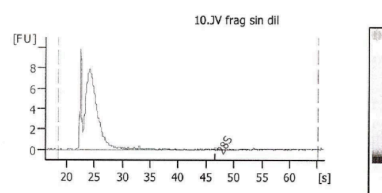
Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	44.18	44.57	0.3	0.3

**Overall Results for sample 2 : 3.JV frag sin dil**

RNA Area: 137.7
 RNA Concentration: 93 ng/μl
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0
 RNA Integrity Number (RIN): 2.6 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 2.60

**Overall Results for sample 4 : 12prima.JV frag sin dil**

RNA Area: 126.6
 RNA Concentration: 87 ng/μl
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0
 RNA Integrity Number (RIN): 2.6 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 2.60

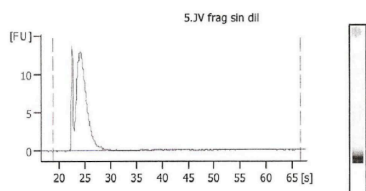
**Overall Results for sample 5 : 10.JV frag sin dil**

RNA Area: 79.2
 RNA Concentration: 54 ng/μl
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0
 RNA Integrity Number (RIN): 2.6 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 2.60

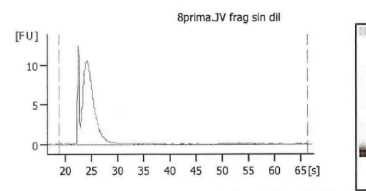
Fragment table for sample 5 : 10.JV frag sin dil

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
28S	48.37	48.94	0.1	0.2

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano DE72901998 2013-04-01 10-11-43.xad
 Created: 4/1/2013 10:11:43 AM
 Modified: 4/1/2013 10:41:54 AM

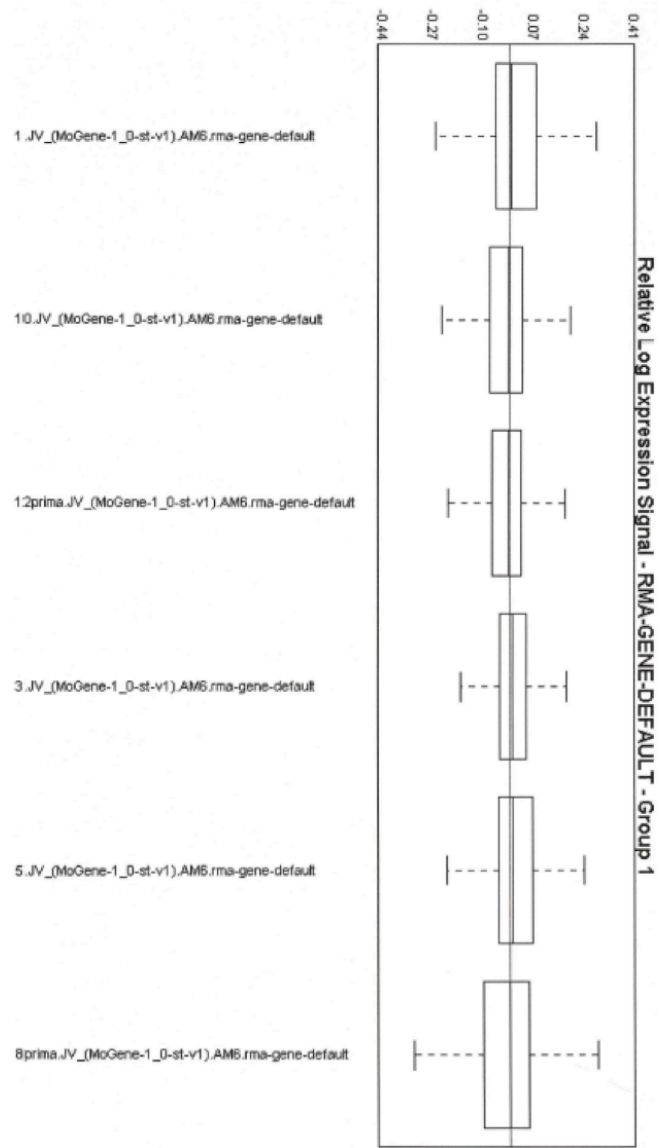
Electropherogram Summary**Overall Results for sample 7 : 5.JV frag sin dil**

RNA Area: 123.5
 RNA Concentration: 71 ng/μl
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0
 RNA Integrity Number (RIN): 2.6 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 2.60

**Overall Results for sample 8 : 8prima.JV frag sin dil**

RNA Area: 106.1
 RNA Concentration: 61 ng/μl
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0
 RNA Integrity Number (RIN): 2.6 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 2.60

File	bgrd_mean	pm_mean	all_probes et_mad_r esidual_m ean	all_probes et_rle_me an	pos_vs_ne g_auc
1.JV_(MoGene-1_0-st- v1).AM6.rma-gene-default	748.9487	1556.781	0.122643	0.120652	0.904601
10.JV_(MoGene-1_0-st- v1).AM6.rma-gene-default	814.6868	1506.992	0.129505	0.091394	0.906716
12prima.JV_(MoGene-1_0-st- v1).AM6.rma-gene-default	820.4305	1619.481	0.110116	0.088091	0.90959
3.JV_(MoGene-1_0-st- v1).AM6.rma-gene-default	780.1575	1455.711	0.106517	0.074134	0.901289
5.JV_(MoGene-1_0-st- v1).AM6.rma-gene-default	644.9094	1340.75	0.121744	0.10452	0.901926
8prima.JV_(MoGene-1_0-st- v1).AM6.rma-gene-default	582.9651	1039.166	0.159108	0.128239	0.908953



Anexo 5. Genes diferencialmente expresados tras la inmunización de ratones BALB/c con la combinación de péptidos con epítotos T

Identificador	Valor P	Fold	Símbolo
ENSMUSG00000031513	3.02E-03	0.762	Leprot1
ENSMUSG00000061815	2.51E-05	1.176	Rufy4
ENSMUSG00000037826	2.93E-05	0.614	Ppm1k
ENSMUSG00000045287	4.19E-05	0.699	Rtn4r1
ENSMUSG00000051457	5.03E-05	0.778	Spn
ENSMUSG00000025357	6.28E-05	0.775	Dgka
ENSMUSG00000037013	6.70E-05	0.716	Ss18
ENSMUSG00000049866	7.54E-05	0.831	Ar14c
ENSMUSG00000066684	8.79E-05	1.987	Pilrb1
ENSMUSG00000048521	9.21E-05	0.748	Cxcr6
ENSMUSG00000030180	1.01E-04	0.775	Kdm5a
ENSMUSG00000048000	1.05E-04	0.781	Gigyf2
ENSMUSG00000028514	1.13E-04	0.776	Usp24
ENSMUSG00000045359	1.38E-04	0.888	AC166252.4
ENSMUSG00000004110	1.47E-04	0.725	Cacna1e
ENSMUSG00000050310	1.55E-04	0.787	Rictor
ENSMUSG00000002325	1.59E-04	0.869	Irf9
ENSMUSG00000076548	1.63E-04	1.549	AC155844.4
ENSMUSG00000020859	1.68E-04	0.782	Spag9
ENSMUSG00000030114	1.76E-04	0.667	Klrg1
ENSMUSG00000070709	1.80E-04	0.865	1700049G17Rik
ENSMUSG00000042298	1.84E-04	0.836	Ttc19
ENSMUSG00000045362	1.88E-04	0.605	Tnfrsf26
ENSMUSG00000031230	1.97E-04	0.959	Fgf16
ENSMUSG00000052331	2.01E-04	0.721	Ankrd44
ENSMUSG00000025742	2.05E-04	0.839	Prps2
ENSMUSG00000000184	2.09E-04	0.648	Ccnd2
ENSMUSG00000079514	2.18E-04	0.412	Slc5a3
ENSMUSG00000039294	2.39E-04	0.526	BC017643
ENSMUSG00000049672	2.47E-04	0.906	Zfp161
ENSMUSG00000029389	2.51E-04	0.895	Ddx55
ENSMUSG00000025578	2.55E-04	0.656	Cbx8
ENSMUSG00000055069	2.68E-04	0.742	Rab39
ENSMUSG00000075583	2.72E-04	4.043	AC110211.1
ENSMUSG00000024399	2.81E-04	0.695	Ltb
ENSMUSG00000023927	2.85E-04	0.715	Satb1
ENSMUSG00000043308	2.89E-04	0.929	V1rg6
ENSMUSG00000030089	2.93E-04	1.231	Slc41a3
ENSMUSG00000042743	3.06E-04	1.066	Sgtb
ENSMUSG00000037029	3.14E-04	0.812	Zfp146
ENSMUSG00000056167	3.18E-04	0.786	Cnot10
ENSMUSG00000040389	3.27E-04	0.656	Wdr47
ENSMUSG00000026180	3.39E-04	3.402	Cxcr2
ENSMUSG0000006398	3.48E-04	1.824	Cdc20
ENSMUSG00000086502	3.56E-04	0.808	AC136146.1
ENSMUSG00000074861	3.60E-04	0.840	1810034E14Rik
ENSMUSG00000075033	3.64E-04	0.730	AC165151.1
ENSMUSG00000032611	3.73E-04	0.791	1700102P08Rik
ENSMUSG00000057706	3.77E-04	0.563	Mex3b
ENSMUSG00000079737	3.89E-04	0.613	3110001122Rik
ENSMUSG00000039701	3.94E-04	0.699	Usp53
ENSMUSG00000003418	3.98E-04	0.733	St8sia6
ENSMUSG00000020258	4.15E-04	0.864	Glyctk
ENSMUSG00000026473	4.19E-04	1.224	Glul
ENSMUSG00000030616	4.23E-04	0.752	Sytl2
ENSMUSG00000033760	4.52E-04	0.736	Rbm4b

Identificador	Valor P	Fold	Símbolo
ENSMUSG00000026147	3.03E-03	0.956	Col9a1
ENSMUSG00000084379	3.04E-03	1.585	AL645563.5
ENSMUSG00000025571	3.04E-03	0.786	Tnrc6c
ENSMUSG00000028394	3.05E-03	1.255	Pole3
ENSMUSG00000059482	3.05E-03	1.175	2610301B20Rik
ENSMUSG00000039774	3.06E-03	0.772	Galt12
ENSMUSG00000073411	3.07E-03	0.886	H2-L
ENSMUSG00000028080	3.07E-03	0.859	Lrba
ENSMUSG00000017737	3.07E-03	4.501	Mmp9
ENSMUSG00000023944	3.08E-03	0.758	Hsp90ab1
ENSMUSG00000040007	3.08E-03	0.854	Bahd1
ENSMUSG00000083261	3.09E-03	0.512	AC144779.1
ENSMUSG00000046031	3.10E-03	0.840	Fam26f
ENSMUSG00000019810	3.12E-03	1.278	Fuca2
ENSMUSG00000049932	3.13E-03	1.590	H2afx
ENSMUSG00000027274	3.13E-03	0.708	Mlks
ENSMUSG00000026778	3.15E-03	0.684	Prkcq
ENSMUSG00000046668	3.16E-03	0.805	Cxcr5
ENSMUSG00000043740	3.17E-03	2.466	B430306N03Rik
ENSMUSG00000042029	3.17E-03	2.629	Ncapg2
ENSMUSG00000005262	3.18E-03	0.882	Ufd1l
ENSMUSG00000076555	3.19E-03	1.239	AC158673.1
ENSMUSG00000015243	3.19E-03	0.756	Abca1
ENSMUSG00000053199	3.20E-03	0.911	Arhgap20
ENSMUSG00000048799	3.21E-03	0.870	Cep120
ENSMUSG00000036501	3.22E-03	0.818	Fam13b
ENSMUSG00000022387	3.22E-03	0.733	Brd1
ENSMUSG00000029135	3.23E-03	1.431	Fosl2
ENSMUSG00000051848	3.24E-03	0.646	AC164093.4
ENSMUSG00000022945	3.24E-03	1.764	Chaf1b
ENSMUSG00000039987	3.25E-03	0.713	Phf2
ENSMUSG00000022235	3.25E-03	1.672	Cmb1
ENSMUSG00000079889	3.25E-03	2.315	RP23-309E11.2
ENSMUSG00000076517	3.26E-03	1.605	AC140374.2
ENSMUSG00000068114	3.26E-03	0.785	Ccdc134
ENSMUSG00000005148	3.27E-03	1.521	Klf5
ENSMUSG00000063659	3.28E-03	0.708	Zfp238
ENSMUSG0000001029	3.28E-03	0.717	Icam2
ENSMUSG00000064262	3.29E-03	0.712	Gimap8
ENSMUSG00000027663	3.29E-03	0.709	Zmat3
ENSMUSG00000024659	3.30E-03	5.510	Anxa1
ENSMUSG00000039747	3.31E-03	0.760	Orai2
ENSMUSG00000024240	3.32E-03	0.809	Epc1
ENSMUSG00000036752	3.32E-03	1.317	Tubb2c
ENSMUSG00000032349	3.33E-03	0.623	Elovl5
ENSMUSG00000034764	3.33E-03	1.331	170006J14Rik
ENSMUSG00000044201	3.34E-03	2.287	Cdc25c
ENSMUSG00000041268	3.34E-03	1.837	Dmxl2
ENSMUSG00000018566	3.35E-03	1.777	Slc2a4
ENSMUSG00000050107	3.35E-03	1.234	Gsg2
ENSMUSG00000081641	3.36E-03	1.133	AL929226.2
ENSMUSG00000068551	3.38E-03	0.911	Zfp467
ENSMUSG00000025277	3.38E-03	0.652	Abhd6
ENSMUSG00000031262	3.39E-03	1.840	Cenpi
ENSMUSG00000045827	3.40E-03	0.773	Serpinb9
ENSMUSG00000032103	3.43E-03	0.714	Pus3

Identificador	Valor P	Fold	Símbolo	Identificador	Valor P	Fold	Símbolo
ENSMUSG00000072501	4.56E-04	0.806	Phf201i	ENSMUSG00000049130	3.43E-03	3.189	C5ar1
ENSMUSG00000072585	4.61E-04	1.047	AC123665.1	ENSMUSG00000039501	3.44E-03	0.904	Znfx1
ENSMUSG00000042742	4.69E-04	0.718	AC139884.2	ENSMUSG00000039109	3.46E-03	4.478	F13a1
ENSMUSG00000029416	4.73E-04	0.554	Slc15a4	ENSMUSG00000064147	3.47E-03	1.511	Rab44
ENSMUSG00000015355	4.77E-04	0.816	Cd48	ENSMUSG00000043241	3.49E-03	0.839	Upf2
ENSMUSG00000014177	4.82E-04	0.721	Fam18b	ENSMUSG00000030336	3.50E-03	0.777	Cd27
ENSMUSG00000021411	4.86E-04	0.624	1300014I06Rik	ENSMUSG00000023249	3.51E-03	0.662	Parp3
ENSMUSG00000024063	4.94E-04	0.741	Lbh	ENSMUSG00000020721	3.52E-03	0.760	Helz
ENSMUSG00000026696	4.98E-04	0.767	Vamp4	ENSMUSG00000037148	3.53E-03	0.907	Arhgap10
ENSMUSG00000027552	5.07E-04	0.760	E2f5	ENSMUSG00000024074	3.56E-03	0.729	Crim1
ENSMUSG00000074280	5.11E-04	1.278	AC125321.1	ENSMUSG00000074404	3.57E-03	0.928	Gm1698
ENSMUSG00000041720	5.15E-04	0.768	P4ka	ENSMUSG00000031979	3.58E-03	0.899	Cog2
ENSMUSG00000048251	5.19E-04	0.643	Bcl11b	ENSMUSG00000026637	3.58E-03	0.703	Traf5
ENSMUSG00000044308	5.23E-04	0.860	Ubr3	ENSMUSG00000025860	3.60E-03	0.803	Xiap
ENSMUSG00000020956	5.40E-04	1.197	6530401N04Rik	ENSMUSG0000006587	3.61E-03	0.837	Snai3
ENSMUSG00000076770	5.53E-04	0.798	AC126250.8	ENSMUSG00000034863	3.62E-03	0.807	Ano8
ENSMUSG00000073557	5.65E-04	0.853	Ppp1r12b	ENSMUSG00000038582	3.63E-03	0.680	Pptc7
ENSMUSG00000047473	5.70E-04	0.901	Zfp30	ENSMUSG00000037946	3.65E-03	0.737	Fgd3
ENSMUSG0000007891	5.86E-04	1.345	Ctsd	ENSMUSG00000041530	3.66E-03	0.709	Eif2c1
ENSMUSG00000045551	5.95E-04	3.246	Fpr1	ENSMUSG00000040599	3.66E-03	0.813	Mis12
ENSMUSG00000029449	5.99E-04	0.579	Rhof	ENSMUSG00000083539	3.70E-03	0.881	AL772174.2
ENSMUSG00000042462	6.03E-04	1.191	Dctpp1	ENSMUSG00000018169	3.73E-03	0.730	Mfng
ENSMUSG00000063052	6.07E-04	1.417	Lrrc40	ENSMUSG00000028737	3.75E-03	0.844	Aldh4a1
ENSMUSG00000039634	6.20E-04	0.778	Zfp189	ENSMUSG00000028974	3.76E-03	0.817	Dffa
ENSMUSG00000030276	6.24E-04	0.695	Ttli3	ENSMUSG00000030325	3.78E-03	0.872	Klrb1c
ENSMUSG00000026617	6.32E-04	0.636	Bpnt1	ENSMUSG00000037720	3.81E-03	0.754	Tmem33
ENSMUSG00000022696	6.45E-04	0.646	Sidt1	ENSMUSG00000027463	3.84E-03	0.787	2310046K01Rik
ENSMUSG00000022434	6.49E-04	0.810	Fam118a	ENSMUSG00000056962	3.85E-03	0.739	Jmjd6
ENSMUSG00000037263	6.53E-04	1.359	1700055N04Rik	ENSMUSG00000030775	3.87E-03	0.443	Trat1
ENSMUSG00000019820	6.78E-04	0.650	Utrn	ENSMUSG00000040899	3.87E-03	0.775	Ccr6
ENSMUSG00000056481	7.04E-04	1.136	Cd248	ENSMUSG00000060108	3.88E-03	0.961	Olfir741
ENSMUSG00000030871	7.08E-04	0.766	Ears2	ENSMUSG00000043183	3.88E-03	0.752	4732471D19Rik
ENSMUSG00000024451	7.16E-04	1.552	Arap3	ENSMUSG00000055960	3.90E-03	0.967	Skint4
ENSMUSG00000048148	7.20E-04	1.120	Nwd1	ENSMUSG00000034826	3.92E-03	0.888	Nup54
ENSMUSG00000027207	7.24E-04	0.775	Galk2	ENSMUSG00000032733	3.92E-03	0.780	Snx33
ENSMUSG00000042121	7.33E-04	0.832	Ssh1	ENSMUSG00000020781	3.92E-03	0.787	Tsen54
ENSMUSG00000067649	7.41E-04	0.978	Mageb18	ENSMUSG0000002455	3.94E-03	0.866	Prpf6
ENSMUSG00000062232	7.45E-04	0.695	Rapgef2	ENSMUSG00000018341	3.94E-03	0.727	Il12rb2
ENSMUSG00000027340	7.58E-04	0.780	Slc23a2	ENSMUSG00000052142	3.95E-03	0.697	Rasal3
ENSMUSG00000021182	7.62E-04	0.740	Ccdc88c	ENSMUSG00000042032	3.96E-03	0.883	Mat2b
ENSMUSG00000022914	7.66E-04	0.672	Brwd1	ENSMUSG00000037913	3.97E-03	0.843	AC124428.1
ENSMUSG0000005696	7.71E-04	0.700	Sh2d1a	ENSMUSG00000071456	3.98E-03	0.699	1110002L01Rik
ENSMUSG00000025492	7.79E-04	2.034	Ifitm3	ENSMUSG00000021277	3.99E-03	0.711	Traf3
ENSMUSG00000050239	7.83E-04	1.099	Krtap24-1	ENSMUSG00000031101	3.99E-03	0.772	Sash3
ENSMUSG00000057738	7.87E-04	0.721	Spna2	ENSMUSG00000035900	4.00E-03	0.858	Gramd4
ENSMUSG00000073603	7.91E-04	0.696	AC121821.3	ENSMUSG00000037104	4.02E-03	0.860	Socs5
ENSMUSG00000037533	7.96E-04	0.838	Rapgef6	ENSMUSG00000039157	4.03E-03	0.776	Fam102a
ENSMUSG00000022679	8.00E-04	1.265	Mpv17l	ENSMUSG00000016181	4.05E-03	0.812	AA408296
ENSMUSG00000084413	8.08E-04	1.166	AL627070.2	ENSMUSG00000048787	4.05E-03	0.808	Dcun1d3
ENSMUSG00000073471	8.12E-04	1.212	Rsph3a	ENSMUSG00000025402	4.05E-03	0.651	Nab2
ENSMUSG00000036151	8.17E-04	0.862	Tm6sf2	ENSMUSG00000028273	4.07E-03	0.774	Pdlim5
ENSMUSG00000060671	8.21E-04	0.613	Atp8b2	ENSMUSG00000065904	4.07E-03	0.889	SNORD63
ENSMUSG00000073058	8.25E-04	0.938	AC111030.1	ENSMUSG00000052684	4.09E-03	0.630	Jun
ENSMUSG00000036853	8.29E-04	0.641	Mcoln3	ENSMUSG00000071669	4.10E-03	0.691	Snx29
ENSMUSG00000025044	8.42E-04	1.638	Msr1	ENSMUSG00000025821	4.11E-03	0.867	Zfp282
ENSMUSG00000028410	8.54E-04	0.340	Dnaja1	ENSMUSG00000057229	4.11E-03	0.782	Atp5sl
ENSMUSG00000017376	8.58E-04	0.718	Nlk	ENSMUSG00000044636	4.13E-03	0.733	Csrmp2
ENSMUSG00000066682	8.67E-04	2.154	Pilrb2	ENSMUSG00000047889	4.18E-03	0.982	RP23-3N21.1
ENSMUSG00000029136	8.71E-04	1.113	Rbks	ENSMUSG00000052760	4.20E-03	0.769	A630001G21Rik
ENSMUSG00000030361	8.84E-04	0.729	Klrb1a	ENSMUSG00000041471	4.21E-03	0.905	Fam35a
ENSMUSG00000036568	8.88E-04	0.852	BC032203	ENSMUSG00000019916	4.22E-03	0.461	P4ha1

Identificador	Valor P	Fold	Símbolo	Identificador	Valor P	Fold	Símbolo
ENSMUSG00000070738	9.00E-04	0.780	Dgkd	ENSMUSG00000029992	4.26E-03	0.818	Gfpt1
ENSMUSG00000019866	9.05E-04	0.738	Aim1	ENSMUSG00000018846	4.26E-03	0.769	Pank3
ENSMUSG00000078667	9.09E-04	0.652	1700094D03Rik	ENSMUSG00000058587	4.28E-03	0.766	Tmod3
ENSMUSG00000045751	9.13E-04	1.425	F730047E07Rik	ENSMUSG00000025352	4.28E-03	0.648	Gdf11
ENSMUSG00000038240	9.17E-04	0.916	Pdss2	ENSMUSG00000026854	4.29E-03	0.841	Usp20
ENSMUSG00000021400	9.25E-04	0.845	Wrmip1	ENSMUSG00000031577	4.31E-03	0.893	BC019943
ENSMUSG00000037523	9.51E-04	0.590	Mavs	ENSMUSG00000033653	4.32E-03	0.912	Vps8
ENSMUSG00000018899	9.55E-04	0.721	Irf1	ENSMUSG00000030031	4.33E-03	0.789	Kbtbd8
ENSMUSG00000021240	9.59E-04	0.920	Abcd4	ENSMUSG00000045598	4.33E-03	0.765	Zfp553
ENSMUSG00000056821	9.76E-04	0.817	1700028116Rik	ENSMUSG00000030655	4.34E-03	0.722	Smg1
ENSMUSG00000062609	9.80E-04	0.953	Kcnj15	ENSMUSG00000026924	4.35E-03	0.859	Sec16a
ENSMUSG00000061666	9.88E-04	1.631	Gdpd1	ENSMUSG00000079184	4.35E-03	0.716	Mphosph8
ENSMUSG00000074802	1.01E-03	1.719	Gas2l3	ENSMUSG00000008686	4.36E-03	0.813	Zfp422-rs1
ENSMUSG00000033285	1.01E-03	0.766	Wdr3	ENSMUSG00000025873	4.36E-03	0.930	Faf2
ENSMUSG00000020288	1.01E-03	0.434	Ahsa2	ENSMUSG00000049232	4.38E-03	0.735	Tigd2
ENSMUSG00000040952	1.02E-03	0.779	Rps19	ENSMUSG00000031608	4.38E-03	0.705	Galnt7
ENSMUSG00000061894	1.03E-03	0.749	Zscan20	ENSMUSG00000022684	4.38E-03	0.717	Bfar
ENSMUSG00000055700	1.04E-03	0.939	RP23-166N12.1	ENSMUSG00000067203	4.41E-03	0.858	CR974462.2
ENSMUSG00000044864	1.06E-03	0.847	Ankrd50	ENSMUSG00000029209	4.41E-03	0.776	Gnpda2
ENSMUSG00000031697	1.07E-03	1.390	Orc6l	ENSMUSG00000053286	4.42E-03	0.764	1190005F20Rik
ENSMUSG00000024350	1.08E-03	0.738	Dnajc18	ENSMUSG00000026339	4.44E-03	0.837	Ccdc93
ENSMUSG00000028053	1.08E-03	0.756	Ash1l	ENSMUSG00000024457	4.45E-03	0.819	Trim26
ENSMUSG00000021288	1.09E-03	0.818	Klcl	ENSMUSG00000063646	4.46E-03	0.708	Jakmip1
ENSMUSG00000030187	1.10E-03	1.317	Klra2	ENSMUSG00000031258	4.46E-03	0.594	Xkrx
ENSMUSG00000022228	1.10E-03	0.717	Zfp187	ENSMUSG00000044709	4.47E-03	0.892	Gemin7
ENSMUSG00000030790	1.11E-03	0.814	Adm	ENSMUSG00000041650	4.47E-03	0.864	Pcca
ENSMUSG00000076501	1.11E-03	1.230	AC124758.2	ENSMUSG00000045775	4.51E-03	0.682	Slc16a5
ENSMUSG00000076824	1.12E-03	0.902	X76971	ENSMUSG00000058318	4.52E-03	0.858	Phf21a
ENSMUSG00000060703	1.12E-03	1.434	Cd302	ENSMUSG00000027339	4.54E-03	0.785	Rassf2
ENSMUSG00000072421	1.13E-03	1.698	AC126673.1	ENSMUSG00000027111	4.54E-03	0.628	Itga6
ENSMUSG00000073861	1.13E-03	0.658	AC104918.2	ENSMUSG00000021488	4.59E-03	0.772	Nsd1
ENSMUSG00000006599	1.13E-03	0.863	Gtf2h1	ENSMUSG00000042570	4.60E-03	0.806	Mier2
ENSMUSG00000031644	1.14E-03	0.815	Nek1	ENSMUSG00000079363	4.61E-03	0.713	Gbp4
ENSMUSG00000030102	1.16E-03	0.730	Itpr1	ENSMUSG00000020156	4.61E-03	0.870	Mum1
ENSMUSG00000022401	1.17E-03	0.789	Xpnpep3	ENSMUSG00000026594	4.62E-03	0.737	Ralgps2
ENSMUSG00000034218	1.17E-03	0.702	Atm	ENSMUSG00000024287	4.63E-03	0.846	Thoc1
ENSMUSG00000051166	1.18E-03	0.835	Eml5	ENSMUSG00000035042	4.65E-03	0.787	Cd5
ENSMUSG00000030760	1.18E-03	1.715	Acer3	ENSMUSG00000057982	4.65E-03	0.709	Zfp809
ENSMUSG00000030144	1.19E-03	2.432	Clec4d	ENSMUSG00000046667	4.66E-03	0.613	Rbm12b
ENSMUSG00000064064	1.19E-03	0.784	AC123838.1	ENSMUSG00000006705	4.68E-03	0.719	Pknx1
ENSMUSG00000025237	1.19E-03	0.733	Parp6	ENSMUSG00000032480	4.69E-03	0.795	Dhx30
ENSMUSG00000001281	1.20E-03	0.715	Itgb7	ENSMUSG00000000409	4.72E-03	0.709	Lck
ENSMUSG00000046442	1.20E-03	0.862	Ppm1e	ENSMUSG00000039219	4.72E-03	0.755	Arid4b
ENSMUSG00000026158	1.21E-03	1.834	Ogfr1	ENSMUSG00000026626	4.72E-03	0.866	Ppp2r5a
ENSMUSG00000027189	1.21E-03	0.845	Trim44	ENSMUSG00000037202	4.73E-03	0.651	Prf1
ENSMUSG00000040481	1.22E-03	0.776	Bptf	ENSMUSG00000029552	4.74E-03	0.732	Tes
ENSMUSG00000036887	1.23E-03	1.651	C1qa	ENSMUSG00000051124	4.76E-03	0.662	Gimap9
ENSMUSG00000014633	1.24E-03	1.248	2310061C15Rik	ENSMUSG00000034724	4.77E-03	0.748	Cnot6l
ENSMUSG00000040687	1.24E-03	0.747	Madd	ENSMUSG00000048027	4.78E-03	0.828	Rgmb
ENSMUSG00000062593	1.24E-03	3.168	Gp49a	ENSMUSG00000037110	4.81E-03	0.857	Ralgapa2
ENSMUSG00000028314	1.26E-03	0.952	4930547C10Rik	ENSMUSG00000001774	4.82E-03	0.449	Chordc1
ENSMUSG00000066643	1.26E-03	1.185	Wdr35	ENSMUSG00000057161	4.83E-03	0.966	V1rg3
ENSMUSG00000032739	1.26E-03	3.956	Pram1	ENSMUSG00000027742	4.85E-03	0.851	Cog6
ENSMUSG00000031360	1.27E-03	0.734	Ctsp2	ENSMUSG00000020385	4.91E-03	0.797	Clk4
ENSMUSG00000025085	1.29E-03	0.783	Ablim1	ENSMUSG00000042644	4.97E-03	0.727	Itpr3
ENSMUSG00000003847	1.29E-03	0.723	Nfat5	ENSMUSG00000053617	4.98E-03	0.772	Sh3pxd2a
ENSMUSG00000000732	1.29E-03	0.788	Icosl	ENSMUSG00000024045	4.98E-03	0.786	Akap8
ENSMUSG00000025372	1.30E-03	0.707	Baiap2	ENSMUSG00000020561	4.99E-03	0.794	Twistnb
ENSMUSG00000035448	1.31E-03	1.655	Cr3	ENSMUSG00000052144	5.05E-03	0.752	Ppp4r2
ENSMUSG00000024742	1.31E-03	1.492	Fen1	ENSMUSG00000029359	5.07E-03	0.871	Tesc
ENSMUSG00000028149	1.32E-03	0.756	Rap1gds1	ENSMUSG00000019907	5.07E-03	0.881	Ppp1r12a

Identificador	Valor P	Fold	Símbolo	Identificador	Valor P	Fold	Símbolo
ENSMUSG0000006920	1.34E-03	0.864	Ezh1	ENSMUSG00000034833	5.09E-03	0.624	5830405N2ORik
ENSMUSG00000028062	1.36E-03	0.895	Robld3	ENSMUSG00000039158	5.10E-03	0.699	Akna
ENSMUSG00000073707	1.37E-03	0.738	D1Ert448e	ENSMUSG00000027131	5.10E-03	0.816	Tmem85
ENSMUSG00000044037	1.38E-03	0.629	Als2cl	ENSMUSG00000032528	5.10E-03	0.611	Vipr1
ENSMUSG00000028952	1.39E-03	0.783	Zbtb48	ENSMUSG00000022186	5.12E-03	0.805	Oxct1
ENSMUSG00000015568	1.39E-03	1.658	Lpl	ENSMUSG00000066415	5.14E-03	0.807	Msl2
ENSMUSG00000024011	1.41E-03	1.524	Phr16	ENSMUSG00000038611	5.15E-03	0.825	Phrf1
ENSMUSG00000030872	1.41E-03	0.763	Gga2	ENSMUSG00000009013	5.15E-03	0.728	Dynll1
ENSMUSG00000031132	1.42E-03	0.575	Cd40lg	ENSMUSG00000053044	5.17E-03	0.699	Cd8b1
ENSMUSG00000056121	1.42E-03	1.085	Fez2	ENSMUSG00000031838	5.18E-03	0.740	Ifi30
ENSMUSG00000055493	1.43E-03	1.112	Epm2a	ENSMUSG00000057796	5.19E-03	0.680	AC135567.2
ENSMUSG00000039428	1.43E-03	0.789	Tmem135	ENSMUSG00000005465	5.20E-03	0.739	Il27ra
ENSMUSG00000067653	1.44E-03	0.690	Ankrd23	ENSMUSG00000032572	5.23E-03	0.829	Dwwa
ENSMUSG00000041560	1.45E-03	0.903	Gltscr2	ENSMUSG00000031532	5.23E-03	0.701	Tmem66
ENSMUSG00000006675	1.45E-03	0.932	P4htm	ENSMUSG00000053907	5.24E-03	0.738	Mat2a
ENSMUSG00000056742	1.46E-03	0.443	AC124417.1	ENSMUSG00000028121	5.25E-03	0.742	Bcar3
ENSMUSG00000041264	1.47E-03	0.553	Usp1	ENSMUSG00000027692	5.27E-03	0.714	AC121268.1
ENSMUSG00000020220	1.48E-03	0.853	Vps13d	ENSMUSG00000029701	5.27E-03	0.807	Rbm28
ENSMUSG00000064682	1.49E-03	1.529	U2	ENSMUSG00000046532	5.30E-03	0.705	Ar
ENSMUSG00000060301	1.49E-03	0.680	2610008E11Rik	ENSMUSG00000024383	5.30E-03	0.673	Map3k2
ENSMUSG00000028560	1.50E-03	1.282	Usp1	ENSMUSG00000037318	5.32E-03	0.718	Traf3ip3
ENSMUSG00000025764	1.51E-03	0.838	Phf17	ENSMUSG00000020594	5.33E-03	0.904	Pum2
ENSMUSG00000037999	1.54E-03	0.738	Arap2	ENSMUSG00000016933	5.33E-03	0.649	Plcg1
ENSMUSG00000037573	1.54E-03	0.683	Tob1	ENSMUSG00000022801	5.34E-03	0.832	Lrch3
ENSMUSG00000026661	1.55E-03	0.776	Alkbh7	ENSMUSG00000065564	5.36E-03	0.959	mmu-let-7b
ENSMUSG00000020974	1.55E-03	1.542	Pole2	ENSMUSG00000033014	5.38E-03	0.831	Trim33
ENSMUSG00000037606	1.56E-03	0.839	Osbp15	ENSMUSG00000034973	5.39E-03	0.730	Dopey1
ENSMUSG00000031696	1.57E-03	1.121	Vps35	ENSMUSG00000027739	5.41E-03	0.867	Rab33b
ENSMUSG00000040658	1.57E-03	1.595	BC048355	ENSMUSG00000033671	5.42E-03	0.780	Cep350
ENSMUSG00000020063	1.57E-03	0.898	Sirt1	ENSMUSG00000025436	5.43E-03	0.838	Xrcc6bp1
ENSMUSG00000064612	1.58E-03	0.871	SNORD51	ENSMUSG00000026207	5.47E-03	0.957	Speg
ENSMUSG00000036053	1.59E-03	1.302	Fmnl2	ENSMUSG00000018999	5.47E-03	0.856	Slc35b4
ENSMUSG00000038291	1.60E-03	0.714	Snx25	ENSMUSG00000042351	5.48E-03	0.785	Grap2
ENSMUSG00000028467	1.60E-03	0.743	Gba2	ENSMUSG00000018381	5.49E-03	0.737	Abi3
ENSMUSG00000029647	1.60E-03	0.833	Pan3	ENSMUSG00000020482	5.51E-03	0.477	Ccdc117
ENSMUSG00000032898	1.62E-03	0.778	Fbxo21	ENSMUSG00000033059	5.51E-03	0.770	Pygb
ENSMUSG00000056054	1.62E-03	5.934	S100a8	ENSMUSG00000055041	5.52E-03	0.848	CommD5
ENSMUSG00000028145	1.63E-03	0.900	Them4	ENSMUSG00000024143	5.53E-03	0.655	Rhoq
ENSMUSG000000065232	1.64E-03	1.549	U2	ENSMUSG00000022280	5.54E-03	0.881	Narf1
ENSMUSG00000002028	1.66E-03	0.715	Mll1	ENSMUSG00000006134	5.54E-03	0.843	Crkl
ENSMUSG00000037095	1.66E-03	6.606	Lrg1	ENSMUSG00000006782	5.54E-03	0.802	Cnp
ENSMUSG00000030287	1.67E-03	0.792	Itpr2	ENSMUSG00000001248	5.55E-03	0.700	Gramd1a
ENSMUSG00000066306	1.68E-03	0.912	Numa1	ENSMUSG00000024188	5.56E-03	0.743	Luc7l
ENSMUSG00000027360	1.68E-03	2.995	Hdc	ENSMUSG00000047909	5.57E-03	0.797	Ankrd16
ENSMUSG00000007613	1.69E-03	0.774	Tgfbr1	ENSMUSG00000008193	5.58E-03	0.744	Spib
ENSMUSG00000031864	1.69E-03	1.249	Ints10	ENSMUSG00000029633	5.60E-03	0.870	RP24-350P11.1
ENSMUSG00000047969	1.70E-03	1.049	Olf1093	ENSMUSG00000004568	5.61E-03	0.746	Arhgef18
ENSMUSG00000030589	1.70E-03	2.199	Rasgrp4	ENSMUSG00000049588	5.61E-03	0.775	Ccdc69
ENSMUSG00000018925	1.71E-03	0.873	RP23-320E6.1	ENSMUSG00000034586	5.62E-03	0.696	C630004H02Rik
ENSMUSG00000040570	1.72E-03	0.726	Rundc3b	ENSMUSG00000015127	5.67E-03	0.705	Unkl
ENSMUSG00000029407	1.72E-03	0.866	Uso1	ENSMUSG00000024136	5.71E-03	0.830	Dnase12
ENSMUSG00000020687	1.73E-03	1.224	Cdc27	ENSMUSG00000027194	5.74E-03	0.893	Ttc17
ENSMUSG00000072718	1.75E-03	0.919	Klra10	ENSMUSG00000074497	5.75E-03	0.656	A430078G23Rik
ENSMUSG00000031537	1.77E-03	0.737	Ikbkb	ENSMUSG00000033799	5.75E-03	0.773	BC016423
ENSMUSG00000035783	1.77E-03	1.640	Acta2	ENSMUSG00000029474	5.77E-03	0.805	Rnf34
ENSMUSG00000030671	1.78E-03	0.564	Pde3b	ENSMUSG00000013698	5.79E-03	0.836	Pea15a
ENSMUSG00000001053	1.78E-03	0.811	C330016G10Rik	ENSMUSG00000058013	5.80E-03	0.811	40787
ENSMUSG00000055897	1.78E-03	0.940	Ppp4r1l	ENSMUSG00000044949	5.81E-03	0.903	Ubt2d
ENSMUSG00000031119	1.80E-03	1.411	Gpc4	ENSMUSG00000015002	5.83E-03	0.771	Efr3a
ENSMUSG00000038855	1.81E-03	0.681	Itpkb	ENSMUSG00000025337	5.83E-03	0.813	Sbds
ENSMUSG00000034525	1.81E-03	0.692	BC018507	ENSMUSG00000028397	5.85E-03	0.758	Kdm4c

Identificador	Valor P	Fold	Símbolo	Identificador	Valor P	Fold	Símbolo
ENSMUSG00000020042	1.82E-03	0.767	Btbd11	ENSMUSG00000020143	5.85E-03	0.855	Dock2
ENSMUSG00000044863	1.83E-03	1.054	Defb36	ENSMUSG00000055170	5.85E-03	0.708	lfng
ENSMUSG00000036768	1.84E-03	2.172	Kif15	ENSMUSG00000074804	5.87E-03	0.932	RP23-20A6.1
ENSMUSG00000030870	1.85E-03	0.577	Ubfd1	ENSMUSG00000053289	5.88E-03	0.850	Ddx10
ENSMUSG00000039990	1.88E-03	0.772	2700050L05Rik	ENSMUSG00000075297	5.89E-03	0.727	H60b
ENSMUSG00000027285	1.88E-03	1.450	Haus2	ENSMUSG00000039801	5.90E-03	0.770	2410089E03Rik
ENSMUSG00000041147	1.89E-03	1.887	Brca2	ENSMUSG00000028060	5.90E-03	0.728	2810403A07Rik
ENSMUSG00000021707	1.90E-03	1.684	Dhfr	ENSMUSG00000024670	5.97E-03	0.756	Cd6
ENSMUSG00000042558	1.91E-03	0.869	Adprhl2	ENSMUSG00000034610	5.98E-03	0.769	Zcchc11
ENSMUSG00000029627	1.91E-03	0.733	Zkscan14	ENSMUSG00000030366	5.98E-03	0.954	Ceacam12
ENSMUSG00000074796	1.91E-03	0.763	Slc4a11	ENSMUSG00000019861	6.05E-03	0.786	Gopc
ENSMUSG00000050592	1.92E-03	0.737	Fam78a	ENSMUSG00000015597	6.06E-03	0.788	Zfp318
ENSMUSG00000029787	1.93E-03	0.719	Avl9	ENSMUSG00000060579	6.08E-03	0.720	Fhit
ENSMUSG00000055782	1.93E-03	2.557	Abcd2	ENSMUSG00000046808	6.09E-03	0.766	Atp10d
ENSMUSG00000052749	1.94E-03	1.407	A530023O14Rik	ENSMUSG00000036391	6.13E-03	0.772	Sec23a
ENSMUSG00000030142	1.95E-03	4.446	Clec4e	ENSMUSG00000019841	6.14E-03	0.769	Rev3l
ENSMUSG00000065561	1.96E-03	1.020	mmu-mir-369	ENSMUSG00000027582	6.14E-03	0.698	Lime1
ENSMUSG00000021041	1.97E-03	0.832	Alkbh1	ENSMUSG00000028344	6.14E-03	0.776	Invs
ENSMUSG00000034361	1.97E-03	2.079	Cpne2	ENSMUSG00000050668	6.15E-03	0.833	Ccdc75
ENSMUSG00000037022	1.98E-03	0.870	Mmaa	ENSMUSG00000032946	6.15E-03	0.750	Rasgrp2
ENSMUSG00000038563	1.99E-03	0.806	Eftud1	ENSMUSG00000047767	6.16E-03	0.750	Atg16l2
ENSMUSG00000071054	1.99E-03	0.770	CT485788.3	ENSMUSG00000018974	6.16E-03	0.877	Sart3
ENSMUSG00000021532	2.00E-03	0.793	Fastkd3	ENSMUSG00000021156	6.19E-03	0.801	Zmynd11
ENSMUSG00000038069	2.00E-03	0.736	Cdkn2aip	ENSMUSG00000034055	6.20E-03	0.766	Phka1
ENSMUSG00000065125	2.01E-03	1.292	5S_rRNA	ENSMUSG00000034438	6.21E-03	0.713	Gbp8
ENSMUSG00000024780	2.02E-03	0.866	Cdc371A	ENSMUSG00000024070	6.26E-03	0.695	Prkd3
ENSMUSG00000076719	2.02E-03	1.364	Gm9740	ENSMUSG00000046679	6.26E-03	0.789	C87436
ENSMUSG00000034774	2.03E-03	0.951	Dsg1c	ENSMUSG00000065563	6.29E-03	0.793	mmu-mir-103-2
ENSMUSG00000024164	2.04E-03	2.945	C3	ENSMUSG00000069769	6.30E-03	0.899	Msi2
ENSMUSG00000042473	2.04E-03	0.766	Tbc1d8b	ENSMUSG00000029524	6.31E-03	0.850	Sirt4
ENSMUSG00000021190	2.04E-03	1.213	Lgmn	ENSMUSG00000057230	6.32E-03	0.793	Aak1
ENSMUSG00000071660	2.05E-03	0.776	Ttc9c	ENSMUSG00000022521	6.32E-03	0.880	Crebbp
ENSMUSG00000030231	2.05E-03	0.757	Plekha5	ENSMUSG00000036281	6.32E-03	0.764	Snappc4
ENSMUSG00000031622	2.06E-03	0.694	Sin3b	ENSMUSG00000025010	6.35E-03	0.797	Ccnj
ENSMUSG00000000159	2.06E-03	0.898	Igslf5	ENSMUSG00000066621	6.36E-03	0.710	Tecpr1
ENSMUSG00000068877	2.07E-03	1.317	Selenbp2	ENSMUSG00000056296	6.37E-03	0.978	Synpr
ENSMUSG00000014426	2.08E-03	0.814	Map3k4	ENSMUSG00000029385	6.39E-03	0.670	Ccng2
ENSMUSG00000032384	2.09E-03	0.775	Csnk1g1	ENSMUSG00000028163	6.42E-03	0.789	Nfkb1
ENSMUSG00000040720	2.09E-03	0.787	1110037F02Rik	ENSMUSG00000073478	6.43E-03	0.651	D73003115Rik
ENSMUSG00000001158	2.10E-03	1.042	Snmp27	ENSMUSG00000079215	6.43E-03	0.741	Zfp664
ENSMUSG00000028986	2.10E-03	0.841	Klh7	ENSMUSG00000031148	6.47E-03	0.813	Gpkow
ENSMUSG00000032009	2.11E-03	0.640	Sesn3	ENSMUSG00000059475	6.47E-03	0.776	Zfp426
ENSMUSG00000041235	2.12E-03	0.783	Chd7	ENSMUSG00000026754	6.48E-03	0.743	Golga1
ENSMUSG00000025491	2.13E-03	2.375	Ifitm1	ENSMUSG00000032705	6.48E-03	0.802	Exd2
ENSMUSG00000005907	2.14E-03	0.875	Pex1	ENSMUSG00000052794	6.50E-03	0.812	1700030K09Rik
ENSMUSG00000030966	2.14E-03	0.744	Trim21	ENSMUSG00000058291	6.52E-03	0.837	Zfp68
ENSMUSG00000060152	2.15E-03	0.778	Pop5	ENSMUSG00000034292	6.53E-03	0.870	Traf3ip1
ENSMUSG00000030283	2.15E-03	0.500	St8sia1	ENSMUSG00000035236	6.54E-03	0.640	Scal
ENSMUSG00000074853	2.16E-03	0.813	AC158605.3	ENSMUSG00000062822	6.54E-03	0.812	4833420G17Rik
ENSMUSG00000036097	2.16E-03	0.800	Fam178a	ENSMUSG00000047959	6.56E-03	0.707	Kcna3
ENSMUSG00000026618	2.18E-03	1.094	Iars2	ENSMUSG00000034636	6.57E-03	0.747	Zyg11b
ENSMUSG00000017776	2.18E-03	0.798	Crk	ENSMUSG00000055065	6.59E-03	0.876	Ddx17
ENSMUSG00000000916	2.19E-03	0.792	Nsun5	ENSMUSG00000024381	6.60E-03	0.702	Bin1
ENSMUSG00000043909	2.20E-03	0.739	Trp53bp1	ENSMUSG00000041538	6.61E-03	0.809	H2-Ob
ENSMUSG00000061751	2.20E-03	1.060	Kalrn	ENSMUSG00000058361	6.62E-03	0.797	Lhfp13
ENSMUSG00000036109	2.22E-03	1.283	Mbnl3	ENSMUSG00000035007	6.63E-03	0.819	Rundc1
ENSMUSG00000068855	2.23E-03	1.542	Hist2h2ac	ENSMUSG00000021696	6.63E-03	0.668	Elov17
ENSMUSG00000082912	2.23E-03	1.200	AL671900.1	ENSMUSG00000065141	6.64E-03	0.944	SNORA46
ENSMUSG00000027985	2.25E-03	0.636	Lef1	ENSMUSG00000001444	6.66E-03	0.648	Tbx21
ENSMUSG00000026436	2.25E-03	0.778	Elk4	ENSMUSG00000024269	6.68E-03	0.782	5730494M16Rik
ENSMUSG00000020439	2.26E-03	1.233	Smtn	ENSMUSG00000029213	6.69E-03	0.840	Comm8

Identificador	Valor P	Fold	Símbolo	Identificador	Valor P	Fold	Símbolo
ENSMUSG00000048232	2.27E-03	1.381	Fbxo10	ENSMUSG00000015750	6.69E-03	0.810	Aph1a
ENSMUSG00000064400	2.27E-03	1.329	U3	ENSMUSG00000031540	6.70E-03	0.821	Myst3
ENSMUSG00000054545	2.28E-03	1.360	Ugt1a6a	ENSMUSG00000032093	6.71E-03	0.786	Cd3e
ENSMUSG00000036893	2.28E-03	0.789	Ehmt1	ENSMUSG00000030533	6.71E-03	0.694	Unc45a
ENSMUSG00000052087	2.29E-03	0.766	Rgs14	ENSMUSG00000056952	6.72E-03	0.800	Tatdn2
ENSMUSG00000083907	2.29E-03	1.192	AC116705.1	ENSMUSG00000034781	6.73E-03	0.784	Gna11
ENSMUSG00000070476	2.31E-03	1.343	9030418K01Rik	ENSMUSG00000029344	6.73E-03	0.810	Trpst2
ENSMUSG00000082087	2.32E-03	0.813	RP23-382C18.1	ENSMUSG00000022858	6.74E-03	0.755	Tra2b
ENSMUSG00000028649	2.32E-03	0.749	Macf1	ENSMUSG0000005312	6.75E-03	0.718	Ubcqln1
ENSMUSG00000031453	2.33E-03	0.813	Rasa3	ENSMUSG0000005483	6.76E-03	0.442	Dnajb1
ENSMUSG00000020134	2.33E-03	0.706	Peli1	ENSMUSG00000033436	6.77E-03	0.819	Armcx2
ENSMUSG00000031629	2.35E-03	1.730	Mlf1ip	ENSMUSG00000029869	6.78E-03	0.894	Ephb6
ENSMUSG00000041187	2.35E-03	0.696	Prkd2	ENSMUSG00000037270	6.80E-03	0.783	4932438A13Rik
ENSMUSG00000035773	2.36E-03	1.070	Kiss1r	ENSMUSG00000045482	6.83E-03	0.829	Trrap
ENSMUSG00000028803	2.37E-03	0.849	Nipal3	ENSMUSG00000037341	6.85E-03	0.670	Slc9a7
ENSMUSG00000042349	2.37E-03	0.676	Ikke	ENSMUSG00000064413	6.86E-03	0.901	U6
ENSMUSG00000037242	2.37E-03	1.218	Clic4	ENSMUSG00000037979	6.87E-03	0.748	Ccdc92
ENSMUSG00000020432	2.38E-03	1.490	Tcn2	ENSMUSG00000022545	6.88E-03	0.783	Ercc4
ENSMUSG00000020733	2.38E-03	0.786	Slc9a3r1	ENSMUSG00000024776	6.89E-03	0.790	Stambpl1
ENSMUSG00000014226	2.40E-03	0.572	Cacybp	ENSMUSG00000030544	6.90E-03	0.944	Mesp1
ENSMUSG00000026698	2.40E-03	0.863	Pigc	ENSMUSG00000087141	6.90E-03	0.691	Pknox2
ENSMUSG00000051354	2.41E-03	0.688	Samd3	ENSMUSG00000031508	6.91E-03	0.687	Ankrd10
ENSMUSG00000016028	2.42E-03	0.853	Celsr1	ENSMUSG00000044250	6.93E-03	0.651	Fam113b
ENSMUSG00000059108	2.42E-03	7.632	Iifitn6	ENSMUSG00000063535	6.94E-03	0.807	Zfp773
ENSMUSG00000032119	2.43E-03	0.827	Hinfp	ENSMUSG00000074129	6.95E-03	0.868	Rpl13a
ENSMUSG00000037300	2.43E-03	0.810	Ttct13	ENSMUSG00000050914	6.96E-03	0.816	Ankrd37
ENSMUSG00000020346	2.45E-03	0.859	Mgat1	ENSMUSG00000044150	6.97E-03	0.869	A830080D01Rik
ENSMUSG00000019992	2.45E-03	1.891	Fam54a	ENSMUSG00000002803	6.97E-03	0.852	Btdb6
ENSMUSG00000067931	2.46E-03	1.278	BC049807	ENSMUSG00000029298	7.00E-03	0.614	Gbp9
ENSMUSG00000036819	2.46E-03	0.744	Jmjd4	ENSMUSG00000060688	7.01E-03	0.951	Olfir292
ENSMUSG00000015619	2.47E-03	0.704	Gata3	ENSMUSG00000046185	7.02E-03	0.778	Zfp84
ENSMUSG00000020315	2.47E-03	0.803	Spnb2	ENSMUSG00000039834	7.03E-03	0.798	Zfp335
ENSMUSG00000024669	2.47E-03	0.732	Cd5	ENSMUSG00000025939	7.04E-03	0.757	Ube2w
ENSMUSG00000023828	2.48E-03	1.183	Slc22a3	ENSMUSG00000022403	7.04E-03	0.639	St13
ENSMUSG00000045969	2.49E-03	0.839	Ing1	ENSMUSG00000079470	7.05E-03	0.820	Utp14b
ENSMUSG00000042557	2.49E-03	0.913	Sin3a	ENSMUSG00000029060	7.07E-03	0.894	Mib2
ENSMUSG00000050212	2.50E-03	0.927	Fam176b	ENSMUSG00000070798	7.09E-03	0.930	Psg25
ENSMUSG0000007080	2.52E-03	1.795	Pole	ENSMUSG00000040447	7.10E-03	0.780	Spns2
ENSMUSG00000001467	2.53E-03	0.785	Cyp51	ENSMUSG00000068699	7.11E-03	0.956	Finc
ENSMUSG00000035683	2.53E-03	1.694	Melk	ENSMUSG00000003348	7.13E-03	0.721	Mobkl2a
ENSMUSG00000000378	2.54E-03	0.729	Ccm2	ENSMUSG00000032580	7.14E-03	0.818	Rbm5
ENSMUSG00000046157	2.55E-03	0.692	Tmem229b	ENSMUSG00000031935	7.14E-03	0.841	Med17
ENSMUSG00000056071	2.56E-03	5.286	S100a9	ENSMUSG00000022610	7.15E-03	0.757	Mapk12
ENSMUSG00000032212	2.57E-03	0.805	Sltm	ENSMUSG00000046598	7.16E-03	0.794	Bdh1
ENSMUSG00000061898	2.57E-03	0.887	Rbak	ENSMUSG00000035495	7.16E-03	0.742	Tstd2
ENSMUSG00000020137	2.58E-03	0.849	Thap2	ENSMUSG00000027427	7.18E-03	0.719	Polr3f
ENSMUSG00000040351	2.58E-03	0.750	Ankib1	ENSMUSG00000055717	7.19E-03	0.698	Slain1
ENSMUSG00000037266	2.58E-03	0.626	D4Wsu53e	ENSMUSG00000027620	7.19E-03	0.815	Rbm39
ENSMUSG00000030339	2.61E-03	1.173	Ltbr	ENSMUSG00000071072	7.21E-03	0.761	Ptges3
ENSMUSG00000028093	2.62E-03	0.823	Acp6	ENSMUSG00000020864	7.23E-03	0.825	Ankrd40
ENSMUSG00000023026	2.62E-03	0.749	Dip2b	ENSMUSG00000057359	7.24E-03	0.937	AC101702.1
ENSMUSG00000055013	2.63E-03	1.592	Agap1	ENSMUSG00000048118	7.25E-03	0.750	Arid4a
ENSMUSG00000013539	2.63E-03	1.339	D16H22S680E	ENSMUSG00000039765	7.26E-03	0.937	Cc2d2a
ENSMUSG00000030016	2.64E-03	0.740	Zfml	ENSMUSG00000047036	7.27E-03	0.839	Zfp445
ENSMUSG00000011427	2.64E-03	0.642	Zfp790	ENSMUSG00000049680	7.27E-03	0.873	Urgcp
ENSMUSG00000025161	2.65E-03	2.019	Slc16a3	ENSMUSG00000032077	7.31E-03	0.844	Bud13
ENSMUSG00000030357	2.66E-03	0.610	Fkbp4	ENSMUSG00000034111	7.31E-03	0.746	Tmed8
ENSMUSG00000070201	2.66E-03	2.322	5S_rRNA	ENSMUSG00000056493	7.32E-03	0.818	Foxk1
ENSMUSG00000046169	2.68E-03	0.637	Adamts6	ENSMUSG00000081739	7.32E-03	0.875	Mdm4-ps
ENSMUSG00000068101	2.68E-03	1.481	Cenpm	ENSMUSG00000030165	7.33E-03	0.788	Klrd1
ENSMUSG00000050799	2.68E-03	1.308	Hist1h2ba	ENSMUSG00000032688	7.34E-03	0.711	Malt1

Identificador	Valor P	Fold	Símbolo	Identificador	Valor P	Fold	Símbolo
ENSMUSG00000025280	2.70E-03	0.845	Polr3a	ENSMUSG00000025422	7.35E-03	0.753	Agap2
ENSMUSG00000064246	2.70E-03	7.441	Chi3l1	ENSMUSG00000024068	7.35E-03	0.894	Spast
ENSMUSG00000036817	2.71E-03	1.105	Unc84a	ENSMUSG00000037210	7.43E-03	0.817	Fam193a
ENSMUSG00000031922	2.71E-03	1.083	Cep57	ENSMUSG00000025958	7.43E-03	0.718	Creb1
ENSMUSG00000038797	2.73E-03	0.826	Zscan2	ENSMUSG00000040021	7.44E-03	0.788	Lats1
ENSMUSG00000034647	2.74E-03	0.731	Ankrd12	ENSMUSG00000034940	7.45E-03	0.862	Syng
ENSMUSG00000048582	2.74E-03	1.062	Gja3	ENSMUSG00000034931	7.50E-03	0.881	Dhx8
ENSMUSG00000040855	2.75E-03	1.248	Reps2	ENSMUSG00000021037	7.52E-03	0.597	Ahsa1
ENSMUSG00000000605	2.76E-03	0.816	Cln4-2	ENSMUSG00000028071	7.53E-03	0.747	Sh2d2a
ENSMUSG00000055340	2.76E-03	0.940	CR974439.1	ENSMUSG00000063949	7.54E-03	0.820	Olfrr205
ENSMUSG00000027881	2.77E-03	0.769	Prpf38b	ENSMUSG00000008398	7.54E-03	0.840	Elk3
ENSMUSG00000053411	2.77E-03	0.791	Cbx7	ENSMUSG00000033306	7.55E-03	0.739	Lpp
ENSMUSG00000002289	2.78E-03	1.218	Angptl4	ENSMUSG00000049742	7.56E-03	0.883	C33006D17Rik
ENSMUSG00000039879	2.78E-03	0.797	Heca	ENSMUSG00000029141	7.56E-03	0.782	Slc4a1ap
ENSMUSG00000031722	2.78E-03	6.133	Hp	ENSMUSG00000071068	7.57E-03	0.743	Trem12
ENSMUSG00000071708	2.79E-03	0.845	Sms	ENSMUSG00000020264	7.59E-03	0.737	Sdf2
ENSMUSG00000002846	2.79E-03	0.832	4930455C21Rik	ENSMUSG00000019843	7.61E-03	0.678	Fyn
ENSMUSG00000022385	2.80E-03	1.678	Gtse1	ENSMUSG00000022565	7.62E-03	0.747	Plec1
ENSMUSG00000028034	2.80E-03	0.738	Fubp1	ENSMUSG00000035929	7.65E-03	0.781	H2-gs10
ENSMUSG00000053754	2.81E-03	0.835	Chd8	ENSMUSG00000021504	7.68E-03	0.789	B4galt7
ENSMUSG00000016257	2.82E-03	1.144	Slmo2	ENSMUSG00000032267	7.68E-03	0.770	Usp28
ENSMUSG00000022414	2.82E-03	1.276	Map3k7ip1	ENSMUSG00000033955	7.69E-03	0.811	Tnks1bp1
ENSMUSG00000037474	2.84E-03	2.058	Dtl	ENSMUSG00000035000	7.73E-03	0.784	Dpp4
ENSMUSG00000027834	2.84E-03	0.785	Serpini1	ENSMUSG00000028423	7.73E-03	0.895	Nfx1
ENSMUSG00000068747	2.84E-03	2.427	Sort1	ENSMUSG00000033009	7.74E-03	0.693	Ogfod1
ENSMUSG00000063382	2.85E-03	0.705	Bcl9l	ENSMUSG00000020423	7.76E-03	0.910	Btg2
ENSMUSG00000052534	2.86E-03	1.778	Pbx1	ENSMUSG00000035069	7.77E-03	0.863	Oma1
ENSMUSG00000034403	2.86E-03	0.571	Pja1	ENSMUSG00000020782	7.79E-03	0.784	Ulg2
ENSMUSG00000045273	2.87E-03	1.817	Cenph	ENSMUSG00000032413	7.80E-03	0.780	Rasa2
ENSMUSG00000022667	2.88E-03	1.336	Cd200r1	ENSMUSG00000037754	7.81E-03	0.691	Ppp1r16b
ENSMUSG00000020125	2.90E-03	6.728	Elane	ENSMUSG00000078671	7.81E-03	0.764	Chd2
ENSMUSG00000028189	2.91E-03	1.126	Ctbs	ENSMUSG00000002147	7.82E-03	0.771	Stat6
ENSMUSG00000025701	2.91E-03	3.444	Alox5	ENSMUSG00000055116	7.84E-03	0.768	Arntl
ENSMUSG00000024966	2.92E-03	0.547	Stip1	ENSMUSG00000048865	7.84E-03	0.716	Arhgap30
ENSMUSG00000037020	2.93E-03	1.321	Wdr62	ENSMUSG00000042814	7.84E-03	0.703	Mct52
ENSMUSG00000050410	2.94E-03	1.522	Tcf19	ENSMUSG00000029657	7.86E-03	0.379	Hsph1
ENSMUSG00000021636	2.94E-03	0.787	Marveld2	ENSMUSG00000041649	2.96E-03	0.877	Klf8
ENSMUSG00000021241	2.95E-03	1.304	Isca2	ENSMUSG00000078946	2.97E-03	0.783	CT030167.1
ENSMUSG00000070799	2.97E-03	1.072	Psg26	ENSMUSG00000018995	2.89E-03	0.669	Nars2
ENSMUSG00000020381	2.98E-03	1.190	3010026O09Rik	ENSMUSG00000048376	2.89E-03	0.842	F2r
ENSMUSG00000080152	3.00E-03	1.670	RP23-4418.1	ENSMUSG00000025723	2.90E-03	0.810	Nmb

Anexo 6. Subfunciones asociadas a funciones de la respuesta inmunológica

Función	Subfunción	Función	Subfunción
Cell-mediated Immune Response	T cell development differentiation of T lymphocytes development of natural killer T lymphocytes development of helper T lymphocytes differentiation of helper T lymphocytes differentiation of Th1 cells arrest in differentiation of T lymphocytes T cell migration arrest in development of alpha-beta T lymphocytes development of Th1 cells infiltration by T lymphocytes NK cell development development of regulatory T lymphocytes development of Th2 cells conversion of T lymphocytes differentiation of Th2 cells arrest in development of T lymphocytes development of thymocytes arrest in development of alpha-beta thymocytes	Inflammatory response	activation of leukocytes activation of lymphocytes quantity of phagocytes activation of T lymphocytes antibody response chemotaxis of myeloid cells chronic hepatitis chemotaxis of leukocytes chemotaxis of granulocytes TH1 immune response chemotaxis of phagocytes inflammatory response inflammation of central nervous system activation of natural killer cells cell movement of neutrophils accumulation of granulocytes response of phagocytes immune response of antigen presenting cells formation of phagocytes chemotaxis of neutrophils inflammation of liver anti-tumor response cell-mediated response immune response of cells quantity of neutrophils transmigration of neutrophils quantity of macrophages phagocytosis of leukocytes function of immune system immune response of phagocytes cell movement of phagocytes glomerulonephritis adhesion of neutrophils priming of leukocytes recruitment of phagocytes response of macrophages activation of thymocytes recruitment of neutrophils cytotoxic reaction of antigen presenting cells cytotoxic reaction of phagocytes degranulation of phagocytes migration of neutrophils
Cell-to-cell signaling and interaction	activation of leukocytes activation of lymphocytes activation of blood cells activation of cells activation of T lymphocytes response of antigen presenting cells adhesion of immune cells selection of thymocytes quantity of histamine activation of natural killer cells response of lymphocytes recruitment of granulocytes response of phagocytes immune response of antigen presenting cells response of mononuclear leukocytes phagocytosis of leukocytes adhesion of granulocytes immune response of phagocytes adhesion of neutrophils priming of leukocytes recruitment of phagocytes response of macrophages		

	<p>activation of thymocytes recruitment of neutrophils cytotoxic reaction of antigen presenting cells cytotoxic reaction of phagocytes immune response of macrophages</p> <p>T cell response phagocytosis of cells</p> <p>recruitment of leukocytes recruitment of lymphocytes adhesion of phagocytes inflammatory response of macrophages activation of neutrophils priming of T lymphocytes binding of antigen presenting cells phagocytosis of phagocytes activation of oocytes detachment of leukocytes response of cytotoxic T cells</p> <p>recruitment of eosinophils response of myeloid cells phagocytosis of antigen presenting cells activation of cytotoxic T cells</p>		<p>immune response of macrophages phagocytosis of cells</p> <p>Nephritis degranulation of cells adhesion of phagocytes inflammatory response of macrophages quantity of dendritic cells formation of follicular dendritic cells host defense accumulation of myeloid cells</p> <p>accumulation of leukocytes activation of neutrophils priming of T lymphocytes phagocytosis of phagocytes engulfment by macrophages allergic inflammation proinflammatory response inflammation of intestine phagocytosis of antigen presenting cells localization of lymphocytes</p> <p>activation of cytotoxic T cells swelling of joint quantity of monocytes</p>
Humoral immune response	<p>quantity of immunoglobulin</p> <p>quantity of IgE quantity of IgM quantity of IgG2 a quantity of IgG</p> <p>quantity of IgG1 quantity of B lymphocytes class switching</p> <p>morphology of B lymphocytes morphology of germinal center formation of germinal center quantity of IgA</p> <p>mitogenesis of B lymphocytes abnormal morphology of germinal center</p> <p>quantity of IgG3</p> <p>quantity of IgG2 b</p> <p>lack of germinal center</p>	Lymphoid Tissue Structure and Development	<p>development of lymphocytes development of leukocytes T cell development morphology of lymphoid organ morphology of lymphatic system component development of thymus gland differentiation of T lymphocytes development of natural killer T lymphocytes development of lymphoid organ morphology of spleen morphology of spleen component development of helper T lymphocytes</p> <p>morphology of white pulp abnormal morphology of white pulp differentiation of helper T lymphocytes development of lymphatic system component selection of thymocytes abnormal morphology of Peyer's patches differentiation of Th1 cells abnormal morphology of lymphoid organ morphology of lymph follicle arrest in differentiation of T lymphocytes</p>
Antigen presentation	Selection of thymocytes		
Immune cell trafficking	<p>Activation of leukocytes activation of lymphocytes</p> <p>cell movement of leukocytes</p>		

<p>leukocyte migration activation of T lymphocytes</p> <p>cell movement of myeloid cells cell movement of granulocytes</p> <p>homing of leukocytes</p> <p>chemotaxis of myeloid cells chemotaxis of leukocytes chemotaxis of granulocytes chemotaxis of phagocytes</p> <p>transmigration of granulocytes adhesion of immune cells activation of natural killer cells cell movement of lymphocytes</p> <p>cell movement of neutrophils accumulation of granulocytes recruitment of granulocytes Lymphocyte migration cell movement of mononuclear leukocytes chemotaxis of neutrophils T cell migration transmigration of neutrophils adhesion of granulocytes</p> <p>infiltration of leukocytes cell movement of phagocytes adhesion of neutrophils</p> <p>priming of leukocytes</p> <p>recruitment of phagocytes</p> <p>activation of thymocytes</p> <p>recruitment of neutrophils</p> <p>infiltration of myeloid cells migration of neutrophils</p> <p>migration of granulocytes localization of leukocytes recruitment of leukocytes recruitment of lymphocytes infiltration by lymphocytes adhesion of phagocytes</p> <p>infiltration of granulocytes accumulation of myeloid cells accumulation of leukocytes activation of neutrophils priming of T lymphocytes transmigration of leukocytes binding of antigen presenting cells</p> <p>infiltration by T lymphocytes detachment of leukocytes recruitment of eosinophils localization of lymphocytes</p>	<p>Immunological disease</p>	<p>development of Th1 cells NK cell development arrest in development of alpha-beta T lymphocytes development of thymocytes morphology of lymphatic system cells formation of lymphatic system component size of lymphoid tissue quantity of myeloid progenitor cells morphology of germinal center abnormal morphology of secondary lymphoid follicle quantity of lymphatic system cells regeneration of Peyer's patches development of lymph node development of regulatory T lymphocytes formation of germinal center development of Th2 cells abnormal morphology of spleen formation of follicular dendritic cells formation of lymphoid tissue lack of Single positive thymocytes lack of peripheral lymph node differentiation of Th2 cells abnormal morphology of germinal center conversion of T lymphocytes lack of myeloid progenitor cells abnormal morphology of thymus medulla quantity of lymphatic system component abnormal morphology of B-cell follicle abnormal morphology of enlarged spleen arrest in development of T lymphocytes organogenesis of lymphoid organ morphology of mesenteric lymph node development of osteoclasts morphology of thymus gland quantity of lymphoid tissue lack of germinal center</p> <p>experimental autoimmune encephalomyelitis hypoplasia of thymus gland hypoplasia of lymphoid organ incidence of lymphoma quantity of granuloma hypersensitive reaction development of thymic lymphoma hyperplasia of lymphatic system cells scrapie of lymph node scrapie of spleen leukocytosis</p>
---	------------------------------	---

activation of cytotoxic T cells
cell movement of eosinophils

tumorigenesis of thymic lymphoma
eosinophilia
systemic autoimmune syndrome
tumorigenesis of lymphoma
allergic inflammation
eosinophilia of esophagus
experimental autoimmune
uveoretinitis
tumorigenesis of non-Hodgkin
lymphoma

Anexo 7. Participación de los genes diferencialmente expresados en funciones y subfunciones de la respuesta inmunológica

Función /Subfunción	Símbolo	Función /Subfunción	Símbolo
Función: Lymphoid Tissue Structure and Development		Infiltration of myeloid cells	IFNG
Development of lymphocytes	ANXA1	Migration of neutrophils	IFNG
Development of leukocytes	ANXA1	Migration of granulocytes	IFNG
T cell development	ANXA1	Localization of leukocytes	IFNG
Differentiation of T lymphocytes	ANXA1	Recruitment of leukocytes	IFNG
differentiation of helper T lymphocytes	ANXA1	Recruitment of lymphocytes	IFNG
differentiation of Th1 cells	ANXA1	Infiltration by lymphocytes	IFNG
Development of lymphocytes	C5AR1	Infiltration of granulocytes	IFNG
Development of leukocytes	C5AR1	Accumulation of myeloid cells	IFNG
T cell development	C5AR1	Accumulation of leukocytes	IFNG
Differentiation of T lymphocytes	C5AR1	Transmigration of leukocytes	IFNG
differentiation of helper T lymphocytes	C5AR1	Binding of antigen presenting cells	IFNG
Quantity of lymphatic system component	C5AR1	Infiltration by T lymphocytes	IFNG
Development of lymphocytes	LTBR	Localization of lymphocytes	IFNG
Development of leukocytes	LTBR	Activation of cytotoxic T cells	IFNG
Morphology of lymphoid organ	LTBR	Cell movement of eosinophils	IFNG
Morphology of lymphatic system component	LTBR	Activation of leukocytes	PRKCCQ
Development of thymus gland	LTBR	Activation of lymphocytes	PRKCCQ
Development of lymphoid organ	LTBR	Cell movement of leukocytes	PRKCCQ
Morphology of spleen	LTBR	Leukocyte migration	PRKCCQ
Morphology of spleen component	LTBR	Activation of T lymphocytes	PRKCCQ
Development of lymphatic system component	LTBR	Cell movement of myeloid cells	PRKCCQ
Abnormal morphology of Peyer's patches	LTBR	Cell movement of granulocytes	PRKCCQ
Abnormal morphology of lymphoid organ	LTBR	Transmigration of granulocytes	PRKCCQ
Morphology of lymph follicle	LTBR	Adhesion of immune cells	PRKCCQ
NK cell development	LTBR	Activation of natural killer cells	PRKCCQ
Morphology of lymphatic system cells	LTBR	Cell movement of lymphocytes	PRKCCQ
Formation of lymphatic system component	LTBR	Cell movement of neutrophils	PRKCCQ
Size of lymphoid tissue	LTBR	Recruitment of granulocytes	PRKCCQ
Quantity of lymphatic system cells	LTBR	Lymphocyte migration	PRKCCQ
Regeneration of Peyer's patches	LTBR	Cell movement of mononuclear leukocytes	PRKCCQ
Development of lymph node	LTBR	T cell migration	PRKCCQ
Abnormal morphology of spleen	LTBR	Transmigration of neutrophils	PRKCCQ
Formation of follicular dendritic cells	LTBR	Adhesion of granulocytes	PRKCCQ
Formation of lymphoid tissue	LTBR	Infiltration of leukocytes	PRKCCQ
Lack of peripheral lymph node	LTBR	Cell movement of phagocytes	PRKCCQ
Quantity of lymphatic system component	LTBR	Adhesion of neutrophils	PRKCCQ
Abnormal morphology of B-cell follicle	LTBR	Priming of leukocytes	PRKCCQ
Abnormal morphology of enlarged spleen	LTBR	Recruitment of phagocytes	PRKCCQ
Organogenesis of lymphoid organ	LTBR	Recruitment of neutrophils	PRKCCQ
Quantity of lymphoid tissue	LTBR	Infiltration of myeloid cells	PRKCCQ
Development of lymphocytes	MSR1	Migration of neutrophils	PRKCCQ
Development of leukocytes	MSR1	Migration of granulocytes	PRKCCQ
T cell development	MSR1	Recruitment of leukocytes	PRKCCQ
Morphology of lymphoid organ	MSR1	Recruitment of lymphocytes	PRKCCQ
Morphology of lymphatic system component	MSR1	Infiltration by lymphocytes	PRKCCQ
Morphology of spleen	MSR1	Adhesion of phagocytes	PRKCCQ
Morphology of spleen component	MSR1	Infiltration of granulocytes	PRKCCQ
Development of lymphocytes	RASGRP4	Accumulation of leukocytes	PRKCCQ
Development of leukocytes	RASGRP4	Priming of T lymphocytes	PRKCCQ
T cell development	RASGRP4	Transmigration of leukocytes	PRKCCQ
Development of thymus gland	RASGRP4	Infiltration by T lymphocytes	PRKCCQ
Development of lymphoid organ	RASGRP4	Activation of leukocytes	IKBKB
Development of lymphatic system component	RASGRP4	Activation of lymphocytes	IKBKB
Development of thymocytes	RASGRP4	Cell movement of leukocytes	IKBKB
Morphology of lymphoid organ	ALOX5	Leukocyte migration	IKBKB

Morphology of lymphatic system component	ALOX5	Activation of T lymphocytes	IKBKB
Morphology of spleen	ALOX5	Cell movement of myeloid cells	IKBKB
Abnormal morphology of lymphoid organ	ALOX5	Cell movement of granulocytes	IKBKB
Abnormal morphology of spleen	ALOX5	Homing of leukocytes	IKBKB
Morphology of lymphoid organ	ANGPTL4	Chemotaxis of myeloid cells	IKBKB
Morphology of lymphatic system component	ANGPTL4	Chemotaxis of leukocytes	IKBKB
Abnormal morphology of lymphoid organ	ANGPTL4	Chemotaxis of granulocytes	IKBKB
Morphology of mesenteric lymph node	ANGPTL4	Chemotaxis of phagocytes	IKBKB
Morphology of lymphoid organ	CTSD	Cell movement of neutrophils	IKBKB
Morphology of lymphatic system component	CTSD	Recruitment of granulocytes	IKBKB
Morphology of spleen	CTSD	Chemotaxis of neutrophils	IKBKB
Morphology of spleen component	CTSD	Infiltration of leukocytes	IKBKB
Morphology of white pulp	CTSD	Cell movement of phagocytes	IKBKB
Abnormal morphology of white pulp	CTSD	Priming of leukocytes	IKBKB
Morphology of lymph follicle	CTSD	Recruitment of phagocytes	IKBKB
Abnormal morphology of B-cell follicle	CTSD	Recruitment of neutrophils	IKBKB
Morphology of lymphoid organ	CXCR2	Infiltration of myeloid cells	IKBKB
Morphology of lymphatic system component	CXCR2	Localization of leukocytes	IKBKB
Morphology of spleen	CXCR2	Recruitment of leukocytes	IKBKB
Morphology of spleen component	CXCR2	Infiltration of granulocytes	IKBKB
Morphology of white pulp	CXCR2	Accumulation of leukocytes	IKBKB
Abnormal morphology of white pulp	CXCR2	Priming of T lymphocytes	IKBKB
Abnormal morphology of lymphoid organ	CXCR2	Localization of lymphocytes	IKBKB
Abnormal morphology of spleen	CXCR2	Activation of leukocytes	STAT6
Abnormal morphology of enlarged spleen	CXCR2	Cell movement of leukocytes	STAT6
Morphology of lymphoid organ	LGMM	Leukocyte migration	STAT6
Morphology of lymphatic system component	LGMM	Cell movement of myeloid cells	STAT6
Morphology of spleen	LGMM	Cell movement of granulocytes	STAT6
Abnormal morphology of lymphoid organ	LGMM	Homing of leukocytes	STAT6
Abnormal morphology of spleen	LGMM	Chemotaxis of myeloid cells	STAT6
Abnormal morphology of enlarged spleen	LGMM	Chemotaxis of leukocytes	STAT6
Morphology of lymphoid organ	PBX1	Chemotaxis of granulocytes	STAT6
Morphology of lymphatic system component	PBX1	Chemotaxis of phagocytes	STAT6
Development of thymus gland	PBX1	Adhesion of immune cells	STAT6
Development of lymphoid organ	PBX1	Cell movement of neutrophils	STAT6
Morphology of spleen	PBX1	Accumulation of granulocytes	STAT6
Development of lymphatic system component	PBX1	Recruitment of granulocytes	STAT6
Morphology of lymph follicle	PBX1	Chemotaxis of neutrophils	STAT6
Morphology of lymphatic system cells	PBX1	Infiltration of leukocytes	STAT6
Quantity of myeloid progenitor cells	PBX1	Cell movement of phagocytes	STAT6
Quantity of lymphatic system cells	PBX1	Recruitment of phagocytes	STAT6
Lack of myeloid progenitor cells	PBX1	Recruitment of neutrophils	STAT6
Abnormal morphology of B-cell follicle	PBX1	Infiltration of myeloid cells	STAT6
Morphology of lymphatic system component	C3	Recruitment of leukocytes	STAT6
Development of lymphoid organ	C3	Recruitment of lymphocytes	STAT6
Development of lymphatic system component	C3	Infiltration of granulocytes	STAT6
Morphology of lymph follicle	C3	Accumulation of myeloid cells	STAT6
Morphology of germinal center	C3	Accumulation of leukocytes	STAT6
Development of lymph node	C3	Recruitment of eosinophils	STAT6
Abnormal morphology of germinal center	C3	Cell movement of eosinophils	STAT6
Quantity of lymphatic system component	C3	Cell movement of leukocytes	CCL5
Quantity of myeloid progenitor cells	BRCA2	Cell movement of myeloid cells	CCL5
Quantity of lymphatic system cells	BRCA2	Cell movement of granulocytes	CCL5
Quantity of lymphatic system cells	USP1	Chemotaxis of myeloid cells	CCL5
<i>Función: Cell-mediated Immune Response</i>		Chemotaxis of leukocytes	CCL5
T-cell development	ANXA1	Chemotaxis of phagocytes	CCL5
Differentiation of T-lymphocytes	ANXA1	Cell movement of lymphocytes	CCL5
Differentiation of helper T-lymphocytes	ANXA1	Cell movement of neutrophils	CCL5
Differentiation of Th1 cells	ANXA1	Recruitment of granulocytes	CCL5
T-cell development	CSAR1	Lymphocyte migration	CCL5
Differentiation of T-lymphocytes	CSAR1	Cell movement of mononuclear leukocytes	CCL5
Differentiation of helper T-lymphocytes	CSAR1	Infiltration of leukocytes	CCL5

T-cell development	RASGRP4	Cell movement of phagocytes	CCL5
Development of thymocytes	RASGRP4	Recruitment of phagocytes	CCL5
T cell migration	C3	Infiltration of myeloid cells	CCL5
Infiltration by T lymphocytes	C3	Migration of neutrophils	CCL5
T cell migration	ALOX5	Migration of granulocytes	CCL5
T-cell development	MSR1	Recruitment of leukocytes	CCL5
Response of antigen presenting cells	ANXA1	Infiltration of granulocytes	CCL5
Adhesion of immune cells	ANXA1	Accumulation of myeloid cells	CCL5
Recruitment of granulocytes	ANXA1	Accumulation of leukocytes	CCL5
Response of phagocytes	ANXA1	Recruitment of eosinophils	CCL5
Immune response of antigen presenting cells	ANXA1	Cell movement of eosinophils	CCL5
Phagocytosis of leukocytes	ANXA1	Activation of leukocytes	DOCK2
Adhesion of phagocytes	ANXA1	Activation of lymphocytes	DOCK2
Immune response of phagocytes	ANXA1	Cell movement of leukocytes	DOCK2
Adhesion of neutrophils	ANXA1	Activation of T lymphocytes	DOCK2
Recruitment of phagocytes	ANXA1	Cell movement of myeloid cells	DOCK2
Response of macrophages	ANXA1	Cell movement of granulocytes	DOCK2
Immune response of macrophages	ANXA1	Homing of leukocytes	DOCK2
Phagocytosis of cells	ANXA1	Chemotaxis of myeloid cells	DOCK2
Recruitment of leukocytes	ANXA1	Chemotaxis of leukocytes	DOCK2
Adhesion of phagocytes	ANXA1	Chemotaxis of granulocytes	DOCK2
Phagocytosis of phagocytes	ANXA1	Chemotaxis of phagocytes	DOCK2
Detachment of leukocytes	ANXA1	Cell movement of lymphocytes	DOCK2
Response of myeloid cells	ANXA1	Cell movement of neutrophils	DOCK2
Phagocytosis of antigen presenting cells	ANXA1	Lymphocyte migration	DOCK2
activation of leukocytes	C3	Cell movement of mononuclear leukocytes	DOCK2
Activation of lymphocytes	C3	Chemotaxis of neutrophils	DOCK2
Activation of blood cells	C3	T cell migration	DOCK2
Activation of cells	C3	Cell movement of phagocytes	DOCK2
Activation of T lymphocytes	C3	Accumulation of leukocytes	DOCK2
Quantity of histamine	C3	Activation of leukocytes	TREML2
Response of phagocytes	C3	Cell movement of leukocytes	TREML2
Phagocytosis of leukocytes	C3	Leukocyte migration	TREML2
Immune response of phagocytes	C3	Cell movement of myeloid cells	TREML2
Priming of leukocytes	C3	Cell movement of granulocytes	TREML2
Phagocytosis of cells	C3	Homing of leukocytes	TREML2
Activation of neutrophils	C3	Chemotaxis of myeloid cells	TREML2
Priming of T lymphocytes	C3	Chemotaxis of leukocytes	TREML2
Phagocytosis of phagocytes	C3	Chemotaxis of granulocytes	TREML2
Response of myeloid cells	C3	Chemotaxis of phagocytes	TREML2
Response of antigen presenting cells	CLIC4	Cell movement of neutrophils	TREML2
Response of phagocytes	CLIC4	Recruitment of granulocytes	TREML2
Immune response of antigen presenting cells	CLIC4	Chemotaxis of neutrophils	TREML2
Phagocytosis of leukocytes	CLIC4	Cell movement of phagocytes	TREML2
Immune response of phagocytes	CLIC4	Recruitment of phagocytes	TREML2
Response of macrophages	CLIC4	Recruitment of neutrophils	TREML2
Immune response of macrophages	CLIC4	Recruitment of leukocytes	TREML2
Phagocytosis of cells	CLIC4	Activation of neutrophils	TREML2
Phagocytosis of phagocytes	CLIC4	Cell movement of leukocytes	CCR6
Response of myeloid cells	CLIC4	Cell movement of myeloid cells	CCR6
Phagocytosis of antigen presenting cells	CLIC4	Homing of leukocytes	CCR6
Response of antigen presenting cells	S100A9	Chemotaxis of leukocytes	CCR6
Response of phagocytes	S100A9	Chemotaxis of phagocytes	CCR6
Immune response of antigen presenting cells	S100A9	Cell movement of lymphocytes	CCR6
Phagocytosis of leukocytes	S100A9	Recruitment of granulocytes	CCR6
Immune response of phagocytes	S100A9	Lymphocyte migration	CCR6
Response of macrophages	S100A9	Cell movement of mononuclear leukocytes	CCR6
Immune response of macrophages	S100A9	T cell migration	CCR6
Phagocytosis of cells	S100A9	Infiltration of leukocytes	CCR6
Phagocytosis of phagocytes	S100A9	Cell movement of phagocytes	CCR6
Response of myeloid cells	S100A9	Localization of leukocytes	CCR6
Phagocytosis of antigen presenting cells	S100A9	Recruitment of leukocytes	CCR6

activation of leukocytes	ELANE	Recruitment of lymphocytes	CCR6
Activation of blood cells	ELANE	Recruitment of eosinophils	CCR6
Activation of cells	ELANE	Localization of lymphocytes	CCR6
Adhesion of immune cells	ELANE	Activation of leukocytes	CD40LG
Recruitment of granulocytes	ELANE	Activation of lymphocytes	CD40LG
Recruitment of phagocytes	ELANE	Cell movement of leukocytes	CD40LG
Recruitment of neutrophils	ELANE	Activation of T lymphocytes	CD40LG
Phagocytosis of cells	ELANE	Adhesion of immune cells	CD40LG
Recruitment of leukocytes	ELANE	Cell movement of lymphocytes	CD40LG
Activation of neutrophils	ELANE	Lymphocyte migration	CD40LG
Adhesion of immune cells	CXCR2	Cell movement of mononuclear leukocytes	CD40LG
Recruitment of granulocytes	CXCR2	T cell migration	CD40LG
Adhesion of granulocytes	CXCR2	Adhesion of granulocytes	CD40LG
Adhesion of neutrophils	CXCR2	Infiltration of leukocytes	CD40LG
Recruitment of phagocytes	CXCR2	Adhesion of neutrophils	CD40LG
Recruitment of neutrophils	CXCR2	Priming of leukocytes	CD40LG
Recruitment of leukocytes	CXCR2	Infiltration by lymphocytes	CD40LG
Adhesion of phagocytes	CXCR2	Adhesion of phagocytes	CD40LG
Response of lymphocytes	CSAR1	Priming of T lymphocytes	CD40LG
Recruitment of granulocytes	CSAR1	Infiltration by T lymphocytes	CD40LG
Response of mononuclear leukocytes	CSAR1	Activation of cytotoxic T cells	CD40LG
Recruitment of phagocytes	CSAR1	Activation of leukocytes	SPN
Recruitment of neutrophils	CSAR1	Activation of lymphocytes	SPN
T cell response	CSAR1	Cell movement of leukocytes	SPN
Recruitment of leukocytes	CSAR1	Leukocyte migration	SPN
Adhesion of immune cells	MSR1	Activation of T lymphocytes	SPN
Response of lymphocytes	MSR1	Cell movement of myeloid cells	SPN
Phagocytosis of leukocytes	MSR1	Cell movement of granulocytes	SPN
Phagocytosis of cells	MSR1	Adhesion of immune cells	SPN
Binding of antigen presenting cells	MSR1	Cell movement of lymphocytes	SPN
Response of mononuclear leukocytes	MSR1	Cell movement of neutrophils	SPN
activation of leukocytes	FPR1	Lymphocyte migration	SPN
Activation of blood cells	FPR1	Cell movement of mononuclear leukocytes	SPN
Activation of cells	FPR1	Cell movement of phagocytes	SPN
Adhesion of immune cells	FPR1	Detachment of leukocytes	SPN
Activation of neutrophils	FPR1	Cell movement of leukocytes	PLEC
Binding of antigen presenting cells	FPR1	Leukocyte migration	PLEC
Recruitment of granulocytes	CHI3L1	Cell movement of myeloid cells	PLEC
Recruitment of phagocytes	CHI3L1	Homing of leukocytes	PLEC
Recruitment of neutrophils	CHI3L1	Chemotaxis of myeloid cells	PLEC
Recruitment of leukocytes	CHI3L1	Chemotaxis of leukocytes	PLEC
Recruitment of eosinophils	CHI3L1	Chemotaxis of phagocytes	PLEC
Recruitment of granulocytes	CLEC4E	Cell movement of lymphocytes	PLEC
Recruitment of phagocytes	CLEC4E	Lymphocyte migration	PLEC
Recruitment of neutrophils	CLEC4E	Cell movement of mononuclear leukocytes	PLEC
Recruitment of leukocytes	CLEC4E	T cell migration	PLEC
Recruitment of lymphocytes	CLEC4E	Infiltration of leukocytes	PLEC
Activation of cells	MMP9	Cell movement of phagocytes	PLEC
Recruitment of granulocytes	MMP9	Activation of leukocytes	BCL11B
Recruitment of phagocytes	MMP9	Activation of lymphocytes	BCL11B
Recruitment of neutrophils	MMP9	Cell movement of leukocytes	BCL11B
Recruitment of leukocytes	MMP9	Leukocyte migration	BCL11B
Adhesion of immune cells	CD200R1	Activation of T lymphocytes	BCL11B
Response of lymphocytes	CD200R1	Cell movement of lymphocytes	BCL11B
Response of mononuclear leukocytes	CD200R1	Lymphocyte migration	BCL11B
T cell response	CD200R1	Cell movement of mononuclear leukocytes	BCL11B
Response of cytotoxic T cells	CD200R1	T cell migration	BCL11B
Recruitment of granulocytes	ALOX5	Infiltration of leukocytes	BCL11B
Recruitment of phagocytes	ALOX5	Infiltration by lymphocytes	BCL11B
Recruitment of neutrophils	ALOX5	Infiltration by T lymphocytes	BCL11B
Recruitment of leukocytes	ALOX5	Activation of leukocytes	FYN
Recruitment of granulocytes	CCR3	Activation of lymphocytes	FYN

Recruitment of leukocytes	CCR3	Cell movement of leukocytes	FYN
Recruitment of lymphocytes	CCR3	Leukocyte migration	FYN
Recruitment of eosinophils	CCR3	Activation of T lymphocytes	FYN
Activation of cells	GP49A	Homing of leukocytes	FYN
Response of antigen presenting cells	GP49A	Chemotaxis of leukocytes	FYN
Immune response of antigen presenting cells	GP49A	Chemotaxis of phagocytes	FYN
Quantity of histamine	HDC	Adhesion of immune cells	FYN
Recruitment of leukocytes	HDC	Adhesion of granulocytes	FYN
Recruitment of lymphocytes	HDC	Cell movement of phagocytes	FYN
Recruitment of phagocytes	F13A1	Activation of thymocytes	FYN
Recruitment of leukocytes	F13A1	Cell movement of leukocytes	MAVS
Quantity of histamine	SLC22A3	Leukocyte migration	MAVS
Phagocytosis of cells	C1QA	Cell movement of myeloid cells	MAVS
Quantity of histamine	SLC22A3	Cell movement of granulocytes	MAVS
Función: Immune cell trafficking		Cell movement of lymphocytes	MAVS
Activation of leukocytes	C3	Cell movement of neutrophils	MAVS
Activation of lymphocytes	C3	Cell movement of mononuclear leukocytes	MAVS
Cell movement of leukocytes	C3	Infiltration of leukocytes	MAVS
Leukocyte migration	C3	Cell movement of phagocytes	MAVS
Activation of T lymphocytes	C3	Infiltration of myeloid cells	MAVS
Cell movement of myeloid cells	C3	Infiltration by lymphocytes	MAVS
Cell movement of granulocytes	C3	Infiltration of granulocytes	MAVS
Cell movement of lymphocytes	C3	Activation of leukocytes	IL27RA
Cell movement of neutrophils	C3	Activation of lymphocytes	IL27RA
Lymphocyte migration	C3	Cell movement of leukocytes	IL27RA
Cell movement of mononuclear leukocytes	C3	Leukocyte migration	IL27RA
T cell migration	C3	Activation of T lymphocytes	IL27RA
Infiltration of leukocytes	C3	Cell movement of myeloid cells	IL27RA
Cell movement of phagocytes	C3	Cell movement of granulocytes	IL27RA
Priming of leukocytes	C3	Infiltration of leukocytes	IL27RA
Infiltration of myeloid cells	C3	Infiltration of myeloid cells	IL27RA
Localization of leukocytes	C3	Infiltration of granulocytes	IL27RA
Infiltration by lymphocytes	C3	Cell movement of eosinophils	IL27RA
Infiltration of granulocytes	C3	Cell movement of leukocytes	ITGA6
Activation of neutrophils	C3	Leukocyte migration	ITGA6
Priming of T lymphocytes	C3	Adhesion of immune cells	ITGA6
Infiltration by T lymphocytes	C3	Cell movement of lymphocytes	ITGA6
Activation of leukocytes	ELANE	Accumulation of granulocytes	ITGA6
Cell movement of leukocytes	ELANE	Lymphocyte migration	ITGA6
Leukocyte migration	ELANE	Cell movement of mononuclear leukocytes	ITGA6
Cell movement of myeloid cells	ELANE	T cell migration	ITGA6
Cell movement of granulocytes	ELANE	Accumulation of myeloid cells	ITGA6
Adhesion of immune cells	ELANE	Accumulation of leukocytes	ITGA6
Cell movement of neutrophils	ELANE	Binding of antigen presenting cells	ITGA6
Accumulation of granulocytes	ELANE	Cell movement of leukocytes	LTB
Recruitment of granulocytes	ELANE	Leukocyte migration	LTB
Infiltration of leukocytes	ELANE	Cell movement of myeloid cells	LTB
Cell movement of phagocytes	ELANE	Cell movement of lymphocytes	LTB
Recruitment of phagocytes	ELANE	Lymphocyte migration	LTB
Recruitment of neutrophils	ELANE	Cell movement of mononuclear leukocytes	LTB
Infiltration of myeloid cells	ELANE	T cell migration	LTB
Recruitment of leukocytes	ELANE	Infiltration of leukocytes	LTB
Infiltration of granulocytes	ELANE	Cell movement of phagocytes	LTB
Accumulation of myeloid cells	ELANE	Infiltration by lymphocytes	LTB
Accumulation of leukocytes	ELANE	Infiltration by T lymphocytes	LTB
Activation of neutrophils	ELANE	Activation of leukocytes	CD48
Transmigration of leukocytes	ELANE	Activation of lymphocytes	CD48
Cell movement of leukocytes	ALOX5	Cell movement of leukocytes	CD48
Leukocyte migration	ALOX5	Activation of T lymphocytes	CD48
Cell movement of myeloid cells	ALOX5	Cell movement of myeloid cells	CD48
Cell movement of granulocytes	ALOX5	Cell movement of granulocytes	CD48
Homing of leukocytes	ALOX5	Infiltration of leukocytes	CD48

Chemotaxis of myeloid cells	ALOX5	Infiltration of myeloid cells	CD48
Chemotaxis of leukocytes	ALOX5	Infiltration of granulocytes	CD48
Chemotaxis of granulocytes	ALOX5	Cell movement of eosinophils	CD48
Chemotaxis of phagocytes	ALOX5	Activation of leukocytes	ICOSLG
Cell movement of lymphocytes	ALOX5	Activation of lymphocytes	ICOSLG
Cell movement of neutrophils	ALOX5	Cell movement of leukocytes	ICOSLG
Accumulation of granulocytes	ALOX5	Leukocyte migration	ICOSLG
Recruitment of granulocytes	ALOX5	Activation of T lymphocytes	ICOSLG
Lymphocyte migration	ALOX5	Cell movement of lymphocytes	ICOSLG
Cell movement of mononuclear leukocytes	ALOX5	Lymphocyte migration	ICOSLG
Chemotaxis of neutrophils	ALOX5	Cell movement of mononuclear leukocytes	ICOSLG
T cell migration	ALOX5	T cell migration	ICOSLG
Cell movement of phagocytes	ALOX5	Accumulation of leukocytes	ICOSLG
Recruitment of phagocytes	ALOX5	Cell movement of leukocytes	ICAM2
Recruitment of neutrophils	ALOX5	Leukocyte migration	ICAM2
Recruitment of leukocytes	ALOX5	Cell movement of myeloid cells	ICAM2
Accumulation of myeloid cells	ALOX5	Cell movement of granulocytes	ICAM2
Accumulation of leukocytes	ALOX5	Transmigration of granulocytes	ICAM2
Cell movement of leukocytes	ANXA1	Adhesion of immune cells	ICAM2
Leukocyte migration	ANXA1	Migration of granulocytes	ICAM2
Cell movement of myeloid cells	ANXA1	Transmigration of leukocytes	ICAM2
Cell movement of granulocytes	ANXA1	Cell movement of eosinophils	ICAM2
Homing of leukocytes	ANXA1	Cell movement of leukocytes	ITGB7
Chemotaxis of myeloid cells	ANXA1	Leukocyte migration	ITGB7
Chemotaxis of leukocytes	ANXA1	Homing of leukocytes	ITGB7
Chemotaxis of granulocytes	ANXA1	Adhesion of immune cells	ITGB7
Adhesion of immune cells	ANXA1	Cell movement of lymphocytes	ITGB7
Cell movement of neutrophils	ANXA1	Lymphocyte migration	ITGB7
Recruitment of granulocytes	ANXA1	Cell movement of mononuclear leukocytes	ITGB7
Adhesion of granulocytes	ANXA1	T cell migration	ITGB7
Infiltration of leukocytes	ANXA1	Adhesion of phagocytes	ITGB7
Cell movement of phagocytes	ANXA1	Activation of leukocytes	JMJD6
Adhesion of neutrophils	ANXA1	Cell movement of leukocytes	JMJD6
Recruitment of phagocytes	ANXA1	Leukocyte migration	JMJD6
Infiltration of myeloid cells	ANXA1	Cell movement of myeloid cells	JMJD6
Migration of neutrophils	ANXA1	Homing of leukocytes	JMJD6
Migration of granulocytes	ANXA1	Chemotaxis of myeloid cells	JMJD6
Recruitment of leukocytes	ANXA1	Chemotaxis of leukocytes	JMJD6
Adhesion of phagocytes	ANXA1	Chemotaxis of phagocytes	JMJD6
Infiltration of granulocytes	ANXA1	Cell movement of phagocytes	JMJD6
Detachment of leukocytes	ANXA1	Leukocyte migration	RASGRP2
Cell movement of leukocytes	CCR3	Adhesion of immune cells	RASGRP2
Leukocyte migration	CCR3	Recruitment of granulocytes	RASGRP2
Cell movement of myeloid cells	CCR3	Adhesion of granulocytes	RASGRP2
Cell movement of granulocytes	CCR3	Adhesion of neutrophils	RASGRP2
Homing of leukocytes	CCR3	Recruitment of phagocytes	RASGRP2
Chemotaxis of myeloid cells	CCR3	Recruitment of neutrophils	RASGRP2
Chemotaxis of leukocytes	CCR3	Recruitment of leukocytes	RASGRP2
Chemotaxis of granulocytes	CCR3	Adhesion of phagocytes	RASGRP2
Cell movement of lymphocytes	CCR3	Activation of leukocytes	SH2D1A
Accumulation of granulocytes	CCR3	Activation of lymphocytes	SH2D1A
Recruitment of granulocytes	CCR3	Cell movement of leukocytes	SH2D1A
Lymphocyte migration	CCR3	Leukocyte migration	SH2D1A
Cell movement of mononuclear leukocytes	CCR3	Adhesion of immune cells	SH2D1A
Recruitment of leukocytes	CCR3	Activation of natural killer cells	SH2D1A
Recruitment of lymphocytes	CCR3	Cell movement of lymphocytes	SH2D1A
Accumulation of myeloid cells	CCR3	Lymphocyte migration	SH2D1A
Accumulation of leukocytes	CCR3	Cell movement of mononuclear leukocytes	SH2D1A
Recruitment of eosinophils	CCR3	Cell movement of leukocytes	F2R
Cell movement of eosinophils	CCR3	Cell movement of myeloid cells	F2R
Cell movement of leukocytes	CXCR2	Cell movement of granulocytes	F2R
Leukocyte migration	CXCR2	Adhesion of immune cells	F2R

Cell movement of myeloid cells	CXCR2	Infiltration of leukocytes	F2R
Cell movement of granulocytes	CXCR2	Infiltration of myeloid cells	F2R
Homing of leukocytes	CXCR2	Adhesion of phagocytes	F2R
Chemotaxis of myeloid cells	CXCR2	Infiltration of granulocytes	F2R
Chemotaxis of leukocytes	CXCR2	Activation of leukocytes	NFKB1
Chemotaxis of granulocytes	CXCR2	Activation of lymphocytes	NFKB1
Chemotaxis of phagocytes	CXCR2	Cell movement of leukocytes	NFKB1
Transmigration of granulocytes	CXCR2	Leukocyte migration	NFKB1
Adhesion of immune cells	CXCR2	Cell movement of lymphocytes	NFKB1
Cell movement of neutrophils	CXCR2	Cell movement of mononuclear leukocytes	NFKB1
Recruitment of granulocytes	CXCR2	Infiltration of leukocytes	NFKB1
Chemotaxis of neutrophils	CXCR2	Infiltration by lymphocytes	NFKB1
Transmigration of neutrophils	CXCR2	Cell movement of leukocytes	KCNA3
Adhesion of granulocytes	CXCR2	Leukocyte migration	KCNA3
Infiltration of leukocytes	CXCR2	Cell movement of lymphocytes	KCNA3
Cell movement of phagocytes	CXCR2	Lymphocyte migration	KCNA3
Adhesion of neutrophils	CXCR2	Cell movement of mononuclear leukocytes	KCNA3
Recruitment of phagocytes	CXCR2	T cell migration	KCNA3
Recruitment of neutrophils	CXCR2	Activation of leukocytes	SERPINB9
Infiltration of myeloid cells	CXCR2	Activation of lymphocytes	SERPINB9
Migration of neutrophils	CXCR2	Activation of T lymphocytes	SERPINB9
Migration of granulocytes	CXCR2	Priming of leukocytes	SERPINB9
Recruitment of leukocytes	CXCR2	Priming of T lymphocytes	SERPINB9
Adhesion of phagocytes	CXCR2	Activation of cytotoxic T cells	SERPINB9
Infiltration of granulocytes	CXCR2	Cell movement of leukocytes	SIRT1
Transmigration of leukocytes	CXCR2	Leukocyte migration	SIRT1
Cell movement of leukocytes	C5AR1	Cell movement of myeloid cells	SIRT1
Leukocyte migration	C5AR1	Infiltration of leukocytes	SIRT1
Cell movement of myeloid cells	C5AR1	Cell movement of phagocytes	SIRT1
Cell movement of granulocytes	C5AR1	Infiltration of myeloid cells	SIRT1
Homing of leukocytes	C5AR1	Cell movement of leukocytes	TGFBR1
Chemotaxis of myeloid cells	C5AR1	Leukocyte migration	TGFBR1
Chemotaxis of leukocytes	C5AR1	Cell movement of lymphocytes	TGFBR1
Chemotaxis of granulocytes	C5AR1	Cell movement of mononuclear leukocytes	TGFBR1
Chemotaxis of phagocytes	C5AR1	Infiltration of leukocytes	TGFBR1
Cell movement of neutrophils	C5AR1	Infiltration by lymphocytes	TGFBR1
Recruitment of granulocytes	C5AR1	Activation of leukocytes	LCK
Chemotaxis of neutrophils	C5AR1	Activation of lymphocytes	LCK
Cell movement of phagocytes	C5AR1	Activation of T lymphocytes	LCK
Recruitment of phagocytes	C5AR1	Adhesion of immune cells	LCK
Recruitment of neutrophils	C5AR1	Activation of thymocytes	LCK
Recruitment of leukocytes	C5AR1	Activation of leukocytes	CD3E
Chemotaxis of granulocytes	FPR1	Activation of lymphocytes	CD3E
Activation of leukocytes	FPR1	Activation of T lymphocytes	CD3E
Cell movement of leukocytes	FPR1	Activation of thymocytes	CD3E
Leukocyte migration	FPR1	Activation of leukocytes	H60B/H60C
Cell movement of myeloid cells	FPR1	Activation of lymphocytes	H60B/H60C
Cell movement of granulocytes	FPR1	Activation of T lymphocytes	H60B/H60C
Homing of leukocytes	FPR1	Activation of natural killer cells	H60B/H60C
Chemotaxis of myeloid cells	FPR1	Activation of leukocytes	ITPKB
Chemotaxis of leukocytes	FPR1	Activation of lymphocytes	ITPKB
Chemotaxis of phagocytes	FPR1	Activation of T lymphocytes	ITPKB
Adhesion of immune cells	FPR1	Activation of thymocytes	ITPKB
Cell movement of neutrophils	FPR1	Activation of leukocytes	KLRA4
Chemotaxis of neutrophils	FPR1	Activation of lymphocytes	KLRA4
Cell movement of phagocytes	FPR1	Activation of T lymphocytes	KLRA4
Activation of neutrophils	FPR1	Activation of natural killer cells	KLRA4
Binding of antigen presenting cells	FPR1	Activation of leukocytes	MALT1
Cell movement of leukocytes	HDC	Activation of lymphocytes	MALT1
Leukocyte migration	HDC	Activation of T lymphocytes	MALT1
Cell movement of lymphocytes	HDC	Activation of natural killer cells	MALT1
Accumulation of granulocytes	HDC	Cell movement of leukocytes	CRKL

Lymphocyte migration	HDC	Cell movement of myeloid cells	CRKL
Cell movement of mononuclear leukocytes	HDC	Cell movement of phagocytes	CRKL
Recruitment of leukocytes	HDC	Activation of leukocytes	HSPH1
Recruitment of lymphocytes	HDC	Activation of lymphocytes	HSPH1
Accumulation of myeloid cells	HDC	Activation of T lymphocytes	HSPH1
Accumulation of leukocytes	HDC	Activation of leukocytes	IL12RB2
Cell movement of leukocytes	HP	Activation of lymphocytes	IL12RB2
Leukocyte migration	HP	Activation of T lymphocytes	IL12RB2
Cell movement of myeloid cells	HP	Activation of leukocytes	KLRB1C
Homing of leukocytes	HP	Activation of lymphocytes	KLRB1C
Chemotaxis of myeloid cells	HP	Activation of natural killer cells	KLRB1C
Chemotaxis of leukocytes	HP	Activation of leukocytes	SATB1
Chemotaxis of phagocytes	HP	Activation of lymphocytes	SATB1
Cell movement of mononuclear leukocytes	HP	Activation of T lymphocytes	SATB1
Cell movement of phagocytes	HP	Activation of leukocytes	CD27
Cell movement of leukocytes	LTBR	Activation of lymphocytes	CD27
Leukocyte migration	LTBR	Activation of leukocytes	PEL11
Homing of leukocytes	LTBR	Activation of lymphocytes	PEL11
Cell movement of lymphocytes	LTBR	Activation of leukocytes	SASH3
Cell movement of mononuclear leukocytes	LTBR	Activation of lymphocytes	SASH3
Infiltration of leukocytes	LTBR	Activation of leukocytes	TRAF5
Infiltration by lymphocytes	LTBR	Activation of lymphocytes	TRAF5
Recruitment of granulocytes	MMP9	Activation of leukocytes	HLA-B*
Cell movement of leukocytes	MMP9	Activation of leukocytes	PRKCE
Leukocyte migration	MMP9	Leukocyte migration	TBX21
Cell movement of myeloid cells	MMP9	Accumulation of leukocytes	SH2D2A
Cell movement of granulocytes	MMP9	Función: Inflammatory response	
Transmigration of granulocytes	MMP9	Quantity of neutrophils	IFNG
Cell movement of neutrophils	MMP9	Activation of leukocytes	IFNG
Accumulation of granulocytes	MMP9	Activation of lymphocytes	IFNG
Transmigration of neutrophils	MMP9	Quantity of phagocytes	IFNG
Infiltration of leukocytes	MMP9	Activation of T lymphocytes	IFNG
Cell movement of phagocytes	MMP9	Antibody response	IFNG
Recruitment of phagocytes	MMP9	Chemotaxis of myeloid cells	IFNG
Recruitment of neutrophils	MMP9	Chronic hepatitis	IFNG
Migration of neutrophils	MMP9	Chemotaxis of leukocytes	IFNG
Migration of granulocytes	MMP9	Chemotaxis of granulocytes	IFNG
Recruitment of leukocytes	MMP9	TH1 immune response	IFNG
Accumulation of myeloid cells	MMP9	Chemotaxis of phagocytes	IFNG
Accumulation of leukocytes	MMP9	Inflammatory response	IFNG
Transmigration of leukocytes	MMP9	Inflammation of nervous central system	IFNG
Cell movement of leukocytes	MSR1	Activation of natural killer cells	IFNG
Leukocyte migration	MSR1	Cell movement of neutrophils	IFNG
Cell movement of myeloid cells	MSR1	Accumulation of granulocytes	IFNG
Cell movement of granulocytes	MSR1	Response of phagocytes	IFNG
Adhesion of immune cells	MSR1	Immune response of antigen presenting cells	IFNG
Infiltration of leukocytes	MSR1	Formation of phagocytes	IFNG
Infiltration of myeloid cells	MSR1	Chemotaxis of neutrophils	IFNG
Infiltration of granulocytes	MSR1	Inflammation of liver	IFNG
Binding of antigen presenting cells	MSR1	Anti-tumor response	IFNG
Cell movement of leukocytes	S100A8	Cell-mediated response	IFNG
Leukocyte migration	S100A8	Immune response of cells	IFNG
Cell movement of myeloid cells	S100A8	Quantity of macrophages	IFNG
Cell movement of granulocytes	S100A8	Phagocytosis of leukocytes	IFNG
Homing of leukocytes	S100A8	Immune response of phagocytes	IFNG
Chemotaxis of myeloid cells	S100A8	Cell movement of phagocytes	IFNG
Chemotaxis of leukocytes	S100A8	Glomerulonephritis	IFNG
Chemotaxis of granulocytes	S100A8	Priming of leukocytes	IFNG
Chemotaxis of phagocytes	S100A8	Recruitment of phagocytes	IFNG
Cell movement of neutrophils	S100A8	Response of macrophages	IFNG
Accumulation of granulocytes	S100A8	Recruitment of neutrophils	IFNG
Chemotaxis of neutrophils	S100A8	Cytotoxic reaction of antigen presenting cells	IFNG

Cell movement of phagocytes	S100A8	Cytotoxic reaction of phagocytes	IFNG
Migration of neutrophils	S100A8	Migration of neutrophils	IFNG
Migration of granulocytes	S100A8	Immune response of macrophages	IFNG
Accumulation of myeloid cells	S100A8	Phagocytosis of cells	IFNG
Accumulation of leukocytes	S100A8	Nephritis	IFNG
Leukocyte migration	S100A9	Inflammatory response of macrophages	IFNG
Cell movement of leukocytes	S100A9	Quantity of dendritic cells	IFNG
Cell movement of myeloid cells	S100A9	Host defense	IFNG
Cell movement of granulocytes	S100A9	Accumulation of myeloid cells	IFNG
Homing of leukocytes	S100A9	Accumulation of leukocytes	IFNG
Chemotaxis of leukocytes	S100A9	Phagocytosis of phagocytes	IFNG
Cell movement of neutrophils	S100A9	Engulfment by macrophages	IFNG
Accumulation of granulocytes	S100A9	Allergic inflammation	IFNG
Cell movement of phagocytes	S100A9	Proinflammatory response	IFNG
Migration of neutrophils	S100A9	Inflammation of intestine	IFNG
Migration of granulocytes	S100A9	Phagocytosis of antigen presenting cells	IFNG
Accumulation of myeloid cells	S100A9	Localization of lymphocytes	IFNG
Accumulation of leukocytes	S100A9	Activation of cytotoxic T cells	IFNG
Leukocyte migration	CHI3LI	Swelling of joint	IFNG
Recruitment of granulocytes	CHI3LI	Quantity of monocytes	IFNG
Recruitment of phagocytes	CHI3LI	Activation of leukocytes	CD40LG
Recruitment of neutrophils	CHI3LI	Activation of lymphocytes	CD40LG
Recruitment of eosinophils	CHI3LI	Quantity of phagocytes	CD40LG
Leukocyte migration	CLEC4E	Activation of T lymphocytes	CD40LG
Recruitment of granulocytes	CLEC4E	Antibody response	CD40LG
Recruitment of phagocytes	CLEC4E	Inflammation of nervous central system	CD40LG
Recruitment of neutrophils	CLEC4E	Response of phagocytes	CD40LG
Recruitment of leukocytes	CLEC4E	Immune response of antigen presenting cells	CD40LG
Recruitment of lymphocytes	CLEC4E	Anti-tumor response	CD40LG
Cell movement of leukocytes	RASGRP4	Cell-mediated response	CD40LG
Leukocyte migration	RASGRP4	Immune response of cells	CD40LG
Cell movement of myeloid cells	RASGRP4	Quantity of macrophages	CD40LG
Cell movement of granulocytes	RASGRP4	Function of immune system	CD40LG
Homing of leukocytes	RASGRP4	Immune response of phagocytes	CD40LG
Chemotaxis of myeloid cells	RASGRP4	Glomerulonephritis	CD40LG
Chemotaxis of leukocytes	RASGRP4	Adhesion of neutrophils	CD40LG
Chemotaxis of granulocytes	RASGRP4	Priming of leukocytes	CD40LG
Chemotaxis of phagocytes	RASGRP4	Response of macrophages	CD40LG
Cell movement of neutrophils	RASGRP4	Immune response of macrophages	CD40LG
Chemotaxis of neutrophils	RASGRP4	Nephritis	CD40LG
Cell movement of phagocytes	RASGRP4	Adhesion of phagocytes	CD40LG
Cell movement of leukocytes	MIR-154	Priming of T lymphocytes	CD40LG
Leukocyte migration	MIR-154	Inflammation of intestine	CD40LG
Leukocyte migration	CHI3LI	Activation of cytotoxic T cells	CD40LG
Recruitment of granulocytes	CHI3LI	Accumulation of leukocytes	IKKBK
Recruitment of phagocytes	CHI3LI	Activation of leukocytes	IKKBK
Recruitment of neutrophils	CHI3LI	Activation of lymphocytes	IKKBK
Recruitment of leukocytes	CHI3LI	Quantity of phagocytes	IKKBK
Recruitment of eosinophils	CHI3LI	Activation of T lymphocytes	IKKBK
Leukocyte migration	CLEC4E	Chemotaxis of myeloid cells	IKKBK
Recruitment of granulocytes	CLEC4E	Chronic hepatitis	IKKBK
Recruitment of phagocytes	CLEC4E	Chemotaxis of leukocytes	IKKBK
Recruitment of neutrophils	CLEC4E	Chemotaxis of granulocytes	IKKBK
Recruitment of leukocytes	CLEC4E	Chemotaxis of phagocytes	IKKBK
Recruitment of lymphocytes	CLEC4E	Inflammatory response	IKKBK
Leukocyte migration	F13A1	Cell movement of neutrophils	IKKBK
Recruitment of phagocytes	F13A1	Chemotaxis of neutrophils	IKKBK
Recruitment of leukocytes	F13A1	Inflammation of liver	IKKBK
Adhesion of immune cells	CD200R1	Quantity of macrophages	IKKBK
Función: Inflammatory response		Cell movement of phagocytes	IKKBK
Activation of leukocytes	C3	Priming of leukocytes	IKKBK
		Recruitment of phagocytes	IKKBK

Activation of lymphocytes	C3	Recruitment of neutrophils	IKBKB
Quantity of phagocytes	C3	Priming of T lymphocytes	IKBKB
Activation of T lymphocytes	C3	Inflammation of intestine	IKBKB
Antibody response	C3	Localization of lymphocytes	IKBKB
Inflammatory response	C3	Swelling of joint	IKBKB
Cell movement of neutrophils	C3	Activation of leukocytes	STAT6
Response of phagocytes	C3	Quantity of phagocytes	STAT6
Inflammation of liver	C3	Antibody response	STAT6
Cell-mediated response	C3	Chemotaxis of myeloid cells	STAT6
Immune response of cells	C3	Chemotaxis of leukocytes	STAT6
Quantity of neutrophils	C3	Chemotaxis of granulocytes	STAT6
Phagocytosis of leukocytes	C3	TH1 immune response	STAT6
Function of immune system	C3	Chemotaxis of phagocytes	STAT6
Immune response of phagocytes	C3	Inflammatory response	STAT6
Cell movement of phagocytes	C3	Cell movement of neutrophils	STAT6
Glomerulonephritis	C3	Accumulation of granulocytes	STAT6
Priming of leukocytes	C3	Chemotaxis of neutrophils	STAT6
Degranulation of phagocytes	C3	Inflammation of liver	STAT6
Phagocytosis of cells	C3	Cell-mediated response	STAT6
Nephritis	C3	Quantity of neutrophils	STAT6
Degranulation of cells	C3	Cell movement of phagocytes	STAT6
Activation of neutrophils	C3	Recruitment of phagocytes	STAT6
Priming of T lymphocytes	C3	Recruitment of neutrophils	STAT6
Phagocytosis of phagocytes	C3	Accumulation of myeloid cells	STAT6
Inflammation of intestine	C3	Accumulation of leukocytes	STAT6
Activation of leukocytes	ELANE	Inflammation of intestine	STAT6
Inflammatory response	ELANE	Activation of leukocytes	TREML2
Cell movement of neutrophils	ELANE	Chemotaxis of myeloid cells	TREML2
Accumulation of granulocytes	ELANE	Chemotaxis of leukocytes	TREML2
Immune response of cells	ELANE	Chemotaxis of granulocytes	TREML2
Cell movement of phagocytes	ELANE	Chemotaxis of phagocytes	TREML2
Recruitment of phagocytes	ELANE	Inflammatory response	TREML2
Recruitment of neutrophils	ELANE	Cell movement of neutrophils	TREML2
Phagocytosis of cells	ELANE	Chemotaxis of neutrophils	TREML2
Accumulation of myeloid cells	ELANE	Immune response of cells	TREML2
Accumulation of leukocytes	ELANE	Phagocytosis of leukocytes	TREML2
Activation of neutrophils	ELANE	Cell movement of phagocytes	TREML2
Activation of leukocytes	FPR1	Recruitment of phagocytes	TREML2
Chemotaxis of leukocytes	FPR1	Recruitment of neutrophils	TREML2
Chemotaxis of phagocytes	FPR1	Degranulation of phagocytes	TREML2
Inflammatory response	FPR1	Phagocytosis of cells	TREML2
Cell movement of neutrophils	FPR1	Degranulation of cells	TREML2
Chemotaxis of neutrophils	FPR1	Activation of neutrophils	TREML2
Cell movement of phagocytes	FPR1	Engulfment by macrophages	TREML2
Activation of neutrophils	FPR1	Activation of leukocytes	ICOSLG
Chemotaxis of myeloid cells	FPR1	Activation of lymphocytes	ICOSLG
Chemotaxis of granulocytes	FPR1	Activation of T lymphocytes	ICOSLG
Quantity of phagocytes	C1QA	Antibody response	ICOSLG
Immune response of cells	C1QA	Inflammatory response	ICOSLG
Quantity of neutrophils	C1QA	Response of phagocytes	ICOSLG
Glomerulonephritis	C1QA	Immune response of antigen presenting cells	ICOSLG
Phagocytosis of cells	C1QA	Cell-mediated response	ICOSLG
Nephritis	C1QA	Immune response of cells	ICOSLG
Quantity of phagocytes	C5AR1	Phagocytosis of leukocytes	ICOSLG
Antibody response	C5AR1	Function of immune system	ICOSLG
Chemotaxis of myeloid cells	C5AR1	Immune response of phagocytes	ICOSLG
Chemotaxis of leukocytes	C5AR1	Phagocytosis of cells	ICOSLG
Chemotaxis of granulocytes	C5AR1	Nephritis	ICOSLG
TH1 immune response	C5AR1	Accumulation of leukocytes	ICOSLG
Chemotaxis of phagocytes	C5AR1	Phagocytosis of phagocytes	ICOSLG
Inflammatory response	C5AR1	Phagocytosis of antigen presenting cells	ICOSLG
Cell movement of neutrophils	C5AR1	Activation of leukocytes	JMJD6

Chemotaxis of neutrophils	C5AR1	Chemotaxis of myeloid cells	JMJD6
Cell-mediated response	C5AR1	Chemotaxis of leukocytes	JMJD6
Quantity of neutrophils	C5AR1	Chemotaxis of phagocytes	JMJD6
Quantity of macrophages	C5AR1	Inflammatory response	JMJD6
Cell movement of phagocytes	C5AR1	Response of phagocytes	JMJD6
Recruitment of phagocytes	C5AR1	Immune response of antigen presenting cells	JMJD6
Recruitment of neutrophils	C5AR1	Immune response of cells	JMJD6
Proinflammatory response	C5AR1	Phagocytosis of leukocytes	JMJD6
Quantity of phagocytes	CCR3	Immune response of phagocytes	JMJD6
Chemotaxis of myeloid cells	CCR3	Cell movement of phagocytes	JMJD6
Chemotaxis of leukocytes	CCR3	Response of macrophages	JMJD6
Chemotaxis of granulocytes	CCR3	Immune response of macrophages	JMJD6
Inflammatory response	CCR3	Phagocytosis of cells	JMJD6
Accumulation of granulocytes	CCR3	Phagocytosis of phagocytes	JMJD6
Degranulation of phagocytes	CCR3	Engulfment by macrophages	JMJD6
Degranulation of cells	CCR3	Phagocytosis of antigen presenting cells	JMJD6
Accumulation of myeloid cells	CCR3	Activation of leukocytes	PRKCC
Accumulation of leukocytes	CCR3	Activation of lymphocytes	PRKCC
Quantity of monocytes	CCR3	Activation of T lymphocytes	PRKCC
Quantity of phagocytes	CD200R1	Antibody response	PRKCC
Quantity of macrophages	CD200R1	Activation of natural killer cells	PRKCC
Degranulation of phagocytes	CD200R1	Cell movement of neutrophils	PRKCC
Degranulation of cells	CD200R1	Transmigration of neutrophils	PRKCC
Quantity of phagocytes	CLEC4E	Cell movement of phagocytes	PRKCC
Quantity of neutrophils	CLEC4E	Adhesion of neutrophils	PRKCC
Recruitment of phagocytes	CLEC4E	Priming of leukocytes	PRKCC
Recruitment of neutrophils	CLEC4E	Recruitment of phagocytes	PRKCC
Quantity of monocytes	CLEC4E	Recruitment of neutrophils	PRKCC
Quantity of phagocytes	CLIC4	Migration of neutrophils	PRKCC
Response of phagocytes	CLIC4	Adhesion of phagocytes	PRKCC
Immune response of antigen presenting cells	CLIC4	Accumulation of leukocytes	PRKCC
Immune response of cells	CLIC4	Priming of T lymphocytes	PRKCC
Quantity of macrophages	CLIC4	Quantity of phagocytes	ABCA1
Phagocytosis of leukocytes	CLIC4	Response of phagocytes	ABCA1
Immune response of phagocytes	CLIC4	Immune response of antigen presenting cells	ABCA1
Response of macrophages	CLIC4	Immune response of cells	ABCA1
Immune response of macrophages	CLIC4	Quantity of macrophages	ABCA1
Phagocytosis of cells	CLIC4	Phagocytosis of leukocytes	ABCA1
Phagocytosis of phagocytes	CLIC4	Immune response of phagocytes	ABCA1
Engulfment by macrophages	CLIC4	Glomerulonephritis	ABCA1
Phagocytosis of antigen presenting cells	CLIC4	Response of macrophages	ABCA1
Quantity of phagocytes	CXCR2	Immune response of macrophages	ABCA1
Chemotaxis of myeloid cells	CXCR2	Phagocytosis of cells	ABCA1
Chemotaxis of leukocytes	CXCR2	Nephritis	ABCA1
Chemotaxis of granulocytes	CXCR2	Phagocytosis of phagocytes	ABCA1
Chemotaxis of phagocytes	CXCR2	Engulfment by macrophages	ABCA1
Inflammatory response	CXCR2	Phagocytosis of antigen presenting cells	ABCA1
Cell movement of neutrophils	CXCR2	Antibody response	CCL5
Chemotaxis of neutrophils	CXCR2	Chemotaxis of myeloid cells	CCL5
Quantity of neutrophils	CXCR2	Chemotaxis of leukocytes	CCL5
Transmigration of neutrophils	CXCR2	TH1 immune response	CCL5
Cell movement of phagocytes	CXCR2	Chemotaxis of phagocytes	CCL5
Adhesion of neutrophils	CXCR2	Inflammatory response	CCL5
Recruitment of phagocytes	CXCR2	Cell movement of neutrophils	CCL5
Recruitment of neutrophils	CXCR2	Response of phagocytes	CCL5
Migration of neutrophils	CXCR2	Cell-mediated response	CCL5
Adhesion of phagocytes	CXCR2	Cell movement of phagocytes	CCL5
Quantity of phagocytes	GP49A	Recruitment of phagocytes	CCL5
Inflammatory response	GP49A	Migration of neutrophils	CCL5
Immune response of antigen presenting cells	GP49A	Accumulation of myeloid cells	CCL5
Immune response of cells	GP49A	Accumulation of leukocytes	CCL5
Quantity of macrophages	GP49A	Activation of leukocytes	IL12RB2

Function of immune system	GP49A	Activation of lymphocytes	IL12RB2
Degranulation of phagocytes	GP49A	Quantity of phagocytes	IL12RB2
Degranulation of cells	GP49A	Activation of T lymphocytes	IL12RB2
Swelling of joint	GP49A	TH1 immune response	IL12RB2
Quantity of phagocytes	HDC	Inflammation of nervous central system	IL12RB2
Accumulation of granulocytes	HDC	Inflammation of liver	IL12RB2
Accumulation of myeloid cells	HDC	Cell-mediated response	IL12RB2
Accumulation of leukocytes	HDC	Quantity of macrophages	IL12RB2
Quantity of neutrophils	HDC	Glomerulonephritis	IL12RB2
Quantity of phagocytes	KISS1R	Nephritis	IL12RB2
Quantity of neutrophils	KISS1R	Quantity of dendritic cells	IL12RB2
Quantity of monocytes	KISS1R	Quantity of monocytes	IL12RB2
Quantity of phagocytes	LTBR	Activation of leukocytes	DOCK2
Chronic hepatitis	LTBR	Activation of lymphocytes	DOCK2
Formation of phagocytes	LTBR	Activation of T lymphocytes	DOCK2
Inflammation of liver	LTBR	Chemotaxis of myeloid cells	DOCK2
Quantity of neutrophils	LTBR	Chemotaxis of leukocytes	DOCK2
Function of immune system	LTBR	Chemotaxis of granulocytes	DOCK2
Quantity of dendritic cells	LTBR	Chemotaxis of phagocytes	DOCK2
Formation of follicular dendritic cells	LTBR	Inflammatory response	DOCK2
Inflammation of intestine	LTBR	Cell movement of neutrophils	DOCK2
Quantity of phagocytes	MMP9	Chemotaxis of neutrophils	DOCK2
Inflammatory response	MMP9	Cell movement of phagocytes	DOCK2
Cell movement of neutrophils	MMP9	Accumulation of leukocytes	DOCK2
Accumulation of granulocytes	MMP9	Activation of leukocytes	FYN
Inflammation of liver	MMP9	Activation of lymphocytes	FYN
Quantity of neutrophils	MMP9	Activation of T lymphocytes	FYN
Transmigration of neutrophils	MMP9	Chemotaxis of leukocytes	FYN
Quantity of macrophages	MMP9	Chemotaxis of phagocytes	FYN
Cell movement of phagocytes	MMP9	Inflammatory response	FYN
Glomerulonephritis	MMP9	Cell movement of phagocytes	FYN
Recruitment of phagocytes	MMP9	Glomerulonephritis	FYN
Recruitment of neutrophils	MMP9	Activation of thymocytes	FYN
Migration of neutrophils	MMP9	Degranulation of phagocytes	FYN
Nephritis	MMP9	Nephritis	FYN
Quantity of dendritic cells	MMP9	Degranulation of cells	FYN
Accumulation of leukocytes	MMP9	Activation of leukocytes	NFKB1
Allergic inflammation	MMP9	Activation of lymphocytes	NFKB1
Inflammation of intestine	MMP9	Quantity of phagocytes	NFKB1
Swelling of joint	MMP9	Antibody response	NFKB1
Quantity of monocytes	MMP9	Inflammatory response	NFKB1
Accumulation of myeloid cells	MMP9	Formation of phagocytes	NFKB1
Quantity of phagocytes	S100A8	Inflammation of liver	NFKB1
Chemotaxis of leukocytes	S100A8	Quantity of macrophages	NFKB1
Chemotaxis of granulocytes	S100A8	Function of immune system	NFKB1
Chemotaxis of phagocytes	S100A8	Nephritis	NFKB1
Inflammatory response	S100A8	Quantity of dendritic cells	NFKB1
Cell movement of neutrophils	S100A8	Inflammation of intestine	NFKB1
Accumulation of granulocytes	S100A8	Response of phagocytes	BIN1
Chemotaxis of neutrophils	S100A8	Immune response of antigen presenting cells	BIN1
Quantity of neutrophils	S100A8	Immune response of cells	BIN1
Cell movement of phagocytes	S100A8	Phagocytosis of leukocytes	BIN1
Migration of neutrophils	S100A8	Immune response of phagocytes	BIN1
Accumulation of myeloid cells	S100A8	Response of macrophages	BIN1
Accumulation of leukocytes	S100A8	Immune response of macrophages	BIN1
Chemotaxis of myeloid cells	S100A8	Phagocytosis of cells	BIN1
Quantity of phagocytes	S100A9	Phagocytosis of phagocytes	BIN1
Chemotaxis of leukocytes	S100A9	Engulfment by macrophages	BIN1
Inflammatory response	S100A9	Phagocytosis of antigen presenting cells	BIN1
Cell movement of neutrophils	S100A9	Activation of leukocytes	PRF1
Accumulation of granulocytes	S100A9	Activation of lymphocytes	PRF1
Response of phagocytes	S100A9	Quantity of phagocytes	PRF1

Immune response of antigen presenting cells	S100A9	Activation of T lymphocytes	PRF1
Immune response of cells	S100A9	Inflammatory response	PRF1
Quantity of neutrophils	S100A9	Inflammation of nervous central system	PRF1
Phagocytosis of leukocytes	S100A9	Activation of natural killer cells	PRF1
Immune response of phagocytes	S100A9	Inflammation of liver	PRF1
Cell movement of phagocytes	S100A9	Anti-tumor response	PRF1
Response of macrophages	S100A9	Quantity of macrophages	PRF1
Migration of neutrophils	S100A9	Activation of cytotoxic T cells	PRF1
Immune response of macrophages	S100A9	Activation of leukocytes	SERPINB9
Phagocytosis of cells	S100A9	Activation of lymphocytes	SERPINB9
Accumulation of myeloid cells	S100A9	Activation of T lymphocytes	SERPINB9
Accumulation of leukocytes	S100A9	Response of phagocytes	SERPINB9
Phagocytosis of phagocytes	S100A9	Immune response of antigen presenting cells	SERPINB9
Engulfment by macrophages	S100A9	Immune response of phagocytes	SERPINB9
Phagocytosis of antigen presenting cells	S100A9	Priming of leukocytes	SERPINB9
Chemotaxis of myeloid cells	ALOX5	Cytotoxic reaction of antigen presenting cells	SERPINB9
Chemotaxis of leukocytes	ALOX5	Cytotoxic reaction of phagocytes	SERPINB9
Chemotaxis of granulocytes	ALOX5	Priming of T lymphocytes	SERPINB9
Chemotaxis of phagocytes	ALOX5	Activation of cytotoxic T cells	SERPINB9
Inflammatory response	ALOX5	Quantity of phagocytes	CCR6
Cell movement of neutrophils	ALOX5	Chemotaxis of leukocytes	CCR6
Accumulation of granulocytes	ALOX5	Chemotaxis of phagocytes	CCR6
Chemotaxis of neutrophils	ALOX5	Inflammatory response	CCR6
Function of immune system	ALOX5	Immune response of antigen presenting cells	CCR6
Cell movement of phagocytes	ALOX5	Immune response of cells	CCR6
Recruitment of phagocytes	ALOX5	Quantity of macrophages	CCR6
Recruitment of neutrophils	ALOX5	Cell movement of phagocytes	CCR6
Accumulation of myeloid cells	ALOX5	Quantity of dendritic cells	CCR6
Accumulation of leukocytes	ALOX5	Localization of lymphocytes	CCR6
Chemotaxis of myeloid cells	ANXA1	Inflammatory response	F2R
Chemotaxis of leukocytes	ANXA1	Response of phagocytes	F2R
Chemotaxis of granulocytes	ANXA1	Immune response of antigen presenting cells	F2R
Inflammatory response	ANXA1	Immune response of cells	F2R
Cell movement of neutrophils	ANXA1	Immune response of phagocytes	F2R
Response of phagocytes	ANXA1	Response of macrophages	F2R
Immune response of antigen presenting cells	ANXA1	Immune response of macrophages	F2R
Immune response of cells	ANXA1	Adhesion of phagocytes	F2R
Phagocytosis of leukocytes	ANXA1	Inflammatory response of macrophages	F2R
Immune response of phagocytes	ANXA1	Inflammation of intestine	F2R
Cell movement of phagocytes	ANXA1	Activation of leukocytes	IL27RA
Adhesion of neutrophils	ANXA1	Activation of lymphocytes	IL27RA
Recruitment of phagocytes	ANXA1	Activation of T lymphocytes	IL27RA
Response of macrophages	ANXA1	TH1 immune response	IL27RA
Degranulation of phagocytes	ANXA1	Inflammation of liver	IL27RA
Migration of neutrophils	ANXA1	Cell-mediated response	IL27RA
Immune response of macrophages	ANXA1	Glomerulonephritis	IL27RA
Phagocytosis of cells	ANXA1	Nephritis	IL27RA
Degranulation of cells	ANXA1	Inflammation of intestine	IL27RA
Adhesion of phagocytes	ANXA1	Quantity of phagocytes	LTB
Phagocytosis of phagocytes	ANXA1	Antibody response	LTB
Engulfment by macrophages	ANXA1	Chronic hepatitis	LTB
Phagocytosis of antigen presenting cells	ANXA1	Formation of phagocytes	LTB
Chemotaxis of myeloid cells	HP	Inflammation of liver	LTB
Chemotaxis of leukocytes	HP	Cell movement of phagocytes	LTB
Chemotaxis of phagocytes	HP	Quantity of dendritic cells	LTB
Inflammatory response	HP	Formation of follicular dendritic cells	LTB
Inflammation of liver	HP	Inflammation of intestine	LTB
Cell movement of phagocytes	HP	Quantity of phagocytes	MAVS
Chemotaxis of myeloid cells	RASGRP4	Inflammatory response	MAVS
Chemotaxis of leukocytes	RASGRP4	Inflammation of nervous central system	MAVS
Chemotaxis of granulocytes	RASGRP4	Cell movement of neutrophils	MAVS
Chemotaxis of phagocytes	RASGRP4	Cell movement of phagocytes	MAVS

Inflammatory response	RASGRP4	Quantity of dendritic cells	MAVS
Cell movement of neutrophils	RASGRP4	Host defense	MAVS
Chemotaxis of neutrophils	RASGRP4	Activation of leukocytes	PRKCE
Cell movement of phagocytes	RASGRP4	Quantity of phagocytes	PRKCE
Degranulation of phagocytes	RASGRP4	Inflammatory response	PRKCE
Degranulation of cells	RASGRP4	Response of phagocytes	PRKCE
Inflammation of intestine	RASGRP4	Quantity of neutrophils	PRKCE
Inflammatory response	ABCD2	Response of macrophages	PRKCE
Inflammatory response	HIST1H2BA	Activation of leukocytes	SH2D1A
Recruitment of phagocytes	F13A1	Activation of lymphocytes	SH2D1A
Recruitment of phagocytes	CHI3L1	Antibody response	SH2D1A
Recruitment of neutrophils	CHI3L1	Activation of natural killer cells	SH2D1A
Immune response of cells	MSR1	Cell-mediated response	SH2D1A
Phagocytosis of leukocytes	MSR1	Function of immune system	SH2D1A
Phagocytosis of cells	MSR1	Quantity of phagocytes	SIRT1
Degranulation of phagocytes	PRAM1	Inflammation of liver	SIRT1
Degranulation of cells	PRAM1	Quantity of macrophages	SIRT1
Función: Humoral immune response		Cell movement of phagocytes	SIRT1
Quantity of immunoglobulin	LTBR	Glomerulonephritis	SIRT1
Quantity of IgE	LTBR	Nephritis	SIRT1
Quantity of B lymphocytes	LTBR	Quantity of phagocytes	IRF1
Morphology of B lymphocytes	LTBR	TH1 immune response	IRF1
Quantity of immunoglobulin	H2AFX	Cell-mediated response	IRF1
Quantity of IgG	H2AFX	Function of immune system	IRF1
Quantity of B lymphocytes	H2AFX	Quantity of dendritic cells	IRF1
Class switching	H2AFX	Quantity of phagocytes	ITGB7
Quantity of immunoglobulin	GP49A	Inflammatory response	ITGB7
Quantity of IgE	GP49A	Function of immune system	ITGB7
Quantity of B lymphocytes	GP49A	Adhesion of phagocytes	ITGB7
Quantity of immunoglobulin	CXCR2	Inflammation of intestine	ITGB7
Quantity of IgE	CXCR2	Chemotaxis of myeloid cells	PLEC
Quantity of B lymphocytes	CXCR2	Chemotaxis of leukocytes	PLEC
Quantity of B lymphocytes	C3	Chemotaxis of phagocytes	PLEC
Abnormal morphology of germinal center	C3	Inflammatory response	PLEC
Morphology of germinal center	C3	Cell movement of phagocytes	PLEC
Quantity of immunoglobulin	MMP9	Activation of leukocytes	SPN
Quantity of IgE	MMP9	Activation of lymphocytes	SPN
Quantity of immunoglobulin	MSR1	Activation of T lymphocytes	SPN
Quantity of IgM	MSR1	Cell movement of neutrophils	SPN
Quantity of immunoglobulin	CHI3L1	Cell movement of phagocytes	SPN
Quantity of IgE	CHI3L1	TH1 immune response	TBX21
Quantity of B lymphocytes	KAT6A	Inflammation of nervous central system	TBX21
Quantity of immunoglobulin	C1QA	Inflammation of liver	TBX21
Función: Immunological disease		Cell-mediated response	TBX21
Experimental autoimmune encephalomyelitis	C3	Inflammation of intestine	TBX21
Hypersensitive reaction	C3	Activation of leukocytes	CD3E
Systemic autoimmune syndrome	C3	Activation of lymphocytes	CD3E
Experimental autoimmune encephalomyelitis	HDC	Activation of T lymphocytes	CD3E
Experimental autoimmune encephalomyelitis	MMP9	Activation of thymocytes	CD3E
Hypersensitive reaction	MMP9	Activation of leukocytes	H60B/H60C
Leukocytosis	MMP9	Activation of lymphocytes	H60B/H60C
Allergic inflammation	MMP9	Activation of T lymphocytes	H60B/H60C
Hypoplasia of thymus gland	CTSD	Activation of natural killer cells	H60B/H60C
Hypoplasia of lymphoid organ	CTSD	Activation of leukocytes	ITPKB
Hypoplasia of lymphoid organ	BRCA2	Activation of lymphocytes	ITPKB
Incidence of lymphoma	BRCA2	Activation of T lymphocytes	ITPKB
Tumorigenesis of thymic lymphoma	BRCA2	Activation of thymocytes	ITPKB
Tumorigenesis of lymphoma	BRCA2	Activation of leukocytes	KLRA4
Incidence of lymphoma	H2AFX	Activation of lymphocytes	KLRA4
Tumorigenesis of thymic lymphoma	H2AFX	Activation of T lymphocytes	KLRA4
Tumorigenesis of lymphoma	H2AFX	Activation of natural killer cells	KLRA4
Tumorigenesis of non-Hodgkin lymphoma	H2AFX	Activation of natural killer cells	KLRB1C

Quantity of granuloma	MSR1	Inflammation of liver	KLRB1C
Scrapie of lymph node	LTBR	Cell-mediated response	KLRB1C
Scrapie of spleen	LTBR	Degranulation of cells	KLRB1C
Leukocytosis	LTBR	Activation of leukocytes	LCK
Hypersensitive reaction	S100A9	Activation of lymphocytes	LCK
Leukocytosis	S100A9	Activation of T lymphocytes	LCK
Hypersensitive reaction	ALOX5	Activation of thymocytes	LCK
Eosinophilia	ALOX5	Activation of leukocytes	MALT1
Experimental autoimmune uveoretinitis	ALOX5	Activation of lymphocytes	MALT1
Eosinophilia	CCR3	Activation of T lymphocytes	MALT1
Eosinophilia of esophagus	CCR3	Activation of natural killer cells	MALT1
Eosinophilia	SELENBP1	Activation of leukocytes	SASH3
Systemic autoimmune syndrome	CLEC4D	Activation of lymphocytes	SASH3
Systemic autoimmune syndrome	CXCR2	Antibody response	SASH3
Systemic autoimmune syndrome	ELANE	Inflammatory response	SASH3
Tumorigenesis of lymphoma	FEN1	Quantity of phagocytes	ARID4A
Tumorigenesis of non-Hodgkin lymphoma	FEN1	Quantity of neutrophils	ARID4A
Tumorigenesis of lymphoma	PBX1	Quantity of monocytes	ARID4A
Quantity of granuloma	MSR1	Quantity of phagocytes	ARID4B
Función: Cell mediated immune response		Quantity of neutrophils	ARID4B
T-cell development	IFNG	Quantity of monocytes	ARID4B
Differentiation of T-lymphocytes	IFNG	Quantity of phagocytes	ARNTL
Development of helper T-lymphocytes	IFNG	Quantity of neutrophils	ARNTL
Differentiation of helper T-lymphocytes	IFNG	Quantity of monocytes	ARNTL
Differentiation of Th1 cells	IFNG	Activation of leukocytes	BCL11B
T cell migration	IFNG	Activation of lymphocytes	BCL11B
Development of Th1 cells	IFNG	Activation of T lymphocytes	BCL11B
Infiltration by T lymphocytes	IFNG	Activation of leukocytes	CD48
NK cell development	IFNG	Activation of lymphocytes	CD48
Development of regulatory T lymphocytes	IFNG	Activation of T lymphocytes	CD48
Development of Th2 cells	IFNG	Activation of leukocytes	HSPH1
Conversion of T lymphocytes	IFNG	Activation of lymphocytes	HSPH1
T-cell development	PRKCQ	Activation of T lymphocytes	HSPH1
Differentiation of T-lymphocytes	PRKCQ	Accumulation of granulocytes	ITGA6
Development of natural killer T-lymphocytes	PRKCQ	Accumulation of myeloid cells	ITGA6
Development of helper T-lymphocytes	PRKCQ	Accumulation of leukocytes	ITGA6
Differentiation of helper T-lymphocytes	PRKCQ	Adhesion of neutrophils	RASGRP2
Differentiation of Th1 cells	PRKCQ	Recruitment of phagocytes	RASGRP2
T cell migration	PRKCQ	Recruitment of neutrophils	RASGRP2
Development of Th1 cells	PRKCQ	Activation of leukocytes	SATB1
Infiltration by T lymphocytes	PRKCQ	Activation of lymphocytes	SATB1
T-cell development	GATA3	Activation of T lymphocytes	SATB1
Differentiation of T-lymphocytes	GATA4	Glomerulonephritis	SH2D2A
Development of helper T-lymphocytes	GATA5	Nephritis	SH2D2A
Differentiation of helper T-lymphocytes	GATA6	Accumulation of leukocytes	SH2D2A
Development of Th1 cells	GATA7	Activation of leukocytes	TRAF5
Development of Th2 cells	GATA8	Activation of lymphocytes	TRAF5
Differentiation of Th2 cells	GATA9	Antibody response	TRAF5
Development of thymocytes	GATA10	Activation of leukocytes	CD27
T-cell development	IRF1	Activation of lymphocytes	CD27
Differentiation of T-lymphocytes	IRF2	Quantity of phagocytes	CXCR6
Development of natural killer T-lymphocytes	IRF3	Quantity of macrophages	CXCR6
Differentiation of helper T-lymphocytes	IRF4	Degranulation of phagocytes	DHCR7
Differentiation of Th1 cells	IRF5	Degranulation of cells	DHCR7
NK cell development	IRF6	Quantity of phagocytes	GRAP2
Differentiation of Th2 cells	IRF7	Quantity of macrophages	GRAP2
Development of thymocytes	IRF8	Quantity of phagocytes	KDM5A
T-cell development	STAT6	Quantity of neutrophils	KDM5A
Differentiation of T-lymphocytes	STAT7	Activation of leukocytes	KLRB1
Development of helper T-lymphocytes	STAT8	Activation of lymphocytes	KLRB1
Differentiation of helper T-lymphocytes	STAT9	Activation of leukocytes	PELI1
Differentiation of Th1 cells	STAT10	Activation of lymphocytes	PELI1

Development of regulatory T lymphocytes	STAT11	Quantity of phagocytes	TGFBR1
Development of Th2 cells	STAT12	Quantity of dendritic cells	TGFBR1
Differentiation of Th2 cells	STAT13	Antibody response	TRAF3
T-cell development	TBX21	Cell-mediated response	TRAF3
Differentiation of T-lymphocytes	TBX21	Activation of leukocytes	HLA-B*
Development of helper T-lymphocytes	TBX21	Antibody response	GATA3
Differentiation of helper T-lymphocytes	TBX21	Antibody response	SPIB
Differentiation of Th1 cells	TBX21	Formation of phagocytes	PLCG1
NK cell development	TBX21	Cell movement of phagocytes	CRKL
Development of regulatory T lymphocytes	TBX21	Nephritis	NFAT5
Differentiation of Th2 cells	TBX21	Inflammation of intestine	SMTN
T-cell development	FYN	<i>Función: Lymphoid Tissue Structure and Development</i>	
Differentiation of T-lymphocytes	FYN	Development of lymphocytes	IFNG
Development of natural killer T-lymphocytes	FYN	Development of leukocytes	IFNG
Arrest in differentiation of T lymphocytes	FYN	T cell development	IFNG
Arrest in development of alpha-beta T lymphocytes	FYN	Morphology of lymphoid organ	IFNG
Arrest in development of T lymphocytes	FYN	Morphology of lymphatic system component	IFNG
T-cell development	CD40LG	Differentiation of T lymphocytes	IFNG
Differentiation of T-lymphocytes	CD40LG	Development of lymphoid organ	IFNG
Differentiation of helper T-lymphocytes	CD40LG	Morphology of spleen	IFNG
Differentiation of Th1 cells	CD40LG	Morphology of spleen component	IFNG
T cell migration	CD40LG	development of helper T lymphocytes	IFNG
Infiltraton by T lymphocytes	CD40LG	Morphology of white pulp	IFNG
T-cell development	ICOSLG	Abnormal morphology of white pulp	IFNG
Differentiation of T-lymphocytes	ICOSLG	differentiation of helper T lymphocytes	IFNG
Development of helper T-lymphocytes	ICOSLG	Development of lymphatic system component	IFNG
Differentiation of helper T-lymphocytes	ICOSLG	Abnormal morphology of Peyer's patches	IFNG
T cell migration	ICOSLG	differentiation of Th1 cells	IFNG
Differentiation of Th2 cells	ICOSLG	Abnormal morphology of lymphoid organ	IFNG
T-cell development	LCK	Morphology of lymph follicle	IFNG
Differentiation of T-lymphocytes	LCK	Development of Th1 cells	IFNG
Arrest in differentiation of T lymphocytes	LCK	NK cell development	IFNG
Arrest in development of alpha-beta T lymphocytes	LCK	Formation of lymphatic system component	IFNG
Arrest in development of T lymphocytes	LCK	Quantity of myeloid progenitor cells	IFNG
T-cell development	BCL11B	Morphology of germinal center	IFNG
Differentiation of T-lymphocytes	BCL11B	Abnormal morphology of secondary lymphoid follicle	IFNG
T cell migration	BCL11B	Quantity of lymphatic system cells	IFNG
Infiltraton by T lymphocytes	BCL11B	Development of lymph node	IFNG
Conversion of T lymphocytes	BCL11B	Development of regulatory T lymphocytes	IFNG
T-cell development	IL12RB2	Development of Th2 cells	IFNG
Differentiation of T-lymphocytes	IL12RB3	Abnormal morphology of spleen	IFNG
Development of helper T-lymphocytes	IL12RB4	Conversion of T lymphocytes	IFNG
Development of Th1 cells	IL12RB5	Abnormal morphology of B-cell follicle	IFNG
Conversion of T lymphocytes	IL12RB6	Abnormal morphology of enlarged spleen	IFNG
T-cell development	SH2D1A	Morphology of mesenteric lymph node	IFNG
Differentiation of T-lymphocytes	SH2D1A	Development of osteoclasts	IFNG
Development of natural killer T-lymphocytes	SH2D1A	Lack of germinal center	IFNG
Differentiation of helper T-lymphocytes	SH2D1A	Development of lymphocytes	LTB
Differentiation of Th2 cells	SH2D1A	Development of leukocytes	LTB
T-cell development	CD3E	T cell development	LTB
Differentiation of T-lymphocytes	CD3E	Morphology of lymphoid organ	LTB
Arrest in differentiation of T lymphocytes	CD3E	Morphology of lymphatic system component	LTB
Development of thymocytes	CD3E	Development of lymphoid organ	LTB
T-cell development	IL27RA	Morphology of spleen	LTB
Differentiation of T-lymphocytes	IL27RA	Morphology of spleen component	LTB
Differentiation of helper T-lymphocytes	IL27RA	Morphology of white pulp	LTB
Differentiation of Th1 cells	IL27RA	Abnormal morphology of white pulp	LTB
T-cell development	LEF1	Development of lymphatic system component	LTB
Differentiation of T-lymphocytes	LEF2	Abnormal morphology of Peyer's patches	LTB

Differentiation of helper T-lymphocytes	LEF3	Abnormal morphology of lymphoid organ	LTB
Differentiation of Th1 cells	LEF4	Morphology of lymph follicle	LTB
T-cell development	RICTOR	Formation of lymphatic system component	LTB
Differentiation of T-lymphocytes	RICTOR	Morphology of germinal center	LTB
Differentiation of helper T-lymphocytes	RICTOR	Quantity of lymphatic system cells	LTB
Differentiation of Th2 cells	RICTOR	Regeneration of Peyer's patches	LTB
T-cell development	GRAP2	Development of lymph node	LTB
Differentiation of T-lymphocytes	GRAP3	Formation of germinal center	LTB
Arrest in differentiation of T lymphocytes	GRAP4	Abnormal morphology of spleen	LTB
T-cell development	IKBKB	Formation of follicular dendritic cells	LTB
Development of natural killer T-lymphocytes	IKBKB	Formation of lymphoid tissue	LTB
NK cell development	IKBKB	Lack of peripheral lymph node	LTB
T-cell development	ITPKB	Abnormal morphology of germinal center	LTB
Differentiation of T-lymphocytes	ITPKB	Abnormal morphology of B-cell follicle	LTB
Arrest in differentiation of T lymphocytes	ITPKB	Organogenesis of lymphoid organ	LTB
T-cell development	Klra4	Morphology of mesenteric lymph node	LTB

Anexo 8. Participación de los genes diferencialmente expresados en las redes

Red	Símbolo
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	DHFR
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	GTSE1
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	MPV17L
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	CDC25C
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	FEN1
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	FMNL2
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	IFITM2
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	PBX1
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	S100A8
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	S100A9
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	F13A1
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	IFITM1
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	SMTN
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	UGT1A6
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	BRCA2
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	DMXL2
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	FPR1
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	CDC27
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	LRG1
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	ABCD2
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	ALOX5
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	MSR1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	AGAP1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	GLUL
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	KALRN
Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function	CLEC4E
Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function	CLIC4
Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function	FOSL2
Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function	GLUL
Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function	PILRB
Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function	SORT1
Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function	VPS35
Cellular Development, Hematological System Development and Function, Hematopoiesis	CSAR1
Cellular Movement, Immune Cell Trafficking, Hematological System Development and Function	CLEC4E
Cellular Movement, Immune Cell Trafficking, Hematological System Development and Function	GPC4
Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	ANXA1
Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	C1QA
Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	CSAR1
Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	CTSD
Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	ELANE
Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	EPM2A
Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	KISS1R
Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	MMP9
Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	SLC2A4
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	CCR3
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	CHI3L1
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	CLEC4D
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	RASGRP4
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	SLC22A3
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	ACTA2
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	ANGPTL4
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	C3
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	GP49A
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	KLF5
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	LPL
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	LTBR
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	mir-154
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	POLE2
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	SELENBP1

Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	Zfp948
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	H2AFX
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	HP
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	SUN1
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	TAB1
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	CD200R1
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	CHAF1B
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	DTL
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	GP49A
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	HDC
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	IFITM2
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	POLE
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	TCN2
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	ALOX5
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	ANGPTL4
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	CTBS
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	SELENBP1
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	SLMO2
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	KIF15
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	S100A8
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	C3
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	HDC
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	LGMN
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	PBX1
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	ALDH4A1
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	C10orf137
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	CCND2
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	E2F5
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	GTF2H1
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	HSPH1
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	IFI30
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	ING1
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	LPP
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	PCCA
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	PDLIM5
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	REV3L
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	SIN3A
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	USO1
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	ZMAT3
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	ADM
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	AR
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	BRD1
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	CENPH
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	ELK3
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	GATA3
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	ICAM2
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	KDM4C
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	MAT2A
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	MLL
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	PKNOX1
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	PPP4R2
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	RPL13A
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	YY1
Cancer, Cellular Development, Embryonic Development	ZNF238
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	BDH1
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	CCNG2
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	CD48
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	FLNC
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	KCNJ15
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	KDM5A
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	MAT2B
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	OXCT1

Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	PRPF6
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	SLC23A2
Carbohydrate Metabolism, Energy Production, Small Molecule Biochemistry	TMEM229B
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	CHD7
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	CRK
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	DFFA
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	DOCK2
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	FUBP1
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	HSP90AB1
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	NLK
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	PJA1
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	SH3PXD2A
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	SLC16A5
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	SOC55
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	TBX21
Cell Death and Survival, Cellular Movement, Cancer	TPST2
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	BCAR3
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	CCM2
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	CHORDC1
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	F2R
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	GEMIN7
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	ITGA6
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	MACF1
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	Nrp
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	PPP2R5A
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	PRPF4B
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	SMG1
Cell Morphology, Cardiovascular System Development and Function, Cell Death and Survival	STIP1
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	Ap1
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	CCND2
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	CD5
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	CD3E
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	CD8B
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	CREBBP
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	F2R
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	FYN
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	GNA11
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	GRAP2
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	ITPR1
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	LCK
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	Mapk
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	P38 MAPK
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	PDE3B
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	PLCG1
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	PRF1
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	PRKCE
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	SATB1
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	SIN3A
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	TRAT1
Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism	UFD1L
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	ABLIM1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	BAIAP2
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	BTBD11
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	CNP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	DNAJB1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	FYN
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	KLRD1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	MSL2
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	PUM2
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	SEPT 1.1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	SPTBN1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Behavior	TNIK

Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	SIRT1
Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	SPTAN1
Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	Utp14b
Embryonic Development, Organ Development, Organismal Development	XIAP
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	APH1A
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	ARID4A
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	ARID4B
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	B4GALT7
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	BIN1
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	ERCC4
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	NCOA3
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	PRF1
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	SAFB
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Development and Function	SLAIN1
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	BTG2
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	CREB1
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	CYP51A1
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	FKBP4
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	HLA-B
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	IKKB
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	ITGB7
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	KLC1
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	Klra4
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	LTB
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	NAB2
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	NIPAL3
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	PRKD3
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	STAT6
Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Infectious Disease	TGFBR1
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	CCR6
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	CD40LG
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	CXCR2
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	DGKA
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	ICOSLG
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	IKBKE
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	ITPKB
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	MALT1
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	NFAT5
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	NFKB1
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	PEL1
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	PRKCC
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	SAA
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	SH2D1A
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	SLC9A3R1
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	SPIB
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	TBX21
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	TP53BP1
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	TRAF5
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	TRIM21
Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function	ZMYND11
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	CRK
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	CRKL
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	NUMA1
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	PRPS2
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	RGS14
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	TOB1
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	TRIM26
Infectious Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	TRRAP
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	CBX7
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	CBX8
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	CYP51A1
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	DHCR7

Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	DYNLL1
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	EIF2C1
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	FBXO21
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	JMJD6
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	let-7
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	mir-103
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	PDSS2
Inflammatory Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	ZCCHC11
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	ADM
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	ANKRD40
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	ARL4C
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	COL9A1
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	ELOVL7
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	MAVS
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	RASA2
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	RASA3
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	SIN3B
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	SLC15A4
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	ST8SIA6
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	TRAF3
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	TREML2
Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	USP53
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	AIM1
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	CACNA1E
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	MESP1
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	MKKS
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	OMA1
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	PLEKHA5
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	RBM39
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	SETX
Protein Synthesis, Endocrine System Development and Function, Molecular Transport	ST13

Anexo 9. Artículo de investigación 1 (Enviado a PLoS ONE)

Salamanca, January 29th 2013

PLOS ONE Editorial Board

PLOS ONE

We would like to submit two manuscripts for publication in PLOS ONE, one entitled, "***In vitro and in vivo studies for assessing the immune response induced by Fasciola hepatica-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes***" and another entitled, "**A high level of protection was induced against *Fasciola hepatica* in mice immunised with a multi-epitope, subunit-based vaccine**" by Rojas-Caraballo *et al.*

We consider that our manuscripts are focused on subject areas which fall within the main topics covered by PLOS ONE, specifically Biology and Life Sciences, including aspects such as immunology, vaccine development and parasitology.

The first manuscript describes a method for predicting and designing vaccine candidates based on *Fasciola hepatica* proteins. Twenty-four peptides were thus selected, chemically-synthesised and the immune response so induced was characterised in a murine model. Following an in-depth study of the immune response, seven peptides were selected for their inclusion in a subunit-based vaccine against fasciolosis caused by *F. hepatica*, due to the high and specific immune response elicited by them. The second manuscript assesses the protective efficacy of the aforementioned peptides against experimental challenge with *F. hepatica*-metacercariae in a murine model. The potential of a combination of three *F. hepatica*-derived peptides containing T-epitopes is shown.

Besides addressing the interests of investigators working on parasitic diseases, we believe this manuscript will be of special interest to researchers working in the area of vaccine development.

Yours sincerely,



Antonio Muro Álvarez MD PhD

Head of the Molecular Parasitology and Immunology Department, CIETUS

Manuscript Number:	
Full Title:	In vitro and in vivo studies for assessing the immune response induced by <i>Fasciola hepatica</i> -derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes
Short Title:	Epitope-driven <i>Fasciola hepatica</i> vaccine candidates
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Parasitology
Keywords:	Bioinformatics; epitopes; cytokine; immune response
Corresponding Author:	Antonio Muro University of Salamanca Salamanca, SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Salamanca
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Jose Vicente Rojas-Caraballo, PhD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Jose Vicente Rojas-Caraballo, PhD Julio López-Abán Luis Pérez del Villar Carolina Vizcaino Belén Vicente Pedro Fernández-Soto Manuel Alfonso Patarroyo Antonio Muro

***In vitro* and *in vivo* studies for assessing the immune response induced by *Fasciola hepatica*-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes**

José Rojas-Caraballo^{1,2}, Julio López-Abán¹, Luis Pérez del Villar¹, Carolina Vizcaino², Belén Vicente¹, Pedro Fernández-Soto¹, Manuel Alfonso Patarroyo^{2,3}, Antonio Muro¹.

¹ Parasite and Molecular Immunology Laboratory, Tropical Disease Research Centre, Universidad de Salamanca (IBSAL-CIETUS), Salamanca, Spain

² Molecular Biology and Immunology Department, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Bogotá, Colombia

³ Basic Sciences Department, School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

Corresponding author: Antonio Muro Álvarez

Mailing address: c/Licenciado Méndez Nieto s/n.

Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca.

Salamanca, España.

Phone: (+34) 923294535

Fax: (+34) 923294515

e-mail: ama@usal.es

Running title: Epitope-driven *Fasciola hepatica* vaccine candidates

Abstract

Immunoinformatics now deals mainly with predicting epitopes and peptide-MHC binding. An immunisation trial was carried out on a murine experimental model to assess humoral and cellular immune responses to selected T- or

B-cell *Fasciola hepatica* protein-derived epitopes and its possible use as vaccine candidates.

Several bioinformatics tools were used for predicting B- and T-cell epitopes according to the available data for *Fasciola hepatica* protein amino acid sequences. BALB/c mice were immunised with the synthetic peptides by using the ADAD vaccination system and several immune response parameters were measured (antibody titers, cytokine levels, T-cell populations) to evaluate their ability to elicit an immune response.

Twenty-four B- or T-epitope-containing peptides were chemically synthesised using the solid phase peptide synthesis methodology. *In vitro* assays showed that none of the peptides were cytotoxic. Immunisation with peptides B1, B2, B5, B6, T14, T15 and T16 was also found to be associated with increased total IgG, IgG1 and IgG2a ($p < 0.05$) and a mixed Th1 / Th2 / Th17 / Treg immune response, according to the high IFN- γ , IL-4, IL-17 and IL-10 levels observed, accompanied by increased CD62L and CD197 T-cell populations. These peptides were then proposed as the most promising vaccine candidates against infection caused by *Fasciola hepatica*.

A bioinformatics approach led to seven peptides being identified showing a high and specific immune response. We proposed the potential use of these peptides as vaccine candidates against infection caused by *Fasciola hepatica* (a liver-fluke trematode).

Introduction

Fasciolosis has been one of the most important helminthiasis worldwide affecting grazing livestock due its widespread geographical distribution and resulting economic loss; it is caused by the common liver fluke *Fasciola hepatica*, along with the related species *Fasciola gigantica* [1]. Besides being a well-known veterinary problem, fasciolosis has also recently become considered as an emerging parasitic human disease, having a significant impact on public health, causing millions of people to be at risk of infection. Reports have indicated its increase in many Latin-American, African, European and Asian countries [2,3]. Such increasing incidence during recent years has been related mainly to changing climatic conditions and anthropogenic modifications of the environment thereby providing more favorable conditions for the intermediate host (i.e. snails), allowing the disease to spread into previously infection-free areas [3-5]. Taking its impact on human health and wide emergence into account, human fasciolosis has been recently included in the World Health Organization's (WHO) list of priorities related to Neglected Tropical Diseases [6].

It is well-known that methodological and technical difficulties related to diagnosis have limited progress in combating human fasciolosis globally, including drawbacks in diagnosing infection and assessing drug efficacy and resistance, mainly concerning triclabendazole which is still the most effective drug for combating the disease. Indeed, no commercial vaccine is currently available and developing vaccines for controlling animal and human fasciolosis thus represents a tremendous research opportunity. Many candidate proteins have been tested for a long time now as target antigens in vaccination assays against fluke, including fatty acid-binding proteins, glutathione S-transferases, cathepsin L proteases, leucine aminopeptidase, fluke hemoglobin, thioredoxin peroxidase and paramyosin. However, no consensus regarding the factors required for immunological protection has yet emerged and there has been no report to date of a successful field trial concerning a liver fluke vaccine [7,8].

Many factors may be responsible for the failure of these vaccines when tested; vaccine formulation, choice of adjuvant and delivery route and dosage will affect the way in which different animals and breeds will respond to different vaccines and, possibly, the choice of target antigen. The aforementioned research challenge must thus involve identifying new target antigens for obtaining an effective vaccine against *F. hepatica* [9].

Public access to an increasing number of pathogen genomes which have been totally or partially sequenced, along with the use of powerful *in silico* analysis, currently relies on rapidly screening a large number of expressed pathogen proteins for their ability to induce a protective immune response. Vaccine candidates based on genome information has thus become possible [10]. Synthetic peptide-based vaccines, in which small peptides derived from known target epitopes are used to induce an immune reaction, have thus attracted interest as a promising approach to treating several infectious diseases and tumors, since they have several advantages over other forms of vaccine, particularly regarding safety, ease of production, reproducibility, low cost and ensuring a more effective antigen-specific immune response to a particular cell type [11].

A vaccine's effectiveness requires a strong response from both T- and B-cells [12]. As epitope-based vaccines only contain small sequences derived from an entire protein known to bind to various major histocompatibility complex (MHC) molecules, predicting peptide-MHC binding and mapping epitopes are crucial in their design [13,14]. This approach has led to identifying specific binding motifs for effectively predicting both T- and B-cell

epitopes. There are several online-based tools for predicting the MHC-peptide interaction available for researchers, although B-cell epitope mapping algorithms have lagged behind T-cell ones and only a few B-cell epitope mapping algorithms are in current use [14]; this is because there are still several obstacles to developing B-cell epitope prediction for peptide-based vaccine design [15].

Synthetic peptides have been examined as potential prophylactic vaccines against viral, bacterial and parasitic diseases for many years now [16,17] and as therapeutic vaccines for chronic infections and non-infectious diseases, as well as cancer [18]. Despite such a large number of potential synthetic peptides having been identified, none are currently being marketed for human use [19] and few studies reported to date have used synthetic peptides as anti-helminth vaccines, including *Echinococcus granulosus* [20], *Trichinella spiralis* [21], *Brugia malayi* [22], *Taenia solium* [23], *Schistosoma mansoni* [24] and *F. gigantica* [25]. Regarding *F. hepatica*, synthetic peptides have been used in diagnosing human infections. In the search for selecting optimal vaccine candidate proteins expressed by *F. hepatica* and trigger an immune response induced by previously reported candidate proteins, our group has focused on the rational identification of T- and B-epitopes by *in silico* mapping.

Several peptides have thus been chemically-synthesised and then assessed using *in vitro* and *in vivo* assays to evaluate the induced immune response and their protective efficacy. Our trials have involved using a murine model prepared with an adjuvant/adaptation (ADAD) vaccination system [26] and then immunised with a chosen peptide antigen, a natural immunomodulator extracted from the rhizome of the fern *Phlebodium pseudoaureum* (PAL) or a chemically-synthesised aliphatic diamine immunomodulator AA0029 [27] and a non-hemolytic adjuvant containing *Quillaja saponaria* (QS) saponins to form an emulsion with a non-mineral oil in a 70/30 oil/water ratio. This study was aimed at identifying epitopes and immunologically assessing those that could be used as vaccine candidates against infection caused by *F. hepatica*.

Materials and methods

Ethics statement

The animal procedures in this study complied with Spanish (Real Decreto RD1201/05) and European Union (European Directive 2010/63/EU) guidelines regarding animal experimentation for the protection and humane use of laboratory animals, and were conducted at the University of Salamanca's accredited Animal Experimentation Facilities (Servicio de Experimentación Animal) (Register number:

PAE/SA/001). Procedures were approved by the University of Salamanca's Ethics Committee (protocol approval number 48531).

***Fasciola hepatica* sequence selection**

Due to a lack of data regarding the *F. hepatica* complete genome sequence, only partial information concerning several genes and protein sequences was available in pertinent databases at the beginning of the present study. Each sequence obtained was individually predicted for signal peptide (SP) and transmembrane (TM) domains to select secreted proteins. SP was predicted with the SignalP 3.0 server [28] available at (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and the TM domain was predicted using the TMHMM v.2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Only proteins showing a SP and no TM domains were finally selected and grouped into families. All selected sequences were subjected to multiple sequence alignment using ClustalW (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) and conserved or semi-conserved fragments were chosen for B- and T-cell epitope prediction.

B-cell epitope prediction

The BepiPred method was used for predicting linear B-cell epitopes [29]; the server (BepiPred 1.0) and training datasets are publicly available at <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred>. This method involves each amino acid receiving a prediction score based on Hidden Markov Model (HMM) profiles for known antigens and incorporates propensity scale methods based on hydrophilicity and secondary structure prediction [30]. Predicted linear B-cell epitopes were then compared to the values given for each amino acid using ANTHEPROT 3D software (<http://antheprot-pbil.ibcp.fr>) regarding several physical-chemical profiles, such as antigenicity, hydrophobicity, flexibility and solvent accessibility [31]. The values obtained for each profile were averaged in groups of 20 amino acids. Only regions showing the best probability for each protein (score ≥ 0.5 , according to the HMM result) were selected as promising linear B-cell epitopes.

T-cell epitope prediction

The SYFPEITHI database [32] and the Immune Epitope Database (IEDB), freely accessible at <http://www.syfpeithi.de/> and <http://www.immuneepitope.org/>, respectively, were used as the source of MHC class II binding peptides. SYFPEITHI allows predicting peptide binding to a defined MHC type. The predictions were made for H2-Ad murine MHC class-II ligands. The analysis was performed choosing 15-mer (15 amino acids) for MHC type II as prediction parameter. Each sequence epitope (15-mer peptides) was tested with every MHC

class-II molecule. The resulting peptides showing the highest scores in the merged dataset capable of binding to the murine class-II molecules described above were selected as candidate epitopes.

Peptide synthesis

All derived peptides selected on the basis of T- or linear B-cell epitope predictions for each protein were chemically synthesised (Fundación Instituto de Immunología, FIDIC, Colombia) by the solid-phase peptide synthesis according to the methodology first described by Merrifield [33] and subsequently modified by Houghten [34] using the t-Boc strategy and a BHA (benzylhydramine) resin (0.7 meq/mg). One cysteine and one glycine residue were added at both amino and carboxyl-terminal extremes to allow their polymerization via oxidation. Peptides were purified by reverse phase high performance liquid chromatography (to at least >90% purity), characterized by MALDI-TOF mass spectrometry, lyophilized and quantified. Freeze-dried synthesised peptides were used in the ensuing experiments.

Cytotoxicity evaluation

The J774.2 mouse peritoneal macrophage cell line was used in this study; it was grown in RPMI-1640 culture medium, supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin, at 37°C in humidified 95% air and 5% CO₂. J774.2 peritoneal macrophage cells were plated in complete RPMI-1640 culture medium at 1x10⁶ cells/well concentration in 12-well culture plates (Costar, Cambridge, MA), and left to adhere for 2 h at 37°C in 5% CO₂. Non-adhering cells were removed by gentle washing with complete RPMI-1640 culture medium. Adherent J774.2 cells were incubated in the absence (negative control) or presence of 10 µg/mL lipopolysaccharide (Sigma, St. Louis, MO) (LPS; positive control) or different concentrations of each synthetic peptide. After 48 h incubation at 37°C in 5% CO₂, supernatants were removed and cell viability was measured by MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay [35]. Controls for checking solvent cytotoxicity were also included. Assays were performed in triplicate and absorbance was measured at 540 nm.

Experimental animals

Seven-week-old female BALB/c mice (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) weighing 20 to 22 g were used for the experiments. Animals were kept in the University of Salamanca's Animal Experimentation Facilities in plastic boxes with food and water *ad libitum*. The animals were maintained in regular 12 h

light–dark periods at 20°C and divided into 56 groups of 3 mice per group.

Vaccine formulation and immunisation trial

One hundred and sixty-eight female BALB/c mice were used in this study. The immune response in mice was studied in two separate experiments (A and B). Experiment A: group 1 (untreated control group; n=6), group 2 (ADAD and natural immunomodulator PAL [ADADn]; n=6), groups 3-14 (ADADn together with B1-B12 B-epitope-containing peptides; n=36) and groups 15-26 (ADADn together with T13-T24 T-epitope-containing peptides; n=36). Experiment B: group 1 (untreated control group; n=6), group 2 (ADAD and synthetic immunomodulator AA0029 [ADADs]; n=6), groups 3-14 (ADADs together with B1-B12 B-epitope-containing peptides; n=36) and groups 15-26 (ADADs together with T13-T24 T-epitope-containing peptides; n=36). The mice were subcutaneously immunised using an adjuvant adaptation (ADAD) system [26].

Briefly, the ADAD vaccination system included the vaccine antigen, an immunomodulator (natural or chemically-synthesised), together with non-hemolytic adjuvant *Quillaja saponaria* (QS) saponins to form an emulsion with a non-mineral oil in a 70/30 oil/water ratio. Vaccination with this system included a set of 2 subcutaneous injections. The first, also called adaptation, contained QS and the immunomodulator emulsified in non-mineral oil, but without the vaccine antigen; the second injection was administered 5 days after adaptation and contained the vaccine antigen with QS and the immunomodulator in the emulsion oil. The individual doses injected during mice immunisation were formulated as follows: 600 µg natural immunomodulator PAL (ASAC Pharmaceutical International, Alicante, Spain) or 100 µg chemically synthesised aliphatic diamine immunomodulator AA0029 [27] together with 20 µg *Q. saponaria* (QS) and, when evaluated, 10 µg of each peptide. A final 100 µL/injection volume was emulsified with non-mineral oil (Montanide ISA763A, SEPPIC, Paris, France) in a 70/30 oil/water ratio. Mice were immunised on day 0 and two booster doses with 100 µL of the preparations mentioned above were administered on days 14 and 28.

Sample collection

Mice were humanely euthanized 2 weeks after third immunisation. The spleen was aseptically removed during necropsy to obtain splenocytes for *in vitro* assays. Spleen cell suspensions were collected by spleen perfusion by passing sterile phosphate buffered solution (PBS) through individual spleens according to the methodology described elsewhere by [36]. Blood samples for each mouse were obtained before each

immunisation and also during necropsy for serological studies.

Measuring antibody responses

Sera from mice immunised with the aforementioned formulations were analyzed by ELISA for measuring total IgG, IgE and IgM levels as well as IgG1 and IgG2a antibody isotype levels. Briefly, 96-well polystyrene microplates (Costar, Corning Costar Corp, Cambridge, Mass) were coated with 1 µg solution of each peptide in carbonate buffer pH 9.6 (100 µL per well) and incubated overnight at 4°C. The plates were then washed thrice for 5 min with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST). The plates were blocked with 5% skimmed milk (SM) in PBST (200 µL per well) for 1 h at 37°C and then washed again thrice, as described above. Sera samples were appropriately diluted at 1:100 in dilution buffer (5% SM and PBST) and added to the wells (100 µL per well) in duplicate. After 1h incubation at 37°C the plates were washed as described above and, according to each assay, goat peroxidase-conjugated anti-mouse IgG, IgE, IgM, IgG1 and IgG2a (1:1,000 in dilution buffer, 100 µL per well; Sigma) were incubated for 1 h at 37°C. After washing as above, the bound antibodies were detected using H₂O₂ (0.012%) and ortho-phenylenediamine (0.04%) in 0.1 M citrate/phosphate buffer (100 µL per well).

The enzyme reaction was stopped after 15-20 min by adding 3N H₂SO₄ (100 µL per well) and optical density was measured at 492 nm (OD₄₉₂) on an Ear400FT ELISA reader (STL Lab Instruments, Groding, Austria). The mean absorbance values for each mouse serum from each group were determined and included in each data point. The data were reported as the mean of each group's optical density and the standard deviation (SD). SPSS 20.0 software (SPSS Inc., USA) was used for data analysis. A value <0.05 was considered statistically significant.

Cytokine determination

The frequencies of antigen specific IFN-γ, IL-1α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-α producing T-cells in the spleens were also determined by flow cytometry. Individual mouse splenocytes were cultured in 6-well plates at 1x10⁶ cells per well concentration in complete medium (RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin) and stimulated with each synthetic peptide at final 10 µg/mL concentration for 72 h at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Control wells were prepared containing untreated mouse splenocytes. After the incubation period, splenocyte culture supernatants were recovered

for cytokine determination. A FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10plex kit (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) was used, according to the manufacturer's instructions. Briefly, different sized fluorescent beads coated with capture antibodies specific for the cytokines mentioned above were incubated with splenocyte supernatant cell culture samples to form sandwich complexes with phycoerythrin (PE)-conjugated secondary antibodies.

Flow cytometry data were collected using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) at the University of Salamanca's Flow Cytometry Central Service. A total of 8,000 events were collected gated by forward and side scatter and data were analyzed using FlowCytomix Pro 3.0 software (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Each cytokine concentration was determined from standard curves using known concentrations of mouse recombinant cytokines.

T-cell subset analysis

Flow cytometry analysis was performed on stained and fixed splenocytes to investigate T-cell populations responding to immunisation. For immunofluorescence staining, 1×10^6 cells were incubated with fluorescein isothiosyanate (FITC)-conjugated mouse monoclonal antibodies (mAb) against CD4, or with phycoerythrin (PE)-conjugated mouse mAb against CD8 and CD197, or with allophycocyanin (APC)-conjugated mouse mAb against CD45/B220, CD27 and CD62L, or peridinin chlorophyll protein (PerCP) and cyanine dye (Cy5.5) tandem (PerCP-Cy5.5) conjugated mouse mAb against CD45. All samples were incubated with anti CD16/CD32 blocking monoclonal antibody for 5 min at room temperature. Each specific antibody (BD Biosystems) was incubated in 1/50 dilution factor in PBS plus 2% fetal calf serum (PBS-FCS) for 30 min at 4°C. After the incubation period, cells were washed with PBS-FCS, centrifuged at 1,200 rpm for 5 min and the supernatant was then discarded.

The splenocytes were fixed with 100 μ L of a solution containing 2% p-formaldehyde in PBS for no longer than 12 h at 4°C before data acquisition. Data was collected using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) at the University of Salamanca's Flow Cytometry Central Service. A total of 30,000 events were collected (gated by forward and side scatter) and data were analyzed using GateLogic Flow Cytometry Analysis Software (Inivai Technologies Pty Ltd).

Statistical analysis

Each peptide was characterized in groups of three mice. An initial descriptive analysis was made of each group of mice, exploring cytokine

and immunoglobulin patterns and cell expression. A linear model with interaction was used to evaluate cytokine and cell expression, including two factors: epitope type (B or T) and the immunomodulator used (AA0029 or PAL). Interactions were plotted for representing this linear model using Plotrix package in R [37]. Furthermore, groups of peptides were compared using a Kruskal Wallis test followed by a Dunn multiple comparisons test. Differences having $p < 0.05$ were considered statistically significant. The results were reported as the mean of each group and the standard deviation (SD). SPSS 20.0 software (SPSS Inc., USA) was used for data analysis. Hierarchical clustering was used to identify sets of cytokines whose expression levels correlated among peptides with B- and T-epitopes. Centering and scaling are the previous data transformation steps. The complete linkage clustering method was used, based on a similarity matrix derived from Pearson (rows) and Spearman (columns) moment correlations. The heatmap was visualized using the heatmap.2 function of gplots package in R [38]. Multivariate data, such as trellis and parallel coordinate plot graphs, was visualized with lattice R package [39].

Results

Selecting candidate proteins, epitope prediction and peptide synthesis

A total of 269 reported *F. hepatica* protein sequences were accessible at and downloaded from NCBI; these proteins were individually predicted for both SP and TM domains for selecting those likely to be secreted. According to such criteria, 34 proteins were finally chosen, aligned and grouped into six different families. Most were found to be cathepsins and cathepsin-like proteases. Table 1 shows the 34 selected protein accession numbers, as well as several items regarding the study's bioinformatics prediction phase.

Once selected, the proteins were then analysed for determining B- and T-cell epitopes. Twenty-four linear peptides were chemically synthesised according to *in silico* epitope prediction: twelve 20-amino-acid-long peptides for B-cell epitopes (peptides B1 to B12) and twelve 15-amino-acid-long peptides for T-cell epitopes (peptides T13 to T24). More than 5 mg of each purified peptide was obtained and its purity was found to be higher than 90%. The sequence for each epitope-based peptide is shown in Table 2.

In vitro peptides cytotoxicity evaluation

Each peptide was assayed in four different concentrations ranging from 1 to 100 μ g/mL for *in vitro* cytotoxicity evaluation. Some peptides' hydrophobic nature resulted in them having low solubility in PBS buffer. Such peptides needed DMSO to be added at a concentration no higher

than 2% and in some cases the addition of low quantities of 0.1M HCl or 0.05M NaOH was required. Controls for checking solvent cytotoxicity were added to the study (data not shown). Results showed that none of the peptides were toxic for macrophages below 50 µg/mL and more than 90% were still viable after treatment (Fig. S1). Some T-peptides showed decreased cell viability at the highest concentration (100 µg/mL) and only 70%-80% of the macrophage population was viable. However, the maximum peptide concentration reached in *in vivo* immunisation assays was no higher than 10 µg/mL.

The effect on immune response induced by immunising mice with synthetic peptides

Antibody response

A significant increase in antibody levels (IgG, IgG1, IgG2a, IgE and IgM) was detected after the third dose when peptides were formulated in the ADAD vaccination system using any immunomodulator ($P<0.001$), (Fig. S2). Immunomodulator (PAL and AA0029), epitope (B or T) and peptide effect were compared. Regarding the immunomodulator effect, it was observed that using PAL induced higher IgG than AA0029 titers ([0.5267] *cf* [0.4332] $P=0.003$). Significantly higher total IgG titers were obtained when B-epitope-containing peptides were used compared to T-epitope-containing peptides, regardless of adjuvant effect ([0.5258] *cf* [0.4332] $P=0.05$). The boxplot in Fig. 1A, showed that peptides B1, B2, B3, B4, T18 and T20 induced the highest levels of IgG after being administered in mice using the PAL compared to the control group ($P<0.05$), whilst peptides B1, B3, B4, B5, B6, T13, T15, T18, T20 and T21 induced the highest levels after being administered using the AA0029 compared to the control group ($P<0.05$) (Fig. 1B). There were no detectable anti-peptide antibody levels in any of the unimmunised control groups, as expected. Regarding IgG subclasses, the following relationships were described through linear regression adjustment: IgG1 with total IgG (Fig. 2A) and IgG2a with total IgG (Fig. 2B). It was observed that PAL induced significantly higher IgG1 levels than AA0029 ($P<0.05$) in immunised mice (Fig. 2A). IgG2a levels were not influenced by the immunomodulator used, since there were no statistical differences between the slopes (Fig. 2B). Furthermore, B-epitope-containing peptides using PAL resulted in them being more immunogenic regardless of the IgG subclass being analysed.

There were not statistical differences in IgE levels when any of the immunomodulators was used. Furthermore, B-epitope-containing peptides showed a stronger IgE response than T-epitope-containing peptides ([0.1588] *cf*

[0.0952] $P<0.01$). The same pattern was observed in anti-peptide IgM antibodies, as there were no statistical differences when comparing immunomodulator effect; however, B-epitope-containing peptides had a stronger response than T-epitope-containing peptides ([0.1161] *cf* [0.1014] $P<0.05$). The boxplot showing the IgE and IgM anti-peptide for each peptide has been included in supplementary data (Figs. S3 & S4).

Cytokine levels

Cytokine levels in mice vaccinated only with the adjuvant using PAL or AA0029 were analysed and compared to those of the untreated group to evaluate immunomodulator effect on cytokine response. Only AA0029 was able to induce high levels of IL-4 compared to PAL or non-immunised control group ($P<0.05$). As it can be seen in the scatterplots in three dimensions in Figs S5 & S6, the type of immunomodulator and epitope used in the immunisation trial influences the levels of cytokines. Specifically, the use of the AA0029 with the peptides containing B-epitopes leads to obtain high levels of IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17 (Figs S5A, S5B, S5C and S5D). The use of the peptides with T-epitopes and the AA0029 immunomodulator also produced higher levels of IFN- γ , IL-4 and IL-17 (Figs S6A, S6B & S6D). However, the levels of IL-10 were seems to be influenced by the type of epitope, as minor levels were obtained when using the AA0029 immunomodulator (Fig S6C). Changes in cytokine levels may thus have resulted from the interaction between two factors: the immunomodulator (PAL or AA0029) and the epitope (B or T) being used. A confounding variable here could have been the immunomodulator effect; a linear model regression was thus formulated to overcome this issue, considering the interaction effect (Fig. 3). Regarding the IL-10 regulatory cytokine (Fig. 3A), both the immunomodulator and epitope's main effects were observed. PAL was able to induce significantly higher IL-10 production compared to AA0029 ($P<0.001$). Higher IL-10 values were observed when T-epitope-containing peptides were used compared to those containing B-epitopes, regardless of the immunomodulator being used ($P<0.001$). Cytokine levels induced by B-epitope-containing peptide groups had almost the same value in both cases; however, the values for cytokine levels induced by T-epitope-containing peptides varied greatly. Using PAL together with T-epitopes thus induced a higher IL-10 response compared to AA0029 ($P<0.001$). The same response pattern was detected in IL-5 levels; using PAL also resulted in significantly higher IL-5 levels compared to AA0029, regardless of the epitope being used ($P<0.001$). Nonetheless, no significant differences were observed between B- and T-epitopes concerning IL-5

levels ($P=0.06$). Figure 3B shows that the lines on the plot were not parallel; significant interaction between the adjuvant and epitope used were thus detected ($P<0.001$). In fact, higher IL-5 levels were reached when T-epitope-containing peptides were used with the PAL immunomodulator.

Regarding IL-4 levels (Fig. 3C), using the AA0029 immunomodulator resulted in significantly higher cytokine levels compared to PAL, regardless of the epitope being used ($P<0.001$). IL-4 cytokine levels for B-epitope-containing peptides were significantly higher than those obtained for T-epitope-containing peptides ($P<0.001$) indicating that there was also a main effect for the type of epitope being used (B or T). There was a significant interaction between epitope and immunomodulator ($P<0.001$); by contrast, B-epitope-containing peptides together with AA0029 induced a significantly higher level of IL-4 than IL-5.

IL-17 production was then evaluated as a main determinant of Th17 response. Figure 3D shows that the resulting lines in the interaction plot were not parallel, indicating both a main and an interaction effect. Concerning the main immunomodulator effect, it can be seen that AA0029 produced a significantly higher IL-17 level than PAL ($P<0.001$); however, no significant differences were observed regarding B- and T- epitope effect on IL-17 levels ($P=0.313$). It was also observed that using PAL decreased IL-17 levels when T-epitope containing peptides were used but that such levels greatly increased when using AA0029. A significant interaction effect between immunomodulators and epitopes was thus detected ($P<0.001$).

Regarding innate and Th1 cytokines (IL-2, IFN- γ , IL-6, TNF- α and IL-1 α), it was detected that IFN- γ , IL-6, TNF- α cytokines had a main effect of the type of epitope being used. B-epitope-containing peptides stimulated significantly higher IFN- γ , IL-6 and TNF- α cytokine levels compared to T-epitope-containing peptides ($P<0.001$) (Figs. 3F, 3G & 3H). No significant effect was detected between the type of epitope used with IL-2 and IL-1 α cytokines (Figs. 3E & 3I). There was a main effect on the type of immunomodulator used. Specifically, the AA0029 immunomodulator was able to induce higher IL-2, IFN- γ and IL-6 levels ($P<0.001$). Figures 3H and 3I show that using PAL produced higher TNF- α and IL-1 α levels ($P<0.001$) regardless of the type of epitope used whereas the lines in the plot were not parallel in Figs. 3E, 3F, 3G & 3H. A significant interaction in IL-2, IFN- γ , IL-6 and TNF- α cytokines was thus detected ($P<0.001$).

It was also observed that IL-2 and IL-6 levels became greatly increased when B-epitope-

containing peptides were used in combination with AA0029. Higher IFN- γ levels were reached when T-epitope-containing peptides were used with the AA0029 immunomodulator whereas using B-epitope-containing peptides and the PAL immunomodulator produced the highest TNF- α values.

Each peptide was also individually analyzed for cytokine quantitation after its administration in the mice using the ADAD vaccination. The relationship between Th2 profile cytokines was studied. The following relationships were described: IL-4 and IL-10 levels (Fig. 4A), and IL-5 and IL-10 levels (Fig. 4B) in all of the mice used in this study.

Figure 4A and Fig. 4b show that most T-epitope-containing peptides had high IL-10 and IL-5 levels, but lower IL-4 levels. Increased IL-4 levels were observed in mice immunised with peptides B5, B6, T14 and T15 compared to the AA0029 adjuvant-vaccinated group and also peptides B6 and B12 when the PAL immunomodulator was used. Peptides T16, T22 and T14 induced changes in IL-10 levels when these peptides were immunised with AA0029 while T15, T16, T22 and T23 did so with PAL. The most representative Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5), Th17 (IL-17), and Th10 (IL-10) cytokine profiles were determined in each group of mice immunised with peptides containing either B- or T-epitopes.

Regarding Th1 profile cytokines, the boxplot in Fig. 5 shows IFN- γ levels. Peptides B1, B5, T15 and T16 showed an increase compared to the AA0029 adjuvant-vaccinated group, whilst peptides B1, B5, B8, B9 and B12 produced changes in IFN- γ when PAL was used. The use of AA0029 immunomodulator produced higher levels of both IL-4 and IL-5 cytokines, being the B peptides those with the highest levels compared with the peptides containing T epitopes (Figs S7 & S8). Peptides B5, B6, T14 and T15 produced the highest levels of IL-4 when the AA0029 was used and only IL-4 was highly produced by the peptide B6 with the PAL one (Fig. S7). Regarding to IL-5 levels, peptides B1, B2, B3, B4, B6, B7 and T17 produced the highest levels with the AA0029, whereas peptides T13, T15, T16, T17 and T20 did with the PAL (Fig. S8). As it can be seen in Fig S9, the levels of IL-10 only were influenced by the use of peptides containing T epitopes and with the PAL immunomodulator. Only the peptide T16 induced higher levels of IL-10 with the AA0029 and the peptides T14, T15, T16, T22 and T23 with the PAL.

Changes were produced in IL-17 levels by peptides T14, T16 and T22 when AA0029 was used and by peptides B1, B3, B4, B6 and B7 using PAL (Fig. 6). These results clearly showed that some peptides stimulated the production of cytokines associated with different T-helper cell

profiles. It has been observed that the AA0029 immunomodulator has induced a more powerful, but not unique, Th2-like immune response. B-peptides only showed a Th1-type immune response for peptide B1 and T-peptides showed a mixed Th1/Th2 immune response when using the natural PAL immunomodulator.

Although analyzing individual cytokines identified peptides associated with different cytokine level patterns, such associations did not represent the relationship between the peptides or cytokines included in this study. Two-dimensional cluster analysis was therefore performed to identify sets of cytokines which might have been coordinately expressed induced by immunisation with peptides having a low immune response (compared to a high one) and more strongly correlate them with an effective immune response. Bicluster analysis led to a comprehensive representation of splenocyte state throughout their response to peptides used in this study. The expressed cytokines' functional concordance gave biological significance to the broad patterns seen in images like the biclusters in *Figs. 7 & 8* for PAL and AA0029, respectively. Peptides containing B- and T-cell epitopes clustered separately: cluster 1-2 and cluster 3-5 for the PAL adjuvant (*Fig. 7*) and cluster 1-4 and cluster 5-7 for adjuvant AA0029 (*Fig. 8*). It was also observed that cytokine correlation depended on the adjuvant used in vaccine formulation. PAL-adjuvant formulation clustered IL-17, IL-4, IFN- γ and TNF- α separately from IL-1 α , IL-6, IL-5, IL-10 and IL-2 cytokines. AA0029-adjuvant formulations induced different cytokine co-expression pattern; IL-1 α , IFN- γ , IL-10 and IL-17 clustered separately from TNF- α , IL-4, IL-6, IL-5 and IL-2. This result confirmed the strong immunomodulatory effect conferred by the adjuvant being used.

Analysis of B-epitopes clustered with the PAL adjuvant (*Fig. 7*) revealed that cluster 1 was able to cluster each B-epitope-containing peptide, except peptide B6, while cluster 2 represented the most interesting cluster in *Fig. 7* because it clustered the three B6 peptide replicates which induced high IL-4, IL-6 and IL-1 α levels. Regarding B-peptides clustered with AA0029 (*Fig. 8*), a single cluster (cluster 4) also represented two of the three B6 peptide replicates, which also induced high IL-4 and IL-5 levels. Cluster 3 in *Fig. 8* included peptide B1 that induced high IL-5, IFN- γ and TNF- α levels and peptide B5 that also induced high IL-4 and IFN- γ levels, suggesting different immunological effects induced by such B-peptides regarding the groups that clustered T-epitopes using the PAL adjuvant (*Fig. 8*). Peptides T14, T15 and T16 were included in clusters 3 and 4; they were able to induce high levels of regulatory cytokine IL-10, IL-5 and

proinflammatory cytokine IL-2. Regarding T-epitope clustered groups using AA0029 (*Fig. 8*), the peptides were extremely disseminated throughout the different clusters, although T14 and T15 both seemed to group in cluster 5, inducing high IL-4 and IFN- γ levels.

B- and T-cell subpopulations

Three lymphocyte subsets were analyzed to better evaluate the cellular immune response of synthetic peptides containing B- and T-epitopes formulated with both AA0029 and PAL immunomodulators: B-lymphocytes (B220), T-cell sub-populations (CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes) and memory lymphocytes (CD27, CD197 (CCR7) and CD62L). No statistical differences in any of the immunophenotypes were detected. However, a linear regression model was used to investigate whether there were any interaction between the peptide (B or T) and the immunomodulator being used (AA0029 or PAL) (*Fig. 9*).

T-epitope-containing peptides were able to express higher T-CD4⁺ and CD27 immunophenotype levels compared to peptides having B-epitopes ($P < 0.001$) and B-epitope-containing peptides were able to express higher CD197 levels ($P < 0.001$). No differences regarding epitope type were detected in the T-CD8⁺ immunophenotype. Interestingly, the immunomodulator effect was only detected in memory T-lymphocytes; higher CD27 and CD62L levels were observed with AA0029 ($P < 0.001$). CD197 expression thus seemed to be more efficient with B-epitopes and PAL, whilst CD27 and CD62L expression seemed to be more efficient with T-epitopes and AA0029. Figure 9A shows that only a single significant interaction between peptide (B or T) and the adjuvant being used (AA0029 and PAL) was detected in CD4 T-lymphocytes ($P < 0.001$). Different lymphocyte expression patterns were observed when the peptides were individually analyzed. Figure 10 shows a parallel coordinate plot where each peptide was represented as a linear profile. In this graph, a different behavior between B and T peptides can be observed with any of the immunomodulators used in the immunisation trial. Here we confirm that the type of epitope used directly affects the immune response obtained. In some cases, the use of peptides with T epitopes increases the levels of lymphocyte populations, such as B220, CD27 and CD62L and in another cases those levels decreased, such as CD197 and CD8⁺ T-cell populations.

No remarkable differences were observed in CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte populations, and only peptides B11 and T14 were able to induce significant changes in the expression of these lymphocyte populations ($P < 0.05$). B-epitope-containing peptides were able to express high

B220 cell levels, especially B2 to B8, B11 and B12 formulated with PAL. Regarding memory T-lymphocytes, T-epitope-containing peptides, together with AA0029, were able to induce significantly high memory T-lymphocyte expression; peptides T15 to T24 with AA0029 were particularly able to induce high CD62L expression compared to the control group. Peptides T14, T18, T23 and T24 were able to induce high CD197 (CCR7) T-cell expression compared to the control group. B-epitope peptides (B1, B4 and B5) and T14 were able to induce high CD197 T-cell levels but only with the PAL adjuvant. Regarding the CD27 lymphocyte subset, only B7 and T16 were able to express higher levels with AA0029 and PAL, respectively.

Discussion

The present study was designed to identify epitopes that could be used as vaccine candidates against the infection caused by *F. hepatica* according to a broad study of the immune response so induced. The newly-emergent discipline of bioinformatics, immunoinformatics and rational vaccine design were used here, involving a reverse vaccinology strategy, which has been successfully applied to malaria and some helminths such as *E. granulosus*, *T. spiralis*, *B. malayi* and *S. mansoni* vaccine development [14,17,20-23]. A strong relationship between developing more powerful and accurate bioinformatics tools, together with modern sequencing techniques, has been forged during the last few years, leading to the rapid identification of epitopes which could be used in both *in vitro* and *in vivo* assays. This methodology has suggested whether they could be used to prevent diseases via immunisation or blocking interactions between host receptors and pathogen ligands, highlighting their great importance and enormous potential in the fight against infectious diseases and identifying novel vaccine targets through *in silico* genome analysis.

No commercial vaccines have been available for human helminthiasis control up to now; however, several efforts have been made regarding *F. hepatica* vaccine development [40]. According to reports in the pertinent literature, cysteine proteases released by *F. hepatica* play a key role in parasite feeding, migration through host tissues and immune evasion and they are considered good vaccine candidates [41]. Sigma GST-based immunisation host protection success in schistosomiasis may therefore be related to neutralizing specific functions in host-parasite interplay. Cysteine proteases have been used as vaccine candidates in immunisation trials involving experimental models such as cattle and sheep and using different adjuvants, resulting in protection up to 79% [42-47]. The

rationale behind selecting proteins that could be secreted by *F. hepatica* has been based on the fact that these proteins are exposed to a host's immune system, making them easily recognizable. Most epitopes included in this study belonged to either the cathepsin L or cathepsin B family, showing a high activation of the immune response.

Cathepsin B is predominately released during the juvenile life-cycle stage, while cathepsin L is released throughout the whole cycle, thereby becoming an important issue in designing a multi-stage, multi-epitope, subunit-based vaccine against *F. hepatica* [41]. The present study has demonstrated that immunisation with peptides containing T- and B-epitopes formulated with the AA0029 immunomodulator induced a stronger immune response compared to the PAL one, based on high IL-4 and IFN- γ cytokine expression, these being important biomarkers in Th2 and Th1 differentiation [48]. This pattern could be essential for using these immunomodulators in vaccination trials where a more powerful Th1 or Th2 immune response would be required for protection against disease. Furthermore, AA0029 was able to stimulate some pro-inflammatory and Th17 cytokines, such as IL-6 and IL-17, while PAL previously tested in other immunisation experiments was associated with a down-regulated Th2 immune response [36]. PAL, together with T-epitopes, was able to induce high IL-10 and IL-5 cytokine levels and PAL plus B-epitopes seemed to better stimulate IgG1, the antibody subtype classically belonging to the Th2 immune response profile. However, other components in the ADAD vaccination system used here could modify or highly modulate the immune response, such as the adjuvant Qs21 and the non-mineral oil Montanide. These components could increase antigen immunogenicity, could be used to enhance immune response speed and duration and could stimulate cell-mediated immunity [49]. Unfortunately, adjuvant action mechanisms are poorly understood. According to reports in the pertinent literature, Qs21 acts as an immunostimulatory adjuvant involved in Th1 cytokine (i.e. IL-2 and IFN- γ) and IgG2a isotype antibody induction [50]. It is well known that cattle are highly susceptible to primary infection but are resistant to reinfection. Cattle can generate chronically and silent *F. hepatica* infection [51]. The mechanisms associated with such tolerance are mediated by host humoral and cellular Th2 immune responses. Although an IFN- γ peak occurs during the first 4-5 weeks post-infection in experimentally infected cattle, IL-4 and IL-10 cytokines are produced during the late stages of infection [52,53].

A prolonged Th2 immune response to *F. hepatica* infection is thus not protective and can lead to the parasite residing within the liver or

passageways conducting bile. According to the literature, the mechanism behind chronic *F. hepatica* infection development involves IgG1 antibody generation and little or no IgG2a [54,55]. However, an antibody response against *F. hepatica* cathepsin L as vaccine candidate involves generating both IgG1 and IgG2a antibodies, suggesting a mixed Th1/Th2 protective immune response [43,54]. The results obtained here showed that most peptides produced both IgG1 and IgG2a antibodies (having higher IgG1 titers in all cases), showing a mixed Th1/Th2 immune response. However, peptide T14 only induced IgG1 and T16 only IgG2a. These results were interesting as peptide response was similar to that induced by natural infection. Induced IgE and IgM immunoglobulin levels resulted in very low titers for all the synthetic peptides used in this study. Helminth infection has been associated with IgE response; however, its role in protective immunity is not well understood [56]. There is some evidence for a positive correlation between IgE level and protection in human populations infected with *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* [57].

S. haematobium adult worm antigens recognized by IgE and by IgG1 are of interest as they may be associated with the development of resistance to schistosomiasis [58]; this is supported by the fact that most of these antigens are already known vaccine candidates [59]. Despite low IgE levels obtained by immunisation with synthetic peptides in the present study, peptides B1, B2, B3, T13, T14, T15, T18, T19 and T20 tended to obtain higher titers compared to the adjuvant-vaccinated group. Furthermore, peptides B3, B4 and T20 showed high IgM levels two weeks after the last immunisation. High IgM levels against *F. hepatica* ES products have been observed two weeks after immunisation in sheep, reaching maximum levels 8 weeks after infection, accompanied by a progressive decrease from this point onwards [60].

Cytokine quantitation in stimulated-splenocyte supernatant cell cultures has indicated that peptides containing B- or T-epitopes have been able to induce high levels of Th1 and Th2-associated immune response. Peptides specifically inducing high IL-17 levels were also found in the present study.

This study also highlighted the fact that our immunisation procedure was able to produce a quite strong Th1 immune response, different to the classical Th2 immune response shown by chronic helminth infection stages that could have major implications for further protection trials. These results were consistent with those from other immunisation trials, resulting in the generation of cytokines involved in a mixed Th1/Th2 immune response [54,61,62].

IL-4 producing T-cell differentiation is an important step in developing an effective protective immune response. IL-4 can directly mediate worm expulsion mechanisms and is required for Th2 cell amplification. The IL-5 cytokine also plays an important role in mediating host protection against helminth parasites [63]. The present results showed that some peptides elicited a strong Th2-like immune response, such as B5, B6 and T14-17 plus AA0029, inducing high IL-4 and IL-5 levels. It is worth noting that the protection induced by many vaccines against helminth, particularly *S. mansoni* experimental infection, has been associated with high IFN- γ and TNF- α production [64,65]. TNF- α might play a role in accelerated worm expulsion through Th2 immune response enhancement [66] and IFN- γ production suppression may mediate parasite survival in fasciolosis [53]. The present study also found that the B1 peptide stimulated both TNF- α and IFN- γ , while peptides B5, T15 and T16 induced high IFN- γ levels, classically corresponding to a Th1-like immune response. This study strongly suggested that Th1 cytokines play a central role as biomarkers and should be used for measuring vaccination effectiveness. A recent study on Indonesian thin-tailed sheep suggested that inducing an early type-1 immune response in this natural sheep host may have been responsible for their ability to resist liver fluke infection [67], thereby agreeing with the aforementioned finding.

Some peptides evidently stimulate both IFN- γ and IL-4 cytokines, such as B5 and T15, suggesting their potential as vaccine candidates. Peptides B5 and T16 were the only ones having high IL-17 levels; however, the role of IL-17 has not yet been completely understood in *F. hepatica* infection. IL-17 has been associated with a severe form of the disease in schistosomiasis experimental models [68].

B-cells are the main source of specific antibody production against multicellular pathogens. Antibody responses are thought to play an important role in controlling *F. hepatica* infection, yet little is known about the B-cell phenotype and function in designing an effective vaccine. Interestingly, it was found that B-epitope-containing peptides (B2-B9, B11 and B12) plus AA0029 led to high total B-cell compartment expression; such changes agreed with the higher titers found in total IgG when B-epitope-containing peptides were used compared to T-epitope-containing peptides.

The specific role of CD4 and CD8 T-cells in protection against *F. hepatica* infection remains to be clearly elucidated. The present study found that only T-epitope-containing peptides seemed to better stimulate CD4 T-cell expression. Regarding the synthetic peptides used, only T14 and B11 expressed high CD4 levels with PAL

and AA0029 immunomodulators, respectively. Only the B11 peptide was able to induce high CD8 expression. However, immunosuppression is one of the main mechanisms leading to liver fluke survival in a chronically-infected host, inducing a significant decrease in peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells. Previous studies have demonstrated that *F. hepatica* cathepsin L has down-regulated CD4 from the surface of human T-cells [69]. The more susceptible sheep host has shown reduced T-lymphocyte proliferation during *F. hepatica* infection [70]. Other authors have suggested lymphocyte migration, including CD4+ and CD8+ lymphocytes, from mesenteric lymph nodes to the antigen exposure site. CD8 T-cells have been particularly evident in fibrotic areas of the liver during chronic infection [71].

It is well known that helminth parasites are able to live for long periods in a host, immunoregulation being a key factor in this [72]. Some memory T-cells, including central memory T-cells and effector memory T-cells expressing CD197 (CCR7) and CD62L, respectively, are involved in such immunoregulation [73]. However, it is not yet well understood how immunoregulation works in *F. hepatica*. Nevertheless, other studies have suggested the importance of central memory T-cells in establishing long-term immunity over effector memory T-cells. Central memory T-cells are maintained when the parasite is eliminated, but effector memory T-cells are not [74].

It has been previously described how regulatory and effector T-cells are involved in malaria protection experiments [75]. Vaccine effectiveness combines the action of both humoral and cellular immune responses; this is why central memory T-cells were also considered in the present study as a key target for peptide screening in the search for vaccine candidates. High CD62L expression levels have been shown to be protective in various infectious diseases [74,76]. Importantly, higher CD62L percentages were obtained with T-epitopes in this study using any of the immunomodulators, whereas higher CD197 percentages were obtained with B-peptides plus PAL. Regarding CD27 memory B-cells, this cell subtype also plays a role in contributing to memory responses against common pathogens and in generating and long-term maintenance of T-cell immunity [77,78]. However, the role of CD27 has not been described in fasciolosis or other helminthic disease, to the best of our knowledge. Our results have shown that T-epitope-containing peptides seem to better stimulate this cell subtype.

These findings further support the idea of a broad immune response being elicited during immunisation trial and that a peptide bank had been put together where some peptides

mimicked similar behavior to that caused by *F. hepatica* infection whereas others did not. This is an important issue for future immunisation and protection trials because a specific and desired immune response can now be produced by peptides working alone or in combination to obtain or expect a greater protection rate against *F. hepatica* infection.

It is particularly worth noting that immunological criteria were established in this study for choosing *in silico*-based epitopes as potential vaccine candidates which could induce a broad immune response in a murine model before carrying out immunisation / protection trials.

This study's results suggested that further work is required to establish the degree of protection elicited by peptides B1, B2, B5, B6, T14, T15 and T16 formulated in the ADAD vaccination system using the chemically-synthesised AA0029 immunomodulator in the quest for promising candidates to be included in a tailor-made vaccine against infection caused by *F. hepatica*. The aforementioned peptides induced a broad, high and specific immune response after being administered in BALB/c mice. Likewise, regarding further vaccine experiments, information concerning the state of immunological release by different chemically synthesised peptides can be quickly inferred by combining and comparing new experiments with the data presented here.

Acknowledgements

We would like to thank Magnolia Vanegas, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), for peptide synthesis, Dr Arturo San Feliciano, Universidad de Salamanca, for kindly providing us with AA0029, Dr Antonio Martínez-Fernández, Universidad Complutense de Madrid, for supplying PAL and Montanide, and Mr Jason Garry for correcting the manuscript.

References

1. Kaplan RM (2001) Fasciola hepatica: a review of the economic impact in cattle and considerations for control. *Vet Ther* 2: 40-50.
2. Mas-Coma S (2005) Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminthol* 79: 207-216.
3. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009) Chapter 2. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol* 69: 41-146.
4. Fuentes MV, Valero MA, Bargues MD, Esteban JG, Angles R, et al. (1999) Analysis of climatic data and forecast

- indices for human fascioliasis at very high altitude. *Ann Trop Med Parasitol* 93: 835-850.
5. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2008) Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. *Rev Sci Tech* 27: 443-457.
 6. WHO (2011) Initiative to estimate the Global burden of Foodborne Diseases.
 7. McManus DP, Dalton JP (2006) Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 133 Suppl: S43-61.
 8. Hillyer GV (2005) *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J Helminthol* 79: 241-247.
 9. Fairweather I (2011) Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? *Vet Parasitol* 180: 133-143.
 10. Sette A, Rappuoli R Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity* 33: 530-541.
 11. Purcell AW, McCluskey J, Rossjohn J (2007) More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov* 6: 404-414.
 12. Dalton JP, Robinson MW, Mulcahy G, O'Neill SM, Donnelly S Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet Parasitol* 195: 272-285.
 13. De Groot AS, Berzofsky JA (2004) From genome to vaccine--new immunoinformatics tools for vaccine design. *Methods* 34: 425-428.
 14. De Groot AS (2006) Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. *Drug Discov Today* 11: 203-209.
 15. Caoili SE B-cell epitope prediction for peptide-based vaccine design: towards a paradigm of biological outcomes for global health. *Immunome Res* 7: 2.
 16. Arnon R, Ben-Yedidia T (2003) Old and new vaccine approaches. *Int Immunopharmacol* 3: 1195-1204.
 17. Patarroyo ME, Cifuentes G, Bermudez A, Patarroyo MA (2008) Strategies for developing multi-epitope, subunit-based, chemically synthesized anti-malarial vaccines. *J Cell Mol Med* 12: 1915-1935.
 18. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatisky M Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today* 15: 40-56.
 19. Hans D, Young PR, Fairlie DP (2006) Current status of short synthetic peptides as vaccines. *Med Chem* 2: 627-646.
 20. Read AJ, Casey JL, Coley AM, Foley M, Gauci CG, et al. (2009) Isolation of antibodies specific to a single conformation-dependant antigenic determinant on the EG95 hydatid vaccine. *Vaccine* 27: 1024-1031.
 21. Robinson K, Bellaby T, Chan WC, Wakelin D (1995) High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite *Trichinella spiralis*. *Immunology* 86: 495-498.
 22. Madhumathi J, Prince PR, Anugraha G, Kiran P, Rao DN, et al. (2010) Identification and characterization of nematode specific protective epitopes of *Brugia malayi* TRX towards development of synthetic vaccine construct for lymphatic filariasis. *Vaccine* 28: 5038-5048.
 23. de Aluja AS, Villalobos NM, Nava G, Toledo A, Martinez JJ, et al. (2005) Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine* 23: 4062-4069.
 24. Arnon R, Tarrab-Hazdai R, Steward M (2000) A mimotope peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*: synthesis and characterization. *Immunology* 101: 555-562.
 25. Jezek J, El Ridi R, Salah M, Wagih A, Aziz HW, et al. (2008) *Fasciola gigantica* cathepsin L proteinase-based synthetic peptide for immunodiagnosis and prevention of sheep fasciolosis. *Biopolymers* 90: 349-357.
 26. Martinez-Fernandez AR, Nogal-Ruiz JJ, Lopez-Aban J, Ramajo V, Oleaga A, et al. (2004) Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Vet Parasitol* 126: 287-298.
 27. del Olmo E, Plaza A, Muro A, Martinez-Fernandez AR, Nogal-Ruiz JJ, et al. (2006) Synthesis and evaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 6091-6095.
 28. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783-795.
 29. Larsen JE, Lund O, Nielsen M (2006) Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2: 2.

30. Parker JM, Guo D, Hodges RS (1986) New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25: 5425-5432.
31. Deleage G, Combet C, Blanchet C, Geourjon C (2001) ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Comput Biol Med* 31: 259-267.
32. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213-219.
33. Merrifield RB (1969) Solid-phase peptide synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 32: 221-296.
34. Houghten RA (1985) General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 5131-5135.
35. Sieuwerts AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA (1995) The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33: 813-823.
36. Lopez-Aban J, Andrade Mdo A, Nogal-Ruiz JJ, Martinez-Fernandez AR, Muro A (2007) Immunomodulation of the response to excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica* by Anapsos in Balb/C mice and rat alveolar macrophages. *J Parasitol* 93: 428-432.
37. Lemon J (2006) Plotrix: a package in the red light district of R. *R-News* 6: 5.
38. Warnes GR (2012) gplots: Various R programming tools for plotting data.
39. Deepayan S (2008) Lattice: Multivariate data visualization with R: Springer.
40. LaCourse EJ, Perally S, Morphey RM, Moxon JV, Prescott M, et al. (2012) The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1666.
41. Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, et al. (2003) *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol* 33: 1173-1181.
42. Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP, Andrews SJ (1996) Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun* 64: 5066-5074.
43. Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, et al. (1998) Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16: 932-939.
44. Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C (1999) Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun* 67: 1954-1961.
45. Villa-Mancera A, Mendez-Mendoza M Protection and antibody isotype responses against *Fasciola hepatica* with specific antibody to pIII-displayed peptide mimotopes of cathepsin L1 in sheep. *Vet J* 194: 108-112.
46. Wedrychowicz H, Kesik M, Kaliniak M, Kozak-Cieszczyk M, Jedlina-Panasiuk L, et al. (2007) Vaccine potential of inclusion bodies containing cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke. *Vet Parasitol* 147: 77-88.
47. Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, et al. (2009) Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet Parasitol* 160: 230-236.
48. Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, et al. (2003) Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 23: 147-161.
49. Singh M, O'Hagan D (1999) Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol* 17: 1075-1081.
50. Kensil CR (1996) Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 13: 1-55.
51. Haroun ET, Hillyer GV (1986) Resistance to fascioliasis--a review. *Vet Parasitol* 20: 63-93.
52. Clery DG, Mulcahy G (1998) Lymphocyte and cytokine responses of young cattle during primary infection with *Fasciola hepatica*. *Res Vet Sci* 65: 169-171.

53. Flynn RJ, Mulcahy G (2008) The roles of IL-10 and TGF-beta in controlling IL-4 and IFN-gamma production during experimental *Fasciola hepatica* infection. *Int J Parasitol* 38: 1673-1680.
54. Mulcahy G, O'Connor F, Clery D, Hogan SF, Dowd AJ, et al. (1999) Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Res Vet Sci* 67: 27-33.
55. Hoyle DV, Taylor DW (2003) The immune response of regional lymph nodes during the early stages of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Parasite Immunol* 25: 221-229.
56. Negrao-Correa D (2001) Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43: 291-299.
57. Hagan P (1993) IgE and protective immunity to helminth infections. *Parasite Immunol* 15: 1-4.
58. Mutapi F, Bourke C, Harcus Y, Midzi N, Mduluzi T, et al. (2011) Differential recognition patterns of *Schistosoma haematobium* adult worm antigens by the human antibodies IgA, IgE, IgG1 and IgG4. *Parasite Immunol* 33: 181-192.
59. Al-Sherbiny M, Osman A, Barakat R, El Morshedy H, Bergquist R, et al. (2003) In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Acta Trop* 88: 117-130.
60. Phiri IK, Phiri AM, Harrison LJ (2006) Serum antibody isotype responses of *Fasciola*-infected sheep and cattle to excretory and secretory products of *Fasciola* species. *Vet Parasitol* 141: 234-242.
61. Espino AM, Rivera F Quantitation of cytokine mRNA by real-time RT-PCR during a vaccination trial in a rabbit model of fascioliasis. *Vet Parasitol* 169: 82-92.
62. Espino AM, Osuna A, Gil R, Hillyer GV (2005) *Fasciola hepatica*: humoral and cytokine responses to a member of the saposin-like protein family following delivery as a DNA vaccine in mice. *Exp Parasitol* 110: 374-383.
63. Gause WC, Urban JF, Jr., Stadercker MJ (2003) The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends Immunol* 24: 269-277.
64. Cardoso FC, Macedo GC, Gava E, Kitten GT, Mati VL, et al. (2008) *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e308.
65. Farias LP, Cardoso FC, Miyasato PA, Montoya BO, Tararam CA, et al. (2010) *Schistosoma mansoni* Stomatin like protein-2 is located in the tegument and induces partial protection against challenge infection. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e597.
66. Artis D, Humphreys NE, Bancroft AJ, Rothwell NJ, Potten CS, et al. (1999) Tumor necrosis factor alpha is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection. *J Exp Med* 190: 953-962.
67. Pleasance J, Wiedosari E, Raadsma HW, Meeusen E, Piedrafita D (2011) Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. *Parasite Immunol* 33: 495-505.
68. Rutitzky LI, Smith PM, Stadercker MJ (2009) T-bet protects against exacerbation of schistosome egg-induced immunopathology by regulating Th17-mediated inflammation. *Eur J Immunol* 39: 2470-2481.
69. Prowse RK, Chaplin P, Robinson HC, Spithill TW (2002) *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. *Parasite Immunol* 24: 57-66.
70. Zimmerman GL, Kerkvliet NI, Brauner JA, Cerro JE (1983) Modulation of host immune responses by *Fasciola hepatica*: responses by peripheral lymphocytes to mitogens during liver fluke infections of sheep. *J Parasitol* 69: 473-477.
71. McCole DF, Doherty ML, Baird AW, Davies WC, McGill K, et al. (1999) T cell subset involvement in immune responses to *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Parasite Immunol* 21: 1-8.
72. Taylor MD, van der Werf N, Maizels RM (2012) T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. *Trends Immunol* 33: 181-189.
73. Totte P, Duperray C, Dedieu L (2010) CD62L defines a subset of pathogen-specific bovine CD4 with central memory cell characteristics. *Dev Comp Immunol* 34: 177-182.

74. Zaph C, Uzonna J, Beverley SM, Scott P (2004) Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med* 10: 1104-1110.
75. Reyes-Sandoval A, Wyllie DH, Bauza K, Milicic A, Forbes EK, et al. (2011) CD8⁺ T effector memory cells protect against liver-stage malaria. *J Immunol* 187: 1347-1357.
76. Bustamante JM, Bixby LM, Tarleton RL (2008) Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8⁺ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med* 14: 542-550.
77. Hendriks J, Gravestein LA, Tesselaar K, van Lier RA, Schumacher TN, et al. (2000) CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* 1: 433-440.
78. Moir S, De Ravin SS, Santich BH, Kim JY, Posada JG, et al. (2012) Humans with chronic granulomatous disease maintain humoral immunologic memory despite low frequencies of circulating memory B cells. *Blood* 120: 4850-4858.

Figure legends

Figure 1. Boxplot showing IgG anti-peptide antibody levels in mice immunised with the synthetic peptides formulated in the ADAD vaccination system. The bottom and the top of the box indicate the 25th and 75th percentiles, respectively. A). Mice immunised using PAL. B). Mice immunised using AA0029.

Figure 2. Linear regression comparing the effect of PAL and AA0029 immunomodulators on IgG subtype levels. A). IgG1 related to IgG. B). IgG2a related to IgG. Red indicates PAL immunomodulator and blue AA0029. Circles and squares represent B- and T-peptides, respectively.

Figure 3. Interaction plot for regulatory (A. IL-10), Th2 (B. IL-5, C. IL-4), Th17 (D. IL-17), Th1 (E. IL-2, F. IFN- γ) and innate inflammatory cytokines levels (G. IL-6, H. TNF α , I. IL-1 α) elicited by two factors: epitope effect (B & T) and immunomodulator effect (AA0029 & PAL).

Figure 4. Scatterplot comparing the effect of PAL and AA0029 immunomodulator on cytokine levels. A). IL-4 related to IL-10. B). IL-5 related to IL-10. Red indicates PAL and blue AA0029. Circles and squares represent B- and T-peptides, respectively.

Figure 5. IFN- γ cytokine levels in splenocyte mouse cell culture immunised with synthetic

peptides. A). Mice immunised with PAL. B). Mice immunised with AA0029.

Figure 6. IL-17 cytokine levels in splenocyte mouse cell culture immunised with synthetic peptides. A). Mice immunised with PAL. B). Mice immunised with AA0029.

Figure 7. Individual cytokine expression levels are represented by shades of green to red in the central heatmap (highest values shown in green and lowest in dark red). The right-hand margin provides the name of peptide sets. Rows and columns represent clusters of interleukins and peptides having a similar immunological response. A list of cytokines grouped within each cluster is also provided. Groupings having shorter distances (as indicated by the distance to k-means nearest group) had greater similarity. Bicluster analysis for B- and T-peptides formulated with the PAL immunomodulator. Five major clusters (1, 2, 3, 4 and 5) encompassing peptides having similar cytokine levels can be discerned.

Figure 8. Individual cytokine expression levels are represented by shades of green to red in the central heatmap (highest values shown in green and lowest in dark red). The right-hand margin provides the name of peptide sets. Rows and columns represent clusters of interleukins and peptides having a similar immunological response. A list of cytokines grouped within each cluster is also provided. Groupings having shorter distances (as indicated by the distance to k-means nearest group) had greater similarity. Bicluster analysis for B- and T-peptides with the AA0029 immunomodulator. Seven major clusters (1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7) encompassing peptides having similar cytokine levels can be discerned.

Figure 9. Interaction plot for T-cell population levels. A). L-CD4⁺. B). L-CD8⁺. C). B220. D). CD27. E). CD197. F). CD62L, elicited by two factors: epitope effect (B & T) and immunomodulator effect (AA0029 & PAL).

Figure 10. Parallel coordinate plot of T-cell (CD4 and CD8 T-lymphocytes), B-lymphocyte (B220) and memory T-lymphocyte populations (CD27, CD197 and CD62L). According to legend, lines represent each peptide included in the experiment for PAL and AA0029 adjuvants. The bottommost position on each axis represents the respective lymphocyte subset's minimum value and the uppermost their maximum value.

Figure S1. *In vitro* cell viability for synthetic peptides containing B and T epitopes at different concentrations using the J774.2 cell line.

Figure S2. Antibody level detection throughout immunisation schedule. A). IgG, B). IgG1, C). IgG2a, D). IgM, E). IgE.

Figure S3. IgE antibody level detection in mice immunised with the synthetic peptides throughout the immunisation schedule. Data presented as box plots with the bottom and the

top of the box indicating the 25th and 75th percentiles, respectively.

A). Peptides formulated with the PAL immunomodulator. B). Peptides formulated with the AA0029 immunomodulator.

Figure S4. IgM antibody level detection in mice immunised with synthetic peptides throughout the immunisation schedule. Data presented as box plots with the bottom and the top of the box indicating the 25th and 75th percentiles, respectively. A). Peptides formulated with the PAL immunomodulator. B). Peptides formulated with the AA0029 immunomodulator.

Figure S5. Scatterplots in three dimensions of cytokine levels for B-peptides. Z-axis represents the levels of IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17 for figure A, B, C and D, respectively. Meanwhile, the x and y-axis represents CD197 and CD27 memory T lymphocytes for each figure. Color blue indicates the use of AA0029 and green color indicates the use of PAL.

Figure S6. Scatterplots in three dimensions of cytokine levels for T-peptides. Z-axis represents the levels of IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17 for figure A, B, C and D, respectively. Meanwhile, the x and y-axis represents CD197 and CD27 memory T lymphocytes for each figure. Color blue indicates the use of AA0029 and green color indicates the use of PAL.

Figure S7. IL-4 cytokine levels in splenocyte mouse cell culture immunised with synthetic peptides. A). Mice immunised with PAL. B). Mice immunised with AA0029.

Figure S8. IL-5 cytokine levels in splenocyte mouse cell culture immunised with synthetic peptides. A). Mice immunised with PAL. B). Mice immunised with AA0029.

Figure S9. IL-10 cytokine levels in splenocyte mouse cell culture immunised with synthetic peptides. A). Mice immunised with PAL. B). Mice immunised with AA0029.

Table 1. Selected *F. hepatica* proteins containing a signal peptide (SP) but no transmembrane (TM) domain. Several items regarding each protein's *in silico* prediction phase are indicated.

Table 2. Amino acid sequences for the linear B- and T-cell epitopes selected. Each peptide's code number, expected molecular weight, protein family and epitope are also indicated.

Figure 1.

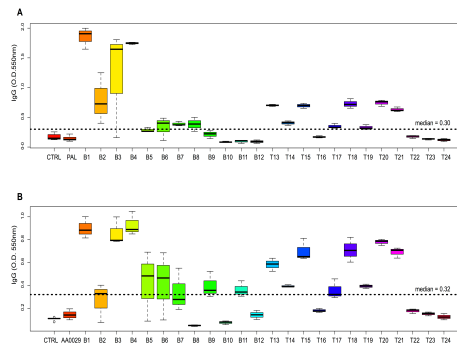


Figure 2.

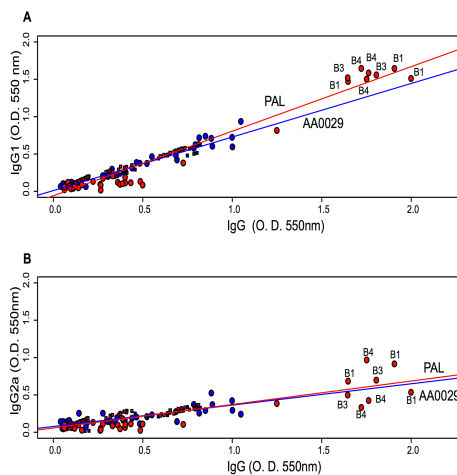


Figure 3.

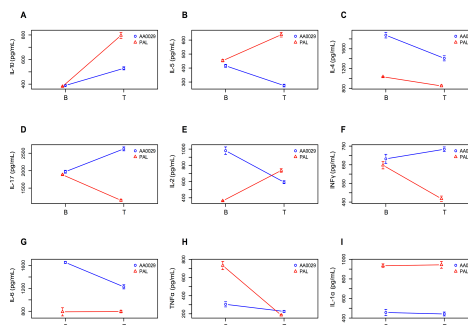


Figure 4.

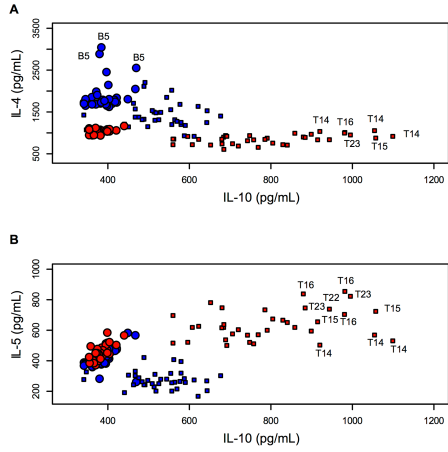


Figure 5.

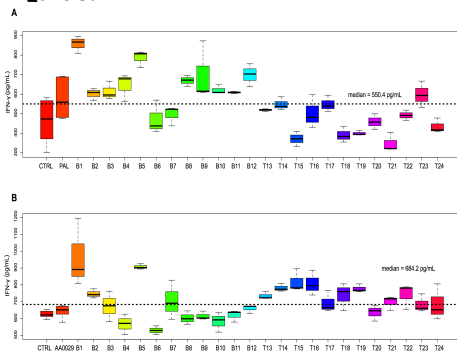


Figure 6.

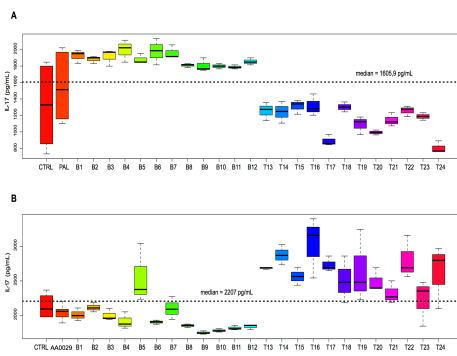


Figure 7.

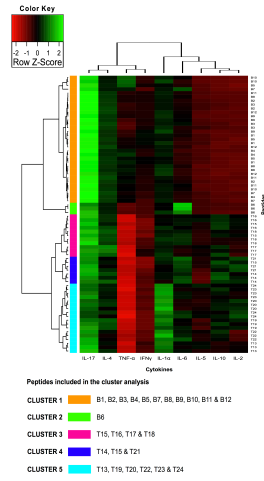


Figure 8.

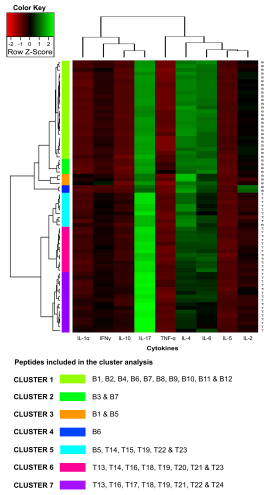


Figure 9.

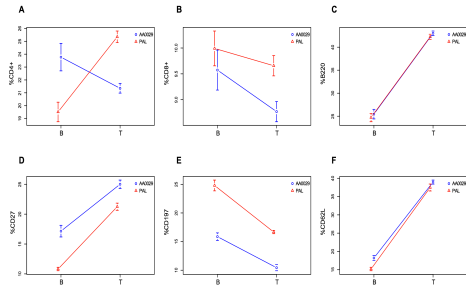


Figure 10.

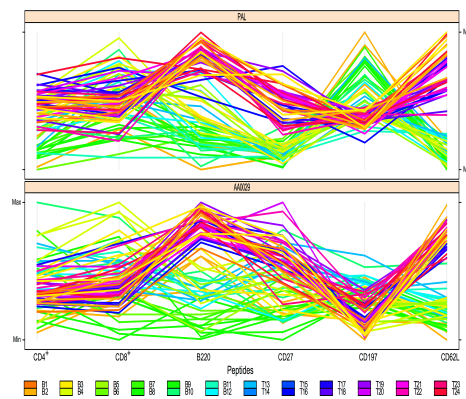


Figure S1.

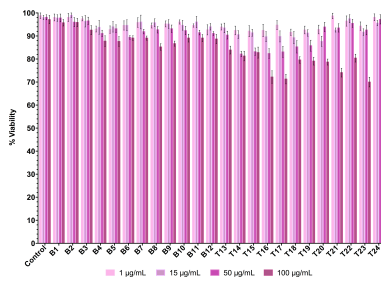


Figure S2.

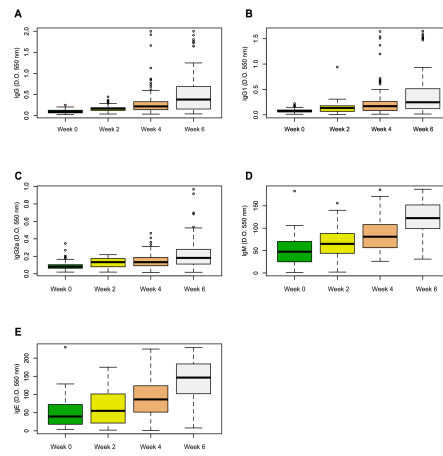


Figure S3.

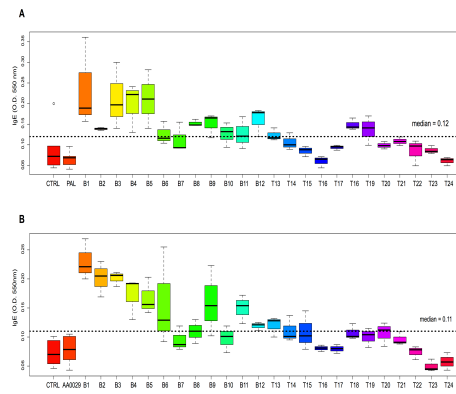


Figure S4.

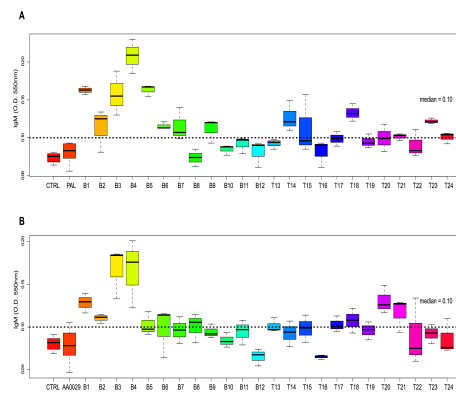


Figure S5.

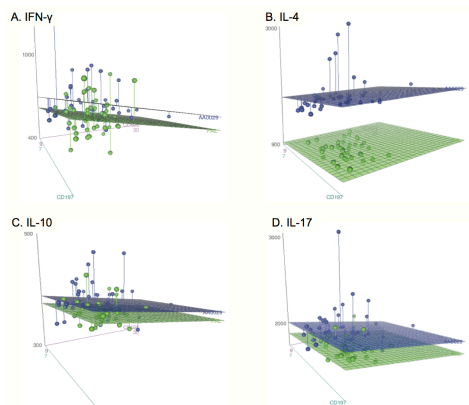


Figure S6.

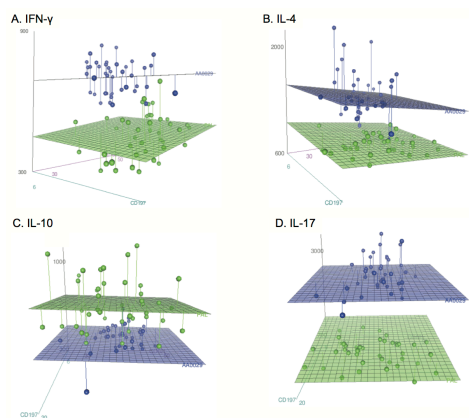


Figure S7.

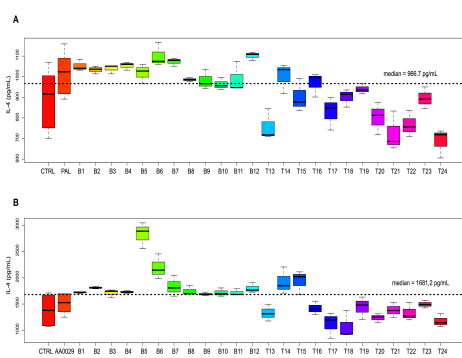


Figure S8.

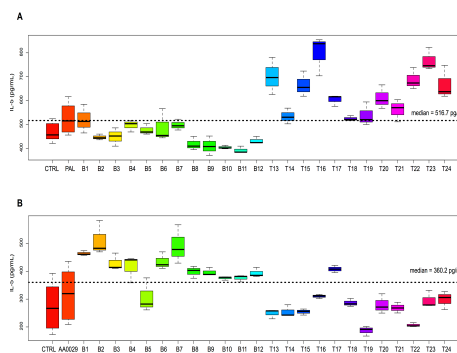
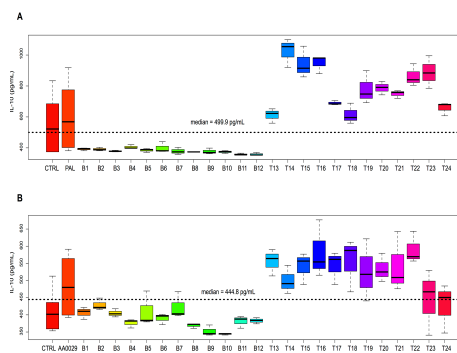


Figure S9.



Anexo 10. Artículo de investigación 2 (Enviado a PLOS ONE)

PLOS ONE

A high level of protection was induced against *Fasciola hepatica* in mice immunised with a multi-epitope, subunit-based vaccine
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	A high level of protection was induced against <i>Fasciola hepatica</i> in mice immunised with a multi-epitope, subunit-based vaccine
Short Title:	A multi-epitope vaccine protects against <i>Fasciola hepatica</i>
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Parasitology
Keywords:	Epitopes, Vaccines, <i>Fasciola hepatica</i> , Immune response
Corresponding Author:	Antonio Muro University of Salamanca Salamanca, SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Salamanca
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Jose Vicente Rojas-Caraballo, PhD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Jose Vicente Rojas-Caraballo, PhD Julio López-Abán Luis Pérez del Villar Belén Vicente Esther del Olmo Pedro Fernández-Soto Manuel Alfonso Patarroyo Antonio Muro

A high level of protection was induced against *Fasciola hepatica* in mice immunised with a multi-epitope, subunit-based vaccine

José Rojas-Caraballo^{1,2}, Julio López-Abán¹, Luis Pérez del Villar¹, Belén Vicente¹, Esther del Olmo³, Pedro Fernández-Soto¹, Manuel A. Patarroyo^{2,4}, Antonio Muro¹.

¹ Parasite and Molecular Immunology Laboratory, Tropical Disease Research Centre, Universidad de Salamanca (IBSAL-CIETUS), Salamanca, Spain

² Molecular Biology and Immunology Department, Fundación Instituto de Immunología de Colombia (FIDIC), Bogotá, Colombia

³ Pharmaceutical Chemistry Department, Tropical Disease Research Centre, Universidad de Salamanca (IBSAL-CIETUS), Salamanca, Spain

⁴ Basic Sciences Department, School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

Corresponding author: Antonio Muro Álvarez

Mailing address: c/Licenciado Méndez Nieto s/n.

Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca.

Salamanca, España.

Phone: +(34) 923294535

Fax: +(34) 923294515

e-mail: ama@usal.es

Running title: A multi-epitope vaccine provides good protection against *Fasciola hepatica* infection

Abstract

Fasciolosis is considered the most widespread trematode disease affecting grazing animals around the world; it is currently recognised by the World Health Organisation as an emergent human pathogen. Triclabendazole is still the most effective drug against this disease; however, resistant strains have appeared and developing a vaccine against this disease has increasingly become a priority. Seven peptides derived from *Fasciola hepatica* proteins containing B- and T-cell epitopes (previously selected based on their specifically induced immune response) were here tested in a murine model, for their protection-inducing ability against experimental infection with *F. hepatica* metacercariae. *F. hepatica* amoebapore and cathepsin protein-derived peptides B1, B2, B5, B6, T14, T15 and T16 were selected, based on the strong and specific immune response they induced. They were then individually immunised in CD1 mice, as well as some peptide combinations. Mice were immunised on day 0 and booster doses were given on days 14 and 28. The mice were orally infected with 7 *F. hepatica* metacercariae two weeks after the last immunisation and then necropsied for organ collection, fluke recovery and evaluating hepatic damage. A high level of protection was obtained in the group of mice vaccinated with a combination of peptides containing T-epitopes (T14, T15 and T16). The mice in this group achieved a 71.4% survival rate and also had the lowest hepatic lesion score and liver fluke burden. High IL-4, IL-10 and IL-17 levels were detected in protected mice, suggesting a key role in controlling infection. Vaccination against *F. hepatica* by using a multi-epitope, subunit-based and chemically-synthesised vaccine produced better protection results than vaccination with a single antigen in a murine model. This vaccination strategy thus represents an excellent choice for preventing the disease. However, vaccine efficacy must be evaluated in other host species, including those having veterinary importance.

Introduction

The infection caused by *Fasciola hepatica* (a liver fluke trematode parasite) remains one of the most important food-borne zoonotic diseases and affects a wide range of mammals, mainly ruminants. Fasciolosis causes severe economic loss worldwide, estimated at over 3 billion dollars per year [1]. *F. hepatica* also causes the disease in human beings and most cases are reported in the South of America (mainly in Andean countries), the Middle East (particularly

Egypt and Iran), the Asian continent and sub-Saharan Africa [2-4]. Several reports have estimated that up to 17 million people are infected and 91 to 170 million people live in areas having a high risk of acquiring the disease [5,6]. The rapid re-emergence of *F. hepatica* has also been caused by worldwide climate change [7,8].

Fortunately, there is an effective treatment for fasciolosis in both animals and humans; triclabendazole (TBZ) is currently considered the only highly active drug for treating of fasciolosis in humans [9]. TBZ is active against both adult parasites located in the bile ducts and immature parasites and immature flukes migrating through the liver. However, this treatment may not be as effective in controlling the disease as desired because cattle and sheep become easily re-infected and resistance against TBZ has been increasing in animals, whilst no human resistance has been yet reported [10-12]. However, an apparent case of human TBZ-resistance against *F. hepatica* was recently reported in a 71-year old farmer in the Netherlands [13]. One of the most appealing strategies for eradicating this disease and reducing the risk of infection in human beings is the development of an effective vaccine.

Although significant progress has been made regarding attempts to develop effective vaccines against infections caused by parasites, no commercial vaccines are yet available and only a few vaccines have been successfully tested against helminthic infection in animals [14]. Several antigens have been identified and tested as vaccine candidates against infection caused by *F. hepatica*. Most studies have focused on using cathepsins, leucine-aminopeptidase, haemoglobin, fatty-acid binding proteins and glutathione S-transferase as vaccine candidates. Such antigens have mainly been produced as recombinant proteins and administered in different adjuvant-type formulations. Vaccine efficacy has ranged from 13% to 97% in cattle, measured as liver-fluke burden reduction [15,16].

Subunit-based, chemically-synthesised vaccine candidates represent a promising vaccine development strategy. Using synthetic peptides offers a wide range of advantages due to their inexpensive production, they can induce an immune response to protein antigen structural elements, they do not contain highly reactive components, they avoid using living organisms, secondary effects are reduced, sequences which can interfere with vaccination success become eliminated and peptides from different antigens can be conjugated to the same carrier [17,18].

A previous study by our group involved an *in-silico*-based methodology for predicting peptides containing either *F. hepatica* protein-

derived B- or T-cell epitopes which could be used as vaccine candidates, according to the specific immune response elicited after its administration in mice using both *in vitro* and *in vivo* assays. Seven peptides were then selected for protection studies, four peptides containing B-epitopes and three containing T-epitopes, derived from *F. hepatica* amoebapore and cathepsin proteins. They were chosen because they induced the highest levels of the most representative Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4), Treg (IL-10) and Th17 (IL-17) cytokines, some of which are induced upon *F. hepatica* infection and may be also involved in acquiring protection against it.

Our group has previously shown the success of the ADAD vaccination system against schistosomiasis and fasciolosis [19-22]. The present study evaluated the aforementioned peptides' protective efficacy, when formulated in the ADAD vaccination system with the AA0029 immunomodulator, against experimental challenge with *F. hepatica* metacercariae in a mouse model. Changes in cytokine levels were also evaluated and an attempt was made to establish a relationship between protection vaccine formulation-induced immune response.

Materials and methods

Ethical statement

Animal procedures in this study complied with Spanish (Real Decreto RD53/2013) and European Union (European Directive 2010/63/CE) guidelines regarding animal experimentation for the protection and humane use of laboratory animals. The University of Salamanca's accredited Animal Experimentation Facilities (Registration number: PAE/SA/001) were used for such procedures, which were approved by the University of Salamanca's Ethics Committee (protocol approval number 48531). The University of Salamanca's Ethics Committee also approved the procedures used in this study (Permit Number: 8402). All efforts were made to minimize suffering.

Animals and parasites

Six-week-old female CD1 mice weighing 20 to 22 g (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) were used for the experiments; they were kept in the University of Salamanca's Animal Experimentation Facilities in plastic boxes with food and water *ad libitum*. The mice were kept in regular 12 h light-dark periods at 20°C.

F. hepatica metacercariae were provided by Ridgeway Research Ltd (Gloucestershire, U. K.) and were stored at 4°C on 0.4% carboxymethylcellulose until use. Metacercariae viability was confirmed by microscope observation before infection.

Antigens, vaccine formulation and immunisation trials

A previous study by Rojas-Caraballo *et al* 2013 (accompanying paper) involved *in silico*-based methodology for predicting peptides containing *F. hepatica* protein-derived B- or T-epitopes and evaluating the immune response elicited by these peptides after being administered in mice using the ADAD vaccination system using *in vitro* and *in vivo* assays. Immunising mice with single peptides led to the following pattern: peptide T15 induced a high Th1 response, peptides B6 and T14 induced a Th2 response, peptide B2 induced a Treg response, peptides B1 and T16 induced a mixed Th1/Th2 response and peptide B5 induced a mixed Th1/Th2/Treg/Th17 response.

The aforementioned peptides were selected as vaccine candidates due to their high and specific immune response and, because immunoprotection-associated molecular mechanisms are not well understood in *F. hepatica*. A combination of B6 and T14 peptides was also included to enhance Th2 response and combination of peptides containing B-epitopes (B1, B5 and B6) and T-epitopes (T14, T15 and T16) to induce different immune responses in the same antigen administration. A further combination containing all the peptides was also assayed.

Ninety-eight female CD1 mice were used in this study for the immunisation trial; they were divided into 14 groups of 7 animals each, according to our group's prior results, as follows: group 1 consisted of untreated and uninfected controls, group 2 untreated and infected controls, group 3 adjuvant-administered and infected controls, group 4 those immunised with peptide B1, group 5 mice immunised with peptide B2, group 6 immunised with peptide B5, group 7 immunised with peptide B6, group 8 immunised with peptide T14, group 9 immunised with peptide T15, group 10 immunised with peptide T16, group 11 immunised with peptides B6 + T14, group 12 immunised with peptides B1 + B5 + B6, group 13 immunised with peptides T14 + T15 + T16 and group 14 consisted of mice immunised with peptides B1 + B2 + B5 + B6 + T14 + T15 + T16.

The mice were subcutaneously immunised using the adjuvant adaptation (ADAD) system [23]. Briefly, the ADAD vaccination system combined the vaccine antigen (i.e. a single peptide or the above-mentioned combinations), a chemically-synthesised AA0029 immunomodulator [24], together with non-haemolytic adjuvant *Quillaja saponaria* (QS) saponins to form an emulsion with a non-mineral oil in a 70/30 oil/water ratio. Vaccination with this system involved a set of 2

subcutaneous injections, the first (adaptation) contained QS and the immunomodulator emulsified in non-mineral oil, but without the vaccine antigen, whilst the second injection was administered 5 days after adaptation and contained the vaccine antigen with QS and the immunomodulator in the emulsion oil. The individual doses were formulated as follows: 100 µg chemically synthesised aliphatic diamine immunomodulator AA0029, 20 µg QS and 10 µg of each individual peptide or a combination of them. A final 100 µL/injection volume was emulsified with non-mineral oil (Montanide ISA763A, SEPPIC, Paris, France) in a 70/30 oil/water ratio. Mice were immunised on day 0 and booster doses were administered on days 14 and 28. Blood samples were also taken prior to each vaccination dose and also at the time of infection.

Experimental infection and protection assessment

All the animals included in this study (except untreated controls) were orally infected with *F. hepatica* metacercariae two weeks after the last immunisation. Human endpoints were used when an evidence of severe pain, excessive distress, suffering or an impending death was observable in any of the animals and then euthanised with an intraperitoneal injection of pentobarbital at 60mg/kg using 30g needles. On day 42 post infection mice were then humanely euthanised and necropsied to recover flukes from liver, score hepatic damage and study the survival rates. Mice welfare was evaluated daily according to behaviour and appearance, physiological indicators and other general clinical signs. As possible, we avoid the animals dying as a direct result of the procedures used here. Two experienced pathologists independently evaluated liver lesions without knowing which group the livers belonged to. Changes regarding size, colour, consistency concerning blood vessels, bile ducts and surface wounds were evaluated; a score was assigned to each feature: 0 points if no lesions was observed, 1 point if a liver lobe was affected, 2 if an entire lobe was affected and 3 if more than 1 lobe was affected. No lesions was assigned when the sum was 0 points, mild (+) for 1-5 points, moderate (++) for 6-10 points and severe (+++) for 11-14 points. *F. hepatica* infection survival rate percentage in the mice was then calculated as the ratio of the number of surviving experimental mice after day 34 and the total of experimental mice in each group. Hepatic lesions scores and fluke recovery counts were also included as protection rates.

Antibody determination

IgG antigen-specific antibodies in sera from the mice included in this study were detected using an ELISA-based methodology. Briefly, 96-well polystyrene microplates (Costar, Corning Costar Corp, Cambridge, Mass.) were coated with 1 µg of each peptide or a mix of them when necessary in 100 µL of carbonate buffer at pH 9.6 per well and incubated overnight at 4°C. The plates were then washed thrice for 5 min with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST), blocked with 5% skimmed milk in PBST (200 µL per well) for 1 h at 37°C and then washed again thrice, as described above. Serum samples were diluted at 1:100 in dilution buffer (5% skimmed milk in PBST) and added to the wells (100 µL per well) in duplicate. The plates were washed after 1h incubation at 37°C, as describe above, and 100 µL per well of goat peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich), diluted 1:1000 in dilution buffer, was incubated for 1 h at 37°C. After washing as above, the bound antibodies were detected using H₂O₂ (0.012%) and ortho-phenylenediamine (0.04%) in 0.1 M citrate/phosphate buffer (100 µL per well).

The enzyme reaction was stopped after 15-20 min by adding 3N H₂SO₄ (100 µL per well) and optical density was read at 492 nm (OD₄₉₂) on an Ear400FT ELISA reader (STL Lab Instruments, Groding, Austria). The mean absorbance values for each mouse serum from each group was determined and included in each data point. Antibody levels against *F. hepatica* excretory/secretory (ES) antigens were also assessed to monitor the infection of the animals used in this study; *F. hepatica* excretory/secretory antigens were obtained according to the methodology described by Casanueva *et al.*, [25] with some modifications. Data was reported as mean OD from each group ± the standard deviation (SD).

Cytokine determination in mouse sera samples

A flow cytometry-based technique was used for IL-4, IFN-γ, IL-10 and IL-17 cytokine quantitation in immunised and infected mice sera. A FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10plex kit (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) was used, according to the manufacturer's instructions. Briefly, different sized fluorescent beads, coated with capture antibodies specific for the aforementioned cytokines, were incubated with mouse sera samples to form sandwich complexes with phycoerythrin (PE)-conjugated secondary antibodies. Flow cytometry data was collected using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) at the University of Salamanca's Flow Cytometry Central Service; 8,000 events were

collected (gated by forward and side scatter) and data was analysed using FlowCytomix Pro 3.0 software (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Each cytokine concentration was determined from standard curves using known mouse recombinant cytokines concentrations.

Statistical analysis

The results were expressed as the mean and standard error of the mean (SEM). Normal data distribution was checked using a non-parametric Kolmogorov-Smirnov test. Differences between groups were found using a one-way ANOVA test and Tukey's honest significance test (HSD) or Kruskal Wallis test.

Statistical analysis was considered significant at p<0.05 level. Kaplan-Meier survival curves were used for evaluating survival rates. Spearman's rank correlation coefficient was used for determining relationships between cytokine levels and protection. SPSS 21.0 and R software (R Development Core Team, 2012) were used for analysis and graphics.

Results

Protection assessment

The survival rate for mice immunised with the synthetic peptides

Immunising mice with the synthetic peptides enhanced their survival rate, compared to the unimmunised and infected control group. A 58% overall protection rate was obtained in this study, measured as survival rate. All the mice in the unimmunised and infected control group died between 24 and 34 days pi; mice which died before day 42 pi in our study were considered unprotected. Figures 1 and 2 show that all the groups of mice immunised with the synthetic peptides had some degree of protection against experimental infection with *F. hepatica* metacercariae.

The highest survival rate (66.7% in each group) was obtained with the peptides B2, B5, B6 and T15 (groups 5, 6, 7 and 9, respectively) when mice were immunised with single peptides, according to Kaplan-Meier estimates (Figures 1A and 1B). Mice immunised with single peptides B1 and T14 (groups 4 and 8, respectively) had 57.1% survival rate (Figures 1A and 1B) and mice immunised with the single peptide T16 (group 10) had a survival rate of 42.9% (Figure 1B). This result clearly supports our idea of considering the aforementioned single peptides as potential vaccine candidates against *F. hepatica* infection. Interestingly, the group of mice inoculated with just ADAD system components reached a survival rate of 33.3% (Figure 1A).

The survival rate in mice immunised with any combination of peptides showed that protection only became increased when the combination was made with peptides containing T-epitopes. The group of mice immunised with a combination of peptides B6 and T14 (group 11) had 57.1% survival rate (Figure 2); an antagonist effect was observed here and the survival rate reached with single peptide B6 (66.7%) decreased to 57.1% when it was combined with peptide T14.

A similar pattern was observed in the group of mice immunised with a combination of peptides containing B-epitopes (group 12) (57.1% survival rate) (Figure 2); a reduction in the survival rate was observed concerning individual peptides B5 and B6.

However, a synergic effect was observed when a combination of peptides having T-epitopes was used (71.4% survival rate) (Figure 2), this being higher than protection obtained with any single peptide. According to Kaplan-Meier estimates, survival rates for the mice immunised with single peptide B2 and those immunised with a combination of peptides containing T-epitopes (groups 5 and 13, respectively) were statistically significant ($p < 0.05$) compared to the unimmunised and infected control groups.

Immunising mice with the synthetic peptides reduced liver fluke burdens and hepatic damage

Forty-two days after the experimental infection, all surviving mice were humanely euthanised and necropsied for fluke recovery and evaluating hepatic lesions. Reduced fluke burden and hepatic damage rate are considered important when evaluating vaccine efficacy after challenge with *F. hepatica* metacercariae.

This work demonstrated that the number of flukes recovered in surviving mice was lower than that from non-survival mice ($[0.7 \pm 0.1]$ cf $[1.7 \pm 0.1]$) ($p < 0.05$). Figure 3A shows that the number of mice containing two flukes was higher in non-surviving mice (33%) than surviving mice (13%); the number of surviving mice having no flukes (41%) was also much higher than non-surviving mice (18%), thereby indicating a clear correlation between protection and fluke burden.

Regarding hepatic damage score, surviving mice had lower hepatic damage scores than non-surviving mice ($[6.3 \pm 0.5]$ cf $[12.2 \pm 0.4]$) ($p < 0.05$). Mice having minor lesions were also classified (0 to 5 score), as were moderate lesions (6 to 10 score) and severe lesions (11 to 14 score). Figure 3B shows that non-surviving mice only had moderate (30%) or severe lesions (70%) whilst surviving mice mainly had minor lesions (48%) or moderate lesions (38%)

thereby indicating a correlation between protection and hepatic damage score.

Immunising mice with the single peptide B5 (group 6) produced the lowest fluke burden compared to the unimmunised and infected control group ($[0.7 \pm 0.3]$ cf $[2.0 \pm 0.3]$) ($p < 0.05$). The group of mice immunised with a combination of peptides having T-epitopes had the lowest hepatic damage score (group 13); a 45% reduction was observed in this group, again showing these peptides' effectiveness as vaccine candidates against *F. hepatica* infection. The group of mice immunised with ADAD vaccination system components only had some reduction in liver damage (22%), which was not statistically significant.

Table 1 shows each mouse's liver fluke burden and the hepatic damage score. The mean worm burden for the original 7 metacercariae inocula was 28.6% in the unimmunised and infected control group. Table 1 shows that the number of liver flukes in the groups of mice immunised with the synthetic peptides was lower than for the unimmunised and/or infected control group.

These results would seem to point to be a direct relationship between the survival percentage for each group of mice and liver fluke burden and the liver damage scores.

Humoral immune responses

Figure S1 shows that most of the animals used in this study had high IgG levels after being immunised with the synthetic peptides, peptide B1 being the most immunogenic; the highest antibody levels were reaching in mice immunised with the single peptides, peptide T16 being the least immunogenic. A combination of peptides led to B-epitope-containing peptides inducing the highest antibody levels while a combination of T-epitope-containing peptides induced low antibody levels. The presence of antibodies against *F. hepatica* ES antigens was not detected in 7 out of 98 mice; these animals were then excluded from the study as it was considered that these animals were not appropriately infected and could have interfered with protection evaluation, leading to a false interpretation of protection (Figure S2). There were no detectable anti-peptide antibody levels in any of the unimmunised control groups, as expected (Figure S1).

All the mice included in this study were bled to check for antibodies raised against the *F. hepatica* ES antigens twenty-one days pi. Total IgG, IgG1, IgG2a, IgE and IgM levels IgM were analysed in the group of mice immunised with the synthetic peptides which reached the highest survival rate (groups 5 and 13) to better understand any relationship between protection and antibody response.

Figure 4A shows that total IgG levels were higher ($p < 0.05$) in the group of mice immunised with a combination of peptides containing T-epitopes (group 13), compared to the unimmunised and infected control group. IgG1 levels were higher ($p < 0.05$) in the group of mice immunised with a combination of peptides containing T-epitopes (group 13) compared to the unimmunised and infected control groups. Regarding IgG2a levels, higher antibody levels ($p < 0.05$) were observed in both groups of mice immunised with the synthetic peptides (data not shown), thus indicating a mixed Th1/Th2 immune response regarding protection against *F. hepatica* (Figure S3).

Only the group of mice immunised with a combination of peptides containing T-epitopes had higher IgE levels ($p < 0.05$) compared to the infected control group (Figure 4B). No differences in IgM levels were observed in any of the groups of mice immunised with the synthetic peptides (Figure 4C).

Cytokine levels

Th2 immune response (IL-4), Th1 (IFN- γ), Treg (IL-10) and Th17 (IL-17) cytokine levels were analysed in the group of mice having the highest survival rates (groups 5 and 13).

Figure 5A shows that higher IL-4 levels were obtained in mice immunised with the synthetic peptides, compared to the unimmunised and infected control group. However, only IL-4 levels of in the group of mice immunised with the single peptide B2 were statistically significant ($p < 0.05$). Regarding IFN- γ levels, Figure 5B shows that immunising mice with the synthetic peptides led to a decrease in IFN- γ levels ($p < 0.05$).

Spearman's rank correlation coefficient revealed a significant negative correlation ($p < 0.05$) amongst IFN- γ and IL-4 levels in surviving mice (Figure 6), thereby indicating a stronger Th2 immune response in surviving mice. It might thus be argued that protection against *F. hepatica* seems likely to be Th2-dependent.

Immunising mice with synthetic peptide B2 and a combination of peptides containing T-epitopes (groups 5 and 13, respectively), also led to an increase ($p < 0.05$) in IL-10 and IL-17 cytokine levels (Figures 5C and 5D) compared to the unimmunised and infected control groups. A negative correlation ($p = 0.076$) was found between IFN- γ and IL-10 levels in surviving mice, thus indicating a possible role for IL-10 in inducing an immune-protective response against the infection caused by *F. hepatica*. A significant positive correlation ($p < 0.05$) was also found between IL-4 levels and hepatic lesion score and (data not shown).

Discussion

The present study was designed to assess the protective efficacy of seven *F. hepatica* protein-derived peptides containing B- and T-epitopes. This article has demonstrated that immunising CD1 mice with some subunit-based and chemically-synthesised peptides containing B- or T-epitopes formulated in the ADAD vaccination system using the AA0029 immunomodulator led to obtaining protection against infection caused by *F. hepatica*, based on survival rates and reduced fluke burden and hepatic lesion score. Most recent work aimed at developing an effective vaccine against *F. hepatica* has been based on recombinant antigens, parasite purified proteins, excretory/secretory released proteins and DNA-based vaccines [26-29]. However, little is known concerning the development of subunit-based, chemically-synthesised anti-*F. hepatica* vaccines [30,31]; such information is also limited regarding other parasitic diseases. Regarding helminthic infection, the protective efficacy of synthetic peptides against *Echinococcus granulosus* has been tested during recent years [32] and the protective efficacy of a synthetic peptide derived from a cathepsin-L protein against *Fasciola gigantica* has also been tested [33]. A synthetic peptide has been also used as an immunodiagnostic tool against *F. hepatica* [34].

Immunising CD1 female mice with synthetic peptides containing either B- or T-epitopes, formulated in the ADAD vaccination system with the AA0029 immunomodulator, increased the survival rate of mice in the present study, leading to good levels of protection ranging from 57.1% to 71.4%, compared to animals which did not receive any treatment throughout the immunisation trial. The combination of peptides containing T-epitopes produced the highest survival rate, supporting our hypothesis that a multi-epitope-based vaccine is necessary for obtaining higher immune-protective responses against helminthic infections. A decrease in fluke burden and hepatic damage score in the groups of mice immunised with single synthetic peptides and combinations of them has also been reported.

The highest reduction in fluke burden was found in the group of mice immunised with single peptide B5 (up to 67%), as well as with single peptides B2, T14 and T16 and the combination of peptides containing either B- or T-epitopes (up to 57%). There was a significant reduction in hepatic damage score in the group of mice immunised with the combination of T-epitopes-containing peptides (up to 45%), demonstrating the potential of a subunit, multi-epitope-based vaccine against *F. hepatica* infection. Antibody response and cytokine levels were investigated

in the group of mice having the highest survival rates (groups 5 and 13, respectively) to better understand possible mechanisms associated with an immune-protection-inducing response regarding infection caused by *F. hepatica*.

It is well known that both innate and the adaptative immune response are involved in producing an immune-protective response against *F. hepatica* [35]. An innate immune response plays a key role in defence against *F. hepatica* but also in priming an adaptive immune response, i.e. inducing high eosinophil levels and macrophage activation [36,37]. According to humoral immune responses, an adaptive B-cell-based response is typically developed within 4 weeks of infection leading to parasite-specific antibody production [35].

Regarding antibody subclass, there are higher IgG1 than IgG2a levels and poor IgM levels in *F. hepatica* infection [38,39]. High IgG2a levels have been correlated with protection against *F. hepatica*. Other studies have shown a correlation between IgG2a and a reduction in parasite burden [39,40]. The present study revealed higher IgG2a levels in groups of mice immunised with the single peptide B2 or with a combination of peptides containing T-epitopes. However, no statistical correlation was detected between IgG2a level and protection. Immunising mice with synthetic peptides partially induced protection against *F. hepatica* and such induced immune response was different from that induced by infection. Fluke-specific serum IgG1 and IgG2a levels were higher in protected animals.

Higher IgE levels were induced in the group of mice immunised with a combination of T-epitope-containing peptides than in the infected control group; however, we could not provide any evidence that protection against *F. hepatica* in mice immunised with synthetic peptides was mediated by IgE levels. Helminthic parasite infection has been associated with high IgE response for a long time now and also its role in protection, particularly against intestinal nematodes. The high number of eosinophils in helminthic infections has also been related to IgE level [41]. Some evidence has been presented regarding other helminthic infections supporting the role of IgE in anti-helminth immunity. Human schistosomiasis studies have shown that lower schistosome worm burdens have been associated with high IgE levels [42] and purified monoclonal IgE antibodies administered in large amounts induce protection against schistosomiasis [43].

Regarding cytokine level, early IFN- γ production has typically been reported in *F. hepatica*-infected mice, cattle and sheep [44-46], thereby supporting a Th1 response during acute phase changing to a Th2-type

response as infection has become established. Lower IFN- γ levels were detected in our study in the group of mice immunised with the synthetic peptides three weeks after experimental infection, compared to the infected control group. Immunising mice with synthetic peptides thus induced an immune response different to that obtained by experimental infection. High IL-4 levels were found in protected mice compared to the infected control group (groups 5 and 13, respectively). A significant negative correlation between IL-4 and IFN- γ levels in the protected mice provided some information regarding the implications of Th2 and Th1 immune responses in inducing protection against *F. hepatica*, at least in a murine model, thereby indicating a stronger Th2 immune response in surviving mice.

It should be noted that not just Th1/Th2 immune responses were involved in inducing protection against *F. hepatica*; regulatory Treg (IL-10) and Th17 (IL-17) immune responses also seemed to be associated with inducing protection against parasites [47,48]. Both pathways are important in regulating an immune response and also play a key role in minimising pathology and enhancing tissue repair during helminth infection [49]. However, the mechanisms controlling such pathology or infection remain unclear and fibrosis could play a key role as it encapsulates flukes and limits their evasion in liver parenchyma [50,51]. The present study's results supported the idea that immunising mice with the synthetic peptides led to immunomodulation of the immune response, thereby inducing an immune response different to that caused by *F. hepatica* and hence it would seem necessary for obtaining an immune-protective response.

According to the pertinent literature, there is negative correlation between IL-10 level and fluke burden in *F. hepatica* [48] and evidence has been presented regarding *S. mansoni* concerning a relationship between IL-17 level and immunopathology [47]. However, higher IL-10 and IL-17 cytokine levels in the group of mice immunised with single peptide B2 and a combination of T-epitopes-containing peptides were detected in the present study, although such cytokine levels were not statistically correlated with either hepatic damage or fluke burden.

The present study's findings have highlighted the immunoprophylactic potential of T-epitope-containing synthetic peptides when used in combination and formulated in the ADAD vaccination system, thus supporting the idea that developing multi-epitope, subunit-based and chemically-synthesised vaccines produces better results than immunisation with single antigens. However, it should be noted that a deeper

knowledge of the host-parasite interactions and understanding the molecular and immunological mechanisms involved in inducing a protective response is crucial for better selecting the most appropriate vaccine formulation.

Acknowledgements

We would like to thank Magnolia Vanegas, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), for peptide synthesis, Dr Arturo San Feliciano, Universidad de Salamanca, for kindly providing us with AA0029, Dr Antonio Martínez-Fernández, Universidad Complutense de Madrid, for supplying PAL and Montanide, and Mr Jason Garry for correcting the manuscript.

References

- Kaplan RM (2001) *Fasciola hepatica*: a review of the economic impact in cattle and considerations for control. *Vet Ther* 2: 40-50.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009) Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol* 69: 41-146.
- Furst T, Keiser J, Utzinger J (2012) Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 12: 210-221.
- Hotez PJ, Savioli L, Fenwick A (2012) Neglected tropical diseases of the Middle East and North Africa: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1475.
- Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD (1999) Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull World Health Organ* 77: 340-346.
- Keiser J, Utzinger J (2009) Food-borne trematodiasis. *Clin Microbiol Rev* 22: 466-483.
- Kenyon F, Sargison ND, Skuce PJ, Jackson F (2009) Sheep helminth parasitic disease in south eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. *Vet Parasitol* 163: 293-297.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009) Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Vet Parasitol* 163: 264-280.
- Fairweather I (2009) Triclabendazole progress report, 2005-2009: an advancement of learning? *J Helminthol* 83: 139-150.
- Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, et al. (2013) Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Vet Parasitol* 195: 118-121.
- Olaechea F, Lovera V, Larroza M, Raffo F, Cabrera R (2011) Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet Parasitol* 178: 364-366.
- Moll L, Gaasenbeek CP, Vellema P, Borgsteede FH (2000) Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet Parasitol* 91: 153-158.
- Winkelhagen AJ, Mank T, de Vries PJ, Soetekouw R (2012) Apparent triclabendazole-resistant human *Fasciola hepatica* infection, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 18: 1028-1029.
- Hotez PJ, Bethony JM, Diemert DJ, Pearson M, Loukas A (2010) Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol* 8: 814-826.
- Hillyer GV (2005) *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J Helminthol* 79: 241-247.
- McManus DP, Dalton JP (2006) Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 133 Suppl: S43-61.
- Ben-Yedidia T, Arnon R (1997) Design of peptide and polypeptide vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 8: 442-448.
- van der Burg SH, Bijker MS, Welters MJ, Offringa R, Melief CJ (2006) Improved peptide vaccine strategies, creating synthetic artificial infections to maximize immune efficacy. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 916-930.
- Lopez-Aban J, Esteban A, Vicente B, Rojas-Caraballo J, del Olmo E, et al. (2012) Adaptive immune stimulation is required to obtain high protection with fatty acid binding protein vaccine

- candidate against *Fasciola hepatica* in Balb/C mice. *J Parasitol* 98: 527-535.
20. Lopez-Aban J, Nogal-Ruiz JJ, Vicente B, Morrondo P, Diez-Banos P, et al. (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.
 21. Lopez-Aban J, Casanueva P, Nogal J, Arias M, Morrondo P, et al. (2007) Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Vet Parasitol* 145: 287-296.
 22. Siles-Lucas M, Uribe N, Lopez-Aban J, Vicente B, Orfao A, et al. (2007) The *Schistosoma bovis* Sb14-3-3zeta recombinant protein cross-protects against *Schistosoma mansoni* in BALB/c mice. *Vaccine* 25: 7217-7223.
 23. Martinez-Fernandez AR, Nogal-Ruiz JJ, Lopez-Aban J, Ramajo V, Oleaga A, et al. (2004) Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Vet Parasitol* 126: 287-298.
 24. del Olmo E, Plaza A, Muro A, Martinez-Fernandez AR, Nogal-Ruiz JJ, et al. (2006) Synthesis and evaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 6091-6095.
 25. Casanueva R, Hillyer GV, Ramajo V, Oleaga A, Espinoza EY, et al. (2001) Immunoprophylaxis against *Fasciola hepatica* in rabbits using a recombinant Fh15 fatty acid-binding protein. *J Parasitol* 87: 697-700.
 26. Zafra R, Perez-Ecija RA, Buffoni L, Moreno P, Bautista MJ, et al. (2013) Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *J Comp Pathol* 148: 373-384.
 27. Buffoni L, Martinez-Moreno FJ, Zafra R, Mendes RE, Perez-Ecija A, et al. (2012) Humoral immune response in goats immunised with cathepsin L1, peroxiredoxin and Sm14 antigen and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 185: 315-321.
 28. Wedrychowicz H, Lamparska M, Kesik M, Kotomski G, Mieszczanek J, et al. (2003) The immune response of rats to vaccination with the cDNA or protein forms of the cysteine proteinase of *Fasciola hepatica*. *Vet Immunol Immunopathol* 94: 83-93.
 29. Wedrychowicz H, Kesik M, Kaliniak M, Kozak-Cieszczyk M, Jedlina-Panasiuk L, et al. (2007) Vaccine potential of inclusion bodies containing cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke. *Vet Parasitol* 147: 77-88.
 30. Harmsen MM, Cornelissen JB, Buijs HE, Boersma WJ, Jeurissen SH, et al. (2004) Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *Int J Parasitol* 34: 675-682.
 31. Vilar MM, Barrientos F, Almeida M, Thaumaturgo N, Simpson A, et al. (2003) An experimental bivalent peptide vaccine against schistosomiasis and fascioliasis. *Vaccine* 22: 137-144.
 32. Read AJ, Casey JL, Coley AM, Foley M, Gauci CG, et al. (2009) Isolation of antibodies specific to a single conformation-dependant antigenic determinant on the EG95 hydatid vaccine. *Vaccine* 27: 1024-1031.
 33. Jezek J, El Ridi R, Salah M, Wagih A, Aziz HW, et al. (2008) *Fasciola gigantica* cathepsin L proteinase-based synthetic peptide for immunodiagnosis and prevention of sheep fasciolosis. *Biopolymers* 90: 349-357.
 34. Rokni MB, Gharavi MJ (2002) Evaluation of a Pre-Selected Epitope of *Fasciola hepatica* Cathepsin-L1 for the Diagnosis of Human Fasciolosis by IgG-ELISA Test. *Iranian J Publ Health* 31: 3.
 35. Flynn RJ, Mulcahy G, Elsheikha HM (2010) Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control. *Vet Parasitol* 169: 235-240.
 36. Bossaert K, Jacquinet E, Saunders J, Farnir F, Losson B (2000) Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 88: 17-34.
 37. Zhang WY, Moreau E, Hope JC, Howard CJ, Huang WY, et al. (2005) *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*:

- comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Exp Parasitol* 111: 154-159.
38. Clery D, Torgerson P, Mulcahy G (1996) Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 62: 71-82.
 39. Raadsma HW, Kingsford NM, Suharyanta, Spithill TW, 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. *Vet Parasitol* 143: 275-286.
 40. Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, et al. (1998) Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16: 932-939.
 41. Jurgens M, Wollenberg A, Hanau D, de la Salle H, Bieber T (1995) Activation of human epidermal Langerhans cells by engagement of the high affinity receptor for IgE, Fc epsilon RI. *J Immunol* 155: 5184-5189.
 42. Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJ, Kariuki HC, Langley JG, et al. (1992) Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol* 22: 1483-1494.
 43. Verwaerde C, Joseph M, Capron M, Pierce RJ, Damonville M, et al. (1987) Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 138: 4441-4446.
 44. O'Neill SM, Brady MT, Callanan JJ, Mulcahy G, Joyce P, et al. (2000) *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol* 22: 147-155.
 45. Flynn RJ, Mulcahy G (2008) Possible role for Toll-like receptors in interaction of *Fasciola hepatica* excretory/secretory products with bovine macrophages. *Infect Immun* 76: 678-684.
 46. Moreau E, Chauvin A, Boulard C (1998) IFN gamma and IL-10 production by hepatic lymph node and peripheral blood lymphocytes in *Fasciola hepatica* infected sheep. *Parasite* 5: 307-315.
 47. van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, van der Meer JW, Joosten LA, et al. (2009) Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep* 42: 776-787.
 48. Hacariz O, Sayers G, Flynn RJ, Lejeune A, Mulcahy G (2009) IL-10 and TGF-beta1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep. *Parasite Immunol* 31: 613-622.
 49. Belkaid Y, Blank RB, Suffia I (2006) Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol Rev* 212: 287-300.
 50. Belkaid Y (2007) Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7: 875-888.
 51. Behn CA, Sangster NC (1999) Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. In: Dalton JP, editor. *Fasciolosis*. Republic of Ireland: CABI Publishing. pp. 185 - 224.

Figure legends

Figure 1. Kaplan-Meier curves depicting survival rates in mice immunised with single peptides and infected with *F. hepatica* metacercariae. A). Mice immunised with single peptides containing B-epitopes. B). Mice immunised with single peptides containing T-epitopes. Survival rates of mice belonging to both untreated and infected controls are also represented. Human endpoint was established when an indicator of severe pain, excessive distress, suffering or an impending death was observed in any of the animals and then euthanatised with an intraperitoneal injection of pentobarbital at 60mg/kg using 30g needles.

Figure 2. Kaplan-Meier curves depicting survival rates in mice immunised with the combination of peptides containing B epitopes, T epitopes and both of them. Survival rates of mice belonging to both untreated and infected-controls are also represented. Human endpoint was established when an indicator of severe pain, excessive distress, suffering or an impending death was observed in any of the animals and then euthanatised with an intraperitoneal injection of pentobarbital at 60mg/kg using 30g needles.

Figure 3. The worm recovery and hepatic damage scores were evaluated in each individual mouse immunised with any of the single or peptide combination and orally infected with 7 *F. hepatica*-metacercariae. Panel A represents worm recovery and panel B shows the hepatic damage score. Gray bars indicate non-survival mice and black bars survival mice.

Figure 4. The levels of IgG (A), IgE (B) and IgM (C) in serum isolated from mice immunised with the single peptide B2 and a combination of peptides containing T-epitopes and

experimentally challenged with 7 *F. hepatica*-metacercariae were analysed by ELISA. Sera obtained from untreated and infected-controls mice were also analysed. Data are presented as box plots with the bottom and the top of the box indicating the 25th and the 75th percentiles, respectively. * Represents statistical differences at a 95% confidence level.

Figure 5. The levels of IL-4 (A), IFN- γ (B), IL-10 (C) and IL-17 (D) in serum isolated from mice immunised with the single peptide B2 and a combination of peptides containing T-epitopes and experimentally challenged with 7 *F. hepatica*-metacercariae were analysed by using a flow-cytometry-based technique. Sera obtained from untreated and infected-controls mice were also analysed. Data are presented as box plots with the bottom and the top of the box indicating the 25th and the 75th percentiles, respectively. * Represents statistical differences at a 95% confidence level.

Figure 6. Spearman correlation analysis showing the relationship between IL-4 and IFN- γ levels in the groups of mice immunised with the single peptide B2 and a combination of peptides containing T-epitopes and experimentally challenged with 7 *F. hepatica*-metacercariae.

Figure S1. Specific anti-peptide levels in sera obtained from mice immunised with synthetic peptides containing B- and T-epitopes was analysed by ELISA. Bar graphs represent mean values and 95% confidence intervals.

Figure S2. Specific anti-*F. hepatica* ES antibody levels in sera obtained from mice immunised with the synthetic peptides containing B- and T-epitopes and infected with 7 *F. hepatica*-metacercariae were analysed by ELISA. Bar graphs represent mean values and 95% confidence intervals. Animals with antibody levels lower than the median +/- 2 standard deviations of untreated-controls were excluded from this study.

Figure S3. Specific anti-*F. hepatica* ES antibody levels in sera obtained from mice immunised with the single peptide B2 and a combination of peptides containing T-epitopes and experimentally challenged with *F. hepatica*-metacercariae was analysed by ELISA. A). IgG1. B). IgG2a. Data are presented as box plots with the bottom and the top of the box indicating the 25th and the 75th percentiles, respectively. Bar graphs represent mean values and 95% confidence intervals.

Table 1. Recovered flukes and assessment of macroscopic hepatic lesions in CD1 mice immunised with synthetic peptides containing B- and T- epitopes using the ADAD vaccination system and challenged with 7 *F. hepatica* metacercaria.

Figure 1.

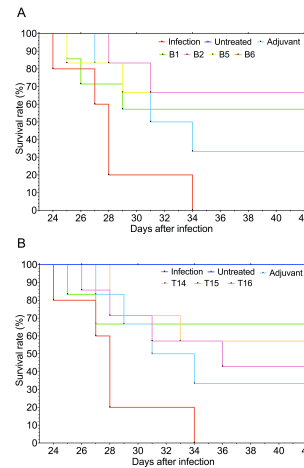


Figure 2.

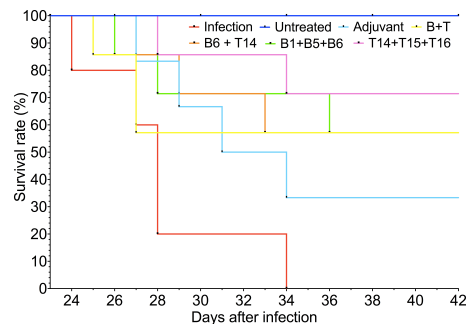


Figure 3.

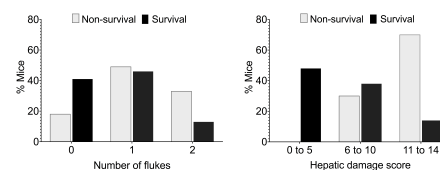


Figure 4.

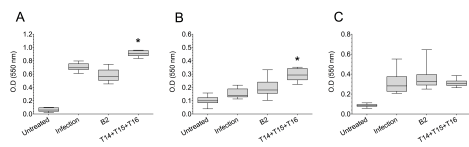


Figure 5.

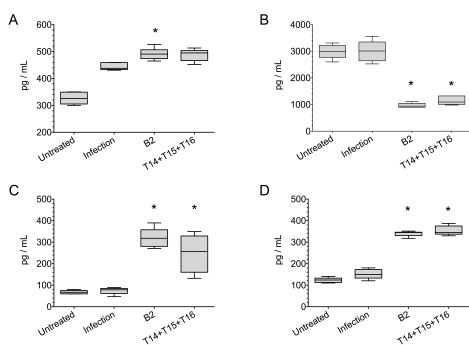


Figure 6.

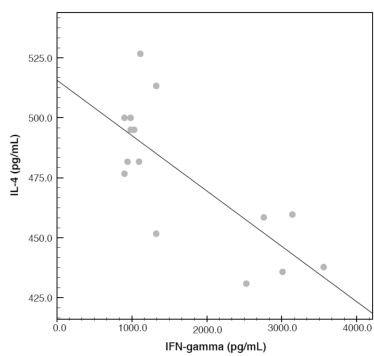


Figure S1.

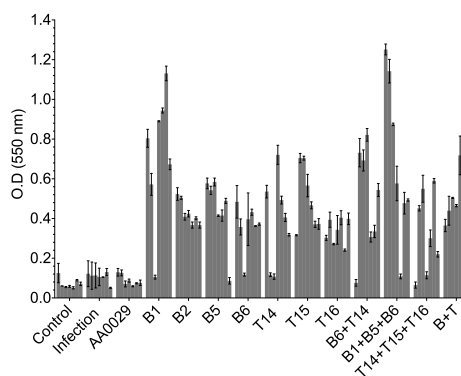


Figure S2.

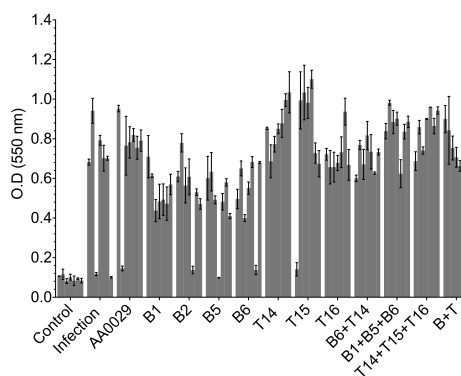
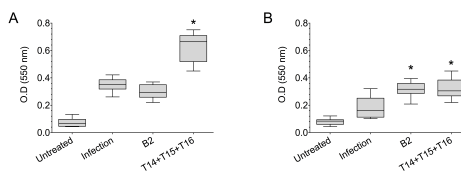


Figure S3.



Anexo 11. Solicitud de patente



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201330905	
Fecha de recepción:	17 junio 2013, 13:47 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1367.58	
Solicitante:	UNIVERSIDAD DE SALAMANCA	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE FASCIOLA HEPATICA Y SU USO COMO VACUNA	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (36 p.) Reivindicaciones-1.pdf (3 p.) Dibujos-1.pdf (7 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip POWATT.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (16 p.) SEQLTXT.txt	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	17 junio 2013, 13:47 (CEST)	
Codificación del envío:	54:62:DA:4C:D0:59:D5:F5:7A:1E:B6:C4:63:CD:58:0E:FA:79:23:DC	

/Madrid, Oficina Receptora/



(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5) DIRECCION ELECTRONICA HABILITADA (DEH):		
(6-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:	UNIVERSIDAD DE SALAMANCA España ES Q3718001E Patio de Escuelas, 1 Salamanca 37 Salamanca 37008 España ES INVENCIÓN LABORAL: CONTRATO: SUCESIÓN:
(7-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	MURO ÁLVAREZ ANTONIO España ES
(7-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	ROJAS CARABALLO JOSÉ VICENTE Colombia CO
(7-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	LÓPEZ ABÁN JULIO España ES
(7-4) INVENTOR 4:		

(7-5) INVENTOR 5:	APELLIDOS: PÉREZ DEL VILLAR MORO NOMBRE: LUIS NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/PASAPORTE:	
(7-6) INVENTOR 6:	APELLIDOS: VICENTE SANTIAGO NOMBRE: BELÉN NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/PASAPORTE:	
(8) TÍTULO DE LA INVENCION:		PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE FASCIOLA HEPATICA Y SU USO COMO VACUNA
(9) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	<input checked="" type="checkbox"/>
(10) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO	<input checked="" type="checkbox"/>
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO	<input checked="" type="checkbox"/>
(12) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(13) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS: LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIA S EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS		<input checked="" type="checkbox"/>
(14) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(15) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(16) AGENTE REPRESENTANTE:	APELLIDOS: PONS ARIÑO NOMBRE: ÁNGEL CÓDIGO DE AGENTE: 0499/5 NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/CIF/PASAPORTE: 50534279-J DOMICILIO: Glorieta Rubén Darío, 4 LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28010 PAÍS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: 917007600	

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS		
Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad		
1. REFERENCIA DE SOLICITUD	ES1367.58	
2. TASAS	Importe (en euros)	
Concepto	Código de barras asignado	Importe
IE01 Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.		0,00
IE02 Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
IE04 Petición IET		0,00
IE06 Prioridad extranjera (0)		0,00
El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas	<input type="checkbox"/>	
El solicitante es una Universidad pública	<input checked="" type="checkbox"/>	
	Importe total	0,00
	Importe abonado	0,00

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

De: Rosa Pérez Manero <rosam@usal.es>
 Asunto: RV: Inicio IET de la Patente No. 201330905
 Fecha: 6 de febrero de 2014 10:44:41 GMT+01:00
 Para: <ama@usal.es>
 Cc: "Alfredo Mateos" <alfredo.mateos@usal.es>
 N/Ref.: ES1367.58

Asunto: Solicitud de Patente de Invención nº 201330905, referente a «PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE FASCIOLA HEPATICA Y SU USO COMO VACUNA», a nombre de la UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Estimado Antonio,

Para su conocimiento y el de los inventores de la Patente de referencia adjunto información relativa a la Patente de referencia, en la que nos indican que la solicitud de patente no presenta ningún defecto formal y que su objeto resulta patentable.

Siguiendo con la tramitación de esta solicitud y teniendo en cuenta que hasta el 17 de junio de 2014 se puede solicitar una PCT, esperaré hasta finales de junio para autorizar (con firma del Vicerrector de Investigación y Transferencia) a la Agencia PONS, la solicitud a la OEPM de la elaboración del Informe sobre el Estado de la Técnica.

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a un polipéptido o una combinación de polipéptidos sintéticos derivados de secuencias de proteínas de *Fasciola hepatica*, los cuales resultan útiles como vacuna frente a la infección producida por este organismo. La invención también se refiere a las secuencias nucleotídicas que codifican para los polipéptidos, y a composiciones que comprendan los polipéptidos. Además la presente invención también incluye los anticuerpos que reconocen los polipéptidos de la invención. Por tanto, la presente invención se podría encuadrar en el campo de la biotecnología y más concretamente dentro del campo de la biomedicina.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El organismo *Fasciola hepatica* es un trematodo digénido que produce la enfermedad denominada fasciolosis o fascioliasis, la cual es transmitida principalmente por la ingestión de metacercarias adheridas a plantas acuáticas. Su distribución geográfica es cosmopolita y se han reportado casos de fasciolosis en los cinco continentes (Mas-Coma *et al.*, 2009. *Adv Parasitol.* 69: 41-146; Hotez *et al.*, 2012. *PLoS Negl Trop Dis.* 6: e1475).

Este organismo en su ciclo de vida necesita dos hospedadores, uno intermediario el cual es un caracol de agua dulce. En Europa el hospedador intermediario es el caracol *Galba truncatula* (sinónimo *Lymnaea truncatula*). El segundo hospedador o hospedador definitivo son principalmente mamíferos herbívoros como ovejas y vacas, pero también el ser humano (López-Abán *et al.*, 2012. *Manual de enfermedades importadas* p.10).

A nivel veterinario, la fasciolosis causa grandes pérdidas económicas debidas principalmente a la muerte de los animales, disminución en la producción de carne y leche, así como el decomiso de los mismos por las autoridades sanitarias en los mataderos para evitar que puedan llegar al consumo alimentario humano (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012. *Vet Parasitol.* 1: 15-38).

Por otro lado, en humanos esta enfermedad está considerada como un problema de salud pública. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha descrito casos de fasciolosis humana en 51 países, con más de 17 millones de personas afectadas, existiendo mayores problemas de salud en áreas endémicas de países andinos, el área del Caribe, Norte de África, Europa del Este y cuenca del mar Caspio. En la actualidad se considera que existe un aumento en los casos registrados de fasciolosis humana ya que los avances surgidos en el diagnóstico de la enfermedad permiten detectar un mayor número de casos, considerándola una enfermedad emergente a nivel mundial (World Health Organization 2008. *Facts sheet on fasciolosis. In action Against worms:* 1-8).

Tras la ingestión de las metacercarias, los vermes juveniles liberados atraviesan la pared intestinal para migrar a través del parénquima hepático y llegar a su localización definitiva en los conductos biliares. El daño durante su proceso migratorio se debe a factores mecánicos como la abrasión que causan sus espículas o la succión originada por sus ventosas. Durante este proceso el parénquima hepático sufre una extensa destrucción con intensas lesiones y hemorragias causadas tanto por los vermes inmaduros como por la reacción inflamatoria e inmunológica desencadenada. Además se pueden producir infecciones bacterianas secundarias que pueden originar peritonitis. Los vermes adultos se localizan principalmente en los conductos biliares, pero pueden encontrarse en el conducto cístico, la vesícula biliar, la ampolla de Vater o el colédoco. Los conductos biliares interlobulares se observan dilatados y esclerosados, presentan hiperplasia y obstrucción del flujo biliar.

Las infecciones por este organismo se tratan fundamentalmente con triclabendazol, un antihelmíntico seguro el cual actúa frente a las fasciolas tanto inmaduras como adultas y elimina hasta el 99% de las mismas. Sin embargo, no resulta útil en todos los casos y por tanto aun resulta necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos. Además, debido al amplio uso de este fármaco en animales se han ido seleccionando organismos resistentes al mismo, por lo que su eficacia se ha ido viendo reducida paulatinamente (World Health Organization, 2006. *Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control*; Fairweather, 2009. *J. Helminthol.* 83: 139-150).

El control de la fasciolosis se basa principalmente en evitar la ingestión de plantas acuáticas (berros, marujas, lechugas, etc.) recogidas en zonas endémicas de fasciolosis y en efectuar tratamientos eficaces en ganado infectado con el parásito. Por último, se siguen realizando grandes esfuerzos para lograr una vacuna efectiva contra esta enfermedad. De esta manera se han descrito diferentes moléculas candidatas a vacunas (catepsinas, GST (Glutathión S-transferasa o “*Glutathione S-transferase*”), FABP (proteínas de unión a ácidos grasos o “*fatty-acid-binding proteins*”), etc.). (Hillyer, 2005. *J. Helminthol.* 79: 241-247; McManus et al., 2006. *Parasitology.* 133 Suppl: S43-61). Sin embargo en la actualidad no se dispone de una vacuna comercial eficaz.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a polipéptidos formados por al menos 3 repeticiones de una secuencia de aminoácidos. La presente invención también se refiere a combinaciones de los polipéptidos, así como a composiciones que comprenden dichos polipéptidos, solos o en combinación con otros elementos. También se refiere a anticuerpos producidos por la inmunización de un animal con cualquiera de estos elementos. La presente invención también se refiere al uso de estos polipéptidos, composiciones y/o anticuerpos para la elaboración de medicamentos, preferiblemente vacunas para la prevención de enfermedades producidas por organismos del género *Fasciola* y más concretamente por *Fasciola hepatica*.

En la presente invención, los inventores demuestran como el uso de uno de los polipéptidos denominados T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2) y T16 (SEQ ID NO: 3) o combinaciones de estos polipéptidos derivados de proteínas de *Fasciola hepatica*, provocan la generación de una respuesta inmune en el individuo. Además demuestran como mediante esta inmunización se disminuye la mortalidad de los individuos infectados con *Fasciola hepatica*, y se consigue una reducción en el daño hepático y del número de vermes presentes en el individuo. Estos polipéptidos son moléculas que presentan 3 copias de una secuencia de 15 aminoácidos. T14 se refiere a un péptido que presenta 3 copias del péptido de secuencia SEQ ID NO: 17 y que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1. T15 se refiere a un péptido que presenta 3 copias del péptido de secuencia SEQ ID NO: 18 y que tiene la secuencia SEQ ID NO: 2. T16 se refiere a un péptido que presenta 3 copias del péptido de secuencia SEQ ID NO: 19 y que tiene la secuencia SEQ ID NO: 3. Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces. En una realización preferida el polipéptido comprende SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 se repite 3 veces. En una realización más preferida el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 17 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17 se repite 3 veces es SEQ ID NO: 1. En otra realización más preferida el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 18 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 18 se repite 3 veces es SEQ ID NO: 2. En otra realización más preferida el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 19 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 19 se repite 3 veces es SEQ ID NO: 3. En una realización aun más preferida el polipéptido es el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida el polipéptido consiste en 3 copias del péptido de secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19.

Estos polipéptidos que comprenden SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, donde dicha

secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces, presentan una mayor utilidad que las secuencias SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 en sí ya que inducen una respuesta inmunológica mayor y provocan una mayor protección.

En la presente invención los polipéptidos que presentan al menos 3 copias de un péptido pueden consistir únicamente en las secuencias de los péptidos repetidas en tándem de forma que no incluyen ningún aminoácido adicional, o bien pueden incluir aminoácidos adicionales entre las repeticiones separándolas y/o en los extremos, debido por ejemplo al método de obtención del péptido para permitir la fusión de monómeros mediante oxidación. Estos aminoácidos adicionales que separan las repeticiones como son por ejemplo la presencia de glicina y cisteína en ambos extremos de cada monómero no modifican la capacidad inmunogénica de los polipéptidos con respecto a los polipéptidos que no presentan estos aminoácidos entre los monómeros. Además todos los polipéptidos descritos en la presente invención, se pueden encontrar fusionados o conjugados con otros elementos de forma que se aumente su inmunogenicidad. Estos elementos pueden ser por ejemplo, aunque sin limitarse, hemocianina de lapa (KLH o *keyhole limpet hemocyanin*), haptenos, GST, GPI (glicosil fosfatidil inositol o *glycosyl phosphatidylinositol*). Por tanto en otra realización preferida de este primer aspecto de la invención los polipéptidos se encuentran fusionados o conjugados con elementos que aumentan su inmunogenicidad.

Los péptidos o polipéptidos de la presente invención pueden ser sintetizados, por ejemplo, aunque sin limitarnos, siguiendo la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida y fusión de varias copias mediante reacciones de oxidación tal y como se indica en los ejemplos, o mediante aproximaciones de ADN recombinante que den lugar a la misma secuencia. Los polipéptidos de la invención pueden producirse recombinantemente, no sólo directamente sino como un polipéptido de fusión junto con un polipéptido heterólogo, el cual puede contener, por ejemplo aunque sin limitarnos, otro péptido o polipéptido que facilite su aislamiento y purificación. Este péptido o polipéptido fusionado al polipéptido de la invención puede comprender además un sitio de corte para una proteasa, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en el extremo N-terminal del polipéptido o proteína madura. La producción recombinante puede comprender por ejemplo, aunque sin limitarse, la amplificación de una secuencia nucleotídica que codifique para el polipéptido de interés, la clonación de la secuencia nucleotídica amplificada en un vector de expresión, la transformación o transfección de una célula competente con dicho vector, el cultivo de dicha célula en condiciones que promuevan la expresión del polipéptido de la invención y el aislamiento y purificación del polipéptido de la invención producido por la célula.

Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diferentes secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia de aminoácidos y por tanto múltiples secuencias de nucleótidos que pueden dar lugar a los polipéptidos de la invención. La obtención de estas secuencias de nucleótidos que dan lugar a los polipéptidos de la invención, son fáciles de obtener mediante herramientas informáticas. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada, de ahora en adelante "secuencia nucleotídica de la invención", que codifica para cualquiera de los polipéptidos de la invención. Los términos "secuencia nucleotídica", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótido" se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra.

La secuencia nucleotídica de la invención puede obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencional, o mediante secuenciación. La secuencia nucleotídica, adicionalmente a la secuencia codificante, puede llevar otros elementos, como por ejemplo aunque sin limitarse, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' o 3', sitios de unión a ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Las secuencias nucleotídicas adicionalmente también pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles, por ejemplo, aunque sin

limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de ellos o permitir una mejor purificación del mismo.

Otro aspecto de la invención se refiere a una construcción genética, de ahora en adelante “construcción genética de la invención”, que comprende la secuencia nucleotídica de la invención. El término “construcción genética” se refiere a una molécula de ADN o ARN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. En una realización preferida, la construcción genética de la invención es un vector de expresión. El término “vector de expresión”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una molécula de ADN linear o circular que comprende la secuencia nucleotídica de la invención operativamente unido a nucleótidos adicionales necesarios para su expresión, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, secuencias control tales como reguladores, terminadores y/o promotores. Ejemplos de vectores de expresión son, sin ningún tipo de limitación, plásmidos, fagos, cósmidos, fagémidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), cromosomas artificiales de bacterias (BAC), cromosomas humanos artificiales (HAC), vectores virales, tales como adenovirus, retrovirus o cualquier otro tipo de molécula de ADN con capacidad para replicarse en el interior de una célula, procariota o eucariota.

La expresión “unidos operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a una secuencia nucleotídica, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término “promotor” hace referencia a una región del ADN, generalmente “aguas arriba” o *upstream* del punto de inicio de la transcripción, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles. Las secuencias de control dependen del origen de la célula en la que se quiere expresar el ácido nucleico. Ejemplos de promotores procariotas incluyen, por ejemplo, pero sin limitarnos, los promotores de los genes *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI*, *tet*, *gal*, *trc*, o *tac* de *Escherichia coli*, o el promotor del gen α -amilasa de *Bacillus subtilis*. Para la expresión de un ácido nucleico en una célula procariota también es necesaria la presencia de un sitio de unión ribosomal situado *upstream* de la secuencia codificante. Secuencias de control apropiadas para la expresión de una secuencia nucleotídica en células eucariotas son conocidas en el estado de la técnica. Dicha construcción genética de la invención puede ser introducida en una célula hospedadora de manera que se mantenga como una construcción genética integrada en el cromosoma o como un vector extracromosómico autoreplicante. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una célula, de ahora en adelante “célula de la invención”, que comprende la construcción genética de la invención.

La célula de la invención puede ser cualquier tipo celular susceptible de transformación o transfección con la construcción genética de la invención para la expresión del péptido de la invención. Así, dicha célula puede ser eucariota o procariota, preferiblemente procariota y más preferiblemente *E. coli*.

Todos los polipéptidos o secuencias nucleotídicas descritas pueden usarse bien de forma independiente o bien incluidos en una composición que comprenda otros elementos útiles para el mismo o diferente fin que los polipéptidos o secuencias nucleotídicas de la invención. Por tanto otro aspecto de la invención se refiere a una composición “de ahora en adelante composición de la invención” que comprende un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces. En una realización preferida el número de repeticiones de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 en el polipéptido es de 3. En una realización más preferida el polipéptido consiste en 3 repeticiones de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19. En una realización aun más preferida el polipéptido consiste en 3 repeticiones de SEQ ID NO: 18. En otra realización más preferida el polipéptido comprende solo 3 copias del péptido de secuencia SEQ ID

NO: 18. En una realización aun más preferida el polipéptido es el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 2.

Los polipéptidos también se pueden usar en composiciones que comprenden uno o varios de estos polipéptidos tal y como se demuestra en la presente invención. De esta forma la composición de la invención puede incluir combinaciones de polipéptidos aislados o sintéticos que comprenden SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces. De esta forma la composición induce una mayor respuesta inmunitaria en un individuo en caso de ser administrada que si comprende uno solo de los péptidos. Por ello en una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición comprende:

a) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 17 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces, y

b) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 18 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 18 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces.

En otra realización preferida la composición comprende:

a) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 17 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces, y

b) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 19 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces.

En otra realización preferida la composición comprende:

a) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 18 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 18 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces, y

b) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 19 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces.

En una realización más preferida la composición comprende:

a) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 17 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces,

b) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 18 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 18 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces, y

c) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 19 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces.

Cabe destacar que tal y como se muestra en los ejemplos de la presente invención la combinación de los péptidos T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2) y T16 (SEQ ID NO: 3) es la que mejor efecto tienen en cuanto a la supervivencia y protección frente a *Fasciola hepatica*. Por ello en una realización aun más preferida la composición comprende los polipéptidos de secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3.

En otra realización preferida la composición comprende el péptido que consiste 3 repeticiones de SEQ ID NO: 17, el péptido que consiste 3 repeticiones de SEQ ID NO: 18 y/o el péptido que consiste 3 repeticiones de SEQ ID NO: 19.

Estas composiciones además de uno o varios de los péptidos o polipéptidos de la invención previamente descritos pueden incluir además otros elementos como son por ejemplo, aunque sin limitarse, otros péptidos derivados de organismos del género *Fasciola* y más preferiblemente de *Fasciola hepatica*, adyuvantes, sistemas de liberación, y/o inmunomoduladores de forma que se potencie aun en mayor medida el efecto inmunológico de los polipéptidos.

Se entiende por "péptidos derivados de organismos del género *Fasciola*" en la presente invención cualquier péptido obtenible de un organismo del género *Fasciola* y que produzca una respuesta inmunitaria en el individuo o potencie la respuesta producido por los péptidos de la invención. Estos péptidos pueden potenciar tanto la respuesta por células T como por células B.

En la presente invención se entiende por “individuo” un sujeto que es un mamífero, y que puede ser tanto humano como no humano.

Se entiende por “adyuvante” en la presente invención aquella sustancia que administrada con un antígeno provoca un aumento en la respuesta inmune y por tanto una mejora en la inmunogenicidad del antígeno así como su eficacia. Además los adyuvantes pueden provocar que la respuesta inmunológica se extienda durante más tiempo. Resultan de interés como adyuvantes por ejemplo, aunque sin limitarse, sales minerales, y más concretamente sales de aluminio, adyuvantes tensoactivos, adyuvantes derivados de bacterias, emulsiones, liposomas, microesferas poliméricas, citocinas, carbohidratos, o mezclas de los mismos. En la presente invención resultan de especial relevancia como adyuvantes las saponinas y más concretamente las saponinas de *Quillaja saponaria* (Qs). Estas saponinas se pueden encontrar individualizadas o incluidas dentro de extractos obtenidos de dicho organismo y que incluyan varias de estas saponinas. En la presente invención resulta de especial importancia el adyuvante QS21, el cual es un adyuvante que comprende diversas saponinas de *Quillaja saponaria*. Por todo lo descrito, en una realización preferida la composición de la invención además comprende un adyuvante. En una realización más preferida el adyuvante comprende al menos una saponina de *Quillaja saponaria*. En una realización más preferida el adyuvante es QS21.

Se entiende por “sistemas de liberación” en la presente invención aquellos sistemas que permiten la encapsulación de los péptidos de forma que estos se vayan liberando de forma lenta y prolongada en el tiempo permitiendo de esta forma mantener el efecto durante más tiempo. Existen diferentes sistemas de liberación conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo aquellos basados en la encapsulación mediante sistemas lipídicos (liposomas) o mediante sistemas poliméricos (microesferas o nanoesferas). Dentro de los sistemas poliméricos se encuentran por ejemplo los sistemas naturales como alginato, dextrano, goma arábica o quitosano, los semisintéticos como derivados de celulosa (etilcelulosa, acetobutirato de celulosa o acetoftalato de celulosa) o los sintéticos como son los derivados acrílicos o los poliésteres (policaprolactona, ácido poliláctico o copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico). Dentro de los sistemas lipídicos en la presente invención se pueden encontrar por ejemplo, aunque sin limitarse, aceites tanto minerales como no minerales. Entre estos grupos resulta más interesante el uso de los aceites no minerales ya que permiten la formación de micelas dentro de las cuales se encapsulan los polipéptidos y permiten su liberación lenta y por tanto mantienen su efecto durante mayor tiempo. Ejemplos de aceites no minerales que presentan utilidad son por ejemplo, aunque sin limitarse, Montanide ISA 720 ó Montanide ISA 763A. Por todo ello, en una realización preferida la composición de la invención comprende además un sistema de liberación. En una realización más preferida el sistema de liberación es un aceite no mineral. En una realización aun más preferida el aceite no mineral es Montanide ISA 763A.

Se entiende por “inmunomodulador” en la presente invención aquellos compuestos o elementos que permiten modular la respuesta inmune en función de los requerimientos de cada caso. De esta forma existen compuestos que pueden activar esta respuesta inmune mientras que otros la reducen o la suprimen. Estos inmunomoduladores pueden actuar a diferentes niveles dentro del sistema inmune de forma que se pueden inhibir o intensificar poblaciones o subpoblaciones de células, modular la respuesta inmune o dirigirla a un tipo celular concreto, o provocar la modulación de la producción de mediadores solubles. Los inmunomoduladores pueden ser de acción inespecífica los cuales estimulan o suprimen la respuesta inmune, sin que la actividad de las células estimuladas vaya dirigida hacia un antígeno determinado, o específicos los cuales ejercen su acción sobre células del sistema inmune en presencia de un antígeno o inmunógeno lo que provoca una especificidad selectiva en la acción de las células para producir una respuesta inmune. La inmunomodulación es selectiva cuando hay estimulación y su resultado significa una inmunorreacción hacia un antígeno o varios. Los inmunomoduladores pueden ser por ejemplo, aunque sin limitarse, bacilo de Calmette-Guering, levamisol, dipéptido murámico, glucanos (hongos), polisacáridos de algas, hormonas tóxicas,

proteínas del complemento (globulinas), citocinas como por ejemplo Interleucina 1(IL-1), Interferón gamma (IFN- γ), Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 5 (IL-5), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 18 (IL-18), Factor de transferencia y factor de crecimiento y diferenciación granulocito-macrófago (GM-CSF), Interleucina 12 (IL-12), lectinas, concanavalina A, fitohemaglutininas (PHA), lipopolisacáridos bacterianos (LPS), ciclosporina, metotrexato, ciclofosfamida, azatriopina, o corticosteroides. En la presente invención resultan de especial relevancia los inmunomoduladores tanto de síntesis química derivados de diaminas o aminoalcoholes como son por ejemplo aunque sin limitarse los inmunomoduladores, OA0004, AA0029 y AA2829, como el inmunomodulador natural PAL el cual es un extracto acuoso del helecho *Polypodium leucotomos* (PAL). Por todo ello, en otra realización preferida la composición de la invención comprende un inmunomodulador. En una realización más preferida el inmunomodulador es OA0004, AA0029, AA2829 o PAL. En una realización aun más preferida el inmunomodulador es AA0029.

La composición de la invención puede comprender además de los polipéptidos descritos previamente, otros péptidos o polipéptidos derivados de organismos del género *Fasciola* y preferiblemente de la especie *Fasciola hepatica*. Tal y como se demuestra en los ejemplos de la invención las composiciones pueden comprender otros polipéptidos que comprendan al menos 3 copias, y preferiblemente solo 3 copias de péptidos derivados de proteínas de *Fasciola hepatica*. Por tanto en otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención puede comprender además al menos otro péptido derivado de proteínas de *Fasciola hepatica*. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención puede comprender además al menos otro polipéptido que comprende al menos 3 copias de un péptido derivado de proteínas de *Fasciola hepatica*. Dentro de los péptidos derivados de proteínas de *Fasciola hepatica*, resultan de especial interés los incluidos y utilizados en los ejemplos de la presente invención. Por ello, en una realización más preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención comprende además al menos otro polipéptido que comprende al menos 3 copias y preferiblemente solo 3 copias del péptido derivado de proteínas de *Fasciola hepatica* el cual se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27. En una realización aun más preferida la composición comprende al menos un polipéptido seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48.

Los polipéptidos o composiciones de la invención tal y como se demuestra en los ejemplos, al ser inoculados en un organismo dan lugar a una respuesta inmunológica en el mismo, mediante la cual se producen anticuerpos que reconocen los polipéptidos. Debido a la composición de los polipéptidos que incluyen varias copias de un único péptido, algunos de los anticuerpos producidos son capaces de reconocer no sólo el polipéptido sino también el péptido repetido en el polipéptido. Por tanto otro aspecto de la invención se refiere a los anticuerpos producidos por la inmunización de un animal con cualquiera de los polipéptidos o composiciones de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el animal inmunizado es un mamífero.

El término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulinas o a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con los péptidos o polipéptidos de la invención. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂, los cuales pueden ser generados, por ejemplo, aunque sin limitarnos, tratando el anticuerpo con una enzima tal como pepsina o mediante técnicas de ingeniería genética conocidas en el estado de la técnica.

El anticuerpo de la invención puede ser policlonal (incluye típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítomos distintos) o monoclonal (dirigido contra un único determinante en el antígeno). La expresión “anticuerpo monoclonal” alude a una población de moléculas de anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de fijación de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítomo particular del antígeno. El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento del péptido de la invención, y estando sustituidas por otras que producen en el anticuerpo propiedades ventajosas adicionales.

El anticuerpo de la invención también puede ser recombinante, quimérico, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora transformada o transfectada con la secuencia nucleotídica de la invención, con un ácido nucleico codificante para el anticuerpo de la invención, o que produce el anticuerpo de la invención o el péptido de la invención como resultado de la recombinación homóloga. Dicha célula hospedadora incluye una célula en un cultivo celular “*in vitro*” así como una célula en un animal hospedador.

El anticuerpo de la invención también puede ser quimérico. Así, una región de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie determinada o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos determinados, mientras que la(s) cadena(s) restante(s) es(son) idéntica(s), u homóloga(s), a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, de manera que exhiban la actividad biológica deseada. La expresión “anticuerpo frente al péptido de la invención” se refiere a que el anticuerpo de la invención reconoce el polipéptido de la invención.

Uno de los métodos mediante el que se pueden obtener los anticuerpos de la invención consiste, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en la inmunización de animales con un polipéptido o composición de la invención y la posterior purificación de los anticuerpos específicos para los péptidos o polipéptidos presentes en su suero.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de anticuerpos específicos frente a los péptidos o polipéptidos de la invención, de ahora en adelante “primer método de la invención”, que comprende:

- a. Obtener el suero previamente extraído de un animal inmunizado con un polipéptido o composición de la invención, y
- b. Purificar los anticuerpos frente al polipéptido usado para inmunizar en el paso (a) presentes en el suero obtenido en la etapa (a).

De forma preferible, el animal al que se refiere la etapa (a) del primer método de la invención puede ser, un mamífero, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, conejo, roedores como el ratón o rata, cerdo, caballo, oveja o cabra.

El protocolo de inmunización se puede realizar por métodos convencionales, es decir, administrando al animal a inmunizar una única dosis o varias dosis. Otro protocolo de inmunización puede ser el descrito en los ejemplos de la presente invención. Las inmunizaciones se pueden llevar a cabo con cualquiera de los polipéptidos o composiciones de la invención.

Las inmunizaciones se pueden llevar a cabo por vía oral o parenteral. Ejemplos de vía parenteral son, aunque sin limitarnos, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Preferiblemente, el protocolo de inmunización es el que se describe en los ejemplos de la presente invención y puede ser llevado a cabo por un técnico sin formación médica específica.

Una vez producida la inmunización, se extrae el suero del animal inmunizado con el polipéptido o composición de la invención. Se entiende por “suero”, “suero sanguíneo” o “suero hemático” el

componente de la sangre resultante tras permitir la coagulación de ésta y eliminar el coágulo de fibrina y otros componentes, que contiene numerosos efectores biológicos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, segregados por los elementos formes al suceder dicha coagulación. Es de un color amarillo, un poco más intenso que el plasma.

Posteriormente, se purifican los anticuerpos específicos frente al polipéptido de interés presentes en el suero obtenido en la etapa (a) del método de la invención. Son conocidos en el estado de la técnica diversos métodos de purificación de anticuerpos que podrían llevarse a cabo en la etapa (b) del primer método de la invención, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, métodos electroforéticos o cromatográficos.

La “electroforesis” es una técnica analítica de separación basada en el movimiento o la migración de macro-moléculas disueltas en un medio (*buffer* de electroforesis), mediante una matriz o un sólido apoyo como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula depende de su movilidad electroforética y esta movilidad depende de la carga, tamaño y forma. Existen numerosas variaciones de esta técnica basadas en el equipamiento usado, soportes y condiciones para llevar a cabo la separación de las moléculas. La electroforesis se selecciona de la lista que consiste en, pero sin limitarse, electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque o electroforesis bidimensional.

Los “métodos cromatográficos” permiten la separación de las moléculas por, aunque sin limitarse, su carga, tamaño, masa molecular, mediante su polaridad o mediante su potencial redox. La técnica de cromatografía se selecciona de entre, pero sin limitarse, cromatografía de partición, filtración, cromatografía de adsorción, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica o cromatografía de afinidad, y pueden realizarse tanto en columna, como en papel o en placa.

Otro aspecto de la invención se refiere al suero que comprende anticuerpos específicos frente a cualquiera de los péptidos o polipéptidos de la presente invención. Este suero también se denominará “suero de la invención”. Dicho suero comprende uno o más anticuerpos frente al polipéptido de la invención.

Como se demuestra en la invención los péptidos o composiciones de la invención presentan utilidad al ser inoculados en un organismo para producir una respuesta inmune específica en el organismo, de forma que se protege al organismo de las infecciones por *Fasciola* y más concretamente por *Fasciola hepatica* al reducir el daño producido por este parásito. Además se evita la muerte de los organismos infectados ya que se reduce la cantidad de vermes presentes. Esta respuesta inmune es la encargada de producir una protección frente a parásitos del género *Fasciola* y especialmente de la especie *Fasciola hepatica*. Como se observa en los ejemplos resulta de especial relevancia la combinación de los polipéptidos de secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 en combinación ya que son los que provocan en el individuo posteriormente infectado por *Fasciola hepatica* una mayor supervivencia, un bajo daño hepático y una mayor reducción de vermes. Por todo esto, tanto otro aspecto de la invención se refiere al uso de los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, construcciones genéticas, vectores de expresión, células, composiciones, sueros o anticuerpos de la invención para la elaboración de un medicamento o alternativamente a los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, construcciones genéticas, vectores de expresión, células, composiciones, sueros o anticuerpos de la invención para su uso como medicamento. Una realización preferida se refiere al uso de los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, construcciones genéticas, vectores de expresión, células, composiciones, sueros o anticuerpos de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de infecciones producidos por organismos del género *Fasciola*, preferiblemente de la especie *Fasciola hepatica* o alternativamente a los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, construcciones genéticas, vectores de expresión, células, composiciones, sueros o anticuerpos de la invención para su uso como medicamento para la

prevención o el tratamiento de infecciones producidos por organismos del género *Fasciola*, preferiblemente de la especie *Fasciola hepatica*.

Otra realización preferida se refiere al uso de los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, construcciones genéticas, vectores de expresión, células, composiciones, sueros o anticuerpos de la invención para la elaboración de un medicamento donde el medicamento es una vacuna o alternativamente a los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, construcciones genéticas, vectores de expresión, células, composiciones, sueros o anticuerpos de la invención para su uso como medicamento donde el medicamento es una vacuna.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para tratar a pacientes infectados por el parásito del género *Fasciola*, preferiblemente de *Fasciola hepatica*, el cual comprende la administración de los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, construcciones genéticas, vectores de expresión, células, composiciones o anticuerpos de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1 representa los niveles de anticuerpos IgG totales, determinados mediante ELISA, específicos para cada uno de los péptidos utilizados.

Fig. 2 representa los niveles de IFN- γ en ratones inmunizados con cada uno de los péptidos sintéticos medido mediante citometría de flujo. A: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítomos B; B: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítomos T.

Fig. 3 representa los niveles de IL-4 en ratones inmunizados con cada uno de los péptidos sintéticos medido mediante citometría de flujo. A: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítomos B; B: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítomos T.

Fig. 4 representa los niveles de IL-10 en ratones inmunizados con cada uno de los péptidos sintéticos medido mediante citometría de flujo. A: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítomos B; B: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítomos T.

Fig. 5 representa los niveles de IL-17 en ratones inmunizados con cada uno de los péptidos sintéticos medido mediante citometría de flujo. A: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítomos B; B: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítomos T.

Fig. 6 representa el porcentaje de CD62L en ratones inmunizados con cada uno de los péptidos sintéticos medido mediante citometría de flujo. A: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítomos B; B: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítomos T.

Fig. 7. Análisis macroscópico del hígado de ratones inmunizados e infectados con metacercarias de *Fasciola hepatica*. A: Hígado de un ratón del grupo control sano; B: Hígado de un ratón del grupo de control de la infección; C: Hígado de un ratón inmunizado con la mezcla de péptidos T14 + T15 + T16 e infectado con metacercarias de *Fasciola hepatica*.

Fig. 8 representa los niveles de anticuerpos IgG totales, determinados mediante ELISA, con cada una de las mezclas complejas de antígenos.

EJEMPLOS

Diseño de péptidos:

Debido a que en la actualidad no se encuentra disponible el genoma completo de *F. hepatica*, solamente se encuentra información parcial de secuencias de genes y proteínas en las bases de datos. Todas las secuencias de proteínas disponibles de *F. hepatica* fueron recogidas de la base de datos NCBI. Para seleccionar aquellas proteínas que posiblemente son secretadas, cada secuencia obtenida fue individualmente analizada para detectar la presencia de péptido señal (SP) y la ausencia de dominios de unión transmembrana (TM). El dominio de péptido señal fue identificado mediante el servidor SignalP 3.0 (Bendsten et al., 2004, *J. Mol Biol.*, 4: 783-95) y la predicción del dominio transmembranal mediante el servidor TMHMM2.0. Solamente aquellas proteínas que presentaron péptido señal y ningún dominio de unión transmembranal fueron finalmente seleccionadas y agrupadas en familias comunes.

Péptidos que contienen epítomos B: Para la predicción de epítomos B lineales se utilizaron las herramientas BepiPred (Larsen et al. 2006, *Immunome Res*, 2:2), y Antheprot (Deléage et al. 2001, *Comput Biol Med*, 31:258-267). En el método empleado por BepiPred, a partir de una secuencia de aminoácidos de una proteína en formato FASTA como entrada, cada aminoácido recibe un puntaje basado en algoritmos de Modelos Ocultos de Markov (HMM) y de Redes Neuronales (NN) e incorpora métodos basado en la hidrofobicidad y predicción de estructura secundaria. Los valores obtenidos por este método fueron comparados con aquellos dados por el programa ANTHEPROT 3D el cual se basa en propiedades físicas y químicas de los aminoácidos, tales como antigenicidad, hidrofobicidad, flexibilidad y acceso al solvente. Las secuencias de aminoácidos con los mayores puntajes fueron agrupadas en secuencias de 20 aminoácidos y solamente aquellas regiones que mostraron los mayores puntajes de probabilidad ($\geq 0,5$ de acuerdo al resultado HMM) fueron seleccionadas como epítomos B lineales (Kolaskar A.S. et al. 1990, *FEBS letters*, 276:172-174; Larsen et al. 2006, *Immunome Res*, 2:2).

Péptidos que comprenden epítomos T: Las herramientas de predicción SYFPEITHI (Rammensee et al. 1999, *Immunogenetics*, 50:213-219) e IEDB (Immune Epitope Database) fueron usadas para predecir el anclaje de péptidos derivados de las proteínas seleccionadas al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. La predicción de epítomos T fue realizada empleando como referencia las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II de ratón (H2-IA_d y H2-IE_d). Los péptidos diseñados siguiendo esta metodología corresponden a secuencias de 15 aminoácidos de longitud. Las secuencias de aminoácidos seleccionadas corresponden a aquellas secuencias que presentan los mayores valores "scores", diseñándose dos péptidos por cada secuencia de proteína.

Síntesis de péptidos:

Se utilizó la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida desarrollada por Merrifield (Merrifield 1969, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 32:221-296) y modificada por Houghten (Houghten 1985, *Proc Nat Acad Sci USA*, 82:5131-5135) con algunas modificaciones. En este procedimiento se distinguen cuatro pasos fundamentales:

- i. Acople del primer aminoácido protegido (t-Boc) por el extremo carboxilo terminal a una resina sólida, inerte y estable que va a soportar los polipéptidos sintetizados mediante un enlace covalente tipo éter.
- ii. Desprotección (clivaje del grupo t-Boc) del aminoácido acoplado en el paso anterior, exponiendo así el grupo funcional amino del extremo N-terminal.
- iii. Activación del grupo carboxílico del aminoácido t-Boc que va a ser acoplado.

IV. Acople del aminoácido t-Boc activado en el paso anterior al aminoácido que está unido covalentemente a la resina (formación del enlace amida peptídico).

Estos pasos son repetidos simultáneamente dependiendo del número de aminoácidos que se deseen acoplar a la cadena peptídica. Al final del último acople y desprotección se sigue un procedimiento de clivaje para retirar el polipéptido de la resina, así como para eliminar grupos protectores adicionales que eventualmente pudieran tener algunos aminoácidos que contengan en su estructura grupos funcionales reactivos, por ejemplo, aminoácidos con grupos –OH, - COOH y -SH libres.

Cada vez que se realiza el acople de un aminoácido y la desprotección del mismo, se debe hacer una prueba analítica cualitativa para verificar que estos pasos han sido correctamente desarrollados. La prueba cualitativa empleada se denomina el test de Kaiser (Kaiser *et al.* 1970, *Anal Biochem*, 34;595-598) que detecta la presencia de grupos amino libres en aminas primarias y secundarias. Cuando el test de Kaiser resulta positivo se produce una coloración azul de la resina y es debido a que la unión de un aminoácido a otro ha sido incompleto y se detecta la presencia de grupos amino libres, o bien la desprotección ha sido completa y los grupos amino del último aminoácido acoplado están libres para formar el enlace peptídico con el siguiente aminoácido t-Boc. En caso contrario no se produce dicha coloración azul.

Inicialmente se parte de una resina de MBHA (Hidrocloruro de Metilbenzildrilamina) con una sustitución de 0,50 meq/gramo, la cual se neutraliza con DIEA (N,N – Diisopropiletilamina) al 5% en DCM (Diclorometano), los aminoácidos t-Boc son acoplados utilizando como activadores del grupo alfa carboxílico DCC (diciclohexilcarbodiimida) y HOBt (1-hidroxi-benzotriazol) en DMF (Dimetil-formamida). Para confirmar la unión del aminoácido se realiza el test de Kaiser. Una vez acoplado el aminoácido, el grupo protector t-Boc se remueve con TFA (Ácido trifluoroacético) al 55% en DCM por 25 minutos. Antes del siguiente acople, el péptido-resina se neutraliza con DIEA al 5% en DCM. Al finalizar la síntesis del péptido el clivaje de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el desanclaje del péptido de la resina se hace con las técnicas de clivaje bajo (25% HF) y clivaje alto (100% HF). Finalmente, se añadieron un residuo de glicina y uno de cisteína en los extremos amino y carboxilo-terminal de cada péptido para permitir su polimerización por oxidación (Lioy *et al.* 2001, *Angew Chem Int Ed Engl*, 40;2631-2635), dando como resultado la generación de polipéptidos formados mayoritariamente por trímeros de cada monómero.

Mediante la síntesis de péptidos en fase sólida se sintetizaron los monómeros indicados en la tabla 1 a los que se añadió una glicina y una cisteína en cada uno de los extremos amino y carboxilo terminal. Posteriormente mediante reacción de oxidación se fusionaron 3 monómeros de cada péptido mediante la cisteínas de los extremos para dar los polipéptidos de la tabla 2.

Tabla 1: péptidos sintetizados

Familia	Péptido	Secuencia de aminoácidos del monómero	Peso molecular	Posición
Amebaporo 1	B1	kgagssqdacikfiqyevdg (SEQ ID NO: 4)	2437,1	63-82
Amebaporo 1	B2	kgagssqdatikfiqyevdg (SEQ ID NO: 5)	2435	63-82
Amebaporo 2	B3	fasfdvpskqptididldi (SEQ ID NO: 6)	2545,3	14-33
Amebaporo 2	B4	fasfdvpskqptididldi (SEQ ID NO: 7)	2543,2	14-33
Catepsina B1	B5	iseirdqsststwavssas (SEQ ID NO: 8)	2419,9	79-98
Catepsina B2	B6	gvengvkywlianswnegwg (SEQ ID NO: 9)	2600,3	293-312
Catepsina L1	B7	qtcsplrvnhavlvgygtq (SEQ ID NO: 10)	2435	260-279
Catepsina L1	B8	qttsplrvnhavlvgygtq (SEQ ID NO: 11)	2432,9	260-279
Cistatina 1	B9	yteprsvtpeersvfqpmil (SEQ ID NO: 12)	2700,2	27-46
Cistatina 2	B10	fvplyssksatsvgtptvrs (SEQ ID NO: 13)	2405,1	95-114

Legumaina 2	B11	vttngppngkhndkhtyvec (SEQ ID NO: 14)	2532,2	350-369
Legumaina 2	B12	vttngppngkhndkhtyvet (SEQ ID NO: 15)	2530,1	350-369
Amebaporo	T13	tnlvkrllqnsve (SEQ ID NO: 16)	2032,5	37-51
Amebaporo	T14	dyiidhvdqhatei (SEQ ID NO: 17)	2103,6	80-94
Catepsina B	T15	drntqrqtrvrsve (SEQ ID NO: 18)	2159,3	46-60
Catepsina B	T16	fymfedflvyksgiy (SEQ ID NO: 19)	2243,1	260-274
Catepsina L	T17	kyltemsrasdilsh (SEQ ID NO: 20)	2071,9	83-97
Catepsina L	T18	isfseqqlvdtsgpw (SEQ ID NO: 21)	2014,3	153-167
Catepsina L	T19	enayeylkhnglete (SEQ ID NO: 22)	2130,7	178-192
Citocromo oxidasa	T20	ldpyfnlvpevyny (SEQ ID NO: 23)	2153,7	27-41
Citocromo oxidasa	T21	dlnlprlnsawll (SEQ ID NO: 24)	2029,9	76-90
Vitelina	T22	faghgkaylhgsfdk (SEQ ID NO: 25)	1955,9	56-70
Vitelina	T23	yekyeddyaretpyd (SEQ ID NO: 26)	2276,7	254-268
NADH	T24	lgigflvevrrgyvr (SEQ ID NO: 27)	2054,9	101-115

Tabla 2: Secuencias de los polipéptidos

Polipéptido	Secuencia
B1	cg kgagssqdacikfiqyevdg gccg kgagssqdacikfiqyevdg gccg kgagssqdacikfiqyevdg gc (SEQ ID NO: 28)
B2	cg kgagssqdatikfiqyevdg gccg kgagssqdatikfiqyevdg gccg kgagssqdatikfiqyevdg gc (SEQ ID NO: 29)
B3	cg fasfdvpskqptididldi gccg fasfdvpskqptididldi gccg fasfdvpskqptididldi gc (SEQ ID NO: 30)
B4	cg fasfdvpskqptididldi gccg fasfdvpskqptididldi gccg fasfdvpskqptididldi gc (SEQ ID NO: 31)
B5	cg iseirdqsststwavssas gccg iseirdqsststwavssas gccg iseirdqsststwavssas gc (SEQ ID NO: 32)
B6	cg gvengkywlianswnegwg gccg gvengkywlianswnegwg gccg gvengkywlianswnegwg gc (SEQ ID NO: 33)
B7	cg qtcspvrnhavlavgygtq gccg qtcspvrnhavlavgygtq gccg qtcspvrnhavlavgygtq gc (SEQ ID NO: 34)
B8	cg qttspvrnhavlavgygtq gccg qttspvrnhavlavgygtq gccg qttspvrnhavlavgygtq gc (SEQ ID NO: 35)
B9	cg yteprsvtpeersvfqpmil gccg yteprsvtpeersvfqpmil gccg yteprsvtpeersvfqpmil gc (SEQ ID NO: 36)
B10	cg fvplyssksatsvgtptrvs gccg fvplyssksatsvgtptrvs gccg fvplyssksatsvgtptrvs gc (SEQ ID NO: 37)
B11	cg vttngppngkhndkhtyvec gccg vttngppngkhndkhtyvec gccg vttngppngkhndkhtyvec gc (SEQ ID NO: 38)
B12	cg vttngppngkhndkhtyvet gccg vttngppngkhndkhtyvet gccg vttngppngkhndkhtyvet gc (SEQ ID NO: 39)
T13	cg tnlvkrllqnsve gccg tnlvkrllqnsve gccg tnlvkrllqnsve gc (SEQ ID NO: 40)
T14	cg dyiidhvdqhatei gccg dyiidhvdqhatei gccg dyiidhvdqhatei gc (SEQ ID NO: 1)
T15	cg drntqrqtrvrsve gccg drntqrqtrvrsve gccg drntqrqtrvrsve gc (SEQ ID NO: 2)
T16	cg fymfedflvyksgiy gccg fymfedflvyksgiy gccg fymfedflvyksgiy gc (SEQ ID NO: 3)
T17	cg kyltemsrasdilsh gccg kyltemsrasdilsh gccg kyltemsrasdilsh gc (SEQ ID NO: 41)
T18	cg isfseqqlvdtsgpw gccg isfseqqlvdtsgpw gccg isfseqqlvdtsgpw gc (SEQ ID NO: 42)
T19	cg enayeylkhnglete gccg enayeylkhnglete gccg enayeylkhnglete gc (SEQ ID NO: 43)
T20	cg ldpyfnlvpevyny gccg ldpyfnlvpevyny gccg ldpyfnlvpevyny gc (SEQ ID NO: 44)
T21	cg dlnlprlnsawll gccg dlnlprlnsawll gccg dlnlprlnsawll gc (SEQ ID NO: 45)
T22	cg faghgkaylhgsfdk gccg faghgkaylhgsfdk gccg faghgkaylhgsfdk gc (SEQ ID NO: 46)
T23	cg yekyeddyaretpyd gccg yekyeddyaretpyd gccg yekyeddyaretpyd gc (SEQ ID NO: 47)
T24	cg lgigflvevrrgyvr gccg lgigflvevrrgyvr gccg lgigflvevrrgyvr gc (SEQ ID NO: 48)

Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de los péptidos sintéticos en macrófagos peritoneales de ratón:

Los péptidos sintetizados se analizaron para determinar su toxicidad con la finalidad de poder descartar aquellos que pudieran generar reacciones no adecuadas en un organismo. Para ello se estableció un cultivo continuo *in vitro* de la línea celular J774.2 derivada de macrófagos peritoneales de ratón. Brevemente, el vial que contenía los macrófagos fue descongelado rápidamente en un baño a 37°C y puesto en un frasco de cultivo de 75 cm² de área superficial junto con 10 mL de medio completo de cultivo (DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM de L-glutamina y penicilina-estreptomina) que se incubó en cámara de 37°C con 5% CO₂ durante 48-72 h. Pasado este tiempo, el sobrenadante de cultivo fue retirado del frasco de cultivo y los macrófagos adheridos

a la superficie fueron retirados añadiendo 5 mL de Versene (Gibco) e incubados durante 10 minutos a 37°C / 5% CO₂. Los macrófagos fueron recuperados por centrifugación a 1.200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y los macrófagos fueron resuspendidos en 10 mL de medio completo de cultivo con el fin de ser cuantificados en cámara de Neubauer. Un millón de macrófagos por cada pocillo fueron puestos en placas de cultivo e incubados durante 2 h a 37°C / 5% CO₂. Posteriormente, todos los péptidos sintéticos fueron añadidos por duplicado en un rango de concentraciones entre 5 y 100 µg/mL por un periodo de 24 h a 37°C y 5% CO₂. Después de este tiempo, el sobrenadante de cultivo fue recuperado y almacenado a -20° C para la posterior cuantificación de la producción de óxido nítrico. Los macrófagos adheridos a la superficie de la placa fueron tratados con el colorante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio) para evaluar la viabilidad celular (Ferrari *et al.* 1990, *J Immunol Methods*, 131; 165-172).

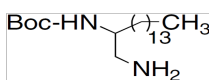
Sistema ADAD de vacunación

Para la inmunización de los ratones con los péptidos sintéticos se utilizó el sistema ADAD de vacunación para potenciar el efecto de los péptidos, el cual presenta la siguiente composición:

- Extracto no-tóxico de *Quillaja saponaria* como adyuvante.
- Inmunodulador de síntesis química AA0029.
- Aceite no-mineral Montanide ISA 763A que forma una emulsión (aceite/agua) (70/30) y permite una liberación lenta del antígeno.

El adyuvante utilizado (*Quillaja saponaria*) está compuesto por 4 fracciones purificadas de un extracto, denominadas: Qs21, Qs18, Qs17y Qs7, las cuales no mostraban actividad hemolítica.

Como inmunomodulador sintético, se empleó la diamina alifática AA0029 de fórmula:



en una dosis de 100 µg / ratón. Este compuesto fue sintetizado siguiendo la metodología descrita por del Olmo (del Olmo *et al.* 2006, *Bioorg Med Chem Lett*, 16;6091-6095). AA0029 inhibe la proliferación de linfocitos en cultivo de esplenocitos en un rango de concentraciones entre 1 y 10 µg / mL, no presenta citotoxicidad (≈ 4%) y aumenta la producción de óxido nítrico (≈ 25%) en macrófagos alveolares de rata pre-estimulados con LPS, por lo cual se sugiere su uso como inmunomodulador.

El protocolo de vacunación con el sistema ADAD consta de dos inyecciones para cada administración: la primera está compuesta por el adyuvante, el inmunomodulador y el aceite no-mineral Montanide ISA 763A formando una emulsión aceite/agua (70/30), administrada por vía subcutánea como un primer paso de adaptación del sistema inmune. Cinco días después de la inyección de adaptación se realiza la primera dosis de inmunización que incluye además de los componentes anteriormente mencionados el antígeno vacunal.

Inmunización de ratones BALB/c con los péptidos sintéticos

Se emplearon para este estudio 84 ratones hembras de la cepa BALB/c de seis semanas de edad procedentes de Charles River Laboratorios España (Griffa, S.A.). Todos los animales fueron tratados de acuerdo a las disposiciones de la Unión Europea, recogidas en el Real Decreto 1201/2005 del 10 de Octubre del Ministerio de Agricultura, Pesca y Ganadería "Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines específicos".

Para los estudios de valoración de la respuesta inmunológica, se inmunizaron grupos de tres ratones cada uno con los diferentes péptidos, empleando el sistema de vacunación ADAD usando el inmunomodulador de síntesis química AA0029.

Se realizaron dos experimentos de inmunización, en los cuales se utilizaron 42 ratones por cada experimento. La distribución de los ratones en los diferentes grupos se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Distribución de los ratones en grupos de inmunización con epítomos de péptidos B y T. Cada grupo consta de tres ratones hembra de la cepa BALB/c.

Experimento 1			Experimento 2		
Grupo	Antígeno	Inmunomodulador	Grupo	Antígeno	Inmunomodulador
1	Sano		1	Sano	
2	Adyuvante	AA0029	2	Adyuvante	AA0029
3	B1	AA0029	3	T13	AA0029
4	B2	AA0029	4	T14	AA0029
5	B3	AA0029	5	T15	AA0029
6	B4	AA0029	6	T16	AA0029
7	B5	AA0029	7	T17	AA0029
8	B6	AA0029	8	T18	AA0029
9	B7	AA0029	9	T19	AA0029
10	B8	AA0029	10	T20	AA0029
11	B9	AA0029	11	T21	AA0029
12	B10	AA0029	12	T22	AA0029
13	B11	AA0029	13	T23	AA0029
14	B12	AA0029	14	T24	AA0029

Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea con 10 µg de cada péptido sintético formulado en el sistema ADAD de vacunación en el día 0. Dos dosis de refuerzo fueron aplicadas con la misma cantidad de antígeno en los días 14 y 28, respectivamente. Se incluyó en este experimento un grupo de ratones como control sano que no fueron inmunizados durante el experimento y un grupo de ratones que solo recibieron los componentes del sistema ADAD. Dos semanas después de la última dosis de inmunización todos los ratones fueron necropsiados a fin de caracterizar la respuesta inmunológica inducida.

Detección de anticuerpos específicos en suero de ratones inmunizados con cada péptido por la técnica de ELISA.

Se emplearon placas de 96 pocillos y cada pocillo fue cargado con 1 µg de cada péptido sintético en un volumen final de 100 µL en tampón carbonato pH 9,6 e incubado durante 1 h a 37°C, 12 h a 37°C y finalmente 1 h más a 37°C. Las placas fueron lavadas tres veces con PBS-0,05% Tween (PBS-T) y bloqueadas con 200 µL por pocillo de una solución de leche descremada al 5% en PBS-T durante 1 h a 37°C. Las placas fueron lavadas nuevamente tres veces con PBS-T. Las muestras de suero obtenidas de cada ratón de cada uno de los dos experimentos de inmunización fueron incubadas en una dilución 1:100 en leche descremada al 5% en PBS-T durante 1 h a 37°C. Posteriormente las placas fueron lavadas como en los pasos anteriores y los anticuerpos secundarios de ratón acoplados a peroxidasa anti-IgG, IgE, IgM, así como de los subtipos IgG1 e IgG2a fueron incubados durante 1 hora a 37°C en una dilución 1:1000 en leche descremada al 5% en PBS-T. Las placas fueron lavadas y reveladas empleando el substrato de la peroxidasa OPD (*o*-fenilendiamina dihidrocloruro) en buffer citrato pH 5,0, la cual da como resultado una coloración amarillo-naranja que se mide a una longitud de onda de 492 nm en un espectrofotómetro Anthos 2010.

Los péptidos que presentaron los mayores títulos de anticuerpos ($p < 0,05$) corresponden a los denominados B1 (SEQ ID NO: 28), B3 (SEQ ID NO: 30), B4 (SEQ ID NO: 31), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33), T13 (SEQ ID NO: 40), T15 (SEQ ID NO: 2), T18 (SEQ ID NO: 42), T20 (SEQ ID NO: 44) y T21 (SEQ ID NO: 45) (Figura 1).

Determinación de citocinas en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos por citometría de flujo.

Todos los ratones utilizados en los experimentos de inmunización fueron necropsiados dos semanas después de la tercera inmunización y los esplenocitos fueron obtenidos siguiendo la metodología descrita por López-Aban (López-Aban *et al.* 2007, *J Parasitol*, 93;428-432) con algunas modificaciones. Brevemente, los bazo de los ratones fueron extraídos y puestos en una caja de Petri que contenía 10 mL de PBS 1X estéril. Los extremos de cada bazo fueron cortados y perfundidos con 10 mL de PBS 1X estéril. Los esplenocitos fueron recuperados por centrifugación a 1.200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente los glóbulos rojos fueron lisados añadiendo 1 mL de solución de lisis que contenía cloruro de amonio (154 mM), bicarbonato de potasio (10 mM) y EDTA (0,082 mM) durante 5 min a 4^o C. El sobrenadante que contiene los glóbulos rojos lisados fue descartado y los esplenocitos fueron recuperados por centrifugación a 1.200 rpm durante 5 min y lavados con 5 mL de PBS 1X – 2% SFB para eliminar restos de la solución de lisis. Finalmente, los esplenocitos fueron resuspendidos en 1 mL de PBS 1X – 2% Suero Fetal Bovino (SFB) y cuantificados en cámara de Neubauer.

Un millón de esplenocitos fueron incubados en placas de cultivo de 6 pocillos en un volumen final de 1 mL de medio completo de cultivo y dejados en cámara de 37^oC /5% CO₂ / 6 h. Pasado este tiempo los esplenocitos de cada ratón fueron reestimulados con 10 µg / mL del péptido con el que fueron inmunizados. El sobrenadante de cultivo fue recuperado a las 72 horas y las citocinas del perfil Th1 (IFN-γ, TNF-α, IL-2), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6), Treg (IL-10), Th 17 (IL17), IL-1α y el factor estimulante de colonias granulocitos / macrófagos (GM-CSF) fueron cuantificadas empleando el kit *FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10plex*, por citometría de flujo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se dispone de unas esferas que están cargadas con anticuerpos específicos que reaccionan con cada citocina que va a ser detectada en este sistema. Las esferas son diferenciadas en citómetro de flujo al tener dos tamaños diferentes (4 µm y 5 µm) y emitir diferentes intensidades de fluorescencia. De esta forma, se pueden distinguir 10 subpoblaciones de esferas diferentes, cada una correspondiente con la citocina que se desea cuantificar. Posteriormente, una mezcla de todas las esferas cargadas con cada anticuerpo para las diferentes citocinas que se van a cuantificar son incubadas con la muestra a analizar, dando como resultado la unión de las citocinas a su anticuerpo correspondiente. Posteriormente se añade una mezcla de anticuerpos secundarios conjugados con biotina, los cuales se unen a las citocinas que previamente se habían unido a las esferas marcadas con anticuerpo primario. Finalmente, el conjugado Streptavidin – Phycoerithrin es adicionado y se une al anticuerpo secundario conjugado con biotina, emitiendo señales fluorescentes que son detectadas en el citómetro de flujo y posteriormente analizadas con el software FlowCytomix Pro de Bender MedSystems. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScalibur de cuatro colores del Servicio de Citometría de Flujo del Centro de Investigación del Cáncer – CIC - de la Universidad de Salamanca. La concentración de cada citocina fue determinada a partir de curvas de calibración usando citocinas recombinantes de ratón de concentración conocida.

Las citocinas más representativas pertenecientes a los perfiles inmunológicos Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-4), Treg (IL-10) y Th17 (IL-17) fueron determinadas en cada grupo de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos y a continuación se describen aquellos péptidos que al inmunizarlos en los ratones produjeron aumentos estadísticamente significativos (p<0,05) comparado con el grupo control.

Los péptidos B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33), T14 (SEQ ID NO: 1) y T15 (SEQ ID NO: 2) produjeron un aumento en los niveles de IL-4 (Figuras 2A y 2B). Como se ilustra en las figuras 3A y 3B, los péptidos B1 (SEQ ID NO: 28), B5 (SEQ ID NO: 32), T15 (SEQ ID NO: 2) y T16 (SEQ ID NO: 3) aumentaron los niveles de IFN-γ y los péptidos B2 (SEQ ID NO: 4), T13 (SEQ ID NO: 40), T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2) y T16 (SEQ ID NO: 3) presentaron altos niveles de IL-10 (Figuras 4A y 4B). Por último, los péptidos B5 (SEQ ID NO: 32) y T16 (SEQ ID NO: 3) mostraron altos niveles de IL-17 (Figuras 5A y 5B).

Determinación de subpoblaciones linfocitarias en esplenocitos tras la inmunización con los péptidos sintéticos por citometría de flujo.

Se emplearon para este estudio los esplenocitos de cada ratón obtenidos en el apartado anterior. A 100 µL de la suspensión de esplenocitos se añadió anticuerpo de bloqueo CD16/CD32 en un volumen final de 25 µL por pocillo y en una dilución de 0.1 µL anticuerpo / muestra en solución de lavado PBS – 2% SFB. Se homogenizó muy bien y se dejó 5 min sobre hielo.

Se hizo la preparación de un MasterMix (mezcla de anticuerpos específicos para cada una de las subpoblaciones linfocitarias a estudiar) añadiendo 0.5 µL de anticuerpo en 25 µL de solución de lavado (PBS 1X - 2% SFB). A cada pocillo de cada serie a determinar se añadieron 25 µL de MasterMix y se dejó incubar durante 30 min a 4º C. Posteriormente, las placas fueron lavadas con 100 µL de solución de lavado, homogenizados, centrifugados a 1.500 rpm y el sobrenadante descartado. Finalmente se añadieron 100 µL por cada pocillo de solución fijadora (2% p-formaldehído en PBS 1X) y los tubos se dejaron en la oscuridad a 4º C hasta la adquisición de datos en el citómetro de flujo. El análisis de los resultados se hizo empleando el software Gatelogic™ Flow Cytometry Analysis Software (Inivai Technologies Pty Ltd). En la tabla 4 se muestran las subpoblaciones linfocitarias estudiadas.

Tabla 4: Subpoblaciones linfocitarias cuantificadas en esplenocitos de ratones inmunizados.

SERIE	ANTICUERPO	FLUOROCROMO
Linfoide	CD45	PerCP-Cy5.5
	CD4	FITC
	CD8	PE
	CD45R/B220	APC
Mieloide	CD45	PerCP-Cy5.5
	CD27	APC
Memoria	CD45	PerCP-Cy5.5
	CD197 (CCR7)	PE
	CD62L	APC

Respecto a las subpoblaciones linfocitarias, un aumento en los niveles de CD62L se observó en el grupo de ratones inmunizados con los péptidos B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33), B7 (SEQ ID NO: 34), B8 (SEQ ID NO: 35), B9 (SEQ ID NO: 36), B10 (SEQ ID NO: 37), B11 (SEQ ID NO: 38), T16 (SEQ ID NO: 3), T17 (SEQ ID NO: 41), T18 (SEQ ID NO: 42), T19 (SEQ ID NO: 43), T22 (SEQ ID NO: 46) y T23 (SEQ ID NO: 47) (Figura 6).

Selección de péptidos para ser utilizados en ensayos de protección frente a la infección por metacercarias de *Fasciola hepatica*.

De los péptidos se seleccionaron varios en función de los siguientes criterios:

- 1) El perfil de respuesta Th1. Se seleccionaron péptidos que aumentaban los niveles de IFN-γ, niveles de IL-2 y/o IL-1α.
- 2) Péptidos que estimulen citocinas del perfil Th2 (IL-4,), Treg (IL-10) y Th17 (IL-17).
- 3) Péptidos que presenten un aumento en los marcadores de células memoria (CD62L, CD197, CD27).

De acuerdo al perfil inmunológico producido tras la inmunización de ratones con los péptidos sintéticos, los péptidos denominados B1 (SEQ ID NO: 28), B2 (SEQ ID NO: 28), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33), T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2) y T16 (SEQ ID NO: 3) fueron seleccionados para realizar los posteriores ensayos de protección *in vivo* en modelo murino frente a la infección experimental con metacercarias de *Fasciola hepatica*.

Estudios de protección en ratones CD1 inmunizados con los péptidos seleccionados e infectados con metacercarias de *Fasciola hepatica*

Animales

Se utilizaron en este estudio 98 ratones hembra de la cepa CD1 (Laboratorios Charles River, Barcelona, España) de seis semanas de edad y con un peso comprendido entre 20 y 35 g. Los animales fueron mantenidos en jaulas plásticas con comida y agua *ad libitum*, periodos controlados de 12 h de luz / oscuridad y una temperatura de 20º C en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

Parásitos

Se utilizaron metacercarias de *Fasciola hepatica* provenientes de Ridgeway Research Ltd (Gloucestershire, United Kingdom) y fueron mantenidas a 4º C en una solución acuosa que contiene 0.4% de carboximetilcelulosa hasta el momento de su uso. La viabilidad de las metacercarias fue confirmada bajo observación microscópica antes de la infección.

Antígenos

Se emplearon en este estudio siete péptidos derivados de proteínas de *F. hepatica* que contienen epítomos B y epítomos T y que fueron seleccionados de acuerdo a la respuesta inmunológica.

Inmunización

Un total de 98 ratones hembras de la cepa CD1 fueron divididos en 14 grupos para ser inmunizados con los diferentes antígenos como se indica en la tabla 5. Siete ratones fueron asignados a cada grupo.

Tabla 5. Distribución de los ratones en grupos de inmunización.

Grupo	Antígeno	* Dosis / Antígeno	Grupo	Antígeno	* Dosis / Antígeno
1	Sin tratamiento		8	B1 (SEQ ID NO: 28), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33)	3,3 µg
2	Control infección		9	B6 (SEQ ID NO: 33), T14 (SEQ ID NO: 1)	5 µg
3	Control adyuvante		10	T14 (SEQ ID NO: 1)	10 µg
4	B1 (SEQ ID NO: 28)	10 µg	11	T15 (SEQ ID NO: 2)	10 µg
5	B2 (SEQ ID NO: 29)	10 µg	12	T16 (SEQ ID NO: 3)	10 µg
6	B5 (SEQ ID NO: 32)	10 µg	13	T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2), T16 (SEQ ID NO: 3)	3,3 µg
7	B6 (SEQ ID NO: 33)	10 µg	14	B1 (SEQ ID NO: 28), B2 (SEQ ID NO: 29), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33), T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2), T16 (SEQ ID NO: 3)	1,4 µg

* Dosis individual de cada antígeno.

Las dosis de los demás componentes del sistema ADAD de vacunación fueron las siguientes: 100 µg del inmunomodulador de síntesis química AA0029 y 20 µg de Qs 21. Los ratones fueron inmunizados en el día 0 y dos dosis adicionales fueron administradas en los días 14 y 28, respectivamente. Se tomaron muestras de sangre antes de cada inmunización, en el momento de la infección y 21 días después de la infección experimental.

Infección y evaluación de la protección

Dos semanas después de la última inmunización, todos los ratones incluidos en este estudio, (excepto el grupo de control sano), fueron infectados por vía oral con siete metacercarias de *F. hepatica*. Todos los ratones del grupo de infección murieron entre los días 24 y 34 después de la infección. Los ratones supervivientes fueron necropsiados para realizar la recuperación de los vermes y la valoración de lesiones hepáticas en el día 42 después de la infección.

En el hígado de cada ratón se evaluaron cambios de color, tamaño, consistencia, cicatrices y conductos biliares. La intensidad de los cambios o de las lesiones se cuantificaron de acuerdo a los siguientes criterios: 0 puntos si no había lesiones, 1 punto si una porción de un lóbulo hepático presentaba lesiones, 2 puntos si un lóbulo entero presentaba lesiones y 3 puntos si más de un lóbulo estaba afectado. Cuando la suma fue de 0 puntos, se asignó "Sin lesiones", entre 1-5 puntos "daño leve" (+), entre 6-10 puntos "daño moderado" (++) y entre 11-14 puntos "daño grave" (+++).

La protección de los ratones frente a la infección causada por *F. hepatica* fue evaluada de acuerdo al porcentaje de supervivencia de los ratones en cada grupo de inmunización, calculado como la relación entre el número de ratones supervivientes después del día 34 y el número de ratones pertenecientes a cada grupo. La puntuación total de las lesiones hepáticas y el porcentaje de reducción de vermes también se consideraron como indicadores de protección.

Determinación de anticuerpos.

Los niveles de IgG totales, IgG1 e IgG2a fueron detectados por la técnica de ELISA en suero de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos y en suero de ratones infectados con metacercarias de *F. hepatica*. Brevemente, placas de 96 pocillos fueron sensibilizados con 1 µg de cada péptido o la mezcla de ellos en buffer carbonato pH 9,6 e incubados durante 12h a 4°C. Las placas fueron lavadas con PBS-T y posteriormente bloqueadas con 200 µL por pozo de una solución de leche descremada al 5% p/V en PBS 1X durante 1h a 37°C. Después de lavar las placas nuevamente se adicionó el suero de los ratones incluidos en este estudio en una dilución 1:100 en solución de bloqueo y se incubó durante 1h a 37°C. Posteriormente, se lavaron las placas como en el paso anterior y se añadieron 100 µL/pozo de anticuerpo secundario IgG anti-ratón generado en cabra y acoplado a peroxidasa en una dilución 1:1000 y se dejó incubar durante 1h a 37°C. Después de lavar las placas, se adicionaron 100 µL de solución de revelado (2,59 mM orto-fenilendiamina + 17,05 mM H₂O₂ en buffer de citrato pH 5,0) a cada pozo y se deja en la oscuridad por un periodo de 10 minutos. Finalmente se adicionan 50 µL de ácido sulfúrico 3N para detener la reacción colorimétrica y se lee la absorbancia de la placa a 492 nm en el lector de ELISA EAR400FT (STL Lab Instruments, Groding, Austria).

Resultados

La inmunización de los ratones con los péptidos sintéticos produjo un aumento en la supervivencia de estos, así como una reducción tanto en el daño hepático como en el número de vermes recuperado. Estos datos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Valoración de la protección frente a la infección experimental con metacercarias de *Fasciola hepatica* en ratones inmunizados con péptidos sintéticos.

Antígeno	Supervivencia (%)	Puntuación daño hepático	Reducción de vermes (%)
Control sano	100	0,0	
Control infección	0	12,0	
Control adyuvante	33	8,0	50,0
Péptido B1 (SEQ ID NO: 28)	50	9,3	50,0
Péptido B2 (SEQ ID NO: 29)	67	6,0	58,3
Péptido B5 (SEQ ID NO: 32)	60	7,8	60,0
Péptido B6 (SEQ ID NO: 33)	60	6,4	50,0
Péptidos B6 (SEQ ID NO: 33)+T14 (SEQ ID NO: 1)	50	10,0	58,3
Péptidos B1 (SEQ ID NO: 28)+B5 (SEQ ID NO: 32)+B6 (SEQ ID NO: 33)	50	8,7	41,7
Péptido T14 (SEQ ID NO: 1)	40	6,8	50,0
Péptido T15 (SEQ ID NO: 2)	67	8,8	58,3
Péptido T16 (SEQ ID NO: 3)	43	10,7	57,1
Péptidos T14 (SEQ ID NO: 1)+T15 (SEQ ID NO: 2)+T16 (SEQ ID NO: 3)	80	6,2	60,0
Péptidos B1 (SEQ ID NO: 28), B2 (SEQ ID NO: 29), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33), T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2), T16 (SEQ ID NO: 3)	57	6,3	57,1

Los resultados demuestran el enorme potencial de la mezcla de péptidos T14 (SEQ ID NO: 1)+T15 (SEQ ID NO: 2)+T16 (SEQ ID NO: 3) como candidatos a vacuna contra la infección causada por *F. hepatica*, ya que el grupo de ratones inmunizados con esta mezcla de péptidos presentaron el mayor porcentaje de supervivencia, así como los menores daños hepáticos y recuperación de vermes comparado con el grupo de infección.

Se evidencia el efecto sinérgico que posee esta mezcla de péptidos, ya que aumenta la protección de los grupos de ratones inmunizados con los péptidos individuales. El análisis macroscópico del hígado de los ratones inmunizados con esta mezcla de péptidos (T14 (SEQ ID NO: 1)+T15 (SEQ ID NO: 2)+T16 (SEQ ID NO: 3)) evidenció que las lesiones hepáticas son mínimas comparado con el grupo de infección (Figura 7). Este efecto sinérgico además no se produce cuando se utilizan otras mezclas de antígenos diferentes como se evidencia en la tabla 6 con la mezcla de los péptidos B (B1 (SEQ ID NO: 28), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33)), o péptidos B y T (B1 (SEQ ID NO: 28), B2 (SEQ ID NO: 29), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33), T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2), T16 (SEQ ID NO: 3)). Además este efecto se produce a pesar de que el número de anticuerpos IgG totales producidos por la inmunización con esta mezcla es inferior a la producción de anticuerpos IgG producida por otras mezclas de antígenos (Figura 8).

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 18, donde dicha secuencia se repite al menos 3 veces.
2. Polipéptido según la reivindicación 1 donde el número de repeticiones de SEQ ID NO: 18 es 3.
3. Polipéptido según la reivindicación 2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2.
4. Secuencia nucleotídica que codifica para un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Construcción genética que comprende la secuencia nucleotídica según la reivindicación 4.

6. Construcción genética según la reivindicación 5 que es un vector de expresión.
7. Célula que comprende una secuencia nucleotídica según la reivindicación 4 o una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6.
8. Composición que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
9. Composición según la reivindicación 8 que además comprende un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 17 donde SEQ ID NO: 17 se repite al menos 3 veces o un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 19 donde SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces.
10. Composición según la reivindicación 9 que comprende un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 17 donde SEQ ID NO: 17 se repite al menos 3 veces y un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 19 donde SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 donde el número de repeticiones de SEQ ID NO: 17 en el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 17 es 3, y/o el número de repeticiones de SEQ ID NO: 19 en el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 19 es 3.
12. Composición según la reivindicación 11 donde el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 17 es el polipéptido SEQ ID NO: 2 y/o donde el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 19 es el polipéptido SEQ ID NO: 3.
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 que además comprende un inmunomodulador, un aceite no-mineral y/o un adyuvante.
14. Composición según la reivindicación 14 donde el inmunomodulador es AA0029.
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 donde el adyuvante es al menos una saponina de *Quillaja saponaria*.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 donde el adyuvante es Qs21.
17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 donde el aceite no-mineral es Montanide ISA 763A.
18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17 que además comprende otro péptido derivado de *Fasciola hepatica*.
19. Composición según la reivindicación 18 donde el péptido derivado de *Fasciola hepatica* es un polipéptido que comprende al menos tres copias de uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO: 4-16 o SEQ ID NO: 20-27.
20. Composición según la reivindicación 19 donde el polipéptido es uno de los polipéptidos de secuencia SEQ ID NO: 28-48.
21. Anticuerpos aislados producidos tras la inmunización de un mamífero con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 20.
22. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, una secuencia nucleotídica según la reivindicación 4, una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, una célula según la reivindicación 7, una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 20 o un anticuerpo según la reivindicación 21 para la elaboración de un medicamento.
23. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, una secuencia nucleotídica según la reivindicación 4, una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, una célula según la reivindicación 7, una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 20 o un anticuerpo según la reivindicación 21 para la prevención y/o el tratamiento de infecciones producidas por organismos del género *Fasciola*.
24. Uso según la reivindicación 23 donde el organismo del género *Fasciola* es de la especie *Fasciola hepatica*.
25. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 donde el medicamento es una vacuna.

FIGURAS

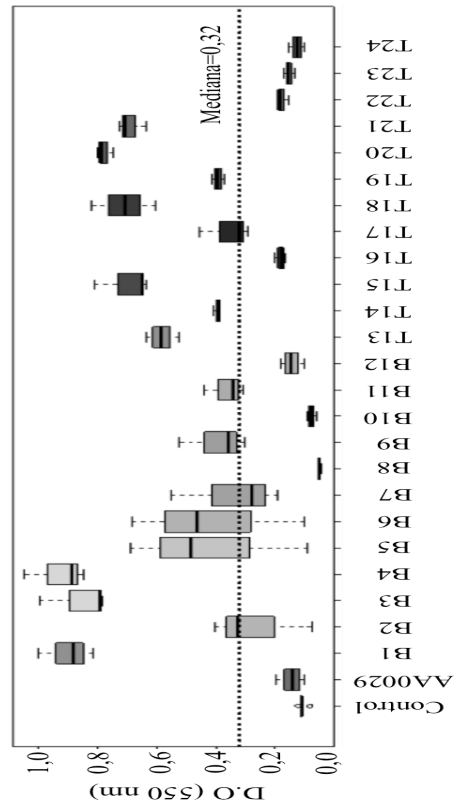


FIG.1

FIG.2A

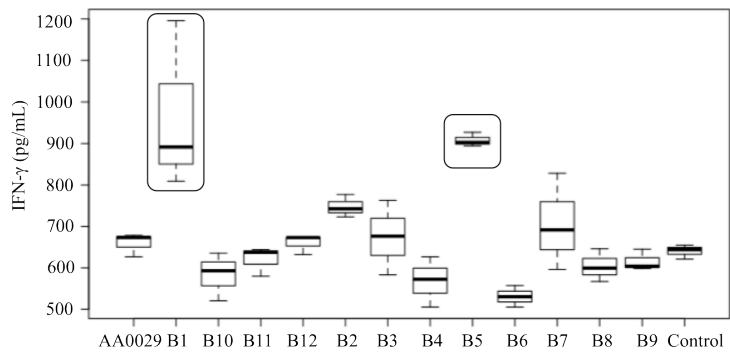


FIG.2B

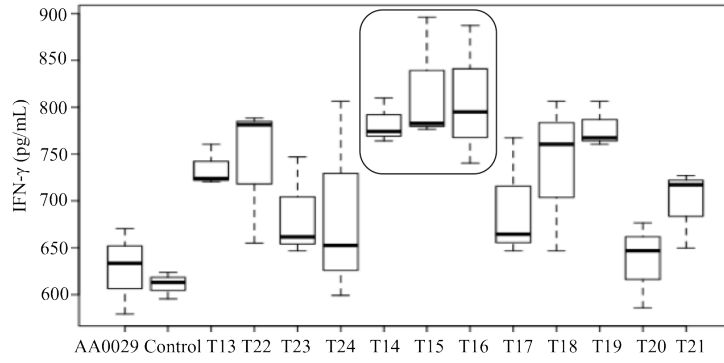


FIG.3A

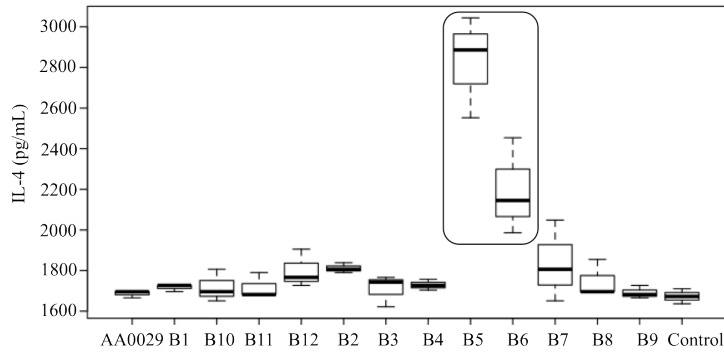


FIG.3B

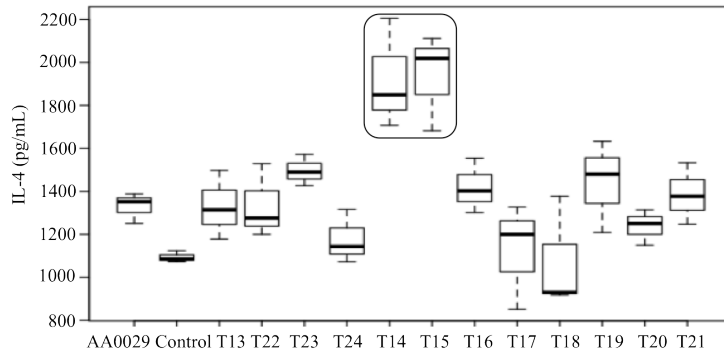


FIG.4A

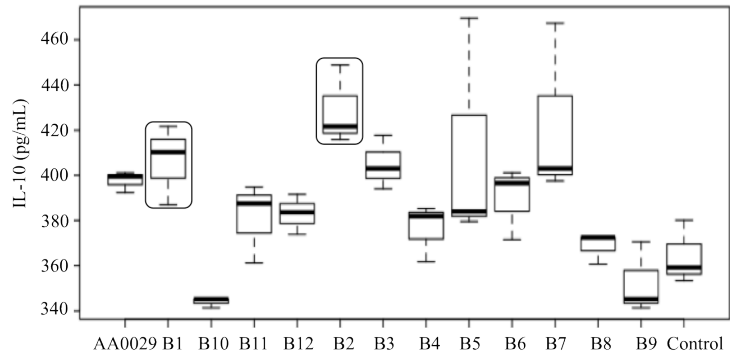


FIG.4B

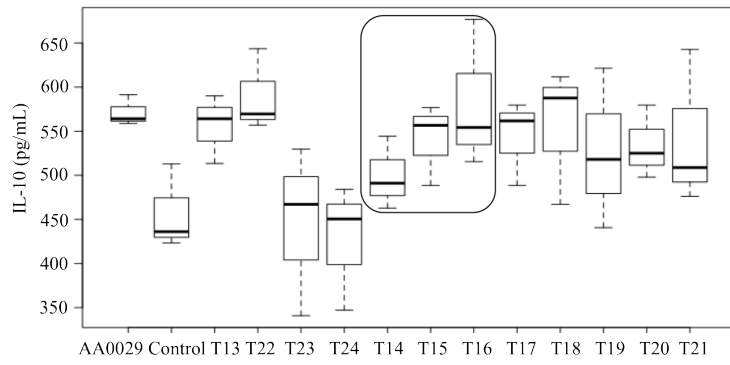


FIG.5A

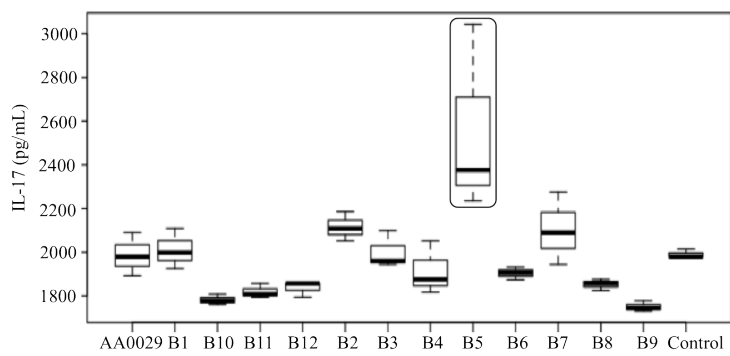


FIG.5B

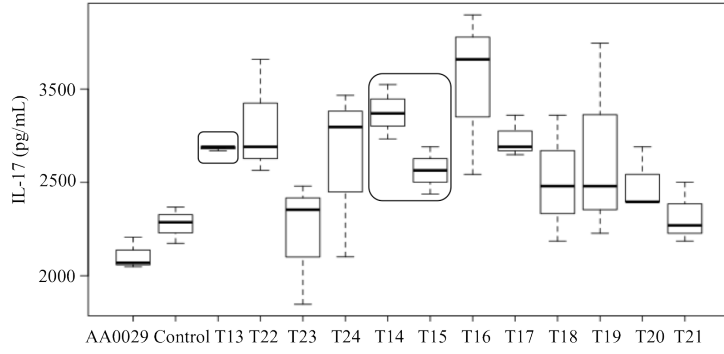


FIG.6A

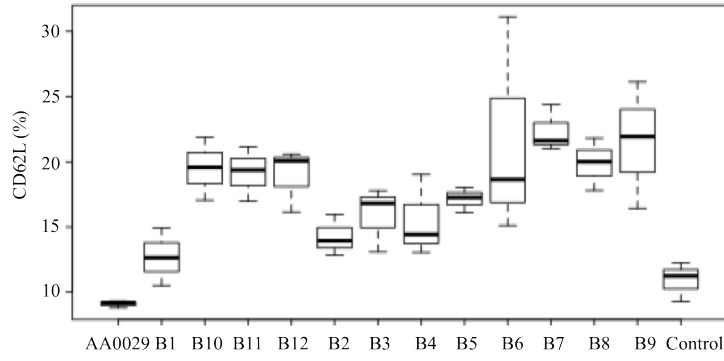


FIG.6B

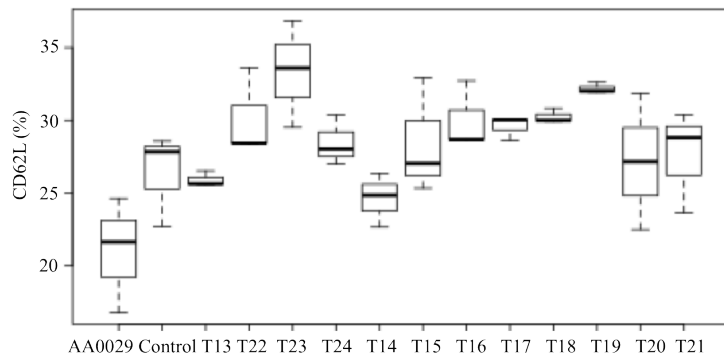


FIG.7

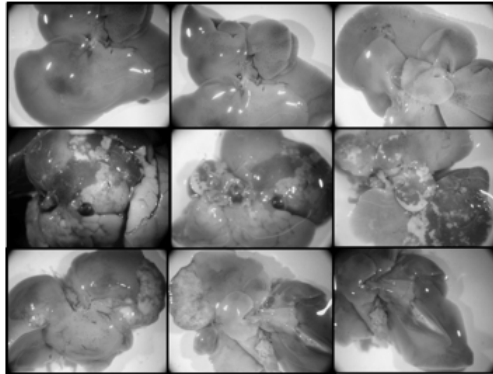
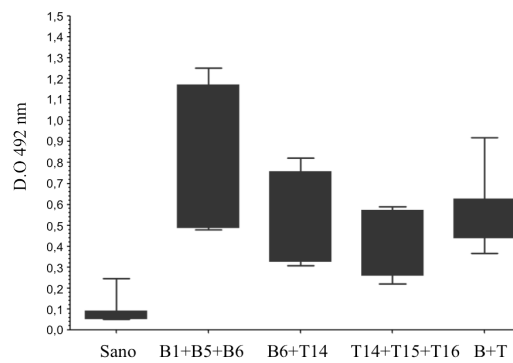


FIG.8



RESUMEN

Péptidos sintéticos derivados de *Fasciola hepatica* y su uso como vacuna

La presente invención se refiere a polipéptidos o secuencias nucleotídicas que los codifican y composiciones que los contienen los cuales resultan útiles para la prevención y o el tratamiento de infecciones producidas por organismos del género *Fasciola* y más concretamente por *Fasciola hepatica*. Estos elementos también resultan útiles para la producción de anticuerpos frente a dichos péptidos. Los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, composiciones, sueros y anticuerpos también resultan útiles para la elaboración de vacunas.

Anexo 11. Presentación de resultados en congresos

1. **VIII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). Murcia, España. Noviembre 6-8 2013.**
Ponencia: ¿Vacunas, genomas y helmintos?
Muro A, Rojas-Caraballo JV, López-Abán J, Pérez del Villar L, Vicente B, Fernández Soto P, Patarroyo MA.
2. **VIII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). Murcia, España. Noviembre 6-8 2013.**
Póster: UNA VACUNA MULTI-EPÍTOPO, BASADA EN SUBUNIDADES PEPTÍDICAS CONFIERE PROTECCIÓN CONTRA *FASCIOLA HEPATICA* EN MODELO MURINO.
José Rojas-Caraballo, Julio López-Abán, Luis Pérez del Villar, Belén Vicente, Pedro Fernández-Soto, Manuel A. Patarroyo, Antonio Muro.
3. **VIII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). Murcia, España. Noviembre 6-8 2013.**
Póster: CANDIDATOS A VACUNA CONTRA *FASCIOLA HEPATICA*: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN MODELO MURINO.
José Rojas-Caraballo, Julio López-Abán, Luis Pérez del Villar, Belén Vicente, Pedro Fernández-Soto, Manuel A. Patarroyo, Antonio Muro.
4. **VIII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). Murcia, España. Noviembre 6-8 2013.**
Póster: PÉPTIDOS SINTÉTICOS CON EPÍTOPOS T FORMULADOS EN SISTEMA ADAD DE VACUNACIÓN PROTEGEN FRENTE A LA FASCIOSIS EN RATAS.
Belén Vicente, Laura Sánchez-Amador, José Rojas-Caraballo, Julio López-Abán, Alejandro Escamilla, Juan Hernández Goenaga, Pedro Fernández-Soto, Manuel Alfonso Patarroyo, Antonio Muro.
5. **VIII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). Murcia, España. Noviembre 6-8 2013.**
Póster: PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN ESPLÉNOCITOS DE RATONES INMUNIZADOS CONTRA *F. HEPATICA* MEDIANTE MICROARRAYS DE AFFYMETRIX
José Rojas-Caraballo, Julio López-Abán, Belén Vicente, Pedro Fernández-Soto, Manuel A. Patarroyo, Ángel Domínguez Olavarri, Antonio Muro.
6. **VIII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). Murcia, España. Noviembre 6-8 2013.**
Póster: APLICACIÓN DE LA TÉCNICA LAMP PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE *SCHISTOSOMA MANSONI* EN MODELO EXPERIMENTAL MURINO.
JAVIER GANDASEGUI, PEDRO FERNÁNDEZ-SOTO, JULIO LÓPEZ-ABÁN, JUAN HERNÁNDEZ GOENAGA, BELÉN VICENTE, JOSÉ ROJAS-CARABALLO, MIGUEL CORDERO, ANTONIO MURO.

7. **XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. Gran Canaria, España. Septiembre 17-20 2013.**
Póster: AVANCES EN EL CONTROL DE LA FASCIOSIS: VACUNAS PEPTÍDICAS COMBINADAS DE SÍNTESIS QUÍMICA.
Muro, A., Rojas-Caraballo, J.V., López-Abán, J., Pérez del Villar, L., Vicente, B., Fernández-Soto, P., Sánchez-Amador, L., Patarroyo, M.A.
8. **XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. Gran Canaria, España. Septiembre 17-20 2013.**
Póster: EXPRESIÓN GÉNICA EN HÍGADO DE RATÓN BALB/C INFECTADO CON FASCIOLA HEPATICA.
Vicente, B, Fernández-Soto, P, Falces, I, Rojas-Caraballo, J.V, Pérez del Villar, L, López-Abán, J, Domínguez, A, Muro A.
9. **XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. Gran Canaria, España. Septiembre 17-20 2013.**
Póster: EXPRESIÓN DE RECEPTORES TIPO-TOLL EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN TRATADOS CON PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE FASCIOLA HEPATICA.
Aguiriano, M., Fernández-Soto, P., Rojas-Caraballo, J.V., López-Abán, J., Vicente, B., Patarroyo, M.A., Muro, A.
10. **7th European Congress on Tropical Medicine and International Health. Barcelona, Espana, October 3 - 6 2011.**
Póster: Cytokine and nitric oxide production induced by synthetic peptides designed by bioinformatical tools as new subunit vaccine candidates against *Fasciola hepatica*.
Jose Rojas-Caraballo, Julio López-Abán, Daniel Hormaechea-Agulla, Pedro Fernández-Soto, Belén Vicente Santiago, Manuel Alfonso Patarroyo and Antonio Muro.
11. **7th European Congress on Tropical Medicine and International Health. October 3 - 6 2011.**
Póster: Effects on memory T cells in BALB/c mice splenocytes immunized with new subunit-based chemically synthesised vaccine candidates against fasciolosis.
Jose Rojas-Caraballo, Julio López-Abán, Pedro Fernández-Soto, Belén Vicente Santiago, Manuel Alfonso Patarroyo and Antonio Muro.
12. **7th European Congress on Tropical Medicine and International Health. October 3 - 6 2011.**
Póster: Differential expression of Toll-like receptors in murine peritoneal macrophages *in vitro* on treatment with synthetic peptides containing B epitopes as vaccine candidates against *Fasciola hepatica*: a practical approach using a touchdown PCR.
Fernández-Soto, Jose Rojas-Caraballo, Rocio Vizcaino-Marin, Julio López-Abán, Belén Vicente Santiago, Manuel Alfonso Patarroyo and Antonio Muro.

- 13. XII Congreso Ibérico de Parasitología. Zaragoza, España, Julio 5 – 8 2011.**
Ponencia: Immunological response in BALB/c mice induced by the recombinant Fh15 FABP protein obtained with baculovirus infected insect larvae for vaccination against *F. hepatica*.
Rojas-Caraballo J, López-Abán J, Fernandez Soto, P, Vicente B and Muro A.
- 14. XII Congreso Ibérico de Parasitología. Zaragoza, España, Julio 5 – 8 2011.**
Ponencia: Immune response in BALB/c mice of peptides derived from *Fasciola hepatica* containing *T* and *B* epitopes designed by bioinformatical tools as vaccine candidates.
Rojas-Caraballo J, López-Abán J, Patarroyo MA, Fernandez Soto, P, Vicente B and Muro A.
- 15. VII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional. Salamanca, España. Marzo 2 – 5 de 2010.**
Ponencia: Aproximación bioinformática para el diseño de péptidos derivados de proteínas de *Fasciola hepatica* candidatos a vacuna.
Jose Rojas-Caraballo, Carolina Vizcaino, Manuel Alfonso Patarroyo y Antonio Muro.
- 16. VII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional. Salamanca, España. Marzo 2 – 5 de 2010.**
Ponencia: Efecto en la producción de óxido nítrico por macrófagos estimulados con péptidos derivados de proteínas de *Fasciola hepatica*.
Jose Rojas-Caraballo, Manuel Alfonso Patarroyo y Antonio Muro.