



Tesis Doctoral Propuesta para Mención Internacional:

“Evaluación de lesiones hepáticas y respuesta inmunitaria local en ovejas vacunadas con CL1 e infectadas con *Fasciola hepatica*”

“Evaluation of hepatic lesions and local immune response in sheep vaccinated with CL1 and infected with *Fasciola hepatica*”

Tesis presentada por **Isabel Lourdes Pacheco Luque**

En el programa de: Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Bajo la dirección del Dr. José Pérez Arévalo

y la codirección de Dr. Rafael Zafra Leva

Córdoba, a 31 de Mayo de 2018

TITULO: *EVALUACIÓN DE LESIONES HEPÁTICAS Y RESPUESTA
INMUNITARIA LOCAL EN OVEJAS VACUNADAS CON CL1 E
INFECTADAS CON FASCIOLA HEPATICA*

AUTOR: *Isabel Lourdes Pacheco Luque*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Evaluación de lesiones hepáticas y respuesta inmunitaria local en ovejas vacunadas con CL1 e infectadas con *Fasciola hepatica*

DOCTORANDO/A: Isabel Lourdes Pacheco Luque

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

En la Tesis Doctoral se ha realizado un estudio de la respuesta inmunitaria en hígado y nódulos linfáticos hepáticos (NLH) en fases tempranas de la infección por *Fasciola hepatica* en ovejas vacunadas con catepsina L1 recombinante de *F. hepatica* y en ovejas no vacunadas e infectadas. Para llevar a cabo el estudio la doctoranda ha trabajado en dos ensayos experimentales en ovinos, en el primero para evaluar la eficacia protectora de la vacuna CL1 recombinante se utilizaron 34 ovejas, y el segundo para evaluar la respuesta inmunitaria en fases tempranas de la infección, tanto en ovejas vacunadas con CL1 como no vacunadas, se usaron 44 ovejas, tanto las vacunadas como no vacunadas e infectadas fueron sacrificadas en grupos de 5 animales a los 1, 3, 9 y 18 dpi, con un grupo de 4 ovejas como control no infectado. Los resultados obtenidos en el estudio de fases tardías CL1 no fueron publicables debido a la ausencia de protección de la vacuna, pero han sido expuestos en el congreso internacional. Respecto a la evaluación de la respuesta inmunitaria en fases tempranas de la infección, tanto en hígado como en NLH se observó un incremento de la ratio IL4/IFN- a los 9 y particularmente a los 18 dpi, lo que indica que durante la migración hepática *F. hepatica* induce una polarización Th2 de la respuesta inmunitaria. Estos resultados han sido publicados en la revista *Veterinary Parasitology*: **Th1/Th2 balance in the liver and hepatic lymph nodes of vaccinated and unvaccinated sheep during acute stages of infection with *Fasciola hepatica***. Pacheco IL, et al. *Vet Parasitol.* 2017 Apr 30;238:61-65.

Recientemente se ha enviado un segundo artículo para publicación en la revista Veterinary Research: ***Fasciola hepatica* induces Foxp3 T cell, proinflammatory and regulatory cytokine overexpression in liver from infected sheep during early stages of infection.** Pacheco IL et al., Vet. Res. (En prensa). Este artículo está en prensa, habiendo contestado ya a las sugerencias de los revisores. En este artículo se ha analizado la expresión génica de citoquinas reguladoras (IL10, TGF- β) y proinflamatorias (IL1, TNF), así como la expresión génica y antigénica de Foxp3 y evaluación de la fibrosis hepática en los mismos grupos. Los resultados indicaron un incremento significativo de la expresión de Foxp3 e IL10 desde los 9 dpi, con correlación entre ambos antígenos, así como incremento y correlación desde los 9 dpi de fibrosis portal y TGF- β .

En un tercer artículo se ha hecho un estudio de numerosos candidatos a genes constitutivos para evaluar los más útiles para estudios de q-PCR en muestras de hígados de ovejas infectadas con *F. hepática*. Este artículo, titulado: **A Comprehensive Approach to identify reference genes for real-time PCR gene expression studies of anti-*Fasciola hepatica* Vaccines Effectiveness in sheep.**, será enviado en las próximas semanas a la revista Plos One para su consideración.

Los resultados de la tesis han sido expuestos por la doctoranda en dos comunicaciones orales con congresos internacionales:

1.- T. regulatory and proinflammatory cytokines expression in sheep vaccinated with cathepsin L1 and challenge with *Fasciola hepática*. Congreso: 3rd joint european congress of the ESVP, ESTP and ECVP. Lyon, Francia, 30/08/2017- 02/09/2017.

2.- Liver changes in sheep vaccinated and non vaccinated with recombinant cathepsin L1 and challenged with *Fasciola hepática*. Congreso: 2nd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP. Berlin, Alemania, 27/08/2014- 30/08/2014.

Así como en dos pósters en congresos nacionales:

1.- Expresión génica de IL4 e INF en hígado y nódulo linfático hepática en ovejas vacunadas con CL1 e infectadas con *Fasciola hepática*. Congreso: XXVIII Reunión SEAPV. Córdoba, España, 08/06/2016- 10/06/2016.

2.- Expresión de IL10TGF y FOXP3 en hígados de ovejas vacunadas con catepsina L1 e infectadas con *Fasciola hepatica*. Congreso: XXIX Reunión de SEAPV. Cáceres, España. 14/06/2017- 16/06/2017.

La doctoranda ha recibido formación en q-PCR durante una estancia de tres meses en el departamento de Parasitología de la Universidad de Gante (Bélgica), bajo la supervisión del Profesor Peter Geldhof.

Por todo ello, los directores consideramos que la tesis reúne los requisitos de calidad suficientes para autorizar su presentación.

Córdoba, 21 de Mayo de 2018

Firma de los directores

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and vertical strokes, appearing somewhat abstract and stylized.

Fdo.: José Pérez Arévalo

A handwritten signature in blue ink, featuring a series of horizontal and diagonal strokes that form a somewhat elongated and scribbled shape.

Fdo.: Rafael Zafra Leva

ÍNDICE

INDICE	vii
Agradecimientos	xiii
Abreviaturas	xxi
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.- IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD	3
2.- EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN	4
3.- DESARROLLO DE RESISTENCIA FRENTE AL PARÁSITO.....	5
4.- CONTROL ACTUAL DE LA ENFERMEDAD	6
5.- DESARROLLO DE VACUNAS.....	6
6.- RESPUESTA DEL HOSPEDADOR ANTE LA ENFERMEDAD	8
7.- CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE qRT-PCR.....	9
8.- OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
1.- ETIOLOGÍA Y PREVALENCIA	15
2.- CICLO BIOLÓGICO	18
3.- PATOGENIA	25
3.1.- Introducción	25
3.2.- Lesiones.....	28
3.2.1.- Fase parenquimatosa	29
3.2.1.1.- Lesiones macroscópicas	29
3.2.1.2.- Lesiones microscópicas	31
3.2.2.- Fase biliar	33
3.2.2.1.- Lesiones macroscópicas	33
3.2.2.2.- Lesiones microscópicas	33
3.2.3.- Lesiones en nódulos linfáticos hepáticos (NLH)...	34

4.- RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A <i>Fasciola hepatica</i> ...	35
4.1.- Respuesta inmunitaria natural	36
4.2.- Respuesta inmunitaria adquirida	41
4.2.1.- Inmunidad celular	41
4.2.2.- Inmunidad humoral	49
5.- EVASIÓN DE <i>F. hepatica</i> DE LA RESPUESTA	
INMUNITARIA.....	51
5.1.- Localización final del parásito	52
5.2.- Glucocáliz	53
5.3.- Evasión de la acción del sistema del complemento.....	54
5.4.- Cambios antigénicos durante la migración	
parasitaria.....	54
5.5.- Capacidad migratoria a través del parénquima	
hepático	55
5.6.- Inmunomodulación de los linfocitos T reguladores	
Foxp3+ (Tregs Foxp3), citoquinas reguladoras y	
diferenciación hacia una respuesta Th2	56
5.7.- Productos de excreción secreción de <i>Fasciola hepatica</i>	
(FhESP): Potentes moléculas inmunomoduladoras.....	60
6.- DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA <i>F. hepatica</i>	62
6.1.- Control actual de la enfermedad	62
6.2.- Aspectos generales en inmunoprofilaxis contra la	
fasciolosis.....	63
6.3.- Formulación de vacunas	65
6.4.- Estrategias vacunales y antígenos candidatos	67
6.4.1.- Vacunas de ácidos nucleicos	67
6.4.2.- Vacunas irradiadas atenuadas	68
6.4.3.- Antígenos definidos.....	69

7.- TÉCNICA DE qRT-PCR Y ESTUDIOS LLEVADOS A CABO	77
7.1.- Generalidades de la técnica	77
7.2.- Estudios actuales realizados con qRT-PCR	81
MATERIAL Y MÉTODOS	85
1.- DISEÑO EXPERIMENTAL	87
1.1.- Estudio parasitológico	89
1.2.- Estudio histopatológico	89
1.2.1.- Estudio macroscópico	89
1.2.2.- Estudio microscópico	90
1.2.2.1.- Material.....	90
1.2.2.2.- Procesado de muestras.....	92
1.3.- Estudio inmunohistoquímico	93
1.3.1.- Materiales	93
1.3.2.- Desarrollo de la técnica inmunohistoquímica.....	97
1.4.- Estudio de qRT-PCR	100
1.4.1.- Materiales para la recogida de muestras.....	100
1.4.2.- Recogida de muestras	100
2.- PARÁMETROS ESTUDIADOS	100
2.1.- Estudio morfométrico macroscópico del hígado	100
2.2.- Estudio histopatológico del hígado	101
3.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	101
4.- EVALUACIÓN DE LA FIBROSIS PERIportal	102
5.- ESTUDIO DE PCR A TIEMPO REAL.....	102
5.1.- Materiales	102
5.2.- Desarrollo de la técnica de qRT-PCR	104
5.2.1.- Extracción de RNA.....	104
5.2.2.- Cuantificación y medición de calidad del RNA y síntesis de cDNA	107

5.2.3.- Diseño de cebadores	108
5.2.4.- Secuenciación	111
5.2.5.- Cálculo de la eficiencia	111
5.2.6.- Cuantificación de transcritos mediante qRT-PCR	113
5.2.7.- Cuantificación relativa de transcritos en qRT-PCR	116
5.2.8.- Análisis de expresión de estabilidad de posibles genes de referencia para ser usados en cuantificación relativa.....	116
5.2.9.- Normalización de los niveles de expresión y determinación de veces de cambio de los genes de interés.....	118
5.2.10.- Cuantificación absoluta de transcritos en qRT-PCR	119
6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	121
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	123
1.- SELECCIÓN DE GENES DE REFERENCIA PARA NORMALIZACIÓN DE ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE qRT-PCR.....	125
1.1.- Extracción de RNA: criterios de calidad.....	125
1.2.- Evaluación de la especificidad de los cebadores	128
1.3.- Genes de referencia: estabilidad y evaluación....	131
1.3.1.- Comparación de la estabilidad de expresión de los genes de referencia candidatos por estadística descriptiva.....	131
1.3.2.- Comparación de las estabilidades de expresión de los genes de referencia candidatos a través de	

algoritmos matemáticos.....	135
1.4.- Variación por pares (Pairwise variation)	137
2.- PROTECCIÓN FRENTE A <i>Fasciola hepatica</i> CON rCL1	139
2.1.- Protección en fases tardías (experiencia 2)	139
2.2.- Estudio patológico del hígado (experiencia 1) ...	140
2.2.1.- Estudio macroscópico del hígado.....	140
2.2.2.- Estudio microscópico del hígado.....	147
2.2.3.- Estudio morfométrico (fibrosis periportal) ..	153
2.3.- Mecanismos de respuesta en fases tempranas (experiencia 1) de la infección	157
2.3.1.- Marcadores Th1/Th2 mediante qRT-PCR	157
2.3.1.1.- Expresión en hígado de IL-4 e IFN- γ	157
2.3.1.2.- Expresión en NLH de IL-4 e IFN- γ	160
2.3.2.- Citoquinas reguladoras en infecciones tempranas por <i>F. hepatica</i>	167
2.3.2.1.- Expresión génica de IL-10/TGF- β en hígado	167
2.3.2.2.- Expresión génica de IL-10/TGF- β en NLH	170
2.3.3.- Expresión de FoxP3 en inmunohistoquímica	175
2.3.3.1.- Expresión de FoxP3 en hígado.....	175
2.3.3.2.- Expresión de FoxP3 en NLH	179
2.3.4.- Expresión de FoxP3 en qRT-PCR.....	183
2.3.4.1.- Expresión de FoxP3 en hígado.....	183
2.3.4.2.- Expresión de FoxP3 en NLH	186
2.3.5.- Citoquinas proinflamatorias en infecciones tempranas por <i>F. hepatica</i>	188
2.3.5.1.- Expresión de IL-1 β y TNF- α en hígado.....	188
2.3.5.2.- Expresión de IL-1 β y TNF- α en NLH.....	191

CONCLUSIONES	197
CONCLUSIONS	203
RESUMEN	209
SUMMARY	215
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	221

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de este trabajo. Quisiera comenzar por las personas más importantes en mi vida y sin las cuales no podría haber llegado hasta aquí tanto por el apoyo económico como por el apoyo sentimental aportado.

A mi Padre porque contigo aprendí que una buena ACTITUD te guía hacia una excelente APTITUD, y durante todo este viaje me recordaste que la primera es la responsable de un buen ambiente en el trabajo, capacidad resolver problemas con rapidez, compromiso y fidelidad hacia el trabajo que desempeñamos. Y la segunda es el éxito de la primera.

A mi Madre por tu paciencia, comprensión y sacarme de los momentos de bajón. Por todo lo que hiciste y lo que serías capaz de hacer si te lo hubiese pedido. Me enseñaste que la humildad está por delante de todo, incluso de nuestros propios intereses y que eso era lo único que necesitaba para admitir mis errores. Me enseñaste a ser inteligente para aprender de ellos y madura para corregirlos.

A mis dos hermanos pequeños Pablo y Carlos, por aguantar a esta hermana loca y sus cambios de humor y enseñarme a compartir.

A mis Abuelas Isabel e Isabel, mi Abuelo Diego y Francisco aunque ya no estéis con nosotros, os dedico estas palabras porque siempre estuvisteis orgullosos de vuestra nieta que como poco ya era veterinaria y llegaría a ser una gran doctora aunque no supierais lo que eso significaba.

A Lara y Gorby por haberme dado y darme tanto cariño y compañía cada día. Con vosotros he aprendido que la lealtad, la

tenacidad y la paciencia si existen, y son unas de las virtudes que dan el éxito a largo plazo.

A todos aquellos Tíos, Primos y familiares que en algún momento me enviaron mensajes de ánimo.

En especial me gustaría mencionar al Dr. José Pérez Arévalo, director de esta investigación y de esta tesis doctoral, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos 6 años. Y por permitir que mi formación haya sido lo más completa posible gracias a la asistencia de cursos y estancias. A la Dra. María José Bautista Pérez, gracias a ti se me abrieron puertas en este departamento y me acogisteis como una más. Me introdujiste en el grupo al que pertenezco y me apoyaste cuando más lo necesitaba. GRACIAS porque sin vosotros no habría sido posible la realización y la defensa de esta tesis doctoral.

Por todos esos momentos vividos tanto en el trabajo como en lo personal, tengo que nombrar a mi codirector, guía y amigo Rafa. Me guiaste e instruiste desde el principio. Me aconsejaste siempre bajo la objetividad. Gracias por esos momentos estadísticos infernales que tan importante son en este trabajo. Gracias por ayudarme a saber sintetizar de forma clara y concisa. Gracias por enseñarme, que en un laboratorio lo importante es la rigurosidad con la que se desempeña el trabajo y no la precipitación. Gracias por enseñarme, todo lo referente al manejo de los animales, siempre intentando causarles el menor daño posible. Gracias por enseñarme, que lo que realmente da frutos es apostar por cosas que proporcionen logros a largo plazo y no a corto plazo, a pesar de lo frustrante que pueda llegar a ser. Gracias por cubrirme las espaldas cuando más lo necesitaba. Gracias por creer en mí y hacerme ver que el éxito consiste en confiar en uno mismo, no depender de nadie y que todo se puede conseguir en esta vida (incluso criar caracoles imposibles). Gracias por

mantenerte siempre optimista, incluso en situaciones que no eran de tu agrado. Gracias porque sin saberlo, me enseñaste que nadie se hace grande haciendo sentir pequeños a los demás, grande son personas como tú, porque consiguen engrandecer a los que tienen alrededor. En general GRACIAS por apostar por este pequeño saltamontes, estar siempre pendiente de él y ayudarlo en todo lo que necesita. Has sido un pilar fundamental en el desarrollo de esta tesis.

A mi querida Nieves, sin ti no podría haber sido posible todo este trabajo biomolecular que tenemos entre manos, así como, la lectura de esta tesis. Salí en busca de ayuda y no sólo la encontré sino que me topé con un ángel. A ti te agradezco que confiaras en mí desde el principio y no tiraras la toalla conmigo a pesar de todo el trabajo que tenías. Me enseñaste que todo se consigue en esta vida, incluso lo más inverosímil. Gracias por acompañarme esos fines de semanas eternos de diluciones en el laboratorio, cuando en realidad no tenías que hacerlo. Gracias por tu optimismo, e inyectarme energía positiva en cada una de nuestras reuniones matutinas. Gracias por ser realista, pero luchadora, no hay que rendirse aunque sepamos que tenemos todas las de perder. Gracias por acogerme como becaria adoptiva. Gracias por enseñarme, que las metas no tienen fecha de caducidad, sólo hay que respirar hondo y volver a intentarlo, aunque a veces haya que cambiar la trayectoria. Me diste fuerzas cuando las había perdido, por eso y mucho más, GRACIAS de todo corazón.

A todos los que han sido y son compañeros de trabajo y profesores, tanto del departamento de Anatomía Patológica: Abelardo, Alejandro, Alfonso, Amador, Aniceto, Antonio, Elena, Fernando, Inma, Irene, Jaime, Joao, José Carlos, Librado, M^a Angeles, Mari, Miguel Angel, Paola, Raquel, Silvia, Tere, Verónica, Yolanda como del departamento de Parasitología, Alvaro, Javi, Leandro, Maribel, Pedro, Rafa, Raúl, Santiago, Sete. Porque todos me habéis aportado algo durante todo este tiempo.

Me gustaría mencionar a ciertas personas del grupo, Dr. Álvaro Martínez-Moreno porque también es director de esta investigación y me ha permitido formar parte del proyecto. Al Dr. Javier Martínez-Moreno, por su inestimable ayuda en todo lo que pudo aportar, sobre todo esas palmaditas de espalda por los pasillos. A Maribel por su apoyo incondicional en todas nuestras experimentales, siempre alegre y con una sonrisa. A Tere, de ti aprendí algo muy importante, no existe nada ni nadie más importante que la integridad mental, cuando haya algo que nos perturbe desconecta, pasa de todo lo tóxico y a disfrutar la vida que son dos días. A Alejandro porque pese a nuestras diferencias, hemos conseguido sacar todo el trabajo adelante junto con el resto del grupo.

Al Dr. Peter Geldhof, por permitir realizar mi estancia junto a su equipo de trabajo en la Facultad Diergeneeskunde de la Universidad de Gante.

Por último, y no menos importante deseo reservar un espacio para esas personas que siempre han estado ahí desinteresadamente, algunos amigos otros también compañeros de trabajo que con el día a día te hacen pasar momentos agradables y te inyectan energía positiva:

A Irene, por escucharme sin juzgarme, no es una tarea fácil, la empatía es algo que te caracteriza. Pese, a todos los duros momentos que has pasado siempre tenías tiempo que dedicarme. Sin ti la pendiente habría sido de 90 grados. Contigo descubrí que es más productivo saber una cosa en profundidad que aprender de mucho y no saber de nada. No te preocupes porque algún día comprenderás que todo lo que Dios permitió en tu vida tuvo un propósito. Sigue luchando porque gracias a ti aprendí que lo que está bien hecho una vez, está hecho para siempre. GRACIAS.

A Cristian y Giuseppe amigos y compañeros de la Universidad de Cajamarca de Perú. Cristian, gracias a ti aprendí

todo lo que necesitaba saber para completar el ciclo de Fasciola, me instruiste de forma desinteresada con tus conocimientos sobre caracoles. Ambos fuisteis y sois muy buenos compañeros y excelentes personas. Guiseppe, sé que me incluyes en todas tus oraciones. GRACIAS.

A Noe, sin ti no habría aprendido lo que no se debe de hacer en un laboratorio de biología molecular, ni como rellenar una placa sin hacer burbujitas. Gracias por nuestros ratos de laboratorio y lo efectivo que puede llegar a ser un buen bote de alcohol a 70 grados. Te agradezco que me acogieras como una más del equipo. Siempre sacaste tiempo para dedicarme. GRACIAS.

A Gema, por ser tan eficiente en tu trabajo, buena persona, resolutiva y humilde. Eres la alegría del departamento, siempre nos dedicas una sonrisa y magdalenas, incluso en tus peores días. No te desanimes, porque de ti he aprendido que la vida hay que tomársela con una sonrisa. GRACIAS.

A Alberto y Leti, no todos tienen las mismas ganas, disposición y energía que vosotros. Siempre estáis dispuestos a echar un cable a cualquiera que os lo pida. Gracias por hacernos el trabajo más fácil. GRACIAS.

A Mari e Inma, por esos momentos de cháchara y palique que son tan necesarios para desobstruirse. Gracias a vosotras he puesto un toque de humor al trabajo, sabiendo que siempre iba a haber alguien con quien reirme de los chistes malos. Mari, gracias por tu paciencia el día que te cambié el nombre y por ser tan eficiente, ojala muchos agilizaran la burocracia tanto como tú. Inma, gracias por tu paciencia durante los días que practicaba contigo artes marciales y también gracias por ser tan eficiente y entregada a tu trabajo, ojalá muchos respondieran tan rápido al telefonillo cuando los necesitas. GRACIAS.

A mis compañeros de piso en Córdoba Juan, Juanma y Tico, por aguantar mis días de negatividad y por acompañarme en muchos momentos de alegría. Si no os hubiese tenido, no habría tenido esos momentos de respiro y desconexión. Ya sea en la Subbética, en los ríos o de gira gastronómica por Córdoba, gracias por acompañarme en todos esos momentos. Juan, gracias por acompañarme en mis locuras impulsivas y no juzgarme por ello, aunque no lo sepas, aprendí de ti a no juzgar tanto sin conocer. Juanma, gracias por aportarme esa faceta tuya tan graciosa y enseñarme que realmente hay gente buena y desinteresada en el mundo. GRACIAS.

A mis compañeros de piso en Valencia Jorge y Edgar, gracias a vosotros he descubierto que no hay regalo más bonito que la vida y que pese a las adversidades todo es superable. Que incluso las situaciones más tristes no deben quitarte la sonrisa y las ganas de vivir. Sois totalmente diferentes en carácter pero ambos me habéis aportado cosas importantes. Jorge, gracias por hacerme ver que hay que luchar por nuestros intereses y a veces no hay que tener miedo a ser rotundo. Edgar, gracias por enseñarme a ver las cosas menos complicadas, contigo todo parece más fácil. GRACIAS.

A Cristi, como olvidarme de tus apoyos incondicionales, invitaciones para instruirme en labores culinarias y métodos de relajación para poder canalizar todo el estrés. Gracias por invitarme a darme un chapuzón cuando más lo necesitaba. Gracias por darme tu punto de vista con objetividad y a enseñarme que ante las injusticias nada se arregla perdiendo los papeles, y aunque no lo sepas gracias a tu autocontrol y tu forma de siempre intentar sacar lo positivo me enseñaste que aunque alguien te regale una caja de oscuridad, con el tiempo te das cuenta de que incluso eso, podía llegar a ser un regalo. GRACIAS.

A todos mis profes del colegio y el instituto, en especial a Carmen y Yolanda, que en paz descanse, a Fernando y Mari Flor,

mis profes de particular. Aunque parezcan lejanos, gracias a ellos fui mejorando como alumna e hicieron que cosas que parecían aburridas fuesen de lo más divertido. Eso de un modo otro hace que al final termines estudiando cosas maravillosas como esta carrera. GRACIAS.

Y porque no, gracias a Mí por ser como soy, ni mucho menos perfecta, pero con la suficiente integridad y persistencia para no haber tirado la toalla a pesar de lo duro que se me ha hecho el camino. GRACIAS.

A todos aquellos, que aunque no haya nombrado me han aportado algo tanto en lo personal como en lo profesional en estos últimos años.

Por último quisiera cerrar este capítulo quedándome con todo lo positivo incluso de lo que a priori sólo parecían obstáculos, porque no hay nada tan malo de lo que no se pueda sacar partido ni algo tan bueno sin contrariedad. Hacer un doctorado me ha hecho ver por un lado que tengo más amigos que enemigos y por otro que lo importante en la vida no es pretender ser más que nadie sino ser alguien y mejor persona, porque todo esto me ha aportado más en lo personal que en lo profesional, y el resultado me ha hecho sentirme más fuerte. Sólo por eso ya ha merecido la pena. Todo ello y junto con las personas que me habéis acompañado me ha hecho ver que por muy largo y duro que haya sido el proceso todo merece la pena, que los errores cometidos siempre son más importantes que los logros adquiridos, y que aunque todo esto nos parezca un mundo, no hay tragedia más grande que el que quiso y no pudo. Por todo eso y mucho más:

GRACIAS DE TODO CORAZÓN

*“Empieza a hacer lo necesario, después lo posible,
y de repente te encontrarás haciendo lo imposible”*

San Francisco de Asis

“Un día comprenderás que todo lo que

Dios permitió en tu vida tuvo un propósito”

Papa Francisco

ABREVIATURAS

ABC: Avidina-Biotina-Peroxidasa
ActB: Actina beta
ADCC: Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos
ATP: Trifosfato de adenosina
B2m: Beta-2 Microglobulina
BME: Beta mercaptoetanol
CD2: Cúmulo de diferenciación 2
CD3: Cúmulo de diferenciación 3
CD4: Cúmulo de diferenciación 4
CD8: Cúmulo de diferenciación 8
CL1: Catepsina L1
Ct: Ciclo umbral
DC: Células dendríticas.
DE: Desviación estándar+
DEPC: Dietil pirocarbonato
DNAc: Acido desoxirribonucleico copia
DNase: Desoxirribonucleasa
dNTP: Desoxirribonucleotidos trifosfato
Dpi: días post-infección
E: Eficiencia de cebadores
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ES: Productos de excreción y secreción

F. gigantea: *Fasciola gigantea*

F. hepatica: *Fasciola hepatica*

FABP: Proteínas de unión de ácidos grasos

FCA: Adyuvante completo de Freund

FDC: Células dentríticas foliculares

FhCL1: catepsina L1 de *F. hepática*

FhESP: productos de excreción-secreción de *F. hepatica*

FhHDM-1: *Fasciola hepatica*- Helminth defence
molecules-1

FhPrx: Peroxirredoxina de *Fasciola hepatica*

FhSAP2: Saposina 2 de *Fasciola hepatica*

FIA: Adyuvante incompleto de Freund

FoxP3: Forkhead box P3

gr.: gramos

Gapdh: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

G6pd: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

GST:Glutation-S-Transferasa

GusB: Glucuronidasa beta

GypC: Glicoforina C

H-E: hematoxilina-eosina

Hsp90AA1: Proteína de choque térmico alpha 90 clase A1

IFN- γ : interferón-gamma

Ig: Inmunoglobulina

IHQ: Inmunohistoquímica

IL-1 β : Interleuquina 1 beta

IL-2: interleuquina 2

IL-3: Interleuquina 3

IL-4: Interleuquina 4

IL-5: Interleuquina 5

IL-6: Interleuquina 6

IL-8: Interleuquina 8

IL-9: Interleuquina 9

IL-10: Interleuquina 10

IL-12: Interleuquina 12

IL-13: Interleuquina 13

IL-17: Interleuquina 17

IL-23; Interleuquina 23

LPS: Lipopolisacáridos

NEJs: formas juveniles recientemente desenquistadas

ml: mililitros

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MIQE: Guía de la información mínima para publicaciones de PCR a tiempo real.

mm: milímetros

M: Molar

NEJs: Larvas juveniles de *Fasciola hepatica* recién desenquistadas.

NK: Natural Killer

NLH: Nódulos linfáticos hepáticos

Pb: pares de bases

PBMCs: Células mononucleares de sangre periféricas

PBS: tampón fosfato salino

PBST: tampón fosfato salino tween

Pgk1: Fosfoglicerato cinasa 1

qRT-PCR: Reacción de la cadena polimerasa a tiempo real

QuilA: Adyuvante de tipo saponinas

rCL1: Catepsina L1 recombinante

RLT: Buffer de lisis

RNA: Acido ribonucleico

RNase: Ribonucleasa

RPLP0: Proteína ribosómica subunidad P0

SdhA: Complejo de succinate deshidrogenasa

Sm14: Antígeno procedente de *Schistosoma mansoni*

Spi: semanas post-infección

SYBR green: Fluorocromo intercalante

Teg: Antígenos tegumentales de *F. hepática*.

TBS: Tampón salino Tris

Tc: linfocitos T citotóxicos

TCBZ: Triclabendazol.

TCR: receptor de linfocitos T

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta

Th: Linfocitos T colaboradores

Th0: Linfocitos colaboradores que aún no han recibido un estímulo para la respuesta

Th1: Respuesta inmunitaria tipo 1

Th2: Respuesta inmunitaria tipo 2

Th17: Respuesta inmunitaria tipo 17

TLR: receptor de tipo Toll

Tm: Temperatura de fusión de oligonucleótidos

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TPx: Tiorredoxina Peroxidasas

Tregs: linfocitos T reguladores

TubB: Beta tubulina clase 1

μ m: Micrometros

INTRODUCCIÓN

Y OBJETIVOS

1.-IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD

La fasciolosis causada por *Fasciola hepatica* constituye una enfermedad parasitaria muy importante dentro del sector ganadero y es responsable de grandes pérdidas económicas en la cabaña de rumiantes en Europa, Las Américas, Australia y Nueva Zelanda. Se trata de una enfermedad cuyas pérdidas económicas anuales a nivel mundial se han estimado en alrededor de 3 mil millones de dólares (Spithill y cols., 1999). La fasciolosis no solo representa un importante problema sin resolver aún en el sector ganadero sino que también supone un importante y creciente problema de salud pública, ya que aparte de afectar a un amplio rango de especies animales, particularmente los rumiantes, el hombre se encuentra entre las especies susceptibles y, por tanto, se trata de una enfermedad que tiene carácter de zoonosis.

La enfermedad ha sido reconocida como una importante zoonosis en Europa, Africa, Asia, América Latina y Oceanía, donde es endémica en especies de animales domésticos (Esteban y cols., 1998c; Mas-Coma y cols., 2005; McManus and Dalton, 2006; Nguyen y cols., 2011). La fasciolosis humana es considerada como una enfermedad parasitaria muy importante, con estimaciones de 2'4 millones a 17 millones de personas infectadas (Hopkins, 1992). El berro silvestre contaminado con metacercarias constituye la principal fuente de infección de humanos en Europa (Ripert y cols., 1987; Rondelaud, 1991; Bourée and Thiebault, 1993) y en otras regiones (Wood y cols., 1975; Bendezú y cols., 1998).

2.-EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN

La distribución del parásito es variable porque deben darse unas condiciones adecuadas de humedad y temperatura tanto para que tengan lugar las distintas fases del desarrollo del parásito, así como condiciones adecuadas para el hospedador intermediario. Estas características originan que este parásito sea enzoótico principalmente en regiones donde la precipitación anual es alta y existen grandes áreas de pastos verdes, pobremente drenados que proporcionan un hábitat adecuado para el caracol que actúa como hospedador intermediario (*Lymnaea truncatula*). De esta forma, aquellas zonas donde exista la presencia de pastos con riego continuo incrementa la distribución y prevalencia de *F. hepatica* (Sanchez-Andrade y cols. 2002). En varios Estados de la Unión Europea, la prevalencia de la fasciolosis en el ganado ha aumentado dramáticamente en los últimos años. De esta forma, Reino Unido ha mostrado una prevalencia de infección que oscila entre el 45-84% (Tandler y Simpson 2008). y por otro lado la prevalencia a nivel de rebaños varía del 7% en Suecia al 97% en las granjas alpinas y del 4% en el sur de Italia al 61,6% en granjas de ovejas en Irlanda (Charlier y cols., 2014; Rinaldi y cols., 2015; Beesley y cols., 2017). Un estudio reciente, evidenció en Irán una prevalencia de *-Fasciola spp.* del 77% en ovejas y del 54% en cabras (Khanjari y cols., 2014). En España la prevalencia de la enfermedad es variable según los diferentes factores que influyen en el ciclo del parásito en las diferentes regiones. La humedad es un factor determinante, por lo que se ha descrito en Galicia una prevalencia del 83% en ovinos (Paz-Silva y cols., 2003), mientras que en áreas más secas como

Andalucía la prevalencia en cabras fue mucho menor, con un valor del 3%(Martínez-Moreno y cols., 1996).

3.-DESARROLLO DE RESISTENCIA FRENTE AL PARÁSITO

Dependiendo de la intensidad de la infección, la dosis infectante y el patrón de reinfección, el proceso patológico puede ser crónico o agudo. Un proceso agudo podría producir la muerte del animal, mientras que uno crónico podría afectar a la producción cárnica, de lácteos y lanar, así como, producir disminuciones en la capacidad reproductiva (Rognlie y cols., 1996; Maqbool y cols., 2000; Schweizer y cols., 2005). Las ratas y el ganado vacuno desarrollan una resistencia parcial a las reinfecciones por *F. hepatica*, sin embargo, las ovejas, los conejos, los ratones y las cabras son muy sensibles (Haroun and Hillyer, 1986; Martínez-Moreno y cols., 1997). Por lo tanto, en muchas especies el parásito tiene mecanismos eficientes de evasión de la respuesta inmune, los cuales incluyen la liberación de factores inmunosupresores que regulan la respuesta de los linfocitos T en ratas (Cervi and Masih, 1997), ovejas (Chauvin y cols., 1995) y cabras (Martínez-Moreno y cols., 1997). De este modo, *F. hepatica* puede provocar una supresión de la respuesta Th1 induciendo una mayor susceptibilidad del hospedador a otras enfermedades como la Salmonelosis (Brady y cols., 1999) y producir interferencias en las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis (Flynn y cols., 2007).

4.-CONTROL ACTUAL DE LA ENFERMEDAD

Actualmente, el control de la fasciolosis en rumiantes se basa en el uso profiláctico/terapéutico de fármacos antihelmínticos, en particular el Triclabendazol, el cual es eficaz tanto en etapas inmaduras como maduras del parásito. El uso de estos antihelmínticos se realiza de forma rutinaria y cíclica en aquellas áreas que son endémicas, debido a que las salidas al pasto de los animales, provocan nuevas reinfecciones. Este hecho junto al uso generalizado de antihelmínticos, ha originado la resistencia al triclabendazol y otros fasciolicidas, constituyendo un problema emergente en muchas áreas de numerosos países (Fairweather, 2009). Además, el uso de antihelmínticos presenta varios problemas. Uno de ellos es el coste del tratamiento continuo, especialmente para los agricultores de áreas endémicas (Overend and Bowen, 1995). A todo esto debe sumarse una mayor conciencia de los consumidores acerca de los residuos de medicamentos en los alimentos y en el medio ambiente (Knox y cols, 2001).

5.-DESARROLLO DE VACUNAS

Por lo tanto, durante los últimos años ha aumentado el interés en el desarrollo de estrategias vacunales para el control inmunoproláctico de fasciolis en rumiantes. El desarrollo de una vacuna viable incluiría protocolos de inmunización con antígenos del parásito capaces de inducir una respuesta inmune efectiva en el hospedador definitivo capaz de destruir al parásito y conferir protección frente a la enfermedad. Varios ensayos de vacunación se han llevado a cabo con diferentes extractos del parásito (Haroun and Hillyer, 1986; Hillyer y cols., 1987) y con antígenos definidos

de *F. hepatica* (Sexton y cols., 1990; Spithill y cols., 1999). Recientemente, se han llevado a cabo ensayos en modelos ovino y caprino utilizando tres tipos de antígenos como candidatos:

Glutation-S-Transferasa (GST): son enzimas detoxificantes con una amplia gama de sustratos químicos.

FABP: Proteínas de unión a ácidos grasos.

Cat-L and TPx: enzimas proteolíticas, tales como la catepsina L1 (CL1) y Tiorredoxina Peroxidasa (TPx).

Utilizando esos antígenos, se ha demostrado una disminución de la carga parasitaria, 43-72% en vacuno y 24-79% en ovino (Hillyer, 2005). Además, la mayoría de los ensayos vacunales mostraron una disminución en la fertilidad del parásito y la viabilidad de los huevos. Otros estudios han demostrado recientemente reducciones notables en la carga parasitaria de ovejas usando Leucina aminopeptidasa (LAP) con diferentes adyuvantes (Maggioli y cols., 2011).

Las proteasas y en concreto las catepsinas han sido postuladas como candidatos prometedores a vacunas frente *F. hepatica* (Dalton y cols., 1996; Piacenza y cols., 1999). Son las principales proteasas encontradas en los productos de excreción-secreción (ES) del parásito (Dalton y cols., 2003b). Durante las etapas migratorias a través del parénquima hepático y las etapas biliares del parásito, la catepsina L1 (CL1) representa el 68% de las catepsinas totales obtenidas de los productos ES. Por lo tanto, la catepsina L1 parece ser importante para la supervivencia del parásito, la digestión tisular, la escisión de la inmunoglobulina G y

la modulación de la respuesta T helper (Th1/Th2) (O'Neill y cols., 2001; Dalton y cols., 2003).

6.-RESPUESTA DEL HOSPEDADOR ANTE LA ENFERMEDAD

Se ha demostrado, tanto en etapas crónicas como agudas de ovejas infectadas con *F. hepatica* una disminución de la expresión de IFN- γ y un aumento de la expresión de IL-4, lo que sugiere una respuesta inmune de tipo Th2 (Mulcahy y cols., 1999; Haçariz y cols., 2009; Pleasance y cols., 2011) aunque algunos estudios mostraron en rumiantes una fase inicial de expresión de IFN- γ (2 semanas) (Clery y cols., 1996; Flynn y Mulcahy 2008; Beesley y cols., 2017). Además, se ha demostrado la importancia de la citoquina reguladora TGF- β en la producción de colágeno para aumentar la resistencia del hospedador frente al parásito (Haçariz y cols., 2009), y la mejora de la expresión de las citoquinas IL-10 y TGF- β inducida por IL-4 (Schmidt-Weber y cols., 1999; Kohyama y cols., 2001).

Por otro lado, los estudios llevados a cabo en ratas y ratones infectados con *T. spiralis* y en terneros infectados con *F. hepatica*, concluyeron que la citoquina IL-10 redujo la expresión de IFN- γ , reflejando una adaptación biológica para limitar los mecanismos de muerte intracelular. También en terneros se concluyó que la citoquina IL-4 aumentó su nivel después de la inhibición de TGF- β sugiriendo que dicha citoquina podría ser responsable de inhibir los mecanismos antiparasitarios dependientes de IL-4 durante la infección aguda (Flynn y cols., 2008; Beiting y cols., 2016). Se ha descubierto a su vez, que una red compleja de células Treguladoras

FoxP3 y combinaciones de citoquinas IL-10 y TGF- β desempeñan un papel en el control de la respuesta inmunitaria del huésped, previniendo la muerte del parásito y la resolución de la infección (Beiting y cols., 2007).

7.-CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE qRT-PCR

La cuantificación de las citoquinas producidas en hospedadores infectados con *F. hepatica* mediante qRT-PCR se ha llevado a cabo en varios estudios. Sin embargo, la mayoría de esos estudios se han realizado en vacas (Waldvogel y cols., 2004; Mendes y cols., 2013), ratas (Tliba y cols., 2002), ratones (Martin y cols., 2016) y conejos (Espino y Rivera., 2010) mientras que los estudios llevados a cabo en ovejas con qRT-PCR son más escasos. El uso de qRT-PCR nos aporta resultados basados en los transcritos y no el producto final (como serían los estudios de proteómica o metabolómica), siendo una buena alternativa, fiable y más económica para llevar a cabo una valoración efectiva.

8.-OBJETIVOS DEL TRABAJO

Dado que la respuesta protectora frente a *F. hepatica* se produce durante las primeras etapas de la infección (Van Milligen y cols., 1999), el objetivo principal de este trabajo fue investigar los mecanismos de la respuesta local del hospedador durante la infección temprana, ya que el parásito, que es inmaduro todavía, migra desde el intestino hacia el hígado, siendo el momento de mayor vulnerabilidad del mismo.

Para llevar a cabo esta valoración de la respuesta inmunitaria del hospedador se plantearon los siguientes objetivos secundarios:

1.- Evaluar mediante qRT-PCR la expresión tanto en hígado como en nódulos linfáticos hepáticos (NLH) de las citoquinas IFN- γ e IL-4 (Th1 y Th2, respectivamente). Así mismo, estudiar la expresión de las citoquinas reguladoras IL-10 y TGF- β , así como el factor de transcripción FoxP3 y las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β .

2.-Evaluar mediante inmunohistoquímica (IHQ) la expresión del factor FoxP3 en ambas localizaciones.

3.- Identificación y selección de genes constitutivos ovinos (hígado y NLH) mediante una comparación entre 10 genes diferentes y obteniendo los más estables para cada caso.

4.-Evaluación (macroscópica y microscópica) de las lesiones hepáticas producidas por el parásito en fases tempranas de la enfermedad.

5.-Estudio de la carga parasitaria en fases crónicas de la enfermedad.

Estos objetivos se plantearon en dos experiencias. La primera de ellas (objetivos 1 al 4) se llevó a cabo en ovejas vacunadas con catepsina L1 recombinante (rCL1) en adyuvante Montanide ISA 70 VG e infectadas con *F. hepatica*. La elección de este adyuvante se debe a los buenos resultados previos en vacunas de *F. hepatica para* ovinos (Haçariz y cols., 2009) y bovinos (Golden y cols., 2010).

La segunda experiencia (objetivo 5) se llevó a cabo en animales con las mismas condiciones de inmunización que en la primera experiencia para hacer el recuento parasitario en fases tardías de la enfermedad.

REVISIÓN

BIBLIOGRÁFICA

1.-ETIOLOGÍA Y PREVALENCIA

Fasciola hepatica es un helminto hermafrodita, clasificado taxonómicamente dentro de la clase Trematoda, phylum Platelminotos, subclase Digenea y familia *Fasciolidae*, que presenta una morfología foliácea y aplanada dorsoventralmente y que mide entre 18 y 51 milímetros de largo entre y 4 y 13 mm de ancho. Presenta dos ventosas muy próximas entre sí, una ventral de mayor tamaño y otra oral, las cuales usa para adherirse a los conductos biliares y poder realizar los movimientos migratorios. Su tegumento lo recubren numerosas espinas que se dirigen caudalmente, cuya función es mantener su posición en el interior de los conductos biliares, así como erosionar su epitelio y el de los vasos sanguíneos (Bennet, 1975). Las formas adultas se localizan en los conductos y vesícula biliar de gran cantidad de especies, aunque se consideran más susceptibles los rumiantes, principalmente los ovinos (Konopka, 1993; Manga y cols., 1990; Mitchell, 1995), los caprinos (Khallaayoune y cols., 1991; Bundy y cols., 1983) y los bovinos (Bouvry y Rau, 1986; Simmank, 1987; González-Lanza y cols., 1989; Genicot y cols., 1991; Poglayen y cols., 1995).

Existen tres grupos de hospedadores definitivos para *F. hepatica* atendiendo a su receptividad. Un primer grupo engloba aquellos hospedadores que reaccionan rápidamente frente al parásito (cerdo, perro y gato) (Cordero y cols., 2010); un segundo que son aquellos que reaccionan con retraso frente al mismo (vaca, caballo y hombre) (Haround y Hillyer, 1986; Morales y cols., 2000; Cordero y cols., 2010) y un tercero que englobaría a los

hospedadores más susceptibles donde existe una alta productividad y patogenicidad del parásito (oveja, cabra y conejo) (Reddington y cols., 1986; Chauvin y cols., 1995; Matinez-Moreno y cols., 1996; Matinez-Moreno y cols., 1997; Matinez-Moreno y cols., 1999 Apt y cols., 1993; Cordero y cols., 2010). En España se ha encontrado *F. hepatica* parasitando ovejas, cabras, vacas, gamos, asnos, caballos, cerdos, jabalíes, conejos, liebres y a la especie humana (Rojo y Ferre, 1999), tratándose de una zoonosis creciente, en la cual se ha estimado entre 2'7 y 17 millones de personas afectadas. La zona de los Andes (Bolivia, Perú y Ecuador) es donde se encuentra la prevalencia más alta de padecer la enfermedad adquiriéndose la infección mediante la ingesta de agua y vegetales contaminados con metacercarias de *F. hepatica*, mientras que en las zonas de Egipto, sureste de Asia e Irán es donde encontramos prevalencias más bajas (Mas Coma y cols., 2005; McManus y Dalton, 2006; Mas Coma y cols. 2009; González y cols., 2011).

La prevalencia de la enfermedad es muy variable en España, dependiendo de la temperatura, la humedad y las precipitaciones (Martínez-Valladares y cols., 2013). El hospedador intermediario *Lymnaea truncatula* presenta una amplia distribución geográfica y requiere de humedad ambiental elevada para su desarrollo y supervivencia (Graczyk y Fried, 1999). Así regiones con temperaturas moderadas y mucha humedad presentan más riesgo de desarrollar la enfermedad ya que influyen de forma positiva en el ciclo biológico del parásito. En Galicia, se describió que la prevalencia en cabras estaba determinada principalmente por la raza y la edad de los animales. Las más mayores presentaban

mayor prevalencia (24'3%) que las jóvenes (9'4%) y la raza autóctona (Cabra Galega) presentó menor prevalencia (13'7%) que la Cross-breed (26'7%) (Pérez-Creo y cols., 2015). Ocurrió lo mismo en vacas siendo la Rubia Gallega la que menos prevalencia presentaba (Sánchez- Andrade y cols., 2002). Por otro lado, la prevalencia de la fasciolosis causada por *F. hepatica* en ovejas fue de un 59'3% en la comunidad de Castilla y León y concretamente de un 60'5% en la provincia de León, la cual es significativamente mayor que la descrita en los años 1992 y 1993 (Ferre y cols., 1995; Martínez-Valladares y cols., 2013). En Europa ha habido un aumento progresivo en la prevalencia de la enfermedad pero con una distribución desigual y con variaciones en la prevalencia según las regiones Las causas de este aumento pueden ser debidas tanto al desarrollo de resistencia frente a los fármacos antihelmínticos (Fairweather, 2011; Dalton y cols., 2013) como a factores climatológicos, aumento de las lluvias, temperatura, evapotranspiración, humedad vegetación y tipo de suelo, todo esto lleva a la aparición de inviernos más cálidos permitiendo así la actividad durante más tiempo del molusco hospedador intermediario (*Lymnaea truncatula*), por el cual el parásito presenta un marcado estenoxenismo (Fox y cols., 2011) y la presencia a su vez del estadio infectante del parásito (metacercaria) (Charlier y cols., 2014a). Así, la prevalencia a nivel de rebaños varía del 7% en Suecia al 97% en las granjas alpinas y del 4% en el sur de Italia al 61'6% en granjas de ovejas en Irlanda (Charlier y cols., 2014; Rinaldi y cols., 2015; Beesley y cols., 2017)

2.- CICLO BIOLÓGICO

Fasciola hepatica es un parásito de ciclo indirecto (**Figura 1**) que necesita un hospedador intermediario para completar el mismo. Estos hospedadores intermediarios son caracoles moluscos del género *Galba* (antiguamente conocidos como *Lymnaea*) (**Figura 2**) los cuales presentan una amplia distribución geográfica y suelen encontrarse en zonas de humedales (**Figura 3**). Dentro de este género *Lymnaea truncatula* se considera como el principal hospedador intermediario. El ciclo biológico de *F. hepatica* completo engloba unas 14 a 23 semanas (Mas Coma y cols., 2003) y consiste en cinco fases que engloban:

- 1.- La eliminación de los huevos sin embrionar al medio con las heces del hospedador definitivo y su posterior desarrollo embrionario.
- 2.- La eclosión de una forma larvaria denominada miracidio y la búsqueda activa de un hospedador intermediario, generalmente el molusco gasterópodo, *Galba truncatula*.
- 3.- Continuación del desarrollo larvario dentro del hospedador intermediario y que incluye multiplicación de los miracidios así como su evolución a esporocistos, redias y finalmente cercarias.
- 4.- La salida de la cercarí del hospedador intermediario y su enquistamiento (metacercaria).
- 5.- La ingestión de las formas infectivas (metacercarias) por parte de los hospedadores definitivos y el desarrollo de las formas adultas.

Los hospedadores definitivos presentan al parásito adulto en los conductos biliares donde eliminan huevos no embrionados, los cuales pasan a duodeno mezclados con la bilis y posteriormente al medio junto con las heces. Un parásito adulto puede eliminar entre tres y cinco mil huevos al día (Graczyk y Fried, 1999; Rojo y Ferre, 1999).

Los huevos presentan morfología oval, color marrón amarillento y unas medidas de entre 130 y 145 μm de largo y entre 70 y 90 μm de ancho y pueden permanecer viables en las heces entre 3 semanas y varios meses, dependiendo de las condiciones ambientales y la época del año, siendo la viabilidad del huevo mayor en invierno que en verano, y decrece conforme aumenta la desecación (Rowcliffe y Ollerenshaw, 1960). Si la temperatura y la humedad son las óptimas (23°C y 26°C) en el interior del huevo se desarrolla una larva móvil que recibe el nombre de miracidio (Ross y Mckay, 1929; Rowcliffe y Ollerenshaw, 1960).

El miracidio, con una longitud de 130 μm , en el plazo de 24 horas debe encontrar un molusco hospedador adecuado (**Figura 4**) ya que tiene reservas de glucógeno limitadas (Wagner, 1965). Una vez encontrado el hospedador intermediario adecuado, los miracidios penetran en el molusco a través de la cavidad pulmonar de éste, gracias al largo proboscis (llamado terebratorium) que le permite introducirse entre las células del epitelio columnar del caracol. Posteriormente pierden los cilios que les dotan de movilidad y entonces se transforman en esporocistos, que son las formas evolutivas que constituyen el primer estadio larvario de *F. hepatica* (Hope Cawdery y cols., 1978; Boch y Supperer, 1986).

Una vez en el hospedador intermediario, el esporocisto crece hasta la siguiente forma evolutiva en el ciclo biológico de *F. hepatica*, la redia, que mide entre 1 y 3 mm de longitud y que ya posee una ventosa y un tubo digestivo primitivo. El cuerpo de la redia contiene numerosas células germinales, que van a originar la siguiente forma larvaria que es la denominada cercaria, con un tamaño de 250 a 350 μm y parecidas morfológicamente a un renacuajo que, una vez que ha madurado, abandona la redia a través del poro obstétrico o tocostoma. Esta cercaria pasará unas horas nadando en el agua, hasta que al final trepa por las plantas, pierde la cola y se enquistada en las hojas, rodeándose de una cubierta resistente, convirtiéndose de este modo en la siguiente forma larvaria, denominada metacercaria y que constituye la forma infectante que afecta a los hospedadores definitivos (Andrews, 1999).

El proceso de enquistamiento, así como la estructura que forma la cubierta del quiste, es bastante complejo, tal y como demuestran los trabajos realizados por Wright (1927), Stirewalt (1963), Dixon y Mercer (1964), Dixon (1965), Koie y cols., (1976) y Smith y Halton (1983). Existen numerosos estudios que afirman que las metacercarias pueden sobrevivir más de un año en los pastos, aunque es muy probable que su poder de infección no dure tanto tiempo (Soulsby, 1965).

La infección de rumiantes suele ocurrir durante el pastoreo, aunque puede también ocurrir en estabulación, a través del agua de bebida o la administración de henos y ensilados mal realizados. Las metacercarias no se implantan en el hígado en su totalidad sino que

se producen pérdidas durante la migración intraorgánica o a través de las heces; por tanto, una vez ingeridas, el porcentaje de implantación hepática de las metacercarias es aproximadamente del 40% (Rojo y Ferre, 1999). Una hora después de la ingestión, las metacercarias comienzan a desenquistarse dentro del intestino, y poco después atraviesan la pared intestinal para acceder a la cavidad peritoneal y migrar hacia el hígado (Andrews, 1999).

El proceso de desenquistamiento tiene lugar en dos fases: la primera o de activación tiene lugar en el rumen y se desencadena por una alta concentración de dióxido de carbono, ambiente reductor y temperatura de 39°C; la segunda o de emergencia ocurre en el intestino delgado, por debajo de la desembocadura del conducto colédoco y es iniciada por la bilis y el propio parásito (Dixon, 1966; Smith y Clegg, 1981; Sukhdeo y Mettrick, 1987).

Una vez situadas en la cavidad peritoneal, las formas juveniles de *F. hepatica* pueden colonizar cualquier tejido cercano, como pueden ser los nódulos linfáticos locales, aunque lo usual es que penetren en el hígado. La predilección por el tejido hepático puede producirse de forma aleatoria o puede deberse a la proximidad anatómica, aunque también se cree que la migración de las formas juveniles hacia el hígado responda a determinados estímulos, aunque estos factores todavía no se conocen con exactitud (Sukhdeo y Mettrick, 1986, 1987). Una vez en el hígado las formas juveniles del parásito atraviesan el parénquima hepático hasta llegar a los conductos biliares donde se alojará el adulto cerrando así el ciclo.

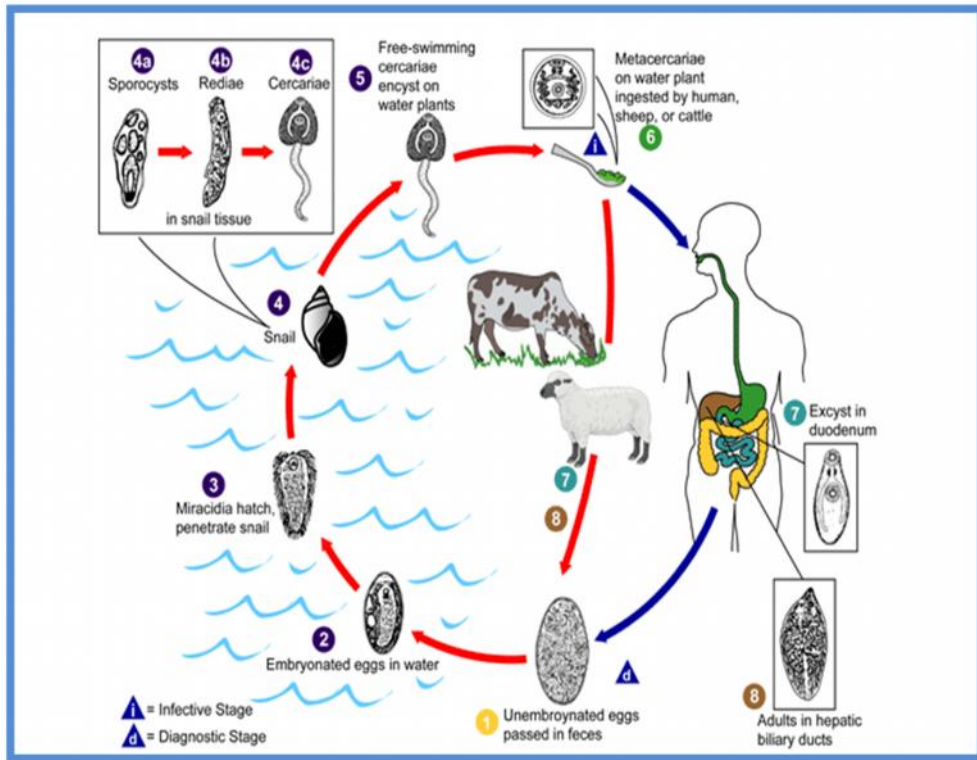


Figura 1.- Imagen tomada de la siguiente dirección:

<http://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.htm>

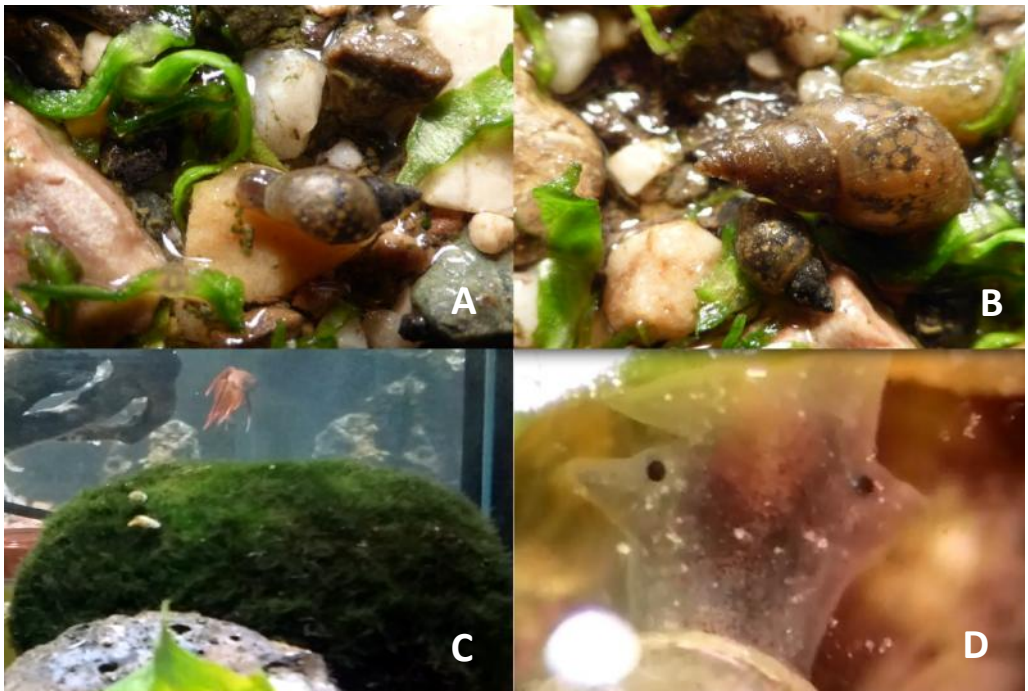


Figura 2.- Imágenes propias tomadas en nuestro laboratorio. **A,B y C.** *Lymnaea*s en diferentes medios de cultivo. **D.** Ampliación del rostro de *Lymnaea*.



Figura 3.- Imagen propia tomada en zona de humedales de la provincia de Cádiz

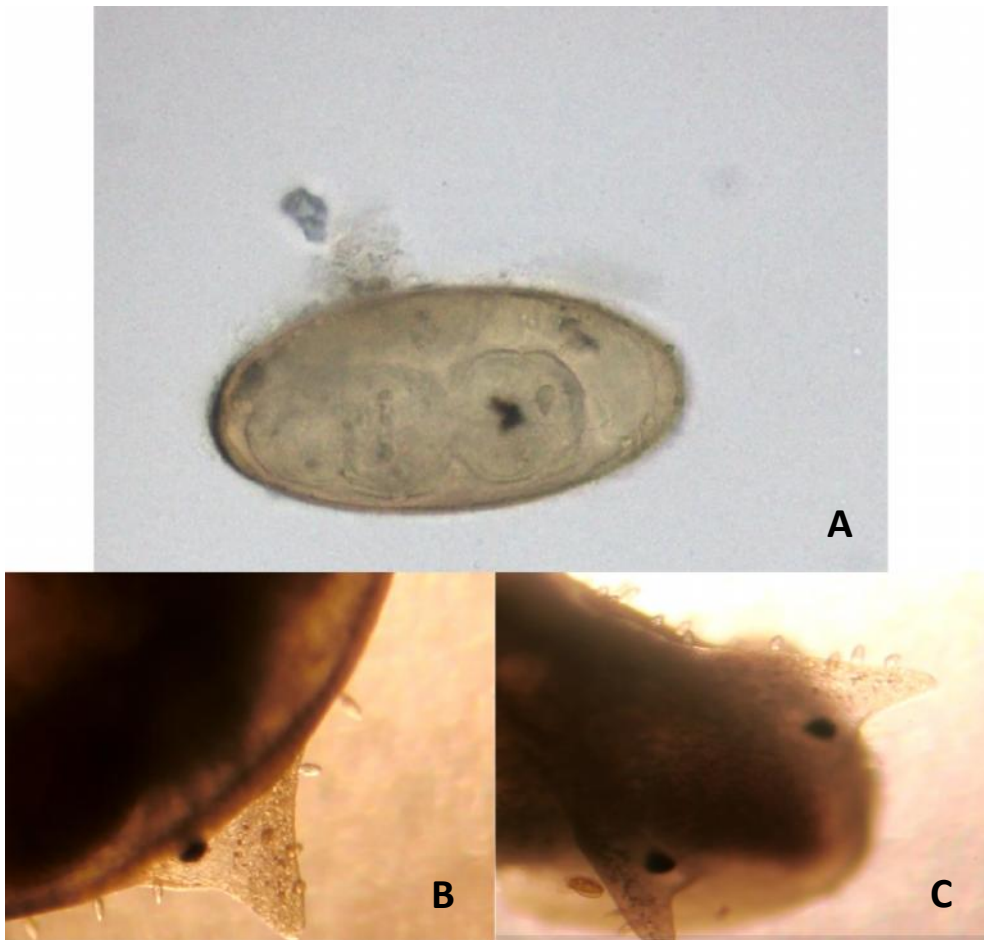


Figura 4.- Imágenes propias, hechas en nuestro laboratorio. **A.** Huevo con miracidio formado, justo antes de la eclosión. **B y C.** Lymnaeas que están siendo infectados por miracidios.

3.- PATOGENIA

3.1.- Introducción

Diferentes autores describieron la patogenia de esta enfermedad durante los años 60 y 70 (Sinclair, 1962, 1967, 1968, 1970; Ross y cols., 1967; Rushton, 1977; Rushton y Murray, 1977).

Muchos animales pueden llegar a ser infectados por el parásito: ovejas (Manga y cols., 1990; Konopka, 1993; Mitchel, 1995; Ferre y cols., 1995b), cabras (Bundy y cols., 1983; Khallaayoune y cols., 1991), vacas (Bouvry y Rau, 1986; Simmank, 1987; González-Lanza y cols., 1989; Genicot y cols., 1991; Poglayen y cols., 1995), y cerdos (Apt y cols., 1993; Gorman y cols., 1997). Algunos animales de laboratorio como ratones, ratas y conejos se han usado en infecciones experimentales para estudiar los diferentes aspectos de la patogenia (Behm y Sangster, 1999).

El periodo de incubación abarca desde la ingestión de la forma infectante del parásito hasta que aparecen los primeros síntomas. Los parásitos maduran en un periodo de 3 a 4 meses en el cual *F. hepatica* viaja entre y dentro de los órganos (Behm y Sangster, 1999).

En las especies susceptibles, principalmente rumiantes, la enfermedad se desarrolla en varias fases, dependiendo de la localización de los parásitos, así se habla de:

1.- Fase prehepática: Las fasciolas juveniles se encuentran en la cavidad abdominal después de 72 horas de la ingestión de las metacercarias y de atravesar la pared intestinal (Kendall y Parfill,

1962). En este proceso apenas existen signos clínicos debido a que se destruyen muy pocas células. En esta fase las formas juveniles interactúan con leucocitos peritoneales (Duffus y Franks, 1980a).

Ocasionalmente se ha descrito la migración de *F. hepatica* a órganos distintos del hígado, por ejemplo el pulmón, provocando neumonía y pleuritis fibrosa (Boray, 1969).

2.- Fase hepática: Después de 90 horas de infección los parásitos llegan al hígado, siendo los lóbulos hepáticos más afectados aquellos más próximos al intestino delgado (izquierdo y ventral) originándose una hipertrofia compensatoria de los lóbulos menos dañados (Sinclair, 1967). A su vez en esta fase, se distinguen dos periodos bien diferenciados:

-) *Periodo parenquimatoso* que tiene lugar durante la migración de las formas larvarias del parásito a través del parénquima hepático.
-) *Periodo biliar* donde las formas adultas ocupan los conductos biliares y la vesícula biliar.

Existen especies (oveja, conejo, ratón) en las cuales se encuentran más adultos en los conductos biliares, teniendo una fase biliar abundante debido a la alta permisividad a la infección (Dawes, 1961; Sinclair, 1962; Urquhart, 1965; Ross y cols., 1967; Rushton, 1977; Rushton y Murray, 1977). En otras especies, como por ejemplo la humana (Chen y Mott, 1990), sobreviven pocos parásitos a la fase migratoria y su presencia en conductos biliares es menos frecuente.

Debido a que un mismo parásito puede atravesar varias veces la misma zona en su fase parenquimatosa, dentro de una misma muestra hepática podemos encontrar tanto lesiones crónicas como lesiones más recientes. Al mismo tiempo las lesiones hepáticas así como la respuesta inflamatoria inducida van aumentando el tamaño debido a que el crecimiento de las formas inmaduras se produce a la misma vez que migra a través del hígado (Behm y Sangster, 1999). Las causas que producen daño hepático son varias. La principal son las espinas del parásito y la acción prensil de la ventosa oral. En ovejas infectadas se observó descamación y ulceración en regiones adyacentes a los cuerpos espinosos y, en algunos casos, aparecieron espinas dentro del parénquima hepático (Sinclair, 1967). Aun así, resulta difícil evaluar el grado de importancia de las espinas sobre el daño hepático y si su ausencia disminuiría o no la irritación en conductos biliares (Behm y Sangster, 1999). Con la ventosa oral las formas juveniles perforan y destruyen los hepatocitos, aspiran los restos celulares hasta su faringe y allí los ingieren implicando daños tisulares bastante importantes (Dawes y Huges, 1964). Los productos de excreción liberados por el parásito son tóxicos para el hospedador, ya que contienen proteasas con las cuales digieren el tejido hepático, contribuyendo tanto a la excavación de los túneles migratorios, como a la nutrición del parásito, produciendo la necrosis de hepatocitos (Kelly, 1993; Chauvin y Boulard, 1996) y disminución de su capacidad metabólica, especialmente de las enzimas microsomiales (Lenton y cols., 1996). De esta forma, se ha observado que las mitocondrias aisladas (encontradas en áreas que habían sufrido daño directo por las fasciolas) del lóbulo izquierdo

de ovejas infectadas con *F. hepatica*, no sintetizaban ATP correctamente.

La dosis infectante a la que se exponen los animales tiene gran importancia en la patogenia y gravedad de la enfermedad. Así, dosis elevadas de metacercarias originan lesiones más severas pudiendo provocar la muerte del animal, sobre todo en animales jóvenes. Por otro lado dosis bajas del parásito darían lugar a un curso crónico de la enfermedad donde las principales afectaciones serían una repercusión en las producciones cárnicas, lácteas y lanares, así como un descenso apreciable en la capacidad reproductiva (Behm y Sangster, 1999; Mulcahy y cols., 1999; Maqbool y cols., 2000; Schweizer y cols., 2005).

En ovejas (Pérez y cols., 2002) y cabras (Pérez y cols., 1999; Martínez Moreno y cols., 1999) se ha demostrado que infecciones pequeñas y repetitivas (similares a las que se producen de forma natural) inducen lesiones hepáticas más severas que una única dosis infectante, aunque el número total de metacercarias sea el mismo. Estos resultados sugieren que en la oveja y cabra la respuesta inmunitaria local puede contribuir al daño hepático durante la fase migratoria.

3.2.- Lesiones

Tras el paso de las formas juveniles por la pared intestinal y la cavidad abdominal no se evidencian reacciones observables, excepto la presencia de pequeños focos hemorrágicos en peritoneo, donde el parásito queda adherido de forma temporal (Kelly, 1993).

Las lesiones que *F. hepatica* produce en el hígado se clasifican en dos grupos, donde el primero de ellos coincide con la fase parenquimatosa, mientras que el segundo se corresponde con la localización biliar de los parásitos adultos (Dow y cols., 1968).

3.2.1.- Fase parenquimatosa

A su vez y dependiendo de si analizamos la patología macroscópica o la histopatología esta fase la dividimos en:

3.2.1.1.-Lesiones macroscópicas

Después de 90 horas post-infección se produce la llegada de las larvas a la cápsula hepática (Kendall y Parfill, 1962) permaneciendo en el parénquima hasta la séptima u octava semana post-infección (spi), fecha en la que comienzan a entrar en los conductos biliares (Kendall y Parfill, 1962; Dow y cols., 1968). En la fase parenquimatosa podemos distinguir una gran cantidad de lesiones, todas ellas de tipo traumático, aunque también existe un componente de necrosis por coagulación que se relaciona con la presencia de productos de excreción-secreción del parásito (FhESP) y que resultan tóxicos para el hospedador (Kelly, 1993; Chauvin y Boulard, 1996).

A los 7-9 días post-infección (dpi), tanto en cabras (Zafra y cols., 2013b; Zafra y cols., 2013c) y ovejas (Escamilla y cols., 2016) las lesiones hepáticas afectaban principalmente al lóbulo izquierdo y consistieron en focos hemorrágicos de color rojizo, o en pequeños trayectos sinuosos de color blanco-grisáceo de 0,2 mm de grosor y hasta 10 mm de longitud.

Después de 10 dpi durante la primoinfección se observan numerosas fasciolas juveniles bajo la cápsula, pero estos hallazgos no se aprecian a los 10 días tras infección secundaria, debido posiblemente a que en esta última, se produce una migración más rápida (Sandeman y Howell, 1981; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995).

Una moderada congestión del lóbulo izquierdo del hígado se observa en la primera spi, pero hasta la 2^a o 3^a spi no aparecen los primeros trayectos parasitarios; su aspecto es blanquecino, miden entre 0'5 y 2 mm de ancho y de 5 a 15 mm de largo, son tortuosos y se localizan principalmente en la superficie diafragmática del hígado, justo debajo de la cápsula hepática. A partir de la 3^a spi, los trayectos adquieren una tonalidad amarillenta, presentan bordes blancos y hacen prominencia sobre la superficie hepática. A veces, pueden aparecer áreas hemorrágicas entre varios trayectos cercanos. En la 6^a spi, la mayoría de los trayectos han perdido su coloración amarillenta, se hacen más anchos (2-3 mm) y están llenos de sangre, lo que les confiere un matiz rojo oscuro. Es común observar placas hemorrágicas de mayor tamaño (hasta 1 cm) en la superficie visceral del lóbulo izquierdo. A la 8^a spi la mayoría de los trayectos ya no presentan convexidad, debido principalmente a la pérdida de su contenido; por otro lado, la superficie rugosa de la cápsula hepática favorece la aparición de adherencias fibrinosas con órganos adyacentes (Sinclair, 1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977).

Dependiendo de la carga parasitaria con la que se infecten los animales las lesiones anteriormente descritas pueden variar.

Según Ross y cols. (1967), podríamos distinguir entre infecciones severas en vacuno (más de 5.000 metacercarias ingeridas) e infecciones moderadas (entre 700 y 1.000 metacercarias ingeridas).

Normalmente la mayoría de las fasciolas alcanzan los conductos biliares, pero algunas de ellas pueden quedar enquistadas en el parénquima hepático. Cada quiste está constituido por un contenido oscuro formado por sangre, detritus y excrementos de fasciola, que con el paso del tiempo será rodeado por macrófagos, células gigantes multinucleadas y una cápsula de tejido conjuntivo. Finalmente se convertirán en quistes caseosos, que pueden mineralizarse o ser invadidos por tejido fibroso (Kelly, 1993). Concretamente, en cabras, se ha descrito que las principales lesiones hepáticas son la perihepatitis fibrosa y abundantes trayectos tortuosos, más severos en animales re infectados que en los infectados por una dosis única, afectando principalmente al lóbulo izquierdo (Pérez y cols., 1999).

3.2.1.2.- Lesiones microscópicas

Entre la 1ª y la 3ª spi la migración de las fasciolas inmaduras provoca túneles que contienen detritus celulares y sangre; aun así, las hemorragias suelen ser discretas, salvo las que se originan a nivel subcapsular (Dow y cols., 1968). Los túneles son ocupados por sangre, detritus celulares y eosinófilos y todo ello rodeado por hepatocitos degenerados infiltrados por eosinófilos y macrófagos (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Kelly, 1993). En los trayectos más antiguos, el infiltrado de eosinófilos es denso en los extremos, mientras que la zona central está ocupada por una masa

de detritus celulares embebidos dentro de una matriz amorfa eosinofílica. Posteriormente, esta zona central se retrae, el infiltrado de eosinófilos disminuye en la periferia, mientras aumenta el número de macrófagos; también existe un pequeño número de linfocitos y fibroblastos, aunque en la oveja apenas aparecen depósitos de colágeno (Dow y cols., 1968).

Durante esta migración hepática, las fasciolas frecuentemente atraviesan los vasos sanguíneos induciendo la formación de flebitis, y en el caso de las venas hepáticas, también producen trombosis. Por el contrario, en los espacios porta cercanos a los trayectos, se establece un infiltrado inflamatorio (principalmente formado por eosinófilos y también algunos macrófagos y linfocitos), así como edema, que puede llegar a estenotar o incluso colapsar las venas portales (Dow y cols., 1968; BVA's Technical Development Commite, 1974; Rushton y Murray, 1977).

Una lesión característica de las infecciones primarias agudas es la aparición de microabscesos en el parénquima hepático. Estos microabscesos están constituidos por colecciones focales de neutrófilos rodeando o invadiendo los hepatocitos, que pueden presentar aún un aspecto normal o sufrir necrosis por coagulación (Meussen y cols., 1995).

En cabra y oveja, los trayectos que han originado abundantes detritus celulares pueden tardar varias semanas más en ser reabsorbidos, permaneciendo con un centro necrótico acidófilo constituido por detritus celulares rodeados por células

gigantes multinucleadas y células epitelioides, linfocitos, células plasmáticas y fibrosis periférica (Pérez y cols., 1999, 2003).

3.2.2.- Fase biliar

3.2.2.1.- Lesiones macroscópicas

La fase biliar se establece a partir de la 8^a-12^a spi aunque es posible observar fasciolas de forma aislada en conductos biliares a las 4^a spi (Rushton y Murray, 1977). Debido a la carga parasitaria, los conductos biliares van a estar dilatados y sus paredes engrosadas haciendo prominencia sobre la cara visceral del hígado (Ross y cols., 1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Reddington y cols., 1986; Kelly, 1993). La lesión más llamativa de las infecciones primarias crónicas es una fibrosis periportal, acompañada de una proliferación y engrosamiento de los conductos biliares, dándole a la superficie hepática un aspecto de pseudolobulillos (Meeusen y cols., 1995).

En la fasciolosis caprina es frecuente observar un gran número de parásitos adultos (>100/hígado), que distienden el conducto biliar principal y la vesícula biliar, llegando incluso al conducto pancreático y duodeno proximal (Leathers y cols., 1982).

3.2.2.2.- Lesiones microscópicas

Según Meeusen y cols. (1995) en las infecciones primarias crónicas, la lesión más llamativa es la fibrosis periportal, acompañada de proliferación de los conductos biliares e infiltrado leucocitario, lo cual puede dar lugar a la pérdida de la arquitectura hepática. Aunque el hallazgo microscópico más característico de la fase biliar es la colangitis hiperplásica que tiene lugar en los

conductos biliares (Sinclair, 1967; Rushton y Murray, 1977). También se puede apreciar necrosis de la mucosa de los conductos con parásitos, pudiéndose a veces extenderse a otras capas más profundas (Sinclair, 1967).

Podemos encontrar huevos de fasciola tanto en los conductos pequeños como en los de mayor tamaño, observándose por primera vez en estos últimos a las 12 spi. También se pueden observar algunos aislados en las arteriolas hepáticas y ocasionalmente en el parénquima hepático, donde está asociado a una severa reacción inflamatoria compuesta por eosinófilos, linfocitos, fibroblastos, y a veces, células gigantes multinucleadas que los fagocitan (Rushton y Murray, 1977; Pérez y cols., 2002). La ruptura de la pared de los conductos biliares y de vasos sanguíneos es un hecho común y frecuentemente va asociado a la aparición de infartos (Ross y cols., 1967).

En la especie caprina particularmente tras infecciones repetitivas se han descrito lesiones en hepatocitos consistentes en dilatación de retículo endoplásmico liso (Martínez Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999). Esta organela cumple importantes funciones en el metabolismo y detoxificación de numerosos tóxicos, y su dilatación podría estar originada por los productos de excreción secretados por el parásito.

3.2.3.- Lesiones en nódulos linfáticos hepáticos (NLH)

Los NL de los animales infectados de forma natural o experimental por *F. hepatica* suelen mostrar un severo aumento de tamaño debido a la hiperplasia de los folículos linfoides y de los cordones medulares. En infecciones severas la médula suele

aparecer enrojecida. Microscópicamente se pueden observar algunos focos hemorrágicos (agudos o crónicos) situados en la médula, donde es frecuente encontrar macrófagos con variable cantidad de pigmento granular y refringente de color marronáceo (hemosiderina). De forma menos constante los nódulos linfáticos hepáticos muestran variable infiltrado de eosinófilos en cordones medulares y áreas paracorticales (Zafra y cols., 2008). Igualmente, se comprueba que durante la fasciolosis se produce un aumento en la ratio linfocitos T CD4/CD8 (Meeusen y cols., 1995).

4.-RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A *Fasciola hepatica*

El sistema inmunitario de los animales ha evolucionado para proporcionar una defensa eficaz contra un amplio rango de organismos infecciosos, incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos. Los mecanismos de defensa se pueden dividir en dos sistemas distintos:

- ***Inmunidad natural o innata***: este tipo de inmunidad no requiere un contacto previo con el agente invasor para desarrollarse, es una respuesta rápida y de amplio espectro y se encuentra mediada por el sistema del complemento, macrófagos y otras células defensivas no específicas como las células “*natural killer*” (NK) y las células dendríticas y eosinófilos. Este tipo de inmunidad es fundamental para el reconocimiento precoz de los microorganismos y actúa como eslabón previo para el posterior desarrollo de la respuesta inmunitaria adquirida, la cual a su vez modula y dirige al sistema inmunitario innato (Roitt, 2014).

- ***Inmunidad adquirida***: Es más lenta pero mucho más específica; está mediada por linfocitos T y linfocitos B, que a su vez actúan sobre varios elementos del sistema inmune (Roitt, 2014).

4.1.- Respuesta inmunitaria natural

El primer eslabón defensivo frente a las infecciones por algunos agentes son las barreras fisiológicas naturales como la piel, mucosas, ácidos gástricos, temperatura corporal, etc., pero, generalmente, son poco eficaces en infecciones por helmintos. De hecho, los jugos gástricos, más que destruir las metacercarias de *F. hepatica*, ayudan en el proceso de desenquistamiento (Dalton y Brindley, 1997). Cuando los agentes consiguen superar estas primeras barreras fisiológicas, la segunda es el sistema inmune innato, el cual desarrolla una respuesta basada en dos eventos: la liberación de sustancias bactericidas o citocidas, que son capaces por sí mismas de destruir el agente. Aquí cabría destacar la acción del sistema del complemento, el cual está formado por una veintena de proteínas plasmáticas que actúan como una cascada enzimática y su activación resulta en una serie de productos capaces de lisar el agente invasor por ataque directo, formando poros en sus membranas (Roitt 2014).; y el proceso de fagocitosis. Este último proceso puede ser generado por la activación del sistema del complemento, el cual induce una respuesta inflamatoria y provoca la opsonización del agente, permitiendo su posterior fagocitosis por granulocitos y macrófagos (Mulcahy y cols., 1999).

Algunos tipos celulares del sistema inmune innato también reconocen las estructuras de carbohidratos de los microorganismos gracias a sus receptores de superficie, siendo capaces de destruir directamente al agente sin necesidad de una respuesta más elaborada y tardía. Además, la estimulación de dichos receptores induce a los macrófagos a sintetizar citoquinas que, subsecuentemente, estimulan el crecimiento de los linfocitos e inducen una respuesta inmunitaria específica.

El reconocimiento inicial de las metacercarias y de los NEJs (Newly Excysted Juveniles o formas juveniles recién desenquistadas) tiene lugar dentro del tracto intestinal y con una activación de la mucosa epitelial muy importante. Existen actualmente numerosos estudios enfocados en el reconocimiento de los NEJs, así García-Campos y cols. en 2016 estudiaron el reconocimiento de los residuos de proteínas y carbohidratos glicosilados que se comportan como antígenos tegumentales (Teg) e inducen la proliferación de células T mediante la activación de células dendríticas (DC) (Aldridge y O'Neill, 2016). Mientras que el reconocimiento de la invasión de estos NEJs se encuentra actualmente bajo investigación, tenemos la certeza de que *F. hepatica* tiene una influencia importantísima en un amplio rango de células efectoras de la inmunidad innata.

Las células dendríticas (que mayoritariamente residen en tejidos linfoides) poseen receptores similares a los de los macrófagos y pueden reconocer e interiorizar glicoconjugados de microorganismos, provocando una respuesta inmediata frente a estos agentes. Uno de los mecanismos clave que actualmente se

considera muy relevante, es el hecho de que estas células sean diana de numerosas fracciones antigénicas y de proteínas específicas de parásitos capaces de modular su fenotipo de forma que pueden suprimir su maduración (Hamilton y cols., 2009; Dowling y cols., 2010) generando efectos de tolerancia antigénica (Falcon y cols., 2010) que muestran, por consiguiente, efectos supresores en la autoinmunidad (Carranza y cols., 2012). Recientemente se han descrito mediadores específicos de esos efectos, como la molécula Knutz (Falcon y cols., 2014) o glicanos tegumentales (Aldridge y cols., 2016).

Efectos similares se han descrito recientemente en los mastocitos o células cebadas procedentes de ratones (Vukman y cols., 2013), pero la función de estos mastocitos no está realmente definida ni hay evidencia de que sea protectora en ratas (Van Milligen y cols., 1998). Estas células son residentes en tejidos que responden ante la activación tanto del sistema inmune innato como el adquirido produciendo y liberando diferentes mediadores inflamatorios presentes en sus gránulos citoplasmáticos (histamina, proteasas, carboxipeptidasas y proteoglicanos). Estas células son también capaces de sintetizar prostaglandinas, leucotrienos y determinadas citoquinas como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) o interleuquina 4 (IL-4) (Prussin y cols., 2003). Además, son capaces de liberar determinadas sustancias activas contra los parásitos al unirse los complejos antígeno parasitario-IgE con sus receptores de IgE de alta afinidad (Gurish y cols., 2004; Yoshimoto y cols., 2006). Se estima que su papel es más determinante en estadios iniciales (peritoneo) de la infección (Doy

y cols., 1981; Wicki y cols., 1991; Van Milligen y cols., 1998). Sin embargo, se ha descrito en bovinos que tras la infección con *F. hepatica* existe escasa evidencia del incremento de porcentaje de basófilos y células cebadas (Bossart y cols., 2000b; McCole y cols., 1998), mientras que en la infección con *F. gigantica* en búfalos se han descrito incrementos en el número de células cebadas en el infiltrado inflamatorio hepático (Molina y Skerratt, 2005).

En numerosos procesos parasitarios podemos encontrar una población de células cebadas residentes intraepiteliares (llamadas “leucocitos globulares”) responsables de los fenómenos de rechazo rápido de parásitos a nivel epitelial (Huntley y cols., 1984; Stankiewicz y cols., 1993; Balic y cols., 2000). Sin embargo, el origen de estos leucocitos globulares aún es campo de controversia pues también se ha demostrado en la especie caprina que expresan receptores $\gamma\delta$, como determinados linfocitos (Konno y cols., 1995).

No existen estudios sobre el papel de los basófilos en la infección con *F. hepatica*, pero se ha descrito que existe una breve elevación de la basofilia en circulación tras la infección (Poitou y cols., 1993). Conociendo el importante papel de los basófilos como las principales células secretoras de IL-4 en respuesta a antígenos tipo-proteasas (Sokol y cols., 2008) y debido a la abundante cantidad de proteasas que están presentes en la infección por *F. hepatica*, el estudio de los basófilos podría resultar una importante vía de investigación.

Las células fagocitarias, tanto macrófagos como neutrófilos, además de su función fagocítica, pueden liberar sustancias que actúan directamente contra el agente invasor como determinados

reactivos derivados del óxido nítrico o especies activas de oxígeno: peróxido de hidrógeno y sus derivados (Roitt, 2014; Piedrafito y cols., 2007). Martínez-Moreno y cols. en 2000 en un estudio realizado en cabras infectadas con *F. hepatica* observaron una deficiente respuesta fagocítica por parte de los neutrófilos que estaba correlacionada con la carga parasitaria cuando fue comparada con los animales control.

Otras células, como las llamadas “*Natural Killer*” (NK) presentan receptores en su superficie que pueden reconocer al agente invasor y provocar su citolisis (Fearon y Locksley, 1996). Estas células actúan en estrecho contacto con el agente diana (células tumorales, células infectadas por virus, etc.), sobre el cual liberan el contenido de sus gránulos (destacando la perforina) produciendo su destrucción.

Los parásitos de gran tamaño, como es el caso de los helmintos, no pueden ser fagocitados y parece ser que el organismo ha solucionado este problema mediante el desarrollo de un sistema de destrucción extracelular mediante los eosinófilos. Estas células son polimorfonucleares con gránulos caracterizados por su afinidad hacia colorantes ácidos (Butterworth y cols., 1981; Gleich y Loegering D.A. 1984).

Tanto los eosinófilos como los macrófagos han demostrado un importante papel en ratas infectadas con *F. hepatica* mediante un mecanismo denominado citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) (Van Milligen y cols., 1998). Experimentos llevados a cabo *in vitro* con macrófagos bovinos también han observado cómo estas células pueden matar NEJs (Duffus y cols.,

1980), aunque este proceso ha sido cuestionado por autores como Glauert y cols. en 1985. Los eosinófilos tienen receptores de superficie para el componente C3b del complemento y, al activarse dichos receptores, son capaces de generar metabolitos de oxígeno activo. Además, ciertos compuestos presentes en sus gránulos son capaces de provocar daños a nivel de la membrana del agente invasor (perforinas, etc.). Piedrafita y cols., (2007) demostraron que los eosinófilos y macrófagos peritoneales de ovejas de Indonesia de cola corta, resistentes a *F. gigantica*, eran capaces de matar larvas juveniles recién desenquistadas de *F. gigantica* en presencia de suero de animales infectados, pero esto no ocurría en razas de ovejas susceptibles.

4.2.- Respuesta inmunitaria adquirida

La respuesta inmunitaria adquirida está mediada por dos poblaciones de linfocitos: linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral y linfocitos T, responsables de la inmunidad celular. En comparación con el sistema inmune innato, el sistema inmune adquirido presenta especificidad, diversidad, memorización y discriminación entre antígenos propios y extraños (Murphy y Weaver, 2017).

4.2.1.- Inmunidad celular

Tanto los linfocitos T, al igual que las células B, derivan de las células hematopoyéticas de la médula ósea, pero los primeros deben pasar un periodo de maduración en el timo antes de poder migrar al bazo y nódulos linfáticos. Los linfocitos T son capaces de reconocer péptidos antigénicos gracias a que portan en su

superficie receptores (TCR), que actúan en colaboración con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Otro receptor usado para distinguir a los linfocitos T de los B es el CD2, este está presente en la mayoría de los linfocitos T, timocitos y células NK. Por otro lado, el receptor CD3 (molécula asociada a TCR) está presente en todos los linfocitos T maduros y timocitos (Roitt, 2014).

Otra serie de co-receptores que pueden presentar los linfocitos T son CD4 y CD8 que desarrollan diferentes funciones y sirven de base para su clasificación (Bernard, 1984), dividiéndolos en dos poblaciones autoexcluyentes. Dentro de cada una de dichas subpoblaciones se pueden diferenciar linfocitos T de memoria (cuya función sería proporcionar una más rápida respuesta tras el contacto con un antígeno ya conocido) y linfocitos T no inmunizados específicamente contra ningún antígeno (Zuckermann y cols., 1996).

Los linfocitos T se clasifican en función de las características de su receptor principal TCR, el cual es una proteína heterodimérica compuesta por cadenas $\gamma\delta$ (TCR-1) o bien cadenas $\alpha\beta$ (TCR-2), que permite a las células T reconocer una gama muy amplia de anticuerpos (Roitt, 2014; Mulcahy y cols., 1999).

Aproximadamente un porcentaje del 90% de las células T de la sangre periférica y órganos linfoides humanos y murinos, expresan el TCR- $\alpha\beta$, mientras que sólo una minoría, el 10%, posee el TCR- $\gamma\delta$ (Kaufmann y Kabelitz, 1991). En rumiantes, el porcentaje es muy diferente, constituyendo gran parte del componente del sistema inmune (Hein y Mackay, 1991), observándose en vacunos

neonatos que entre el 60 y el 75% de las células T en sangre periférica son TCR- $\gamma\delta^+$, aunque este porcentaje decrece un 10% en animales adultos (Wyatt y cols., 1994) y se cree que pueden desempeñar un importante papel en la respuesta inmunitaria al estar involucrados en la respuesta linfocitaria frente a *F. hepatica* (Brown y cols., 1994), y también en el reconocimiento de anticuerpos microbianos (Roitt, 2014). Por otra parte, los linfocitos TCR- $\gamma\delta^+$ han demostrado realizar funciones inmunoregulatoras de ciertas respuestas inmunopatológicas (McMenamin y cols., 1994) y ejercen un importante papel en el sistema no específico de inmunovigilancia (Janeway y cols., 1988; Ferrick y cols., 1995; Saito y cols., 1998).

Las dos principales poblaciones de linfocitos T son los linfocitos T colaboradores (Th) y los linfocitos T citotóxicos (Tc), que se pueden distinguir por los marcadores de superficie CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente:

) *Linfocitos T colaboradores (T helper cell, Th)*

Las células Th CD4⁺ están restringidas al MHC tipo II y ayudan a las células B a proliferar y producir anticuerpos (Roitt, 2014). Se han identificado dos subpoblaciones principales de linfocitos T CD4⁺ colaboradores (Th). Se han llamado células T “helper 1” (Th1) y “helper 2” (Th2), ambas provienen de un mismo precursor (células Th0). Pueden distinguirse por la combinación de citoquinas que son capaces de secretar.

Las células Th1 responden a antígenos presentados por células dendríticas mieloides y por células B usando la molécula

coestimuladora CD80 promoviendo la respuesta inmunitaria tipo 1, caracterizada por la producción del factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), interferón-gamma (IFN- γ) y diversas citoquinas (IL):IL-2, IL-3, IL-12; este tipo de respuesta inmunitaria va a ser especialmente eficaz contra las infecciones intracelulares provocadas por virus y otros microorganismos que proliferan dentro de los macrófagos (Roitt, 2014; Mulcahy y cols., 1999).

Las células Th2, responden a antígenos presentados por células dendríticas linfoides o plasmocitoides y por macrófagos, y menos a antígenos presentados por linfocitos B desarrollando la respuesta inmunitaria tipo 2, con la producción de citoquinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Mulcahy y cols., 1999). Estas citoquinas cooperan con las células B y están adaptadas para la defensa contra los parásitos vulnerables a la IgE (activada por la IL-4), la eosinofilia (inducida por la IL-5) y la proliferación de las células cebadas (estimulada por las IL-3 e IL-4), según los estudios realizados por Estes y cols., (1995), Abbas y cols., (1996), y Cervi y cols., (2001).

Ambas respuestas celulares están fuertemente asociadas proporcionando inmunidad frente a helmintos, pero sin embargo produce un descenso y decrece la resistencia frente a micobacterias y otros organismos intracelulares (Tizard, 2012).

Las células Th17, son el tercer tipo de células colaboradoras y desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos. Asimismo se ha descrito para ellas un efecto proinflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Bettelli y

cols., 2007; Matsuzaki y Umemura, 2007). Esta respuesta Th17 está controlada por las citoquinas IL-23, TGF- β e IL-6. Estas dos últimas promueven la diferenciación de los linfocitos quiescentes en Th17 y, una vez diferenciados, la citoquina encargada de la proliferación de estos es la IL-23 (McGeachy y cols., 2007). Actualmente se conocen 6 moléculas diferentes de IL-17 nombradas desde la IL-17A a la IL-17F. Son esenciales en el reclutamiento, activación y migración de otras células del sistema inmune. La IL-17A e IL-17H influyen sobre un amplio panel de células, estimulándolas para secretar mediadores de la inflamación como IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, prostaglandina E2, quimiocinas y metaloproteasas (Kolls y Linden, 2004).

Actualmente, no se conoce el papel de la respuesta Th17 y no hay evidencia consistente de que tenga un efecto protector frente a helmintos. En el caso de infección por *Teladorsagia circumcincta* en ovejas, la expresión de citoquinas Th17 se correlaciona con susceptibilidad a la infección (Grossner y cols., 2012).

La respuesta inmunitaria generada frente a parásitos helmintos, y en particular frente a trematodos, está caracterizada por una respuesta inmune Th2, que involucra a citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13, así como IgE y células efectoras especializadas como basófilos, mastocitos y eosinófilos (Abbas y cols., 1996; Klion y cols., 2004; Nutman y cols., 2013). Sin embargo, en la fasciolosis, no parece ser una respuesta realmente protectora. Las ovejas infectadas con *F. hepatica* experimentan un aumento de la expresión génica de citoquinas Th2, pero no de Th1 en el transcurso de la infección (Álvarez y cols., 2015). Se ha descrito,

además, que la magnitud de esta respuesta Th2 está directamente relacionada con la carga parasitaria (Clery y cols., 1996).

El desencadenamiento de una respuesta Th2 parece asociado a una producción temprana de IL-4. El origen de esta liberación es poco claro, aunque probablemente se produzca por parte de macrófagos y algunas células T que se estimulen vía receptores de superficie diferentes a los de la lectina, como por ejemplo, linfocitos $\gamma\delta^+$ intraepiteliares, que son capaces de liberar citoquinas ante determinados estímulos (Ferrick y cols., 2000).

Si bien la mayoría de los parásitos son sensibles a esta respuesta inmunitaria tipo Th2 (sobre todo los nematodos intestinales), otros han evolucionado y han conseguido evitar dicha respuesta inmunitaria (Pritchard y cols., 1997). Diversos estudios sugieren que determinados helmintos provocan una respuesta inmunitaria Th2, de la cual son capaces de protegerse, para evitar los mecanismos defensivos potencialmente tóxicos dependientes de una respuesta Th1 (Finkelman y cols., 1991; Pearce y Sher, 1991; Allen y Maizels, 1997; Mulcahy y cols., 2005). Como un claro ejemplo de mecanismo dependiente de una respuesta inmunitaria tipo Th1 que se muestra eficaz frente a los procesos parasitarios, cabría destacar la acción citotóxica realizada por los macrófagos. Estas células, una vez activadas por la acción de diferentes citoquinas, intervienen como células efectoras en la inmunidad protectora frente a un amplio rango de parásitos protozoarios y helmintos como *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, o *Schistosoma mansoni* (Mulcahy y cols., 1999).

Como la gran mayoría de los parásitos helmintos, la infección por *F. hepatica* provoca una respuesta inmunitaria tipo Th2. Así diversos estudios han demostrado que tanto la IgE (Bossaert y cols., 2000a) como los eosinófilos y las células cebadas (Bossaert y cols., 2000b), juegan un papel muy importante en la respuesta inmunitaria que tiene lugar específicamente en el hígado de vacas infectadas con *F. hepatica*. Varios trabajos previos ya habían descrito dicha importancia en la mucosa intestinal de ratas (Doy y cols., 1982; Van Milligen y cols., 1998; Kesik y cols., 2007) y de vacas (Wicki y cols., 1991) infectadas con *F. hepatica*.

Sin embargo, se ha descrito que esta respuesta tipo Th2 es incapaz de eliminar o detener al parásito (Mulcahy y cols., 1999), por lo que cabría suponer que *F. hepatica* puede superarla para facilitar su propia supervivencia. Cabe incluso la posibilidad de que el parásito module la respuesta del hospedador hacia una respuesta Th2, para de esa forma protegerse de una respuesta Th1 que podría resultarle más dañina (Maizels y cols., 1998; Maizels y cols., 2004).

De hecho, en el caso de la fasciolosis, en las especies susceptibles se produce un cambio en el tipo de respuesta inmunitaria predominante desde un tipo Th1 (o Th0 en otras especies) inicial hacia una respuesta Th2 final en fases crónicas de la infección, lo cual resulta en beneficio del parásito. Así, por ejemplo, el anticuerpo dominante en parasitaciones crónicas es la IgG1 en terneros, ovejas y ratas (O'Neill y cols., 2000), identificándose en estas especies también IgE (inmunoglobulinas características todas ellas de respuestas tipo Th2).

En cuanto a la respuesta temprana frente a la fasciolosis, un trabajo realizado en ganado vacuno por Clery y cols., (1998), concluyó que la infección con *F. hepatica* daba lugar a una proliferación de linfocitos con rápida producción de IFN- γ , lo que era indicativo de un patrón Th1 en las fases iniciales del proceso. Si extrapolamos la dicotomía Th1/Th2 que tiene lugar en ratones (Pearce y cols., 1991; Pearce y Sher, 1991), la detección de IFN- γ en las primeras fases de la infección y su ausencia en infecciones crónicas, demostraría la polarización de la respuesta en función del curso de la infección, permitiendo la supervivencia del parásito durante las fases crónicas de la infección.

) Linfocitos T citotóxicos

Las células Tc (CD8⁺) son las encargadas de destruir aquellos virus, bacterias o protozoos que infectan a las células del hospedador, tejidos trasplantados así como células cancerígenas (Roitt, 2014).

Estos linfocitos se encuentran restringidos al MHC tipo I, estando su acción y activación controlada por parte de los linfocitos T colaboradores. Los antígenos derivados de los agentes infecciosos intracelulares son procesados en los endosomas y presentados juntos al MHC clase I en la superficie de la célula infectada. El reconocimiento de este complejo péptido-MHC clase I por parte de los receptores TCR- $\alpha\beta$ de linfocitos T CD8⁺ inicia el proceso de destrucción de la célula infectada, normalmente mediado por la producción de radicales libres de oxígeno y

perforinas (Roitt, 2014). Por lo general, las células Tc no son capaces de mediar la eliminación de parásitos eucarióticos extracelulares, incluidos los helmintos (Mulcahy y cols., 1999).

4.2.2. Inmunidad humoral

Esta respuesta está mediada por linfocitos B y células plasmáticas. Los linfocitos B se diferencian de las células hematopoyéticas de la médula ósea. Viajan por el torrente circulatorio hasta llegar a órganos linfoides secundarios como el bazo, nódulo linfático, tonsilas o placas de Peyer (Clark y Ledbetter, 1994). Las células B maduras poseen receptores para la fracción Fc de inmunoglobulinas en su superficie, lo que le permite unirse a distintos anticuerpos y éstos a su vez, al epítipo de un antígeno. Por último los antígenos se presentan junto con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II.

La combinación estructural de péptidos y MHC tipo II en la superficie de las células B es reconocida por linfocitos T activados, más específicamente linfocitos Th. Estos linfocitos Th (CD4⁺) van a secretar proteínas mediadoras o citoquinas, principalmente la IL-4, aunque también intervienen la IL-2, IL-5 e IL-6 que inducen a las células B a migrar al interior del folículo linfoide (Roitt, 2014; Cerutti y Guerrero, 2001). En esta localización entran en contacto con las células dendríticas foliculares (FDC) que reconocen su complejo inmune antígeno-anticuerpo y estimulan su proliferación y diferenciación. Esta interacción dará lugar a la formación de un centro germinativo prácticamente desprovisto de linfocitos T. Cuando las células B maduran, se desplazan a la zona clara, en la

que abundan las FDC y linfocitos Th activados, que las inducen a diferenciarse en:

- a) Células plasmáticas, capaces de secretar más de 2000 moléculas de anticuerpos o inmunoglobulinas por segundo, específicas del antígeno que originalmente se unió a la célula B;
- b) Células de memoria, que mantienen la capacidad de reconocer al antígeno y proliferar a células plasmáticas y de memoria; este hecho acelera el proceso en el caso de que se produzca un nuevo contacto con el mismo antígeno (Clark y Ledbetter, 1994).

Los rumiantes, han mostrado poseer los siguientes tipos de inmunoglobulinas: IgM, IgG, IgA e IgE homólogos a los de otras especies y definidos según su antigenicidad y movilidad electroforética (Musoke y cols., 1986).

Las células B han demostrado tener un papel protector tanto en animales infectados con *F. hepatica* como aquellos que han sido vacunados previamente a la infección. Chung y cols (2012), destacaron el acumulo de células B CD19⁺ en el bazo de ratones infectados con *F. hepatica*. Por otra parte, en ovejas también infectadas con *F. hepatica*, se describió un incremento del 11% en el número de células B reclutadas a nivel de nódulos linfáticos hepáticos (Meeusen y cols., 1995).

En vacas y ovejas infectadas se ha demostrado que un aumento de la IgG2 específica de *F. hepatica* se correspondía con protección inducida por la vacuna y un aumento de la IgG1 se ha

asociado a una respuesta Th2 no protectora (Mulcahy y cols., 1998; Mulcahy y Dalton 2001; Phiri y cols., 2006) Zafra y cols., en 2010 describieron en cabras vacunadas con GST nativa de *F. hepatica* y posteriormente infectadas un incremento de células IgG⁺ en la corteza de nódulos linfáticos hepáticos y en el hígado. Golden y cols. (2010) mostró que en vacas vacunadas con Catepsina L1 donde hubo una disminución de la carga parasitaria con respecto al grupo control, un aumento tanto de la IgG1 como de la IgG2 específicas en vacas vacunadas indicando una respuesta mixta Th1/Th2. Asimismo, Buffoni y cols., 2012 mostraron un aumento tanto de la IgG1 como de la IgG2 en cabras vacunadas con FhCL1, FhPrx y Sm14.

5.- EVASIÓN DE *F. hepatica* LA RESPUESTA INMUNITARIA

Al igual que otros helmintos, *F. hepatica* pueden sobrevivir en sus hospedadores durante largos periodos de tiempo (1-2 años en bovinos y hasta 20 años en oveja) aunque estén expuestos por su naturaleza invasiva tanto a la respuesta humoral como celular del hospedador. De esta forma, los parásitos poseen mecanismos moduladores para evitar el persistente ataque del sistema inmune del hospedador. Aunque su destino final en los conductos biliares es relativamente seguro desde el punto de vista inmunológico, para llegar a él tienen que atravesar estructuras como el intestino y el parénquima hepático en las que el sistema inmune es muy activo (Mulcahy y cols., 1999; Mulcahy y cols., 2005). Pero cada estadio del desarrollo parasitario puede ser antigénicamente diferente provocando que la respuesta del hospedador esté a veces caracterizada por una serie de discretas respuestas inmunitarias

que envuelven diferentes periodos durante el curso de la infección. Este hecho origina que el parásito pueda eludir una respuesta inmunitaria protectora directamente contra un estadio.

Hipotéticamente, la inmunomodulación de la respuesta inmunitaria debería ser beneficiosa para ambos, tanto para el hospedador como para el parásito, protegiendo al helminto de ser erradicado y, por otro lado, impidiendo una respuesta pro-inflamatoria excesiva que provocaría importantes daños tisulares. Sin embargo, cuando el sistema inmunitario contacta con la infección o con sus moléculas antigénicas comienza una intensa respuesta para intentar erradicar al parásito. Pero *F. hepatica*, a medida que aumenta su carga parasitaria y el tiempo post-infección es capaz de ir modulando esas respuestas permitiendo su supervivencia en detrimento del hospedador (Maizels y cols., 2004; Van Riet y cols., 2007).

Los factores que pueden contribuir a la evasión inmune pueden ser variables:

5.1.- Localización final del parásito

La localización final del parásito dentro de los conductos biliares hace que tanto los huevos liberados como los antígenos vayan a intestino a través de los conductos biliares y colédoco junto con la bilis, lo que limita la respuesta inmune que deberían inducir. Debido a esto los niveles de anticuerpos inducidos en diferentes especies descienden una vez que el parásito penetra dentro de los conductos biliares (Hanna, 1980a; Meeusen y Brandon, 1994; Clery y cols., 1996). También se observó que los niveles de

inmunoglobulinas en conductos biliares de vacas infectadas son 12 veces menores que los medidos en sangre, predominando la IgA, lo que confirma la escasa actividad inmunológica a este nivel (Hughes y cols., 1981).

5.2.- Glucocáliz

Asumiendo que la mayoría de las interacciones entre el parásito y el hospedador tendrán lugar en la superficie parasitaria, podríamos decir que esta va a desarrollar un papel muy importante en la protección contra el sistema inmune (Mulcahy y cols, 1999). Partiendo de la premisa que no existe evidencia de que *F. hepatica* absorba macromoléculas del hospedador en su superficie para enmascararse como ocurre con *Schistosoma spp* podemos decir que el glucocáliz superficial de *F. hepatica* puede contribuir a la evasión inmune de tres formas distintas:

- a) El sistema inmune lucha contra un “blanco variable” debido a que la composición del glucocáliz sufre una serie de cambios durante el desarrollo del parásito en el hospedador, posiblemente para adaptarse a los distintos medios, siendo más frecuentes durante la fase migratoria (Hanna, 1980b).
- b) Las células defensivas como neutrófilos y eosinófilos no pueden establecer un contacto estrecho y lo suficientemente duradero con el parásito como para permitir su degranulación y destrucción ya que el glucocáliz sufre procesos de muda constantemente y es reemplazado por vesículas secretoras del parásito, provocando el

desprendimiento de estas células defensivas junto con el mismo. (Duffus y Franks, 1980; Hanna, 1980b).

- c) La reacción inmune potencialmente letal llevada a cabo por los anticuerpos no puede llevar a cabo su función debido a la liberación de productos del glucocáliz creando un flujo circulatorio (Duffus y Franks, 1980).

5.3.- Evasión de la acción del sistema del complemento

Existen factores que podrían explicar la gran resistencia de las fasciolas juveniles recién desenquistadas a la acción del sistema del complemento. Aunque las larvas recién desenquistadas son *per se* muy sensibles a la acción del sistema del complemento, la presencia de ácido siálico terminal en componentes del glucocáliz parece que influye en la unión de la fracción C3 a la superficie del parásito evitando la activación del complemento por la vía alternativa (Montgomery y cols., 1986).

5.4.- Cambios antigénicos durante la migración parasitaria

Los anticuerpos desarrollados en nódulos linfáticos mesentéricos son diferentes a los de nódulos linfáticos hepáticos y a los del bazo, presentando diferentes patrones de reacción frente a diferentes antígenos. Igualmente, se provocan distintas respuestas isotípicas (por ejemplo, la producción de IgE es mucho mayor en los nódulos linfáticos hepáticos que en los mesentéricos o en el bazo, mientras que la de IgA es mayor en los nódulos linfáticos mesentéricos). Estos hallazgos sugieren una particular regulación de las citoquinas secretadas por las células T en cada una de estas

zonas. Esta variación en el tipo de respuesta inmunitaria hace que ésta sea menos efectiva que si se tratase de un único mecanismo defensivo (Meeusen y Brandon, 1994).

5.5.- Capacidad migratoria a través del parénquima hepático

Los parásitos tienen la suficiente motilidad como para “dejar atrás” al infiltrado inflamatorio; mientras éstos pueden atravesar el hígado sin obstáculos, los leucocitos tienen que abandonar los capilares sanguíneos del espacio porta y atravesar el tejido intersticial hasta llegar a los túneles en los que se encuentra el helminto (Meeusen y cols., 1995). De este modo los túneles migratorios del parénquima hepático de ovejas primoinfectadas con *F. hepatica* aparecen rodeados por granulocitos (eosinófilos y neutrófilos), macrófagos, y linfocitos T y B (Meeusen y cols., 1995). Sin embargo, mientras los parásitos jóvenes se hallan presentes en esos túneles, no se observa infiltración linfocitaria rodeándolos. Así, a los 7-9 dpi, la mayoría de las larvas observadas en hígado no mostraban reacción inflamatoria y apenas lesiones en el tejido hepático que rodeaba las larvas, mientras que 2-3 mm detrás de ellas aparecía necrosis por coagulación e infiltrado inflamatorio principalmente compuesto por eosinófilos (Zafra y cols., 2013b; Zafra y cols., 2013c, Escamilla y cols., 2016). En estadios posteriores el infiltrado celular se incrementa, pero sólo se observa junto a los espacios porta y zonas lesionadas, y no rodeando a las fasciolas.

En el caso de las reinfecciones, los parásitos pueden avanzar más rápidamente al evitar zonas previamente lesionadas y

únicamente migrar por zonas sanas, lo cual explicaría que en sucesivas reinfecciones los parásitos migren más rápidamente que en las primoinfecciones (Meeusen y cols., 1995).

5.6.- Inmunomodulación de los linfocitos T reguladores FoxP3+ (Tregs FoxP3), citoquinas reguladoras y diferenciación hacia una respuesta Th2

Determinados parásitos helmintos amplifican la red de células Treg en el hospedador, ya que estas parecen ser un factor importante en la habilidad del parásito para evadir la respuesta inmune y así asegurar su supervivencia (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003; Escamilla y cols., 2016). Grainger y cols. (2010) mostraron *in vitro* que los productos de excreción y secreción de la larva L4 de *Teladorsagia circumcincta* inducían la expresión del factor de transcripción FoxP3 en linfocitos T (Treg). Dicho factor de transcripción está íntimamente involucrado en la activación de linfocitos T CD4⁺. Sugiriendo, de esta forma, que el parásito podría inducir activamente las respuestas reguladoras de las células T durante la infección. En experimentos *in vivo* también se demostró que *T. circumcincta* inducía expansión de linfocitos FoxP3 en abomaso, así como incremento en la producción de IL-10 (McNeilly y cols., 2013). También observaron que los productos de excreción y secreción de *Heligmosomoides polygyrus* pueden conducir a la expresión del factor de transcripción FoxP3 de una manera análoga a TGF- β . De igual forma, estudios de los estadios larvarios de *Ostertagia ostertagi* han demostrado que pueden suprimir la

activación y proliferación linfocitaria *in vitro* (Gómez-Muñoz, 2004).

Los linfocitos Tregs para llevar a cabo la inmunomodulación requieren de citoquinas como IL-10 y TGF- β , con un papel antiinflamatorio fundamental, suprimiendo el desarrollo de células Th1 y limitando la magnitud de la respuesta Th2, permitiendo disminuir además el daño tisular hepático casuado por la respuesta inflamatoria en infecciones por *F. hepatica* (Pleasance y cols., 2011a; Martínez-Pérez y cols., 2014; Rojo-Vazquez y cols., 2012). Las células Treg mediadoras de la supresión y el papel de la IL-10 siguen siendo controvertidos. Hasby y cols. (2015) en un estudio desarrollado en ratones que fueron vacunados con antígenos de huevos de *Schistosoma mansoni*, como terapia frente a la colitis, demostraron que los animales vacunados mostraban una mayor expresión de FoxP3 así como una significativa correlación positiva entre Tregs FoxP3 e IL-10. Este hecho sugiere un refuerzo de la capacidad de modulación de la respuesta inmune por parte del parásito, lo que se traducía en una mitigación de los efectos negativos de la colitis. Así mismo, estos investigadores también observaron que todo el proceso iba acompañado de un descenso de IL-2, IFN- γ , e IL-4. Sin embargo, no ocurrió lo mismo en un estudio llevado a cabo en ratas y ratones infectadas con *Trichinella spiralis* donde el aumento de IL-10 si disminuyó la expresión de IFN- γ pero no influyó en la producción de IL-4. La disminución de la respuesta Th1 durante la infección de *T. spiralis* refleja una adaptación biológica para limitar los mecanismos que acabarían con el desarrollo larvario dentro de las células musculares (Beiting y cols.,

2016). También es sabido que la IL-10 inhibe la producción de IL1, IL-6, IL8, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y óxido nítrico (NO) por monocitos/ macrófagos en hígado para posteriormente ejercer efectos antiinflamatorios en el mismo (Malefyt y cols., 1991; Gazzinelli y cols., 1992).

Otro estudio también demostró que en fasciolosis crónica en vacuno, la inhibición de IL-10 provocaba un aumento de IFN- γ y que al inhibir TGF- β aumentaba la producción de IL-4 lo cual sugiere que TGF- β es responsable de inhibir los mecanismos antiparasitarios dependientes de IL-4 y que la IL-10 es la responsable de que no se lleve a cabo una respuesta Th1 eficaz contra el parásito. En general, se sugiere la existencia de una interacción cooperativa entre IL-10, TGF- β y FoxP3 originando un entorno regulador que asegura la supervivencia del parásito y al mismo tiempo protege al hospedador de los procesos inflamatorios (Flynn y Mulcahy, 2008). Otros estudios, sin embargo indican que la IL-4 se encarga de estimular tanto a la IL-10 (Schmidt-Weber y cols., 1999) como al TGF- β (Kohyama y cols., 2001). Según Ishizaka y cols. (1996) la IL-10 producida en los hepatocitos de ratones, es estimulada por la presencia de TGF- β , y a su vez esta citoquina es quimiotáctica para los fibroblastos, estimulando su proliferación y el incremento de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, incluyendo el colágeno. Por lo que la citoquina TGF- β participa también en la reparación y regeneración de los tejidos, aunque un exceso de la misma provocando excesiva fibrosis pueden producir hipertensión periportal (Booth y cols., 2004; Cutroneo, K.R. 2007).

Esta capacidad de supresión de la respuesta inmune Th1 en el hospedador está directamente relacionada con un aumento de la susceptibilidad del animal parasitado a otras infecciones como pueden ser la salmonelosis, clostridiosis y tuberculosis, e incluso interfiriendo en pruebas diagnósticas de dichas enfermedades (Brady y cols., 1999; Flynn y cols., 2007; Claridge y cols., 2012; Dalton y cols., 2013). En el caso de la tuberculosis, es bien conocido que la protección que se desarrolla frente a *Mycobacterium* está caracterizada por una fuerte respuesta Th1 específica, sin embargo, la coinfección con helmintos, impide esa respuesta Th1 necesaria para eliminar *Mycobacterium* modulándola hacia una respuesta inmune Th2 o un estado antiinflamatorio inefectivo para controlar la infección.

Flynn y cols. (2007) demostraron que las células mononucleares aisladas de la sangre periférica (PBMCs) de animales coinfectados con *F. hepatica* y *Mycobacterium bovis* secretaban niveles reducidos de IFN- γ en respuesta a la estimulación con antígenos micobacterianos comparados con PBMCs de animales infectados solo con *M. bovis*. Garza-Cuartero y cols. (2016) describieron que *F. hepatica* era capaz de reducir la carga de *Mycobacterium bovis* y suprimir la respuesta proinflamatoria asociada.

La función efectora de las células Th1 ha sido asociada tradicionalmente con la activación de macrófagos a través de IFN- γ para destruir los patógenos intracelulares, mientras que los efectores de la respuesta Th2 incluyen células granulocíticas como eosinófilos, mastocitos, basófilos e isotipos de anticuerpos citófilos.

En infecciones por *F. hepatica* se ha descrito que existe una inducción al fenotipo M2 de los macrófagos. Esto ocurre durante los tres primeros días post-infección en ratones. Al producirse esta inducción hacia la vía alternativa M2, estos macrófagos pierden su función efectora proinflamatoria, perdiéndose ligandos de receptores tipo TLR (Toll-like receptors) y contra *F. hepática*, pasando a una respuesta Th2 de tipo reparativo (Donnelly y cols., 2005; Donnelly y cols., 2008).

La presencia de todos esos mecanismos inmunológicos (Th2, derivación hacia macrófagos M2) regulados por *F. hepatica* son de vital importancia para la protección de tejidos como el hígado, así como del daño causado por la larva migrante. Existe evidencia de que estos macrófagos M2 producen TGF- β , así como grandes cantidades de citoquina IL-6, las cuales presentan unas fuertes propiedades fibrogénicas (Sime y O'Reilly, 2001; Knight y cols., 2003).

5.7.- Productos de excreción y secreción de *Fasciola hepatica* (FhESP): Potentes moléculas inmunomoduladoras

Diversos estudios han demostrado el papel regulador de la respuesta inmune que los productos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* juegan en diversas especies de hospedadores. Así, Donnelly y cols. (2005) demostraron que los ratones a los que se le administraron intraperitonealmente en tres ocasiones 10 μ g de FhESP durante una semana, desarrollaron una respuesta inmunitaria Th2. Tras esta respuesta Th2 inducida, se pudo evidenciar la supresión del desarrollo de la respuesta Th1.

Robinson y cols. describieron dos fracciones de los FhESP: por un lado la peroxirredoxina (FhPrx), la cual ha sido estudiada *in vivo e in vitro* demostrando su responsabilidad en la activación del fenotipo M2 de los macrófagos, los cuales no responden a los estímulos inflamatorios clásicos y promueven la diferenciación de la respuesta inmunitaria hacia Th2 (Robinson y cols., 2009). La otra molécula es la denominada molécula de defensa contra helmintos (FhHDM-1), la cual se ha propuesto como una molécula similar a la catelicidina en mamíferos. Este péptido, más estudiado en humanos se expresa en neutrófilos, macrófagos y células de las mucosas epiteliales como respuesta a la estimulación por mediadores inflamatorios y microorganismos. Por lo que la FhHDM-1 se ha propuesto como un potencial agente terapéutico anti-sepsis (Robinson y cols., 2011).

Rodríguez y cols. (2015) demostraron que los glicoconjugados de *F. hepatica* eran capaces de promover la producción de IL-4 e IL-10 y suprimir la producción de IFN- γ por parte de los esplenocitos durante la infección, dilucidando con ello algunas de las moléculas responsables de la regulación inmunitaria.

Recientes estudios evidencian como los FhESP también inducen la apoptosis de los eosinófilos *in vivo* en ratas (Serradell y cols., 2007), así como de otras células efectoras como macrófagos, y células dendríticas evadiendo así la respuesta inmune (Shin y cols., 2000; Semnani y cols., 2008; Yan y cols., 2008; Zepeda y cols., 2010; Nono y cols., 2012; Das Mohapatra y cols., 2014), aunque no se ha demostrado qué moléculas son las implicadas en tales procesos.

6.-DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA *F. hepatica*

6.1.- Control actual de la enfermedad

El control actual de la fasciolosis en rumiantes está basado en el uso de profiláctico y terapéutico de fármacos antihelmínticos (Halferty y cols., 2009). Uno de los antiparasitarios más eficaces frente a la fasciolosis es el triclabendazol (TCBZ) y así lo demuestran varios estudios realizados en ganado ovino (Maes y cols., 1990; Taylor y cols., 1994; Ramisz y cols., 1997), caprino (Kinabo y Bogan, 1988; Martínez-Moreno y cols., 1997), vacuno (Ibarra y cols., 2002) e incluso en la especie humana (Laird y Boray, 1992; Luz y cols., 1999). En aquellas zonas endémicas el tratamiento ha de administrarse de forma ininterrumpida durante el periodo más propicio para la infección de los animales en pasto, debido a que la mayoría de los principios activos usados como antiparasitarios presentan una corta vida media, de sólo varios días, tras los cuales los animales pueden volver a infectarse al pastar. Sin embargo, en 1995, Overend y Bowen describieron falta de eficacia del tratamiento con triclabendazol en ovejas infectadas con *F. hepatica* sugiriendo que el fenómeno podría deberse a la presencia de parásitos resistentes al fármaco. Durante las últimas dos décadas la resistencia al TCBZ y a otros antihelmínticos como el albendazol se ha extendido a numerosos países (Beesley y cols., 2017). Todo lo anterior, añadido además a la presencia de residuos en productos de origen animal, hace que actualmente se estén realizando numerosos estudios con el objetivo de desarrollar y establecer un control basado en inmunoprofilaxis. El desarrollo de

una vacuna eficaz frente a la fasciolosis podría presentarse como una alternativa que proporcionase una protección duradera, barata, respetuosa con el medio ambiente y efectiva para el control de esta enfermedad (McManus y Dalton, 2006; Molina-Hernández y cols., 2015; Toet y cols., 2014; Yap y Smooker, 2016).

6.2.- Aspectos generales en inmunoprolifaxis contra la fasciolosis

Se ha demostrado que *F. hepatica* puede inducir una respuesta inmunitaria protectora en el hospedador provocando la muerte del parásito y confiriendo protección contra la fasciolosis (Rickard y Howell, 1982; Haroun e Hillyer, 1986; Hughes, 1985). La vacunación con antígenos definidos de *F. hepatica* puede producir una respuesta inmunitaria en vacas y es teóricamente, un punto alcanzable. Sin embargo, estudios llevados a cabo en ovinos demostraron que estos no desarrollan resistencia ante una segunda infección por *F. hepatica* después de una exposición primaria (Boray, 1969; Boyce y cols., 1987; Chauvin y cols., 1995). Así mismo, en cabras infectadas secundariamente no sólo no se produjo una respuesta protectora, sino las lesiones hepáticas fueron más severas que en la infección primaria (Pérez y cols., 1999; Martínez Moreno y cols., 1999), sugiriendo que la respuesta inmune en vacas es diferente cuantitativa y cualitativamente que en ovejas y cabras.

El objetivo de una inmunización con este tipo de antígenos sería promover una respuesta inmunitaria de efectiva que involucre células cebadas, eosinófilos y producción de IgE

(Bossaert y cols., 2000a; Bossaert y cols., 2000b; Mulcahy y cols., 1999). De forma general, los factores que pueden interferir en la inmunidad vacunal según Dalton y Mulcahy (2001) son: la dosis y el adyuvante en el que se vehicula el antígeno así como la vía de administración. Existen algunas referencias de vacunación con algún éxito contra *F. hepatica* en terneros usando antígenos crudos (Haroun y cols., 1986). Oldham y Huges, en 1982 consiguieron disminuir la carga parasitaria al inmunizar ratas intra-peritonealmente con antígenos emulsionados de *F. hepatica* adultas en adyuvante incompleto de Freund (FAI).

Para identificar moléculas candidatas para vacunas frente al parásito existen 3 estrategias básicas (Dalton y cols., 2003b):

) *Antígenos con protección cruzada*: son aquellos que presentan reacción cruzada con otros trematodos *Schistosoma mansoni* (Spithill y cols., 1997), dando protección cruzada frente a ambos parásitos. Un ejemplo son las proteínas transportadoras de ácidos grasos ó FABPs (*Fatty Acid Binding Proteins*).

) *Antígenos homólogos*: Son moléculas del parásito homólogas a antígenos que se han visto previamente proteger frente a otros trematodos como *Schistosoma mansoni* o *Schistosoma japonicum*. Un ejemplo es la enzima Glutación-S-transferasa ó GST (Morrison y cols., 1996; Sexton y cols., 1994).

) *Antígenos esenciales*: Son moléculas de *F. hepatica* que desarrollan una función esencial en la infección o supervivencia del parásito considerándose posibles candidatos vacunales idóneos. Un ejemplo es Catepsina L (Dalton y cols., 1996).

6.3.- Formulación de vacunas

Una buena formulación de vacuna para conseguir efecto protector no solo depende del antígeno usado, sino también del adyuvante, la vía de administración y la dosis. Las proteínas purificadas y péptidos investigados actualmente como candidatos vacunales son pobres inmunógenos por si solos, necesitando ser vehiculados conjuntamente en forma de cóckteles vacunales y en adyuvantes que ayuden a potenciar la respuesta inmune específica frente a los antígenos vacunales. Más importante aún en el caso de las vacunas contra parásitos, polarizar selectivamente los diferentes componentes de la respuesta inmunitaria hacia la producción de determinados isotipos de anticuerpos o hacia una respuesta mediada por células (Bomford y cols., 1989). Los adyuvantes podrían mejorar la respuesta inmune al antígeno mediante los siguientes efectos (Freund y cols., 1956; Allison y cols., 1986):

) Actuando como depósito de antígeno, liberándolo lentamente y permitiendo un estímulo de la respuesta inmune más persistente y eficaz.

) Interactuar directamente con los macrófagos y linfocitos T ó B.

) Activar el complemento contribuyendo a la atracción hacia el foco de los monocitos y su posterior activación, facilitando el depósito de antígenos a nivel de las células dendríticas foliculares de los nódulos linfáticos regionales, las cuales presentan receptores para factores del sistema del complemento (Rimaniol y cols., 2007).

) Ejercer efectos en la migración celular, atrayendo a células mononucleares al punto de inoculación y dando lugar a la formación de un granuloma, provocando igualmente una proliferación linfoide en los nódulos linfáticos que drenan la zona. Estas dos acciones podrían favorecer la interacción entre el antígeno y las células presentadoras de antígenos (Warren y cols., 1986).

Los adyuvantes más comúnmente usados son:

- Adyuvante completo de Freund ó FCA.
- Adyuvante incompleto de Freund ó FIA.
- Al (OH)₃ o hidróxido de aluminio (Bomford y cols., 1989).
- Adyuvante RIBI.
- Adyuvantes del tipo de saponinas (Quil A).
- Montanide ISA 70 (Golden y cols., 2010).
- Montanide ISA 206 (Golden y cols. 2010).
- Adyuvac (Maglioli y cols., 2011)

Independientemente del producto usado, se ha demostrado en ocasiones un significativo “efecto adyuvante”, lo que significa que se obtiene una cierta protección frente a *F. hepatica* en grupos a los que únicamente se les había administrado el adyuvante sin antígeno específico.

Actualmente algunos investigadores han optado por usar en ensayos vacunales el denominado sistema ADAD, el cual se compone de una saponina (QuilA), un inmunomodulador (usualmente un extracto del helecho *Polypodium leucotomos*) y

como excipiente un aceite no mineral (Montanide) que permite una liberación lenta del antígeno (Martínez-Fernández y cols., 2004).

6.4.- Estrategias vacunales y antígenos candidatos

El objetivo del siguiente apartado es presentar una revisión de los datos más recientes acerca del desarrollo de vacunas frente a fasciolosis desde los primeros inicios usando vacunas irradiadas atenuadas hasta las nuevas estrategias que se están testando recientemente para el desarrollo de vacunas recombinantes y de DNA.

6.4.1.- Vacunas de ácidos nucleicos

Se trata del desarrollo de vacunas que utilizan DNA codificantes (DNAc) de antígenos protectores. En este tipo de vacunas se usan plásmidos que contienen un inserto, donde se codifica el antígeno deseado, y que se inoculan mediante inyección intradérmica o intramuscular. El plásmido construido contiene un promotor (RNA) similar al promotor que utiliza un citomegalovirus que dirige la expresión del antígeno deseado en las células de los mamíferos. Dada la elevada eficacia obtenida al usar las catepsinas como inmunógenos, este antígeno ha sido uno de los más usados en las nuevas vacunas basadas en DNA. Así, por ejemplo, se han realizado experiencias con DNAc de cisteína-proteasas de *F. hepatica* en ratas (Kofta y cols, 2000; Wedrychowicz y cols., 2003), obteniéndose importantes reducciones de carga parasitaria (entre el 74-100%). Sin embargo, se ha de tener en cuenta que el animal usado en dicho experimento fue la rata, la cual ya muestra de forma natural cierta resistencia (Kofta y cols., 2000). Usando una

modificación de la técnica anterior en la cual el antígeno se formuló en cuerpos de inclusión y la vacuna se inoculó intranasalmente se obtuvieron reducciones de carga parasitaria de hasta un 54% en vacuno y 56% en ovino (Wedrychowicz y cols., 2007). Estos resultados sugieren por lo tanto, que este tipo de vacunas pueden ser una alternativa viable frente a las vacunas convencionales de rumiantes con antígenos proteicos, sin embargo, tras estos resultados prometedores no se ha obtenido protección consistente en otros ensayos posteriores realizados en ovinos.

6.4.2.-Vacunas irradiadas atenuadas

Son vacunas a partir de parásitos vivos atenuados mediante radiaciones. Este tipo de vacunación ha tenido éxito en bovinos, obteniéndose niveles de protección que oscilaron entre el 30 y el 85'5% de reducción en la carga parasitaria (Dargie y cols., 1974; Nansen, 1975; Acosta y cols., 1989). Sin embargo, en ratas, ratones, conejos y ovinos generalmente no han funcionado (Dawes y Hughes, 1964; Boray, 1967; Dargie y cols., 1974; Harness y cols., 1976; Harness y cols., 1977; Campbell y cols., 1978; Hughes y cols., 1981).

A pesar de que las ovejas han sido vacunadas con éxito contra *F. gigantica* y *Schistosoma mattheei* usando metacercarias irradiadas, con un 80% y 56-78%, respectivamente de reducción en la carga parasitaria (A'Gadir y cols., 1987; Taylor, 1987) parece poco probable que éstas desarrollen protección eficaz frente a *F. hepatica* usando este tipo de vacuna, ya que varios estudios parecen sugerir que la supervivencia de *F. hepatica* en ovejas es la suma de dos variables: por un lado la variación en la falta de

respuesta del hospedador, y, por otro lado la resistencia del parásito a ser destruido por el sistema inmune (Spithill y cols., 1997).

6.4.3.- Antígenos definidos

Uno de los requisitos que deben cumplir las vacunas frente a *F. hepatica* es su reducido coste para que pueda generalizarse su uso en rumiantes. Por este motivo durante los últimos años se ha trabajado con varios antígenos definidos que permiten su producción recombinante a gran escala (Dalton y cols., 2003b).

J) "Proteínas Transportadoras de ácidos grasos" (FABP)

Bajo este nombre se engloba una familia de proteínas encargadas de unirse y transportar una gran variedad de ligandos hidrofóbicos como pueden ser el oleato, palmitato y gran variedad de ácidos biliares. Existen una gran variedad de FABPs descritas tanto en vertebrados como en invertebrados y cuya característica más significativa es la conservación de su tamaño, que oscila entre 14 y 16 kDa de masa y entre 127 y 133 aminoácidos de longitud (Veerkamp y cols., 1991). De toda esta familia de proteínas la mejor caracterizada es la familia de las FABP citoplasmáticas.

El candidato más idóneo parecen ser las proteínas FABP de *Schistosoma mansoni*, en concreto la proteína Sm14, como demuestra el estudio llevado a cabo por Tendler y cols., en 1996, donde se utilizó una proteína recombinante de Sm14 en conejos y ratones. Los resultados en conejos revelaron reducción de la carga parasitaria del 89% tras infectar con 1000 cercarias de *Schistosoma*. En ratones, los resultados arrojaron unos niveles de

protección de entre el 37% al 66% frente a *Schistosoma mansoni*, aunque el dato más interesante fue que mostró un porcentaje de protección del 100% frente a infección por *Fasciola hepatica*. En cabras inmunizadas con el antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* se produjo una reducción de la carga de un 45,9% de los grupos vacunados con respecto a los infectados no vacunados (Zafra y cols., 2008)

) Glutación-S-transferasa (GST)

Las Glutación-S-transferasas (GSTs) comprenden a una familia de isoenzimas involucradas en la detoxificación de un amplio rango de sustratos químicos a través de la conjugación con el glutatión, de manera que el producto se vuelve más soluble en agua, menos tóxico y mucho más fácil de excretar. Se trata, en mamíferos, de seis clases de enzimas diméricas (alfa, mu, pi, theta, sigma y kappa) compuestas por subunidades de entre 24 y 29 kDa y que comparten un alto porcentaje de su secuencia de aminoácidos (70% aproximadamente) diferenciándose dentro de las de una misma clase en pequeñas secuencias (aproximadamente el 30%) (Mannervik y cols., 1985; Meyer y cols., 1991; Ji y cols., 1995; Pemble y cols., 1996). Se ha demostrado que este tipo de enzimas son muy abundantes en los helmintos (Brophy y cols., 1990; Brophy y cols., 1994), donde la GST juega un papel muy importante en distintos aspectos de la vida del parásito como pueden ser el mantenimiento de la homeostasis, la supervivencia ante la exposición a xenobióticos (Brophy y cols., 1994), relación con la actividad enzimática con productos procedentes de la peroxidación lipídica (O'Leary y Tracy, 1988; Brophy y Barret,

1990; Brophy y cols., 1990; Salvatore y cols., 1995) y un papel protector frente a radicales libres exógenos del hospedador (Brophy y Pritchard, 1994).

Diversas experiencias se han llevado a cabo, con el fin de purificar GST a partir de formas adultas de *Fasciola* mediante cromatografía de afinidad usando una columna de glutatión (Howell y cols., 1988; Brophy y cols., 1990; Wijffels y cols., 1992; Sexton, 1994) así como otras experiencias donde se trabajó con GST recombinantes de *Fasciola*, estos resultados indican que, en *F. hepatica* se expresan múltiples GSTs de la clase mu y que esto permite una gran diversidad en la especificidad ante los sustratos necesaria para poder sobrevivir en el hospedador. Estudios llevados a cabo en ovejas vacunadas con GST nativa e infectadas con *F. hepatica* mostraron que la reducción de la carga parasitaria recogida de las hígados de ovejas vacunadas fue variable (6-65%) dependiendo del adyuvante usado (Sexton y cols. 1990; Sexton y cols., 1994). Otro estudio mostró una reducción variable en la carga parasitaria (49-69%) en vacas vacunadas con GST nativa, siendo el mejor resultado obtenido con el adyuvante Quil alsqualene montanide® (Morrison y cols., 1996). Otros estudios realizados en ovejas no mostraron una reducción significativa de la carga parasitaria en el grupo vacunado con GST nativa en comparación con el grupo control de infección (Zafra y cols., 2010), y en otro estudio donde se vacunaron ovejas con GST recombinante de clase sigma tampoco mostró una reducción de la carga parasitaria en cabras vacunadas (Zafra y cols., 2013b; Zafra y cols., 2013c).

) Hemoglobina y Paramiosina

Los resultados más esperanzadores se consiguieron cuando se usó como vacuna una mezcla de hemoglobina y catepsina L2 ya que no sólo se consiguió una reducción en la viabilidad de los huevos, sino también en la carga parasitaria (72'4%), convirtiéndose en un candidato idóneo para una vacuna comercial si sus resultados fueran reproducibles. El mecanismo mediante el cual la hemoglobina de *F. hepatica* induce la acción del sistema inmune todavía es un misterio, aunque las propiedades relativas al almacenamiento de oxígeno que tiene la hemoglobina pueden jugar un papel vital (Dalton y cols., 1996). En un estudio llevado a cabo en ratones vacunados con el antígeno paramiosina (Sm97) de *Schistosoma mansoni* e infectados con dicho parásito, se obtuvo un 43% de protección en animales vacunados con antígenos solubles del parásito libres de paramiosina y un 39% de protección en aquellos animales vacunados solo con paramiosina, sugiriendo que una combinación de ambos podría inducir niveles de protección mayores (Pearce y cols., 1988)

) Catepsinas-L

Son un conjunto de proteasas del tipo cisteína-proteasas secretadas por todos los parásitos helmintos, y son cruciales en la interacción entre el parásito y su hospedador. Estas enzimas proteolíticas proceden del material excretor-secretor (FhES) del parásito. Se estima que la producción de catepsina L por parte de un adulto de *F. hepatica* puede llegar hasta 1 µg/h (Collins y cols., 2004). Otro dato que confirma la importancia de estas enzimas en

el ciclo vital del parásito es que cerca del 15% de su transcriptoma codifica cisteína-proteasas (Dalton y cols., 2003b).

Las catepsinas se pueden dividir en diferentes subtipos, que el parásito durante su evolución va modulando según sus necesidades. Así, por ejemplo, durante la migración intestinal y peritoneal, en las larvas recién desenquistadas, predomina la expresión de catepsina B (Beckam y cols., 2006) y L3, mientras que al alcanzar el hígado el parásito aumenta la producción de catepsina L1 y L2 y disminuye la de las anteriores. En los parásitos adultos es el grupo de la catepsina L el que predomina en el FhES (Smith y cols., 1993).

Se ha estudiado especialmente la catepsina L ya que se postulaba que estaba involucrada en aspectos funcionales importantes de la vida del parásito como pueden ser la penetración en el tejido (Howell, 1966; Smith y cols., 1993; McGinty y cols., 1993; Berasain y cols., 1997) adquisición de nutrientes (Halton, 1967; Dalton y Heffernan, 1989; Rege y cols., 1989; Yamasaki y cols., 1992; Smith y cols., 1993; Dowd y cols., 1994) y la producción de huevos (Wijffels y cols., 1994; Dalton y cols., 1996; Spithill y Morrison, 1997). Además, las catepsinas L están implicadas en la evasión inmune de *Fasciola*. De este modo se ha demostrado que la catepsina L1 provoca la rotura de las regiones Fc de los anticuerpos (Chapman y Mitchell, 1982; Dalton y Heffernan, 1989; Smith y cols., 1993; Smith y cols., 1994), también previenen el ataque mediado por anticuerpos procedente de las células efectoras del hospedador ante las formas juveniles (Goose, 1978; Carmona y cols., 1993; Smith y cols., 1993; Smith y cols., 1994), así como la generación de

grumos de fibrina que podrían evitar el acceso a la superficie del parásito de las células efectoras (Dowd y cols., 1995). El mismo hecho se ha demostrado igualmente con la catepsina L2, la cual provoca coágulos sanguíneos debido a su acción sobre el fibrinógeno, dando lugar a émbolos de fibrina que evitan el acceso de las células defensivas a la superficie del trematodo (Dowd y cols., 1995; Carmona y cols., 1993; Carmona y cols., 1994).

Al mismo tiempo las catepsinas L pueden modular la expresión en superficie de CD4 por parte de los linfocitos T (Prowse y cols., 2002), lo cual conlleva que dichos linfocitos sean incapaces de proliferar.

Las catepsinas L pueden intervenir igualmente en la supresión y/o modulación de la respuesta inmunitaria tipo Th1 (O'Neill y cols., 2000; Prowse y cols., 2002; Dalton y cols., 2013), induciendo una respuesta inmunitaria no protectora tipo Th2 (con producción de IL-4, IL-5 y IL-2 y bajos niveles de IFN- γ), que favorece la supervivencia del parásito. De hecho, se ha demostrado que las cisteína-proteasas de helmintos parásitos son capaces de provocar la liberación de IL-4 desde células cebadas y basófilos en ausencia de un estímulo por parte de la IgE (Machado y cols., 1996).

Podríamos entonces concluir que las catepsinas de *F. hepatica* participan de forma activa en su ciclo desde el desenquistamiento de la metacercaria hasta la llegada del parásito a los conductos biliares, ayudando al parásito a nutrirse, a crecer y a moverse a través del intestino y parénquima hepático. A su vez, participa en los procesos de evasión inmune, evitando la

producción de una respuesta inmune eficaz por parte del hospedador frente a nuevas infecciones.

En caprinos y ovinos parasitados con *F. hepatica* los anticuerpos que se desarrollan frente al parásito son fundamentalmente IgG1 y escasa o ninguna cantidad de IgG2, estando la respuesta altamente polarizada hacia una respuesta Th2, lo cual explicaría la alta susceptibilidad de estas especies (Mulcahy y cols., 1998; Mulcahy y cols., 1999). La respuesta de anticuerpos a vacunas basadas en la catepsina L incluye altos títulos tanto de IgG1 como IgG2 sugiriendo una respuesta de tipo mixto Th1/ Th2 (Mulcahy y cols., 1998; Mulcahy y cols., 1999). Sin embargo, la inducción de esta respuesta Th1/Th2 depende del adyuvante usado en la vacuna (Adyuvante de Freund completo o incompleto). Una posible hipótesis que explicaría por qué la vacunación con catepsinas provoca una respuesta inmunitaria diferente sería que, al bloquearse las funciones de la catepsina L, se evitara la supresión de la respuesta Th1 y la inducción de una respuesta Th2 (Mulcahy y cols., 1999).

Uno de los efectos vacunales de este antígeno es el marcado descenso en la capacidad reproductora del parásito (50-98%), y fecundidad de los huevos de éste (Wijffels y cols., 1994; Dalton y cols., 1996; Mulcahy y cols., 1998), por lo cual parece ser que el efecto de la vacuna reside en una acción directa en los órganos reproductivos (Wijffels y cols., 1994; Dowd y cols., 1997). Este hecho, hace que dicho antígeno sea interesante para disminuir la transmisión en los pastos, disminuyendo así el número de huevos

eliminados al medio y el número de metacercarias viables (Mulcahy y cols., 1998).

Por otro lado, los efectos de la vacunación con catepsinas sobre la carga parasitaria, varían según la especie de hospedador, isotipo enzimático, adyuvante vinculado y el uso de otras moléculas para potenciar el efecto vacunal. Así, se ha observado un efecto protector del 60% si en la formulación de la vacuna se unen ambas catepsinas L1 y L2, (Mulcahy y cols., 1999). También se observó como la vacuna aumentó su eficacia al combinarse con FhHb (hemoglobina de *F. hepatica*) (Dalton y cols., 1996). En ensayos de campo en vacuno la inmunización con FhCL1 en adyuvante Montanide Isa 70VG indujo una reducción del 47'2% de la carga parasitaria en el adyuvante Montanide ISA 206VG la reducción fue del 49'2% (Golden y cols., 2010).

Ensayos vacunales posteriores demostraron un aumento de la protección, así el uso de vacunas formuladas con catepsinas de formas juveniles y adultas del parásito (catepsina L5 y B) indujeron hasta el 83% de reducción en la carga parasitaria en ratas (Jayaraj y cols., 2009). Igualmente, Harmsen y cols., (2004), demostraron una reducción de hasta el 76% en la población parasitaria al vacunar ratas con catepsina L3, procedente de formas juveniles de *F. hepatica*. En otros estudios llevados a cabo en cabras infectadas con *F. hepatica* no se encontraron ninguna diferencia significativa en las cargas parasitarias, en el contaje de huevos, ni en las longitudes de los parásitos entre los grupos vacunados con CL1 y los grupo infectados (Pérez-Ecija y cols., 2010; Zafra y cols., 2013a).

7.-TÉCNICA DE qRT-PCR Y ESTUDIOS LLEVADOS A CABO

7.1. Generalidades de la técnica

Existen muchos métodos en biología molecular que miden expresión génica. Sin embargo, la mayoría presentan más defectos que ventajas: requieren mucho tiempo de trabajo e intensivo, no son lo suficientemente sensibles, tienen bastante probabilidad de que haya contaminación cruzada (Reischl y cols., 2002). Entre ellas, la técnica de la qRT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se ha convertido en una metodología de referencia para la detección y cuantificación de transcritos, ya que destaca por su extraordinaria sensibilidad, emanada de la naturaleza exponencial de la PCR.

La qRT-PCR en tiempo real presenta algunas limitaciones y entre ellas es la presencia de posibles inhibidores que den interferencias a la hora de llevar a cabo la técnica (Wilson, 1997). Pero aun así, presenta otras muchas ventajas como en primer lugar la poca variabilidad que hay entre ensayos, teniendo como consecuencia la generación de resultados fiables y reproducibles. En segundo lugar, hay que resaltar el amplio rango dinámico (más de siete órdenes de magnitud) permitiendo así el análisis de transcritos con diferentes abundancias en sus niveles basales, pudiendo variar en varias órdenes de magnitud. Y en tercer lugar, esta técnica permite la utilización de fluorocromos permitiendo así la monitorización de la amplificación de cada producto de PCR en cada ciclo, evitando a su vez la manipulación de las muestras tras la reacción de PCR (Klein, 2002; Bustin y Mueller, 2005; Luu-The y cols., 2005).

La combinación de la técnica de PCR con el uso de la fluorescencia permite que mediante qRT-PCR en tiempo real se pueda medir la cantidad de DNA sintetizado durante el transcurso de la reacción de amplificación. La qRT-PCR usa polimerasas de DNA termorresistentes que replican la cadena de DNA usando oligonucleótidos cortos y específicos denominados cebadores. Para poder cuantificar transcritos, es necesario incluir un paso previo a la amplificación que convierte el RNA a DNAc mediante el uso de retrotranscriptasas. Los cebadores han de diseñarse cuidadosamente, para que generen una única secuencia de amplificación con eficiencias del 100%, por lo que es conveniente que tengan altas temperaturas de fusión. El termociclador donde se lleva a cabo la técnica consta un lector de fluorescencia, el cual, permite que la fluorescencia emitida tenga un seguimiento a tiempo real. Los fluorocromos a utilizar pueden ser inespecíficos o sondas moleculares dependientes de la secuencia. Las sondas de hidrólisis son oligonucleótidos fluorogénicos de cadena sencilla, las cuales se unen sólo a la secuencia de DNA que se encuentra entre ambos cebadores dando un producto de PCR específico (Holland y cols., 1991). Su uso incrementa la especificidad de la cuantificación. En la realización de este trabajo se usó SYBR Green I, un fluorocromo inespecífico que se une al DNA de doble cadena, permitiendo la cuantificación de la tasa de generación de cualquier producto de PCR con el tiempo (Schneeberger y cols., 1995). SYBR Green es un fluorocromo que se intercala en dobles cadenas de DNA para monitorear la amplificación del gen objetivo específicamente iniciado por cebadores específicos de los genes objeto. La desventaja es que este fluorocromo es inespecífico, lo

que puede llegar a generar falsos positivos. Otros inconvenientes serían que la intensidad de la reacción se afecta por la longitud del amplicón (Schneeberger y cols., 1995) y que sólo es posible cuantificar un transcrito en cada reacción de PCR. Pero presenta otras ventajas, ya que simplifica la técnica y abarata el coste de la misma, evitando el diseño y síntesis de sondas específicas para cada transcrito que se desee cuantificar.

El ciclo al cual la fluorescencia emitida se incrementa por encima del ruido de fondo, determinando la posición del umbral de fluorescencia, es lo que determina la sensibilidad del equipo. Se llama Ct o ciclo umbral (threshold cycle) al punto de intersección entre la fluorescencia de la reacción y la línea correspondiente a la fluorescencia umbral. Este valor está relacionado de manera inversa con el número de moléculas iniciales mediante la ecuación:

$$X_{Ct} = X_0 + (1 + E)^{Ct}$$

X_0 representa el número de moléculas de transcrito iniciales, X_{Ct} representa la cantidad de moléculas cuando se alcanza el valor de fluorescencia representado por el Ct (número mínimo de ciclos de PCR necesarios para detectar amplificación partiendo de una determinada cantidad de transcrito, que se denomina ciclo umbral o Ct) y E representa la eficiencia de amplificación de los cebadores usados. Las curvas de amplificación de cada muestras, las cuales se corresponden con la fluorescencia emitida, se representan en el software, donde cada curva de amplificación se corresponde con un valor de Ct (Cycle threshold).

El análisis de los datos obtenidos se puede llevar a cabo por cuantificación relativa o absoluta. Ambos usan los valores de Ct para cuantificar la expresión génica. En la cuantificación relativa los datos estandarizados informan sobre el número de veces que la cantidad de un transcrito aumenta o disminuye en un experimento concreto y con respecto a un grupo de referencia. Pero este tipo de cuantificación requiere del uso de estándares que permitan detectar la variabilidad producidas por pequeños cambios en la eficiencia que puedan dar lugar a grandes diferencias en el número final de copias debido a la naturaleza exponencial de esta técnica. Los estándares más empleados son genes de expresión teóricamente constitutiva (*housekeeping*) cuyos transcritos deben presentarse siempre en las mismas cantidades en todas las condiciones experimentales valoradas (Dheda y cols., 2004). El problema de este tipo de cuantificación es que no se conoce la cantidad exacta de transcritos de los genes en estudio, sólo se conoce los cambios relativos entre ellos, lo que no da idea del verdadero valor biológico del cambio observado. En la cuantificación absoluta, por el contrario, se obtiene el número exacto de moléculas de cada transcrito en cada una de las muestras valoradas. Las ventajas que proporciona esta cuantificación son: (i) ofrecen una visión exacta del significado biológico de los cambios de expresión transcripcional ya que informan sobre los niveles basales de cada transcrito. De esta manera la cuantificación absoluta no da una idea de lo grande o pequeño que es el cambio dándole a su vez un valor biológico, ya que cambios pequeños en términos relativos en transcritos abundantes suponen cambios grandes en número de moléculas que pueden tener más impacto en

las células y ser de mucha más relevancia biológica que cambios relativos espectaculares en transcritos raros o infrecuentes, que se traducirían en pequeños cambios en términos absolutos (Jurado y cols. 2003, Prieto-Alamo y cols. 2003). (ii). En la cuantificación absoluta no se asume que los transcritos de referencia tengan que estar siempre presentes en la misma cantidad debido a que los datos no están estandarizados (Hamalainen y cols., 2001; Prieto-Alamo y cols., 2003; Monje-Casas y cols., 2004).

La cuantificación absoluta de un transcrito por qRT-PCR en tiempo real está basada en la construcción de una recta patrón o recta de calibración que relaciona la señal de fluorescencia obtenida en la amplificación con el contenido de RNA en la muestra. Esta recta patrón se realiza con diluciones seriadas (10⁹ hasta 10² moléculas) de RNA que se retrotranscriben y amplifican por PCR en tiempo real. La recta patrón se obtiene a partir de la representación del logaritmo del número de moléculas iniciales de RNA frente al Ct correspondiente (Kuhne y cols., 2002).

7.2. Estudios actuales realizados con qRT-PCR

La técnica de qRT-PCR tiene en la actualidad numerosas aplicaciones que van desde realizar diagnósticos microbiológicos como para realización de investigaciones biomédicas, pudiéndose evaluar la expresión génica para la detección de determinado tipo de enfermedades o medir la carga viral o bacteriana presentes en un organismo y así poder aplicar tratamientos antibióticos eficientes (Mackay y cols., 2002; Mackay, 2004)

En el estudio de la fasciolosis causada por *F. hepatica* se han llevado a cabo diversos estudios usando la técnica de qRT-PCR con el fin de valorar a nivel de transcritos la respuesta inmune del hospedador hacia el parásito. Estos estudios se han llevado a cabo en varias especies. Un estudio realizado en el ganado vacuno cuyo objetivo fue valorar la expresión de IL-4 e IFN- γ en PBMCs y NLH en etapas tempranas a la infección tuvo como resultado una respuesta inmune de tipo Th2 a los 10 días postinfección (Waldvogel y cols., 2004). Otro estudio cuantificó las citoquinas IL-4, IFN- γ e IL-10 en hígados de vacas en estadios crónicos de la enfermedad, en este caso también obtuvieron una polarización de la respuesta hacia una respuesta Th2 (Mendes y cols., 2013). Otro estudio llevado a cabo en ratas evaluaba las mismas citoquinas en hígado en estadios tempranos de la enfermedad obteniendo como resultado una polarización hacia un perfil de respuesta Th2 a partir del día 11 de infección, sugiriendo que las células en contacto directo con el parásito podrían virar el tipo de respuesta antes que en órganos menos directos como el NLH (Tliba y cols., 2002). En ratones también se han desarrollado estudios donde valoraron la expresión de citoquinas IL-4, IFN- γ , IL-10 y TNF- α , entre otras. Estos animales además de ser inoculados con un tipo de FABP (Fh12) de *F. hepatica*, se les inoculó con lipopolisacáridos (LPS) de *E. Coli*. El resultado fue una supresión de todas las citoquinas presentes en el suero sanguíneo, en comparación con los animales que solo fueron inyectados con los LPS. Se produjo así una disminución de las citoquinas asociadas con las respuestas inflamatorias, disminuyendo la respuesta Th1 (Martin y cols., 2015). También se ha desarrollado algún estudio en PMBCs de

conejos vacunados con la proteína recombinante FhSAP2 para comparar la respuesta inmune con otros grupos no vacunados. El resultado fue un aumento de la Th1 en animales vacunados frente a los no vacunados. Al mismo tiempo se observó que el método de qRT-PCR puede ser útil para controlar los cambios de la respuesta inmune en modelos de conejos infectados con *F. hepatica* (Espino y Rivera, 2010).

La mayoría de estos estudios llevados a cabo en otras especies diferentes a la oveja resaltan la importancia del estudio de las respuestas Th1 y Th2 en esta enfermedad, ya que es necesaria una polarización hacia el tipo Th1 para poder luchar contra la enfermedad (Mulcahy y cols., 1999). Estudios llevados a cabo en ovejas sobre NLH para valorar la respuesta inmune comparándola con animales infectados con *F. hepatica* y *F. gigantica*, han demostrado un desequilibrio hacia una respuesta de tipo Th2 en *F. hepatica* (Pleasance y cols., 2011). Hacariz y cols. en 2009 valoraron las citoquinas reguladoras IL-10 y TGF- β en dos grupos de ovejas clasificados en ovejas con alta carga parasitaria y ovejas con baja carga parasitaria. La conclusión de su estudio es que las ovejas con mayor carga parasitaria mostraban una menor expresión de TGF- β , sugiriendo que la falta de expresión de dicha citoquina podría ser responsable de la falta de formación de colágeno en hígado de esos animales, lo que podría estar induciendo una mayor severidad en las lesiones hepáticas y, por ende, mayor carga parasitaria (Hacariz y cols., 2009).

Cabe destacar que todos estos estudios se han basado en el efecto de la infección frente a animales no infectados o con

diferentes cargas parasitarias. Y no se han llevado a cabo para valoraciones más específicas de la respuesta inmune Th1/Th2 en ovejas vacunadas, ni se han hecho comparaciones de hígado con NLH.

MATERIAL

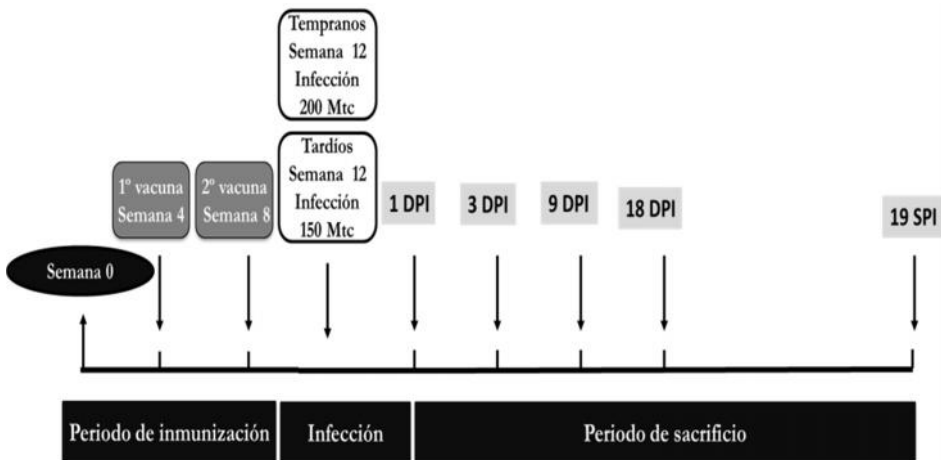
Y MÉTODOS

1.-DISEÑO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo la experiencia 1 en fases tempranas se usaron 44 ovejas hembras de Raza Merina de 7 meses de edad. Los animales se adquirieron al destete, procedentes de una granja libre de fasciolosis y se mantuvieron estabulados en la granja experimental de la Universidad de Córdoba hasta que alcanzaron la edad adecuada para comenzar el experimento. Previamente a la experiencia, a todos los animales se les realizó mensualmente tanto la técnica coprológica de sedimentación, como técnica de ELISA en suero. En todos los casos fueron negativos tanto en la eliminación de huevos del parásito como en la presencia en suero de IgG específica de catepsina L1 de *Fasciola hepatica* (FhCL1). El diseño y temporalización de la experiencia se muestran de forma resumida en la **gráfica 1**. Las ovejas, se distribuyeron en dos grupos diferentes. El **grupo 1 (n=20)** corresponde con animales inmunizados por vía subcutánea con dos dosis, separadas en el tiempo, 4 semanas. La vacuna consistía en 100 µg de CL1 recombinante de *F. hepatica* (rCL1) en 2ml de Montanide ISA 70 VG (Seppic, Puteaux, Francia). La rCL1 fue generosamente cedida por el Prof. John Dalton (Queen's University Belfast, Belfast, Reino Unido). El **grupo 2 (n=20)** se usó como controles de infección y el tercer grupo, **grupo 3 (n=4)**, se usó como controles negativos no infectados ni vacunados. Los grupos 1 y 2 se infectaron oralmente con 200 metacercarias de la cepa South Gloucester de *F. hepatica* (Ridgeway, Gloucestershire, Reino Unido) vehiculadas en cápsulas de gelatina. Ambos grupos a su vez se dividieron cada uno en 4 subgrupos (**n=5**). Estos subgrupos se correspondieron con el día

post infección (dpi) en que fueron sacrificados. De este modo, los subgrupos fueron los siguientes: 1 dpi, 3 dpi, 9 dpi y 18 dpi.

Con el objetivo de poder estudiar la eficacia de la vacuna se realizó una experiencia 2 utilizando 34 ovejas, hembras, de raza Merina de la misma edad, que fueron divididas en 3 grupos. El **grupo 4** (n=13) estaba compuesto por animales inmunizados de igual forma que el grupo 1. El **grupo 5** (n=12) correspondió a animales inmunizados sólo con el adyuvante y finalmente el **grupo 6** (n=9) que fue usado como control de infección. Estos 3 grupos fueron infectados oralmente con 150 metacercarias de la cepa South Gloucester de *F. hepatica* de igual forma que en la experiencia anterior con la diferencia de que estos animales fueron sacrificados a las 19 semanas post infección (fases tardías) para valorar la carga parasitaria.



Gráfica 1. Temporización de las inmunizaciones, infección y sacrificio de los grupos 1 al 6.

En ambas experiencias cuando se recibieron las metacercarias, se mantuvieron en agua destilada y a 4 °C hasta su uso. Previamente a las infecciones experimentales se realizó un estudio de viabilidad de las metacercarias que resultó ser de un 95%.

Todos los animales fueron eutanasiados mediante inyección intravenosa en la vena yugular de la solución eutanásica T-61 ® (Intervet, España). El sacrificio se llevó a cabo de manera humanitaria y el experimento fue aprobado por el Comité de bioética de la Universidad de Córdoba (No.1118) y bajo el acuerdo de directivas de experimentación animal europeas (2010/63/UE) y españolas (RD 1201/2005).

1.1 Estudio parasitológico

Para llevar a cabo el estudio parasitológico (experiencia 2) se recogieron muestras de heces de cada animal durante las semanas post-infección (spi) 8, 10, 12, 14, 16, 19. Dicho estudio se llevó a cabo mediante la técnica coprológica de sedimentación. El hígado se diseccionó de forma cuidadosa y la vesícula biliar, abriendo los canalículos biliares para recoger todas las fasciolas, las cuales fueron medidas y pesadas.

1.2 Estudio histopatológico

1.2.1 Estudio macroscópico

Los hígados se extrajeron haciendo previamente una ligadura proximal del colédoco al nivel de su desembocadura en el duodeno con fines estéticos en sacrificios tempranos, para las

posteriores fotografías de los mismos y con el fin de evitar la posible salida de los parásitos por dicho conducto en sacrificios tardíos. Para llevar a cabo el estudio macroscópico se tomaron fotografías tanto de la cara diafragmática como visceral del hígado de los animales de sacrificios tempranos (grupos 1 y 2) y se realizó un conteo semiautomático de las lesiones observadas (fundamentalmente trayectos blanquecinos tortuosos y puntos hemorrágicos). La valoración se llevó a cabo mediante el software biomédico Image J v.1.51 (U. S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos) Los resultados se expresaron como promedio del número de lesiones \pm desviación estándar.

1.2.2 Estudio microscópico

1.2.2.1 Material

El material usado para el procesado de las muestras y tinciones histoquímicas es el siguiente:

-) Procesador automático de tejidos (Citadel™, Shandon®).
-) Consola montadora de bloques (Histocentre 2™, Shandon®).
-) Estufa a 37°C.
-) Microtomo (RM 2125RT, Leica®).
-) Cubeta de baño histológico.

-) Formol tamponado 10% (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania).
-) Alcohol 60º,70º,80º,96º y 100º (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania).
-) Xilol puro (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania).
-) Parafina con punto de fusión a 58ºC (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania).
-) Teñidor automático (Tissue Tek DKS, Sakura, Estados Unidos)
-) Hematoxilina de Harris (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania).
-) Eosina (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania).
-) Tricrómico de Masson (Bio-Optica, Milán, Italia)
-) Medio de montaje Eukitt® (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania).
-) Portaobjetos (Deltalab, Barcelona, España)
-) Cubreobjetos (Deltalab, Barcelona, España)

1.2.2.2 Procesado de muestras

De cada animal se tomaron 6 muestras de hígado y 3 de nódulo linfático hepático (NLH), las cuales se fijaron en formol tamponado al 10% (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania) durante 24 horas. Después de ese tiempo, las muestras fueron talladas y procesadas en un procesador de tejidos automático (Citadel™, Shandon®). Durante este proceso fueron deshidratadas en gradientes crecientes de alcohol, pasaron a xilol y finalmente fueron incluidas en parafina líquida. El protocolo del procesado se describe a continuación:

- Formol: 1 hora
- Alcohol 70 °:1 hora
- Alcohol 96°: 1 hora y 30 min
- Alcohol 96°: 1 hora y 30 min
- Alcohol 100°: 1 hora
- Alcohol 100°: 1 hora y 30 min
- Alcohol 100°: 2 hora
- Xilol: 1 hora
- Xilol: 1 hora y 30 min
- Xilol: 2 horas
- Parafina: 1 hora y 30 min.
- Parafina 3 horas

Posteriormente al procesado, se procedió a realizar los bloques de parafina con las muestras. Para ello se utilizó una

estación de embebido en parafina (Histocentre 2TM, Shandon®) usando parafina líquida a 60°C.

Sobre los bloques fijados y embebidos en parafina se realizaron cortes histológicos de 4µm de grosor en un micrótopo (RM 2125RT, Leica®). Seguidamente, dichos cortes se pasaron a un baño histológico a 37°C para permitir su completa extensión y poder colectarlos en un porta sin que presentaran arrugas. Finalmente las muestras se mantuvieron a 37°C durante 24 horas hasta su completa adhesión al portaobjetos.

La tinción rutinaria para el estudio histológico fue la Hematoxilina-Eosina (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania), llevada a cabo con un teñidor automático (Tissue Tek DKS, Sakura, Estados Unidos). También se llevó a cabo la tinción de Tricrómico de Masson (Bio-Optica, Milán, Italia) usando el protocolo del fabricante, para estudiar la fibrosis periportal. Para sellar las muestras se puso una gota de medio de montaje Eukitt®, (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania) en el cubreobjetos y cuidadosamente se fue apoyando el portaobjetos sobre la gota. Finalmente se eliminaron las burbujas de aire y se dejaron secar las muestras durante 24 horas antes de examinarlas al microscopio.

1.3.- Estudio inmunohistoquímico

1.3.1 Materiales

Los materiales usados en la toma y procesado de muestras, realización de cortes histológicos y técnicas inmunohistoquímicas, se muestra a continuación:

A. Toma de muestras y realización de cortes histológicos

Los materiales usados en la toma de muestras son los mismos que se usaron para el estudio histopatológico, ya que las muestras se fijaron en formol tamponado 10%. Descartando los colorantes ya que las muestras no se tiñeron.

B. Buffers o soluciones tampón

B.1.- *Tampón fosfato salino (PBS) 0'01M, pH 7'2*

-) 1000 ml de agua bidestilada.
-) 1'48 gr de fosfato sódico dibásico anhidro (Merck, Darmstadt, Alemania).
-) 0'43 gr de fosfato potásico monobásico anhidro (Merck, Darmstadt, Alemania)
-) 7'20 gr de cloruro sódico (Merck, Darmstadt, Alemania).

B.2.- *Tampón fosfato salino (PBS)+Tween80 0'01M, pH 7'2*

-) 1000 ml de agua bidestilada.
-) 1'48 gr de fosfato sódico dibásico anhidro (Merck, Darmstadt, Alemania).
-) 0'43 gr de fosfato potásico monobásico anhidro.
-) 7'20 gr de cloruro sódico (Merck, Darmstadt, Alemania).
-) 5 ml de Tween 80 (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania).

B.3.-Tampón Tris salino (TBS) pH 7'6

-Solución Tris Madre pH 7'6.

-) 500 ml agua bidestilada.
-) 60'57 gr Trizma Base (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania).
-) Se añaden 300-400 ml de ácido clorhídrico 1N (458 ml agua + 42 ml de ácido clorhídrico) hasta conseguir un pH final de 7'6.

-Solución salina fisiológica 0'85%

-) 1000 ml de agua bidestilada.
-) 8'5 gr cloruro sódico (Merck, Darmstadt, Alemania).

-Solución de trabajo

-) 100 ml Solución Tris Madre
-) 900 ml Solución salina fisiológica.

C.- Inhibición de la peroxidasa endógena y tratamiento enzimático

-Solución inhibidora de la actividad peroxidasa endógena

-) 6 ml peróxido de hidrógeno (Applichem, Panreac , Gatersleben, Alemania)
-) 194 ml de PBS-Tween80 (Applichem, Panreac Gatersleben, Alemania)

D.- Sueros no inmunes y reactivos específicos

-) Suero normal de cabra (SNCa) al 10% (Immuno™, MP Biomedicals, Ohio, Estados Unidos).
-) Bloqueante de la biotina hepática (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos).
-) Anticuerpo primario específico: monoclonal anti-ratón FoxP3 (clone FJK-16s, rat IgG2a, eBioscience Inc. San Diego, California, Estados Unidos) 1:100.
-) Anticuerpo secundario conjugado: Anti-IgG de rata biotinado desarrollado en cabra (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos) 1:100.
-) Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos). Diluido al 1:50 en PBS (Esta solución se prepara 30 minutos antes de su uso y se mantiene a temperatura ambiente y en oscuridad).

E.- Solución de revelado

Se utilizó un kit NovaRED® (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos) compuesto por varios reactivos:

-) Añadir 3 gotas del **reactivo 1** a 5 ml. de agua destilada.
-) Añadir posteriormente 2 gotas del **reactivo 2** y mezclar bien.
-) Añadir posteriormente 2 gotas del **reactivo 3** y mezclar bien.
-) Añadir posteriormente dos gotas de H₂O₂ y mezclar bien.

1.3.2 Desarrollo de la técnica inmunohistoquímica

Se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico para evaluar la expresión del factor de transcripción FoxP3 en hígado y en NLH. Para este propósito, se usaron muestras fijadas en formol tamponado al 10% e incluidas en parafina. El procesado fue el mismo descrito anteriormente para las muestras histopatológicas, la única diferencia a reseñar es que con el objetivo de mejorar la adherencia de las muestras al portaobjetos, éstos fueron previamente tratados con Vectabond® (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos). La técnica inmunohistoquímica fue desarrollada con el método del complejo de Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC), descrita por Escamilla y cols. (2016):

- 1. Desparafinado:** 3 baños en xilol durante 10 minutos cada uno.
- 2. Rehidratación:** 2 baños en alcohol de 100° durante 5 minutos cada uno, luego 1 baño en alcohol de 96°,70° y un baño en agua destilada durante 5 minutos cada uno.
- 3. Tratamiento:** Después de la hidratación, se llevó a cabo el desenmascaramiento antigénico incubando las muestras en tampón Citrato (pH 6'0) con posterior autoclavado a 121°C y 1 atmósfera de presión durante 10 minutos.
- 4. Baños de PBS:** Las muestras se sumergieron en dos baños distintos de tampón fostato salino (PBS) durante 5 minutos cada uno y en PBS 0'5% Tween 80 (Applichem, Panreac, Gatersleben, , Alemania) durante otros 5 minutos.

5. **Inhibición de la peroxidasa endógena:** se incubaron las muestras en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania) en PBS-Tween 80 (PBST).
6. **Baños de PBST:** Las muestras se sumergieron dos veces en PBST 0'5% durante 5 minutos y una vez en PBS durante 5 minutos.
7. **Bloqueo de reacciones no específicas:** Las muestras se incubaron con suero normal de cabra al 25% y PBS-Tween 80 en cámara húmeda durante una hora a temperatura ambiente.
8. **Bloqueo de la biotina hepática:** Primero las muestras se incubaron durante 15 minutos en Avidina y luego en Biotina durante otros 15 minutos (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos).
9. **Anticuerpo primario:** El anticuerpo monoclonal anti-ratón FoxP3 (clone FJK-16s, rat IgG2a, eBioscience Inc. San Diego, California, Estados Unidos) se diluyó 1:100 en PBS con suero normal de cabra al 10% y se mantuvieron las muestras con la dilución durante toda la noche.
10. **Baños de PBS:** Las muestras se sumergieron 2 veces en PBS durante 5 min cada uno.
11. **Anticuerpo secundario biotinado:** Un suero de inmunoglobulina de cabra anti-rata (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos) se aplicó durante 30 minutos diluido a 1:100
12. **Complejo de Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC):** Después de sumergir las muestras en 3 baños diferentes de PBS

durante 7 minutos, se les aplicó a las muestras el complejo ABC (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos) diluido a 1:50 durante una hora. La solución se prepare 30 minutos antes y se mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad. Las muestras se incubaron en oscuridad y en cámara húmeda.

13. Baños de TBS: Las muestras se sumergieron en 3 baños de tampón salino de TRIS (TBS, pH 7.2).

14. Revelado: Las muestras se incubaron con 100 µl de la mezcla de los componentes del kit de NovaRED® (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos) durante 5 min. La mezcla se preparó un tiempo antes y se mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad.

15. Frenado del revelado: Las muestras se sumergieron en agua del grifo durante 10 minutos.

16. Contrateñido: Las muestras fueron ligeramente contrateñidas con hematoxilina de Mayer durante 15 segundos y posteriormente sumergidas en agua del grifo para eliminar por completo los restos del colorante.

17. Deshidratación: para volver a deshidratar se les dio un pase rápido por alcohol de 70° and 96°, dos baños de 5 minutos en alcohol de 100° y dos baños de 5 minutos en xilol.

18. Montaje: Se montaron con EUKITT® (Appllichem, Panreac, Gatersleben, Alemania).

1.4.-Estudio de PCR a tiempo real

1.4.1.-Materiales para la recogida de muestras

-) Nitrógeno líquido
-) Dietil pirocarbonato (DEPC) (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania)
-) Agua pura biomolecular (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania)
-) Criotubos (Simport, Quebec, Canadá)

1.4.2.-Recogida de muestras

Para realizar el estudio de PCR se recogieron muestras tanto del lóbulo hepático izquierdo como de los NLH, se lavaron en agua biomolecular con Dietil pirocarbonato (DEPC) (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania)(1 ml de DEPC en 1 litro de agua) durante 1 minuto y fueron congeladas de inmediato en nitrógeno líquido para ser almacenadas finalmente a -80°C . Debido a que la técnica de PCR requiere varios pasos previos se ha desarrollado todo en el apartado 5.

2. PARÁMETROS ESTUDIADOS

2.1.- Estudio morfológico macroscópico del hígado

El estudio macroscópico del hígado consistió en contar diferentes tipos de lesiones de la superficie hepática, tales como, trayectos blanquecinos y puntos hemorrágicos utilizando Image J v.1.51 (U. S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland,

Estados Unidos) Los resultados se dieron como número de lesiones \pm DE.

2.2.- Estudio histopatológico del hígado

Se evaluó la presencia de las siguientes estructuras en cada dpi de los estadios tempranos:

- **Trayectos parasitarios**, principalmente los agudos.
- **Granulomas**, originados por antiguos túneles migratorios, rodeados por macrófagos y células gigantes multinucleadas.
- **Infiltrado de eosinófilos**
- **Infiltrado linfoplasmocitario**

Los resultados se expresaron de la siguiente manera: -: ausencia de lesiones; +/-: lesiones discretas; +: lesiones moderadas; ++: lesiones severas; +++: lesiones muy severas.

3. - ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Con el fin de contar las células positivas a FoxP3 tanto en hígado como en nódulos linfáticos hepáticos (NLH) se usaron 3 muestras de hígado y 3 muestras de NLH por animal, y se tomaron de cada muestra 5 microfotografías al azar a 200 aumentos. Para hígados, las fotos se hicieron de los espacios portas debido que eran las zonas que presentaban infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario. Para NLH, las fotos se hicieron de las zonas interfoliculares debido a que la mayor parte de FoxP3 se expresa en esa área.

El conteaje de células positivas se llevó a cabo de manera semiautomática usando Image J v.1.51 (U. S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). Previamente fue necesario el desarrollo de macros específicas para calibrar una adecuada intensidad de tinción, así como el tamaño celular. Los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar.

4. - EVALUACIÓN DE LA FIBROSIS PERIportal

La tinción de Tricrómico de Masson se usó para valorar la fibrosis periportal en hígado. La tinción se hizo con un kit específico siguiendo las indicaciones del fabricante (Bio-Optica, Milán, Italia).

Para valorar la fibrosis se usó el software Image J v.1.51d. (U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). Para ello se usaron 3 muestras de hígado por animal y se tomaron 5 microfotografías de forma aleatoria a 200 aumentos. Fue necesario desarrollar macros específicas para calibrar las medidas e intensidad de las áreas positivas (expresadas en μm^2) a la tinción de Tricrómico de Masson. Los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar.

5. - ESTUDIO DE PCR A TIEMPO REAL

5.1.- Materiales

A. Fungibles

) Mortero (Labbox, Barcelona, España)

-) Cucharas (Labbox, Barcelona, España)
-) Pinzas (Labbox, Barcelona, España)
-) Criotubos (Simport, Quebec, Canadá)
-) T10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA , Staufen, Alemania)
-) Placas de PCR (BioRad, , Hércules, California, Estados Unidos)
-) Eppendorf (Axygen, Union City, Estados Unidos)

B. Alcoholes

-) Alcohol 70° (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania)
-) Etanol absoluto EMSURE®, ACS, ISO (Merk, Darmstadt, Alemania)
-) Etanol 70° EMSURE®, ACS, ISO (Merk, Darmstadt, Alemania)

C. Aguas e inactivadores de RNAasas

-) RNase-ExitusPlus™(Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania)
-) DEPC (dietil pirocarbonato) (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania). Se usó 1 ml de DEPC en 1 litro de agua pura biomolecular.
-) Agua pura biomolecular (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania)
-) Agua libre de nucleasas (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos)

D. Tampones de lisis

-) TRIzol® (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos)
-) RLT (Qiagen, Hilden, Alemania) + Beta mercaptoetanol (BME)(diluido 100x) (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania)

E. Kits y reactivos de extracción

-) Cloroformo (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania)
-) Isopropanol (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania)
-) RNeasy ®mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania)
-) RNase-free DNase I (Qiagen, Hilden, Alemania)

F. Reactivos de PCR

-) iScript™ cDNA Synthesis kit (BioRad, Hércules, California, Estados Unidos)
-) SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supmermix (BioRad, Hércules, California, Estados Unidos)
-) Oligonucleótidos (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos)

5.2.- Desarrollo de la técnica de qRT-PCR**5.2.1.- Extracción de RNA**

El proceso de extracción de RNA se dividió en 3 pasos:

CRUSH: consistió en triturar las muestras de forma individual usando un mortero, el cual se introdujo, junto con el resto del instrumental, en una caja de poliespán con nitrógeno

líquido con el fin de mantenerlos en frío. Las muestras se introdujeron en el mortero para triturarlas hasta tener consistencia arenosa. Las muestras ya trituradas se recogieron con una cuchara de laboratorio y se pusieron en nuevos criotubos que fueron previamente rotulados y enfriados en nitrógeno líquido para ser almacenados a -80°C . Entre una muestra y otra, el mortero y el resto de instrumental se lavaron siguiendo el siguiente protocolo: primero se lavaron con agua del grifo y jabón para eliminar los restos de la muestra anterior, después se cubrieron con alcohol de 70° para eliminar la espuma restante. A continuación, se pulverizaron con RNase-ExitusPlus™ (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania) durante dos minutos para eliminar las RNAasas de superficie. Finalmente se enjuagaron con agua biomolecular DEPC: 1ml de DEPC en 1 litro de agua.

HOMOGENIZACIÓN: el RNA se aisló a partir de 300 mg de del tejido triturado que se mezclaron con 1,5 ml de TRIzol® (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos) usando un homogeneizador T10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA, Staufen, Alemania). Previamente, el rotor del homogeinizador se limpió con peróxido de hidrógeno 10% (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania) para eliminar posibles agentes anaerobios. A su vez, entre una muestra y la siguiente, el rotor se limpió siguiendo este orden: etanol para análisis EMSURE®, ACS, ISO (Merk, Darmstadt, Alemania) al 70° , etanol absoluto para análisis EMSURE®, ACS, ISO (Merk, Darmstadt, Alemania), agua con DEPC, RNase-ExitusPlus™ (Applichem, Panreac, Gatersleben,

Alemania), agua tratada con DEPC y finalmente se secó con una servilleta.

Después de homogeneizar, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm, 4 °C durante 10 minutos para desechar el pellet sucio formado tras la centrifugación. Finalmente las muestras diluidas en Trizol® se mantuvieron en hielo picado hasta seguir con el siguiente paso.

EXTRACCIÓN: a cada muestra se añadió 150 µl de cloroformo (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania) y se centrifugaron a 10000 rpm, 4 °C durante 10 minutos. La centrifugación generó 3 fases diferentes: en profundidad se encontraba la fase orgánica, compuesta por el Trizol® y las proteínas; la capa intermedia contenía el DNA genómico y en la capa más superficial se encontraba la fase acuosa con el RNA.

Después de pipetear la fase acuosa, se le añadió a la misma isopropanol (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania) y se centrifugó a 10000 rpm, 4 °C durante 25 minutos para hacer precipitar el material genético. Una vez precipitado el pellet se lavó dos veces con etanol para análisis 70° EMSURE®, ACS, ISO (Merk, Darmstadt, Alemania) y se disolvió en 100 µl de agua libre de nucleasas (no tratada con DEPC) (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), para luego añadirle 250 µl de etanol absoluto para análisis EMSURE®, ACS, ISO y 350 µl de tampón RLT diluido 100X en Beta mercaptoetanol (BME) (Applichem, Panreac, Gatersleben, Alemania). Desde aquí se usó RNeasy ®mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo a las condiciones del fabricante. Una incubación de 15 minutos con

RNase-free DNase I (Qiagen, Hilden, Alemania) se incluyó en el protocolo para eliminar DNA genómico residual. Finalmente, el RNA aislado se incubó a 65 °C durante 10 min en un termobloque y se almacenó a -80°C hasta su uso.

5.2.2.- Cuantificación y medición de calidad del RNA y síntesis de cDNA

Para cuantificar y medir la calidad el RNA se usó NANODROP™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). La concentración de RNA total se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}). Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA total (Sambrook & Russell, 2001). Las muestras obtenidas tuvieron una cuantificación por encima de los 1000ng/µl Para determinar la calidad se tuvieron en cuenta el valor de los ratios de absorbancia diferentes: la ratio 260/230 indica la presencia/ausencia de contaminantes como fenoles o carbohidratos y la ratio 260/280 indica si hay contaminación por proteínas. La ausencia de contaminación con DNA genómico se comprobó amplificando por PCR las muestras de RNA sin retro-transcribir, con cebadores específicos diseñados sobre el mismo exón de un gen.

El Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos) que se encontraba en el Servicio Central de Ayuda a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, se usó para determinar la integridad del RNA (Fleige y Pfaffl 2006). Este instrumento utiliza tecnología microfluídica que permite la separación electroforética microcapilar de las moléculas de RNA de una forma automatizada y reproducible (Mueller,

Hahnenberger y cols. 2000). El resultado se visualiza como un electroferograma utilizado para extraer un algoritmo que permite el cálculo de un número de integridad de RNA (RIN). Este RIN da valores en el rango de 0 (RNA degradados) a 10 (RNA íntegros) (Schroeder y cols., 2006) y permite estimar con una mayor fiabilidad la integridad del RNA que el patrón de bandas de RNA ribosómico 28S:18S obtenido usando electroforesis en un gel de agarosa.

Una vez valorada la calidad del material genético, las muestras de RNA se diluyeron a 1000 ng/μl para usar 1 μg de RNA total de cada animal para la síntesis de DNAc. Para ello se usó el kit iScript™ DNAc Synthesis kit (BioRad, Hércules, California, Estados Unidos) y se llevó a cabo en un termociclador MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BioRad, Hércules, California, Estados Unidos) El protocolo de retrotranscripción constaba de un paso de incubación de las reacciones a 25 °C durante 10 min (*priming* o cebado), seguido de un paso a 46°C durante 20 min (retrotranscripción) y un paso final a 95°C durante 1 minuto para inactivar la retrotranscriptasa. Las muestras se diluyeron con agua de grado biomolecular hasta una concentración de trabajo de 25 ng/μL y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

5.2.3.-Diseño de cebadores

Las parejas de cebadores de los genes a estudiar: IL4, IFN γ , FoxP3, IL10, TGF β , TNF α and IL1 β en hígado y NLH y los genes constitutivos usados para la normalización: PGK1, B2M, RPLP0, G6PD, SDHA, ACTB, HSP90AA1, GYPC, GUSB, TUBB (**Tabla 1**) se diseñaron sobre secuencias específicas obtenidas de la base de

datos GenBank, con el programa Oligo 7 Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc., <http://www.oligo.net>) como se describió previamente por (Prieto-Alamo, y cols., 2003, Pacheco, Abril y cols., 2017).

El tamaño de los cebadores fue entre 25 y 30 pares de bases y se diseñaron para generar fragmentos de amplificación (amplicones) de longitud comprendida entre 100 y 200 pares de bases. Los dos cebadores de cada pareja se localizaron en diferentes exones cercanos para asegurar la no amplificación de posibles restos de DNA genómico. Para obtener alta especificidad y mejor rendimiento, se requirió que los cebadores no formaran estructuras ahorquilladas ni *duplex* de cebadores y tuvieran valores elevados de T_m ($\geq 68^\circ\text{C}$) y valores óptimos $3'\text{-}\Delta G$ (≤ -6 kcal/mol). Como se indica en la **Tabla 1** (cebadores), las temperaturas de fusión (T_m) de los cebadores fueron considerablemente inferiores a las T_m de los amplicones, que estaban entre 81.6°C y 91.8°C (**Figuras 8 y 9** de resultados y discusión, de las curvas de amplificación). Los altos valores de T_m de los cebadores permitieron llevar a cabo la reacción de PCR en dos pasos: desnaturalización de DNA bicatenario a 94°C e hibridación del cebador y extensión a 68°C , asegurando la especificidad de la reacción de amplificación.

Gen ^a	Número de acceso ^a	Secuencia de cebadores ^b 5'...3'	Cebadores Tm (°C) ^c	Longitud del producto amplificado (pb) ^d	Eficiencia de cebadores (R ²) ^e
<i>IL-4</i>	NM_001009313.2	F 5'-CATGTGCTTGAACAAATTCCTGGGCGGAC-3'	70.7	124	1.001 (99.85)
		R 5'-TAGCCTTTCGAAGAGGTCTCTCAGCGTAC-3'	70.1		
<i>IFN-γ</i>	NM_001009803.1	F 5'-ACCGATTTCAACTACTCCGGCTAACTC-3'	69.5	97	0.993 (99.55)
		R 5'-CAGAAAAACCCAAAAGCACACAGAGCAG-3'	68.1		
<i>TNF-α</i>	NM_001024860.1	F 5'-CCACGCTCTTCTCGCTGCTGCACTTCGG-3'	73.1	146	0.996 (99.56)
		R 5'-AACGCTGGGCTACCGGCTTGTTATTTGAGGC-3'	73.6		
<i>IL-1β</i>	NM_001009465.2	F 5'-GAAGCTGAGGAGCCGCTCGCTACGAACA-3'	68.8	185	1.001 (99.85)
		R 5'-CCAGCACCCAGGATTTTTGCTCTGTCTCC-3'	69.0		
<i>FoxP3</i>	NM_001144947.1	F 5'-GCCCATCTGGCTGGGAAGATGGCCAAACC-3'	76.5	166	0.991 (99.16)
		R 5'-AGAGGTGCCTCCGACGGCAAACAGG-3'	76.2		
<i>IL-10</i>	NM_001009327.1	F 5'-TCAGCCGTGCTCTGTTGCCTGGCTTCC-3'	73.8	124	0.999 (99.9)
		R 5'-GGACGTCCCGCAGCATGTGGGGCAG-3'	73.5		
<i>TGF-β</i>	NM_001009400.1	F 5'-GGGTTTCGCCTCAGTGCCACTGTTTC-3'	73.8	151	1.009 (99.9)
		R 5'-CAGAGGGTGGCCATGAGGAGCAGG-3'	73.8		
<i>PGK1</i>	NM_0011142516.1	F 5'-GTGAAGGGGAAGCGGCTCGTCATGAGAG-3'	72.9	99	1.002 (99.43)
		R 5'-GCTTGAACAGCAGCCTTGATCCTCTGG-3'	72.1		
<i>B2M</i>	NM_001009284.2	F 5'-CAAGACACCCGCCAGAAGATGAAAAGC-3'	71.6	180	0.989 (99.91)
		R 5'-GGAGTGAAGTCCAGCGTGGGACAGAAG-3'	70.3		
<i>RPLP0</i>	XM_004017413.2	F 5'-CGGCTGCTGCCCGTCTGCTGCCAT-3'	77.7	191	1.002 (99.81)
		R 5'-TTGGCTGGGCCCACCTTGTCTCCGGTC-3'	77.1		
<i>G6PD</i>	NM_001093780.1	F 5'-CGGGCGAGAGCAAGCAAGCAGAGAGC-3'	74.0	161	1.004 (99.82)
		R 5'-CCAGTCCCCCGATGCACCCATGATG-3'	74.2		
<i>SDHA</i>	XM_012097183.1	F 5'-CCATGAGTTTGATGCCGTGGTGGTCCGTC-3'	70.7	184	1.006 (99.51)
		R 5'-CCGCCAGTTGTCTCTCCATGTTCCCA-3'	70.4		
<i>ACTB</i>	NM_001009784.1	F 5'-GCCGTGATGGTGGCATGGCCAGAAGG-3'	76.0	170	1.003 (99.99)
		R 5'-GGGGGCCACACGCAGCTCGTTGTAGAAGG-3'	75.7		
<i>HSP90AA1</i>	XM_004017995.3	F 5'-GCCGCCCTGGAAGGAGACGACGACAGC-3'	71.1	130	1.005 (99.53)
		R 5'-GCCAGGGGAGCCCTCGGACGGCTCA-3'	72.0		
<i>GYPC</i>	XM_004004772.3	F 5'-TGCCCCGCACCGGCCACGGATGAG-3'	79.2	110	1.006 (99.85)
		R 5'-GGTGGGCTCTGGGGTCCAAAGGGCGCTC-3'	79.3		
<i>GUSB</i>	XM_015103904.1	F 5'-CTTCCGGCCGACTTCTCCGACAAC-3'	72.4	185	1.004 (99.89)
		R 5'-GCAGCGTGATCTCCGTTTATACACACC-3'	72.8		
<i>TUBB</i>	XM_012101347.2	F 5'-CCAGGACGCCACGGCCGAGGAGGAGG-3'	79.1	112	0.997 (99.58)
		R 5'-TGGCCGACGGCGTCCACCCCTTC-3'	79.8		

Tabla 1. ^a Símbolos de los genes utilizados en este trabajo y números de acceso según la base de datos de NCBI. ^b Secuencias de los cebadores *forward* (F) y *reverse* (R). ^c Temperatura de fusión (Tm en °C) calculada por el software Oligo 7. ^d Tamaño del producto de PCR en pares de bases (pb) ^e Eficiencias de amplificación de la PCR a tiempo real (E) para cada pareja de oligos, calculadas a partir de la pendiente de las respectivas curvas, según la ecuación $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Los valores de E están entre los rangos de 0 valor mínimo) a 1 (100% de eficiencia, valor máximo y óptimo).

5.2.4.- Secuenciación

Como se indicó en el apartado anterior, durante el proceso de validación de los cebadores, todos los productos de PCR se secuenciaron utilizando un secuenciador ABI PRISM™ 3130XL (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) que se encontraba en el Servicio Central de Ayuda a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

Las secuencias obtenidas se editaron eliminando los cebadores de PCR, adaptadores (1 y 2R) y ambigüedades terminales usando el programa *EditSeq* del paquete informático *DNASTAR* Lasergene v6 (<https://www.dnastar.com/t-dnastar-lasergene.aspx>). Para su identificación, las secuencias depuradas se compararon con las presentes en las bases de datos, utilizando el algoritmo *tblastx* del servidor BLAST del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) con un valor límite de $E < 2e^{-04}$. E es una medida relativa de la fiabilidad de la homología entre las secuencias comparadas, siendo mayor la probabilidad de homología entre la secuencia problema y la de la base de datos cuanto menor sea su valor. En todos los casos, las secuencias obtenidas mostraron una identidad del 100% con las secuencias de fragmentos en las que se basó el diseño del cebador (datos no mostrados)

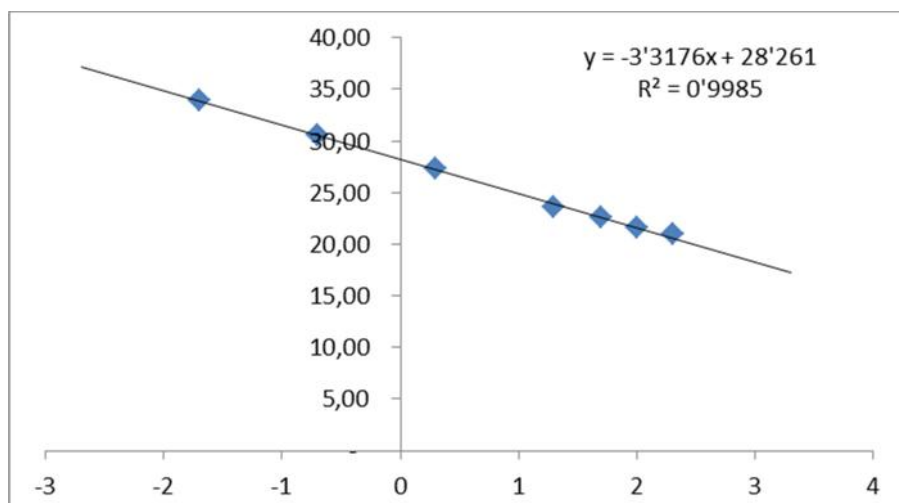
5.2.5.- Cálculo de la eficiencia

La eficiencia de una reacción de PCR indica el porcentaje de moléculas de DNA sustrato que se duplican tras cada ciclo de reacción. Una eficiencia de amplificación del 100% indica que cada

molécula de sustrato ha generado 2 copias tras cada ciclo. Es imprescindible controlar este parámetro dado que numerosos factores (presencia de inhibidores en la muestra, mal diseño de cebadores o de las condiciones de reacción, etc.) pueden afectarla, introduciendo graves errores en la cuantificación. Para comprobar la eficiencia de amplificación de los cebadores, se hicieron diluciones seriadas (20 a 2×10^5 pg/reacción) de DNAC generado a partir de un pool de RNA hecho a partir de la mezcla de cantidades iguales de RNA de cada uno de los animales y tejidos. Las muestras se amplificaron por cuadruplicado mediante qRT-PCR. Las rectas de eficiencias se construyeron representando el logaritmo de la cantidad de RNA inicial (en pg) respecto al valor de Ct. La recta resultante debía ser lineal ($r \geq 0,99$) en al menos 5 órdenes de magnitud. Cada eficiencia (E) fue calculada a partir de la pendiente de la recta según la ecuación:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})-1}.$$

La **Grafica 2** muestra como ejemplo la curva de eficiencia del gen IL-1 β , a partir de la cual se dedujo que la eficiencia de amplificación fue 1.001. En la **Tabla 1** se muestra que todos los cebadores amplificaron sus respectivas dianas con una eficiencia óptima (100%) y alta linealidad ($r > 0.99$).



Grafica 2 Representación de la recta de eficiencia del gen IL-1 β , el cual tuvo una eficiencia de amplificación de 1.001.

5.2.6.- Cuantificación de transcritos mediante qRT-PCR

Se usó la mezcla comercial SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad, Hércules, California, Estados Unidos) que utiliza el fluoróforo SYBR® Green, cuya fluorescencia se manifiesta únicamente en caso de unión a DNA de doble cadena, para seguir la generación de productos de amplificación. Se utilizó el sistema MyiQ™2 Two Color Real-Time PCR Detection System (BioRad, Hércules, California, Estados Unidos) para el seguimiento de las reacciones de amplificación en tiempo real. Cada cuantificación se realizó por triplicado, utilizando en cada reacción 50 ng de DNAc de cada una de las muestras y 0'3 μ M de cada uno de los dos cebadores de cada pareja (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos), en un volumen final de reacción de 20 μ L. El protocolo de ciclado que se usó tenía un primer paso de 2 min a 95°C para la activación de la Taq polimerasa, seguido de 40 ciclos de dos pasos: un primer paso (15 s, 95°C) para la desnaturalización

de la cadena y un segundo paso (30 s, 68°C) para el anillamiento/extensión del cebador. La fluorescencia se midió al final del paso de hibridación/extensión para monitorizar el progreso de la reacción. Después de los 40 ciclos, se realizó una curva de fusión, como se indicó anteriormente, incrementando la temperatura desde 60–95°C a una velocidad de 0'5°C/S, para verificar la especificidad de los amplicones (la amplificación no específica genera productos de PCR que se disocian a temperaturas inferiores o superiores a las el producto deseado). Las reacciones de réplicas de PCR generaron unos resultados altamente reproducibles con SEM <10% de la media (<1% datos de ciclo de umbral).

El análisis de datos se realizó con el programa iQ5™ Optical System Software (BioRad, Hércules, California, Estados Unidos) seleccionando el modo "*background subtracted*". La corrección de la línea base se realizó mediante el cálculo automático del software de la máquina manteniendo los parámetros por defecto. En cada experimento se introdujo como calibrador inter-placa una muestra comercial de RNA de distintos órganos de ratón (Mouse Universal Reference Total RNA, Clontech™) en la que se cuantificó de manera muy precisa la cantidad de transcrito del gen A170; esta muestra permitió garantizar la calidad de la retro-transcripción y determinar la posición de la línea umbral, eliminando la variación entre placas. El valor de Ct obtenido al cuantificar el gen A170 en el RNA de referencia se fijó en $17'55 \pm 0'22$. Establecida la línea umbral (cantidad de fluorescencia que se debe alcanzar en cada uno de los pocillos), el programa iQ5™ proporcionó el valor de Ct

(ciclo umbral, “threshold cycle”) para cada reacción, el cual se define como el número del ciclo al cual se consigue que la cantidad de productos de PCR generados en ese pocillo tenga una fluorescencia suficiente para alcanzar el valor umbral de fluorescencia previamente fijado. A partir del valor de C_t , se puede establecer la ratio entre el número final X_{C_t} y el inicial X_0 de copias de la secuencia diana mediante la ecuación:

$$X_{C_t} = X_0 + (1 + E)^{C_t}$$

En esta ecuación X_0 representa el número de moléculas de transcrito iniciales y E la eficiencia de amplificación. Tomando logaritmos en ambos términos, se tiene que:

$$\log X_{C_t} = \log X_0 + C_t \log (1+E)$$

A partir de aquí, y despejando, se llega a la ecuación que describe la recta representada en la **Gráfica 2**:

$$C_t = \log X_{C_t} / \log (1+E) - 1 / \log (1+E) \log X_0$$

Cuya pendiente de la recta es:

$$a = -1 / \log (1+E)$$

a partir de la ecuación anterior puede calcularse la eficiencia de la amplificación:

$$E = 10^{-1/a} - 1$$

5.2.7 Cuantificación relativa de transcritos en qRT-PCR

Los datos obtenidos con la qRT-PCR en tiempo real pueden ser relativos o absolutos. Los datos relativos son datos estandarizados que informan del número de veces que la cantidad de un transcrito aumenta o disminuye en una situación experimental concreta en relación a una situación de referencia. La variabilidad que generan los cambios de eficiencia se puede controlar mediante el uso de un estándar que permita detectar la variabilidad de los diferentes pasos experimentales. Los estándares más empleados suelen ser genes de expresión supuestamente constitutiva (housekeeping) cuyos transcritos deben estar presentes y en las mismas cantidades, siempre, o al menos en las condiciones experimentales objeto de análisis. La inmensa mayoría de los estudios de expresión génica cuantifican los transcritos de forma relativa ya que la estandarización incrementa la repetitividad y fiabilidad de las medidas.

5.2.8.- Análisis de expresión de estabilidad de posibles genes de referencia para ser usados en cuantificación relativa

Se eligieron diez posibles genes de referencia para su uso en nuestros estudios, basándonos en la literatura al respecto (**Tabla 1**). La estabilidad de cada uno de los posibles genes de referencia se evaluó mediante los algoritmos GeNorm (Vandesompele, y cols., 2002), NormFinder (Andersen, y cols 2004), BestKeeper (Pfaffl, y cols., 2004), y el método comparativo Δ Ct (Silver, y cols., 2006), integrado en el programa on-line RefFinder (Xie, y cols., 2012).

GeNorm trabaja con los datos exportados a una hoja de cálculo Excel para calcular el valor de M, parámetro que mide la estabilidad

de expresión de los genes de referencia en estudio. Un valor de M bajo indica mayor estabilidad de expresión, mientras que valores de M más altos indican menor estabilidad de expresión. Valores de M menores a 1'5 se consideran indicadores de una buena estabilidad de expresión. GeNorm también se usó para determinar el número óptimo de genes de referencia para la normalización a través del análisis de la *pairwise variation* (V_n/V_{n+1}). Cuando con un par V_n/V_{n+1} se obtienen valores menores a 0'15, el número de genes de referencia con que hay que trabajar es N. NormFinder clasifica el conjunto de genes candidatos de acuerdo con su estabilidad de expresión. El algoritmo se basa en un modelo matemático de expresión génica y utiliza una estadística sólida para estimar no solo la variación de la expresión general de los genes de referencia candidatos sino también la variación entre subgrupos. Los valores de Ct usados en GeNorm fueron también utilizados como datos de entrada para NormFinder calculando la expresión de estabilidad y clasificando los genes de referencia candidatos según las variaciones intragrupalas e intergrupales. BestKeeper selecciona los genes en función de sus valores de DE. El método ΔCt compara la expresión relativa de pares de genes dentro de cada muestra. Sobre esta base, la estabilidad de los genes estudiados se ordena de acuerdo con la repetitividad de la expresión del gen en las distintas muestras. RefFinder es una herramienta on-line que integra los datos generados por estos cuatro algoritmos de forma individual y genera una clasificación general integradora de la estabilidad genética.

5.2.9. Normalización de los niveles de expresión y determinación del número de veces de cambio de los genes de interés

Para medir con precisión los niveles de expresión, la normalización se llevó a cabo considerando los tres genes de referencia más estables en nuestras condiciones experimentales: HSP90AA1, GYPC y PGK1. En primer lugar, se calculó el factor de normalización de los tres genes de referencia. Los valores de Ct se transforman en cantidades (número de veces de cambio, $2^{-\Delta Ct}$) respecto al valor de Ct más bajo de cada gen, obteniéndose un valor de normalización mediante el cálculo de la media geométrica de los valores obtenidos. Se transformaron los valores de Ct en cantidades procediendo de igual modo y normalizaron dividiendo por el correspondiente factor de normalización. Los valores de cada grupo experimental se refirieron a los obtenidos para el control negativo. Ejemplo representado en la **Figura 5**.

Determinación del factor de normalización de los genes de referencia

	valores de Ct			ΔCt respecto al menor			$2^{-\Delta Ct}$			factor de normalización
	gen ref1	gen ref2	gen ref3	gen ref1	gen ref2	gen ref3	gen ref1	gen ref2	gen ref3	
	control	32.10	27.00	34.90	1.60	0.00	1.90	0.33	1.00	
muestra B	33.30	28.40	36.10	2.80	1.40	3.10	0.14	0.38	0.12	0.19
muestra C	31.00	27.50	34.00	0.50	0.50	1.00	0.71	0.71	0.50	0.63
muestra D	30.50	28.20	33.00	0.00	1.20	0.00	1.00	0.44	1.00	0.76

Cuantificación del gen diana 1

	valores de Ct	ΔCt respecto al menor	$2^{-\Delta Ct}$	factor de normalización	valores normalizados	Nº veces de cambio respecto al control
control	23.00	0.00	1.00	0.45	2.24	1.00
muestra B	24.20	1.20	0.44	0.19	2.35	1.05
muestra C	26.35	3.35	0.10	0.63	0.16	0.07
muestra D	24.45	1.45	0.37	0.76	0.48	0.22

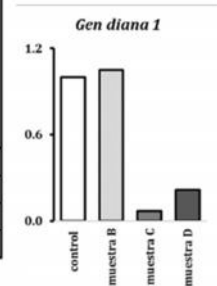


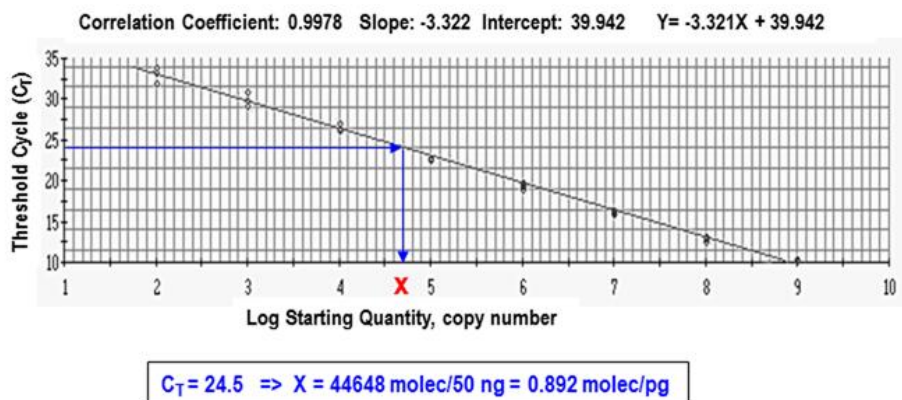
Figura 5. Se indica mediante un ejemplo el modo de calcular el número de veces de cambio en la expresión del gen de interés, una vez normalizado por los genes de referencia.

5.2.10.- Cuantificación absoluta de transcritos en qRT-PCR

La cuantificación absoluta transforma los valores de Ct en números exactos de moléculas de cada transcrito en cada muestra, por lo que informa sobre los niveles basales de cada transcrito estudiado. Esto permite obtener una visión exacta del significado biológico de los cambios de expresión transcripcional, ya que cambios pequeños en términos relativos en transcritos abundantes suponen cambios grandes en número de moléculas que pueden tener más impacto en las células y ser de mucha más relevancia biológica que cambios relativos espectaculares en transcritos raros o infrecuentes, que se traducirían en pequeños cambios en términos absolutos (Jurado y cols., 2003; Prieto-Alamo y cols., 2003). Otra ventaja de la cuantificación absoluta es que los datos

no están estandarizados y por tanto no se asume que los transcritos de referencia tengan que estar siempre presentes en la misma cantidad, lo que dista mucho de ser cierto en numerosas condiciones experimentales.

La conversión de valores de Ct en número absoluto de transcritos está basada en la relación de la señal de fluorescencia obtenida en la amplificación con el contenido de RNA en la muestra, empleando una recta de calibrado o recta patrón. Esta recta patrón (**Gráfica 3**) se construyó a partir de diluciones seriadas, desde 10^9 hasta 10^2 moléculas, de un RNA estándar transcrito a partir de un fragmento de DNA sintetizado in vitro (Prieto-Alamo y cols., 2003). La concentración del estándar se determinó midiendo la densidad óptica a 260 nm y convirtiendo la absorbancia en número de moléculas de acuerdo con su peso molecular. Las moléculas de RNA se retrotranscribieron y amplificaron por PCR en tiempo real. La recta patrón se obtuvo a partir de la representación del logaritmo del número de moléculas iniciales de RNA frente al número mínimo de ciclos de PCR necesarios para detectar amplificación partiendo de esa cantidad de transcritos (Ct). La recta patrón resultante, $y = 3.321x + 39.942$ (**Gráfica 3**) fue lineal en 7 órdenes de magnitud y a partir de la pendiente se calculó que la amplificación del estándar se produjo con una eficiencia del 99,8%. El número de transcritos de los diferentes genes problemas se calculó extrapolando sus valores de Ct sobre la recta de calibración.



Gráfica 3. Curva estándar para calcular el número de copias por pg de RNA total de cada RNAm.

6. - ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los estudios de PCR la comparación de los datos obtenidos con el control se llevó a cabo mediante un test de Dunnet, utilizando el programa estadístico InStat v. 3.05 de GraphPad. Se realizaron los test de normalidad de Kolmogorov and Smirnov y de Bartlett respectivamente. En los casos en los que las muestras superaron estos test de normalidad se utilizó un test Bonferroni de comparaciones múltiples para comparar dos tratamientos entre sí. Cuando las muestras no superaron los test de normalidad se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis.

En el estudio inmunohistoquímico así como en el estudio morfométrico microscópico para evaluar las lesiones histopatológicas y la fibrosis se utilizó el programa estadístico Graphpad Prism v.7 (Graphpad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos). Para comprobar si las distribuciones de los datos eran o no paramétricas se realizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Cuando se superaron dichas pruebas se

realizó un test ANOVA de comparaciones múltiples y el test de Kruskal-Wallis por el post-test de Dunn's cuando la distribución fue no paramétrica. Para los estudios de correlación se realizó un test de correlación no paramétrica de Spearman.

En cualquier caso, se consideraron significativos aquéllos valores de $P < 0'05$.

RESULTADOS

Y DISCUSIÓN

1.- SELECCIÓN DE GENES DE REFERENCIA PARA NORMALIZACIÓN DE ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE qRT-PCR.

1.1.- Extracción de ARN: criterios de calidad

En las siguientes figuras (**Figuras 6 y 7**) se muestran los resultados correspondientes a los valores de aislamiento/purificación de ARN de los animales de la experiencia 1. Sólo se consideraron valores de RIN $>8,0$, ratios 260/280 y 260/230 por encima de 2 y aquellas muestras con ausencia de DNA genómico.

El ratio 260/280 indica si hay contaminación por proteínas, y el ratio 260/230 indica la presencia /ausencia de contaminantes como fenoles o carbohidratos. Valores por debajo de 2 indican la presencia de los contaminantes nombrados anteriormente para cada ratio.

Como puede observarse en la **figura 6**, los valores de RIN en las muestras de NLH de la experiencia 1, oscilaron en general para los animales sacrificados a 1 dpi entre 8,4 y 9,3 siendo 8,91 el valor promedio; para los animales sacrificados a 3 dpi estuvo entre 8,5 y 9,1 con un valor promedio de 8,82; los animales sacrificados a los 9 dpi mostraron un rango de valores entre 8,6 y 9,5 con un promedio de 9,08; por último los animales sacrificados a los 18 dpi mostraron valores de RIN que oscilaron entre 9,1-9,5 con un valor promedio de 9,29. Así mismo, el rango en las muestras utilizadas como control osciló entre 9,1 y 9,3 siendo el promedio 9,17. Estos datos demuestran la alta calidad y pureza de las muestras de NLH utilizadas para en este estudio.

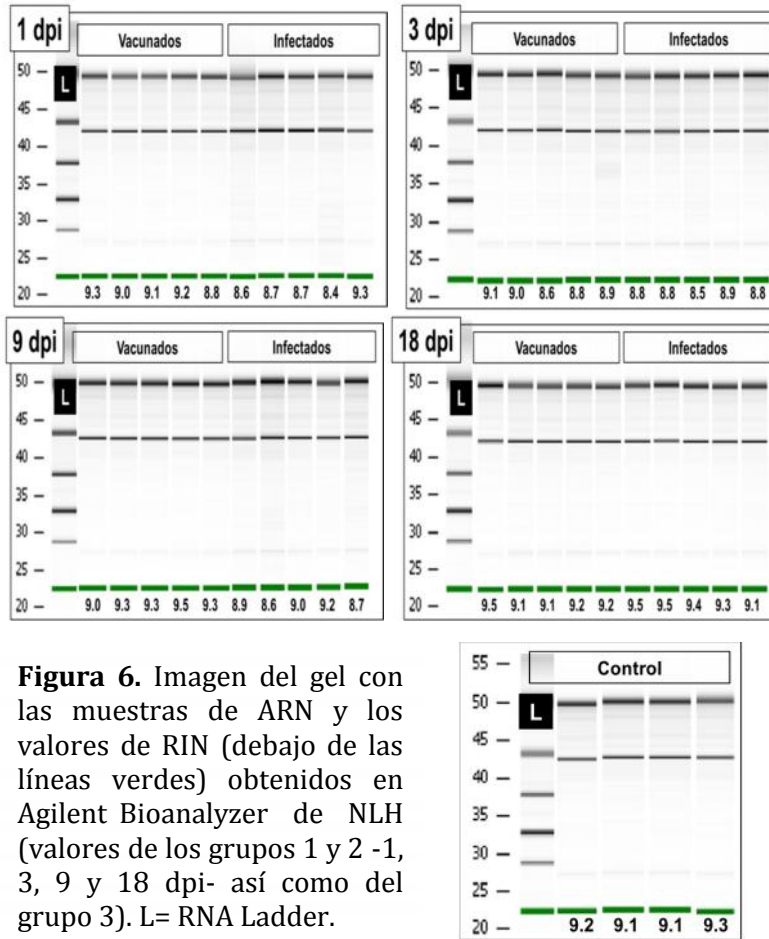


Figura 6. Imagen del gel con las muestras de ARN y los valores de RIN (debajo de las líneas verdes) obtenidos en Agilent Bioanalyzer de NLH (valores de los grupos 1 y 2 -1, 3, 9 y 18 dpi- así como del grupo 3). L= RNA Ladder.

La **figura 7**, muestra los valores de RIN en las muestras de hígado de la experiencia 1. Los valores obtenidos a pesar de ser altos, mostraron valores ligeramente peores que los obtenidos en NLH. Los animales sacrificados a 1 dpi entre 8 y 8,6 siendo 8,25 el valor promedio; para los animales sacrificados a 3 dpi estuvo entre 8,1 y 8,5 con un valor promedio de 8,29; los animales sacrificados a los 9 dpi mostraron un rango de valores entre 8 y 8,3 con un promedio de 8,15; por último, los animales sacrificados a los 18 dpi

mostraron valores de RIN que oscilaron entre 8-8,5 con un valor promedio de 8,29. Así mismo, el rango en las muestras utilizadas como control osciló entre 8 y 8,5 siendo el promedio 8,22. Estos datos demuestran también la alta calidad y pureza de las muestras de hígado utilizadas para en este estudio.

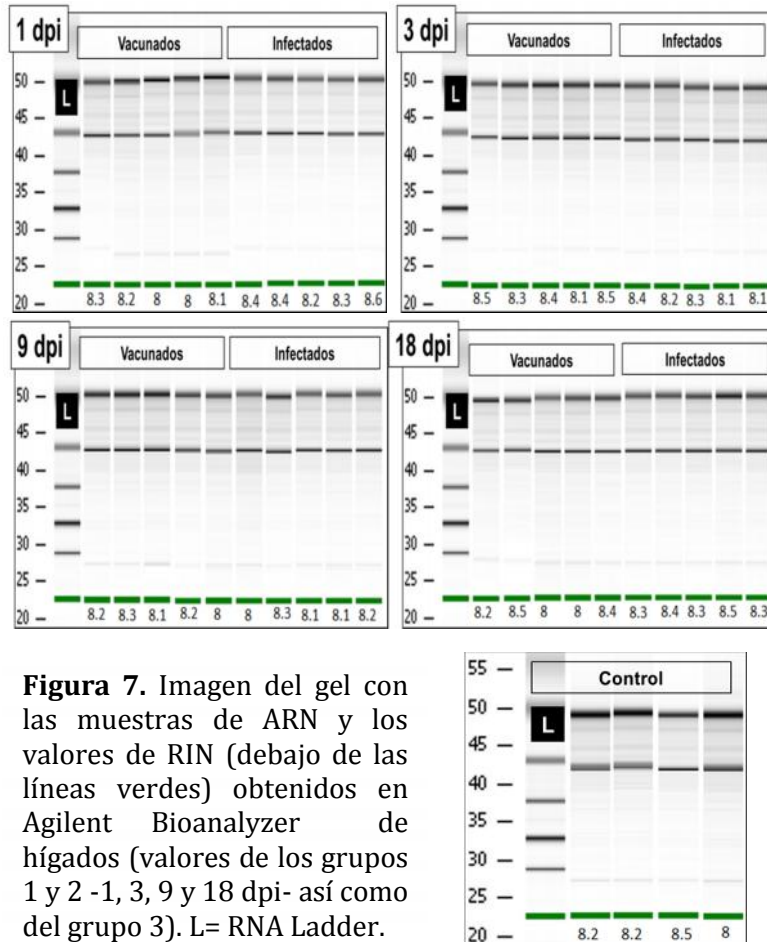


Figura 7. Imagen del gel con las muestras de ARN y los valores de RIN (debajo de las líneas verdes) obtenidos en Agilent Bioanalyzer de hígados (valores de los grupos 1 y 2 -1, 3, 9 y 18 dpi- así como del grupo 3). L= RNA Ladder.

1.2.- Evaluación de la especificidad de los cebadores

Se comprobó la especificidad de los cebadores mediante análisis de los amplicones obtenidos con cada gen en los diferentes tejidos empleados (hígado y nódulo linfático hepático), mediante electroforesis en geles de agarosa de los amplicones obtenidos y secuenciación (ver apartado 5.2.4 de material y métodos) de éstos, así como mediante la inclusión de curvas de fusión en cada carrera de PCR. En todos los casos, cada par de cebadores amplificó una secuencia única del gen diana (**Figura 8 y 9**), lo que demostraba que los cebadores habían sido bien diseñados (no formaban dímeros ni estructuras ahorquilladas ni hibridaban con secuencias que no fueran la diana deseada). Los datos obtenidos en los dos tejidos también indican que la maduración de los mensajeros de los genes estudiados es idéntica en los dos tejidos estudiados, dada la identidad de tamaño y secuencia de la banda obtenida. La inclusión de las curvas de fusión en todas las carreras de PCR nos garantizó, además, la ausencia de contaminación accidental en las mezclas de reacción

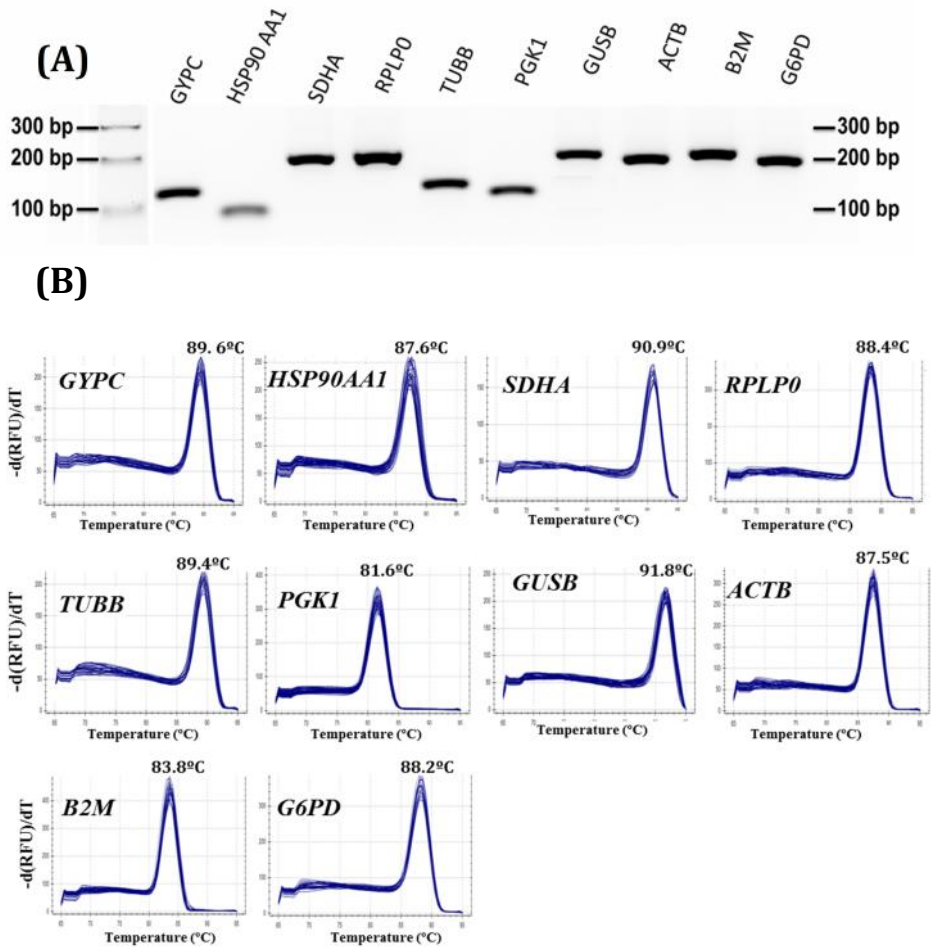


Figura 8. Confirmación de la especificidad de los genes de referencia y el tamaño de los amplicones. (A) Geles de agarosa que muestran los productos de qRT-PCR para cada gen de referencia con su tamaño esperado. Se mezclaron y amplificaron cantidades iguales de DNAc de varios animales y tejidos con cada par de cebadores y la reacciones de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 2%, junto con un DNA Ladder estándar. **(B)** Curvas de fusión de los 10 genes de referencia; la presencia de un solo pico de fluorescencia indica la existencia de un único producto de amplificación en cada uno de los pocillo de reacción; os valores de T_m de cada producto de amplificación se muestran sobre cada pico.

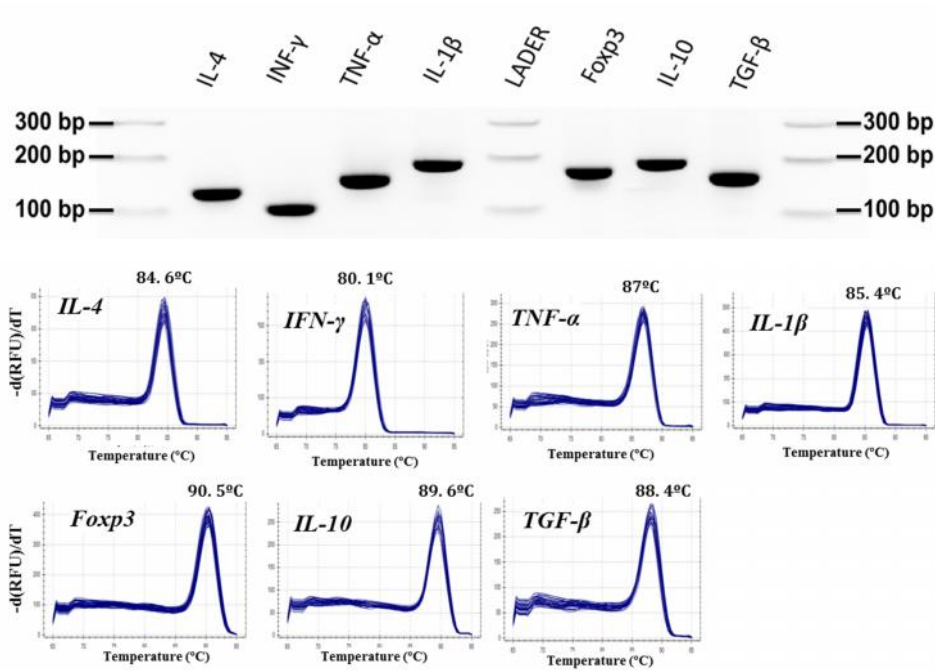


Figura 9. Confirmación de la especificidad de los genes de interés estudiados y el tamaño de los amplicones. (A) Geles de agarosa que muestran los productos de qRT-PCR para cada gen de interés con su tamaño esperado. Se mezclaron y amplificaron cantidades iguales de DNAc de varios animales y tejidos con cada par de cebadores y la reacciones de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 2%, junto con un DNA Ladder estándar. **(B)** Curvas de fusión de los 7 genes de interés; la presencia de un solo pico de fluorescencia indica la existencia de un único producto de amplificación en cada uno de los pocillo de reacción; los valores de Tm de cada producto de amplificación se muestran sobre cada pico.

1.3.- Genes de referencia: estabilidad y evaluación

1.3.1. - Comparación de las estabilidades de expresión de los genes de referencia candidatos por estadística descriptiva.

Para normalizar los datos de qRT-PCR se usan genes de referencia. Un gen de referencia perfecto no presenta cambios de expresión entre las diferentes muestras comparadas, aunque procedan de diferentes tejidos, condiciones experimentales o tiempos. Los genes de referencia deben seleccionarse cuidadosamente en base a datos experimentales, así que se siguió el protocolo establecido por la guía MIQE (Bustin y cols., 2009, Hellemans y Vandesompele 2014, Johnson y cols., 2014). Para cuantificar los genes de referencia en la qPCR se incluyeron 3 réplicas técnicas en la PCR, y se obtuvieron valores de Ct tanto en NLH como en hígado. Los valores de Ct se exportaron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel. La estadística descriptiva se llevó a cabo con el complemento de Excel XLStat v. 19.4.45191 (Addisoft, Texas, Estados Unidos)

En la PCR en tiempo real valores más bajos de Ct de un gen determinado indican mayor abundancia del mismo y viceversa. De todos los genes estudiados como candidatos a genes de referencia el que demostró ser más abundante fue el gen B2M, el cual presentó un valor de Ct de $14,041 \pm 0,79$ (media \pm DE). Por el contrario, el gen menos abundante y más variable fue el gen TUBB, cuyo valor de Ct fue $27,21 \pm 3,13$ (media \pm DE) (**tabla 2**). Un gen ideal de referencia debería mostrar poca variabilidad en sus valores de Ct (poca desviación estándar). Por lo que, los genes más

estables son aquellos que presentan valores de Ct similares y con baja desviación estándar en cualquier tejido que se estudie.

Los parámetros estadísticos de los valores de Ct se calcularon tanto para NLH como para hígado de forma separada como de forma conjunta (**tabla 2**). En todas las combinaciones, TUBB y G6PD eran los que presentaban niveles de expresión más variables, los cuales se veían reflejados en su alta desviación estándar. Los demás genes estudiados presentaban bastante estabilidad tanto en NLH como en hígado cuando se valoraban por separado. Sin embargo, cuando ambos tejidos se valoraban conjuntamente los genes que mostraban niveles de expresión más estables fueron PGK1, HSP90AA1, GUSB y SDHA. Estos 4 genes también mostraron valores promedios intermedios en ambos tejidos, lo cual los hacía más apropiados para ser usados como genes de referencia. La media y DE de cada gen se muestra en la **Figura 10**.

Hígado

Parámetros estadísticos	PGK1	B2M	G6PD	SDHA	RPLP0	GUSB	ACTB	HSP90	GYPC	TUBB
Observations	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84
Minimum value	19.080	12.800	19.080	18.660	14.590	20.830	14.260	16.880	21.650	22.680
Maximum value	22.140	15.800	26.790	20.930	18.830	25.640	18.990	19.700	23.720	25.710
1st Quartil	20.348	14.618	23.723	19.290	15.725	21.880	15.503	17.740	22.618	23.453
Median	20.730	15.000	24.280	19.610	16.455	22.290	16.360	17.930	22.835	24.140
3rd Quartil	21.050	15.203	25.195	20.018	16.975	22.603	16.720	18.083	23.035	24.593
Average	20.728	14.840	24.018	19.673	16.439	22.259	16.278	17.969	22.807	24.068
Variance (n-1)	0.313	0.380	3.232	0.323	1.003	0.555	1.133	0.179	0.200	0.576
Standard deviation (n-1)	0.560	0.616	1.798	0.568	1.001	0.745	1.065	0.423	0.448	0.759

Parámetros estadísticos	PGK1	B2M	G6PD	SDHA	RPLP0	GUSB	ACTB	HSP90	GYPC	TUBB
Statistical parameter	<i>Pgk1</i>	<i>B2m</i>	<i>G6pd</i>	<i>SdhA</i>	<i>Rplp0</i>	<i>GusB</i>	<i>ActB</i>	<i>Hsp90</i>	<i>GypC</i>	<i>TubB</i>
Observations	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84
Minimum value	17.470	12.290	20.360	18.250	13.450	22.580	13.500	15.290	19.820	25.670
Maximum value	21.860	16.370	26.790	21.540	18.830	24.240	17.740	17.950	21.910	32.940
1st Quartil	19.483	12.788	21.178	20.090	13.950	23.040	13.998	16.240	20.398	29.850
Median	19.800	12.955	21.640	20.690	14.080	23.395	14.195	16.665	20.685	30.845
3rd Quartil	20.110	13.265	22.010	21.013	14.293	23.683	14.730	17.075	20.933	31.443
Average	19.817	13.243	22.005	20.431	14.486	23.368	14.356	16.618	20.699	30.341
Variance (n-1)	0.596	0.706	2.345	0.754	1.673	0.153	0.311	0.379	0.172	2.885
Standard deviation (n-1)	0.772	0.840	1.531	0.868	1.293	0.391	0.558	0.616	0.414	1.699

NLH+Hígado

Parámetros estadísticos	PGK1	B2M	G6PD	SDHA	RPLP0	GUSB	ACTB	HSP90	GYPC	TUBB
Observations	168	168	168	168	168	168	168	168	168	168
Minimum value	17.470	12.290	19.080	18.250	13.450	20.830	13.500	15.290	19.820	22.680
Maximum value	22.140	16.370	26.790	21.540	18.830	25.640	18.990	19.700	23.720	32.940
1st Quartil	19.790	12.938	21.465	19.390	14.080	22.290	14.208	16.673	20.688	24.165
Median	20.235	14.170	22.110	20.035	15.240	22.850	14.885	17.470	21.760	25.690
3rd Quartil	20.840	15.045	24.823	20.763	16.565	23.415	16.360	17.933	22.833	30.838
Average	20.273	14.041	23.012	20.052	15.463	22.813	15.317	17.293	21.753	27.205
Variance (n-1)	0.661	1.181	3.791	0.680	2.289	0.661	1.647	0.737	1.302	11.617
Standard deviation (n-1)	0.813	1.087	1.947	0.825	1.513	0.813	1.283	0.858	1.141	3.408

Tabla 2. Comparación de la expresión de estabilidad de los genes de referencia candidatos por estadística descriptiva usando XLStat v. 19.4.45191 software (Addisoft) para calcular los parámetros estadísticos de los valores de Ct en hígado, NLH y ambos.

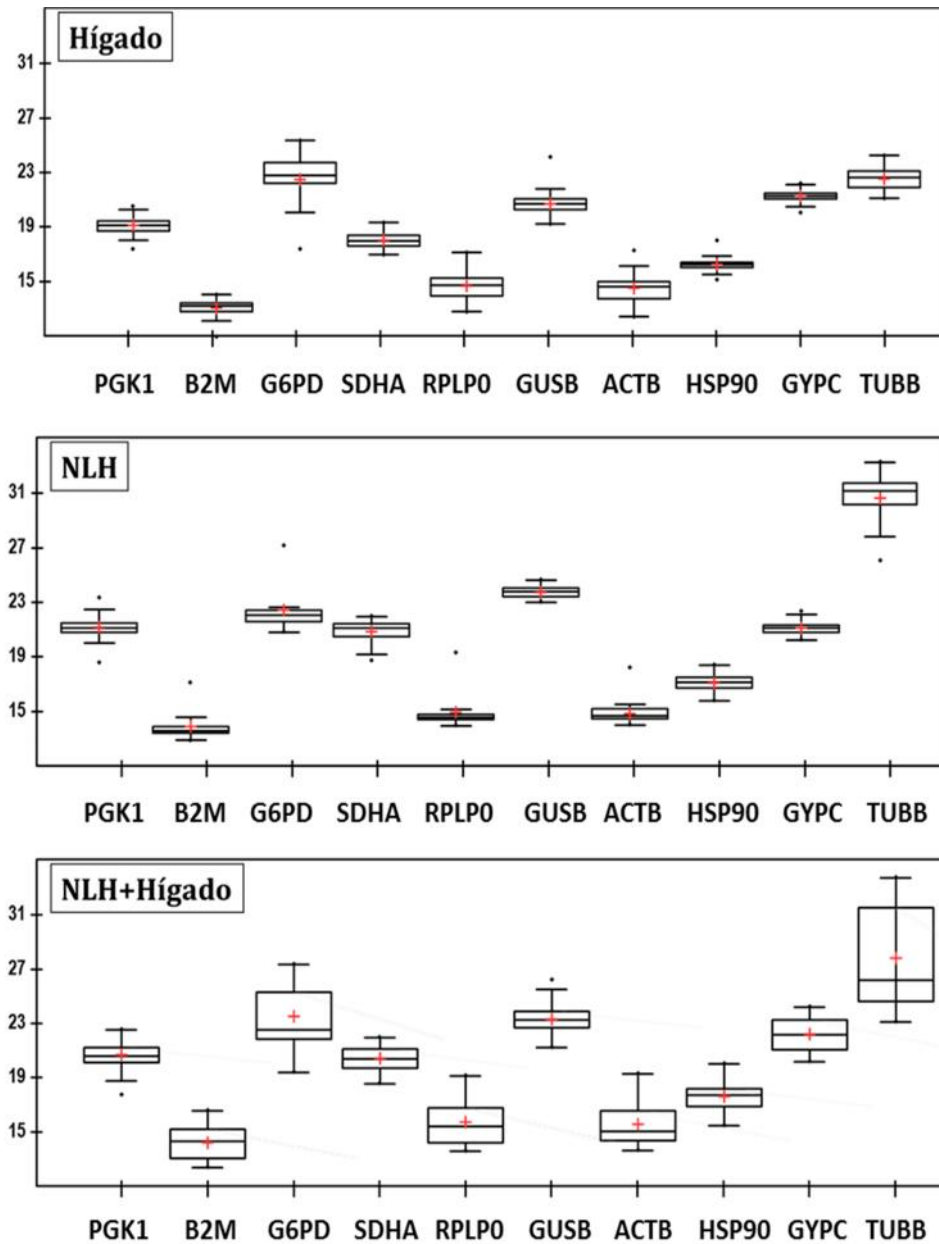


Figura 10. Distribución de los valores de Ct para los genes de referencias candidatos. (A) Análisis de los datos de hígado. **(B)** Análisis de los datos de NLH **(C)** Ambos tejidos, Los valores de Ct de NLH e hígado se analizaron juntos. Los datos de esta gráfica se han obtenido de la **tabla 2**.

1.3.2. - Comparación de las estabildades de expresión de los genes de referencia candidatos a través de algoritmos matemáticos.

Para identificar al gen de referencia más estable tanto en NLH como en hígado, se llevaron a cabo análisis más complejos mediante las herramientas GeNorm (Vandesompele y cols., 2002), NormFinder (Andersen y cols., 2004), BestKeeper (Pfaffl y cols., 2004), RefFinder y el método ΔCt (Silver y cols., 2006). El algoritmo de GeNorm, NormFinder, Bestkeeper y el método comparativo de ΔCt consideran diferentes aspectos para la evaluación de la expresión de estabilidad de los genes de referencia candidatos. La herramienta basada en la web RefFinder (<http://leonxie.esy.es/RefFinder/>) integra los datos generados por estos cuatro algoritmos de forma individual y genera una clasificación global integrada de la estabilidad de los genes. Mediante la integración de estas herramientas especializadas se obtiene para cada gen un valor denominado M, que es inversamente proporcional a la estabilidad que muestra un gen en concreto.

La mayoría de los algoritmos usados indicaron que los genes PGK1, HSP90AA1 y GYPC fueron los más estables bajo todas las condiciones experimentales y tejidos usados (**Tabla 3**)

GeNorm		NormFinder		Bestkeeper		ΔCt Method		RefFinder	
Nombre de los genes	Valor de estabilidad	Nombre de los genes	Valor de estabilidad	Nombre de los genes	Desviación estandar (SD)	Nombre de los genes	Promedio SD	Nombre de los genes	Media geométrica
Hígado									
GUSB	0,426	GYPC	0,294	PGK1	0,530	GYPC	0,920	GYPC	1,000
GYPC	0,426	PGK1	0,318	B2M	0,560	GUSB	0,940	GUSB	1,860
ACTB	0,533	GUSB	0,331	G6PD	0,950	PGK1	0,950	PGK1	3,500
HSP90AA1	0,564	HSP90AA1	0,516	SDHA	0,690	HSP90AA1	1,010	ACTB	3,870
PGK1	0,642	ACTB	0,554	RPLP0	0,780	ACTB	1,030	HSP90AA1	4,000
SDHA	0,684	SDHA	0,588	GUSB	0,330	SDHA	1,070	SDHA	6,240
B2M	0,758	B2M	0,666	ACTB	0,410	B2M	1,080	B2M	6,740
RPLP0	0,886	RPLP0	1,190	HSP90AA1	0,510	RPLP0	1,370	RPLP0	8,000
G6PD	0,984	G6PD	1,371	GYPC	0,330	G6PD	1,500	G6PD	9,000
TUBB	1,187	TUBB	1,926	TUBB	1,270	TUBB	2,000	TUBB	10,000
NLH									
HSP90AA1	0,420	HSP90AA1	0,393	PGK1	0,450	HSP90AA1	0,760	HSP90AA1	1,000
GYPC	0,420	PGK1	0,423	B2M	0,440	PGK1	0,780	GYPC	2,060
PGK1	0,530	GYPC	0,440	G6PD	1,340	GYPC	0,790	PGK1	2,630
SDHA	0,550	B2M	0,481	SDHA	0,450	SDHA	0,820	B2M	4,160
B2M	0,586	SDHA	0,510	RPLP0	0,780	B2M	0,830	SDHA	4,470
GUSB	0,644	RPLP0	0,530	GUSB	0,500	RPLP0	0,870	GUSB	6,930
TUBB	0,692	ACTB	0,618	ACTB	0,810	ACTB	0,920	RPLP0	6,930
RPLP0	0,738	GUSB	0,731	HSP90AA1	0,270	GUSB	0,950	TUBB	7,940
ACTB	0,774	TUBB	0,779	GYPC	0,330	TUBB	0,990	ACTB	7,940
G6PD	0,923	G6PD	1,434	TUBB	0,640	G6PD	1,520	G6PD	10,000
NLH+Hígado									
HSP90AA1	0,608	PGK1	0,135	PGK1	0,630	PGK1	1,330	PGK1	1,320
GYPC	0,608	HSP90AA1	0,546	B2M	1,020	HSP90AA1	1,400	HSP90AA1	2,000
PGK1	0,741	SDHA	0,700	G6PD	1,760	B2M	1,440	GYPC	3,460
B2M	0,775	B2M	0,771	SDHA	0,710	GYPC	1,490	B2M	3,940
ACTB	0,812	GUSB	0,892	RPLP0	1,310	ACTB	1,530	SDHA	4,740
RPLP0	0,902	GYPC	0,935	GUSB	0,640	RPLP0	1,630	GUSB	5,180
G6PD	1,038	ACTB	0,941	ACTB	1,070	SDHA	1,640	ACTB	5,920
SDHA	1,168	RPLP0	1,190	HSP90AA1	0,710	GUSB	1,740	RPLP0	6,930
GUSB	1,261	G6PD	1,609	GYPC	1,060	G6PD	1,940	G6PD	8,450
TUBB	1,816	TUBB	3,970	TUBB	3,220	TUBB	4,040	TUBB	10,000

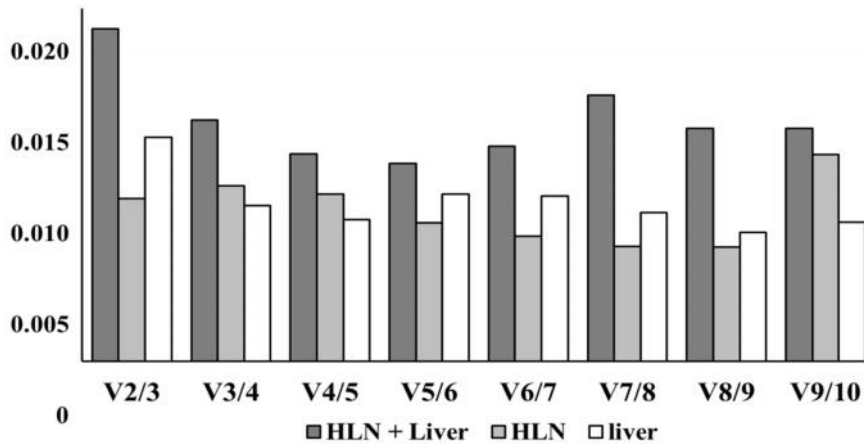
Tabla 3. Clasificación de estabilidad de los genes de referencia candidatos. Los niveles de expresión de los genes de referencia candidatos se evaluaron con los valores de Ct de las muestras. Los datos se analizaron con la herramienta RefFinder, la cual integra los métodos comparativos ΔCt, Bestkeeper, NormFinder y geNorm dando una clasificación completa de los genes estudiados (en negrita). Los sombreados en gris muestran los valores obtenidos en los diferentes programas para Pkg1, Hsp90AA1 y GypC (los tres genes más estables). Estos genes fueron usados como genes de referencia tanto en NLH como en hígado.

1.4.- Variación por pares (Pairwise variation)

Normalmente, el número de genes de referencia usados en un experimento viene determinado por la variación del “fold change” entre los ARN comparados. Siempre se recomienda usar al menos dos genes de referencia, debido a que el uso de uno sólo de ellos puede llevar a cometer errores relativamente grandes. La variación por pares o “Pairwise variation” (V_n/V_{n+1}) es un índice para determinar el número mínimo de genes de referencia requeridos para una normalización precisa de la qRT-PCR en estudios de expresión génica. Esta variación por pares se calcula mediante el programa GeNorm. Cuando el valor de la variación por pares es $<0,15$ un gen puede ser considerado apropiado como gen de referencia.

Los valores $V_{2/3}$ de NLH e hígado analizados tanto individuales como de forma conjunta, fueron menores a $0,15$ (**Gráfica 4**) sugiriendo que el uso de dos genes de referencia era necesario en este estudio. Sin embargo, ya que diferentes algoritmos clasificaron a PGK1, HSP90AA1 y GYPC como los más estables, en nuestro estudio se usaron estos 3 genes para la normalización de nuestros datos y así aumentar la resolución y fiabilidad de nuestros resultados (Kozera y Rapacz 2013). Realmente, a la vista de los resultados y de los valores umbrales obtenidos en todos los genes cualquiera de ellos podría haber sido usado como gen de referencia debido que ninguno sobrepasa el umbral establecido. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, se optó por elegir de entre todos ellos a los que

además se expresaban de forma más estable para que el estudio tuviera mayor fiabilidad.



Gráfica 4. Determinación del número óptimo de genes de referencia para la normalización. El algoritmo geNorm se usó para determinar el valor de variación pair-wise ($V_n/n+1$) de los valores obtenidos en NLH, hígado y en ambos tejidos juntos.

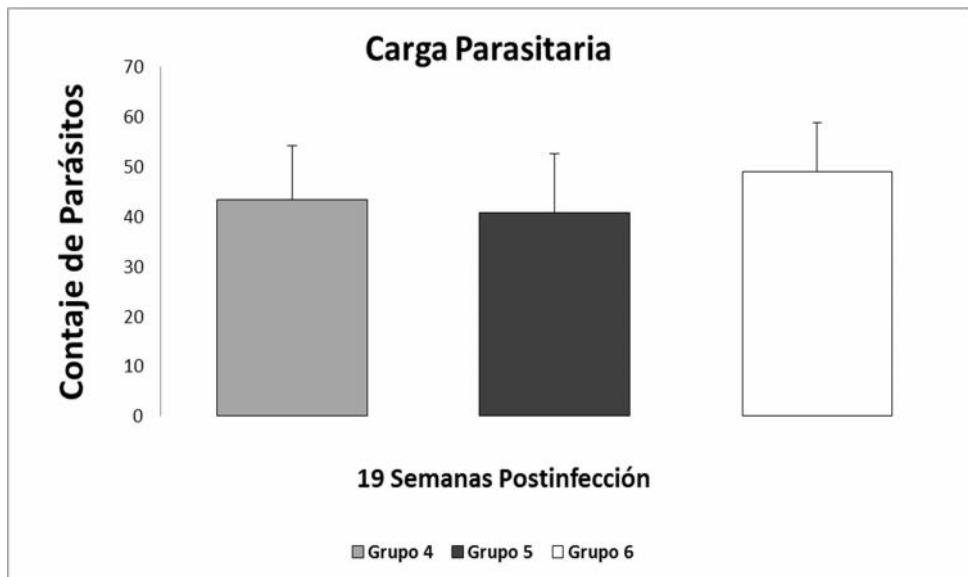
En otros estudios, se ha establecido la estabilidad de varios genes usados frecuentemente en qRT-PCR en ovejas, y solo en uno de ellos identificaron al gen PGK1 como gen apropiado para un análisis de qRT-PCR adecuado y reproducible (Zaros y cols., 2010, O'Connor y cols., 2013, Puech y cols., 2015, Mahakapuge y cols., 2016). En todos los estudios anteriores, los autores usaron otros tejidos pero también un número más reducido de genes candidatos y no más de dos enfoques estadísticos (normalmente GeNorm y NormFinder). La obtención de datos concluyentes sobre genes constitutivos usando solo de uno o dos métodos puede dar lugar a resultados falsos positivos y llegar a conclusiones engañosas (Taki y cols., 2014). En nuestro estudio, usamos un enfoque estadístico

más exhaustivo (RefFinder) para determinar buenos genes de referencia candidatos para una normalización más fiable de los datos de expresión génica en NLH e hígado de oveja.

2.- PROTECCIÓN FRENTE A *Fasciola hepatica* CON rCL1.

2.1.- Protección en fases tardías (experiencia 2)

Con el fin de estudiar la protección conferida mediante la inmunización con rCL1, se evaluó la carga parasitaria en los grupos 4, 5 y 6, los cuales estaban compuestos por ovejas infectadas y sacrificadas a las 19 wpi. Los resultados de la carga parasitaria (expresados como media±desviación estándar) se muestran en la **gráfica 5**. En el grupo 4 se obtuvieron $43.4\pm 10,8$ fasciolas, en el grupo 5 $40,8\pm 11,7$ y en el grupo 6 $49,0\pm 9,7$ fasciolas.



Gráfica 5. Media de la carga parasitaria encontrada tanto en el grupo vacunado, adyuvante e infectado a las 19 semanas post-infección. No se encontraron diferencias significativas entre grupos.

Dichos resultados no mostraron diferencias significativas entre grupos respecto a la carga parasitaria, lo que indica una falta de protección de la vacuna usada (rCL1 en montanide isa 70VG). Estos resultados son similares a la ausencia de protección obtenida en cabras inmunizadas con rCL1 usando Quil A (Pérez-Ecija y cols., 2010, Zafra y cols, 2013a) y montanide isa 70VG (Fu y cols., 2016) como adyuvantes. Sin embargo, estos resultados contrastan con la reducción significativa (48%) del número de parásitos descrito en ensayos de campo en bovinos inmunizados con rCL1 usando como adyuvante montanide isa 70 VG y montanide isa 206 VG (Golden y cols., 2010). El conteo de huevos en heces tampoco mostró diferencias significativas entre los tres grupos (datos no mostrados).

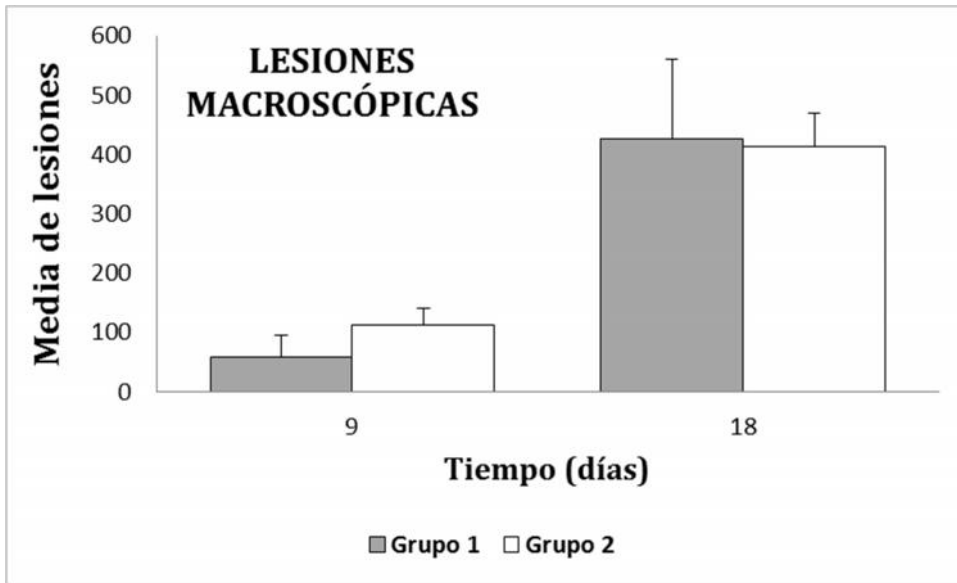
2.2.- Estudio Patológico del hígado (experiencia 1)

2.2.1.- Estudio macroscópico del hígado

En los grupos 1 (vacunado e infectado) y 2 (no vacunado e infectado) a los 1 y 3 dpi, y en el grupo 3 (control negativo) no se encontraron cambios hepáticos macroscópicos. A los 9 dpi tanto el grupo 1 como el grupo 2 presentaron trayectos blanquecinos tortuosos de 1 a 2 mm de grosor y 0,5 a 1 cm de longitud, en ocasiones rodeados por un halo rojizo. También mostraban numerosas lesiones esféricas, planas, de bordes bien definidos, de 1-3 mm de diámetro y color rojo vivo. Ambos tipos de lesiones se localizaban principalmente en el lóbulo izquierdo del hígado (**Figuras 11-14**). El conteo de las lesiones macroscópicas hepáticas (puntos hemorrágicos y trayectos blanquecinos)

expresados mediante la media \pm desviación estándar, se muestra en la **gráfica 6**. A los 9 dpi el número de lesiones hepáticas fue $58,6 \pm 27,9$ en el grupo 1 y $111,8 \pm 37,6$ en el grupo 2. El estudio estadístico demostró que el número de lesiones hepáticas era significativamente mayor ($P = 0,03$) en el grupo 2 en comparación con el grupo 1. A los 18 dpi el número de lesiones hepáticas fue de $425,4 \pm 58,0$ en el grupo 1 y $412,4 \pm 135,5$ en el grupo 2, sin existir diferencias significativas entre ambos grupos.

El menor número de lesiones hepáticas observadas a los 9 dpi en el grupo vacunado respecto al grupo control infectado coinciden con los resultados descritos en cabras vacunadas con rCL1 en adyuvante Quil A (Zafra y cols., 2013a), y en cabras vacunadas con rGST en Quil A (Zafra y cols., 2013b). Estos resultados sugieren que de algún modo la vacuna podría haber retrasado la llegada de las larvas de *F. hepatica* al hígado, pero los parásitos habrían usado algún mecanismo para conseguir establecerse en el hígado como confirma las similares lesiones hepáticas observadas a los 18 dpi en el grupo 1 y 2, así como la ausencia de diferencias significativas en el conteo de parásitos adultos a las 19 spi. Estos resultados también son corroborados por estudios previos en los que, a pesar de detectarse menores lesiones a los 7-9 dpi en los grupos vacunados respecto a los controles infectados, no hubo diferencias significativas de parásitos adultos en fases crónicas (Zafra y cols., 2013a, 2013b).



Gráfica 6. Media de las lesiones macroscópicas en hígado a los 9 y 18 dpi en el grupo 1 (vacunado e infectado) y grupo 2 (no vacunado e infectado).

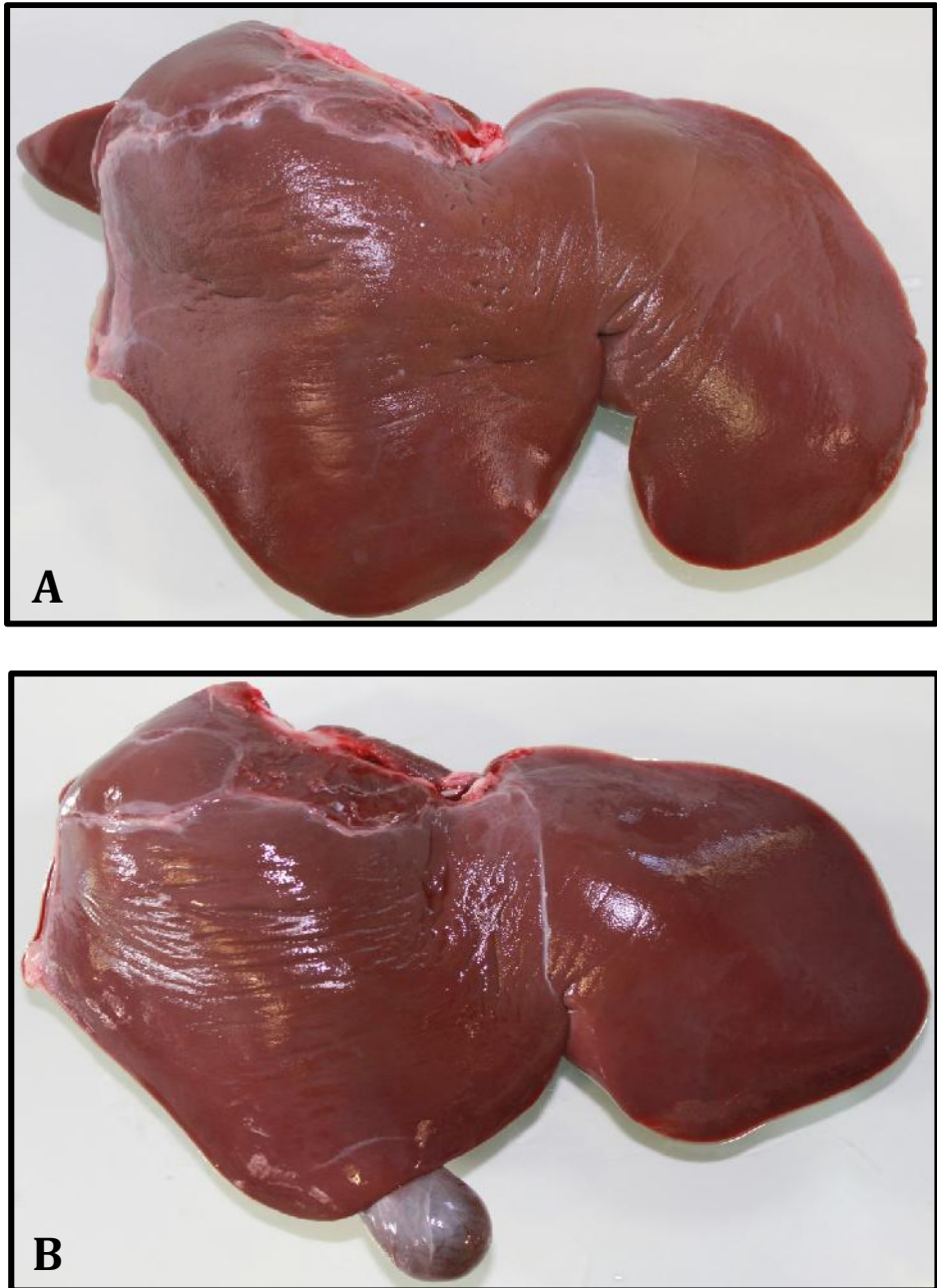


Figura 11. Aspecto macroscópico de las caras parietales de dos hígados correspondientes tanto a los grupos 1 **(A)** y 2 **(B)** a 1 dpi. No presentaban lesiones.



Figura 12. Aspecto macroscópico de las caras parietales de dos hígados correspondientes tanto a los grupos 1 (**A**) y 2 (**B**) a los 3 dpi. No presentaban lesiones.

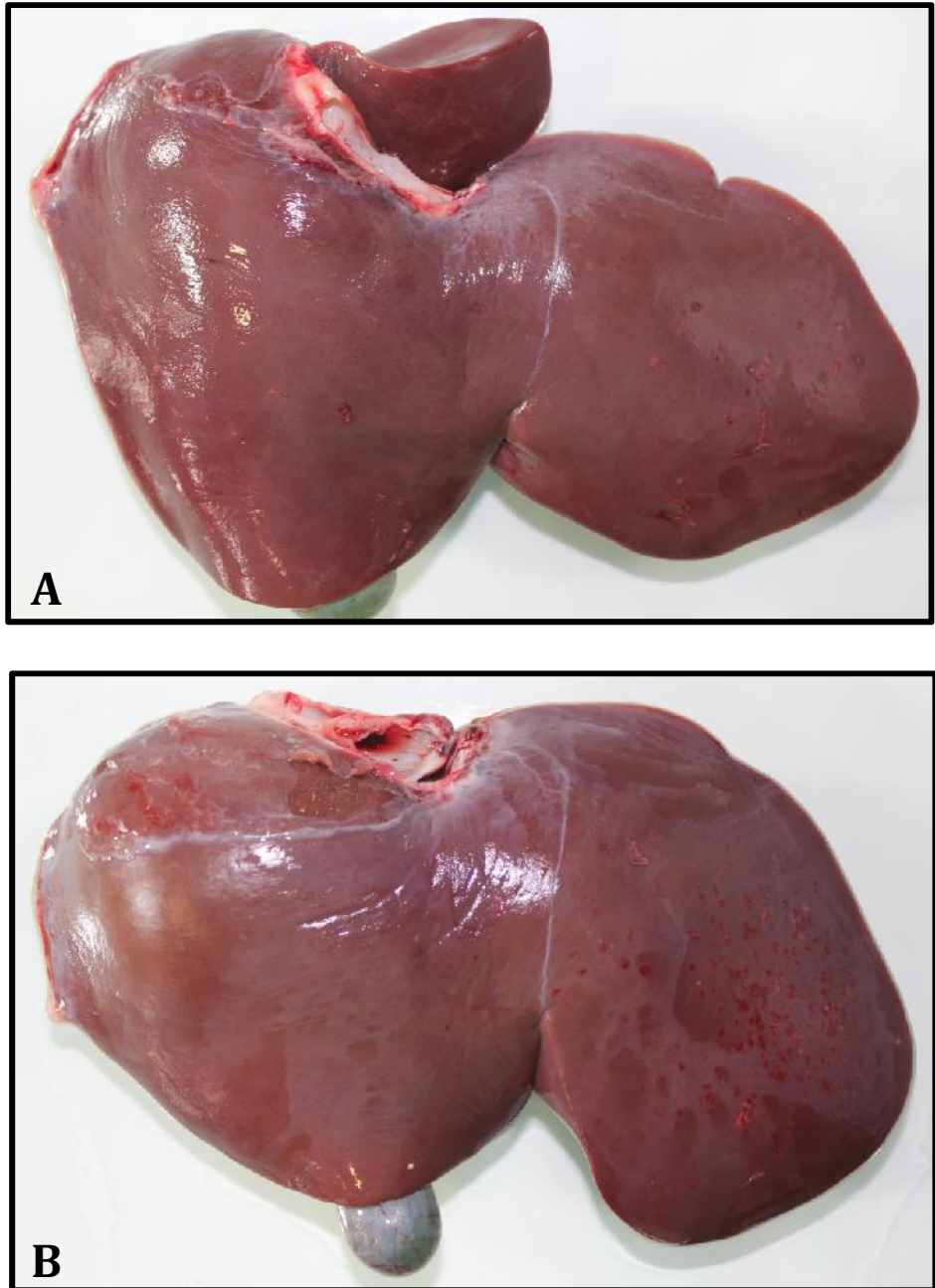


Figura 13. Aspecto macroscópico de las caras parietales de dos hígados correspondientes tanto a los grupos 1 **(A)** y 2 **(B)** a los 9 dpi. Las lesiones afectan principalmente al lóbulo izquierdo y consisten en puntos hemorrágicos y algunos trayectos sinuosos blanquecinos, siendo el número de lesiones menor en el hígado del grupo 1.



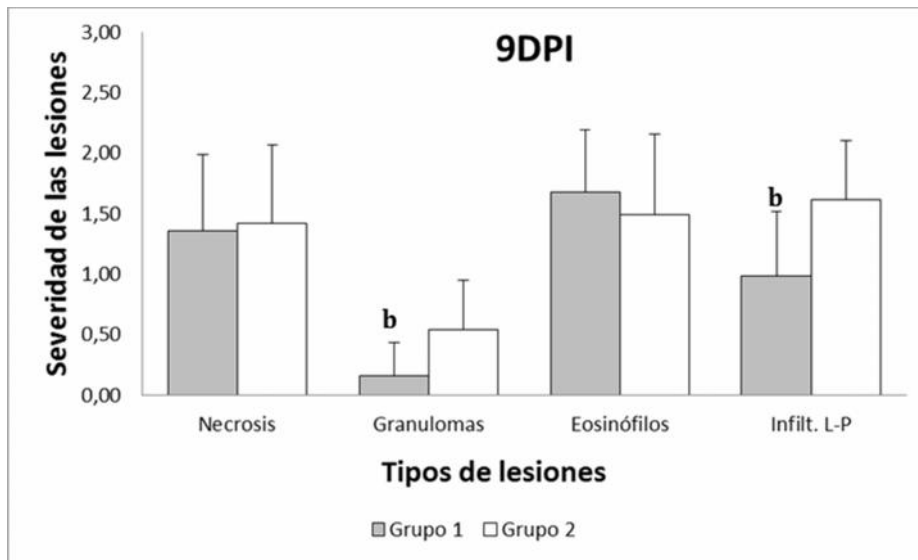
Figura 14. Aspecto macroscópico de las caras parietales de dos hígados correspondientes tanto a los grupos 1 **(A)** y 2 **(B)** a los 18 dpi. Las lesiones afectan principalmente al lóbulo izquierdo y consisten en puntos hemorrágicos y algunos trayectos sinuosos blanquecinos. No presentaban diferencias significativas.

2.2.2.- Estudio microscópico del hígado

Al igual que las lesiones macroscópicas, no se encontraron lesiones histopatológicas en los animales del grupo 3 (control negativo) ni en los de los grupos 1 y 2 a los 1 y 3 dpi. A los 9 dpi, tanto en el grupo 1 como en el grupo 2 se observaron focos de necrosis coagulativa de tamaño variable, localizados principalmente a nivel subcapsular, en ocasiones con forma de trayecto. No se observaron larvas migrantes asociadas a estos focos de necrosis. Las lesiones más iniciales consistían en acidofilia citoplasmáticas de los hepatocitos, picnosis y cariorrhexis nuclear, así como discreto infiltrado de eosinófilos, algunos linfocitos y macrófagos. En otros focos de necrosis más antiguos existía un severo infiltrado de eosinófilos, la mayoría de ellos degenerados mostrando picnosis o cariorrhexis nuclear en el área de necrosis, la cual era rodeada por abundante infiltrado de eosinófilos macrófagos y linfocitos. Algunos de los focos de necrosis estaban rodeado por empalizada de macrófagos y una capa externa de linfocitos dando lugar a granulomas. Los espacios porta cercanos a focos o trayectos de necrosis mostraban abundante infiltrado de eosinófilos, linfocitos y macrófagos, los cuales se distribuían a través de los sinusoides hepáticos para dirigirse hacia los focos de necrosis. Algunas de las lesiones están recogidas en las **figuras 15 y 16**.

Se realizó una valoración semicuantitativa de las lesiones microscópicas hepáticas. A los 9 dpi (**Grafica 7**) la presencia de focos de necrosis y el infiltrado de eosinófilos fue moderado y no mostró diferencias significativas en ambos grupos 1 y 2, aunque el

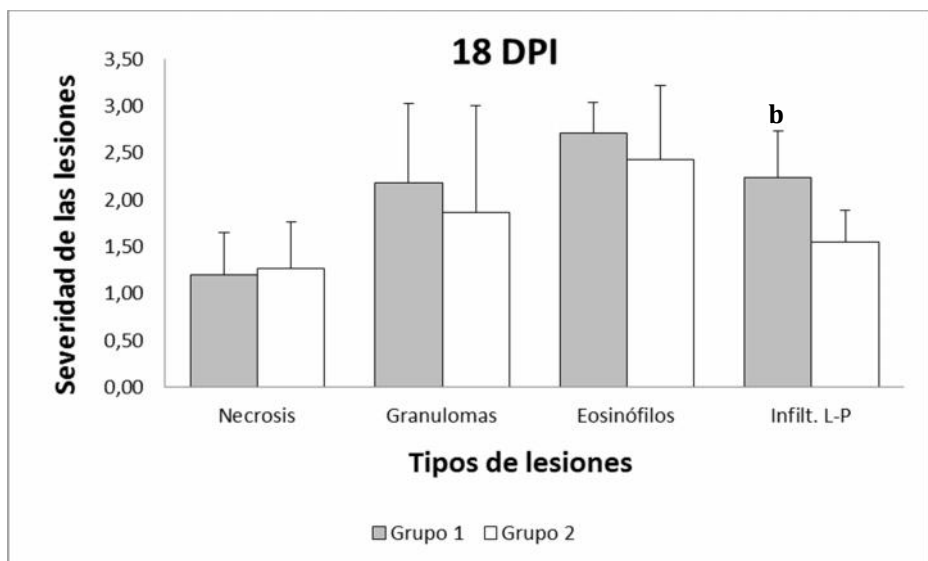
infiltrado de eosinófilos fue ligeramente superior en el grupo 1 que en el grupo 2 ($1,67 \pm 0,51$ frente a $1,48 \pm 0,66$, respectivamente). Sin embargo, en el grupo 1 sí que se observó un descenso significativo ($P=0,04$) en la presencia de granulomas ($0,15 \pm 0,27$ frente a $0,53 \pm 0,41$, respectivamente) así como el infiltrado linfoplasmocitario ($P=0,04$) cuando fue comparado con el grupo 2 ($0,98 \pm 0,53$ en grupo 1 frente a $1,61 \pm 0,49$ en grupo 2).



Gráfica 7. Valoración de las lesiones microscópicas donde **b** indica diferencias significativas entre los grupos 1 (vacunado e infectado) y 2 (no vacunado e infectado). Infilt. L-P.: Infiltrado linfoplasmocitario. 0: Ausencia; 0'5: Discreto; 1: Moderado; 2: Severo; 3: Muy severo.

Por otra parte, a los 18 dpi las lesiones histopatológicas mostraron una severidad mayor como era de esperar. La presencia de focos de necrosis fue de nuevo moderada al igual que ocurrió a los 9 dpi. Sin embargo, las reacciones granulomatosas, el infiltrado de eosinófilos así como el infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario fueron entre moderados y severos. Entre los grupos 1 y 2, el grupo

1 presentó de forma ligera mayor número de granulomas ($2,17 \pm 0,85$ en grupo 1 frente a $1,86 \pm 1,14$ en grupo 2) así como de infiltrado de eosinófilos ($2,71 \pm 0,32$ frente a $2,43 \pm 0,78$ respectivamente) aunque no fue estadísticamente significativo. Por otra parte, el infiltrado linfoplasmocitario sí que fue estadísticamente superior ($P=0,03$) en el grupo 1 respecto al grupo 2 ($2,24 \pm 0,49$ frente a $1,54 \pm 0,34$, respectivamente) (**Gráfica 8**).



Gráfica 8. Valoración de las lesiones microscópicas donde **b** indica diferencias significativas entre los grupos 1 (vacunado e infectado) y 2 (no vacunado e infectado). Infiltr. L-P.: Infiltrado linfoplasmocitario. 0: Ausencia; 0'5: Discreto; 1: Moderado; 2: Severo; 3: Muy severo.

A los 18 dpi, en el grupo 1 y 2 las lesiones hepáticas eran similares a las descritas a los 9 dpi pero más severas con trayectos necróticos de mayor tamaño, siendo los granulomas más numerosos y de mayor tamaño que a los 9 dpi. a los 18 dpi.

Las lesiones microscópicas hepáticas a los 9 dpi fueron muy similares a las descritas en cabras a los 7-9 dpi tras infección con *F.*

hepatica (Zafra y cols., 2013a, 2013b). Sin embargo, en ambos estudios previos en cabras en los grupos no vacunados apenas se observó reacción inflamatoria frente a larvas migrantes de *F. hepática*, mientras en los grupos vacunados, tanto con rGST (Zafra et al., 2013b) como con rCL1 (Zafra y cols., 2013a) se observó un severo infiltrado de eosinófilos alrededor de las larvas migrantes, así como algunos granulomas compuestos por células gigantes multinucleadas y eosinófilos y ausencia de necrosis, lo que sugería que podría tratarse de granulomas frente a restos de larvas de *F. hepatica*. Estos hallazgos no se observaron en el presente estudio en el que las larvas migrantes mostraron escasa o nula reacción inflamatoria a su alrededor.

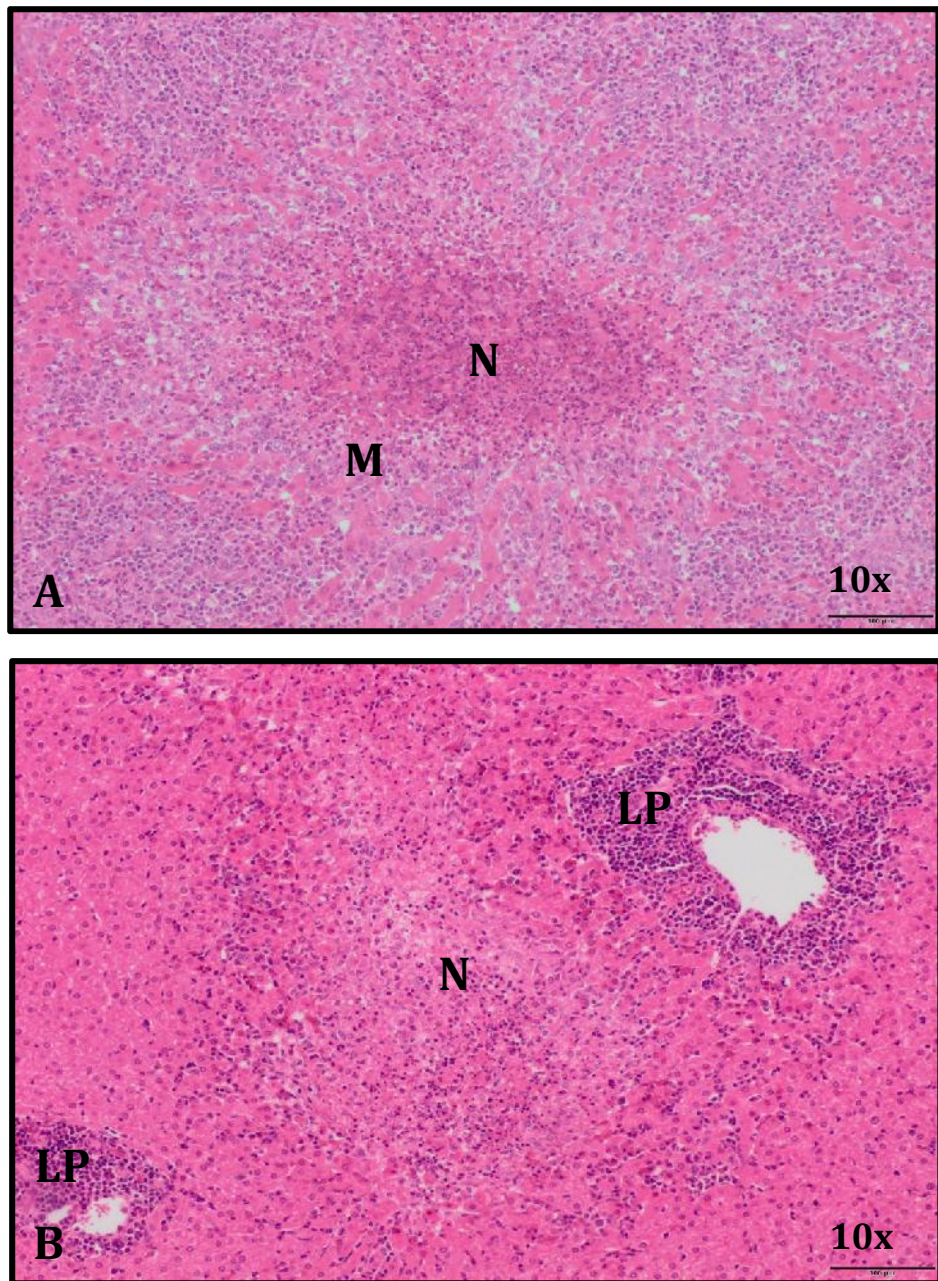


Figura 15. Imágenes microscópicas de hígado correspondientes al grupo 2 a los 9 dpi **(A)** Centro necrótico con eosinófilos en su interior (N) que se empieza a rodear por macrófagos (M) **(B)** Presencia de infiltrados linfoplasmocitario periportal (LP) así como un foco de necrosis aguda (N)-HE.

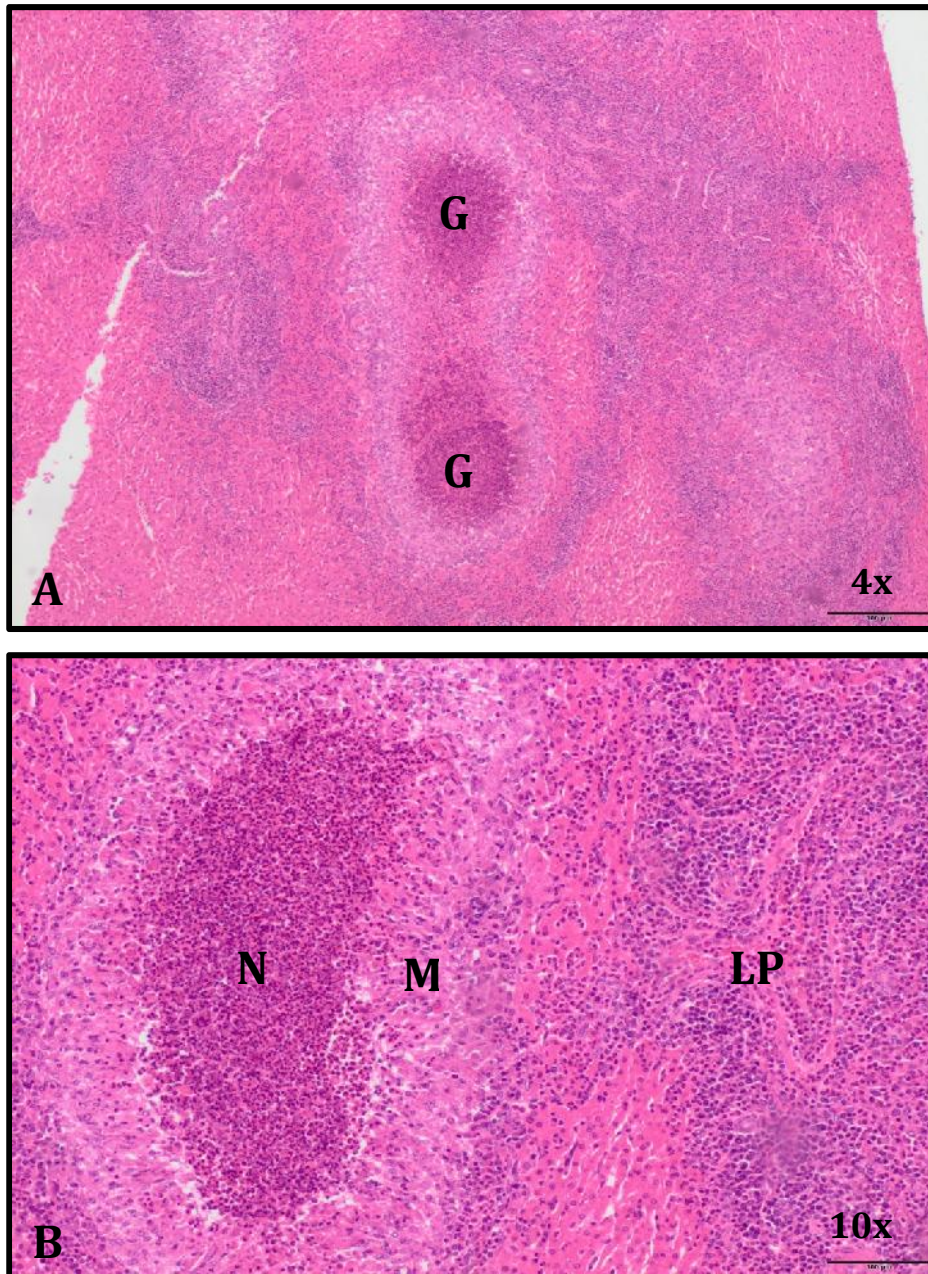
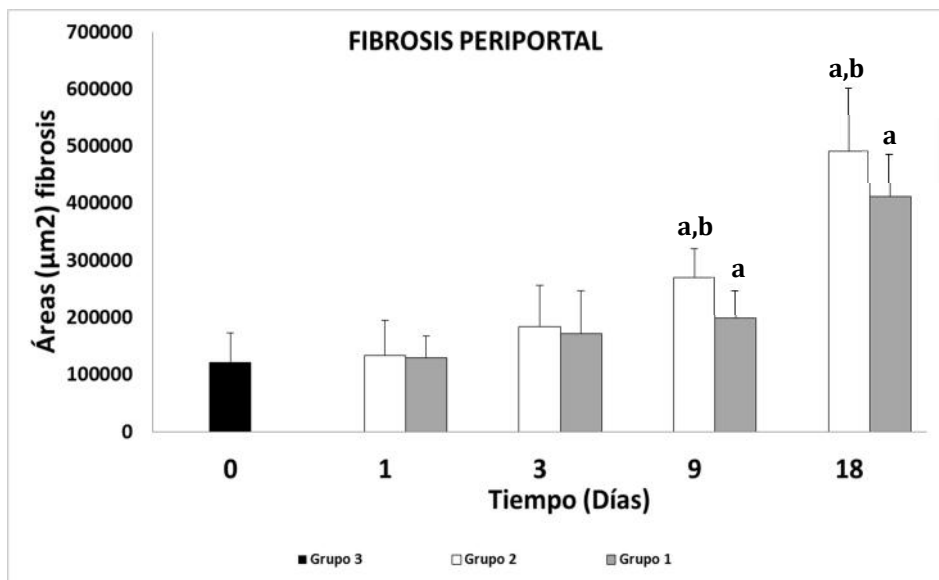


Figura 16. Imágenes microscópicas de hígado correspondientes al grupo 1 a los 18 dpi **(A)** Reacciones granulomatosas en parénquima hepático (G) **(B)** Detalle de la imagen anterior donde puede apreciarse el centro necrótico con eosinófilos en su interior (N), la empalizada de macrófagos (M) y el abundante infiltrado linfoplasmocitario-HE.

2.2.3.- Estudio morfométrico (fibrosis periportal)

La fibrosis hepática es una lesión crónica típica de la fasciolosis en ovejas (Meeusen y cols., 1995; Pérez y cols., 2002) y la citoquina TGF- β , la cual induce una señalización SMAD juega un papel importante en el inicio y progresión de la fibrosis (Cutroneo y cols., 2007).

La evaluación de la fibrosis periportal con Tricromico de Masson en cortes del tejido en este estudio (**Grafica 9**) reveló un incremento gradual del área de fibrosis a lo largo de los diferentes días postinfección tanto en el grupo 1 como en el grupo 2 (**Figuras 17-19**) siendo estadísticamente significativo ($p < 0,0001$) en comparación con el grupo control negativo a partir de los 9 dpi. Tanto a los 9 como a los 18 dpi el grupo control infectado mostró mayores áreas de fibrosis con respecto al grupo vacunado ($p < 0,05$).



Gráfica 9. Áreas de fibrosis periportal (medidas en μm^2) para los grupos 1 y 2 y el grupo 3 donde **a** indica diferencias significativas con el grupo 3 (control negativo-0 dpi) y **b** indica diferencias significativas entre los grupos 1 (vacunado e infectado) y 2 (no vacunado e infectado).

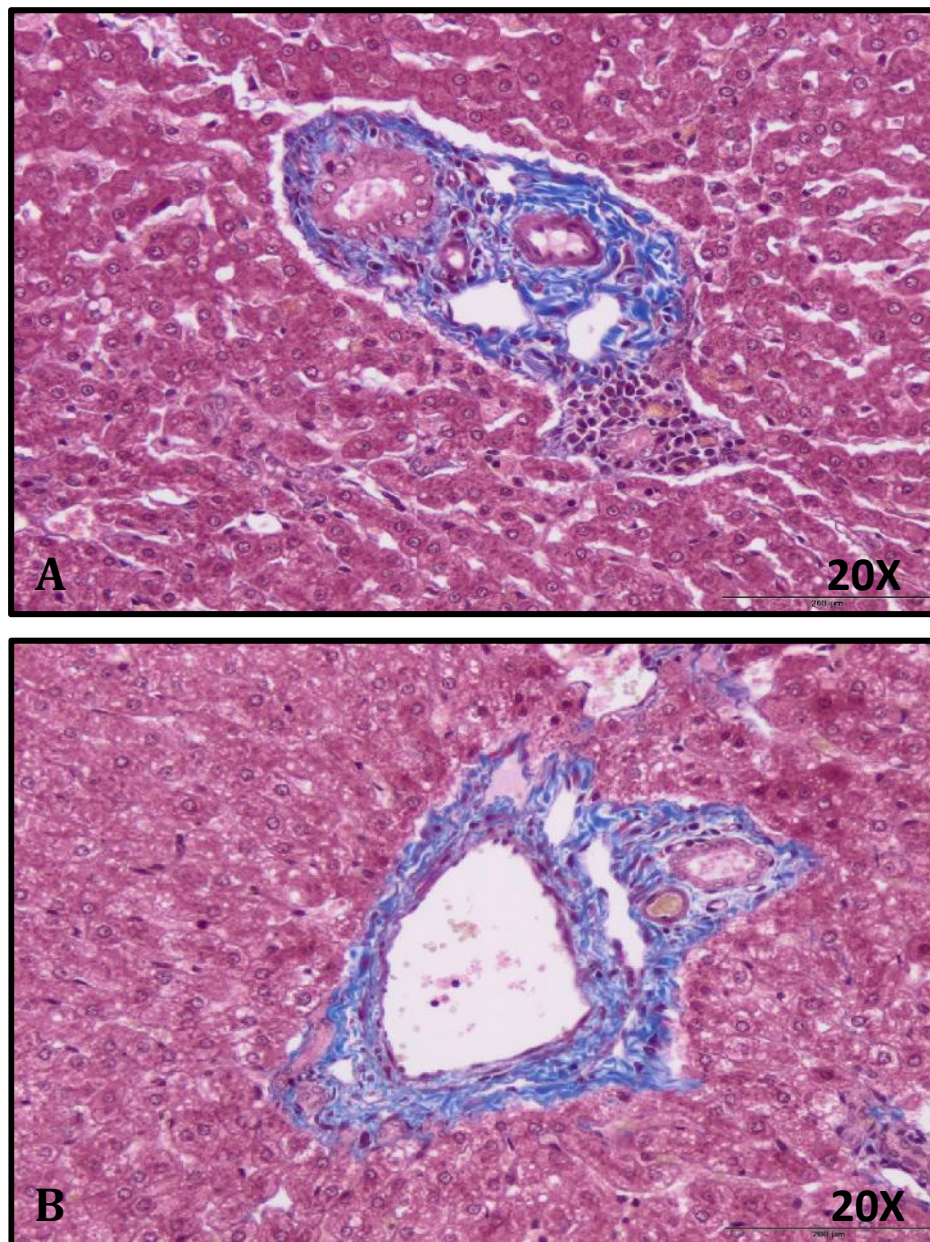


Figura 17. Imágenes microscópicas de hígado donde se observan áreas de fibrosis (área teñida de azul) **(A)** Fibrosis periportal de animales pertenecientes al grupo 1 a 1 dpi **(B)** Fibrosis periportal de animales pertenecientes al grupo 1 a 3 dpi. No había diferencias significativas entre 1 y 3 dpi, ni con respecto al grupo 3- Tricómico de Masson.

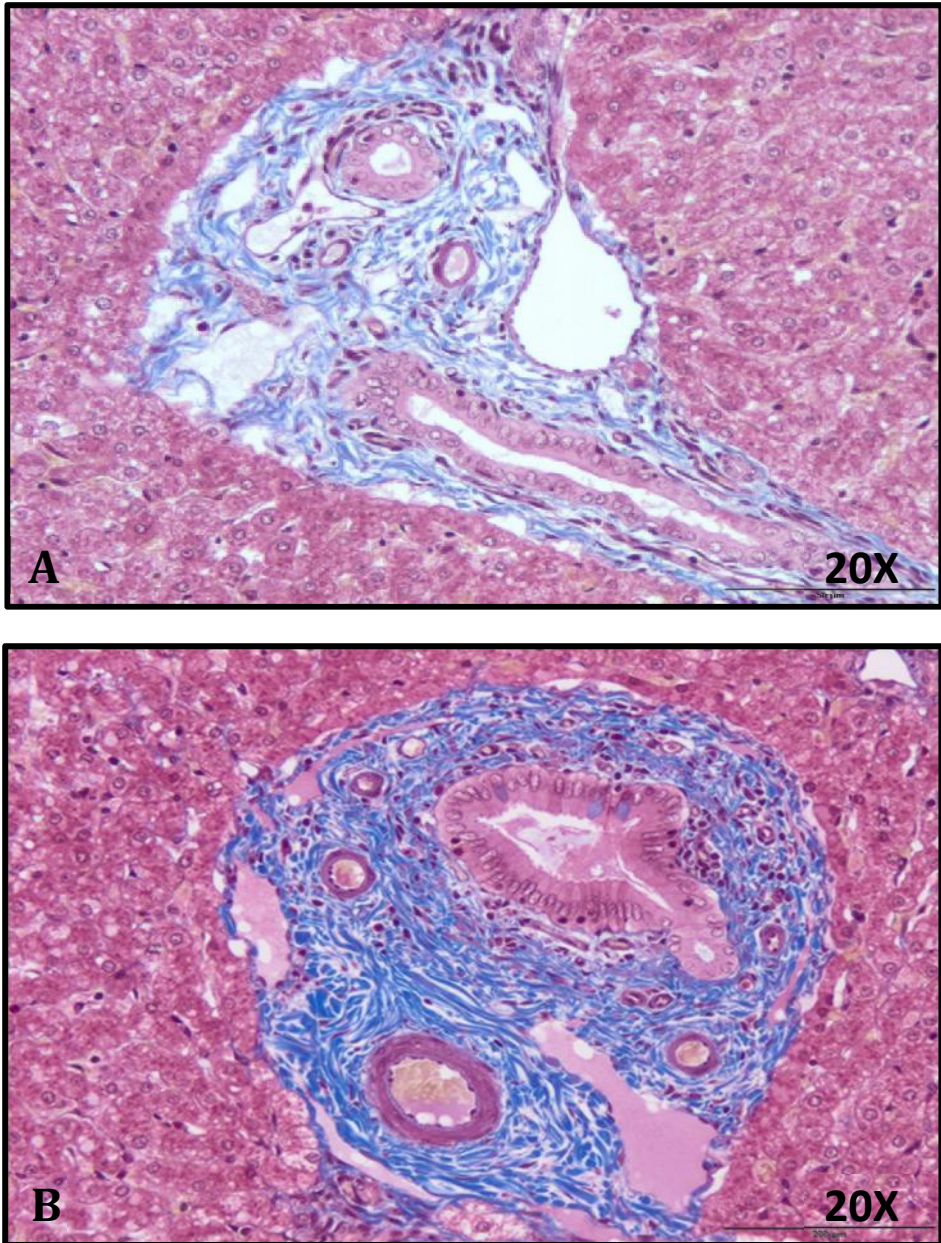


Figura 18. Imágenes microscópicas de hígado donde se observan áreas de fibrosis (área teñida de azul) **(A)** Fibrosis periportal de animales pertenecientes al grupo 1 a 9 dpi **(B)** Fibrosis periportal de animales pertenecientes al grupo 2 a 9 dpi. Se observaron diferencias significativas entre el grupo 1 y grupo 2, y de ambos con respecto al grupo 3- Tricómico de Masson.

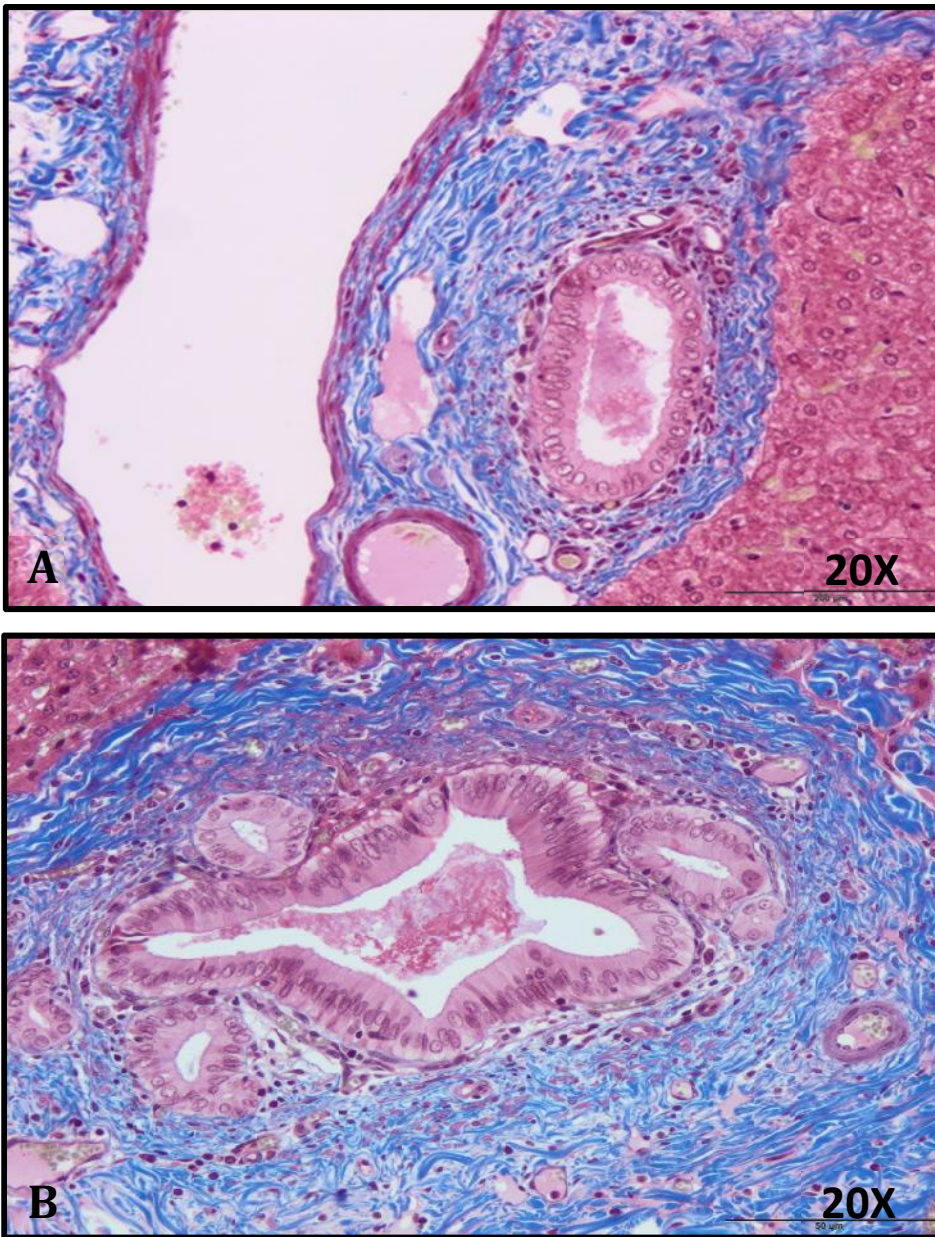


Figura 19. Imágenes microscópicas de hígado donde se observan áreas de fibrosis (área teñida de azul) **(A)** Fibrosis periportal de animales pertenecientes al grupo 1 a 18 dpi **(B)** Fibrosis periportal de animales pertenecientes al grupo 2 a 18 dpi. Se observaron diferencias significativas entre el grupo 1 y grupo 2, y de ambos con respecto al grupo 3- Tricómico de Masson.

2.3.-Mecanismos de respuesta en fases tempranas (experiencia 1) de la infección

Para mejorar la protección de los candidatos vacunales es de vital importancia el conocimiento de los mecanismos de la respuesta inmune local de las ovejas vacunadas y no vacunadas. Entre los mecanismos de respuesta poco conocidos en fases tempranas a nivel local en infecciones por F. hepática está la dinámica de diferentes tipos de citoquinas implicadas en el proceso (Molina-Hernández y cols., 2015, Toet y cols., 2014).

El método más utilizado para la detectar los niveles de transcripción o la cuantificación absoluta/relativa de ARN es la PCR cuantitativa (qRT-PCR). En nuestro estudio hemos cuantificado el ARN de forma absoluta debido a que este método ofrece mayor información de los datos, siendo capaz de medir con precisión la cantidad total de ADN, evitando la inexactitud de la mayoría de los estándares internos como referencias cuantitativas. Además, de esta forma mediante la cuantificación absoluta podemos expresar los niveles de transcripción en términos de números de copias de moléculas (Bustin y cols., 2000).

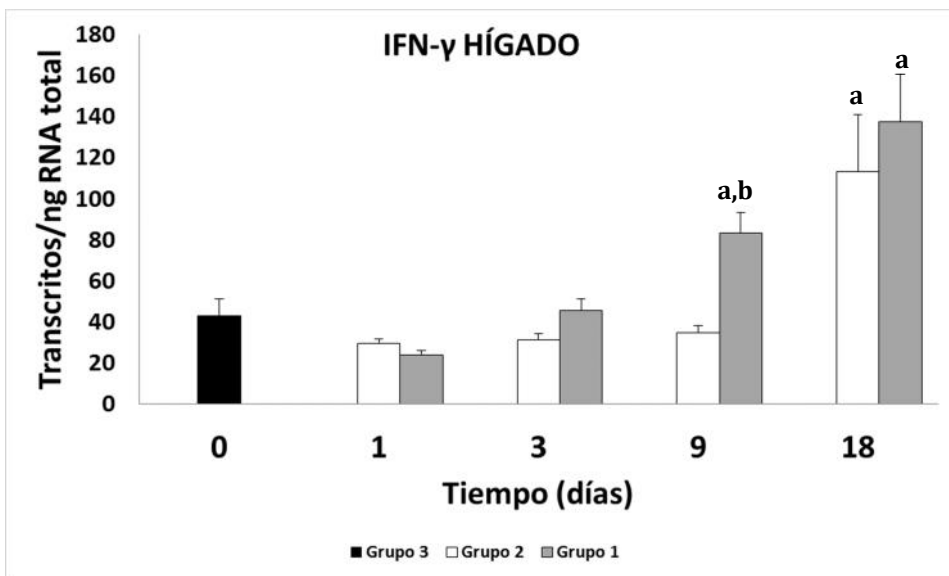
2.3.1- Marcadores Th1/Th2 mediante qRT-PCR

2.3.1.1- Expresión en hígado de IL-4 e IFN- γ

El número de moléculas cuantificadas tanto de IFN- γ como de IL-4 en hígado fue 20 veces menor que en el NLH (las moléculas expresadas en el grupo 3 fueron, 42 moléculas/ng totales de ARN de IFN- γ y 17 moléculas/ng totales de ARN de IL-4 en hígado con respecto a 1020 moléculas/ng totales de ARN de IFN- γ y

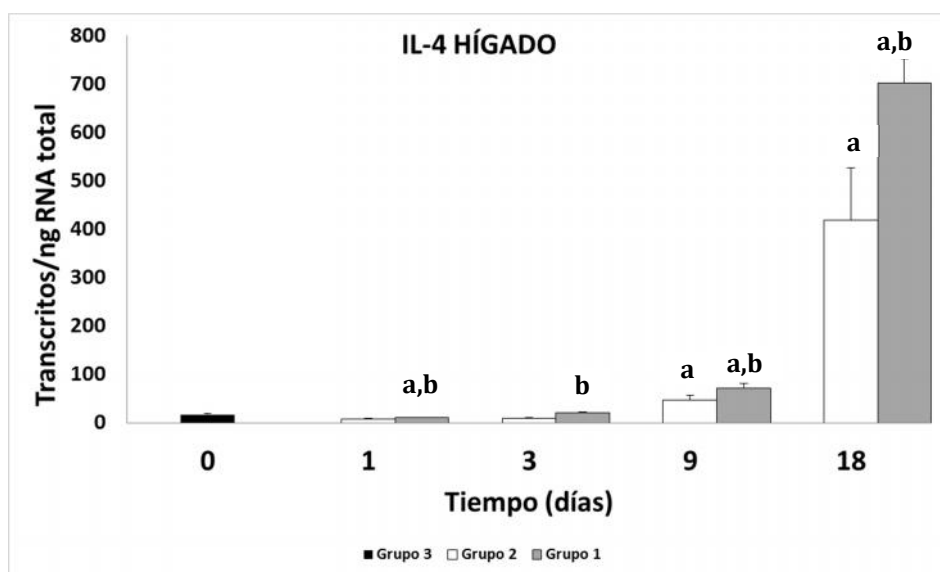
227moléculas/ng totales de ARN de IL-4 en NLH), dicho resultado era de esperar debido a que la cantidad de linfocitos encontrados en ovejas sanas es bastante menor en hígado.

La dinámica de expresión correspondiente a IFN- γ en hígado se muestra en la **gráfica 10**. Dicha expresión se incrementó de forma gradual, sin haber ninguna diferencia significativa en los grupos 1 y 2 a 1 y 3 dpi con respecto al grupo 3 (control negativo). A los 9 dpi el grupo 2 se mantuvo con una expresión similar a la observada en el grupo 3, mientras que el grupo 1 mostró un aumento significativo ($P < 0,001$) en comparación tanto con los grupos 2 y 3. A los 18 dpi se observó la máxima expresión de esta citoquina en los grupos 1 y 2 con aumento significativo ($P < 0,001$) en comparación con el grupo 1.



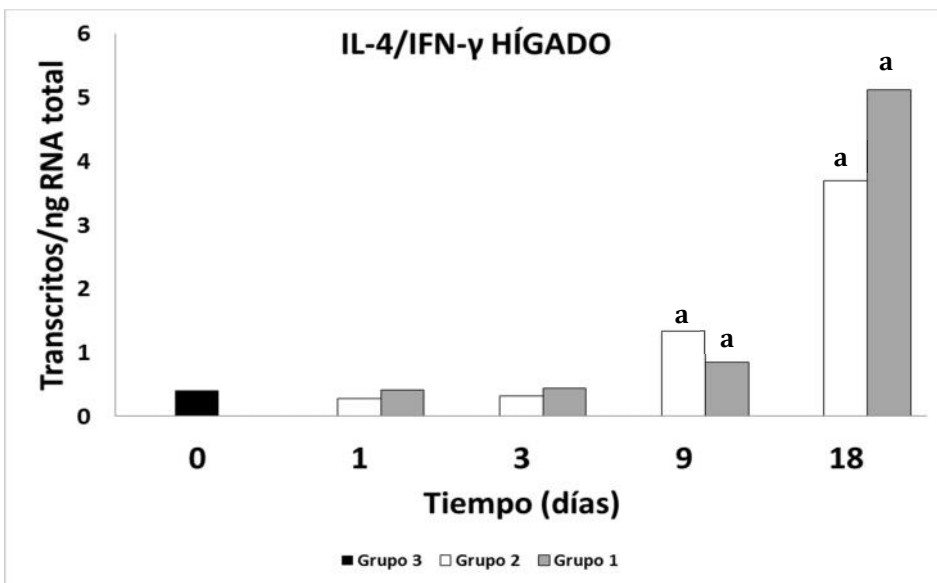
Gráfica 10. Niveles de expresión génica de IFN- γ en hígado donde **a** indica diferencias significativas ($P < 0,05$) con el grupo 3 (control negativo-0 dpi) y **b** indica diferencias significativas entre los grupos 1 (vacunado e infectado) y 2 (no vacunado e infectado). La mayor expresión de esta citoquina con respecto el grupo 3 fue a los 18 dpi tanto en el grupo 1 como en el grupo 2.

El estudio de cuantificación de IL-4 en hígado se muestra en la **gráfica 11**. A 1 dpi la expresión de esta citoquina en el grupo vacunado fue significativamente ($P<0,01$) menor con respecto al grupo control negativo. A los 3 dpi, el grupo 1 mostró un incremento estadísticamente significativo en la expresión de moléculas/ng ($P<0,0001$) respecto al grupo 2. Este incremento significativo del grupo 1 respecto a los grupos 2 y 3 también se observó a los 9 dpi ($P<0,05$). El mayor incremento se observó a los 18 dpi en los grupos 1 y 2 respecto al grupo 3, siendo dicha diferencia más pronunciada en el grupo 1 ($P<0,001$).



Gráfica 11. Niveles de expresión génica de IL-4 en hígado donde **a** indica diferencias significativas ($P<0,05$) con el grupo 3 (control negativo-0 dpi) y **b** indica diferencias significativas entre los grupos 1 (vacunado e infectado) y 2 (no vacunado e infectado). La mayor expresión de esta citoquina con respecto el grupo 3 fue a los 18 dpi tanto en el grupo 1 como en el grupo 2.

La ratio IL-4/IFN- γ en hígado se expresa en la **gráfica 12**. Esta ratio fue de 0,4 en el grupo 3 (control negativo) y se mantuvo en niveles muy similares en los grupos 1 y 2 a los 1 y 3 dpi, aumentando de forma significativa ($P < 0,05$) en ambos grupos respecto al grupo control negativo a los 9 dpi (1,33 y 0,85 respectivamente) ($P < 0,05$). Dicho aumento fue particularmente elevado a los 18 dpi (5,1 y 3,7 para el grupo 1 y 2, respectivamente), con diferencias significativas respecto al grupo 3 ($P < 0,05$).

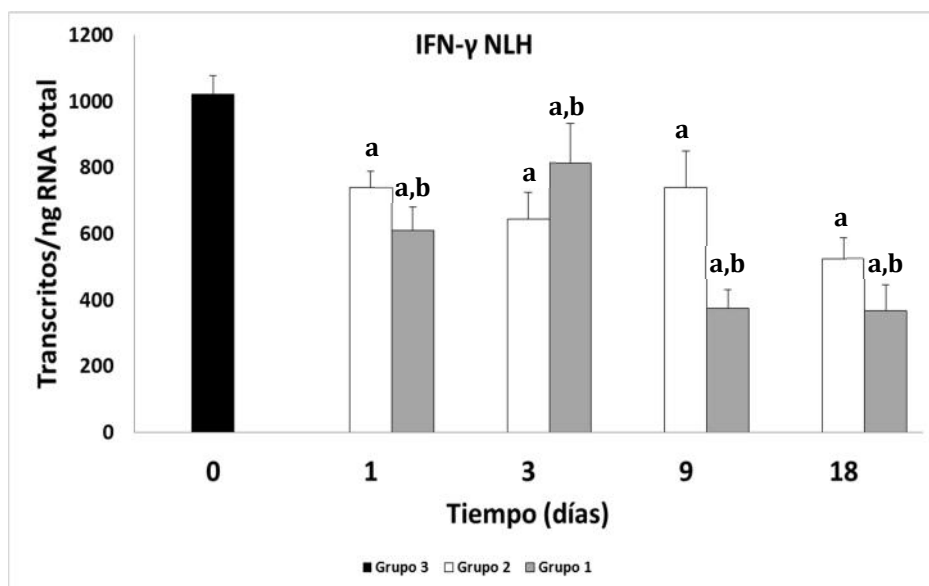


Gráfica 12. Ratio IL-4/ IFN- γ en hígado donde **a** indica diferencias significativas ($P < 0,05$) con el grupo 3 (control negativo-0 dpi).

2.3.1.2- *Expresión en NLH de IL-4 e IFN- γ*

La dinámica de expresión de IFN- γ en NLH se muestra en la **gráfica 13**. Dicha expresión disminuye significativamente ($P < 0,01$) tanto en el grupo 2 como en el 1 con respecto al grupo 3 desde 1 dpi en adelante, observándose la menor expresión a los 18

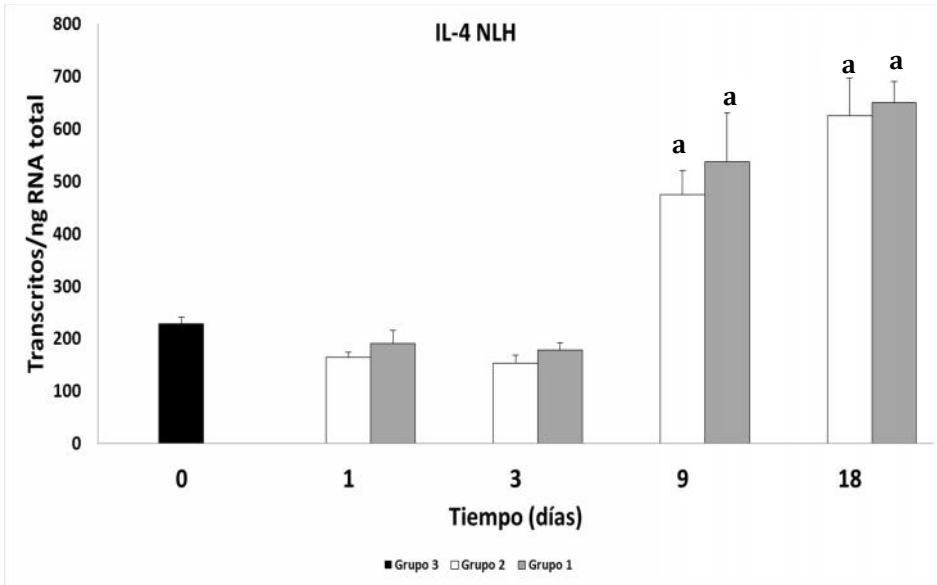
dpi con respecto al grupo 3. En todos los estadios se observaron diferencias significativas entre el grupo 1 y 2, siendo estadísticamente mayor ($P < 0,001$) la expresión de IFN- γ en el grupo 2 con respecto al grupo 1 a los 1, 9 y 18 dpi. Sin embargo, a los 3 dpi esta dinámica se invirtió y fue el grupo 1 el que mostró mayores niveles de expresión de IFN- γ comparado con el grupo 2 ($P < 0,05$).



Gráfica 13. Niveles de expresión génica de IFN- γ en NLH donde **a** indica diferencias significativas ($P < 0,05$) con el grupo 3 (control negativo-0 dpi) y **b** indica diferencias significativas entre los grupos 1 (vacunado e infectado) y 2 (no vacunado e infectado). La mayor expresión de esta citoquina en NLH se observó en el grupo 1 a los 3 dpi.

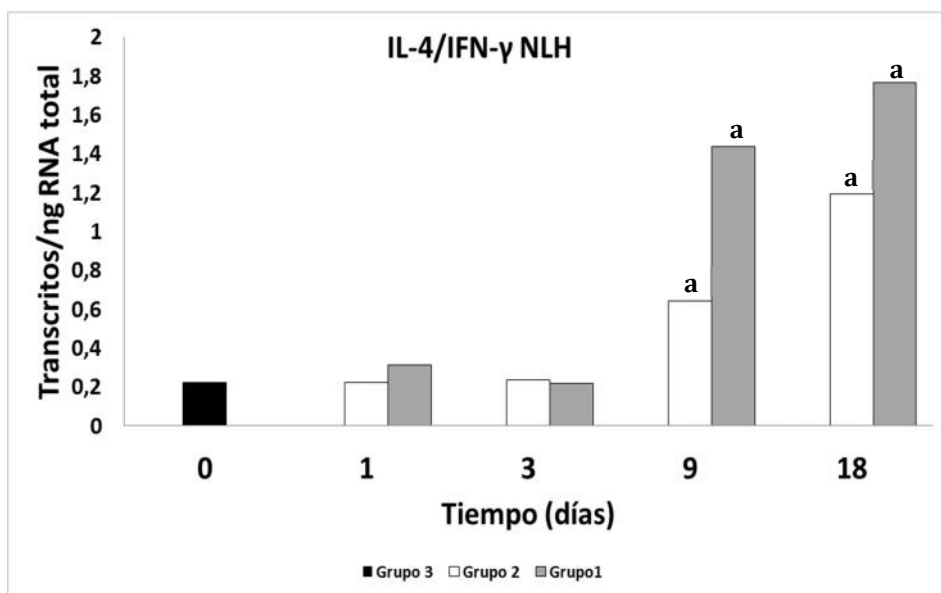
La expresión de IL-4 en NLH se muestra en la **gráfica 14**. La dinámica de esta citoquina fue más gradual que la de IFN- γ . El grupo 3 mostró una expresión ligeramente mayor que los grupos 1 y 2 a los 1 y 3 dpi aunque sin diferencias estadísticas significativas. Por otro lado, a los 9 y 18 dpi sí que se observó un aumento

extremadamente significativo ($P < 0,0001$) en el número de moléculas/ng totales de ARN en los grupos 1 y 2 con respecto al grupo 3. En ninguno de los estadios hubo diferencias significativas entre los grupos 1 y 2.



Gráfica 14. Niveles de expresión génica de IL-4 en NLH donde **a** indica diferencias significativas ($P < 0,05$) con el grupo 3 (control negativo-0 dpi). La mayor expresión de esta citoquina con respecto al grupo 3 fue a los 9 y 18 dpi tanto en el grupo 1 como en el grupo 2.

La ratio IL-4/IFN- γ en NLH se expresa en la **gráfica 15**. Fue de 0,22 en el grupo 3 y se mantuvo con valores similares en los grupos de 1 y 3 dpi, de igual forma a como ocurrió en el hígado. Por otro lado, sí que se observó un incremento significativo en la ratio IL-4/IFN- γ a los 9 y particularmente a los 18 dpi al comparar el grupo 1 y 2 con el grupo 3 ($P < 0,05$). La expresión en estos grupos fue del orden de entre 4 y 5 veces superior a los observados en el control negativo



Gráfica 15. Ratio IL-4/IFN- γ en NLH donde **a** indica diferencias significativas ($P < 0,05$) con el grupo 3 (control negativo-0 dpi).

El incremento de la expresión de IFN- γ a los 9 y 18 dpi en hígado en los grupos 1 y 2 contrasta con el marcado descenso de la expresión de esta citoquina descrito por otros autores a los 7 dpi en PBMCs de ovejas vacunadas con la misma vacuna que en el presente estudio así como en ovejas infectadas (Fu y cols., 2016). Este hecho podría deberse a que la expresión de IFN- γ podría ser muy diferente en muestras de hígado normal y en leucocitos sanguíneos circulantes. El hígado normal ovino presenta muy pocas células inflamatorias, lo que justifica una expresión muy baja de esta citoquina en el grupo 3 y a los 1 y 3 dpi en los grupos 1 y 2. Las lesiones causadas por *F. hepatica* en fases tempranas de la infección comenzaron a observarse en la presente experiencia a los 9 dpi, y consistieron en trayectos necróticos y en hemorragias, así como en infiltrado inflamatorio severo compuesto por eosinófilos, linfocitos y macrófagos, el cual se organizaba formando granulomas

con macrófagos activos a modo de células epitelioides que rodeaban los focos y trayectos de necrosis. La activación de los macrófagos a células epitelioides para formar granulomas requiere de IFN- γ . Así, se ha descrito que el IFN- γ juega un papel importante en la formación de granulomas en diversas enfermedades parasitarias como en la schistosomiasis (Attia y cols., 2014) y cisticercosis (Freitas y cols., 2016), por lo que el incremento de IFN- γ en hígado de ambos grupos infectados, quizás refleja una respuesta contra el daño producido en ese tejido y la formación de granulomas, más que contra la larva del parásito. Esto justificaría el incremento de la expresión de IFN- γ a los 18 dpi cuando el número de granulomas fue significativamente mayor tanto en el grupo 1 como en el grupo 2.

Por otro lado, el incremento en la expresión génica de IFN- γ en hígado a los 9 y 18 dpi también contrasta con la reducción en la expresión de IFN- γ en hígados de vacas con infección crónica por *F. hepatica* (Flynn y Mulcahy, 2008; Mendes y cols., 2013), lo que fue relacionado con un incremento en la producción de IL10 como se ha descrito en estudios *in vitro* (Flynn y Mulcahy, 2008). Sin embargo, en estadios agudos de la infección con *F. hepatica* se ha descrito un incremento de los niveles de IFN- γ en PBMc (Clery y cols., 1996), lo que está en consonancia con los resultados del incremento en la expresión génica de esta citoquina observada en el hígado a los 9 y 18 dpi en nuestro estudio.

La citoquina IL-4, también mostró un incremento significativo de los grupos 1 y 2 con respecto al grupo 3 tanto a los 9 como a los 18 dpi, siendo mucho mayor el aumento a los 18 dpi.

Este incremento en la expresión de IL-4 también está de acuerdo con el aumento de la expresión de IL-4 en PBMCs a los 7 dpi de ovejas vacunadas e infectadas con *F. hepatica* (Fu y cols., 2016). Un estudio llevado a cabo por Mendes y cols., (2013) observó en hígado de vacas con infección espontánea crónica por *F. hepatica* que la expresión de IL-4 aumentó de forma significativa en los animales infectados respecto a los no infectados. La débil expresión de IL-4 a los 1 y 3 dpi, tanto en el grupo 1 como en el grupo 2, sugiere que el parásito induce pocos cambios en la expresión génica de esta citoquina en el hígado antes de penetrar en el mismo.

En NLH la máxima expresión de IFN- γ fue a los 3 dpi. Estos datos contrastan con los obtenidos por Moreau y cols., en 1998, quienes observaron los valores más altos de IFN- γ a los 10 dpi en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y NLH en ovejas infectadas con *F. hepatica* en comparación con ovejas no infectadas. Estos autores cuantificaron los niveles de esta citoquina mediante ELISA y en nuestro estudio se han cuantificado mediante qRT-PCR evaluando la presencia de transcritos. Los transcritos son moléculas de una vida media corta a partir de los cuales se sintetizan las proteínas y una vez sintetizadas si no se necesitan más no se producen más transcritos o se degradan. Esto explicaría por qué en el estudio de Moreau y cols., (1998) la expresión de IFN- γ era algo más tardía que en nuestro estudio. Por otro lado, el estudio llevado a cabo por Fu y cols., (2016) evaluando la expresión génica de la misma citoquina mediante transcriptómica arrojó resultados similares a los de nuestra experiencia, observando un

descenso en la expresión de IFN- γ en PBMCs de ovejas infectadas con *F. hepatica* a los 7 dpi respecto a las ovejas no infectadas. Este hecho pone de manifiesto que las técnicas utilizadas tanto en nuestra experiencia como en la de Fu y cols., (2016) son más sensibles a la hora de detectar esta citoquina en fases tempranas de la enfermedad. Por otro lado, en un estudio llevado a cabo por Pleasance y cols en 2011 se observó un descenso en la expresión de IFN- γ a las 10 spi en ovejas indonesias de cola delgada infectadas con *F. hepatica*. Estos resultados están de acuerdo con nuestro estudio, ya que desde 1 dpi se observa una menor expresión de esta citoquina en ambos grupos infectados y dicho descenso en la expresión es máximo a los 9 y 18 dpi.

En nuestro estudio se observó a los 9 y 18 dpi una mayor expresión de IL-4 que de IFN- γ (el cual disminuyó a estos estadios), coincidiendo este resultado con los obtenidos en NLH de ovejas, donde se observó una mayor expresión de IL-4 que de IFN- γ a 4 y 10 spi (Martinez-Pérez y cols., 2014). Así mismo, un estudio llevado a cabo en NLH de vacas, se observó una sobreexpresión de IL-4 con respecto a IFN- γ en animales de 84 dpi (Waldvogel y cols., 2004). En el bazo de ratas infectadas con *F. hepatica* se observó un incremento muy significativo de IL-4 en animales re infectados a las 12 spi y sacrificados a las 20 spi en comparación con los controles negativos, primoinfectados y re infectados a las 8spi (Valero y cols., 2017). Por el contrario, estudios llevados a cabo en conejos vacunados con FhSAP2 presentaban una menor cantidad de IL-4 a 10 spi en animales vacunados que de IFN- γ (Espino y Rivera 2010).

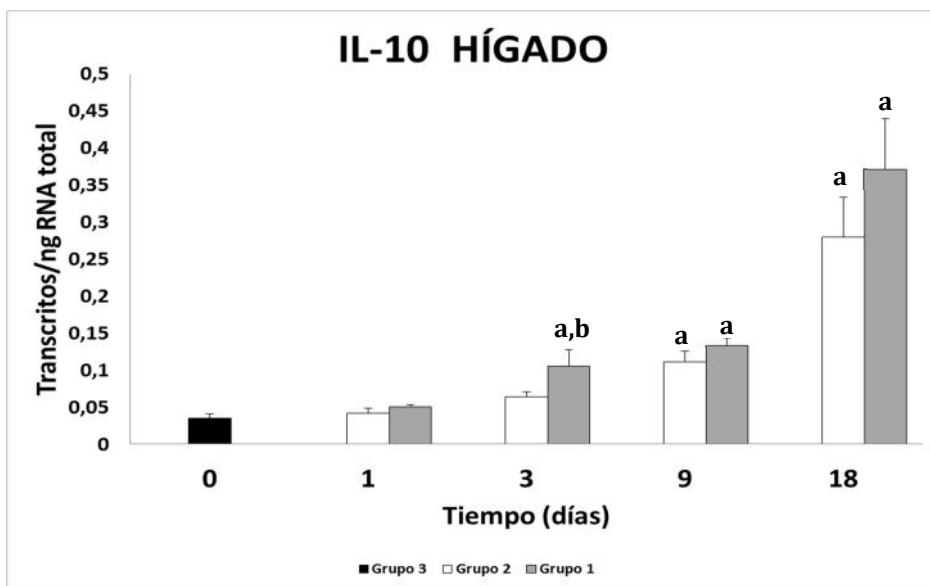
En nuestro estudio, los niveles de transcripción de ambas citoquinas, IFN- γ e IL-4, aumentaron de forma gradual en hígado, tanto en el grupo control infectado como en el grupo vacunado a lo largo de toda la experiencia, aunque el número de transcritos cuantificados era mayor en IL-4. En NLH, desde 1 dpi se observa una menor expresión de IFN- γ en ambos grupos infectados y dicho descenso en la expresión es máximo a los 9 y 18 dpi. Mientras que a expresión de IL-4 es mayor a los 9 y 18 dpi. Estos datos sugieren una polarización de la respuesta inmunitaria hacia un perfil Th2 en los 9 dpi y particularmente a los 18 dpi tanto en el grupo vacunado como en el grupo control infectado, lo que está de acuerdo con la polarización de la respuesta hacia un perfil Th2 descrita cuando la infección progresa a estadios crónicos en PBMC ovinos (Fu et al., 2016) y bovinos (Clery y cols., 1996; Flynn and Mulcahy, 2008), así como en hígado bovinos con infección crónica natural (Mendes y cols., 2013) y que igualmente se ha visto que ocurre en los macrófagos peritoneales durante las fases tempranas de la infección con *F. hepatica* en ovejas (datos no publicados).

2.3.2.- Citoquinas reguladoras en infecciones tempranas por *F. hepatica*

2.3.2.1. -Expresión génica de IL-10/TGF- β en hígado

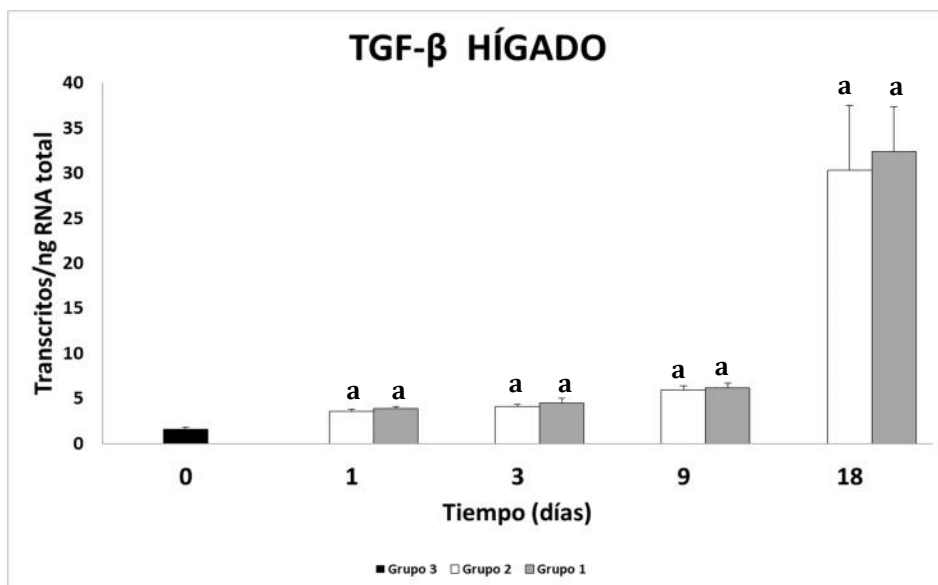
Para IL-10 (**Gráfica 16**) hubo un incremento gradual en los grupos 1 y 2, siendo la expresión mayor a los 18 dpi. Este incremento fue significativo desde los 9 dpi en el grupo 2 respecto al grupo 3 ($P < 0,001$), y a partir de los 3 dpi en los animales del grupo 1 ($P < 0,001$) con respecto al grupo 3. Por otro lado, el grupo 1 mostró mayor expresión que el grupo 2 a lo largo de toda la

experiencia, solo habiendo diferencias significativas a los 3 dpi (P=0,03).



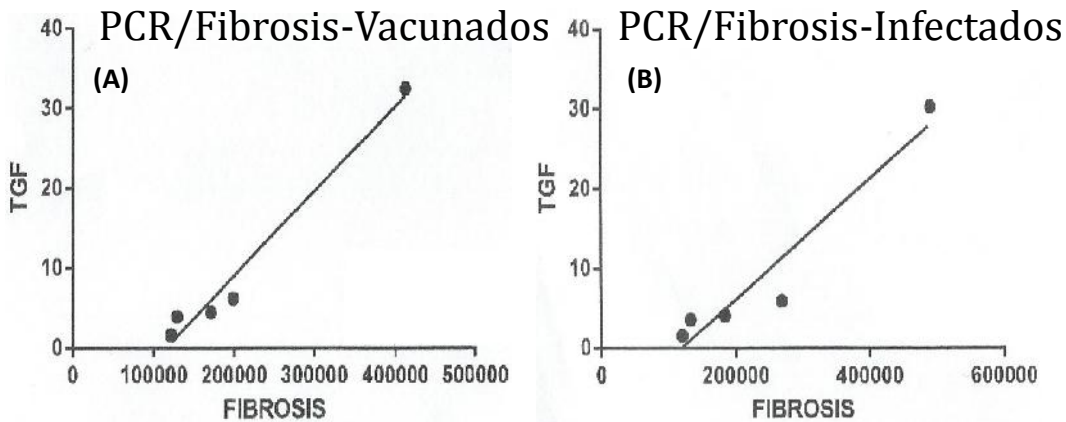
Gráfica 16. Niveles de expresión génica de IL-10 en hígado donde **a** indica diferencias significativas ($P < 0,05$) con el grupo 3 (control negativo-0 dpi) y **b** indica diferencias significativas entre los grupos 1 (vacunado e infectado) y 2 (no vacunado e infectado).

La expresión de TGF- β (**Gráfica 17**) en animales del grupo 1 y 2 fueron muy similares a lo largo de la infección sin diferencias significativas entre ambos. Al comparar con el grupo 3, tanto el grupo 1 como el 2 mostraron incremento significativo ($P < 0,05$) a los 1, 3 y 9 dpi, mientras que a los 18 dpi hubo un incremento bastante importante de ambos grupos con respecto al grupo control negativo ($P < 0,001$).



Gráfica 17. Niveles de expresión génica de TGF- β en hígado donde **a** indica diferencias significativas ($P < 0,05$) con el grupo 3 (control negativo-0 dpi). La mayor expresión de esta citoquina con respecto el grupo 3 fue a los 18 dpi tanto en el grupo 1 como en el grupo 2.

El estudio estadístico demostró de una correlación positiva significativa (**Grafica 18**) entre la expresión génica de TGF- β y la fibrosis peri-portal tanto del grupo 1 ($P=0,017$; $r=1$) como del grupo 2 ($P=0,017$; $r=1$).

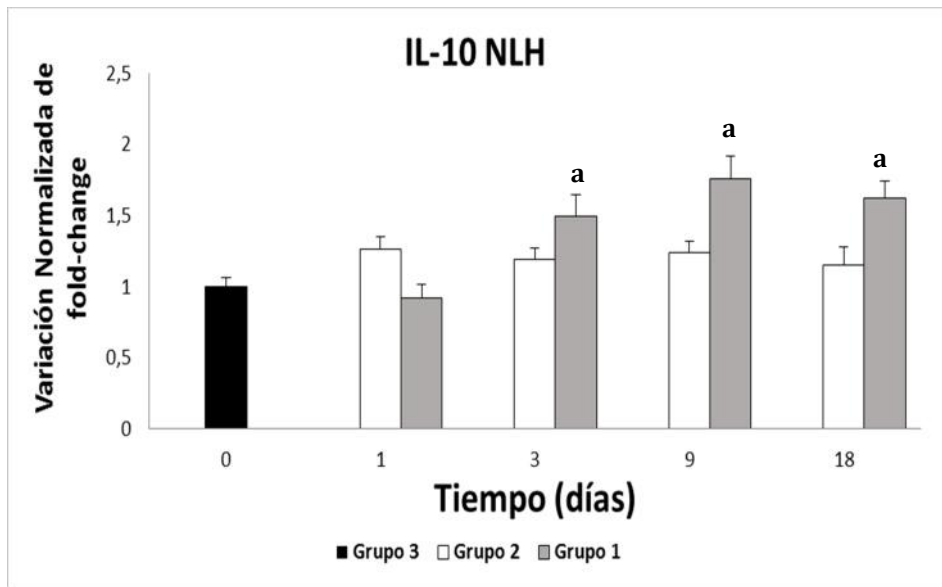


Gráfica 18. Correlación entre la expresión génica de TGF β con las áreas de fibrosis periportal en animales del grupo 1 **(A)** y animales del grupo 2 **(B)**. Se observó una correlación significativa y positiva en ambos grupos.

2.3.2.2.-*Expresión de IL-10/TGF- β en NLH*

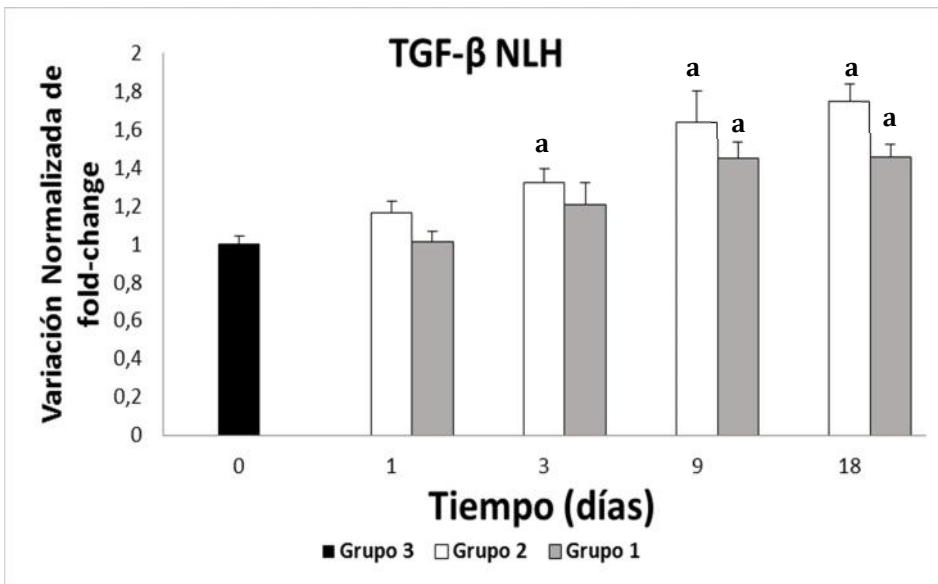
El NLH se utilizó para validar la fiabilidad de los genes de referencias (se muestran en el apartado 1 de resultados y discusión) para ello se normalizaron los genes TGF- β , IL-10 con los genes constitutivos por cuantificación relativa.

La expresión de IL-10 (**Gráfica 19**) incrementó de forma significativa a los 3 dpi ($P<0,05$) y los 9 dpi ($P<0,001$) en el grupo 1 en comparación con el grupo 3. A los 18 dpi la expresión de IL-10 disminuyó de forma general en comparación con la expresión a los 9 dpi aunque el grupo 1, a los 18 dpi, seguía mostrando diferencias significativas con respecto al grupo 3 ($P<0,001$).



Gráfica 19. Niveles de expresión relativa de IL-10 en NLH donde **a** indica diferencias significativas con el grupo 3 control negativo (-0 dpi).

La expresión de TGF- β (**Gráfica 20**) mantuvo un incremento gradual a lo largo de la experiencia. A los 3 dpi el grupo 2 se encontraba 0,3 rangos significativamente por encima que el grupo 3. A los 9 y 18 dpi se observó un incremento significativo de dicha citoquina tanto en el grupo 1 como en el grupo 2 en comparación con el grupo 3, siendo la mayor expresión a los 18 dpi ($P < 0,001$).



Gráfica 20. Niveles de expresión relativa de TGF- β en NLH donde **a** indica diferencias significativas con el grupo 3 (control negativo-0 dpi).

En nuestro estudio, IL-10 comenzó a aumentar de forma significativa con respecto al grupo 3 a partir de 3dpi tanto en hígado como en NLH. Guasconi y cols (2015) describieron un aumento de IL-10 en macrófagos peritoneales de ratones expuestos productos de excreción-secreción de *F. hepatica* con respecto a macrófagos peritoneales no expuestos a los 3 días post-incubación. Se ha descrito que los bovinos infectados de forma natural con *F.*

hepatica también mostraron un incremento de la expresión génica de IL-10 con respecto al grupo control no infectado en hígado (Mendes y cols., 2013), sugiriendo un papel inmunomodulador de la respuesta inmune del hospedador de esta citoquina y facilitando así la supervivencia del parásito durante los estadios crónicos de la infección. Los resultados de nuestro estudio revelaron que este papel de la citoquina IL-10 se hace relevante desde los estadios tempranos, cuando la larva del parásito está migrando a través del parénquima hepático.

Las citoquinas IL-10 y TGF- β son importantes en la regulación de la respuesta inmunitaria y son las responsables en provocar la estimulación del factor de transcripción FoxP3 (Belkaid y cols., 2006). La expresión de IL-10 y TGF- β van de la mano como se demostró en un estudio *in vivo* e *in vitro* llevado a cabo en ratones. En el estudio *in vivo* ratones infectados con *F. hepatica* presentaban de forma significativa mayor expresión de IL-10 y TGF- β en comparación con animales no infectados a los 2 dpi y en el estudio *in vitro* macrófagos peritoneales expuestos a los productos de excreción-secreción del parásito presentaban también de forma significativa mayor expresión de dichas citoquinas en comparación con los macrófagos no expuestos (Guasconi y cols., 2011). Al igual ocurrió en ovejas infectadas con *F. hepatica* y sacrificadas a los 18 dpi, aunque en este caso el incremento no fue significativo debido a la variabilidad entre animales (Ruiz-Campillo y cols., 2017). En NLH de ovejas en estadios crónicos de la infección con *F. hepatica*, donde ovejas con alta carga parasitaria presentaba una expresión de estas citoquinas

significativamente menor a la expresión de las mismas citoquinas en ovejas que presentaban menos carga parasitaria (Haçariz y cols., 2009). En nuestro trabajo la cantidad de esas citoquinas aumentan a lo largo de la experiencia, tanto en hígado como en NLH, coincidiendo con una carga parasitaria parecida a la obtenida en las ovejas con baja carga parasitaria del estudio de Haçariz y cols., (2009). Además la citoquina TGF- β es esencial para la producción de fibrosis (Cutroneo 2007).

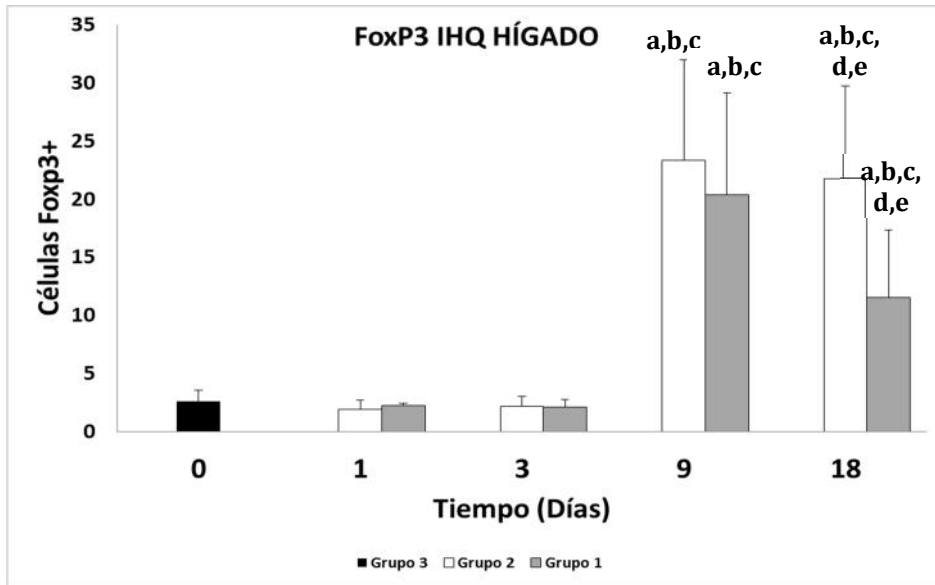
En nuestro estudio, hubo un aumento significativo de TGF- β a partir de 1 dpi en hígado y a partir de 3 dpi en NLH con respecto al grupo 3. En un estudio realizado por Alvarez-Rojas y cols. (2016) en PBMCs de ovejas vieron un incremento significativo de esta citoquina con respecto al grupo control negativo a los 14 dpi. Por otro lado, el incremento observado de la fibrosis periportal correlacionado con el incremento de la expresión del gen TGF- β en hígado tanto en los animales del grupo 2 como en los animales del grupo 1 con respecto al grupo 3. Este hecho tiene lugar desde 1 dpi en adelante, y adquiere su valor máximo de expresión a los 18 dpi. Este resultado está en consonancia con los de otros autores en los que se observa el aumento del gen COL1A1 (gen codificador del colágeno tipo I, importante en la cicatrización de heridas) inducido por TGF- β a través de la señalización de SMAD en PBMCs de ovejas infectadas por *F. hepatica* a los 7 dpi (Fu y cols., 2016) así como en estadios crónicos de la infección (Haçariz y cols., 2009; Fu y cols., 2017) donde se identificó un aumento de varias expresiones génicas (SMAD3, SMAD4, COL1A1) relacionadas con la citoquina reguladora TGF- β y asociadas con tipos celulares asociadas a

fenómenos reparativos como pueden ser fibroblastos, principal células productora de fibras colágenas y por tanto de fibrosis hepática (Fu y cols., 2017).

2.3.3. -Expresión de FoxP3 en inmunohistoquímica

2.3.3.1. -Expresión de FoxP3 en hígado

Con respecto a los resultados obtenidos en inmunohistoquímica (**grafica 21**) el número de células FoxP3 positivas a 1 y 3 dpi fue muy parecida a la expresada en el grupo 3, no sobrepasando una media de 5 células/área $945.564 \mu\text{m}^2$. Mientras que a los 9 y 18 dpi su produjo un incremento significativo ($P < 0,0001$) tanto del grupo 1 como del grupo 2 con respecto al grupo 3 (control negativo), aunque los contajes en el grupo 2 se mantenían por encima de los contajes del grupo 1 especialmente a los 18 dpi, sin encontrar diferencias significativas entre ambos. La mayoría de los linfocitos positivos al revelado de anti-FoxP3 mAb se localizaban principalmente en los espacios portas del hígado, habiendo menos cantidad en los centros de necrosis y zona periférica de los granulomas (**Figuras 20 y 21**).



Gráfica 21. Contaje de células FoxP3+/área de 945.564 μm^2 en zonas periportales donde **a** indica diferencias significativas con el grupo 3 (control negativo-0 dpi) **b** las diferencias significativas con el grupo 1 a 1 dpi **c** las diferencias significativas con el grupo 1 a 3 dpi **d** las diferencias significativas con el grupo 2 a 1 dpi y **e** las diferencias significativas con el grupo 2 a 3 dpi.

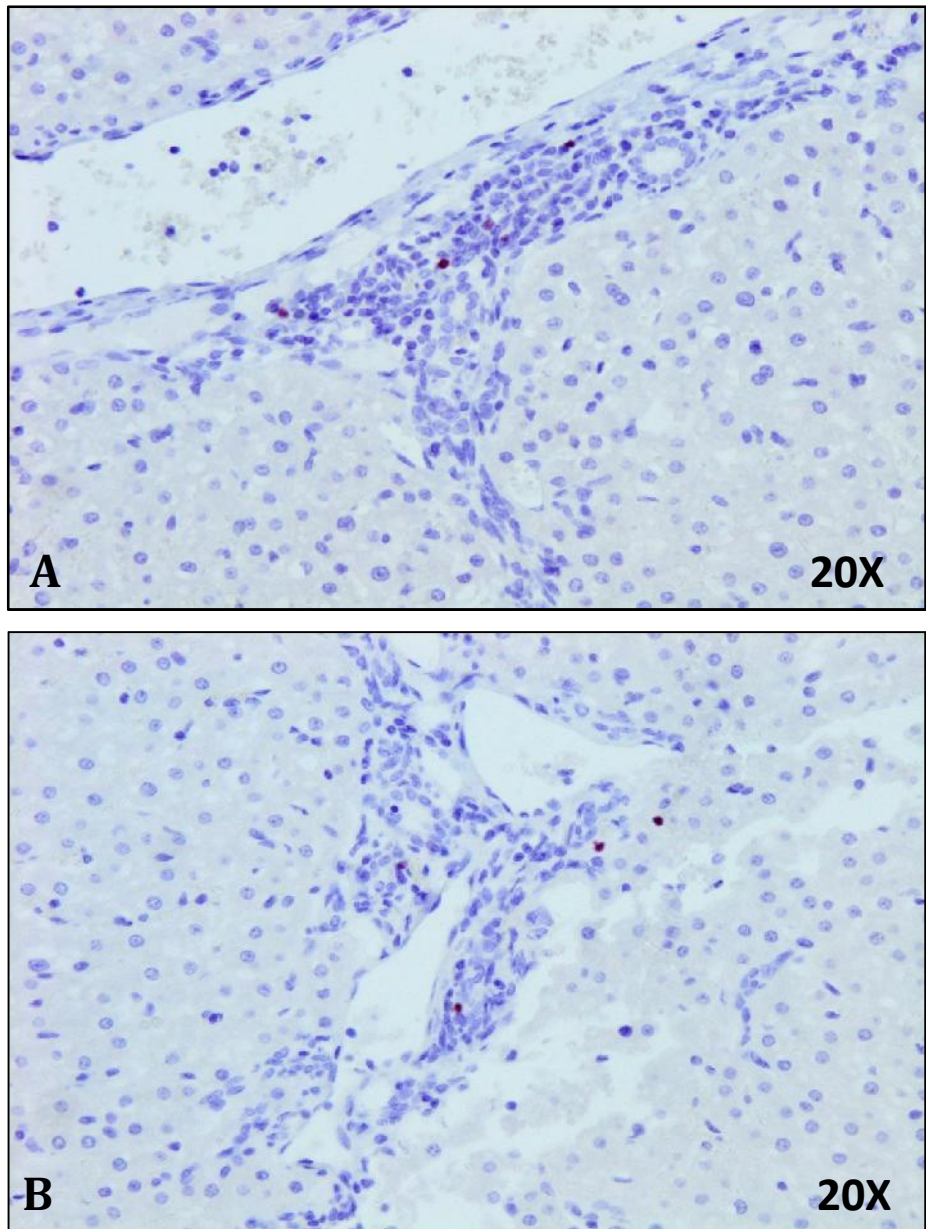


Figura 20. Imágenes microscópicas de hígado donde se observan células positivas a FoxP3 **(A)** en el grupo 1 a 1 dpi y **(B)** en el grupo 1 a 3 dpi -IHQ

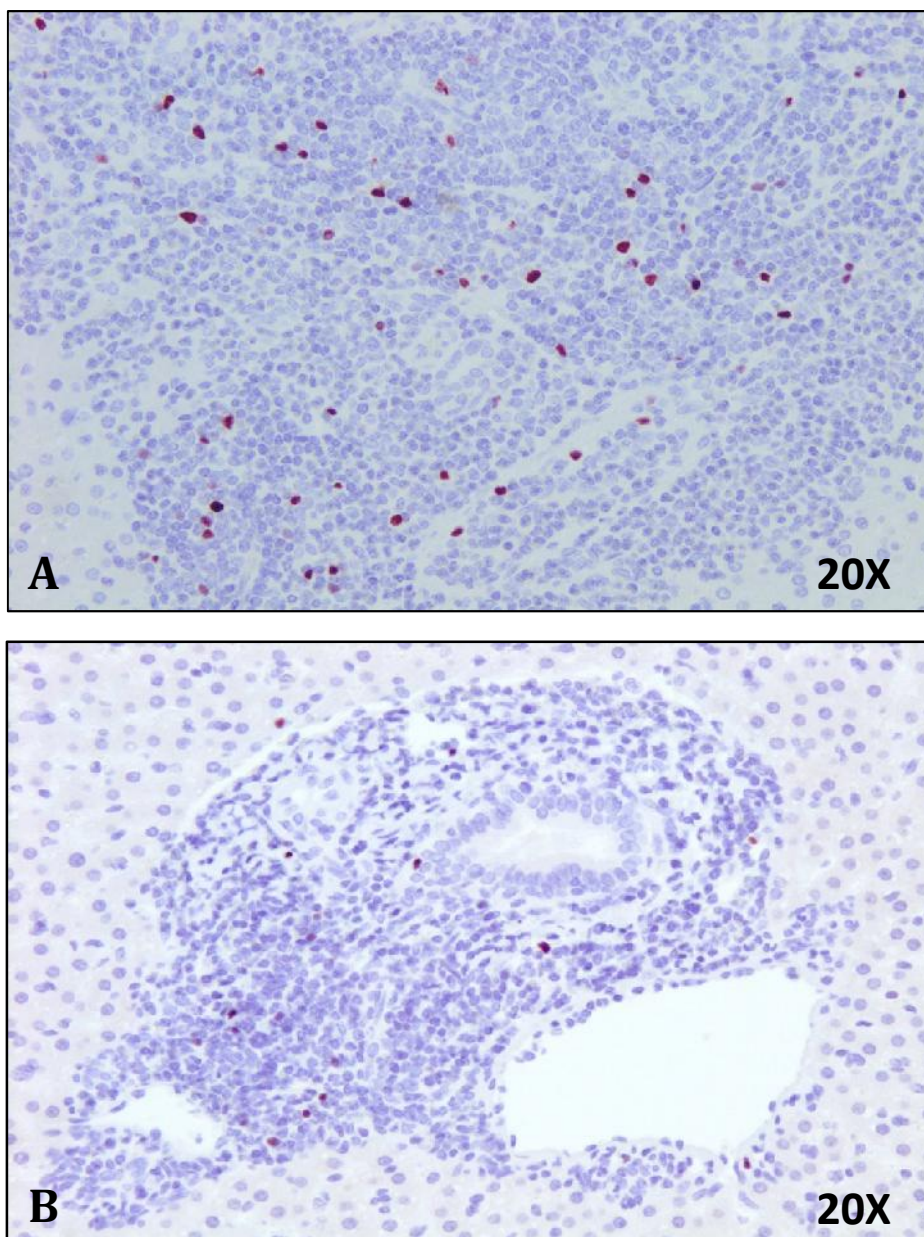
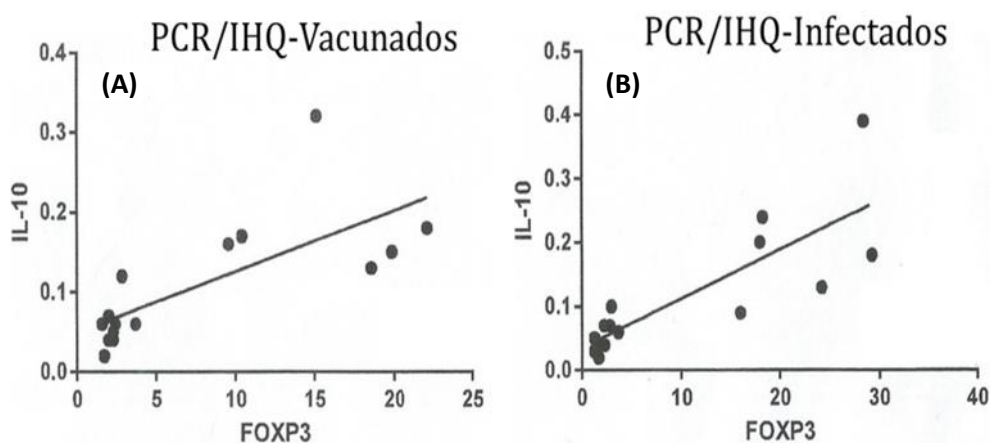


Figura 21 Imágenes microscópicas de hígado donde se observan células positivas a FoxP3 **(A)** en el grupo 1 a los 9 dpi y **(B)** en el grupo 1 a 18 dpi -IHQ

Los resultados de la correlación (**Gráfica 22**) entre el número de células FoxP3 positivas en los infiltrados hepáticos y entre la expresión génica de IL-10, reveló una correlación positiva significativa para los grupos 1 ($r=0,81$; $P=0,0004$) y 2 ($r=0,88$; $P<0,0001$).

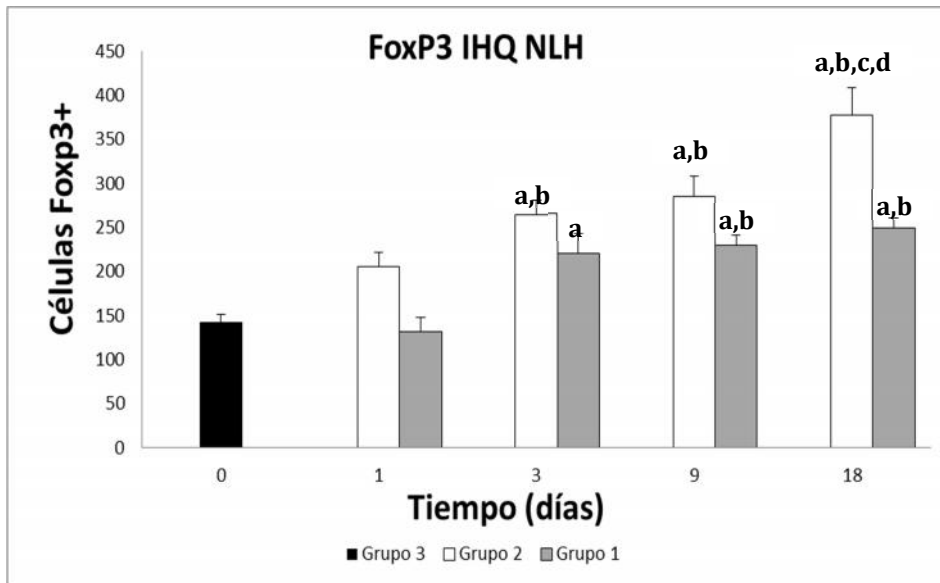


Gráfica 22. Correlación entre el número de células positivas a FoxP3 con la expresión génica de IL10 en animales del grupo 1 **(A)** y animales del grupo 2 **(B)**. Se observó una correlación significativa y positiva en ambos grupos.

2.3.3.2. *-Expresión de FoxP3 en NLH*

Con el fin de comparar la expresión de transcritos de FoxP3 con la expresión antigénica del mismo se llevó a cabo la técnica de inmunohistoquímica en NLH (**Figuras 22 y 23**). Las células positivas a FoxP3 (**Gráfica 23**) incrementaron de forma gradual a lo largo de la experiencia siendo el máximo conteaje a los 18 dpi. Los animales pertenecientes al grupo 2 tuvieron mayor número de células positivas que los pertenecientes al grupo 1 en cada uno de los estadios de la infección. En comparación con el grupo 3 (a), a partir de los 3 dpi los grupos 1 y 2 presentaban mayor expresión ($P<0,01$) y ($P<0,001$), respectivamente. En comparación con el

grupo 1 a 1 dpi (b), a los 3 dpi el grupo 2 ($P<0,001$) y a los 9 y 18 dpi el grupo 1 ($P<0,05$), y 2 ($P<0,001$), presentaban mayor expresión. Además el grupo 2 a los 18 dpi presentó significativamente mayor expresión que el grupo 2 a 1dpi (c) ($P<0,05$) y que el grupo 1 a 3 dpi (d) ($P<0,05$).



Gráfica 23. Contaje de células Foxp3+/área de $945.564 \mu\text{m}^2$ en espacios interfoliculares de NLH donde **a** indica diferencias significativas con el grupo 3 (control negativo-0 dpi) **b** las diferencias significativas con el grupo 1 a 1 dpi **c** las diferencias significativas con el grupo 1 a 3 dpi y **d** las diferencias significativas con el grupo 2 a 1 dpi.

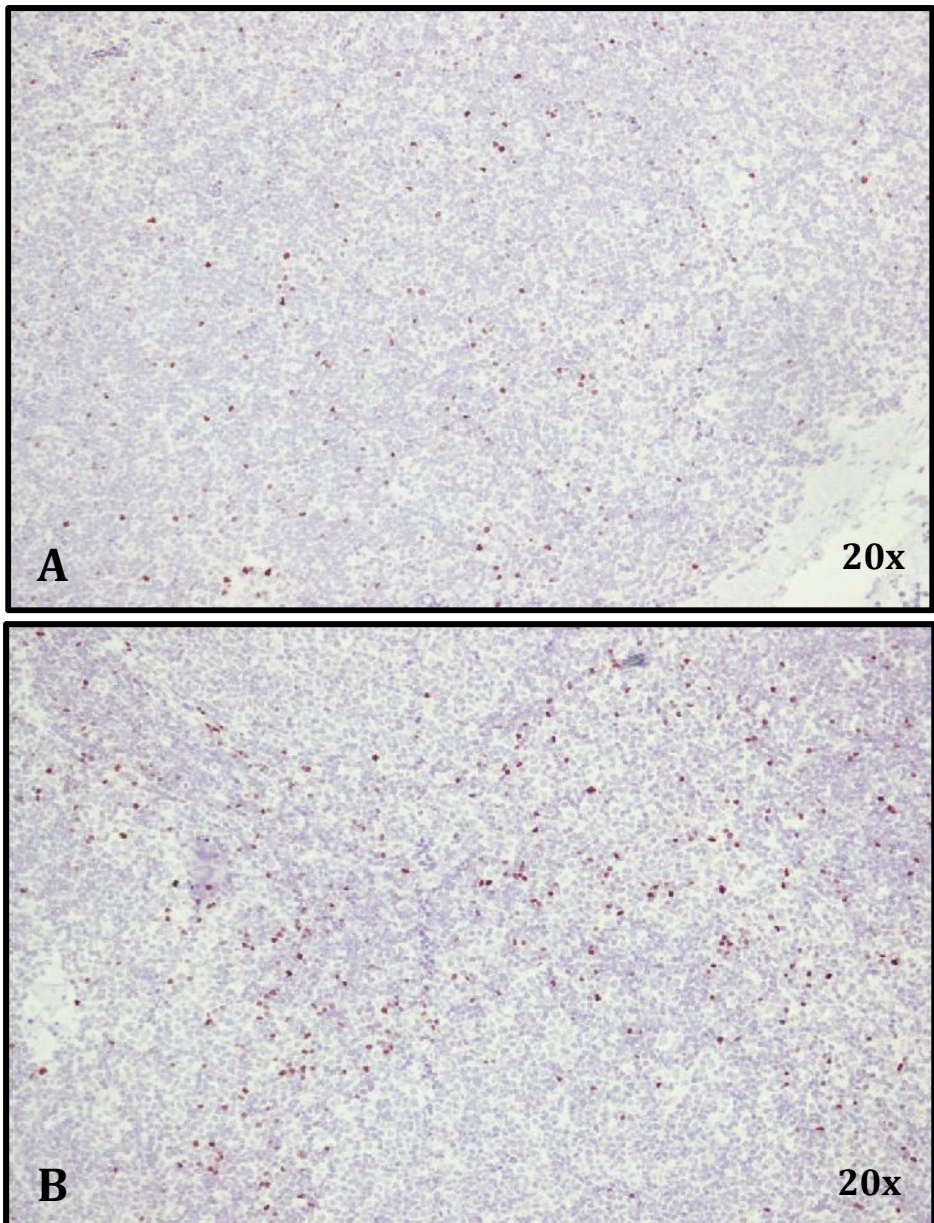


Figura 22. Imágenes microscópicas de hígado donde se observan células positivas a FoxP3 **(A)** en el grupo 1 y **(B)** grupo 2 a 1 dpi.

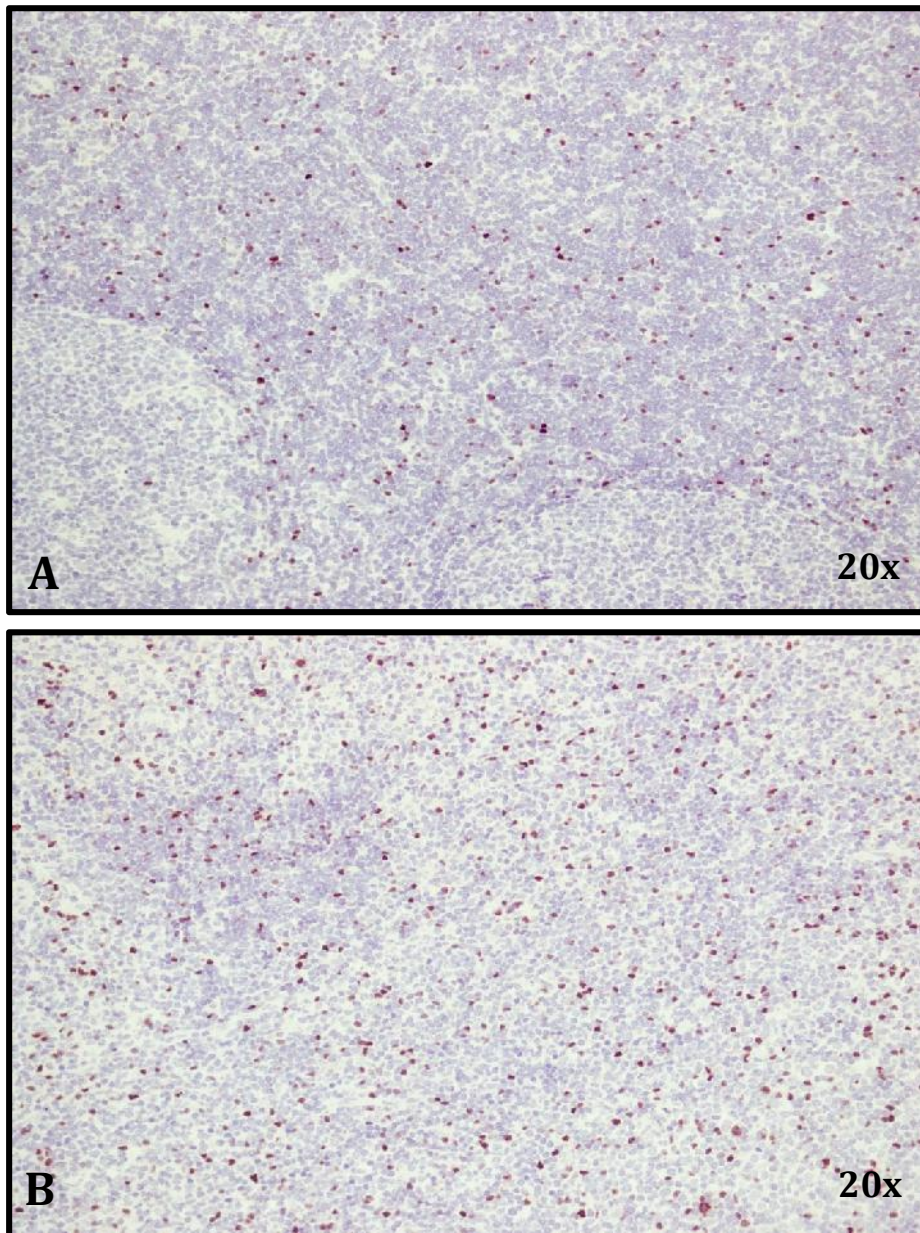


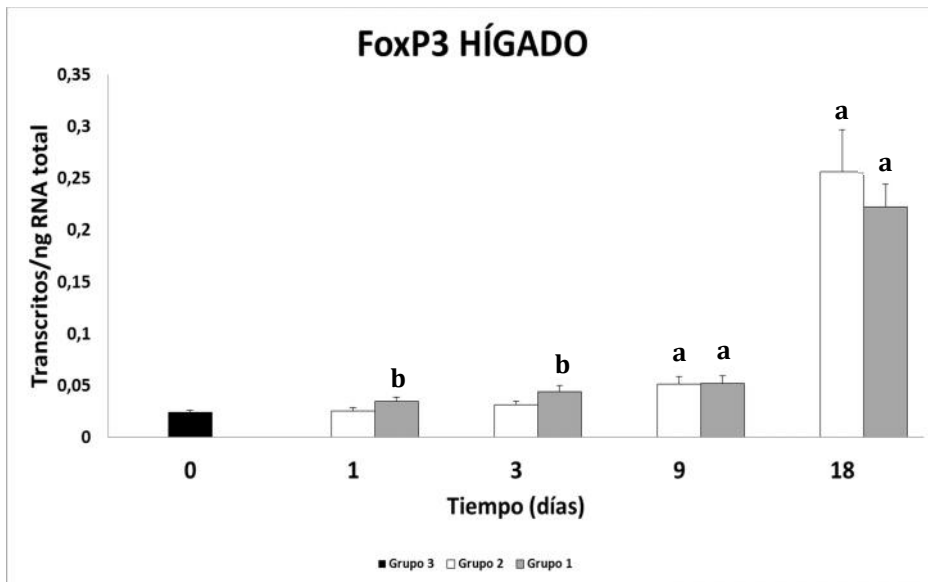
Figura 23. Imágenes microscópicas de hígado donde se observan células positivas a FoxP3 **(A)** en el grupo 1 y **(B)** en el grupo 2 a 18 dpi. Imagen representativa de los animales del grupo vacunados a 3, 9 y 18 dpi.

2.3.4. -Expresión de FoxP3 en qRT-PCR

El NLH se utilizó para validar la fiabilidad de los genes de referencias (se muestran en el apartado 1 de resultados y discusión) para ello se normalizaron el gen FoxP3 con los genes constitutivos por cuantificación relativa.

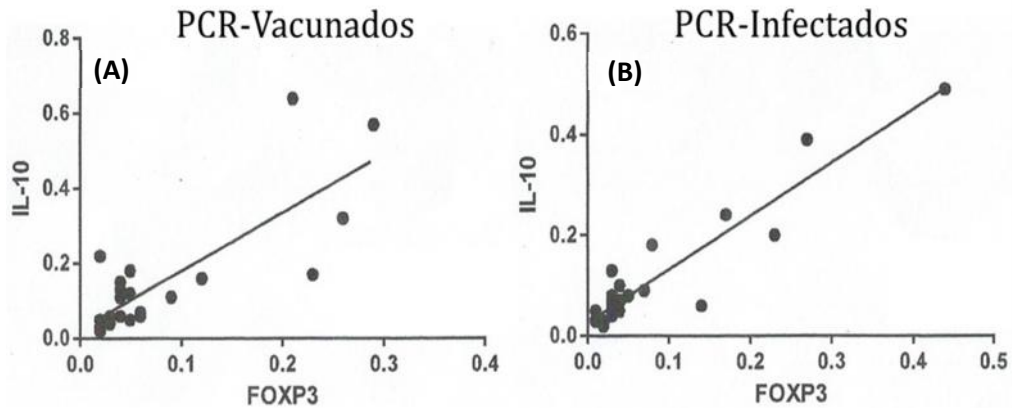
2.3.4.1. -Expresión de FoxP3 en hígado

A los 1 y 3 dpi la expresión génica (**Grafica 24**) de FoxP3 fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en el grupo 1 respecto al grupo 2, mientras que no hubo diferencias significativas entre los grupos 1 y 2 con el grupo 3. A los 9 dpi, tanto el grupo 1 como el grupo 2 mostraron un incremento significativo ($P < 0,01$) respecto al grupo 3. Sin embargo, a los 18 dpi tanto el grupo 1 como el grupo 2 tuvieron un incremento de la expresión bastante acusado habiendo diferencias significativas con respecto al grupo 3 ($P < 0,001$). A los 9 dpi la expresión de ambos grupos fue muy parecida y a los 18 dpi se expresaba algo más en los animales del grupo 2 pero sin diferencias significativas.



Gráfica 24. Niveles de expresión génica de FoxP3 en hígado donde **a** indica diferencias significativas con el grupo 3 (control negativo-0 dpi) y **b** indica diferencias significativas entre los grupos 1 (vacunado e infectado) y 2 (no vacunado e infectado).

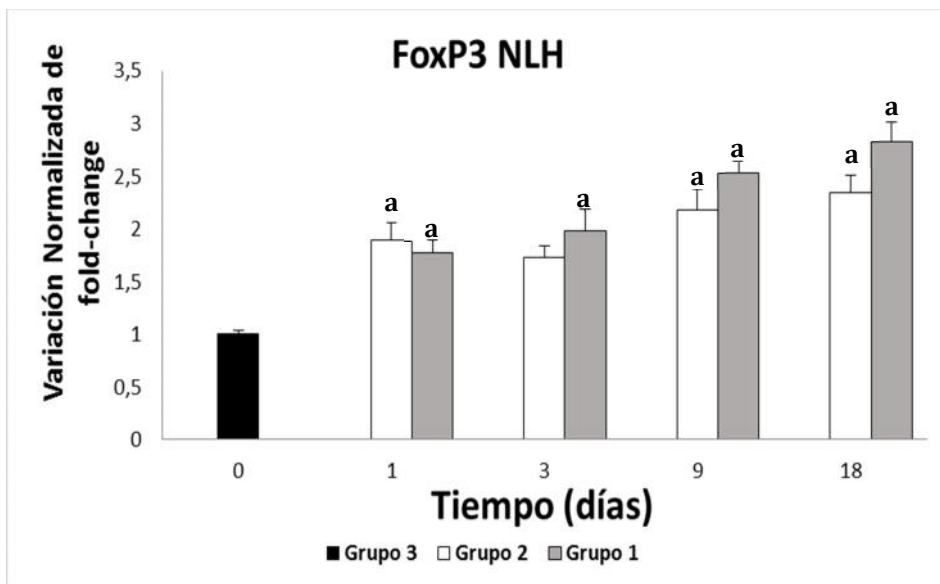
La correlación (**Grafica 25**) entre la expresión génica de IL-10 y la expresión génica de FoxP3 para el grupo 1 ($r=0,68$; $P=0,0002$) y grupo 2 ($P<0,0001$; $r=0,81$) fue también positiva y significativa, como ocurrió con la correlación entre el número de células FoxP3 positivas y la expresión génica de IL-10.



Gráfica 25. Correlación entre la expresión génica de FoxP3 con la expresión génica de IL10 en animales del grupo 1 **(A)** y animales del grupo 2 **(B)**. Se observó una correlación significativa y positiva en ambos grupos.

2.3.4.2. *-Expresión de FoxP3 en NLH*

La expresión de FoxP3 (**Gráfica 26**) a 1 dpi es significativamente el doble en el grupo 1 ($P < 0,05$) y 2 ($P < 0,01$) en comparación con el grupo 3; y a 3 dpi solo se mostraron resultados significativos para el grupo 1 ($P < 0,01$). A los 9 y 18 dpi la expresión del grupo 1 y 2 fue sobre 1,5 y 2 rangos significativamente mayor que el grupo 3, respectivamente ($P < 0,001$), siendo el grupo 1 el que presentaba la expresión más alta a los 18 dpi. A lo largo de la experiencia, la expresión de FoxP3 in el grupo 1 fue mayor que la expresada en el grupo 2 en todos los estadios excepto a 1 dpi.



Gráfica 26. Niveles de expresión relativa de FoxP3 en NLH donde **a** indica diferencias significativas con el grupo 3 (control negativo-0 dpi).

El incremento en el número de células Foxp3+, tanto en el hígado como en los NLH (en IHQ y qRT-PCR) a los 9 y 18 dpi, está en consonancia con la expansión de Foxp3 en hígado y NLH en cabras y ovejas infectadas con *F. hepatica* a los 7-9 dpi (Escamilla y

cols., 2016). Este incremento de FoxP3 no sólo se ha observado en estudios hechos con *F. hepatica* sino también con otros helmintos. Un estudio llevado a cabo en ratones inmunizados con antígenos de huevos de *Schistosoma mansoni* y posteriormente inducidos a colitis comparados con ratones que sólo presentaban colitis, mostró que los ratones vacunados aumentaron la producción de FoxP3 e IL-10, habiendo correlación positiva entre ambos y las cuales a su vez disminuyeron los efectos de la colitis (Hasby y cols., 2015).

En ovejas infectadas con *T. circumcincta*, el aumento de células positivas a FoxP3 también se asoció a un incremento de la expresión génica de IL-10 (McNeilly y cols., 2013). Los resultados de este estudio revelaron una dinámica parecida de la expresión del gen IL-10 y la expresión tanto antigénica como génica de FoxP3, así como se encontró una fuerte correlación entre IL-10 y FoxP3 tanto en los animales del grupo infectado como en los el grupo vacunado, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en ovejas infectadas con *T. circumcincta* y en ratones inmunizados con antígenos de huevos de *Schistosoma mansoni* (McNeilly y cols., 2013; Hasby y cols., 2015).

En nuestro estudio, también se observó un incremento de TGF- β en fases tempranas de la infección. Un estudio llevado a cabo en ratones infectados con el helminto intestinal *Heligmosomoides polygyrus* mostró que un verdadero mimético de TGF- β estaba presente en los productos de excreción-secreción (ES) del parásito el cual producía una expansión de la expresión de FoxP3, demostrando que la inducción de FoxP3 por los HES dependía de la

señalización a través de la vía TGF- β (Grainger y cols., 2010). Todo esto, apoya el papel de las células T reguladoras en la generación de un ambiente supresor favorable para la persistencia del parásito.

La dinámica de la expresión de FoxP3 tanto por inmunohistoquímica como por PCR fue parecida tanto en animales del grupo 1 como en animales del grupo 2. Estos resultados eran los esperados puesto que la vacuna no proporcionó protección.

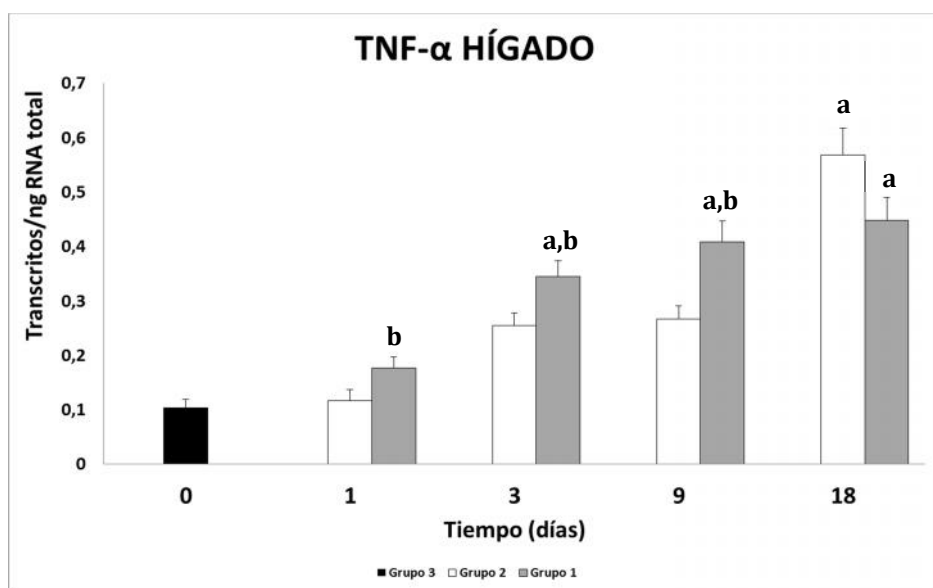
La expansión de Foxp3 desde fases iniciales de la infección (9 dpi) podría por un lado facilitar la supervivencia del parásito durante la fase de migración hepática, y por otro lado, podría modular las lesiones hepáticas consecuencia de la reacción inflamatoria al limitar y modular dicha inflamación como ha sido sugerido en ovejas infectadas con *T. circumcincta* a nivel de abomaso (McNeilly y cols., 2013).

2.3.5.-Citoquinas proinflamatorias en infecciones tempranas por *F. hepatica*

2.3.5.1. -Expresión de IL-1 β y TNF- α en hígado

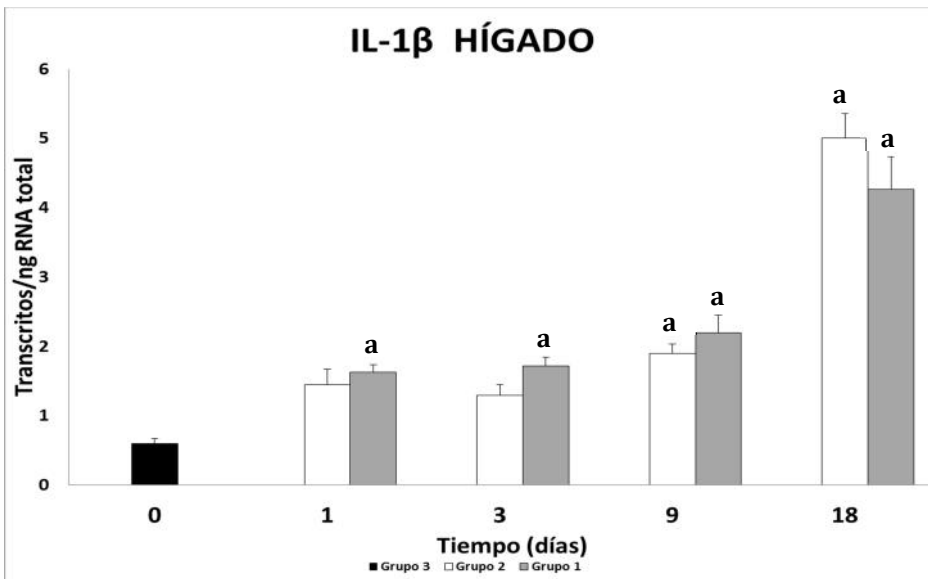
Una de las citoquinas más participativas en las reacciones inflamatorias de la respuesta inmune innata en mamíferos son IL-1 β y TNF- α , las cuales suelen estar presentes en los estadios agudos de los procesos inflamatorios (Titus y cols., 1991; Eberhard y cols., 1995). La IL-1 β es la responsable de promover la actividad fagocítica favoreciendo la respuesta inmunitaria frente a la infección (Dinarelli y cols., 1997). Por otro lado el TNF- α es un mediador importante de los mecanismos proinflamatorios (Goetz y cols., 2004).

En nuestro estudio, la expresión de TNF- α (**Gráfica 27**) tuvo un incremento gradual a lo largo de la experiencia tanto para los animales del grupo 1 como para los animales del grupo 2, habiendo más expresión en el grupo 1 que en el grupo 2 a 1, 3 y 9 dpi ($P < 0,05$), mientras que a los 18 dpi no hubo diferencias significativas entre ambos grupos. En comparación con el grupo 3 se encontraron diferencias significativas a partir de 3 dpi para el grupo 1 y solo a los 18 dpi para el grupo 2 ($P < 0,001$).



Gráfica 27. Niveles de expresión génica de TNF α en hígado donde **a** indica diferencias significativas ($P < 0,05$) con el grupo 3 (control negativo-0 dpi) y **b** indica diferencias significativas entre los grupos 1 (vacunado e infectado) y 2 (no vacunado e infectado).

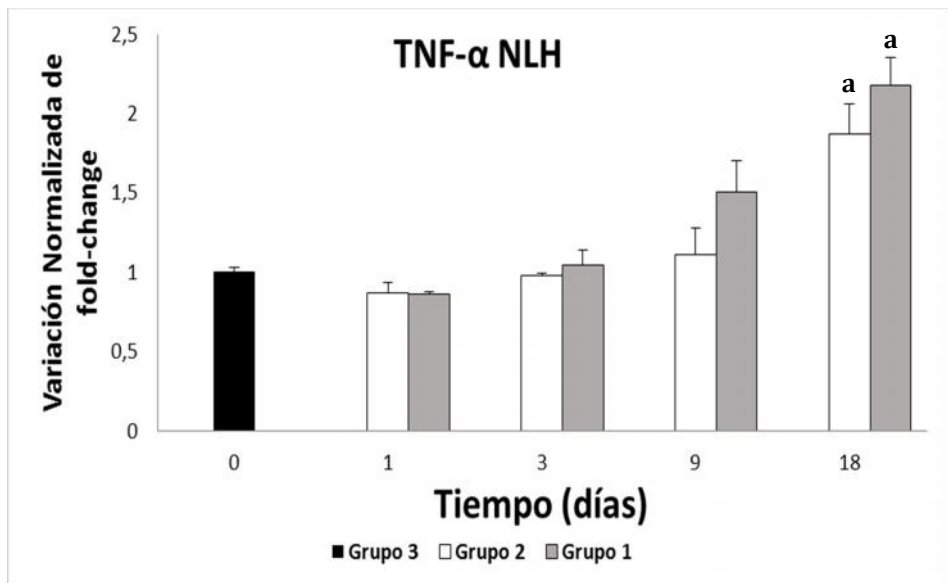
La expresión de IL-1 β (**Gráfica 28**) también tuvo un incremento gradual a lo largo de toda la experiencia siendo a los 18 dpi la máxima expresión. Este incremento en comparación con el grupo 3 fue significativa a partir de 1 dpi para el grupo 1 y a partir de los 9 dpi para el grupo 2 ($P < 0,001$). La expresión en el grupo 1 fue algo superior que en el grupo 2 a 1, 3 y 9 dpi excepto a los 18 dpi donde no hubo diferencias significativas entre ambos grupos.



Gráfica 28. Niveles de expresión génica de IL1 β en hígado donde **a** indica diferencias significativas ($P < 0,05$) con el grupo 3 (control negativo-0 dpi)

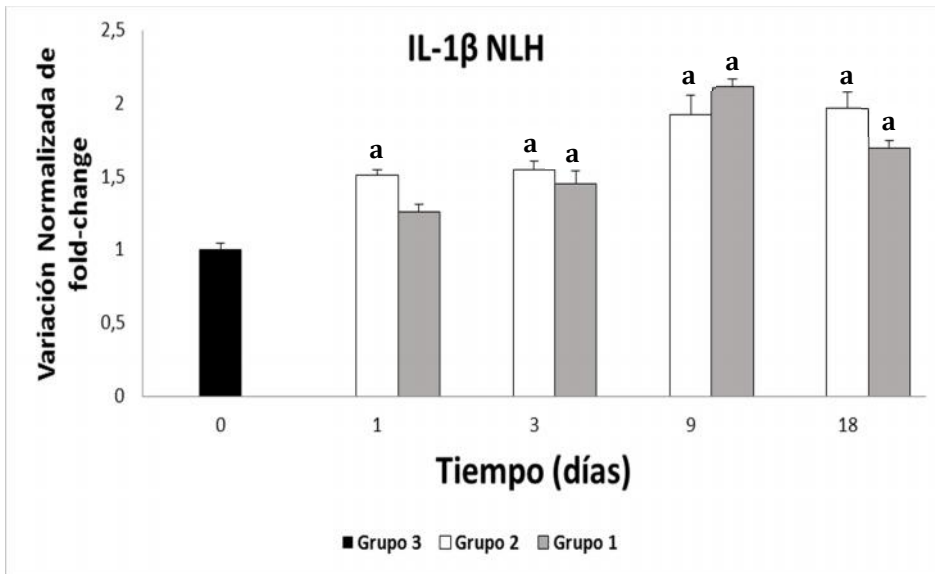
2.3.5.2. – *Expresión de IL-1 β y TNF- α en NLH*

Los NLH se utilizaron para validar la fiabilidad de los genes de referencias (se muestran en el apartado 1 de resultados y discusión) para ello se normalizaron los genes TNF- α e IL-1 β con los genes constitutivos por cuantificación relativa (**Gráfica 29**). La expresión de TNF- α en NLH fue menor a 1 dpi en comparación con el grupo 3. A los 3 dpi la expresión fue similar que el grupo 3 y a partir de los 9 dpi hubo un incremento siendo significativo a los 18 dpi tanto para el grupo 1 ($P < 0,001$) como el 2 ($P < 0,05$)



Gráfica 29. Niveles de expresión relativa de TNF α en NLH donde **a** indica diferencias significativas con el grupo 3 (control negativo-0 dpi).

La expresión de IL-1 β (**Gráfica 30**) incrementó de forma gradual y significativo hasta los 9 dpi en comparación con el grupo 3 ($P < 0,001$), para luego decrecer a los 18 dpi, aunque los grupos 1 y 2 a este estadio también presentaban mayor expresión de la citoquina en comparación con el grupo 3 ($P < 0,001$).



Gráfica 30. Niveles de expresión relativa de IL1 β en NLH donde **a** indica diferencias significativas con el grupo 3 (control negativo-0 dpi).

Un estudio *in vivo*, mostró que ratones inyectados intraperitonealmente con proteínas de unión a ácidos grasos (Fh12) de *F. hepatica* y sacrificados a las 12 horas postinfección, no expresaron citoquinas proinflamatorias, mientras que aquellos inyectados con Fh12 y después con lipopolisacáridos bacterianos (LPS) se observó una disminución significativa de la citoquina TNF- α en comparación con los animales que solo habían sido tratados con LPS. Así mismo, en el mismo experimento, hicieron un estudio *in vitro* con macrófagos derivados de médula ósea de ratón donde

encontraron una supresión de la expresión de IL-1 β y TNF- α en células tratadas con LPS y previamente con Fh12 en comparación con aquellas células que provenían de animales solo tratados con LPS (Martin y cols., 2015), a pesar de que los macrófagos son excelentes productores de citoquinas proinflamatorias cuando son estimulados *in vitro*. Chung y cols., (2012), realizó un estudio en tres modelos diferentes de ratones (BALB/c, C57BL/6, and C3H/He) infectados con *F. hepatica* y valoró la expresión de IL-1 β y TNF- α a 7,14 y 21 dpi. En los dos primeros modelos, ambas citoquinas aumentaron de forma progresiva a lo largo de la infección, siendo la expresión de ambas menor a los controles negativos. En nuestro estudio, se observó una expresión baja de los transcritos de ambas citoquinas, tanto en hígado como en NLH a 1 dpi en comparación con los niveles mayores de estas citoquinas a 3, 9 y 18 dpi, aunque a excepción de TNF- α en NLH, en todos los casos la expresión a 1 dpi fue mayor comparada con el grupo 3. Estas diferencias también podrían ser debidas a las diferentes muestras empleadas, ya que en nuestro estudio hemos usado muestras de hígado y NLH donde asienta un importante proceso inflamatorio cuando comienza la migración de *F. hepatica* en parénquima hepático, lo que justifica el notable incremento de estas dos citoquinas proinflamatorias a nivel hepático y de NLH.

Otro estudio llevado a cabo en ratones sí mostró resultados similares a los de nuestro trabajo, así en ratones los cuales fueron vacunados con FAPB (rFh15) de *F. hepatica*, infectados con *Schistosoma bovis* y sacrificados a las 8 spi. Se observó un aumento de ambas proinflamatorias en animales vacunados y adyuvantes en

comparación con el grupo control (Vicente y cols., 2014). Es importante remarcar que a 1, 3 y 9 dpi la expresión génica de TNF- α fue mayor en los animales del grupo vacunado en comparación con los animales del grupo infectado tanto en hígado como en NLH, a pesar de que la vacuna no fue protectora. Estas ovejas vacunadas, a su vez no mostraron una reducción de la carga parasitaria de forma general, pero si hubo una disminución de las lesiones hepáticas a los 9 dpi en animales vacunados con respecto a los animales infectados.

Estos resultados también coinciden con los altos niveles de expresión de TNF- α en hígado de ratas inmunizadas con cadena ligera de miosina reguladora (MRLC) de *F. hepatica*, las cuales resultaron estar parcialmente protegidas en comparación con las ratas que no estaban inmunizadas en estadios crónicos de la infección. En este estudio las ratas inmunizadas si presentaban menor número de lesiones hepáticas aunque no fueron significativas (Henker y cols., 2017). En NLH, la máxima expresión de IL-1 β se observó a los 9 dpi mientras que en el hígado se observó a los 18 dpi, sugiriendo ciertas diferencias de expresión de esta citoquina a nivel sistémico, quizás debido a la gran cantidad de células inflamatorias presentes en hígado a los 18 dpi que actúan debido a los productos de excreción-secreción del parásito.

En rumiantes han sido escasos los estudios en los que se ha evaluado la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β), así en un estudio llevado a cabo en búfalos inmunizados con rFAPB e infectados con *F. gigantica* se observó un descenso de expresión génica de TNF- α en PBMCs en fases crónicas de la

infección (Kumar y cols., 2013), lo que contrasta con el incremento obtenido en nuestro estudio. Estas diferencias podrían deberse tanto al diferente estadio de la infección, como a las diferentes muestras empleadas en ambos estudios.

CONCLUSIONES

1. La vacunación con catepsina L1 recombinante de *Fasciola hepatica* con adyuvante montanide isa 70VG no indujo reducción del número de parásitos, pero sí cierto retraso en la llegada de las larvas como demostró el menor número de lesiones hepáticas a los 9 dpi en el grupo vacunado respecto al control infectado. Sin embargo, las lesiones hepáticas fueron similares en ambos grupos a los 18 dpi.
2. Las lesiones microscópicas hepáticas en fases tempranas de la infección consistieron en focos de necrosis, granulomas, infiltrado de eosinófilos e infiltrado linfoplasmocitario, siendo similares en el grupo vacunado y control infectado, salvo el número de granulomas e infiltrado linfoplasmocitario que fueron menores a los 9 dpi en el grupo vacunado respecto al control infectado.
3. El estudio morfométrico indicó un aumento progresivo de la fibrosis hepática a lo largo del proceso en ambos grupos infectados, siendo este aumento especialmente acusado a los 9 dpi y 18 dpi. Entre los grupos infectados el grupo 1 mostró un descenso significativo de las áreas de fibrosis comparado con el grupo 2.
4. El estudio de estabilidad de la expresión génica reveló que los genes PGK1, HSP90AA1 y GYPC fueron los más estables para usarse en la normalización. El estudio de variación por

pares (pairwise variation) indicó que tanto en NLH como en hígado dos genes eran suficientes para la normalización.

5. La expresión génica de IFN- γ en hígado mostró un aumento a los 9 y 18 dpi en los grupos vacunado y control infectado, lo que puede ser debido a la formación de granulomas que requiere de esta citoquina para la activación de macrófagos, sin embargo, en NLH hubo un descenso significativo de IFN- γ a los 9 y 18 dpi tanto en el grupo vacunado como control infectado, lo que unido al marcado incremento de la IL-4 tanto en hígado como en NLH en ambos grupos, sugiere una polarización Th2 de la respuesta inmunitaria desde fases tempranas de la infección (9 dpi).
6. La expresión génica de IL-10 y TGF- β aumentó tanto en hígado como en NLH en los grupos 1 y 2 a los 9 y 18 dpi, mostrando un patrón similar a la expresión antigénica y génica de Foxp3 en hígado y NLH, lo que sugiere que *F. hepatica* induce una expansión de células reguladoras Foxp3+ que facilitarían la supervivencia del parásito desde fases muy tempranas de la infección (9 dpi).
7. La expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) mostraron un incremento gradual a lo largo de la infección en hígado y NLH tanto en el grupo vacunado como en el control infectado, siendo dicho incremento más notable a los 18 dpi, lo que se corresponde con las mayores lesiones inflamatorias observadas al progresar la infección.

8. No se observaron diferencias relevantes para la expresión de citoquinas entre los grupos vacunado y control infectado como era de esperar al no haber protección. La excepción fue una menor expresión IHQ de Foxp3 y menor expresión génica de TNF- α en el grupo vacunado, lo que podría estar justificado por las menores lesiones hepáticas en el grupo vacunado a los 9 dpi.

CONCLUSIONS

1. Vaccination with recombinant cathepsin L1 from *Fasciola hepatica* with the adjuvant montanide isa 70VG did not induce reduction of the number of parasites, but a delay in the arrival of the larvae to the liver has been demonstrated due to the lower number of liver lesions at 9 dpi in the vaccinated group compared to the infected control. However, liver lesions were similar in both groups at 18 dpi.
2. Microscopic hepatic lesions in early stages of infection consisted in necrosis, granulomas, lymphoplasmacytic infiltrate and eosinophils, being similar in both groups (vaccinated and infected control), except lymphoplasmacytic infiltrate and the number of granulomas that were less severe in the vaccinated group in comparison with the infected control at 9 dpi.
3. The morphometric study indicated a progressive increase of hepatic fibrosis throughout the experience in both infected groups. The increase was especially marked at 9 and 18 dpi and more severe in the infected control than in the vaccinated group.
4. The study of gene expression stability revealed that the PGK1, HSP90AA1 and GYPC genes were the most stable for use in normalization. The study of pairwise variation indicated that in both HLN and liver two genes were enough for normalization.

5. Gene expression of IFN- γ in the liver showed an increase at 9 and 18 dpi in both infected groups, which could be due to the presence of granulomas that requires this cytokine for the activation of macrophages. However, in the HLN there was a significant decrease of IFN- γ at 9 and 18 dpi in both infected groups, suggesting a Th2 polarization of the immune response from early stages of infection (9dpi).
6. Gene expression of IL-10 and TGF- β increased either in the liver and HLN in both infected groups at 9 and 18 dpi, showing a similar pattern to antigenic and gene expression of FoxP3 in the liver and HLN. This result suggest that *F. hepatica* induces an expansion of FoxP3+ regulatory T cells that would facilitate the survival of the parasite from very early stages of the disease (9 dpi).
7. Gene expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β) showed a gradual increase throughout the infection in the liver and HLN in both infected groups. This increase was remarkable at 18 dpi coinciding with more severe inflammatory infiltrates in the liver lesions.
8. No relevant differences for cytokine gene expression was found between the infected group and the vaccinated group, which was expected due to the absence of protection. The exception was a lower expression of FoxP3+ cells and TNF- α

in vaccinated group, which could be justified by the lower hepatic lesions in the vaccinated group at 9 dpi.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio, ha sido, por un lado evaluar la respuesta inmunitaria en hígado y nódulos linfáticos hepáticos (NLH) de ovejas no vacunada y vacunadas Catepsina L1 recombinante (rCL1) e infectadas con *Fasciola hepatica* durante fases tempranas de la infección. Por otro lado se evaluó la eficacia protectora de dicha vacuna según el número de parásitos adultos en fases crónicas de la infección.

Para el estudio se realizaron dos experiencias, en la primera se utilizaron 44 ovejas hembras de Raza Merina de 7 meses de edad, libres de *F. hepatica*, que se distribuyeron en tres grupos. El **grupo 1 (n=20)** fueron inmunizadas con CL1 recombinante de *F. hepatica* (rCL1) en adyuvante Montanide ISA 70 VG. El **grupo 2 (n=20)** se usó como controles no vacunados e infectados, y el tercer grupo y el **grupo 3 (n=4)** como controles negativos no infectados ni vacunados. Los grupos 1 y 2 se infectaron oralmente con 200 metacercarias de *F. hepatica*. Ambos grupos a su vez se dividieron cada uno en 4 subgrupos (**n=5**) que fueron sacrificados a los 1, 3, 9 y 18 días post-infección (dpi).

En la segunda experiencia se usaron 34 ovejas, hembras, de raza Merina de la misma edad, que fueron divididas en 3 grupos. El **grupo 4 (n=13)** estaba compuesto por animales inmunizados de igual forma que el grupo 1. El **grupo 5 (n=12)** correspondió a animales inmunizados sólo con el adyuvante y finalmente el **grupo 6 (n=9)** que fue usado como control de infección. Estos 3 grupos fueron infectados oralmente con 150 mc de *F. hepatica* y sacrificados a las 19 semanas post infección (spi) para valorar la carga parasitaria.

Todos los grupos fueron sacrificados a las 19 semanas post-infección. Los dos experimentos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba.

El estudio parasitológico no reveló diferencias significativas en la reducción de la carga parasitaria entre los grupos 4 (vacuna CL) y los grupos 5 y 6. de la experiencia 2. El estudio patológico demostró que a los 9 dpi el grupo 1 mostraba lesiones hepáticas menos severas que el grupo 2, aunque a los 18 dpi las lesiones hepáticas eran similares en ambos grupos. Los dos grupos infectados (1 y 2) mostraron trayectos necróticos y granulomas hepáticos a los 9 y 18 dpi. La fibrosis periportal mostró un incremento progresivo en el grupo 1 y 2 a los 9 y 18 dpi, cuando fue más severa en el grupo 2 en comparación con el grupo 1.

El número de células FoxP3+ en hígado aumentó significativamente en el grupo 1 y 2 a los 9 y 18 dpi en comparación con el grupo 3, sin observarse diferencias significativas entre los dos grupos infectados. En los NLH, el número de linfocitos FoxP3+ aumentó significativamente en los grupos 1 y 2 respecto al grupo 3 desde los 9 dpi, sin diferencias significativas entre los grupos 1 y 2, siendo menos numerosas en el grupo 1 a los 18 dpi.

En este trabajo, se investigó la estabilidad de 10 genes de referencia candidatos en NLH e hígado. El análisis de estabilidad de la expresión génica mediante el enfoque estadístico de RefFinder reveló que PGK1, HSP90AA1 y GYPC fueron los genes más estables que podrían usarse en la normalización. El número óptimo de genes de referencia para la normalización también se calculó por geNorm usando la variación por pares (*pairwise variation*

V_n/V_{n+1}) y el resultado indicó que, en ambos tejidos, el uso de dos genes más estables era suficiente para la normalización.

La expresión de IL-4 aumentó a los 9 y 18 dpi y tanto en hígado como NLH de los grupos 1 y 2, en comparación con el grupo 3. La expresión de IFN- γ mostró diferentes dinámicas en hígado y NLH. En hígado aumentó a los 9 dpi en los animales del grupo 1 y a los 18 dpi aumentó en los animales del grupo 1 y 2 con respecto al grupo 3. Este incremento podría ser debido a una respuesta frente al daño hepático con formación de granulomas. En los NLH la expresión de IFN- γ disminuyó de forma gradual y significativa desde 1 dpi en adelante en los grupos 1 y 2 respecto al grupo 3, lo que sugiere que el parásito deprime la respuesta Th1 y estimula la respuesta Th2 para facilitar así su supervivencia.

La expresión de TNF- α , IL-1 β , FoxP3, IL-10 y TGF- β mostró un incremento en hígado y NLH de los grupos 1 y 2 a lo largo de la experiencia, particularmente a los 18 dpi. También hubo una correlación positiva significativa entre la expresión de FoxP3 e IL-10 (por IHQ y qRT-PCR) al igual que entre la fibrosis periportal y la expresión del gen TGF- β .

No hubo diferencias relevantes para la expresión de citoquinas ni de Foxp3 en hígado y NLH de los grupos 1 (vacunado con CL1) y 2 (control infectado), lo que era de esperar ya que la vacuna no indujo reducción del número de parásitos, aunque sí produjo un retraso en la llegada de las larvas al hígado reflejado por las menores lesiones a los 9 dpi en el grupo vacunado respecto al control infectado.

SUMMARY

The aim of the present study was to evaluate the immune response during early stages of infection in the liver and hepatic lymph nodes (HLN) in unvaccinated and vaccinated with recombinant Cathepsin L1 (rCL1) sheep and challenged with *Fasciola hepatica*, and to evaluate the protective efficacy of the vaccine according to fluke burdens.

Two experiments were carried out, in the first one forty-four 7-month old female Merino-breed sheep obtained from a liver fluke-free farm were used to study early stages of infection. Sheep were distributed into three groups. **Group 1 (n=20)** was immunized subcutaneously with two doses four weeks apart with 100µg of recombinant CL1 from *F. hepatica* in 2 ml of Montanide ISA 70 VG. **Group 2 (n=20)** was used as infected control and **group 3 (n=4)** was used as the uninfected negative control. Groups 1 and 2 were orally infected with 200 metacercariae of *F. hepatica* and divided into four subgroups each (**n=5**) which were sacrificed in pairs at one day post infection (dpi), 3 dpi, 9 dpi and 18 dpi.

To study vaccine efficacy another 34 sheep of the same age were divided into three groups. **Group 4 (n=13)** were immunized as group 1; **group 5 (n=12)** was immunized only with the adjuvant and **group 6 (n=9)** was used as infected control. These 3 groups were orally infected with 150 metacercariae and were sacrificed 19 weeks post-infection for fluke burdens. The experiment was approved by the Bioethics Committee of the University of Cordoba.

The parasitological study did not show significant differences of fluke burdens between group 4 and groups 5 and 6. Gross hepatic changes at 9 dpi revealed lower number of lesions in

the group 1 in comparison that group 2, although at 18 dpi the liver presented similar lesions in both groups. Both infected groups (1 and 2) showed necrotic paths and hepatic granulomas at 9 and 18 dpi. Periportal fibrosis showed an increase in group 1 and 2 at 9 and 18 dpi, which it was more severe in group 2 in comparison with group 1.

FoxP3+ cells showed a significant increase in liver in the groups 1 and 2 at 9 and 18 dpi in comparison with group 3. No significant differences between both infected groups were found. FoxP3+ cells had a significant increase in HLN in the groups 1 and 2 at 9 and 18 dpi. No significant differences between both infected groups were found.

The stability of 10 candidate reference genes was evaluated in the HLN and liver. The stability analysis of gene expression using the RefFinder statistical approach revealed that PGK1, HSP90AA1 and GYPC were the most stable genes that could be used for normalization. The optimal number of reference genes for normalization was also calculated by GeNorm using the pairwise variation (V_n/V_{n+1}) and the results indicated that in both tissues the use of the two more stable genes was enough for the standarization.

The expression of IL-4 increased in the liver and HLN at 9 and 18 dpi in both group 1 and 2 in comparison with group 3. The expression of IFN- γ showed different dynamics in liver and HLN. In the liver it increased at 9 dpi in animals from group 1 and at 18 dpi it increased in animals from group 1 and 2, in comparison with group 3. This increase could be due to a response to liver damage

with formation of granulomas. In the HLN the expression of IFN- γ showed a significant and gradually decrease from 1 dpi onwards in both groups 1 and 2 in comparison with group 3, which suggest that the parasite downregulates the Th1 immune response and stimulates the Th2 immune response to facilitate its survival.

The expression of TNF- α , IL-1 β , FoxP3, IL-10 y TGF- β showed an increase in liver and HLN in groups 1 and 2 throughout the experience, particularly at 18 dpi. There was also a significant positive correlation between the expression of FoxP3 and IL-10 (by IHC and qRT-PCR) as well as between periportal fibrosis and expression of the TGF- β gene.

There were no relevant differences for the expression of FoxP3 and the cytokines either in liver or HLN of group 1 (vaccinated with rCL1) or group 2 (infected control). This fact, was expected since the vaccine did not induced reduction of the number of parasites, although it caused a delay in the arrival of the larvae to the liver, reflected by the lower lesions at 9 dpi in the group 1 in comparison with group 2.

REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

-) **A'gadir H., Haroun E.M., Gameel A.A.** 1987. The protective effect of irradiated metacercarias of *Fasciola gigantica* against homologous challenge in sheep. *Journal of Helminthology* 61, 137-142.
-) **Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A.** 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
-) **Acosta D., Cristina J., Uriarte G., Lanzzeri S. Y Gama S.** 1989. Estudio preliminar sobre la resistencia conferida a bovinos por metacercarias irradiadas de *Fasciola hepatica* en Uruguay. *Veterinaria* 25, 12-20.
-) **Aldridge A., O'Neill S.M.,** 2016. 'Fasciola hepatica tegumental antigens induce anergic-like T cells via dendritic cells in a mannose receptor-dependent manner'. *European Journal of Immunology* 46, 1180-1192.
-) **Allen J.E. y MAizels R.M.** 1997. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunology Today* 18, 387-392.
-) **Allison A.C. y Byars N.E.** 1986. An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity. *Journal of Immunological methods* 24: 95(2), 157-68.
-) **Alvarez-Rojas C.A., Ansell B.R., Hall R.S., Gasser R.B., Young N.D., Jex A.R., Scheerlinck J.P.,** 2015. Transcriptional analysis identifies key genes involved in metabolism, fibrosis/tissue repair and the immune response against *Fasciola hepatica* in sheep liver. *Parasites & Vectors*. 8, 124.

- J) **Alvarez-Rojas C.A., Scheerlinck J.P., Ansell B.R., Hall R.S., Gasser R.B., Jex A.R.** 2016. Time-course study of the transcriptome of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from sheep infected with *Fasciola hepatica*. *PLOS one* 11(7), e0159194.
- J) **Andersen C.L., Jensen J.L., Orntoft T.F.** 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 64 (15), 5245-5250.
- J) **Andrews S.J.** 1999. The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: JP Dalton (ed.) Fasciolosis, CABI Publishing. Cambridge UK, pp 1-29.
- J) **Apt W., Aguilera X., Vega F., Alcaino H., Zulantay I., Apt P., Gonzalez V., Retamal C., Rodriguez J. Y Sandoval J.** 1993. Prevalence of fascioliasis in humans, horses, pigs and wild rabbits in 3 Chilean providences. *Boletín de la Oficina Sanitaria de Panama* 115, 405-414.
- J) **Attia, S.K., Moftah, N.H., Abdel-Azim, E.S.,** 2014. Expression of IFN- γ , IL-4, and IL-17 in cutaneous schistosomal granuloma. *International Journal for Dermatology* 53(8), 991-998.
- J) **Balic A., Bowles V.M. Y Meeusen E.N.** 2000. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Advances in Parasitology* 45,181-241.

-) **Beckham S.A., Law R.H., Smooker P.M., Quinsey N.S., Caffrey C.R., Mckerrow J.H., Pike R.N. Y Spithill T.W.** 2006. Production and processing of a recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin B-like enzyme (FhcatB1) reveals potential processing mechanisms in the parasite. *Biology Chemistry* 387(8), 1053-1561.
-) **Behm C.A. y Sangster N.C.** 1999. Pathology, pathophysiology and clinical aspect. En: JP Dalton (ed.) Fasciolosis. CABI Publishing, Cambridge UK, pp 185-224.
-) **Beiting D. P., Gagliardo L.F., Hesse M., Bliss S.K., Meskill D., Appleton J.A.,** 2007. Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL10, regulatory T cells, and TGF β . *The Journal of immunology* 178, 1039-1047.
-) **Belkaid Y., Blank R.B., Suffia I.** 2006. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunological Reviews* 212, 287–300.
-) **Bendezú P., Frame A.D., Frame E.L., Bonilla C.** 1988. Watercress cultivation sites and their relationships to fascioliasis in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 72, 405-411.
-) **Bennet C.E.** 1975. Surface features, sensory structures, and movement of the newly excysted juvenile *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 61, 886-891.
-) **Berasain P., Goni F., McGonigle S., Dowd A., Dalton J.P., Frangione B., Carmona C.** 1997. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and

basement membrane components. *Journal of Parasitology* 83(1), 1-5.

-) **Bernard A. y Boumsell L.** 1984. Human leukocyte differentiation antigens. *Presse Medica.* 13(38), 2311-2316.
-) **Beesley N.J., Caminade C., Charlier J., Flynn R.J., Hodgkinson J.E., Martínez-Moreno A., Martínez-Valladares M., Pérez J., Rinaldi L., Williams D.J.L.** 2017. Fasciola and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transboundary and Emerging Diseases* doi: 10.1111/tbed.12682
-) **Bettelli E., Korn T., Kuchroo V.K.** 2007. Th17: The third member of the effector T cell trilogy. *Current Opinion in Immunology* 19, 652-657.
-) **Boch J. y Supperer R.** 1986. Parasitología veterinaria. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp 110-120.
-) **Bomford R.** 1989. Adjuvants for anti-parasite vaccines. *Parasitology Today* 5(2),41-6.
-) **Booth M., Mwatha J.K., Joseph S., Jones F.M., Kadzo H., Ireri E., Kazibwe F., Kemijumbi J., Kariuki C., Kimnani G., Ouma J. H., Kabatereine N.B., Vennervald B.J., Dunne D.W.** 2004. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL10, low IFN γ , high TNF α , or low RANTES, depending on age and gender. *The Journal of Immunology* 172, 1295-1303.
-) **Boray J.C.** 1967. The effect of host reaction to experimental *F. Hepatica* infections in sheep and cattle. En: Soulsby, E.J.L (ed.) The reaction of the host to parasitism. *Proceedings of*

- the Third International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* Elwert, Marburg, Germany.
-) **Boray J.C.** 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology* 7, 95-209.
-) **Bossaert K., Farnir F., Leclipteux T., Protz M., Lonneux J.F., Losson B.** 2000a. Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 87, 103-123.
-) **Bossaert K., Jacquinet E., Saunders J., Farnir F. Y Losson B.** 2000b. Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 88, 17-34.
-) **Bourée P., y Thiebault M.,** 1993. Fasciolose à *Fasciola hepatica* en Basse Normandie de 1980 à 1990. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* 11, 79-84.
-) **Bouvry M. y Rau M.E.** 1986. Seasonal variations in egg passage of *Fasciola hepatica* in dairy cows in Quebec. *Veterinary Parasitology* 22, 267-273.
-) **Boyce W.M., Courtney C.H., Loggins P.E.** 1987. Resistance to experimental infection with *Fasciola Hepatica* in exotic and domestic breeds of sheep. *International Journal for Parasitology* 17, 1233-1237.
-) **Brady M.T., O'Neill S.M., Dalton J.P., Mills K.H.** 1999. *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 67, 5372-5378.

-) **Brophy P.M. y Barrett J.** 1990. Strategies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in helminths. *Molecular and Biochemical Parasitology* 42(2), 205-211.
-) **Brophy P.M., Crowley P., Barrett J.** 1990. Detoxification reactions of *Fasciola hepatica* cytosolic glutathione S-transferases. *Molecular and Biochemical Parasitology* 39, 155-161.
-) **Brophy P.M., Brown A., Pritchard D.I.** 1994. A PCR strategy for the isolation of glutathione S-transferases (GSTs) from nematodes. *International Journal for Parasitology* 24(7), 1059-1061.
-) **Brophy P.M. y Pritchard D.I.** 1994. Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. *Experimental Parasitology* 79(1), 89-96.
-) **Brown W.C., Davis W.C, Dobbelaere D.A.E. Y Rice-ficht A.C.** 1994. CD4+ T-cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola hepatica* and specific for adult worm antigen express both unrestricted and Th2 cytokine profiles. *Infection and Immunity* 62, 818-827.
-) **Buffoni L., Martínez-Moreno F.J., Zafra R., Mendes R.E., Pérez-Ecija A., Sekiya M., Mulcahy G., Pérez J., Martínez-Moreno A.** 2012. Humoral immune response in goats immunised with cathepsin L1, peroxiredoxin and Sm14 antigen and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 185, 315-321.

-) **Bundy D.A.P., Arambulo III P.V. Y Grey C.L.** 1983. Fascioliasis in Jamaica: epidemiologic and economic aspects of a snail-borne parasitic zoonosis. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 17, 243-258.
-) **Bustin, S.A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 25,169-193.
-) **Bustin S.A. y Mueller R.** 2005. Real-time reverse transcription PCR(qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science* 109(4),365-379.
-) **Bustin SA., Benes V., Garson, J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J.,Wittwer C.T.** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55(4), 611-622.
-) **Butterworth A.E. y David, J.R.,** 1981. Eosinophil function. *N. Engl. J. Med.* 304(3), 154-6.
-) **BVA'S technical development commite** 1974. Hepatic vascular pathology in ovine fascioliasis. *Veterinary Record* 95, 572-573.
-) **Campbell N.J., Gregg P., Kelly D.J. Y Dineen J.K.** 1978. Failure to induce homologous immunity to *Fasciola hepatica* in sheep vaccinated with irradiated metacercariae. *Veterinary Parasitology* 4, 143-152.
-) **Carmona C., Dowd A.J., Smith A.M. Y Dalton J.P.** 1993. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro

prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and biochemical Parasitology* 62, 9-17.

-) **Carmona C., McGonigle S., Dowd A.J., Smith A.M., Coughlan S., McGowran E., Dalton J.P.** 1994. A dipeptidylpeptidase secreted by *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 109, 113-118.
-) **Carranza F., Falcon C.R., Nunez N., Knubel C., Correa S.G., Bianco I., Maccioni M., Fretes R., Triquell M.F., Motran C.C., Cervi L.** 2012. Helminth antigens enable CpG-activated dendritic cells to inhibit the symptoms of collageninduced arthritis through Foxp3+ regulatory T cells, *PLoS One*, 7(7), e40356.
-) **Cerutti P. y Guerrero F.** 2001. Identification of positive cells to interleukin-4 in bovine haemal nodes. *Anatomia, Histologia Embriología: Journal of Veterinary Medicine Series C.* 30, 219-223.
-) **Cervi L., Masih D.T.** 1997. Inhibition of spleen cell proliferative response to mitogens by excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica*. *International Journal of Parasitology* 27, 573-579.
-) **Cervi L., Cejas H., Masih D.T.** 2001. Cytokines involved in the immunosuppressor period in experimental fasciolosis in rats. *International Journal for Parasitology* 31(13), 1467-1473.

-) **Chapman C.B. y Mitchell G.F.** 1982. Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 11, 165-178.
-) **Charlier J., Soenen K., De Roeck E., Hantson W., Ducheyne E., Van Coillie F., Vercruysse J.**, 2014a. Longitudinal study on the temporal and micro-spatial distribution of *Galba truncatula* in four farms in Belgium as a base for small-scale risk mapping of *Fasciola hepatica*. *Parasit. Vectors.* 7, 528.
-) **Charlier J., Vercruysse J., Morgan E., Van Dijk J., Williams D.J.**, 2014b. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitology* 141 (3), 326–335.
-) **Chauvin A., Bouvet G., Boulard C.** 1995. Humoral and cellular immune response to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *International Journal of Parasitology* 25, 1227-1241.
-) **Chauvin A., y Boulard C.** 1996. Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite* 3, 209-215.
-) **Chen M.G. y Mott K.E.** 1990. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Tropical Diseases Bulletin* 87, 1-38.
-) **Chung J.Y., Bae Y.A., Yun D.H., Yang H.J., Kong Y.**, 2012. Experimental murine fascioliasis derives early immune suppression with increased levels of TGF-beta and IL-4. *Korean J Parasitol.* 50, 301-308.

-) **Claridge J., Diggle P., McCann C.M., Mulcahy G., Flynn R., McNair J., Strain S., Welsh M., Baylis M., Williams D.J.L.**, 2012. *Fasciola hepatica* is associated with failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nature Communications* 3, 853.
-) **Clark E.A. y Ledbetter J.A.** 1994. How B and T cells talk to each other. *Nature* 367, 425-428.
-) **Clery D., Torgerson P.R., Mulcahy G.** 1996. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 62, 71-82.
-) **Collins P.R., Stack C.M., O'neill S.M., Doyle S., Ryan T., Brennan G.P., Mousley A., Stewart M., Maule A.G., Dalton J.P., Donnelly S.** 2004. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279(17), 17038-1746.
-) **Cordero M., Rojo F.A., Marínez A.R., Sánchez A., Hernández S., Navarrete I., Díez P., Quiroz H., Carvalho M.** 2010. Parasitología general 1st ed. *McGraw-Hill Interamericana de España S.L.*
-) **Cutroneo K. R.**, 2007. TGF β induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring. *Wound Repair and Regeneration* 15, 54-60.

-) **Dalton J.P., Heffernan M.** 1989. Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 35(2), 161-166.
-) **Dalton J.P., McGonigle S., Rolph T.P., Andrews S.J.** 1996. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin-L proteinases and with haemoglobin. *Infection and Immunity* 64, 5066-5074.
-) **Dalton J.P. y Brindley P.J.** 1997. Proteases of trematodes. En: Fried B and Craczyk TK (eds.). *Advances in trematode biology*. CRC Press, Baton Raton y Nueva York, pp 265-308.
-) **Dalton J.P. y Mulcahy G.** 2001. Parasite vaccines--a reality? *Veterinary Parasitology* 98, 149-167.
-) **Dalton J.P., Neill S.O., Stack C., Collins P., Walshe A., Sekiya M., Doyle S., Mulcahy G., Hoyle D., Khaznadji E., Moire N., Brennan G., Mousley A., Kreshchenko N., Maule A.G., Donnelly S.M.** 2003a. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Internacional Journal for Parasitology* 30, 1173-1181.
-) **Dalton J.P., Brindley P.J., Knox D.P., Brady C.P., Hotez P.J., Donnelly S., O'Neill S.M., Mulcahy G., Loukas A.** 2003b. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *International Journal of Parasitology* 33, 621-640

-
-) **Dalton J.P., Robinson M.W., Mulcahy G., O'neill S.M., Donnelly S.** 2013. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Veterinary Parasitology* 195(3-4), 272-285.
-) **Dargie J.D., Armour J., Rushton B., Murray M.** 1974. Immune mechanism and hepatic fibrosis in fascioliasis. En: Soulsby E.J.L. (ed.) *Proceedings of the Sixth International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* Academic Press, Nueva York, pp. 119-122.
-) **Das Mohapatra A., Panda S.K., Pradhan A.K., Prusty B.K., Satapathy A.K., Ravindran B.,** 2014 Filarial antigens mediate apoptosis of human monocytes through toll-like receptor 4. *The Journal of Infectious Diseases* 210(7), 1133-1144.
-) **Dawes B.** 1961. On the early stages of *Fasciola hepatica* penetrating into the liver of an experimental host, the mouse: a histological picture. *Journal of Helminthology* R.T. Leiper supplement, 35(S1), 41-52.
-) **Dawes B. y Hughes D.L.** 1964. Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian host. *Advances in Parasitology* 8, 97-168.
-) **Dheda K., Huggett J.F., Bustin S.A., Johnson MA, Rook G., Zumla A.** 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 37, 112-119.
-

-) **Dinarelo, C.A.** 1997. Interleukin-1. *Cytokine growth factor reviews* 8, 253-265.
-) **Dixon K.E. y Mercer E.H.** 1964. The fine structure of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 105, 385-389.
-) **Dixon K.E.** 1965. The structure and histochemistry of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* 55, 215-226.
-) **Dixon K.E.** 1966. The physiology of excystment of the metacercarias of *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 56, 431-456.
-) **Donnelly S., O'neill S.M., Sekiya M., Mulcahy G. y Dalton J.P.** 2005. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and Immunity* 73(1), 166-173.
-) **Donnelly S., Stack C.M., O'Neill S.M., Sayed A.A., Williams D.J., Dalton J.P.** 2008. Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *The FASEB Journal* 22(11),4022-4032.
-) **Dow C., Ross J.G. Y Tood J.R.** 1968. The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Parasitology* 58, 120-135.
-) **Dowd A.J., Smith A.M., McGonigle S., Dalton J.P.** 1994. Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *European Journal of Biochemistry* 223(1), 91-8.

-) **Dowd A.J., McGonigle S., Dalton J.P.** 1995 *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase cleaves fibrinogen and produces a novel type of fibrin clot. *European Journal of Biochemistry* 232(1), 241-6.
-) **Dowd, A. J., Tort J., Roche L., Ryan T., Dalton J.P.** 1997. Isolation of a cDNA encoding *Fasciola hepatica* cathepsin L2 and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 88(1-2), 163-174.
-) **Dowling D.J., Hamilton C.M., Donnelly S., La Course J., Brophy P.M., Dalton J.P., O'Neil S.M.,** 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. *Infection and Immunity*. 78, 793-801.
-) **Doy T.G., Hughes D.L., Harness E.** 1981. Hypersensitivity in rats infected with *Fasciola hepatica*: possible role in protection against a challenge infection. *Research in Veterinary Science* 30, 360-363.
-) **Doy T.G. Y Hughes D.L.** 1982. In vitro cell adherence to newly excysted *Fasciola hepatica*: failure to affect their subsequent development in rats. *Research in Veterinary Science* 32(1), 118-120.
-) **Duffus W.P.H. Y Franks D.** 1980. In vitro effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. *Clinical and Experimental Immunology* 41, 430-440.

-) **Eberhard, B.A., Anderson, U., Laxer, R.M., Rose, V., Silverman, E.D.** 1995. Evaluation of the cytokine response in Kawasaki disease. *Pediatric Infectious Disease Journal* 14,199-203.
-) **Escamilla A., Zafra R., Pérez J., McNeilly T.N., Pacheco I.L., Buffoni L., Martínez-Moreno F.J., Molina-Hernández V., Martínez-Moreno A.,** 2016. Distribution of FoxP3 + Tcells in the liver and hepatic lymph nodes of goats and sheep experimentally infected with *Fasciola hepática*. *Veterinary parasitology* 230, 14-19.
-) **Espino A.M. y Rivera F.** 2010. Quantitation of cytokine mRNA by real-time RT-PCR during a vaccination trial in a rabbit model of fascioliasis. *Veterinary Parasitology* 169, 82-92.
-) **Esteban J.G., Bargues M.D. & Mas-Coma S.** 1998. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. *Research and Reviews in Parasitology* 58, 13–42.
-) **Estes D.M., Hirano A., Heussler V.T., Dobbelaere D.A. Y Brown W.C.** 1995. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cell Immunology* 163, 268-279.
-) **Fairweather I.** 2009. Triclabendazole progress report, 2005–2009: an advancement of learning? *Journal of Helminthology* 83, 139-150

-) **Fairweather I.**, 2011. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? *Veterinary Parasitology* 180, 133-143.
-) **Falcon C., Carranza F., Martinez F.F., Knubel C.P., Masih D.T., Motran C.C., Cervi L.**, 2010. Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 137, 36-46.
-) **Falcon C. R., Masih D., Gatti G., Sanchez M.C., Motran C.C., Cervi L.**, 2014. *Fasciola hepatica* Kunitz type molecule decreases dendritic cell activation and their ability to induce inflammatory responses. *PLoS One*. 9, e114505.
-) **Fearon D.T. y Locksley R.M.** 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-54.
-) **Ferre I., Ortega-Mora L.M., Rojo-Vázquez F.A.** 1995. Seroprevalence of *Fasciola hepatica* infección in sheep in northwestern Spain. *Parasitology research* 81, 137-142.
-) **Ferrick D.A. Schrenzel M.D. Mulvania T. Hsieh B. Ferlin W.G. Lepper H.** 1995. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta Tcells in vivo. *Nature* 373(6511), 255-257.
-) **Ferrick D.A., King D.P., Jackson K.A., Braun R.K., Tam S., Hyde D.M., Beaman B.L.**, 2000. Intraepithelial gamma delta T lymphocytes: sentinel cells at mucosal barriers. *Springer Seminars in Immunopathology* 22(3), 283-296.

-) **Finkelman F.D., Svetic A., Gresser I., Snapper C., Holmes J., Trotta P.P., Katona I.M., Gause W.C.**, 1991. Regulation by interferon alpha of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice. *The Journal of Experimental Medicine* 174(5), 1179-1188.
-) **Fleige S. y Pfaffl M.W.**, 2006. "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance." *Molecular Aspects of Medicine* 27(2), 126-139.
-) **Flynn R.J., Mannion C., Golden O., Hacariz O., Mulcahy G.** 2007. Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infection and Immunity* 75(3), 1373-1381.
-) **Flynn R.J. y Mulcahy G.** 2008. The roles of IL-10 and TGF-beta in controlling IL-4 and IFN-gamma production during experimental *Fasciola hepatica* infection. *International Journal of Parasitology* 38(14), 1673-80.
-) **Fox N.J., White P.C., Mcclean C.J., Marion G., Evans A., Hutchings M.R.**, 2011. Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. *PLoS One*. 6(1),e16126.
-) **Freitas A.A., Moura V.B., Irusta V.R., Vinaud M.C., Oliveira M.A., Lino-Júnior R.S.**, 2016. IFN-gamma role in granuloma formation in experimental subcutaneous cysticercosis. *Experimental Parasitology* 168, 1-8.
-) **Freund J.** 1956. The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibliotheca Tuberculosae*. 10, 130-48.
-) **Fu Y., Chryssafidis A.L., Browne J.A., O'Sullivan J., McGettigan P.A., Mulcahy G.** 2016. Transcriptomic study

on ovine immune responses to *Fasciola hepatica* infection. *Plos Neglected Tropical Diseases*. doi:10.1371/journal.pntd.0005015.

- J) **Fu Y., Browne J.A., Killick K., Mulcahy G.** 2017. Network analysis of the systemic response to *Fasciola hepatica* infection in sheep reveals changes in fibrosis, apoptosis, toll-like receptors $\frac{3}{4}$, and B cell function. *Frontiers in Immunology* doi: 10.3389/fimmu.2017.00485
- J) **Garcia-Campos A., Ravida A., Nguyen D.L., Cwiklinski K., Dalton J.P., Hokke C.H., O'Neill S., Mulcahy G.,** 2016. 'Tegument glycoproteins and cathepsins of newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* carry mannosidic and paucimannosidic Nglycans'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10: e0004688.
- J) **Garza-Cuartero L., O'Sullivan J., Blanco A., McNair J., Welsh M., Flynn RJ., Williams D., Diggle P., Cassidy J., Mulcahy G.,** 2016. *Fasciola hepatica* infection reduces *Mycobacterium bovis* burden and mycobacterial uptake and suppresses the proinflammatory response. *Parasite Immunology* 38(7),387-402.
- J) **Gazzinelli R. T., Oswald I.P., James S.L., Sher, A.,** 1992. IL10 inhibits parasite killing and nitric oxide production by IFN γ activated macrophages. *The Journal of Immunology* 148, 1792-1796.
- J) **Genicot B., Mouligneau F., Lekeux P.** 1991. Economic and production consequences of liver fluke disease in double-

muscled fattening cattle. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 38, 203-208.

-) **Glauert A.M., Lammas D.A., Duffus W.P.** 1985. Ultrastructural observations on the interaction in vitro between bovine eosinophils and juvenile *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 91, 459-470.
-) **Gleich G.J. y Loegering D.A.** 1984. Immunobiology of eosinophils. *Annual Reviews of Immunology* 2, 429-459.
-) **Goetz, F.W., Planas, J.V., MacKenzie, S.** 2004 Tumor necrosis factor. *Developmental & Comparative Immunology* 28, 487-497.
-) **Golden, O., Flynn R.J., Read C., Sekiya M., Donnelly S.M., Stack C., Dalton J.P., Mulcahy G.** 2010. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine* 28(34), 5551-5557.
-) **Gómez-Muñoz M.T., Canals-Caballero A., Almeida S., Pasquali P., Zarlenga D.S., Gasbarre L.C.,** 2004. Inhibition of bovine T lymphocyte responses by extracts of stomach worm *Ostertagia ostertagi*. *Veterinary parasitology* 120, 199-214.
-) **González-Lanza C., Manga-González Y., Del Pozo Carnero E Hidalgo-Arguello R.** 1989. Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda Digenea) in the faeces of cattle in the Porma basin, Spain. *Veterinary Parasitology* 34, 35-43.

-) **Gonzalez L.C., Esteban J.G., Bargues M.D., Valero M.A., Ortiz P., Naquira C., Mas-Coma S.**, 2011. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: an altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Tropica* 120 (1-2), 119-129.
-) **Goose J.** 1978. Possible role of excretory/secretory products in evasion of host defences by *Fasciola hepatica*. *Nature* 275, 216-217.
-) **Gorman T., Aballay J., Fredes F., Silva M., Aguilon J.C., Alcaino H.A.** 1997. Immunodiagnosis of fasciolosis in horses and pigs using western blots. *International Journal of Parasitology* 27, 1429-1432.
-) **Graczyk T.K. y Fried B.** 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. En: J.P. Dalton (ed.) Fasciolosis CABI Publishing, Cambridge UK, pp 31-46.
-) **Grainger J.R., Smith K.A., Hewitson J.P., McSorley H.J., Harcus Y., Filbey K.J., Finney C.A., Greenwood E.J., Knox D.P., Wilson M.S., Belkaid Y., Rudensky A.Y., Maizels R.M.**, 2010. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway. *Journal of Experimental Medicine* 207, 2331-2341.
-) **Gossner A.G., Venturina V.M., Shaw D.J., Pemberton J.M., Hopkins J.** 2012. Relationship between susceptibility of Blackface sheep to *Teladorsagia circumcincta* infection and an inflammatory mucosal T cell response. *Veterinary Research* 43,26.

-) **Guasconi L., Serradel M.C., Garro A.P., Iacobelli L., Masih D.T.** 2011. C-type lectins on macrophages participate in the immunomodulatory response to *Fasciola hepatica* products. *Immunology* 133, 386-396.
-) **Guasconi L., Chiapello L.S., Masih D.T.** 2015. *Fasciola hepatica* excretory-secretory products induce CD4+T cell anergy via selective up-regulation of PD-L2 expression on macrophages in a Dectin-1 dependent way. *Immunobiology* 220, 934-939.
-) **Gurish M.F., Bryce P.J., Tao H., Kisselgof A.B., Thornton E.M., Miller H.R., Friend D.S., Oettgen H.C.** 2004. IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Journal of Immunology* 172(2),1139-1145.
-) **Haçariz, O., Sayers, G., Flynn, R.J., Lejeune, A., Mulcahy, G.** 2009. IL-10 and TGF-beta1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep. *Parasite Immunology* 31(10),613-622.
-) **Halferty L., Brennan G.P., Trudgett A., Hoey L., Fairweather I.** 2009. Relative activity of triclabendazole metabolites against the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Veterinary parasitology* 159(2), 126-138.
-) **Halton D.W.** 1967. Observations on the nutrition of digenetic trematodes. *Parasitology* 57(4),639-60.
-) **Hamalainen H.K. Tubman J.C., Vikman S., Kyrola T., Ylikoski E., Warrington J.A., Lahesmaa R.** 2001. Identification and validation of endogenous reference genes

for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. *Analytical Biochemistry* 299(1), 63-70.

- J **Hamilton C.M., Dowling D.J., Loscher C.E., Morphew R.M., Brophy P.M., O'Neill S.M.**, 2009. 'The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. *Infection and Immunity* 77, 2488-2498.
- J **Hanna R.E.B.** 1980a. *Fasciola Hepatica*. An immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and sheep. *Experimental Parasitology* 50, 155-170.
- J **Hanna R.E.B.** 1980b. *Fasciola Hepatica*: glycocalix replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Experimental Parasitology* 50, 103-114.
- J **Harmsen M.M., Cornelissen J.B., Buijs H.E., Boersma W.J., Jeurissen S.H., Van Milligen F.J.** 2004. Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *International Journal of Parasitology* 34(6), 675-682.
- J **Harness E., Hughes D.L., Doy T.G.** 1976. The demonstration of pre-hepatic immune response to *Fasciola hepatica* in the mouse. *International Journal for Parasitology* 6:15-17.
- J **Harness E., Doy T.G. Y Huges D.L.** 1977. The early migratory behaviour of young *Fasciola hepatica* in

sensitized mice. *International Journal of Parasitology* 7, 51-54.

- J) **Haroun E.M. y Hillyer G.V.** 1986. Resistance to Fasciolosis – a review. *Veterinary Parasitology* 20, 63-93.
- J) **Hasby E. A., Hasby Saad M.A., Shohieb Z., El Noby K.,** 2015. FoxP3+ T regulatory cells and immunomodulation after *Schistosoma mansoni* egg antigen immunization in experimental model of inflammatory bowel disease. *Cellular immunology* 295, 67-76.
- J) **Hein W.R., Mackay C.R.** 1991. Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunology Today* 12(1), 30-34.
- J) **Hellemans J. y Vandesompele J.** 2014. Selection of Reliable Reference Genes for RT-qPCR Analysis. En Biassoni R. y Raso A. *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* 1st ed. *Springer New York*, pp 19-26.
- J) **Henker, L.C., Schwertz, C.I., Lucca, N.J., Piva, M.M., Prior, K.C., Baska, P., Norbury, L., Januszkiewicz, K., Dezen, D., Duarte, M.M.M.F., Moresco, R.N., Bertagnolli da Rosa, L., Mendes, R.E.** 2017. Immune protection conferred by recombinant MRLC (myosin regulatory light chain) antigen in TiterMax Gold® adjuvant against experimental fasciolosis in rats. *Vaccine* 35, 663-671.
- J) **Hillyer G.V., Haroun E.T., Hernandez A., De Galanes MS.** 1987. Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 37, 363-369.

- J **Hillyer G.V.** 2005. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *Journal of Helminthology* 79(3), 241-247.
- J **Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Gelfand D. H.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (16), 7276–7280.
- J **Hope-Cawdery M.J., Gettinby G., Grainger J.N.R.,** 1978. Mathematical models for predicting the prevalence of liver-fluke disease and its control from biological and meteorological data. En: *Weather and Parasitic Animal Disease*. World Meteorological Organisation Technical Note N° 159, pp 21-38.
- J **Hopkins D.R.** 1992. Homing in on helminths. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46(6), 626-634.
- J **Howell R.M.** 1966. Collagenase activity of immature *Fasciola hepatica*. *Nature*. 209(5024), 713-714.
- J **Howell M.J., Board P.G., Boray J.C.** 1988. Glutathione S-transferases in *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 74(4), 715-718.
- J **Huges D.L., Hanna R.E.B., Symonds H.W.** 1981. *Fasciola hepatica*: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. *Experimental Parasitology* 52, 271-279.
- J **Hughes D.L.** 1985. Trematodes, excluding schistosomes with special emphasis on *Fasciola*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 120, 241-260.

-) **Huntley J.F., Newlands G., Miller H.R.** 1984. The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. *Parasite Immunology* 6(4), 371-390.
-) **Ibarra R., Montenegro N., Vera Y., Castillo R., Hernández A. Y Ochoa P.** 2002. Eficacia comparativa de un fasciolicida experimental, triclabendazol y closantel e bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*. *Journal of Helminthology* 75, 245-249.
-) **Ishizaka S., Saito S., Yoshikawa M., Kimoto M., Nishiyama T.,** 1996. IL10 production in mouse hepatocytes augmented by TGF β . *Cytokine*. 8, 837-843.
-) **Janeway C.A. J.R., Jones B., Hayday A.** 1988. Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunology Today* 9, 73-76.
-) **Jayaraj R., Piedrafiata D., Dynon K., Grams R., Spithill T.W., Smooker P.M.** 2009. Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Veterinary Parasitology* 160, 230-236.
-) **Ji X., Von Rosenvinge E.C., Johnson W.W., Tomarev S.I., Piatigorsky J., Armstrong R.N., Gilliland G.L.** 1995. Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry* 34(16), 5317-5328.
-) **Johnson G., Nour A.A., Nolan T., Huggett J., Bustin S.** 2014. Minimum Information Necessary for Quantitative

Real-Time PCR Experiments. En Biassoni R. y Raso A. Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols 1st ed. *Springer New York* pp 5-17.

- J) **Jurado J., Prieto-Alamo, M. J., Madrid- Risquez J., Pueyo C.** 2003. Absolute gene expression patterns of thioredoxin and glutaredoxin redox systems in mouse. *The Journal of Biological Chemistry* 278(46), 45546-45554.
- J) **Khallaayoune K.H., Stromberg B.E., Dakkak A., Malone J.B.,** 1991. Seasonal dynamics of *Fasciola hepatica* burdens in grazing Timahdit sheep in Morocco. *International Journal of Parasitology* 21, 307-314.
- J) **Kaufmann S.H. y Kabelitz D.,** 1991. Gamma/delta T lymphocytes and heat shock proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 167, 191-207.
- J) **Kelly W.R.** 1993. The liver and biliary system. En: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. y Palmer N. (eds.). *Pathology of domestic animals.* pp. 319-407.
- J) **Kendall S.B. y Parfill J.W.** 1962. The chemotherapy of fascioliasis. *British Veterinary Journal* 118, 1-10.
- J) **Kesik M., Jedlina-Panasiuk L., Kozak-Cieszczyk M., Płucienniczka A., Wedrychowicz H.** 2007. Enteral vaccination of rats against *Fasciola hepatica* using recombinant cysteine proteinase (cathepsin L1). *Vaccine* 25, 3619-328.
- J) **Khallaayoune K.H., Stromberg B.E., Dakkak A., Malone J.B.** 1991. Seasonal dynamics of *Fasciola hepatica* burdens in

- grazing Timahdit sheep in Morocco. *International Journal of Parasitology* 21, 307-314.
-) **Khanjari A., Bahonar A., Fallah S., Bagheri M., Alizadeh A., Fallah M., Khanjari Z.** 2014, Prevalence of fasciolosis and dicrocoeliosis in slaughtered sheep and goats in Amol Abattoir, Mazandaran, northem Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(2), 120-124.
-) **Kinabo L.D. y Bogan J.A.** 1988. Pharmacokinetics and efficacy of triclabendazole in goats with induced fascioliasis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 11, 254-259.
-) **Klein D.** 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 8, 257-260.
-) **Klion A.D. y Nutman T B.,** 2004. The role of eosinophils in host defense against helminths parasites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113, 30-37.
-) **Knight D.A., Ernst M., Anderson G.P., Moodley Y.P., Mutsaers S.E.** 2003. The role of gp130/IL6 cytokines in the development of pulmonary fibrosis: critical determinants of disease susceptibility and progression? *Pharmacology & Therapeutics* 99,327-338.
-) **Knox D.P., Redmond D.L., Skuce P.S., Newlands G.F.** 2001. The contribution of molecular biology to the development of vaccine against nematode and trematode parasites of domestic ruminants. *Veterinary Parasitology* 22, 311-335.

- J **Kofta W., Mieszczanek J., Plucienniczak G. Y Wedrychowicz H.** 2000. Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. *Vaccine* 18, 2985-2990.
- J **Kohyama M., Sugahara D.m Hosokawa H., Kubo M., Hozumi N.,**2001. IL4 mediated development of TGF beta1 producing cells from naïve CD4(+) T cells through a STAT6 independent mechanism. *European journal of immunology.* 31,3659-3666.
- J **Koie M., Christensen N.O., Nansen P.** 1976. Stereoscan studies of eggs, free-swimming and penetrating miracidia and early sporocysts of *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 51, 79-90.
- J **Kolls J.K. y Linden A.** 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467-476.
- J **Konno A., Hashimoto Y., Kon Y., Okada K., Davis W.C. Y Sugimura M.** 1995. Expression of gamma delta T cell receptor on caprine globule leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 48(1-2), 105-112.
- J **Konopka B.** 1993. Ocurrance of parasites in slaughter animals in Kielce regioin (centra Poland) in 1987-1992. *Medycyna Weterynaryjna* 49, 373-374.
- J **Kozera B. y Rapacz M.** 2013. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics* 54(4), 391-406.
- J **Kuhne B.S. y Oschmann P.** 2002. Quantitative real-time PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. *Biotechniques* 33, 1078-1084.

-) **Laird P.P. y Boray J.C.** 1992. Human fascioliasis successfully treated with triclabendazole. *Australian and New Zealand journal of medicine* 22, 45-47.
-) **Leathers C.W., Foreyt W.J., Fetcher A., Foreyt K.M.** 1982. Clinical fascioliasis in domestic goats in Montana. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 180, 1451-1454.
-) **Lenton L.M., Bygrave F.L., Behm C.A.** 1996. *Fasciola hepatica* infection in sheep: changes in liver metabolism. *Research in Veterinary Science* 61, 152-156.
-) **Luu-The V., Paquet N., Calvo E., Cumps J.** 2005. Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotechniques* 38, 287-293.
-) **Luz J.E., Focaccia Siciliano R., De Oliveira A.G. Filho Y., Pisani J.C.** 1999. Human Fascioliasis in the Metropolitan Area of Curitiba. Brazil evaluation of the Foci of Infection and Report of Nine Cases Treated With Triclabendazole. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 3, 220-225.
-) **Machado D.C., Horton D., Harrop R., Peachell P.T. Y Helm B.A.** 1996. Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen-specific IgE. *European Journal of Immunology* 26(12), 2972-80.
-) **Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A.** 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30, 1292-1305.

- J **Mackay I.M.** 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection* 10, 190–212,
- J **Maes L., Vanparijs O., Lauwers H., Deckers W.** 1990. Comparative efficacy of Closantel and triclabendazole against *Fasciola hepatica* in experimentally infected sheep. *Veterinary Record* 127, 450-452.
- J **Maggioli G., Acosta D., Silveira F., Rossi S., Giacaman S., Basica T., Gayo V., Rosadilla D., Roche L., Tort J., Carmona C.** 2011. 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, 9057-9063.
- J **Mahakapuge T.A.N., Scheerlinck J.P.Y., Rojas C.A.A., Every A.L., Hagen J.** 2016. Assessment of reference genes for reliable analysis of gene transcription by RT-qPCR in ovine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 171: 1-6.
- J **Maizels R.M. y Holland M.J.** 1998. Parasite immunology: pathways for expelling intestinal helminths. *Current Biology* 8(20), R711-4.
- J **Maizels R.M. y Yazdanbakhsh M.** 2003. Regulation of the immune response by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology* 3, 733-743.
- J **Maizels R.M., Balic A., Gomez-Escobar N., Nair M., Taylor M.D. Y Allen J.E.** 2004. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunology Reviews* 201, 89-116.

-) **Malefyt R.D., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., Devries J.E.** 1991. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes- an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of experimental medicine.* 174 (5), 1209-1220.
-) **Manga Y., González-Lanza C., Del Pozo P. E Hidalgo R.** 1990. Kinetics of *Fasciola hepatica* egg pasaje in the faeces of sheep in the Porna basin, Spain. *Acta Parasitologica Polonica* 35, 149-157.
-) **Mannervik B., Alin P., Guthenberg C., Jensson H., Tahir M.K., Warholm M., Jornvall H.** 1985. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Science U S A.* 82(21), 7202-7206..
-) **Maqbool A., Hashmi H.A., Shafique M., Akhtar T., Ahmad M., Mahmood F.** 2000. Epidemiology and chemotherapy of fascioliasis in goats. *Indian Journal of Animal Research* 34, 33-36.
-) **Martin, I., Cabán-Hernández, K., Figueroa-Santiago, O., Espino, A.M.** 2015. *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein inhibits TLR4 activation and suppresses the inflammatory cytokines induced by LPS *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Immunology* 194(8),3924-3936.
-) **Martínez-Fernández A.R., Nogal-Ruiz J.J., López-Abán J., Ramajo V., Oleaga A., Manga-González Y., Hillyer G.V., Muro A.** 2004. Vaccination of mice and

sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Veterinary Parasitology* 126, 287-298.

- J) **Martínez Moreno A., Martínez-Cruz M.S., Martínez F.J., Gutierrez P.N. Y Hernández S.** 1996. Detection of antibodies to *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology* 62, 247-252.
- J) **Martínez Moreno A., Jiménez V., Martínez-Cruz M.S., Martínez Moreno F.J., Becerra C. Y Hernández S.** 1997. Triclabendazole treatment in experimental goat fasciolosis: antihelmintic efficacy and influence in antibody response and pathophysiology of disease. *Veterinary Parasitology* 68, 57-67.
- J) **Martínez-Moreno A., Jiménez-Luque V., Moreno T., Redonde E.S.H., Martín De Las Mulas J. Y Pérez J.** 1999. Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Veterinary Parasitology* 82, 19-33.
- J) **Martínez-Moreno A., Jiménez-Luque V., Cámara S., Martínez-moreno F.J., Acosta I. Y Hernández S.** 2000. Oxidative responses during bacterial phagocytosis of polymorphonuclear leucocytes in primarily and secundarily *Fasciola hepatica* infected goats. *International Journal of Parasitology* 30(9), 1013-1017.
- J) **Martínez-Pérez J.M., Robles-Pérez D., Rojo-Vazquez F.A., Martínez-Valladares M.,** 2014. Immunological features of

LPS from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepática*. *Research in veterinary science*. 97,329-332.

-) **Martínez-Valladares M., Robles-Pérez D., Martínez-Pérez J.M., Cordero-Pérez C., Farmularo M. R., Fernández-Pato N., González-Lanza C., Castañón-Ordoñez L., Rojo-Vazquez F.A.** 2013. Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasites & Vectors* 6, 282
-) **Mas-Coma S., Bargues M.D., Valero M.A., Fuentes M.V.,** 2003. Adaptation capacities of *Fasciola hepatica* and their relationships with human fascioliasis: from below sea level up to the very high altitude. In: Combes C., Jourdane J. (eds) *Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites*, vol 2. Presses Universitaires de Perpignan, Perpignan.
-) **Mas-Coma S., Bargues M.D., Valero M.A.** 2005 Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology* 35(11-12), 1255-1278.
-) **Mas-Coma S., Valero M.A., Bargues M.D.,** 2009. Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology* 69, 41–46.

- J **Matsuzaki G. y Umemura M.** 2007. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiology Immunology* 51, 1139-1147.
- J **McCole D.F., Doherty M.L., Baird A.W., Davis W.C., McGill K., Torgerson P.R.** 1998. Concanavalin A-stimulated proliferation of T cell subsetdepleted lymphocyte populations isolated from *Fasciola hepatica*-infected cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66(3-4), 289-300.
- J **McGeachy M.J., Bak-Jensen K.S., Chen Y.** 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by cells and restrain T(H) -17 cell-mediated pathology. *Nature Immunology* 8, 1390-1397.
- J **McGinty A., Moore M., Halton D.W., Walker B.** 1993. Characterization of the cysteine proteinases of the common liver fluke *Fasciola hepatica* using novel, active-site directed affinity labels. *Parasitology* 106 (Pt 5), 487-493.
- J **McManus D.P. y Dalton J.P.** 2006. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 133 (S2), S43-61.
- J **McMenamin C., Pimm C., McKersey M., Holt P.G.** 1994. Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific gammadelta Tcells. *Science* 265(5180), 1869-1871.

- J **McNeilly, T.N., Rocchi, M., Bartley, Y., Brown, J.K., Frew, D., Longhi, C., McLean, L., McIntyre, J., Nisbet, A.J., Wattegedera, S., Huntley, J.F., Matthews, J.B.** 2013. Suppression of ovine lymphocyte activation by *Teladorsagia circumcincta* larval excretory-secretory products. *Veterinary Research* 44 (1), 70.
- J **Meeusen E. y Brandon M.R.** 1994. The use of antibody-secreting cell probes to reveal tissue-restricted immune response during infection. *European Journal of Immunology* 24, 469-474.
- J **Meeusen E., Lee C.S., Rickard M.D., Brandon M.R.** 1995. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunology* 17, 37-45.
- J **Mendes, E.A., Mendes, T.A., Dos Santos, S.L., Menezes-Souza, D., Bartholomeu, D.C., Martins, I.V., Silva, L.M., Lima, W.S.,** 2013. Expression of IL-4, IL-10 and IFN γ in the liver tissue of cattle that are naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 195,177-182
- J **Meyer D.J., Coles B., Pemble S.E., Gilmore K.S., Fraser G.M., Ketterer B.** 1991. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochemical Journal* 274 (Pt 2), 409-414.
- J **Mitchell M.** 1995. The distribution and epidemiology of liver fluke in New Zealand. *Surveillance* 22, 22-26.
- J **Molina E.C., Skerratt L.F.** 2005. Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a

single dose of *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology* 131, 157-163.

- J) **Molina-Hernandez V., Mulcahy G., Pérez J., Martínez-Moreno A., Donnelly S., O'Neill S.M., Dalton J.P., Cwiklinski K.** 2015. *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Veterinary Parasitology* 208(1-2), 101-111.
- J) **Monje-Casas F., Michán C., Pueyo C.** 2004. Absolute transcript levels of thioredoxin- and glutathione-dependent redox systems in *Saccharomyces cerevisiae*: response to stress and modulation with growth. *Biochemical Journal* 383, (Pt 1), 139-147.
- J) **Montgomery T.D., Leid R.W., Westcott R.B.** 1986. Interaction of bovine complement with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 19, 55-65.
- J) **Morales M.A., Luengo J., Vasquez J.,** 2000. Distribution and tendency of fasciolosis in meat animals in Chile, 1989-1995. *Parasitología al día*, 24(3-4), 115-118.
- J) **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, 307-15.
- J) **Morrison C.A., Colin T., Sexton J.L., Bowen F., Wicker J., Friedel T., Spithill T. W.** 1996. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-Transferase. *Vaccine* 14(17-18), 1603-1612.

-) **Mueller O., Hahnenberger K., Dittmann M., Yee H., Dubrow R., Nagle R., Ilsley D.** 2000. A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* 21(1), 128-134.
-) **Mulcahy G., O'connor F., McGonigle S., Dowd A., Clery D.G., Andrews S.J., Dalton J.P.** 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16(9-10), 932-939.
-) **Mulcahy G., O'connor F., Clery D., Hogan S.F., Dowd A.J., Andrews S.J., Dalton J.P.** 1999. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Research in Veterinary Science* 67, 27-33.
-) **Mulcahy G. y Dalton J.P.** 2001. Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Research in Veterinary Science* 70, 83-86.
-) **Mulcahy G., O'Neill S., Fanning J., McCarthy E., Sekiya M.** 2005. Tissue migration by parasitic helminths - an immunoevasive strategy? *Trends in Parasitology* 21, 273-277.
-) **Murphy K. y Weaver C.** 2017. Janeway's Immunology 9th ed. Garland science,
-) **Musoke A.J., Rurangirwa F.R., Nantulya V.M.** 1986. Biological properties of bovine immunoglobulins and systemic antibody responses. En: Morrison W.I. (ed.) The

Ruminant Immune System in Health and Disease. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

- J **Nansen P.** 1975. Resistance in cattle to *Fasciola hepatica* induced by a gamma-ray attenuated larvae: Results from a controlled field trial. *Research in Veterinary Science* 19, 278-283.
- J **Nguyen T.G., Le T.H., Tran T.L., Praet N., Speybroeck N., Vercruysse J., Dorny P.** 2011. Bovine fasciolosis in the human fasciolosis hyperendemic Binh Dinh province in Central Vietnam. *Acta Tropica* 117 (1), 19-22.
- J **Nono J.K., Pletinckx K., Lutz M.B., Brehm K.,** 2012. Excretory/secretory products of *Echinococcus multilocularis* larvae induce apoptosis and tolerogenic properties in dendritic cells in vitro. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(2), e1516.
- J **Nutman T.B.,** 2013. Immune responses in helminth infections. In: Lee JJ, Rosenberg, HF (eds) Eosinophils in health and disease. *Academic. Press. Waltham* pp 312–320.
- J **O'Connor T., Wilmut I., Taylor J.** 2013. Quantitative evaluation of reference genes for real-time PCR during in vitro maturation of ovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* 48(3), 477-483.
- J **O'Leary K.A. y Tracy J.W.** 1988. Purification of three cytosolic glutathione S-transferases from adult *Schistosoma mansoni*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 264(1), 1-12.

-) **O'Neill S.M., Brady M.T., Callanan J.J., Mulcahy G., Joyce P., Mills K.H., Dalton J.P.** 2000. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunology* 22(3), 147-155.
-) **O'Neill S. M., Mills K.H.G., Dalton J.P.** 2001. *Fasciola hepatica* cathepsin L cysteine proteinase suppresses *Bordetella pertussis*-specific interferon- γ production *in vivo*. *Parasite immunology* 23, 541-547.
-) **Oldham G. y Hughes D.L.** 1982. *Fasciola hepatica*: immunization of rats by intraperitoneal injection of adult fluke antigen in Freund's adjuvant. *Experimental Parasitology* 54(1), 7-11.
-) **Overend D.J. y Bowen F.L.** 1995. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian Veterinary Journal* 72, 275-276.
-) **Pacheco I.L., Abril N., Morales-Prieto N., Bautista M.J., Zafra R., Escamilla, A., Ruiz M.T., Martínez-Moreno A., Pérez J.,** 2017. Th1/Th2 balance in the liver and hepatic lymph nodes of vaccinated and unvaccinated sheep during acute stages of infection with *Fasciola hepatica*. *Veterinary parasitology*. 238, 61-65.
-) **Paz Silva A., Sánchez Andrade R., Suarez J.L., Pedreira J., Arias M., López C., Panadero R., Diaz Baños P., Morrondo P.** 2003. Prevalence of natural ovine fascioliasis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitology Research* 91(4), 328-331.

- J) **Pearce E.J., James S.L., Hieny S., Lanar D.E., Sher A.** 1988. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proceedings of the National Academy of Science U S A.* 85(15), 5678-5682.
- J) **Pearce E.J. y Sher A.** 1991. Functional dichotomy in the CD4+ T-cell response to *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 73, 110-116.
- J) **Pearce E.J., Caspar P., Grych J.M., Lewis F.A., Sher A.** 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine* 173, 159-166.
- J) **Pemble S.E., Wardle A.F., Taylor J.B.** 1996. Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochemical Journal* 319 (Pt 3), 749-754.
- J) **Pérez J., Martín De Las Mulas J., Carrasco L., Gutierrez P.N., Martínez Cruz M.S., Martínez Moreno A.** 1999. Pathological and immunohistological study of the liver and hepatic lymph nodes in goats primarily and secondarily infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Comparative Pathology* 120, 199-210.
- J) **Pérez J., Ortega J., Moreno T., Morrondo P., López-Sández C., Martínez Moreno A.** 2002. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*,

- with or without triclabendazole treatment. *Journal of Comparative Pathology* 127, 30-36.
-) **Pérez J., Garcia P.M., Hernandez S., Mozos E., Camara S., Martínez Moreno A.** 2003. Experimental haemonchosis in goats: effects of single and multiple infections in the host response. *Veterinary Parasitology* 111(4), 333-342.
-) **Pérez-Creo A., Díaz P., López C., Béjar J.P., Martínez-Sernández V., Panadero R., Díez-Baños P., Ubeira F.M., Morrondo P.** 2016. *Fasciola hepatica* in goats from north-western Spain: Risk factor analysis using a captura ELISA. *The veterinary Journal* 208,104-105.
-) **Pérez-Ecija R.A., Mendes R.E., Zafra R., Buffoni L., Martínez-Moreno A., Pérez J.** 2010. Pathological and parasitological protection in goats immunised with recombinant cathepsin L1 and challenged with *Fasciola hepatica*. *The Veterinary Journal* 185, 351-353.
-) **Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T.P.** 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26 (6), 509-515.
-) **Phiri I.K., Phiri A.M., Harrison L.J.S.** 2006. Serum antibody isotype responses of *Fasciola*-infected sheep and cattle to excretory and secretory products of *Fasciola* species. *Veterinary Parasitology* 141, 234–242.
-) **Piacenza L., Acosta D., Basmadjian L., Dalton J.P., Carmona C.** 1999. Vaccination with cathepsin L proteinases

and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fasciolosis in sheep. *Infection and Immunity* 67, 1954-1961.

- J) **Piedrafita D., Estuningsih E., Pleasance J., Prowse R., Raadsma H.W., Meeusen E.N., Spithill T.W.** 2007. Peritoneal lavage cells of Indonesian thintail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity in vitro against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infection and Immunity* 75(4), 1954-63.
- J) **Pleasance J., Wiedosari E., Raadsma H.W., Meeusen E., Piedrafita D.**, 2011. Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type 1 cytokine response. *Parasite immunology* 33, 495-505.
- J) **Poglayen G., Capelli G., Martini M., Zampiccoli R.** 1995. Epidemiologia delle parassitosi dell'aparato digerente del bovine nella provincia autonoma di Trento. *Atti della Societa Italiana di Buiatria* 27, 483-489.
- J) **Poitou I., Baeza E., Boulard C.** 1993. Analysis of the results obtained using a technic of experimental primary infestation with *Fasciola hepatica* in the rat. *International Journal for Parasitology* 23, 403-406.
- J) **Prieto-Alamo, M. J., Cabrera-Luque J. M., Pueyo C.** 2003. Absolute quantitation of normal and ROS-induced patterns of gene expression: an in vivo real-time PCR study in mice. *Gene Expression* 11(1), 23-34.

-) **Pritchard D.I., Hewitt C., Moqbel R.** 1997. The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helper 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths. *Parasitology* 115, 33-44.
-) **Prowse R.K., Chaplin P., Robinson H.C., Spithill T.W.** 2002. *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. *Parasite Immunology* 24(2), 57-66.
-) **Prussin C. y Metcalfe D.D.** 2003. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 111(2), S486-94.
-) **Puech C., Dedieu L., Chantal I., Rodrigues V.** 2015. Design and evaluation of a unique SYBR Green real-time RT-PCR assay for quantification of five major cytokines in cattle, sheep and goats. *BMC Veterinary Research* 11, 65.
-) **Ramisz G., Ramisz A., Balicka-Ramisz** 1997. The influence of treatment on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection and weight gains in sheep. *Wiadomosci Parazytologiczne* 43, 69-77.
-) **Reddington J.J., Leid R.W., Wescott R.B.** 1986. The susceptibility of the goat to *Fasciola hepatica* infections. *Veterinary Parasitology* 19, 145-150.
-) **Rege A.A., Herrera P.R., Lopez M., Dresden M.H.** 1989. Isolation and characterization of a cysteine proteinasa from *Fasciola hepatica* adult worms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 35(1), 89-95.

-
-) **Reischl U., Wittwer C.T., Cockerill F.** 2002. Rapid Cycle Real-time PCR: Methods and Applications; Microbiology and Food Analysis 1st ed. Springer-Verlag, New York.
-) **Rickard M.D. y Howell M.J.** 1982. Comparative aspect of immunity in fascioliasis and cysticercosis in domesticated animals. En: Symons L.E.A., Donald A.D. and Dineen J.K. (eds.). *Biology and Control of Ectoparasites*. Academic Press, Sydney, pp. 343-374.
-) **Rimaniol A.C., Gras G., Clayette P.** 2007. *In vitro* interactions between macrophages and aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 25 (37-38), 6784-6792.
-) **Rinaldi, L., Biggeri, A., Musella, V., De Waal, T., Hertzberg, H., Mavrot, F., Torgerson P.R., Selemetas N., Coll T., Bosco A., Grisotto L., Cringoli G., Catelan, D.** 2015. Sheep and *Fasciola hepatica* in Europe: The GLOWORM experience. *Geospatial Health*, 9, 309.
-) **Ripert C., Tribouley J., Luong Dinh Giap G., Combe A., Laborde M.** 1987. Epidémiologie de la fasciolose humaine dans le sud ouest de la France. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* 5, 227-230.
-) **Robinson M.W., Menon R., Donnelly S.M., Dalton J.P., Ranganathan S.,** 2009. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Molecular & Cellular Proteomics* 8, 1891-1907.
-

-) **Robinson M.W., Donnelly S.M., Hutchinson A.T., To J., Taylor N.L., Norton, R.S., Perugini, M.A., Dalton, J.P.,** 2011. A family of helminth molecules that modulate innate cell responses via molecular mimicry host antimicrobial peptides. *Plos Pathogens*. 7, e1002042.
-) **Rodríguez, E., Noya V., Cervi L., Chiribao M.L., Brossard N., Chiale C., Carmona C., Giacomini C., Freire T.,** 2015. Glycans from *Fasciola hepatica* modulate the host immune response and TLR-Induced maturation of dendritic cells. *Plos Neglected Tropical Diseases* 9(12), e0004234.
-) **Rognlie M.C., Dimke K.L., Potts R.S., Knapp S.E.** 1996. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in Montana, USA, with detection of infected intermediate hosts using a DNA-based assay. *Veterinary Parasitology* 65(3-4), 297-305.
-) **Roitt** 2014. *Essential Immunology* 12th ed. Blackwell Science Inc., USA.
-) **Rojo F.A. y Ferre I.** 1999. Fasciolosis. En: Cordero M. y Rojo F.A. (eds.). *Parasitología Veterinaria*. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp 260-282.
-) **Rojo-Vazquez F.A., Meana A., Valcárcel F., Martínez-Valladares M.,** 2012. Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*. 189, 15-38.
-) **Rondelaud D.,** 1991. Les cressonnières naturelles du Limousin et leur contamination par *Fasciola hepatica* L. Bilan d'une enquête de 20 années. *Annales des Sciences du Limousin* 7,3-4.

- J **Ross I.C. y McKay A.C.** 1929. The bionomics of *Fasciola hepatica* in New South Wales and of the intermediate host *Limnaea brazieri*. *Bulletin of the Council of Scientific and Industrial Research Australia* 43, 62.
- J **Ross J.G., Dow C., Todd J.R.** 1967. A study of *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Veterinary Record* 18, 543-546.
- J **Rowcliffe S.A. y Ollerenshaw C.B.** 1960. Observations on the bionomics of the egg of *Fasciola hepatica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 54, 172-181.
- J **Ruiz-Campillo M.T., Molina-Hernández V., Escamilla A., Stevenson M., Pérez J., Martinez-Moreno A., Donnelly S., Dalton J.P., Cwiklinski K.** 2017. Immune signatures of pathogenesis in the peritoneal compartment during early infection of sheep with *Fasciola hepatica*. *Scientific Reports* 7, 2782.
- J **Rushton B.** 1977. Ovine fascioliasis following reinfection. *Research in Veterinary Science* 22, 133-134.
- J **Rushton B. y Murray M.** 1977. Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. *Journal of Comparative Pathology* 87, 459-470.
- J **Saito H., Kanamori Y., Takemori T., Nariuchi H., Kubota E., Takahashi-Iwanaga H., Iwanaga T., Ishikawa H.** 1998. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science*. 280(5361), 275-278.
- J **Salvatore L., Wijffels G., Sexton J.L., Panaccio M., Mailer S., McCauley I., Spithill T.W.** 1995. Biochemical analysis of

recombinant glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 69(2), 281-288.

-) **Sambrook J.F. y Russell D.W.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
-) **Sánchez-Andrade R., Paz-Silva A., Suárez J.L., Panadero R., Pedreira J., López C., Díez-Baños P., Morrondo P.** 2002. Influence of age and bree don natural bovine fasciolosis in an endemic area (Northwest Spain). *Veterinary Research Communications*. 26, 361 -370.
-) **Sandeman R.M. y Howell M.J.** 1981. Response of sheep to challenge infection with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science* 30, 294-297.
-) **Schmidt-Weber C.B., Alexander S.L., Henault L.E., James L., Lichtman A.H.,** 1999. IL4 enhances IL10 genes expression in murine Th2 cells in the absence of TCR engagement. *The journal of immunology*. 162, 238-244.
-) **Schneeberger, C.; Speiser, P.; Kury, F.; Zeillinger, R.** 1995. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods and Applications* 4 (4), 234–238.
-) **Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T.,** 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7, 3.

-) **Schweizer G., Braun U., Deplazes P., Torgerson P.R.** 2005. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record* 157(7), 188-193.
-) **Semnani R.T., Venugopal P.G., Mahapatra L., Skinner J.A., Meylan F., Chien D., Dorward D.W., Chaussabel D., Siegel R.M., Nutman T.B.,** 2008. Induction of TRAIL- and TNF-alpha-dependent apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells by microfilariae of *Brugia malayi*. *The Journal of Immunology* 181, 7081-7089.
-) **Serradell M.C., Guasconi L., Cervi L., Chiapello L.S., Masih D.T.** 2007. Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 117(3-4), 197-208.
-) **Sexton J.L., Milner A.R., Panaccio M., Waddington J., Wijffels G., Chandler D., Thompson C., Wilson K., Spithill T.W., Mitchell G.F., Cambell N.J.** 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *The Journal of Immunology* 145, 3905-3910.
-) **Sexton J.L., Wilce M.C., Colin T., Wijffels G.L., Salvatore L., Feil S., Parker M.W., Spithill T.W., Morrison C.A.** 1994. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a three-dimensional model of the antigen. *Journal of Immunology* 152(4), 1861-1872.

-) **Shin M.H.**, 2000. Excretory-secretory product of newly excysted metacercariae of *Paragonimus westermani* directly induces eosinophil apoptosis. *The Korean Journal of Parasitology* 38 (1), 17-23.
-) **Silver N., Best S., Jiang J., Thein S.L.** 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 7, 33.
-) **Sime P.J. y O'Reilly K.M.** 2001. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clinical Immunology* 99, 308-319.
-) **Simmank W.** 1987. Der grosse Leberegel (*Fasciola hepatica*) ausfleischhygienischer Sicht. *Rundschau fur Fleischhygiene und Lebensmitteluberwachung* 39, 5-6.
-) **Sinclair K.B.** 1962. Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. *British Veterinary Journal* 118, 37-53.
-) **Sinclair K.B.** 1967. Pathogenesis of *Fasciola* and the other liver-flukes. *Helminthological Abstracts* 3, 115-134.
-) **Sinclair K.B.** 1968. The effect of corticosteroid on the plasma protein of lamb infected with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science* 9, 181-183.
-) **Sinclair K.B.** 1970. The Pathogenicity of *Fasciola hepatica* in previously infected, corticosteroid-treated lambs. *British Veterinary Journal* 127, 125-136.
-) **Smith A.M., Dowd A.J., McGonigle S., Keegan P.S., Brennan G., Trudgett A., Dalton J.P.** 1993. Purification of

Cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 62, 1-8.

- J) **Smith A.M., Carmona C., Dowd A.J., McGonigle S., Acosta D., Dalton J.P.** 1994. Neutralization of the activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. *Parasite Immunology* 16(6), 325-328.
- J) **Smith J.D. y Halton D.W.** 1983. The physiology of Trematodes, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, 446 pp.
- J) **Smith M.A. y Clegg J.A.** 1981. Improved culture of *Fasciola hepatica* in vitro. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 66, 9-15.
- J) **Sokol C.L., Barton G.M., Farr A.G., Medzhitov R.,** 2008. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature Immunology* 9, 310-8.
- J) **Soulsby E.J.L.** 1965. Textbook of the Veterinary Clinical Parasitology, Volume 1 Helminths. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 529-576.
- J) **Spithill T.W. y Morrison C.A.** 1997. Molecular vaccines for the control of *Fasciola hepatica* infection in ruminants. En: Boray, J.C. (ed.) *Immunology, Pathophysiology and Control of Fasciolosis. Round table conference at the VIIIth International Congress of Parasitology*, Izmir Turkey. Merk AgVet, Rahway pp. 29-35.
- J) **Spithill T.W., Piedrafita D., Smooker P.M.** 1997. Immunological approaches for the control of fasciolosis. *International Journal of Parasitology* 27, 1221-1235.

- J) **Spithill T.W., Smooker P.M., Sexton J.L., Bozas E., Morrison C.A., Creaney J., Parson J.C.** 1999. Development of Vaccines Against *Fasciola Hepatica*. En: J.P. Dalton (ed.) *Fasciolosis*, CABI Publishing, Cambridge UK, pp 465-526.
- J) **Stankiewicz M., Jonas W.E., Douch P.C., Rabel B., Bisset S., Cabaj W.** 1993. Globule leukocytes in the lumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. *Journal of Parasitology* 79(6), 940-945
- J) **Stirewalt M.A.** 1963. Chemical biology of secretions of larval helminths. *Annals of the New York Academic of Sciences* 113, 36-53.
- J) **Sukhdeo M.V.K. y Mettrick D.F.** 1986. The behaviour of juvenile *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 72, 492-497.
- J) **Sukhdeo M.V.K. y Mettrick D.F.** 1987. Parasite behaviour: Understanding platyhelminth responses. *Advance in Parasitology* 26, 73-144.
- J) **Taki F.A., Abdel-Rahman A.A., Zhang B.** 2014. A Comprehensive Approach to Identify Reliable Reference Gene Candidates to Investigate the Link between Alcoholism and Endocrinology in Sprague-Dawley Rats. *PLoS ONE* 9(5), e94311.
- J) **Taylor M.G.** 1987. Schistosomes of domestic animals: *Schistosoma bovis* and other animals forms. En: Soulsby E.J.L. (ed.) *Immune responses in Parasitic Infections:*

Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis II. Trematodes and Cestodes. *CRC Press*, Boca Raton, pp. 49-90.

- J **Taylor S.M., Langridge S.A., Kenny J.** 1994. Anthelmintic suppression of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Veterinary Record* 135, 86-88.
- J **Tendler M., Brito C.A., Vilar M.M., Serra Freire N., Diogo C.M., Almeida M.S., Delbem A.C., Da Silva S.F., Savino W., Garrott R. C., Katz N., Simpson A.** 1996. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14 is the potential basis of a dual-purpose anti-helmintic vaccine. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 93(1), 269-273.
- J **Tendler M. y Simpson A.J.G.** 2008. The biotechnology-value chain: Development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. *Acta Tropica* 108, 263-266.
- J **Titus, R.G., Sherry, B., Cerami, A.** 1991. The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Immunology Today* 12, 13-16.
- J **Tizard, I.** *Veterinary Immunology*, 2012. Editorial: Saunders, 9^o Ed.
- J **Tliba O., Sibille P., Boulard C., Chauvin A.,** 2002. Early hepatic cytokine mRNA expression in experimental rat fasciolosis. *Veterinary Parasitology* 103, 237-249.
- J **Toet, H., Piedrafita, D.M., Spithil, I T.W.,** 2014. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *International Journal for Parasitology* 44, 915-927.

-) **Urquhart G.M.** 1965. The pathology of experimental fascioliasis in the rabbit. *Journal of Pathology and Bacteriology* 71, 301-310.
-) **Valero M.A., Perez-Crespo I., Chillón-Marinas C., Khoubbance M., Quesada C., Reguera-Gómez M., Mas-Coma S., Fresno M., Gironés N.** 2017. *Fasciola hepatica* reinfection potentiates a mixed Th1/Th2/Th17/Treg response and correlates with the clinical phenotypes of anemia. *PLOS one* 13(3), e0173456.
-) **Vandesompele J., De Poreter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR geometric averaging of multiple internal control gene. *Genome Biology* 3 (7), research0034.1-0034.11
-) **Van Miligen F.J., Cornelissen J.B.W.J., Hendriks I.M., Gaasenbeek C.P.H., Bokhout B.A.** 1998. Protection to *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1 and IgG2a antibodies around the parasites. *Parasite Immunology* 20, 285-292.
-) **Van Riet E., Hartgers F.C., Yazdanbakhsh M.,** 2007. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology*. 212, 475-490.
-) **Veerkamp J.H., Peeters R.A., Maatman R.G.** 1991. Structural and functional features of different types of

cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochimica Biophysica Acta* 1081(1), 1-24.

-) **Vicente B., López-Abán J., Rojas-Caraballo J., Pérez del Villar L., Hillyer G.V., Martínez-Fernandez R., Muro A.** 2014. A *Fasciola hepatica*-derived fatty acid binding protein induces protection against schistosomiasis caused by *Schistosoma bovis* using the adjuvant adaptation (ADAD) vaccination system. *Experimental Parasitology* 145,145-151
-) **Vukman K.V., Adams P.N., Dowling D., Metz M., Maurer M., O'Neill S.M.,** 2013. The effects of *Fasciola hepatica* tegumental antigens on mast cell function. *The International Journal of Parasitology* 43, 531-539.
-) **Wagner B.** 1965. Untersuchungen ubre ektogene Helminthenstadien. *Angewandte Parasitologie* 6, 142-150
-) **Waldvogel A.S., Lepage M.F., Zakher A., Reichel M.P., Eicher R., Heussler V.T.** 2004. Expression of interleukin 4 , interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 97, 53-63.
-) **Warren H.S., Vogel F.R., Chedid L.A.** 1986. Current status of immunological adjuvants. *Annual Review of Immunology* 4, 369-88.
-) **Wedrychowicz H., Lamparska M., Kesik M., Kotomski G., Mieszczanek J., Jedlina-Panasiuk L., Płucienniczak A.** 2003. The immune response of rats to vaccination with the cDNA or protein forms of the cysteine proteinase of *Fasciola*

- hepatica*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 94, 83-93.
-) **Wedrychowicz H., Kesik M., Kaliniak M., Kozak-Cieszczyk M., Jedlina-Panasiuk L., Jaros S., Plucienniczak A.** 2007. Vaccine potential of inclusion bodies containing cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke. *Veterinary Parasitology* 147(1-2), 77-88.
-) **Wicki P., Schwalbach B., Charbon J.L., Steiner A., Lang M., Laup F., Pfister K.** 1991. Intestinal cellular reaction of cattle after infection by *Fasciola hepatica*. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 133, 429-437.
-) **Wijffels G.L., Sexton J.L., Salvatore L., Pettitt J.M., Humphris D.C., Panaccio M., Spithill T.W.** 1992. Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology* 74(1), 87-99.
-) **Wijffels G.L., Salvatore L., Dosen M., Waddington J., Wilson L., Thompson C., Campbell N., Sexton J., Wicker J., Bowen F., Y AL.** 1994. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Experimental Parasitology* 78(2), 132-148.
-) **Wilson IG.** 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3741-3751.
-) **Wood I.J., Porter D.D., Stephens W.B.** 1975. Wild watercress (letter). *Medical Journal of Australia* 1, 841.

- J **Wright W.R.** 1927. Studies on larval trematodes from North Wales. Part I. Observations on the redia, cercarias and cyst of *Fasciola hepatica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 21, 47-56.
- J **Wyatt CR, Madrugá C, Cluff C, Parish S, Hamilton MJ, Goff W, Davis WC.** 1994. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 40(3), 187-199.
- J **Xie, F., Xiao P., Chen D., Xu L., Zhang B.** 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology* 80 (1), 75-84.
- J **Yamasaki H., Kominami E., Aoki T.** 1992. Immunocytochemical localization of a cysteine protease in adult worms of the liver fluke *Fasciola sp.* *Parasitology Research* 78(7), 574-580.
- J **Yan H.L., Xue G., Mei Q., Ding F.X., Wang Y.Z., Sun S.H.,** 2008. Calcium dependent proapoptotic effect of *Taenia solium* metacestodes annexin B1 on human eosinophils: a novel strategy to prevent host immune response. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40,2151-2163.
- J **Yap H.Y. y Smooker P.M.** 2016. Development of experimental vaccines against liver flukes. *Methods in Molecular Biology* 1404, 135-151.

-) **Yoshimoto T. y Nakanishi K.** 2006. Roles of IL-18 in basophils and mast cells. *Allergology International* 55(2), 105-113.
-) **Zafra R., Buffoni L., Martínez-Moreno A., Pérez-Écija A., Martínez-Moreno F.J., Pérez. J.** 2008. A Study of the Liver of Goats Immunized with a Synthetic Peptide of the Sm14 Antigen and Challenged with *Fasciola hepatica*. *Journal of Comparative Pathology*. 139, 169-176.
-) **Zafra R., Pérez-Ecija R.A., Buffoni L., Mendes R.E., Martínez-Moreno A., Martínez-Moreno F.J., Martínez-Galisteo M.E., Pérez. J.** 2010. Evaluation of hepatic damage and local immune response in goats immunized with native Glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Journal of Comparative Pathology* 143, 110-119.
-) **Zafra R., Pérez-Écija R.A., Buffoni L., Moreno P., Bautista M.J., Martínez-Moreno A., Mulcahy G., Dalton J.P., Pérez J.** 2013a. Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *Experimentally Induced Disease* 148(4), 373-384.
-) **Zafra R., Pérez-Ecija R.A., Buffoni L., Pacheco I.L., Martínez-Moreno A., LaCourse E.J., Perally S., Brophy P.M., Pérez J.** 2013b. Early hepatic and peritoneal changes and immune response in goats vaccinated with a recombinant glutathione transferase sigma class and challenged with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science* 94, 602-609.

-) **Zafra R., Pérez J., Buffoni L., Martínez-Moreno F.J., Acosta I., Mozos E., Martínez-Moreno A.** 2013c. Peripheral blood lymphocyte subsets in *Fasciola hepatica* infected and immunised goats. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 155,135-138.
-) **Zaros L.G., Coutinho L.L., Sider L.H., De Medeiros H.R., Neves M. R., Benvenuti C.L., Do Carmo Navarro A. M., Da Silva Vieira L.** 2010. Evaluation of reference genes for real-time PCR studies of Brazilian Somalis sheep infected by gastrointestinal nematodes. *Genetics Molecular Biology* 33(3), 486-490.
-) **Zepeda N., Solano S., Copitin N., Fernández A.M., Hernández L., Tato P., Molinari J.L.,** 2010. Decrease of peritoneal inflammatory CD4(+), CD8(+), CD19(+) lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. *Parasitology Research* 107, 1129-1135.
-) **Zuckermann F.A. y Husmann R.J.** 1996. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology* 87(3), 500-12.