

Informe final publicable de proyecto

Desarrollo de una vacuna recombinante contra Fasciolosis en ovejas utilizando como adyuvante nanopartículas basadas en saponinas de *Quillaja brasiliensis*.

Código de proyecto ANII: FMV_1_2019_1_155469

29/06/2023

MAGGIOLI CUINAT, Gabriela Beatriz (Responsable Técnico - Científico)

CHECA FLORES, Jackeline (Investigador)

GOYECHE FERREIRA, María Antonella (Investigador)

RIVERA PATRON, Mariana (Investigador)

ROSSI, Andrea (Investigador)

SALAZAR GONZÁLEZ, María Cecilia (Investigador)

SILVEIRA GONZALEZ, Luis Fernando (Investigador)

TORT ALMEIDA, José Francisco (Investigador)

VETTORAZZI FERNANDEZ, Renzo Israel (Investigador)

ALONZO, Pablo (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA

\\
INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\
INSTITUTO DE HIGIENE

Resumen del proyecto

La infección causada por *Fasciola hepatica* produce un gran impacto negativo en rumiantes a nivel local y global. Nuestro grupo de investigación ha acumulado evidencia sobre la efectividad inmunoprotectora de la enzima leucina aminopeptidasa 1 (FhLAP1), una metaloproteasa multimérica asociada al tubo digestivo del parásito. La enzima recombinante ha sido expresada en forma funcional en *Escherichia coli* y los resultados de un importante ensayo de vacunación llevado a cabo en ovinos machos confirman su potencial protector, siendo capaz de inducir niveles de protección en el rango de aplicación comercial. Estos resultados, aún no han sido reproducidos en bovinos ni validados en ensayo a campo.

En este sentido, la presente propuesta tiene como objetivos principales: a) Determinar el potencial inmunoprotector de la FhLAP1 en ovinos hembras formulada con nanopartículas tipo ISCOMs basadas en saponinas de *Quillaja brasiliensis*, perteneciente a la flora nativa, b) Evaluar la contribución de nuevos antígeno recombinantes de *F. hepatica* en la inducción de una respuesta protectora contra la fasciolosis cuando son formulados con diferentes adyuvantes. En este trabajo probamos una FhLAP2 obtenida en nuestro laboratorio y como adyuvante probamos ISCOMs basados en saponinas de *Q. brasiliensis* producidas por el Dpto. de Desarrollo Biotecnológico. Buscamos adyuvantes que puedan potenciar una respuesta inmune (RI) protectora, c) Profundizar en los aspectos inmunológicos desarrollados por estas formulaciones en rumiantes.

Esta propuesta es la continuación de una línea de investigación desarrollada por este grupo, sobre la biología de las proteasas de *F. hepatica* y su posible rol como antígenos vacunales. Dicho trabajo generará importantes aportes en el conocimiento sobre la inmunidad en rumiantes y se podrán sumar nuevas formulaciones inmunoprotectoras para prevenir la fasciolosis. También, es atractivo porque no hay estudios realizados sobre las características de la RI celular generada por FhLAP1 en su hospedero.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología, vacunas

Palabras clave: leucina aminopeptidasas / Quillaja brasiliensis / vacunas animales /

Introducción

La fasciolosis, causada por el tremátodo *F. hepatica*, en el ganado causa grandes pérdidas económicas generadas como consecuencia de la mayor susceptibilidad a infecciones secundarias, reducción de la producción de carne, lana y leche, interferencia en la fertilidad y gastos en aplicación del tratamiento fasciolicida.

En Uruguay hay más de 38.000 establecimientos ganaderos, ocupando 16 millones de hectáreas de pastoreo, sobre las que se maneja ganado vacuno y ovino. En este sector trabajan casi 100 mil personas. Se trata en la mayoría de los casos de sistemas de producción mixtos, en los que vacunos y ovinos pastorean juntos en los mismos campos. En las zonas de ganadería extensiva existen casi 12 millones de vacunos y 10,5 millones de ovinos. Además, nuestro país se encuentra entre los 10 principales países exportadores de carne vacuna y lana en el mundo.

Nuestro país puede considerarse una zona enzoótica para *F. hepatica*. El monitoreo llevados a cabo en 2003 por el Instituto Plan Agropecuario, Facultad de Veterinaria y Merial S.A. en la zona Norte y Este del país reveló que el 62.5% de los predios tenía presencia de *F. hepatica*. La fasciolosis, a nivel mundial, causa pérdidas económicas cercanas a US\$ 3.000 millones anuales. En Suiza hay estudios que establecen pérdidas de 52 millones de euros anuales (299 euros por animal infectado). En Uruguay, se analizaron datos de frigoríficos uruguayos y observaron un promedio de 33,9% de presencia de *F. hepatica* en bovinos a nivel nacional, alcanzando un 50-60% en algunos departamentos del país.

Asimismo, la fasciolosis humana es considerada una enfermedad re-emergente. Su control está basado en el tratamiento con triclabendazole (TCBZ). Además de reportarse casos de resistencia a esta droga, se reportó presencia de residuos tóxicos en carne y leche provenientes de animales tratados trayendo como consecuencia grandes impedimentos para la utilización de estos productos para su consumo. En este contexto, la vacunación surge como una alternativa capaz de brindar mayor protección y sustentabilidad a largo plazo, no genera residuos tóxicos para el consumo y tampoco es perjudicial para el ambiente.

Estudios sobre vacunación contra fasciolosis se han llevado a cabo tanto en mamíferos pequeños como en rumiantes. Estos ensayos de vacunación han permitido avanzar en el estudio sobre los mecanismos de protección de la respuesta inmune (RI) pero algunos resultados prometedores sobre protección obtenidos en pequeños mamíferos no han podido

reproducirse en rumiantes.

Para que una vacuna contra *F. hepatica* posea potencial comercial, debe conferir niveles de protección que eviten afectar la producción en rumiantes. Se postula, que una vacuna tendría gran impacto sobre el control de la enfermedad, si reduce como mínimo la carga

parasitaria en un 43% sobre el 90% de la manada y se mantiene durante una temporada de pastoreo completa. Para diseñar y desarrollar vacunas contra *F. hepatica* es fundamental profundizar nuestros conocimientos sobre los mecanismos de una respuesta protectora en rumiantes. Tal respuesta se relaciona a un fenotipo Th1 con altos títulos de IgG2 y bajos títulos de IgG1(21), o una respuesta tipoTh1/Th2 mixta relacionada a altos niveles de anticuerpos IgG2 e IgG1.

En este contexto, se postula la utilización del antígeno junto a un apropiado adyuvante buscando dirigir la respuesta hacia un fenotipo Th1 reduciendo los efectos de inmunomodulación del parásito sobre la RI y aumentando así la eficacia de la vacuna (25,26). En helmintos, la idea de una vacuna basada en un solo antígeno es probablemente irrealista. En este sentido, se ensayaron diferentes combinaciones de proteínas nativas obteniendo el resultado más prometedor del 72% en bovinos. La desventaja de estas formulaciones con antígenos nativos es que no fueron viables para el desarrollo de vacunas comerciales. En los últimos años, diferentes grupos de investigación se centraron en el desarrollo de antígenos recombinantes. Los resultados de protección más prometedores fueron los mimitopos CL1/CL2 (47%) y mimitopo CL1 (51%). Por otro lado, una leucina aminopeptidasa FhLAP recombinante producida por nuestro laboratorio, es el antígeno que generó los mejores resultados de protección en ovejas machos (74-86%). Hasta la fecha, ninguno de estos antígenos ha sido validados en ensayos a campo, ni sus resultados han sido replicados en bovinos.

Desde hace tres décadas el Laboratorio de Biología Parasitaria - Instituto de Higiene -Facultad de Ciencias se ha propuesto como objetivo el estudio de la relación hospedero-parásito utilizando como modelo a *F. hepatica*. Nuestro laboratorio se ha centrado en la función de las enzimas proteolíticas en esta interfase, la cual le permite al parásito invadir, migrar, nutrirse y evadir la RI. Durante los últimos años se ha obtenido una metaloproteasa importante como la FhLAP1, la que ha sido clonada y expresada en forma funcional en un sistema procariota.

Continuando con esta línea de investigación, se obtuvo una segunda FhLAP2 recombinante del parásito a modo de realizar su caracterización bioquímica y un análisis comparativo con la FhLAP1 con el objetivo de sumar nuevos candidatos vacunales. La FhLAP2 recombinante mostró niveles de protección elevados (70%) durante un ensayo de inmunoprotección en ratón.

Por otro lado, los adyuvantes son componentes esenciales en el desarrollo de vacunas y tienen como función principal aumentar su potencia principalmente activando la inmunidad innata y promoviendo una inflamación controlada. En este sentido, el grupo del Dr Fernando Silveira del Dpto de Desarrollo Biotecnológico-Facultad de Medicina ha reportado que la fracción de saponinas (QB-90) extraídas de las hojas de Quillaja brasiliensis, una planta nativa de Brasil y Uruguay, promueve fuertes RI cuando es formulada con antígenos virales. Esta fracción posee propiedades adyuvantes efectivas que la hacen competitiva con los productos del mercado. Con la intención de reducir los efectos tóxicos inherentes a las saponinas y a su vez potenciar su actividad inmunoestimulante, el grupo incluyó a QB-90 en formulaciones micelares tipo ISCOMs (IQB). Estas preparaciones tipo caja de 40 nm, son formuladas con saponinas, colesterol y fosfolípidos y debido a su estructura pueden conseguir una liberación eficaz del antígeno dando como resultado la inducción de una RI duradera. Recientemente han reportado la formulación exitosa de nanopartículas (IQB) como activadores de la RI temprana, como también de una respuesta sistémica y de mucosas. Cuando fueron inoculados en ratones promovieron elevados títulos de anticuerpos tipo IgG1/IgG2a/IgG2b y una respuesta tipoTh1 (IL-2 e INF?), el fenotipo de RI requerido para llevar a cabo un control efectivo contra la fasciolosis.

En esta propuesta, se planteó evaluar la capacidad de protección de la FhLAP1 y FhLAP2 recombinantes en ovejas hembras formulada con IQB. Además, planteamos buscar nuevos candidatos que puedan tener un efecto positivo en la formulación junto a FhLAP1.

En este trabajo se propuso evaluar el potencial inmunoprotector de FhLAP1 junto a FhLAP2 e IQB en rumiantes generando resultados originales y un punto de partida para estudios de nuevos antígenos y/o formulaciones para el control de la fasciolosis y otras parasitosis.

Con la finalidad de continuar avanzando en el desarrollo y mejoramiento de una vacuna contra la fasciolosis en rumiantes, es necesario ahondar nuestro conocimiento sobre qué mecanismos deben generarse para obtener una respuesta protectora contra este parásito. Para ello, debemos trabajar con su hospedero natural. Esta convocatoria nos brindó la posibilidad de proponernos los siguientes objetivos:

1) Estudiar el rol protector contra F. hepatica de FhLAP1 sola y junto a FhLAP2 formuladas con IQB en ovinos hembras. Con esto buscamos estudiar la RI protectora utilizando como modelo animal a su hospedador natural.

2) Estudiar la RI generadas por FhLAP1 sola y junto a FhLAP2 formuladas con IQB en ovinos hembras. En particular estudiamos la RI humoral, cuantificación de anticuerpos IgG total e isotipos (IgG1, IgG2 e IgA) en suero mediante la técnica de ELISA. Además, evaluamos la RI celular mediante el análisis de la expresión de citoquinas por qPCR. Los primers serán sintetizados específicamente y se determinará el perfil de las siguientes citoquinas y factores de transcripción: Foxp3; IL10; TGF- β ; TNF- α ; IL-1 β ; IL2; INF- γ ; IL4.

Con esto pretendemos obtener información preliminar buscando potenciar el efecto profiláctico de la FhLAP1. Este proyecto sería la continuación de una línea de investigación central que se desarrolla por el equipo de investigación sobre la biología de las proteasas de F hepatica y su posible rol como antígenos vacunales.

Metodología/diseño del estudio

1) Ensayo de vacunación en ovinos

Un total de 50 ovinos Corriedale hembras se dividieron en 5 grupos de 10 cada uno. Los grupos vacunados recibieron 2 dosis por vía subcutánea de 100 μ g de FhLAP1 / FhLAP2 (en las semanas 0 y 4 formulado con el adyuvante correspondiente como sigue: Grupo 1: FhLAP1/IQB; Grupo 2: FhLAP1/FhLAP2/IQB; Grupo 3: Control PBS; Grupo 4: Control IQB; Grupo 5: FhLAP1/Adyuvac 50 (gentilmente cedido por la empresa VirBac). En la semana 6 todos los grupos fueron desafiados oralmente con 200 metacercarias. Los animales se sacrificaron en la semana 20, para evaluar daño hepático, carga parasitaria, conteo y viabilidad de huevos en heces. Todos los animales serán tratados de acuerdo con las disposiciones de la CHEA para la experimentación animal.

2) Determinación de la RI humoral anti-FhLAP1 y anti-FhLAP2

Con el objetivo de estudiar la respuesta humoral, se tomaron muestras de sangre por venopunción yugular cada 2 semanas hasta el final de cada experimento. El suero obtenido en ambos ensayos se empleó para determinar los niveles de IgG total, IgG1, IgG2 e IgA específicos mediante la técnica de ELISA. El antígeno sensibilizante será FhLAP1 o FhLAP2. El seguimiento de la evolución de los anticuerpos específicos será detectado con un anticuerpo conjugado a peroxidasa anti-IgG total y subclases de ovinos.

3) Estudio de la RI celular

Hasta el momento no se conocen las características de la respuesta celular generada por FhLAP1 al ser utilizada como inmunógeno en rumiantes. Para lograr mejorar nuestros resultados en bovinos, necesitamos profundizar nuestros conocimientos sobre las características de una RI protectora generada al inmunizar con FhLAP1.

Con el objetivo de estudiar la respuesta celular, se tomarán muestras de sangre por venopunción yugular en las semanas 0, 6, 8, 10 y 20. La sangre será colectada con un anticoagulante (EDTA 1%) con el fin de aislar las células mononucleares.

- Purificación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC)

La obtención de las PBMC se llevará a cabo mediante la utilización de protocolos estándares. Inicialmente, la sangre es diluida en PBS (1:2) y se le agrega una solución comercial para aislar PBMC. Posteriormente, se centrifuga y colecta la fase enriquecida en PBMC. Se lava utilizando PBS y centrifugando a baja velocidad. Las células obtenidas serán estimuladas con FhLAP1, FhLAP2 y PBS (control sin estimular) durante 6h. Luego, se guardan en TRIzol reagent a -80 C hasta su utilización. Estas células serán utilizadas para obtener ARN total.

- Análisis de perfil de citoquinas mediante qPCR

Se generará el ADNc a partir de 1 μ g de ARN total obtenido a partir de PBMC. Para esto se utilizará un kit comercial para síntesis de ADNc. Para llevar a cabo las qPCR se utilizará el equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett) que se encuentra en el Dpto de Desarrollo Biotecnológico-Instituto de Higiene. Todas las amplificaciones se realizarán por triplicado y se partirá de 50 ng ADNc de cada animal. Los primers serán sintetizados específicamente y se determinará el perfil de las siguientes citoquinas y factores de transcripción: Foxp3; IL10; TGF- β ; TNF- α ; IL-1 β ; IL2; INF- γ ; IL4. Los niveles de expresión de los genes de interés serán normalizados usando el gen de la α -actina como "housekeeping". La cantidad de ARNm relativo en cada muestra se calcula usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (94) donde $\Delta\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ Actb}$.

4) Análisis estadístico

Los datos serán expresados como media \pm SEM de los resultados obtenidos en muestras ensayadas por duplicado o por triplicado. Los datos serán analizados con el software GraphPad Prism (GraphPad Software, USA). Se comprobará la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Bartlett. En caso que los datos sugieran una distribución normal se aplicará un test paramétrico y en caso contrario se aplicará un test no paramétrico. Valores de $p < 0.05$ serán considerados estadísticamente significativos.

Resultados, análisis y discusión

Nuestro laboratorio probó la FhLAP1 recombinante junto con Adyuvac 50 (VirBac) en formulaciones vacunales y hemos obtenido resultados muy alentadores de protección en ovinos machos (74-86%). Estos resultados no se replicaron en bovinos y tampoco han sido validados en ensayos a campo.

En la presente propuesta se llevó a cabo un ensayo de vacunación en ovinos hembras con el objetivo de estudiar la RI protectora generada por FhLAP1/Adyuvac50 y buscar nuevos antígenos y adyuvantes que puedan potenciar el efecto profiláctico de FhLAP1 contra *F. hepatica* y poder replicar estos resultados en bovinos.

En este trabajo se utilizaron 2 antígenos (FhLAP1 y 2) formulados con IQB un adyuvante natural producido en el Instituto de Higiene. Se observa una tendencia a la protección contra la infección en animales inmunizados con los dos antígenos pero estas diferencias no son significativas con respecto a los controles. Se observa una respuesta de anticuerpos IgG totales específica contra FhLAP1 y 2 comparada con los controles pero no es tan potente como la generada por el grupo inmunizado FhLAP1/Adyuvac50. La diferencia en los niveles de protección podría deberse a que con el adyuvante IQB no logramos tan altos niveles de anticuerpo.

En el marco de este proyecto se lleva adelante una Tesis de doctorado. Además, el análisis de la RI celular mediante qPCR se realizará en colaboración con otro laboratorio. En este contexto, hemos tenido algunos retrasos. Pensamos comenzar las qPCR en julio-agosto. Mediante este análisis esperamos encontrar diferencias significativas en ciertas citoquinas o factores de transcripción entre los grupos vacunados con respecto a los controles y al grupo FhLAP1/adyuvac (formulación mas exitosa). Estas diferencias podrían indicarnos qué debemos activar o suprimir para obtener una RI protectora.

Conclusiones y recomendaciones

Dicho trabajo genera importantes aportes en el conocimiento sobre la inmunidad de los rumiantes. Además, podremos sumar nuevas formulaciones inmunoprotectoras para prevenir la fasciolosis. Asimismo, este trabajo es atractivo porque hasta la fecha no hay estudios realizados sobre las características de la respuesta celular generada por FhLAP1 y si esta proteína presenta algún efecto inmunomodulador en su hospedero natural. Para lograr mejorar nuestros resultados en bovinos, necesitamos profundizar nuestros conocimientos sobre qué mecanismos de la RI del hospedero se están activando o suprimiendo al inmunizar con FhLAP.

Por otro lado, utilizamos un adyuvante natural basado en saponinas (IQB), el cual fue descrito y producido en Uruguay por el grupo del Dr Fernando Silveira. Con la incorporación de este adyuvante generamos una RI polarizada Th1 pero no fue una respuesta potente como la inducida por Adyuvac50. En futuros ensayos, se podría inmunizar con mayor concentración de IQB y realizar un 2º refuerzo para aumentar la respuesta de anticuerpos.

Una vez analizada la RI celular y teniendo en cuenta todos los resultados en conjunto podremos tener conclusiones más precisas. Esperamos observar diferencias entre los grupos vacunados y controles y a su vez con respecto al grupo vacunado con FhLAP/adyuvac. De esta manera, identificar puntos clave para potenciar o inhibir en el diseño de formulaciones protectoras contra fasciolosis.

Referencias bibliográficas

- Acosta, et.al. (1998). *J. Parasitol.*84:1-7.
- Acosta, et.al.(2008). *Mol.Biochem.Parasitol.*158:52–64.
- Aitken, et.al.(1978). *J.Comp.Pathol.*88(1):75-84.
- Beesley, et.al.(2017). *Transbound.Emerg.Dis.*<https://doi.org/10.1111/tbed.12682>
- Berasain, et.al.(1997). *J.Parasitol.*83:1-5.
- Berasain, et.al.(2000). *Exp.Parasitol.*94:99-110.
- Brady, et.al.(1999). *Infect.Immun.*67(10):5372-8.
- Buonavoglia, et.al.(1998). *New.Microbiol.*2:209-212.
- Buonavoglia, et.al.(2010). *Research.in.Veterinary.Science.*88:16–19.
- Cancela, et.al.(2008). *Biochimie.*90(10):1461-1475.
- Changklungmoa, et.al.(2013). *Parasitol.Res.*112:3653–3659.
- Carmona, et.al.(1993). *Mol.Biochem.Parasitol.*62:9-18.
- Charlier, et.al.(2014). *Parasitology.*141(3):326–335. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182013001662>.
- Checa, et al. (2023). *Vet Parasitology* <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109959>
- César D. Instituto Plan Agropecuario. www.santaelena.com.uy/andocasociado.aspx?190,6835
- Cibulski, et.al.(2016). *Vaccine.*34:1162–1171.
- Cibulski, et.al.(2016). *Microbiology.and.Infectious.Diseases.*45:1–8.
- Cibulski et al.(2018). *Vaccine.*36:55–65.
- Cibulski, et.al.(2018). *Scientific.Reports.*8:13582.
- Corvo, et.al.(2009). *Mol.Biochem.Parasitol.*167:41-47.
- Corvo, et.al.(2013). *PLoS.Negl.Trop.*7:e2269.[doi:10.1371/journal.pntd.0002269](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002269).
- Dalton, Brindley(1996). In *Advances in Trematode Biology*,CRCPress.
- Dalton, et.al.(2013). *Veterinary.Parasitology.*195:272–285.
- Dalsgaard, et.al.(1977). *Acta.veterinaria.scandinavica.*18:349–360.
- Dargie (1987). *International. Journal.for.Parasitology.*17:453–463.
- De Costa, et.al.(2014). *PLoS.ONE.*9:1–7.
- Dowd, et.al.(1994). *Eur.J.Biochem.*223:91-98.
- Fairweather (2011). *Vet.Parasitol.*176:1–8.
- Flynn, et.al.(2008). *Int.J.Parasitol.*38(14):1673-80.
- Flynn, et.al.(2009). *Transbound.Emerg.Dis.*56:269-274.<https://doi.org/10.1111/j.1865-1682>
- Flynn, et.al.(2010). *Vet.Parasitol.*169(3-4):235-40.
- Fleck, et.al(2006). *Vaccine.*24:7129–7134.
- Garza-Cuartero, et.al.(2016). *Parasite.Immunol.* <https://doi.org/10.1111/pim.12326>.2009.01075.x.
- Graham-Brown, et.al.(2018). *Infec.Immun.*86: e00607-17.
- Greco, et.al.(2002). *New.Microbiol.*1:17-20.
- Golden, et.al.(2010). *Vaccine.*28:5551–5557.
- Gómez-Miller(2006). INIA.SUPLEMENTO.TECNOLÓGICO. <http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/ara/ara192.pdf>
- Harrison, et.al(1999). *Veterinary.Immunology.and.Immunopathology.*70:161–172.
- Imperiale, et.al.(2011). *J.Food.Additives.Contaminants.*
- Jung-Mi Kang, et.al.(2012). *Mol.Biochem.Parasitol.*182:17-26.
- Knudsen, et.al.(2016). *Scientific.reports.*6:19570.
- Lendemans et al. (2005). *Journal.of.Pharmacy.and.Pharmacology.*57:729–733.
- Livak, Schmittgen(2001). *Methods.*25:402–8
- Lövgren Bengtsson, et.al.(2011). *Expert.Review of Vaccines.*10:401–403.
- Maggioli, et.al.(2011). *Vaccine.*29:9057-9063.
- Maggioli, et.al.(2017). *Mol.Biochem.Parasitol.*219:17-23.
- Maggioli, et al.(2020). Liver Fluke Vaccine Assessment in Cattle. *Methods in Molecular Biology*, chapter 15. doi: 10.1007/978-1-0716-0475-5.
- Marcilla, et.al.(2012). *PLoS.ONE.*7:e45974.
- Marcilla, et.al.(2008). *Clinical.and.Vaccine Immunology.*15:95-100.[doi:10.1128/CVI.00338-07](https://doi.org/10.1128/CVI.00338-07).

McCarthy, et.al.(2004). *IntJ.Parasitol.*34(6):703–14.

McKenzie, et.al.(2010). *Human.vaccines.*6:237–246.

McManus, Dalton(2006). *Parasitology.*133:43–61.

Molina-Hernández, et.al.(2015). *Vet.Parasitology.*208:101–111.

Morein, et.al.(1984). *Nature.*308:457–460.

Morelli, et.al.(2012). *Journal.of.Medical.Microbiology.*61:935–943.

Mowat et al.(1995). *Current.protocols.in.immunology.* <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0211s16>.

Mulcahy, et.al.(1999). *Research.in.Veterinary.Science.*67:27–33.

O'Hagan, Fox(2015). *Vaccine.*33.S.B14–B20.

Pacheco, et.al.(2018). *Vet.Res.*<https://doi.org/10.1186/s13567-018-0550-x>.

Piacenza, et.al.(1997). *J.Helminthol.*71:333–338.

Piacenza, et.al.(1999). *Infect.Immun.*67:1954–1961.

Rajput, et.al.(2007). *Journal.of.Zhejiang.University.Science.*88:153–61.

Rees, et.al(1975). *Australian.Veterinary.Journal.*51:497–499.

Rinaldi, et.al.(2009). *Mol.Biochem.Parasitol.*167:118–126.

Robertson, et.al.(1996). *Persp.Drug.Discov.Design.*6:33–46.

Roche, et.al.(1999). *Mol.Biochem.Parasitol.*98:271–277.

Roche, et.al.(1997). *Eur.J.Biochem.*245:373–380.

Sachdev, et.al.(2017). *Frontiers.inImmunology.*8:1002.

San Martin, Briones(1999). *Economic.Botany.*53:302–311.

Sánchez-Di Maggio, et.al.(2016). *Scientific.Reports.*6:32796. doi:10.1038/srep32796

Sanchís, et.al(2015). *Arch.med.vet.*47:201–208.

Schweizer, et.al(2005). *Vet.Rec.*157:188–193.

Silveira, et.al(2011). *Vaccine.*29:9177–9182.

Sinclair(1972). *Revista.Científica.*2(1):59–60.

Spithill, et.al(1999).In: *Fasciolosis.* CAB International Publishing, Wallingford, Oxon 377–410.

Sun, et.al.(2009). *Vaccine.*27:1787–1796.

Toet, et.al.(2014). *International.Journal.for.Parasitology.*44:915–927.

Tola, et.al.(1999). *Vaccine.*doi:10.1016/S0264-410X(99)00070-5

Tort, et.al.(1999). *Adv.Parasitol.*43:161–266.

Turner, et.al.(2016). *Scientific.Reports.*6:1–13.

Villa-Mancera, et.al.(2008). *Parasitology.*135:14–37

Villa-Mancera, Mendez-Mendoza(2012). *Veterinary.Journal.*194:108–112.

Wesolowska, et.al.(2018). *Parasitology.International.* <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.parint.2017.04.002>

WHO(2012)_Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases; a roadmap for implementation—executive summary

Williamson, et.al.(2004). *J.Biol.Chem.*279:35950–7.

Yendo, et.al.(2016). *Vaccine.*34:2305–2311.

Yendo et al.(2017). *Methods.in.Molecular.Biology.* 1494:87–93. <http://www.springer.com/gb/book/9781493964437>.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional. (CC BY-NC)