

Fasciola hepatica: Avances en el empleo de candidatos vacunales (*Fasciola hepatica: Advance of vaccine candidates' employ*)

Naranjo, Feliciano, Dany: Grupo Biología Molecular. Dirección Microbiología. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Contacto: dany@censa.edu.cu

REDVET: 2008, Vol. IX, N° 4

Recibido: 12.10.07 / Referencia provisional: E014_RED VET / Referencia definitiva: 040807_RED VET /
Aceptado: 06.03.08 / Publicado: 01.04.08

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040807.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Resumen

Diferentes estudios sugieren que la vacunación con determinados antígenos de *Fasciola hepatica* puede ser un medio eficaz para el control de esta enfermedad. Este artículo revisa los resultados de varios ensayos vacunales recientes con los más importantes candidatos vacunales: proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), cisteína proteasas (catepsinas), hemoglobina, leucina aminopeptidasa (LAP) y proteínas del tipo saponina.

Palabras clave: Fasciola hepatica, Rhamdia | vacuna

Summary

Several studies suggest the vaccination with determined *Fasciola hepatica's* antigens can be an efficient mean for the control of this disease. This paper reviews the results of several recent vaccine trials with the major vaccine candidates: fatty acid binding protein (FABP), cysteine (cathepsins) proteases, haemoglobin, leucine aminopeptidase (LAP), and a saposin-like protein.

Keywords: Fasciola hepatica | Rhamdia | vaccine

Introducción

La fascioliasis hepática, es una enfermedad helmíntica mundialmente distribuida. En Cuba es causada por *Fasciola hepatica*, parásito de los canales biliares y de la vesícula de herbívoros y omnívoros. El hombre puede enfermarse de forma accidental. Su ciclo es complejo, en el que se involucra un caracol de hábitos anfibios del género *Lymnaea* como hospedador intermediario.

Muestra alta prevalencia en el ganado (49) y tiene significación médica (31,35). A Cuba se le atribuye la tercera parte de los casos registrados de fascioliasis humana en el mundo (44). Produce grandes pérdidas en la economía, por concepto de decomisos de hígados, carne, leche, descenso de la resistencia a otras enfermedades, inhibición de la reproducción, abortos (17) y el alto costo en la producción pecuaria al tratar sistemáticamente los rebaños afectados para su control.

En programas de control, la estrategia más importante consiste en el empleo de fasciolicidas, para minimizar la contaminación de los pastos con huevos (8). Idealmente, el uso de fasciolicidas con actividad contra formas juveniles es lo más deseable, debido a que los mismos ofrecen un control más prolongado y con ello una simplificación en el manejo. Un solo fármaco, el triclabendazol, está disponible para la quimioterapia contra estadios adultos y juveniles, pero es costoso, debe usarse en repetidas ocasiones en herbívoros y ha sido reportada la disminución de su eficacia (37).

Concerniente a la aparición de resistencia a los fasciolicidas y por la presencia de residuos en los alimentos y el ambiente, se ha potenciado el incentivo de descubrir vacunas moleculares contra este patógeno. La forma exponencial de acumulación de secuencias de genes y proteínas de varios helmintos requiere nuevos métodos de asimilación y análisis de esos datos que permitirán la identificación de moléculas capaces de inducir protección inmunológica (11). Diferentes estudios sugieren que la vacunación puede ser un medio eficaz para el control de la fascioliasis (29).

Objetivos

Este artículo revisa los resultados de varios ensayos vacunales recientes con los más importantes candidatos vacunales: Proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), cisteíno proteasas (catepsinas), hemoglobina, leucin aminopeptidasa (LAP), y proteínas del tipo saponina.

Desarrollo

Proteína transportadora de ácidos grasos (FABP)

Las proteínas transportadoras de ácidos grasos, FABP, forman una larga familia que participa en la unión y transporte de un amplio número de

ligandos hidrofóbicos tales como el ácido oléico, palmítico; ácidos grasos de cadena larga y de sus ésteres acil-CoA, así como ácidos biliares. Se caracterizan por la conservación del tamaño: todos los miembros conocidos se extienden entre 14 y 16 kDa de masa y de 127 a 133 aminoácidos de longitud (25). Han sido reportadas como antígenos protectores por diferentes grupos de investigación (1, 6, 7, 41).

El reconocimiento de este antígeno como protector procede de una serie de experimentos comenzados en la década de los 70 por Hillyer y col. (1979); quienes purificaron por cromatografía de afinidad un subconjunto de antígenos de *Fasciola* en virtud de su reactividad cruzada con anticuerpos contra *Schistosoma mansoni* (21). A esta fracción se le denominó FhSmIII (M).

La vacunación de terneros con dos dosis de 500 µg de FhSmIII (M) con adyuvante completo de Freund (ACF) indujo una reducción significativa del 55% de la carga parasitaria (23). Se observaron también altos niveles de protección en ratón, 68-78% (24).

El antígeno de la fracción FhSmIII (M) que era inmunoprotector en ratones fue identificado como Fh12, una proteína de 12 kDa (24). Con antisueros de la proteína Fh12 se seleccionó de una librería de cADN (43) el clon correspondiente a la proteína recombinante Fh15, de 14.7 kDa, que a su vez demostró poseer una homología del 44% con la proteína recién caracterizada FABP recombinante de *S.mansoni* Sm14 (36), similitud que permitió la clasificación de Fh12 como FABP. Existen discrepancias con relación a si estas proteínas son idénticas, al menos están relacionadas antigénicamente y esto está dado a que existen varias isoformas de FABP en *F. hepatica*.

La purificación de la proteína recombinante rFh15 y de la molécula nativa nFh12 incitó una serie de experimentos para comparar su potencial inmunoprolifáctico. Muro y col. (1997) vacunaron conejos con ambas proteínas con el adyuvante completo de Freund para ver sus efectos al ser retadas con metacercarias. Los niveles más altos de protección solo se obtuvieron para nFh12, con un 40% de reducción de las duelas con relación a los controles. Sin embargo, conejos inmunizados con nFh12 o rFh15 desarrollaron duelas más pequeñas, y tenían lesiones menos severas en el hígado que los controles. Este ensayo se realizó con ovejas en similares condiciones (41) y produjo resultados menos significativos.

Casanueva y col. (2001) realizó este ensayo solo con rFh15 pero prolongó los intervalos de tiempo de 2 a 12 y de 4 a 20 semanas de latencia después de la segunda inmunización. Se obtuvieron reducciones significativas de las duelas y se relacionó con el tiempo de latencia (reducción de las duelas del 43% con 12 semanas; reducción del 76% con de 20 semanas). Por otra parte, el porcentaje de fasciolas inmaduras también era significativo (reducción del 66% con 12 semanas; reducción del 84% con 20 semanas). Finalmente, las

lesiones del hígado estaban disminuidas en los conejos vacunados con rFh15. Los autores concluyeron que una FABP recombinante de *Fasciola hepatica* induce protección (reducción de la carga parasitaria), tiene actividad contra la fecundación (reducción de duelas inmaduras), efectos antipatológicos (menos lesiones del hígado) en conejos y pueden servir como modelo para la inmunoprolifaxis de la fascioliasis.

En un estudio posterior, se empleó un nuevo adyuvante inmunomodulador con nFh12 como vacuna contra ovejas desafiadas con metacercarias (33). El protocolo de la vacunación consistió en un sistema de dos inyecciones. La primera consistía en una micela en la cual se incluían dos componentes, una saponina de *Quillaja saponaria* y/o Anapsos, un extracto hidroalcohólico de *Polypodium leucotomos*, ambos emulsionados en un aceite no mineral (Montanide) en una proporción 30/70 agua/emulsión de aceite, inyectada por vía subcutánea. La segunda inyección tenía los mismos componentes más la proteína nFh12 FABP. Las ovejas fueron desafiadas seis semanas después con 100 metacercarias. En la necropsia las ovejas vacunadas mostraron un bajo recobrado de duelas (24.5%), un número más bajo de huevos en el líquido de la bilis (58.1%), y excedente en las heces (40.3%) con relación a los grupos de control. Por otra parte, las duelas recuperadas eran más pequeñas (32.7%), inmaduras (34%) y con una masa corporal más baja (31.6%) con respecto a las ovejas no vacunadas completamente. También se vacunaron ratones BALB/c y CD-1, se retaron con dosis letales de metacercarias; al cabo de 6 semanas todos habían muerto, menos el 40% de los que se sometieron al protocolo de vacunación con nFh12.

La investigación sobre estos antígenos continúa activa: sus isoformas han sido aisladas - al menos ocho isoformas de Fh12 - y caracterizadas inmunológicamente (18). Este es uno de los candidatos vacunales más promisorios contra la fascioliasis y tiene el beneficio adicional de ser un candidato para la vacunación contra la schistosomiasis. El *Schistosoma* (y probablemente otros tremátodos) no pueden sintetizar ácidos grasos de cadena larga (34) y presumiblemente confían la fuente de precursores de ácidos grasos al suplemento de estos en los sueros de los hospederos. La vacunación contra FABPs puede interferir con el suministro de ácidos grasos al parásito y así ser una promisoriosa vía de ataque.

Glutación-S-Transferasa

La glutación S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18) abarca la familia de isoenzimas implicadas dentro la desintoxicación celular de una amplia gama de sustratos. En el caso de *Fasciola hepatica* se identifica como FhGST y está propuesta a desempeñar tres roles: Primero, está involucrada en la desintoxicación de aldehídos citotóxicos producidos durante la peroxidación lipídica (5); segundo, involucrada en la función de absorción del intestino del parásito adulto (9); tercero, interactúa con la hematina y previene el bloqueo del intestino del parásito por cristalización de la hematina (4).

La GST de *Fasciola hepatica* fue elegida como antígeno candidato a vacuna sobre la base que sus homólogas de *S.mansoni* - Sm28 - y de *S.japonicum* - Sj26 - (4) han sido reportadas para proteger animales de laboratorio (47). La purificación de GSTs de *F. hepatica* ha demostrado un alto grado de heterogeneidad, con ocho isoenzimas nativas y cuatro recombinantes (48).

El primer ensayo de vacunación en ratas con GST y el adyuvante completo de Freund fue un fracaso (26). Sin embargo, las ovejas que recibieron múltiples vacunaciones con la GST nativa con FCA, mostraron una reducción de la carga parasitaria del 57%, y fue la primera demostración de protección en ovejas contra *F. hepatica* en la que se empleó un antígeno definido (45).

Un extenso grupo de ensayos se realizaron en los años 90, pero no era posible reproducir una respuesta protectora a pesar de usar el mismo protocolo para la vacunación (48). Recientemente, De Bont y col. (2003) en el Institut Pasteur de Lille realizaron la inmunización con proteínas GST recombinantes de *S.bovis* con hidróxido de aluminio, Quil A, o FCA como adyuvante y no obtuvo ninguna protección en ganados contra *F. hepatica*.

Cisteíno proteasas (catepsinas)

Las cisteíno proteasas abarcan una amplia familia en las que se incluyen las catepsinas L y B (CatB y CatL) y se han estudiado por su relación con la invasión del parásito, alimentación, evasión de la respuesta inmune y potencial como candidato vacunal (30). Estas se encuentran mayoritariamente en los productos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* y pueden ser fácilmente colectadas *in vitro* (46,48). Las secuencias que codifican para CatL y CatB han sido aisladas a partir de librerías de cADN de *Fasciola hepatica* adultas (28, 12).

La catepsina L se ha propuesto para desempeñar un número de papeles funcionales en los que se ubican promover la penetración en tejidos finos (27), la adquisición de nutriente (19), la producción de huevo, y la evasión de la respuesta inmune por escisión de la región de Fc de las inmunoglobulinas del hospedero (3).

Las proteínas secretadas por *F. hepatica* han sido caracterizadas por diferentes laboratorios. Todos los estudios concuerdan en que las proteínas predominantes en los estadios adultos son enzimas cisteíno proteasas homólogas a la CatL lisosomal de mamífero (20); mientras que la CatB es la predominante en los estadios juveniles (51, 32). Por ser mayoritarias y estar involucradas en tan importantes funciones biológicas son consideradas promisorios candidatos antigénicos y terapéuticos.

La eficacia de la catepsina L como vacuna en ovejas se demostró por primera vez por Wijffels en 1994. La vacuna se suministró dos veces con el adyuvante completo de Freund (120 y 90 µg en un intervalo de cuatro semanas). La

carga parasitaria no varió significativamente con relación a los animales no vacunados; sin embargo, hubo una reducción al 70% en la eliminación de huevos. Además, los huevos producidos por estos parásitos tenían una reducción al 80% de su viabilidad. En un segundo experimento en ovejas se obtuvo el significativo valor de 52% de reducción huevos en las heces.

Por electroforesis bidimensional se demostró que la CatL tiene naturaleza heterogénea (50), sin embargo se han caracterizado dos formas importantes: CatL1 y CatL2 (46, 14). Estas dos enzimas tienen distintas características fisicoquímicas (tamaño molecular, pH óptimo) y especificidad de sustrato (14).

La eficacia de la CatL1 se demostró en el ganado (10). En este ensayo, grupos de tres o cuatro animales recibieron tres dosis de 10, 20, 50 o 200 µg de CatL1 purificada y formulada con el adyuvante de Freund. Todos los grupos demostraron una significativa protección con relación a los controles no vacunados (52.5, 54.9, 69.5 y 38.2%). Cuando todos los animales vacunados se trataron como un solo grupo y comparados con los controles, se observó una protección significativa ($p < 0.05$) con una media del 57.7%. En un segundo ensayo, con un protocolo similar se obtuvo un 42.5% de la protección y un 50% de reducción en la viabilidad de huevos (10).

La eficacia de CatL1 y CatL2, solas o con la hemoglobina de *Fasciola hepática* también se probó en el ganado (38). Ambas confirieron protección con el valor más alto de 72% para la CatL2 en combinación con la hemoglobina. Por otra parte, la CatL1 indujo reducción en la fecundación de los huevos.

Posteriormente, Dalton y col. (2003b), en una serie de ensayos en ovejas y ganado con CatL1 y CatL2 nativas purificadas; demostraron que estas enzimas podían inducir protección, con valores del 33 al 79% al reto con metacercarias. Además, tenían un potente efecto inhibitorio de la anti-embriogénesis y la fecundación, que podrían bloquear la transmisión del parásito.

Estas cisteíno proteasas son eficientes candidatos vacunales porque además de poseer el marcador de disminuir la carga parasitaria, tienen efectos sobre la fecundación y disminuyen los niveles de huevos eliminados en las heces tanto en ovejas como en el ganado (37).

La CatB de los estadios juveniles de *Fasciola hepática* ha sido clonada y expresada en levadura y se ha comprobado su acción antigénica en ratas vacunadas (32). Tanto la CatL como la CatB han sido empleadas como vacunas ADN (2), son inmunogénicas en ovejas y en ratón, y se muestran como promisorios candidatos vacunales.

Leucin aminopeptidasa

La leucin aminopeptidasa (LAP) es una metaloproteasa de *Fasciola hepatica* capaz de inducir anticuerpos neutralizantes y una protección del 89% (40) contra la fascioliasis en oveja. Aunque la protección más alta fue encontrada con LAP sola, también se emplearon cócteles con CatL1, CatL2 y LAP. Los porcentajes de protección en presencia de LAP fueron superiores a los inducidos por CatL1 o CatL2 de forma aislada. El daño en el hígado estuvo disminuido, según los niveles de la enzima hepática gamma glutamil transferas referente a todos los grupos vacunados.

En estos momentos este grupo cuenta con la enzima funcional recombinante. Han confirmado por MALDI-TOF que la enzima clonada es idéntica a la enzima purificada por cromatografía de afinidad e inoculada a las ovejas. Su potencial se comprobó en conejos con un 81% de protección. La vacuna basada en la enzima ha sido patentada y están por comenzar los ensayos clínicos en rumiantes (C. Carmona, comunicación personal).

Proteínas del tipo saponinas

Espino y Hillyer (2003) aislaron el producto de la expresión de 436pb procedentes de una librería cADN de *Fasciola hepática* adulto reconocido por el suero de un conejo infectado con *Fasciola* por 4 semanas. El marco de lectura abierto codificó para un polipéptido de 101 aminoácido, 11.5 kDa de peso molecular y un punto isoeléctrico de 4.63.

La secuencia de aminoácidos deducida reveló una homología significativa con una lisina-NK, proteína del tipo saponina de *Fasciola hepatica* denotada como FhSAP-1 (42). Por esta razón, esta proteína nuevamente descrita se identificó como FhSAP-2. Los conejos vacunados con FhSAP-2 desarrollaron 81.2% menos duelas que los controles. Por otra parte, en los animales vacunados hubo una disminución de la cantidad de huevos presentes en las heces y en la bilis, del 83.8% y del 73% respectivamente.

Los conejos vacunados también tenían una significativa disminución de los niveles del parásito en las heces y en la bilis con relación a los controles. La evaluación de las lesiones macroscópicas del hígado reveló que los conejos vacunados con rFhSAP-2 tenían lesiones menos severas. Estos resultados apoyan la hipótesis que esta nueva proteína rFhSAP-2 tiene potencial inmunoprolifáctico contra la fascioliasis en conejos incluyendo efectos de la contra fecundidad y de actividad antipatológica (16).

Conclusiones

El control de la fascioliasis mediante la vacunación parece ser una meta alcanzable. El valor promedio de la reducción de la carga parasitaria en ganado bovino con el empleo de diversos inmunógenos está en el rango del

43-72%, por lo que surge la duda de si tales niveles son comercialmente útiles (48). Las pérdidas económicas en rumiantes debidas a la fascioliasis resultan en la reducción del aumento de peso, la producción de leche y/o la producción de lana, que son determinadas por la intensidad de la infección. En este sentido, las pérdidas significativas de peso se observan solamente con cargas de duelas de 30-80, lo que sugiere que una vacuna con eficacia de solo el 43% podría disminuir la carga en los animales infestados a 53-140 duelas. Las cargas parasitarias reportadas en diversos países están en la gama de 4-140 duelas; en el Reino Unido por ejemplo, solo el 3% del ganado tuvo más de 50 duelas en sus hígados (48). Estos reportes indican que las actuales formulaciones vacunales son productos potencialmente viables.

Recomendaciones

Aumentar la eficacia de las actuales formulaciones vacunales para su uso como herramientas en una estrategia combinada de control y erradicación de *Fasciola hepatica*.

Implementar otras líneas de investigación como el diseño racional de fármacos, efectivos contra los estadios juveniles, que soporten las estrategias de control combinadas.

Referencias

1. Aban JL. A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/BL mice from challenge infection with *Schistosoma bovis*. *Vet Parasitol.* 1999; 83(2):107-21.
2. Almeida MS, Torloni H, Lee-Ho P, Vilar MM, Taumaturgo N, Simpson AJ, et al. Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. *Parasite Immunology.* 2003; 25:135–137.
3. Berasain P, Carmona C, Frangione B, Dalton JP, Goni, F. *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Exp Parasitol.* 2000; 94: 99–110.
4. Brophy PM, Pritchard DI. Parasitic helminth glutathione s-transferases: an update on their potential as target for immuno and chemotherapy. *Exp Parasitology.* 1994; 79: 89-96.
5. Brophy PM, Crowley P, Barrett J. Detoxification reactions of *Fasciola hepatica* cytosolic glutathione transferases. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; 39:155–162.
6. Carballeira NM, Cruz GV, Hillyer GV. Fatty acids bound to *Fasciola hepatica* 12 kDa fatty acid-binding proteins, a candidate vaccine, differ from fatty acids in extracts of adult flukes. *Lipids.* 2003; 7(7):769-72.
7. Casanueva, R. Immunoprophylaxis against *Fasciola hepatica* in rabbits using a recombinant Fh15 fatty acid-binding protein. *J Parasitol.* 2001.3(3):697-700.

8. Craig TM, Wikse SE. Control programs for internal parasites of beef cattle in the Southern United States. *The Cattlemen*. 1995 October;66-79.
9. Creaney J, Wijffels GL, Sexton JL, Sandeman RM, Spithill TW, Parsons JC. *Fasciola hepatica*: localization of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile fluke. *Ex Parasitol*. 1995;81:106–116.
10. Dalton JP. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun*. 1996; 64:5066–5074.
11. Dalton JP, Brindley PJ, Knox DP, Brady CP, Hotez PJ, Donnelly S, et al. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int J Parasitol*. Mayo, 2003a;33:621-40.
12. Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, et al. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology*. 2003b;33: 1173–1181.
13. De Bont J, Cleerebout E, Riveau G, Schacht AM, Smets K, Conder G, et al. Failure of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental *Fasciola hepatica* infection. *Veterinary Parasitology*. 2003;113: 135–144.
14. Dowd AJ. Purification of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur J Biochem*. 1994;223:91–98
15. Espino AM, Hillyer GV. Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family. *J Parasitol*. 2003;89:545–552.
16. Espino AM, Hillyer GV. A novel *Fasciola hepatica* saposinlike recombinant protein with immunoprophylactic potential. *J Parasitol*. 2004;90:876–879.
17. Espino AM, Marcet R, Finlay CM. *Fasciola hepatica*: detection of antigenemia and coproantigens in experimentally infected rats. *Exp Parasitol*. 1997;85:117-20.
18. Espino AM, Rodríguez JR, Hillyer GV. Isolation and immunological characterization of fatty acid binding protein isoforms from *Fasciola hepatica*. *J Parasitol*. 2001;87: 1028–1033.
19. Halton DW. Observations on the nutrition of digenetic trematodes. *Parasitology*. 1967;57:639–660.
20. Heussler VT, Dobbelaere DA. Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1994;64:11–23.
21. Hillyer, GV. *Schistosoma mansoni*: acquired immunity in mice and hamsters using antigens of *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol*. 1977;42:348–355.
22. Hillyer, GV. *Schistosoma mansoni*: reduced worm burdens in mice immunized with isolated *Fasciola hepatica* antigens. *Exp Parasitol*. 1979;48:287–295.
23. Hillyer, GV. Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *Am J Trop Med Hyg*. 1987;37:363–369.

24. Hillyer, GV. Successful vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection with a purified 12 kD *Fasciola hepatica* cross-reactive antigen. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38: 103–110.
25. Hillyer GV. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and shistosomiasis. *J Helminthology.* 2005;79:241-247.
26. Howell NJ, Board PG, Boray JC. Glutathione S-transferase in *Fasciola hepatica*. *J Parasitol.* 1988;74:717-718.
27. Howell RM. Collagenase activity of immature *Fasciola hepatica*. *Nature.* 1966;209: 713–714.
28. Irving JA, Spithill TW, Pike RN, Whisstock JC, Smooker PM. The Evolution of Enzyme Specificity in *Fasciola* spp. *J Mol Evol.* 2003;57: 1–15.
29. Kennedy NJ, Spithill TW, Tennent J, Word PR, Piedrafita D. DNA vaccines in sheep: CTLA-4 mediated targeting and CpG motifs enhance immunogenicity in a DNA prime/protein boost strategy. *Vaccine.* 2006;24:970–979.
30. Knox DP. Parasite enzymes and the control of round and fluke infestation in domestic animals. *British Veterinary Journal.* 1994;150:319-337.
31. Kourí P. Diagnóstico, epidemiología y profilaxis de la fasciolosis humana en Cuba. *Rev Cuba Med Trop y Parasitol.* 1948;4:2-12.
32. Law RH, Smooker PM, Irving JA, Piedra D, Ponting R, Kennedy NJ, et al. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infect Immun.* 2003;71(12):6921–6932.
33. Martínez AR, Nogal JJ, Lopez AJ, Ramajo V, Oleaga A, Manga G, et al. Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Veterinary Parasitology.* 2004;126:287–298.
34. Meyer F, Meyer H, Bueding E. Lipid metabolism in the parasitic and free living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1970;210:257-266.
35. Millan JC, Mull R, Freise S, Richter J. The efficacy and tolerability of Triclabendazole in Cuban patients with latent and chronic *Fasciola hepatica* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63:264-269.
36. Moser D. A 14 kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *J Biol Chem.* 1991;266:8447–8454.
37. Mulcahy G, Dalton JP. Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res Vet Sci.* 2001;70:83–86.
38. Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, et al. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine.* 1998;16:93–99.
39. Muro A. *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits, with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol.* 1997;69:219–229.

40. Piacenza O, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infection and Immunity*. 1999;67:1954–1961.
41. Ramajo V. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with homologous fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol*. 2001;97(1):35-46.
42. Reed MB, Strugnell RA, Pannacio M, Spithill TW. A novel member of the NK-lysin protein family is developmentally regulated and secreted by *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2000;105:297–303.
43. Rodríguez P. *Fasciola hepatica*: molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein. *Exp Parasitol*. 1992;74:400–407.
44. Rodríguez R, Torrado L, Pérez D, Morey F. Hematoma subscapular del hígado. Manifestación en tres pacientes con fasciolosis hepática. *Rev Enf Inf y Micro*. 2001; 21(3):87- 90.
45. Sexton JL, Milney AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels D, Thompson C, et al. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Journal of Immunology*. 1990;145:3905-3910.
46. Smith AM. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;62:1–8.
47. Spithill TW, Dalton JP. Progress in the development of liver fluke vaccines. *Parasitology Today*. 1998;14:224–228.
48. Spithill TW, Smooker PM, Sexton JL, Bozas E, Nirrusib CS, Creany J, et al. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: Dalton JP, editor. Fasciolosis. Ireland: Wallingford; 1999. p. 377–410. (N. del T.: En español: En:)
49. Verdecia F, Ramirez W, Antunez G. Alerta sobre vulnerabilidad por fasciolosis. *Revista electronica Granma Ciencia* [serial on the internet]. 2001 Apr [cited Aug 12 2007];5(1):[about 2 p.]. Available from:
50. http://www.grciencia.granma.inf.cu/vol5/no.1/resumen/2001_05_01_r01.htm
51. (N. del T.: En español: [serie en internet]. [citado 12 de Ago 2007]; [aprox. 2 p]. Disponible en:)
52. Wijffels GL. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Exp Parasitol*. 1994;78:132–148.
53. Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM, Spithill TW. *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol*. 1998;88(2):85.