



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
ESCUELA DE POSTGRADO



DOCTORADO EN CIENCIAS

Mención: Ciencias Veterinarias

TESIS

**Caracterización molecular de las saposinas de *Fasciola hepatica* en
cepas de distinto origen y sensibilidad al triclabendazol**

Por:

Marco Antonio Rivera Jacinto

Asesor:

Pedro Luis Ortiz Oblitas

Cajamarca – Perú

2016

COPYRIGHT © 2016 by
MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

Todos los derechos reservados



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
ESCUELA DE POSTGRADO



DOCTORADO EN CIENCIAS
Mención: Ciencias Veterinarias

TESIS

**Caracterización molecular de las saposinas de *Fasciola hepatica* en
cepas de distinto origen y sensibilidad al triclabendazol**

Por: Marco Antonio Rivera Jacinto

Comité Científico Evaluador:

Dr. Corpus Cerna Cabrera
Miembro del Comité Científico

Dr. Carlos Rosales Loredó
Miembro del Comité Científico

Dr. Severino Torrel Pajares
Miembro del Comité Científico

Ph. D. Pedro Luis Ortiz Oblitas
Asesor

Fecha: 28 de marzo del 2016

Dedicatoria:

Este trabajo de investigación se lo dedico a mis dos pequeñas princesas, Fátima y Sofía, el motor y motivo de todo lo que emprendo desde que Dios me dio la dicha de ser su papá.

CONTENIDO

| Ítem | Página |
|---|--------|
| AGRADECIMIENTOS | vi |
| LISTA DE ABREVIACIONES | vii |
| LISTA DE TABLAS | viii |
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| RESUMEN/ABSTRACT | x |
| CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.2. Hipótesis de la investigación | 4 |
| 1.3. Objetivo general de la investigación | 4 |
| CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO | 5 |
| 2.1. La fascioliasis, su impacto en la economía y en la salud humana | 5 |
| 2.2. El proteoma de <i>Fasciola</i> spp. y el control de la fascioliasis | 7 |
| 2.3. La diversidad genética y su rol en la biología de <i>F. hepatica</i> | 9 |
| 2.4. Las SAPs: su función y utilidad inmunoproliférica y diagnóstica | 11 |
| 2.5. La biología molecular y el estudio de la diversidad genética | 17 |
| CAPÍTULO III: DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS | 21 |
| 3.1. Unidad de análisis, universo y muestra | 21 |
| 3.2. Tipo de investigación | 22 |
| 3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos | 22 |
| 3.4. Técnicas de procesamiento y análisis de los datos | 30 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 31 |
| CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 50 |
| 5.1. Conclusiones | 50 |
| 5.2. Recomendaciones | 50 |
| LISTA DE REFERENCIAS | 51 |

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ponerme los retos y darme las herramientas para enfrentarlos en cada paso que doy en mi vida profesional.

A Claudia, mi esposa, por su constante apoyo y paciencia en mis días de arduo trabajo.

Al Dr. Pedro Ortiz Oblitas, mi asesor, por su incondicional apoyo en la realización de esta tesis.

A Christian Hobán, por su importante ayuda en el laboratorio.

A Isabel Luque Pacheco, por su apoyo durante el entrenamiento en biología molecular.

A la Dra. Ana M. Espino de la Universidad de Puerto Rico por su apoyo en la concepción del proyecto y su ayuda en el análisis de los resultados.

Al Dr. José Pérez de la Universidad de Córdoba, España, por el financiamiento de mi entrenamiento en España y por toda su ayuda.

Al Dr. Hugo Solana, a Vicki Solana, a Vanessa Fernández y a Silvana Scarcella, investigadores de la Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires en Argentina, por recibirme y permitirme hacer una estancia con ellos en Tandil.

Al Dr. Terry W. Spithill del Departamento de Ciencias Agrícolas de la Universidad La Trobe, Australia por proporcionarme las cepas para este trabajo.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico e Innovación Tecnológica – FONDECYT y al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica CONCYTEC, por la subvención de mis estudios doctorales.

LISTA DE ABREVIACIONES

| | |
|-------------------|--|
| SAPs : | Proteínas tipo saposina (del inglés <i>Saposin like protein</i>) |
| FhSAP1: | Proteína tipo saposina 1 de <i>Fasciola hepatica</i> |
| FhSAP2: | Proteína tipo saposina 2 de <i>Fasciola hepatica</i> |
| GST: | Glutation S-transferasa |
| Cat-L: | Catepsina L |
| FABP: | Proteína transportadora de ácidos grasos (del inglés <i>Fatty Acid Binding Protein</i>) |
| LAP: | Leucina aminopeptidasa |
| Gp-P: | Glicoproteína P |
| TCBZ: | Triclabendazol, triclabendazole |
| PES: | Producto de excreción - secreción |
| ADN: | Desoxinucleótido de adenina, Adenosin desoxinucleótido |
| ARN: | Ribonucleótido de adenina, Adenosin ribonucleótido |
| PCR: | Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| ELISA: | Inmunoensayo ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>) |
| RAPD: | ADN polimórfico amplificado al azar |
| RFLP: | Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción |
| ITS: | Espaciador transcrito interno (del inglés, <i>Internal Transcribed Spacer</i>) |
| NCBI: | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| CLUSTAL- MAFFT | <i>CLUSTAL - Multiple Alignment using Fast Fourier Transform</i> |

LISTA DE TABLAS

| | Página |
|---|--------|
| 1. Denominación y secuencias de los <i>primers</i> empleados en el estudio..... | 26 |
| 2. Alineamiento de secuencias de nucleótidos, de la FhSAP1, de las cepas del estudio comparada con la secuencia <i>FASTA</i> de amoebapore-like de <i>F. hepatica</i> (disponible en el <i>GenBank</i> , con N° de acceso AF286903.1) en el programa BioEdit..... | 46 |
| 3. Alineamiento de secuencias de nucleótidos, de la FhSAP2, de las cepas del estudio comparada con la secuencia <i>FASTA</i> de amoebapore-like de <i>F. hepatica</i> (disponible en el <i>GenBank</i> , con N° de acceso AF286903.1) en el programa BioEdit..... | 46 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando bandas de aproximadamente 100 pb correspondientes a la FhSAP1 en cepas de <i>F. hepatica</i> de diferente origen geográfico, susceptibles y resistentes al TCBZ..... | 32 |
| 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando las bandas de 141 pb correspondientes a la FhSAP2 en cepas de <i>F. hepatica</i> de diferente origen geográfico, susceptibles y resistentes al TCBZ..... | 33 |
| 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando las bandas de FhSAP1 y FhSAP2 juntas, en cepas de <i>F. hepatica</i> de diferente origen geográfico, susceptibles y resistentes al TCBZ..... | 34 |
| 4. Cromatogramas de la FhSAP1 en cepas de <i>F. hepatica</i> de diferente origen geográfico, susceptibles y resistentes al TCBZ..... | 36 |
| 5. Cromatogramas de la FhSAP2 en cepas de <i>F. hepatica</i> de diferente origen geográfico, susceptibles y resistentes al TCBZ..... | 37 |
| 6. Alineamiento local <i>BLAST</i> de la secuencia de FhSAP2 de la cepa resistente “Cajamarca” con la colección de nucleótidos del <i>GenBank</i> | 38 |
| 7. Alineamiento por pares en <i>BLAST nucleotide</i> , de la secuencia de FhSAP1 de la cepa resistente “Cajamarca” (Cax) con cada una de las cepas australianas (Sunny Corner, Gireke y Tallangatta)..... | 40 |
| 8. Alineamiento múltiple en <i>BLAST nucleotide</i> , de la secuencia de FhSAP1 de la cepa resistente “Cajamarca” con cada una de las cepas australianas (Sunny Corner, Gireke y Tallangatta)..... | 41 |
| 9. Alineamiento por pares en <i>BLAST nucleotide</i> , de la secuencia de FhSAP2 de la cepa resistente “Cajamarca” (Cax) con cada una de las cepas australianas (Sunny Corner, Gireke y Tallangatta)..... | 42 |
| 10. Alineamiento múltiple en <i>BLAST nucleotide</i> , de la secuencia de FhSAP2 de la cepa resistente “Cajamarca” con cada una de las cepas australianas (Sunny Corner, Gireke y Tallangatta)..... | 43 |
| 11. Alineamiento múltiple en <i>CLUSTAL-MAFFT</i> de las cepas en estudio para FhSAP1..... | 47 |
| 12. Alineamiento múltiple en <i>CLUSTAL-MAFFT</i> de las cepas en estudio para FhSAP2..... | 48 |
| 13. Árbol filogenético comparativo de la FhSAP2 en las cepas de estudio usando el software TreeView (AF 286903: Amoebapore-like 2 protein)..... | 49 |

RESUMEN

La fascioliasis humana y animal causa pérdidas económicas millonarias en el mundo, esto se agrava con la resistencia del parásito al triclabendazol (TCBZ). A nivel molecular, diferentes proteínas de *Fasciola hepatica* se estudian en relación con la resistencia al TCBZ y en relación a su empleo como vacunas para una respuesta protectora en el hospedero definitivo. Entre estas proteínas están las saposinas (FhSAP1 y FhSAP2), cuyas diferencias moleculares tendrían relación con la resistencia al TCBZ o por el contrario, la falta de variabilidad favorecería su uso en diferentes áreas geográficas. El presente estudio tuvo por finalidad determinar la constitución nucleotídica de algunos segmentos de las secuencias de FhSAP1 y FhSAP2 en cepas de *F. hepatica* de distinta sensibilidad al TCBZ y procedentes de dos áreas geográficas diferentes. Para ello, se obtuvo ADN complementario mediante la técnica RT-PCR a partir del ARN mensajero extraído de 24 fasciolas adultas: seis especímenes resistentes al TCBZ y tres susceptibles, procedentes de la Universidad La Trobe (Australia), y 15 parásitos resistentes al TCBZ procedentes de Cajamarca; luego, mediante PCR convencional y el uso de cebadores específicos se amplificaron fragmentos codificantes para saposinas en todas las cepas. Los resultados del análisis de electroforesis con el GelAnalyzer muestran bandas de 100 y 141 pares de bases que pertenecen a FhSAP1 y FhSAP2, respectivamente. Los cromatogramas, con el programa FinchTV y el análisis de secuencias con BLAST y Clustal-MFFT, revelaron alta homología entre las secuencias de nucleótidos de las cepas estudiadas y que no hubo diferencias significativas en la conformación de los aminoácidos al ser comparadas con las cepas reportadas en el *Gen Bank*. Se concluye que, entre las distintas cepas estudiadas, no hay diferencias moleculares significativas en las secuencias de las saposinas FhSAP1 y FhSAP2.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, Saposinas, Triclabendazol, Reacción en Cadena de la Polimerasa.

ABSTRACT

Animal and human fascioliasis cause millions of dollars in economic losses in the world, this is exacerbated with the triclabendazole (TCBZ) resistance in *Fasciola hepatica*. At the molecular level, different proteins of *F. hepatica* are studied in relation to TCBZ resistance and in relation to their use as vaccines for a protective response in the definitive host. Among these proteins are the saposins (FhSAP1 and FhSAP2) whose molecular differences would be related to TCBZ resistance or conversely, lack of variability favor its use in different geographical areas. The present study was designed to determine the nucleotide constitution of some segments of the FhSAP1 and FhSAP2 sequences in *F. hepatica* strains from different sensitivity TCBZ and from two different geographical areas. To make this, complementary DNA was obtained by RT-PCR technique from messenger RNA extracted from 24 adult flukes: Six specimens resistant to TCBZ and three susceptible one, from La Trobe University (Australia), and 15 parasites resistant to TCBZ from Cajamarca; then, by conventional PCR and using specific primers fragments coding for saposins in all strains were amplified. The results of the electrophoresis analysis show bands of 100 and 141 base pairs and belonging to FhSAP1 and FhSAP2, respectively. The chromatograms, with FinchTV program and sequence analysis with BLAST and Clustal-MFFT revealed high homology between the nucleotide sequences of the strains studied and no significant differences in conformation of amino acids when compared to the strains reported in the Gen Bank. We concluded that among the different strains studied, no significant molecular differences in the sequences of the FhSAP1 and FhSAP2 saposins.

Keywords: *Fasciola hepatica*, Saposins, Triclabendazole, Polymerase Chain Reaction.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La fascioliasis producida por *Fasciola* spp. es una enfermedad que afecta a una gran variedad de animales mamíferos incluyendo al ser humano (1;2). Las pérdidas económicas generadas por esta enfermedad al sector agropecuario del mundo son millonarias (3;4), y en el Perú, en un subestimado de las pérdidas reales, estaría en 50 millones de dólares/año (5), costos que se elevarían considerablemente con la resistencia del parásito a los fasciolicidas, como es el caso de la confirmada resistencia al triclabendazol (TCBZ) en el ganado vacuno en Cajamarca (6).

En el Perú, la infección humana por *Fasciola hepatica* ha sido diagnosticada en casi toda la región andina, desde los valles interandinos hasta el altiplano (7;8), en áreas urbanas cerca a Lima y en otros lugares de la costa (9), constituyéndose en un serio problema de salud pública. Cajamarca, clasificada como región hiperendémica, es una de las 17 regiones del país con fascioliasis humana (10;11), y sus características ambientales hacen sospechar de una gran cantidad de casos subclínicos sin diagnosticar (12;13). La infección humana sólo en la región andina de nuestro país ha alcanzado prevalencias de hasta 72% (14), con un panorama mundial que se agrava con el reporte de los primeros casos humanos de aparente resistencia al TCBZ, inclusive en el Perú (15-17).

Las estrategias para el control de la fascioliasis, tanto en el hombre como en los animales, están centradas en el desarrollo de vacunas como propósito fundamental y común, a partir de los productos de excreción - secreción (PES) del parásito, muchos de los cuales han probado ser capaces de estimular una respuesta inmunoprotectora en el hospedero definitivo (1;18;19). Entre los antígenos con este potencial están las proteínas tipo saposina de *F. hepatica* (FhSAPs), cuyas funciones importantes en el metabolismo del parásito juvenil y del adulto, las hacen potencialmente útiles en la inmunoprolifaxis y en el serodiagnóstico, al ser específicas de *Fasciola* (20-24).

Se ha teorizado que las variaciones genéticas poblacionales entre parásitos de diversas regiones ecogeográficas podría estar asociada con la resistencia a antihelmínticos (25), y por tanto, tendría importantes implicancias sobre la efectividad de los planes de prevención y control de la fascioliasis humana y/o animal; del mismo modo, frente al gran potencial que tienen los PES, algunos estudios han establecido que pequeñas variaciones poblacionales genómicas o proteómicas en algunos de estos antígenos tendrían implicancias más que funcionales para el parásito (26;27).

Existen reportes de variaciones regionales en proteínas tipo catepsinas, en trabajos en los que además se discute la posibilidad de que una única sustitución en la cadena de aminoácidos, por ejemplo de la catepsina L (Cat-L), puede afectar la especificidad de la enzima por el substrato (26;27). También hay estudios en los que se ha establecido diferencias moleculares entre cepas susceptibles y resistentes a TCBZ en cuanto a sus glicoproteínas (glicoproteína P, Gp-P) (28) o en cuanto a sus isoenzimas

Glutation S-Transferasas (GST) (29); sin embargo, no hay reportes acerca de variaciones genéticas en las FhSAPs en especímenes provenientes de áreas geográficas diferentes, ni de las diferencias que podrían presentar en relación a cepas de distinta sensibilidad al TCBZ.

Debido al vacío teórico existente y a la importancia que han adquirido las FhSAPs, en este estudio se pretendió determinar las variaciones genéticas que podrían presentar estas proteínas en cepas susceptibles y resistentes al TCBZ, y al mismo tiempo que provienen de dos áreas geográficas diferentes.

La investigación se enfocó en aspectos teórico-metodológicos a fin de determinar diferencias en las secuencias de las FhSAPs expresadas en cepas de diferente origen geográfico y distinta sensibilidad al TCBZ, comparadas a nivel de sus cadenas de nucleótidos y/o de los aminoácidos proteína-codificantes. La resistencia al TCBZ, de las cepas empleadas en este estudio, ha sido comprobada en estudios previos (6;30). mediante pruebas de eficacia controlada y estandarizada, en las que se empleó como tratamiento las dosis de TCBZ recomendadas (31). Las fasciolas adultas del estudio fueron obtenidas de la Universidad Nacional de Cajamarca (Perú) y de la Universidad La Trobe (Australia). Se extrajo el ARN total de los especímenes, luego se obtuvo ADN complementario que fue amplificado con cebadores (*primers*) específicos para las proteínas de interés, la FhSAP1 y la FhSAP2, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, técnica molecular conocida como PCR. Finalmente, los productos de PCR se secuenciaron y fueron analizados con softwares de alineamiento local y múltiple.

En este punto, es oportuno indicar que una de las limitaciones más importantes de este estudio tuvo que ver con la dificultad actual para implementar protocolos estándar de purificación específica de saposinas (FhSAP1 y FhSAP2), lo que restringe realizar estudios genómicos y proteómicos completos; en este sentido, el estudio ha dependido fundamentalmente de la calidad del ARN total extraído de cada parásito. Además, una limitante adicional ha sido que no se ha evaluado la expresión cuantitativa de estas proteínas, ya que esto no es posible mediante la técnica de PCR convencional sino que requiere de equipos más sofisticados, como el que emplea la PCR cuantitativa (*Real Time PCR*). Adicionalmente, el acceso a los servicios de secuenciamiento sigue siendo una limitante muy importante en nuestro país, sumado a los altos costos de este servicio en el mercado internacional.

1.2. Hipótesis de la investigación

Las saposinas de *F. hepatica*, en cepas susceptibles y resistentes al TCBZ y/o que provienen de áreas geográficas distintas, no presentan variaciones moleculares al comparar la cadena de sus nucleótidos y las secuencias de sus aminoácidos.

1.3. Objetivo general de la investigación

Comparar las secuencias de nucleótidos de las saposinas FhSAP1 y FhSAP2 en cepas de *F. hepatica* susceptibles y resistentes al TCBZ, provenientes de áreas geográficas distintas, a fin de determinar la existencia o no de variabilidad molecular entre ellas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. La fascioliasis, su impacto en la economía y en la salud humana

La fascioliasis es una enfermedad zoonótica causada por helmintos trematodos de las especies *F. hepatica* y *F. gigantica*, que afecta a una amplia variedad de animales de interés económico, principalmente rumiantes (bovino, ovino y caprino), así como a otras especies domésticas y silvestres del mismo ecosistema (equinos, porcinos) y accidentalmente al ser humano (1;2).

Dentro de las enfermedades parasitarias del ganado, la fascioliasis es una de las de mayor impacto económico. Las millonarias pérdidas financieras en el sector agropecuario originadas por la infección masiva por *Fasciola* spp., suman pérdidas en producción lechera (de 20% a 80%), cantidad y calidad de la carne (de 8% a 50%), disminución de la fertilidad del ganado, muerte, uso de antihelmínticos, etc. (3;32), pérdidas que llegarían a los 2000 millones de dólares anuales, en el mundo (4;33). En Suiza por ejemplo, se ha estimado que el promedio de pérdidas por fascioliasis bovina llegaría a 69 millones de dólares anuales (34); en Turquía se estimó en cerca de 43 millones (35) y en el Reino Unido el promedio sería de 36 millones (5). En Latinoamérica, sólo en dos estados del Brasil las pérdidas estarían por encima de los

132 000 dólares anuales (3) mientras que en Cuba, según un estudio de cuatro años las pérdidas se estimaron en más de medio millón de dólares (32). En el Perú, la pérdida económica ganadera anual estaría por los 50 millones de dólares, estimada según la prevalencia de la infección y los decomisos de hígados de vacunos en mataderos (5).

En cuanto a la enfermedad en humanos, la fascioliasis ha adquirido un carácter cosmopolita debido a su amplia distribución mundial (4;36); al respecto, algunos estudios han estimado que hasta 17 millones de personas en el mundo tendrían fascioliasis (37) y más de 91 millones estarían en riesgo de infectarse con el parásito (38). Estimaciones más recientes y conservadoras indican que la carga de infectados estaría muy cerca de los 2.65 millones de personas (39), y que el 50% de estos estarían en Sudamérica (entre Bolivia, Ecuador y Perú). El parásito ha sido reportado en todos los países del continente americano, y en el Perú, las más altas prevalencias de fascioliasis humana (como también la animal) están en la sierra (de hasta 72%), principalmente en los valles andinos de Cajamarca, Junín, Cusco y Arequipa (10;14;40), así como, en la altiplanicie de la cuenca del Lago Titicaca (41), principalmente en la zona rural agrícola, aunque en la actualidad hay un número creciente de casos no autóctonos en otras ciudades debido al consumo de vegetales contaminados traídos de zonas endémicas (5;9). Pese a las estadísticas mundiales, la fascioliasis humana es una enfermedad desatendida por la Organización Mundial de la Salud (2;42;43), condición relacionada con la falta de vacunas para su prevención (44) y con el hecho de que, a la fecha, no se han reportado muertes humanas asociadas directamente con la enfermedad (4).

2.2. El proteoma de *Fasciola* spp. y el control de la fascioliasis

El proteoma es el término que agrupa a todas las proteínas codificadas en el material genético de una célula (genoma), las mismas que son expresadas por instrucciones del genoma en un estado de desarrollo en particular o bajo ciertas condiciones fisiológicas, determinando el fenotipo biológico de un organismo (45). El estudio del proteoma (proteómica), ofrece nuevas herramientas para el estudio de los parásitos y las enfermedades que producen, ya que estas proteínas son el blanco para la mayoría de agentes terapéuticos (46), así como la materia prima para la producción de vacunas (2).

El control futuro de la infección humana y animal depende, al parecer, de moléculas producidas por el parásito, conocidas comúnmente como PES. Uno de los primeros estudios proteómicos en helmintos describió la naturaleza de los PES de *F. hepatica* identificando 29 proteínas mediante electroforesis en gel de dos dimensiones (47); varios ensayos vacunales han empleado estos productos, en sus formas natural o recombinantes, en el desarrollo de inmunógenos que en muchos casos han estimulado muy buena respuesta en el hospedero definitivo (1;48). Entre los antígenos con este potencial están las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP, del inglés *Fatty Acid Binding Protein*), leucina aminopeptidasas (LAP), cisteína proteasas del tipo catepsinas (Cat-L), GST, y proteínas tipo saposinas (SAP, *Saposin-like protein*) (18;22;49-54). Todas estas moléculas pertenecen al proteoma del parásito adulto (proteínas), son PES con actividad enzimática (secretoma), o pertenecen en el mejor de los casos al proteoma de estadios juveniles del parásito o de la fase inicial de la

infección (2;55-57). Recientemente se han reportado además que algunas de las moléculas, como la ferritina y la FhSAP2, tienen localización y expresión diferencial según el estadio evolutivo de *F. hepatica* (58;59).

Además de su potencial vacunal, el secretoma de *F. hepatica* tiene importantes funciones metabólicas y por tanto es potencialmente útil en zonas endémicas, ya que sus componentes pueden emplearse en el inmunodiagnóstico (22;23;27;60). Asimismo, el análisis subproteómico de los principales sistemas de detoxificación en *F. hepatica* ha contribuido a mejorar en algo la comprensión de los mecanismos de resistencia a los antihelmínticos y a otros compuestos tóxicos para el parásito (61), como es el caso de la actividad diferencial de la isoenzimas GST-*mu* en cepas resistentes al TCBZ (62). Así, la manifestación del fenómeno de resistencia al TCBZ resulta ser una respuesta multienzimática que involucraría a más de una ruta metabólica, probablemente más de una de las proteínas o PES podrían estar involucradas en este fenómeno (63;64).

En cuanto al secretoma y las proteínas de la superficie del tegumento, aún no se conoce de estudios completos a este nivel para *F. hepatica*, debido probablemente a la falta de protocolos y/o técnicas estandarizadas y adecuadas para ello, aunque el número de proteínas analizadas ha ido creciendo exponencialmente (60), sobre todo por su alto potencial como blancos relevantes para vacunas y el diseño de drogas antiparasitarias (55).

2.3. La diversidad genética y su rol en la biología de *F. hepatica*

Dado el origen europeo de *F. hepatica*, todo indica que su expansión geográfica en los últimos cinco siglos es consecuencia de la colonización global europea y la exportación continua de ganado infectado a otros lugares del mundo, donde el parásito se adaptó a nuevas especies hospederas (65;66). El rango importante de hospederos mamíferos en Europa, incluyendo humanos, vacunos, ovinos, caprinos, porcinos, conejos, ciervos, búfalos, liebre, etc. (1), se amplió a hospederos a los cuales el parásito fue expuesto en recientes siglos, por ejemplo, llamas y alpacas en Sudamérica, camellos en África y canguros en Australia (67).

La diversidad genética de una especie es fundamental para enfrentar la presión selectiva ambiental y es esencial en el proceso de evolución de cualquier especie (68). Durante el ciclo biológico de *Fasciola*, dentro o fuera de los hospederos, el parásito es expuesto a diversas condiciones ambientales que han influido en la diversidad genética de estos trematodos y por consiguiente en su adaptabilidad a esa diversidad de hospederos y ambientes (65). Por ejemplo, el miracidio y el esporocisto pasan por varios ambientes expuestos a presiones ambientales distintas incluyendo las del hospedero molusco; dentro de los hospederos mamíferos hay mayores diferencias entre los ambientes al cual el trematodo es expuesto, como el entorno surfactante del conducto biliar, la viscosidad y presión de la sangre, etc., ambientes completamente diferentes al ambiente del tracto gastrointestinal, el peritoneo o el parénquima hepático (69), incluso el ambiente es diferente dependiendo de la respuesta inmune del hospedero (1;70).

Diversos estudios han demostrado el alto nivel de polimorfismo en el genoma de *F. hepatica*, con variabilidad genética interespecie, intraespecie e incluso intra-individuo, en un mismo hospedero animal (71;72). Este alto grado de variabilidad génica resulta válido para postular que dicho polimorfismo le otorga mayor capacidad de adaptabilidad frente al hospedero como también al medio ambiente (70). Es decir, la existencia de diferentes poblaciones genéticamente distintas dentro de la especie *F. hepatica*, podría permitir que, frente a cualquier presión de selección, ya sea natural o artificial (por ejemplo por el uso de fasciolicidas y/o medidas de control), una o varias poblaciones sean capaces de resistir o adaptarse a dicha presión selectiva (72;73). Es probable entonces que la gran diversidad de proteínas secretadas por *F. hepatica* adulto y en estados inmaduros tenga mucho que ver con la diversidad de hospederos a los que parasita y con la diversidad de ambientes y tejidos que el parásito debe enfrentar hasta instalarse en el conducto biliar.

La demostrada variabilidad genética de los trematodos hepáticos debería ser tomada en cuenta en los prospectos de tratamientos y vacunas, debido a que algunas variantes pueden ser capaces de escapar del sistema inmune del hospedero y/o del tratamiento (71). Para estos parásitos, además de contender con factores potencialmente dañinos como lo es la bilis, en el caso de tratamiento de su hospedero deben también enfrentar la acción de las moléculas antihelmínticas muchas veces exacerbada por la misma bilis. Varias de estas proteínas han mostrado proteger al parásito de la respuesta celular del hospedero (2).

Diferencias regionales en el secretoma de *F. hepatica*, como las mostradas en Cat-L1 son un reflejo de la diversidad genética encontrada dentro de las poblaciones (68). Por un lado, estas diferencias en los residuos de aminoácidos puede poner en peligro los test de diagnóstico serológico en desarrollo, porque siendo importantes las variaciones pueden no tener la misma especificidad y sensibilidad en cada región; o poner en duda los ensayos vacunales porque las diferencias pueden estimular respuestas diferentes e inespecíficas (26;27;74).

A pesar de la escasa información en relación al mecanismo de resistencia al TCBZ y la falta de un marcador genético para este fenotipo, se puede inferir, a partir de estudios análogos en nematodos, que la respuesta frente a la presión ambiental diferencial en el hospedero o en la selección de los trematodos resistentes después del uso antihelmíntico, puede ser más rápida si las infra-poblaciones (es decir, los trematodos contenidos dentro de un hospedero como individuo) que intervienen son genéticamente diversas (75). Finalmente, un mecanismo para eliminar la droga por eflujo involucraría diferencias importantes (como el cambio de una serina por arginina en el residuo 1144), en los alelos de la Gp-P transportadora (28), habiéndoselas hallado sólo en cepas TCBZ-resistentes y no en las susceptibles.

2.4. Las SAPs: su función y utilidad inmunoproláctica y diagnóstica

Las SAPs pertenecen a una familia de diversas proteínas que interaccionan con lípidos de las membranas celulares; tienen diferentes funciones celulares entendidas sólo en parte pero al parecer esenciales. Su existencia se conserva en organismos

filogenéticamente muy distantes, desde protozoos hasta mamíferos, y con notable variabilidad en sus secuencias; no se les conoce un mecanismo común de acción y sólo algunos principios compartidos (76-79). Considerando que la interacción con lípidos es la base de sus funciones, las SAPs se definen a menudo por sus patrones de interacción con distintos lípidos aunque sin evidencia suficiente para establecer con claridad su función *in vivo*; sin embargo, dado que la caracterización *in vitro* de la mayor parte de proteínas empleadas como antígenos sugiere función antimicrobiana, estas podrían ser importantes también en resistencia antihelmíntica (77).

En *Fasciola* spp. hay cinco isoformas de saposinas reportadas, FgSAP1, FgSAP2 y FgSAP3 en *F. gigantica* (23) y FhSAP1 y FhSAP2 en *F. hepatica* (24;80). Las SAP1 son expresadas principalmente en estados inmaduros del parásito mientras que las otras dos son abundantes en estados juveniles y adultos (79). La SAP2 de *F. hepatica* (FhSAP2), un polipéptido de 11.5 kDa, es uno de los PES con un rol muy importante en el proceso digestivo del parásito en sinergia con otras proteasas como Cat-L y LAP (22;81;82), habiéndose demostrado que su forma recombinante es capaz de lisar eritrocitos y leucocitos mononucleares (80), para la alimentación del trematodo; esto la hace un antígeno relevante en los estudios que buscan obtener una vacuna efectiva y sistemas de diagnóstico específicos y sensibles.

Numerosos antígenos y sistemas de prueba han sido descritos para la detección de la infección en vacunos, entre ellas las pruebas ELISA, que emplean antígenos crudos o parcialmente purificados con muy buena sensibilidad (83), pero debido a la

existencia de antígenos comunes entre los helmintos el punto débil de la prueba ha sido su baja especificidad. Además, la inmunogenicidad de muchas de estas proteínas ha mostrado ser muy variable en vacunos, ovejas y humanos (84). Por su parte, la FhSAP2 provoca una fuerte respuesta por anticuerpos durante la infección activa (85) y en su forma recombinante ha sido empleada en un ELISA para la detección de anticuerpos en fascioliasis humana crónica con sensibilidad de 96,5% y especificidad de 97,6% (53). También se han ensayado el empleo de anticuerpos monoclonales contra antígenos recombinantes para SAP2 de *F. gigantica* (rFgSAP2) hallándose una alta especificidad (79). En ambos casos, el empleo de la SAP tipo 2 parece ser una alternativa importante para el inmunodiagnóstico de fascioliasis humana y animal, y un método para *screening* en áreas endémicas. También se ha investigado el empleo de una vacuna con ADN complementario construido a partir de FhSAP2, la respuesta inmune inducida por este constructo de ADN mostró más eficiencia que el antígeno recombinante al inducir protección en ratones contra la infección subsiguiente con metacercarias de *F. hepatica* (54).

A la fecha se han reportado dos saposinas para *F. hepatica*, la FhSAP1 (24;86) y la FhSAP2 (22;80). Varios estudios señalan que estas enzimas están entre los mejores candidatos junto con algunas catepsinas (Cat-L1 y Cat-L2), para obtener vacunas y kit diagnósticos de sensibilidad y especificidad importantes (20;21;54); sin embargo, no hemos hallado estudios en los que se evalúe diferencias genéticas o proteómicas de expresión, por ejemplo, entre cepas resistentes o susceptibles a antihelmínticos, o de diferentes áreas geográficas como los hay en Cat-L.

Aun cuando varios investigadores, que emplearon catepsinas para el diagnóstico de fascioliasis animal y humana, no revelaron reacciones cruzadas sino por el contrario, alta especificidad y sensibilidad en las técnicas de ELISA (83;87), uno de los primeros estudios que refieren diferencias regionales entre los PES potencialmente utilizables como antígenos para diagnóstico fue descrito en Cat-L1 de *F. hepatica* (68). En otro trabajo, la Cat-L1 resultó ser una proteína inmunogénica en bovinos, ovejas y ratas, pero debido a su expresión en diversos helmintos la molécula completa no fue considerada como herramienta diagnóstica prometedora; frente a lo cual se seleccionaron algunos epítomos de Cat-L1 específicos de *F. hepatica* y se preparó un nuevo inmunógeno con hasta tres aminoácidos modificados, mejorando su especificidad (99%), frente al 94,6% obtenido con la Cat-L1 entera (84).

Cuando se reportó la Cat-L5 de *F. hepatica*, una proteinasa nueva que mostró hasta un 80% de identidad con la Cat-L2, se demostró que la sustitución de un único aminoácido en su secuencia podía afectar sustancialmente la estructura de la enzima y su especificidad por el sustrato (26).

Por otro lado, también se ha reportado diferencias en las secuencias de cinco aminoácidos de la Cat-L2 de especímenes de *F. hepatica* de una región geográfica en Turquía (cepa Firat), al ser comparada con una cepa reportada previamente en las bases de datos (la denominada cepa Dublin). Sin embargo, el análisis de las secuencias mostró 99% de homología con la Cat-L2 de *F. hepatica* reportada en la literatura y 98% de homología con la “*cathepsin L-like protease*” de la misma especie de

trematodo. Los investigadores sugieren que el reconocimiento de diferencias regionales en Cat-L2 sería importante en la selección de antígenos para uso diagnóstico, ya que las diferencias en los cinco aminoácidos afectaban la inmunogenicidad de las proteínas involucradas (27). Esta hipótesis se basó en un estudio en el que las modificaciones en tres aminoácidos de un antígeno resultó ser la principal diferencia al evaluarse su potencial inmunodiagnóstico (84).

En base a todo esto, siempre será necesario considerar las diferencias regionales cuando se trata de seleccionar una proteína inmunogénica o un fragmento de ADN, para los estudios vacunales o para implementar los test diagnósticos, como es el caso de las SAPs de *F. hepatica*.

En cuanto a las variaciones genotípicas en SAPs, las más importantes podrían estar en el tipo de aminoácidos (p.e. 10 o más diferentes). Al compararse SAPs de *F. gigantica* con las de *F. hepatica* las variaciones en la estructura primaria son notables, y van de 89,1% a 98% entre SAP2 y SAP1 de ambas especies, respectivamente. Al comparar sólo las de *F. hepatica* la FhSAP1 tiene 58.8% de aminoácidos idénticos y 78.4% de similitud a la FhSAP2 (23). A pesar de ser tan parecidas, todas las SAPs tienen funciones y comportamientos diferentes; además, las variantes de *F. gigantica* tienen un patrón de localización y expresión diferencial distinto entre ellas y lo mismo sucede con las de *F. hepatica* (20-24;54;80;86), sin embargo, no hemos hallado estudios acerca de las variaciones genéticas que podrían haber entre SAPs del mismo tipo, como en el caso de las catepsinas, producidas por especímenes provenientes de

áreas geográficas diferentes. Tampoco se conoce si hay relación alguna de las SAPs con la resistencia antihelmíntica como si ha ocurrido con la GST (29;62) o las FABP (2), en cepas que expresen algún mecanismo o nivel de resistencia al TCBZ. Estas cepas son caracterizadas como susceptibles o resistentes a antihelmínticos mediante pruebas de eficacia *in vivo*, en modelos animales, siguiendo métodos estándar que han sido evaluados estadísticamente (88-90).

Por otro lado, aunque hay suficiente evidencia que indica que el blanco del TCBZ es la tubulina, el mecanismo de resistencia no está asociado con mutaciones en esta proteína (91); sin embargo si se ha demostrado que las cepas resistentes metabolizan la droga (92), o sobre-producen un número importante de proteínas parasitarias durante su exposición a la droga en comparación a una cepa susceptible al TCBZ, al parecer, a fin de proteger al parásito del estrés celular sugiriendo un mecanismo adicional de respuesta en cepas resistentes (93), en las que pueden estar involucradas las GST, enzimas antioxidantes como las FABP, o proteínas de respuesta al estrés (2;64), lo cual establecería a su vez una relación metabolismo-resistencia interesante.

Si un fasciolida interactúa con diferentes sistemas dentro del parásito y ejerce una variedad de efectos (es probable que exista un efecto de arrastre sobre otros sistemas por lo que es difícil determinar si la acción fasciolida se debe a un solo efecto o una combinación de efectos), es de esperar también que la respuesta del parásito emplee múltiples mecanismos de defensa (o enzimas, o moléculas), frente a la acción de los fármacos.

2.5. La biología molecular y el estudio de la diversidad genética

En las poblaciones parasitarias, la diversidad genética puede expresarse indirectamente mediante variaciones en caracteres fenotípicos del tipo morfológico o fisiológico en una misma especie, o por la aparición de cepas o variantes patogénicas entre los individuos que la conforman. Medir la magnitud y distribución geográfica de esa diversidad es actualmente muy importante, no sólo porque ayuda a conocer la biología, ecología y evolución de los parásitos, sino también porque permitiría diseñar estrategias para su control (94;95), como por ejemplo evaluar y seleccionar antígenos inmunógenos para ensayos vacunales o en el desarrollo de técnicas más sensibles y específicas para el diagnóstico.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un método para la amplificación *in vitro* de secuencias definidas del ADN objetivo e implica ciclos automatizados de desnaturalización, hibridación y extensión o síntesis utilizando un equipo conocido como termociclador. La PCR fue concebida y desarrollada en la década de 1980 por Kary Mullis (96), habiéndose consolidado como una técnica moderna con alto potencial para la detección de enfermedades infecciosas, incluyendo parásitos animales (97). La mayoría de las técnicas moleculares modernas empleadas para estudios de diversidad se basan también en la tecnología PCR, la misma que permite amplificar secuencias específicas de genes (de marcadores moleculares, de proteínas, de intrones, etc.) incluso si partimos de cantidades muy pequeñas de ADN inicial (94) o de ADN complementario.

El número de técnicas descritas y basadas en PCR es cada vez más numerosa; y los estudios de diversidad parasitaria incluyendo a *Fasciola* spp. emplean frecuentemente técnicas moleculares como el RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) (25), y el RFLP-PCR (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), aplicados sobre marcadores moleculares como los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 principalmente del ADN ribosomal (98;99), aplicando además diversas enzimas de restricción. Estas mismas técnicas pueden aplicarse para el análisis del ADN mitocondrial y sus enzimas como parte de estudios de diversidad (100).

La técnica del RAPD se caracteriza esencialmente porque en la reacción de PCR se emplea sólo un cebador y la amplificación se realiza bajo condiciones de baja estrictez. Esto resulta en la amplificación de fragmentos de ADN anónimos que representan diversas regiones del genoma del individuo en estudio. Los productos de la amplificación se separan por tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa. Mediante esta técnica se puede demostrar por ejemplo que un individuo animal puede ser simultáneamente infectado por más de un genotipo de *Fasciola* spp. y se puede estimar la variación genética dentro de la especie (101;102).

El RFLP-PCR, en cambio, consiste en amplificar una región de ADN definida con una pareja de *primers* específicos. Para el caso de algunos estudios, estos amplifican las regiones ITS (espaciador transcrito interno) del ADN ribosomal. Se obtiene de esta manera un sólo producto de amplificación, el que luego es sometido a digestión con

enzimas de restricción. Estas enzimas cortan el ADN en cualquier región donde se encuentre una determinada secuencia, la que corresponde al sitio de corte de la misma. Así, el fragmento de ADN obtenido es cortado en fragmentos menores según sean las veces que esté presente el sitio de corte de la enzima. Los productos de la digestión son finalmente separados electroforéticamente en geles de agarosa. Esta técnica puede emplearse para la diferenciación de especies en áreas geográficas donde dos especies se superponen o tienen mucha similitud morfológica (100;102).

Los estudios experimentales que evalúan la susceptibilidad o la resistencia de las fasciolas al TCBZ generalmente emplean métodos estandarizadas en modelos animales, siguiendo las recomendaciones de instituciones internacionales que han normado al respecto (31), a su vez, en la detección y monitoreo de la resistencia antihelmíntica se emplea la prueba de reducción del conteo de huevos en heces, con sus limitaciones, por ejemplo, en la detección de resistencia desarrollada en estados inmaduros (88;90). Frente a esto, el conocimiento de los mecanismos moleculares de resistencia antihelmíntica a través de la biología molecular es una alternativa importante; en la literatura se describen antecedentes del empleo de la RFLP-PCR para comparar los genes que codifican la tubulina, entre cepas susceptibles y cepas resistentes a benzimidazoles (90). Las bases moleculares de resistencia a la mayoría de antihelmínticos siguen siendo desconocidas.

En ambas metodologías (las antes mencionadas), la diversidad se establece según sea que los individuos compartan o no los patrones de bandas. En las técnicas que

generan patrones de bandas de ADN es posible encontrar bandas monomórficas (es decir invariable en todos los individuos estudiados), o polimórficas (presentan variaciones). Este último tipo de bandas son las que finalmente permiten establecer las diferencias entre los individuos. Sin embargo, las técnicas de secuenciamiento de los productos amplificados permiten establecer comparaciones específicas de genes o grupos de genes, con las grandes bases de datos disponibles en el *GenBank*, a través de herramientas de acceso libre como las del NCBI.

En *Fasciola*, las variaciones genéticas han sido usadas para distinguir una especie de otra, pudiéndose inferir la relación filogenética entre las especies (100). Sin embargo, es muy poco lo que se sabe acerca de la variación genética dentro de *F. hepatica*, hecho que es potencialmente importante para el entendimiento de las interacciones hospedero-parásito, para evaluar la efectividad del tratamiento, para el desarrollo de métodos diagnósticos y vacunas, y para la interpretación epidemiológica de la fascioliasis. La genómica funcional es esencial para ello y para la comprensión de los complejos mecanismos a nivel molecular en un organismo o sus células; como consecuencia tenemos el análisis molecular del transcriptoma, a través de una PCR del ARN del individuo, a fin de atribuirle funcionalidad a los cambios de expresión revelados en diferentes individuos (103). Dado que el ARN usualmente es de una sola hebra y es sensible al calor, es necesario hacer una transcripción reversa (RT), antes de iniciar la amplificación por PCR. La RT-PCR representa el fórceps que ofrece la sensibilidad necesaria para validar los hallazgos a partir de genes individuales (103).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Unidad de análisis, universo y muestra

3.1.1. Unidad de Análisis

Correspondió a parásitos adultos de *F. hepatica* procedentes de cuatro diferentes áreas geográficas (una de Cajamarca, Perú); los parásitos de Cajamarca (cepa Cajamarca, resistente al TCBZ), fueron proporcionados por el Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Universidad Nacional de Cajamarca (Perú), y las cepas de otras áreas geográficas han sido proporcionadas por el Departamento de Ciencias Agrícolas de la Universidad La Trobe, de Australia.

3.1.2. Universo y muestra:

La población estuvo delimitada a parásitos adultos de *F. hepatica* provenientes de cuatro áreas geográficas. La muestra de estudio estuvo conformada por 24 especímenes, 15 de la cepa resistente a TCBZ provenientes de Cajamarca, 3 especímenes susceptibles de la cepa Sunny Corner, 3 resistentes a TCBZ de la cepa Tallangata y 3 resistentes a TCBZ de la cepa Gireke, provenientes de las regiones del mismo nombre en Australia.

3.2. Tipo de Investigación

Investigación básica, no experimental, de nivel analítico descriptivo.

3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.3.1. Mantenimiento de los parásitos adultos

Las muestras adecuadamente etiquetadas (parásitos adultos obtenidos del cepario correspondiente), se han mantenido congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en solución *RNAlater*[®] (Sigma) que protege el ARN del parásito. Las muestras parasitarias provenientes de Australia fueron transportadas congeladas en viales con *RNAlater*, y en un contenedor con hielo seco hasta su llegada al Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.3.2. Preparación previa y extracción del ARN parasitario

Los parásitos adultos conservados en *RNAlater* a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron procesados antes del aislamiento del ARN. El ARN total de los parásitos fue extraído por el método clásico con trizol, empleándose 1 mL del reactivo por espécimen de *F. hepatica* (100 μg de peso aproximadamente), de acuerdo con el protocolo siguiente (104;105).

- Previamente se limpió y desinfectó la superficie de trabajo (mesas), con alcohol al 70 % y luego con NaOH 1M. Se utilizó siempre puntas libres de ARNasas, así como guantes y mascarilla para evitar la contaminación de las muestras con las ARNasas presentes en la respiración.

- Todos los materiales a emplearse en la extracción de ARN (mortero, pilón, pinzas, espátulas, etc.), fueron previamente lavados con lavavajilla, enjuagados en agua corriente, luego lavados con alcohol al 70 %, y luego con solución de NaOH 1 M para eliminar toda contaminación por ARNasas. Estos materiales, una vez secos, fueron enfriados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos envueltos en bolsas plásticas de primer uso. Luego, al sacarlos del congelador, los materiales fueron colocados dentro de una caja de poliestireno expandido (tecnoport), con hielo picado, en cantidad suficiente para cubrir la base del mortero y mantenerlo frío.
- Se colocó cada espécimen en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, libre de nucleasas (ARNasas, ADNasas, proteasas), para ser congelado en nitrógeno líquido y luego descongelado a temperatura ambiente, proceso que se repitió hasta 3 veces (para facilitar la posterior homogenización).
- Con el mortero mantenido en la caja de poliestireno con hielo picado, se colocó cada espécimen (uno cada vez), dentro de él, se machacó con el pilón frío y se homogenizó hasta que el parásito tomó consistencia pastosa o como polvo. El pilón siempre se mantuvo frío para evitar el choque térmico sobre el ARN a extraer, por lo que más de una vez debió ser puesto dentro del hielo picado (dentro de la bolsa plástica).
- Se agregó 1 mL de trizol dentro del mortero con la muestra, homogenizando el contenido varias veces con la misma punta y luego se recolectó el macerado colocándolo en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL, libre de nucleasas.
- Se incubaron las muestras durante 5 min a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en baño maría previamente calentado, para la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas.

- Se añadió 200 μL de cloroformo y se agitó enérgicamente a mano durante 15 segundos y luego se volvió a incubar a 30 $^{\circ}\text{C}$ en baño maría por 3 minutos más.
- Se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos a temperaturas entre 2 - 8 $^{\circ}\text{C}$.
- La fase acuosa (la superior, translúcida), que contiene el ARN, se pasó a otro tubo Eppendorf de 1,5 ml, libre de nucleasas, teniendo cuidado de no pipetear la interface (la fase blanca que contiene el ADN) y la fase rosa con las proteínas.
- Se agregó 500 μL de isopropanol e incubó 10 min a temperatura ambiente, el ARN precipitó formando un pellet semitransparente en el fondo del tubo.
- Se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm por 15 minutos entre 2 - 8 $^{\circ}\text{C}$.
- Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol absoluto que previamente fue enfriado a -20 $^{\circ}\text{C}$, agitando muy bien, este proceso se repitió 2 o 3 veces quitando el etanol sucio cada vez.
- Se centrifugó a 7 500 rpm durante 5 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$.
- Se secó el pellet en la estufa (a 36 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura), dejando el tubo invertido sobre papel de filtro hasta que no quedaron restos de etanol en el tubo.
- Se re-suspendió el ARN con 50 μL de agua libre de ARNasas y se disolvió el pellet mediante un vortex de 5 segundos.
- Se incubó a 56 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos en baño María previamente calentado.

La evaluación de la calidad del ARN se hizo inmediatamente, cuando no fue así las muestras de ARN se guardaron a -70 $^{\circ}\text{C}$.

3.3.3. Evaluación de la calidad del ARN por espectrofotometría

Las muestras de ARN fueron evaluadas mediante espectrofotometría UV a 260 nm y 280 nm; para determinar la concentración de ARN se midió a 260 nm y su pureza (calidad) fue determinada mediante la relación de absorbancia 260/280.

Procedimiento:

Se encendió el espectrofotómetro y se colocó a 260 nm en modo absorbancia. Se colocó 1195 µL de agua libre de ARNasas en una cubeta de cuarzo, se agregó 5 µL de la muestra de ácidos nucleicos y se mezcló cuidadosamente. Se llenó otra cubeta solo con agua libre de ARNasas. Con el espectrofotómetro a 260 nm, primero se colocó la cubeta con agua y se llevó a cero, luego, se colocó la cubeta con los ácidos nucleicos y se hizo la medición (sin volver a llevar a cero). Después, se hizo lo mismo, siguiendo los pasos descritos anteriormente, pero con el espectrofotómetro en 280 nm.

Evaluación de la pureza del ARN

Cuando el valor resultante de la relación 260/280 fue de 2 ± 0.1 , el ARN se consideró de alta pureza (105), los valores mayores a 1.6 fueron considerados de buena calidad y a partir de estas muestras se obtuvo el ADN complementario (ADNc). Las muestras de ARN obtenidas fueron conservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.4. Diseño de *primers* con secuencias completas del *GenBank*

Los *primers* para la amplificación correspondientes a las FhSAPs fueron diseñados a partir de las secuencias completas de nucleótidos disponibles en las bases de datos del *GenBank*. Para FhSAP1 el número de acceso en el *GenBank* es U58467 (*Fasciola hepatica amoebapore-like (FHAP) mRNA, 418 bp linear mRNA*) (24), y para

FhSAP2 el número de acceso es AF286903 (*Fasciola hepatica amoebapore-likeproteinmRNA, 384 bp linear mRNA*) (80). Se diseñaron tres pares de *primers*, pero sólo se seleccionó un par para FhSAP1 y uno para FhSAP2, adicionalmente se empleó un par de *primers* empleado en otro estudio (59).

Para el diseño de *primers* se emplearon las herramientas bioinformáticas *Primer BLAST* (106) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), disponible en la web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/design-pcr-primers/> y *Primer 3* (107), del *Whitehead Institute for Biomedical Research*, disponible en <http://primer3.ut.ee/>. Los *primers* u oligonucleótidos empleados fueron:

Tabla 1. Denominación y secuencias de los *primers* empleados en el estudio

| Saposina | Denominación | Secuencia del <i>primer</i> |
|-----------------|---------------------|--------------------------------------|
| FhSAP1 | FhS1-1 | Forward: 5'-CGAACACCCATCCGCAAATC-3' |
| | | Reverse: 5'-TGGTTCCTCTGATTCCACGC-3' |
| | FhS1-2 | Forward: 5'-GCGTGGAATCAGAGGAACCA-3' |
| | | Reverse: 5'-TCAAGTAACCAACAGCGCCA-3' |
| FhSAP2 | FhS2-E | Forward: 5'-CAAATAGCTCGCTCTCAGGAT-3' |
| | | Reverse: 5'-CAGATTTCCGTTGCGTTGTG-3' |
| | FhS2-2 | Forward: 5'-ACTGTCGAGGAGCACATTGG -3' |
| | | Reverse: 5'-GCAGATTTCCGTTGCGTTGT-3' |

3.3.5. Obtención del ADN complementario (ADNc) por RT-PCR

El ADNc fue sintetizado a partir de 5 µg de ARN de cada una de las muestras extraídas, de cada uno de los especímenes adultos de *F. hepatica* considerados en este estudio. Para ello se empleó el *SuperScript*[®] III *First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), siguiendo el protocolo siguiente:

- Se mezcló y centrifugó brevemente (spin) cada componente del kit antes de usar.
- Por muestra de ARN, en un tubo Eppendorf de 200 µL se colocó los siguientes componentes: 1 µL de oligo-dT 50 µM (500 µg/ml), 1 µL de mix dNTPs 10mM, el volumen requerido de ARN total para una concentración de 5 µg y el volumen necesario de agua libre de ARNasas para completar un volumen total de 10 µL. Todo esto se centrifugó brevemente.
- Las muestras se incubaron en baño María previamente calentado a 65 °C por 5 min (para romper las estructuras secundarias presentes en el ARN). Luego se colocaron en hielo hasta agregar la mix de síntesis de ADNc.
- Para preparar la mix de síntesis se agregó los siguientes reactivos por reacción (muestra): 2 µL de buffer RT 10X, 2 µL de DTT 0,1 M, 4 µL de Cl₂Mg 25 mM, 1 µL de RNase OUT (40 U/µL) y 1 µL de enzima Superscript III RT (200 U/µL); esto hizo un volumen de 10 µL que se adicionaron a los otros 10 µL del paso anterior, teniendo un volumen total de reacción de 20 µL de cada muestra, se mezcló suavemente y se colectó luego de una breve centrifugación.
- Se colocó en el termociclador a 50 - 55 °C por 50 - 60 minutos y luego a 70 – 85 °C por 5 - 15 min, para terminar la reacción.
- El ADNc sintetizado se preservó a -20 °C hasta su uso.

3.3.6. Amplificación del ADNc por PCR

La amplificación de los fragmentos de ADNc se realizó a partir de 2 μ L del producto de la RT-PCR (templado obtenido por retrotranscripción reversa). Para este proceso se empleó el *Novagen*[®] *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Toyobo), siguiendo el protocolo siguiente:

- El ADNc de cada cepa fue empleado como templado para la amplificación por PCR empleando los pares de *primers* (*forward and reverse*), previamente diseñados para cada FhSAP (Tabla 1).
- La amplificación por muestra (de ADNc), fue llevada a cabo en tubo Eppendorf de 200 μ L donde se colocó los siguientes componentes: 5 μ L de *Buffer KOD Hot Start DNA Polymerase* 10X, 5 μ L de dNTPs 2 mM, 3 μ L de Cl_2Mg 25 mM, 1.5 μ L de cada *primer* (10 μ M), 2 μ L de templado, 1 μ L de *KOD Hot Start DNA Polymerase* (1 U/ μ L) y 31 μ L de agua grado molecular haciendo un volumen final de reacción de 50 μ L.
- Las condiciones de PCR en el termociclador fueron las siguientes: activación de la polimerasa a 95 °C por 2 minutos, con desnaturalización inicial por 20 segundos a 95 °C, seguido del *annealing* por 10 segundos a la temperatura *melting* (T_m) más baja según el par de *primers* empleados, y elongación por 10 segundos a 70 °C. El número de ciclos varió entre 35 a 40 ciclos dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar.
- Finalmente las muestras amplificadas fueron conservadas a -20 °C hasta su secuenciamiento.

3.3.7. Detección de fragmentos amplificados por electroforesis en gel (bandas)

El producto de la PCR fue analizado mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 % preparado con Tris Borato EDTA 0.5X (TBE), y teñido con *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen) (10 μ L). Se continuó con el protocolo siguiente:

- El gel solidificado se colocó en el sistema de electroforesis y también fue cubierto con TBE. En el primer pocillo o primera calle, se incorporó el marcador de peso molecular de 100 pb + buffer de siembra, a razón de 5 μ L + 1 μ L respectivamente, luego el control negativo (master mix sin ADN), y luego los amplificados, todos a razón de 4 μ L + 1 μ L de buffer de siembra.
- Se conectó a la fuente de poder, se hizo una corrida inicial por 30 minutos a 80 voltios y luego a 100 voltios por 45-50 minutos más. Finalizada la corrida, las bandas se observaron con transiluminación de luz UV con un *Visi-Blue Transilluminator*TM (UVP) y fueron fotografiadas para su posterior análisis.

3.3.8. Secuenciamiento de los productos amplificados y análisis

Los productos de PCR obtenidos fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa, purificados y enviados para su secuenciación a MacroGen (Korea) (<http://www.macrogen.com>). Las muestras se enviaron en las siguientes condiciones: volumen de 100 μ L a concentración de 100 ng/ μ L en tubos Eppendorf de 200 μ L, rotulados, y acompañados de los *primers* correspondientes a un volumen de 100 μ L a concentración 10 μ M. Los amplicones fueron secuenciados en ambas direcciones, mediante secuenciador automático de ADN, empleando los mismos oligonucleótidos usados en el PCR convencional.

3.4. Técnicas de procesamiento y análisis de los datos

3.4.1. Análisis de los fragmentos amplificados

Las bandas de los fragmentos amplificados fueron obtenidas con un equipo fotodocumentador *MicroDOC Basic System* (Clever Scientific Ltd.); luego fueron medidas por aproximación al marcador de peso molecular (MPM) mediante la utilización del software GelAnalyzer 2010[®], disponible en forma gratuita en www.gelanalyzer.com. Esto se hizo con la finalidad de comparar las bandas de las saposinas en todos los especímenes en busca de variaciones macromoleculares.

3.4.2. Análisis de los amplicones

Las secuencias obtenidas en el cromatograma fueron editadas con el programa FynchTV 1.4.0 (de Geospiza Inc., Washigton, USA), disponible online en www.geospiza.com/finchtv.html y alineadas preliminarmente con el software BioEdit de Tom Hall, disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. La búsqueda de datos para la comparación de las secuencias de consenso se realizó con el programa FASTA en la base de datos del *GenBank*, luego fueron alineadas mediante el Software BLAST para nucleótidos, disponible en forma gratuita en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, y finalmente analizadas y comparadas con el programa Clustal-MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*), disponible en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/> mediante el cual se realizó un alineamiento múltiple y se obtuvo los códigos para el árbol filogenético final construido con TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Empleando los pares de *primers* denominados FhS1-1 y FhS2-2 (Tabla 1, del capítulo anterior), se obtuvo como producto de la amplificación del ADNc fragmentos de aproximadamente 100 pb (pares de bases) y de 141 bp (Figuras 1 y 2), los cuales pertenecen a las secuencias de FhSAP1 y FhSAP2, respectivamente. Ambas secuencias de proteínas también son conocidas como proteínas tipo saposinas (*Saposin-like protein*) o proteínas tipo amoebaporas (*Amoebapore-like protein*).

El inicio y final de los fragmentos estuvo ubicado entre las posiciones 154 y 293 de las secuencias completas de las saposinas, cuyos números de acceso en el *GenBank* son: U58467 para FhSAP1 (*F. hepatica amoebapore-like (FHAP) mRNA, 418 bp linear mRNA*) (24), y AF286903 para FhSAP2 (*F. hepatica amoebapore-like protein mRNA, 384 bp linear mRNA*) (80). Mediante el análisis visual de los fragmentos, con el programa GelAnalyzer, pudimos confirmar que amplificamos las moléculas correspondientes a las saposinas del estudio, y no se evidenció diferencias ni el peso molecular ni en el tamaño de las secuencias amplificadas, aun cuando los especímenes provenían de diferente origen geográfico y han sido probados de presentar distinta sensibilidad al TCBZ (Figura 3). En este punto, es importante indicar que, midiendo el

peso molecular no es posible establecer la variación molecular de las proteínas estudiadas en las distintas cepas de *F. hepatica*, por lo que el siguiente paso fue hacer el secuenciamiento de los fragmentos amplificados, cuyos resultados sí permiten hacer las comparaciones correspondientes.

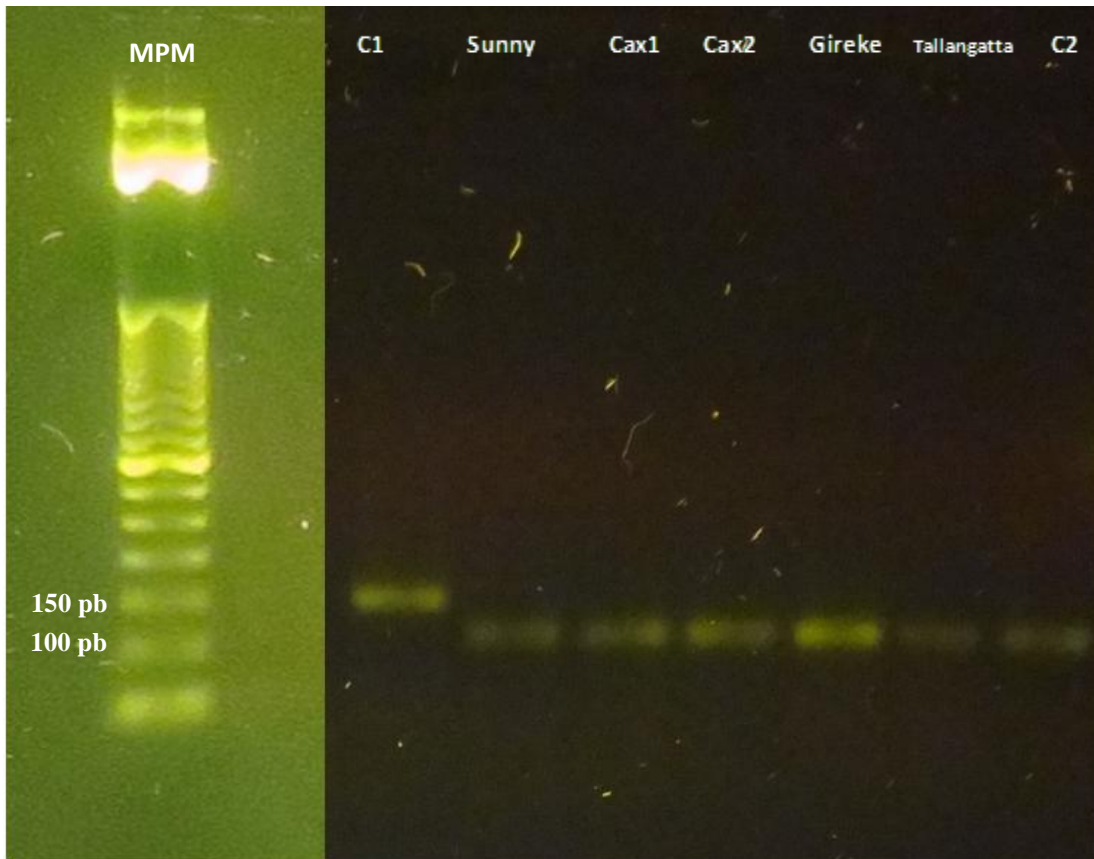


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando bandas de aproximadamente 100 pb correspondientes a la FhSAP1 en cepas de *F. hepatica* de diferente origen geográfico, susceptibles y resistentes al TCBZ.

MPM: marcador de peso molecular (50 pb DNA ladder), C1: control positivo de 150 pb (FhGADPH), Sunny: cepa australiana “Sunny Corner” susceptible al TCBZ, Cax1: cepa “Cajamarca” resistente al TCBZ, Cax2: cepa de Cajamarca de sensibilidad desconocida al TCBZ, Gireke: cepa australiana resistente al TCBZ, Tallangatta: cepa australiana resistente al TCBZ, C2: control positivo de 100 pb.

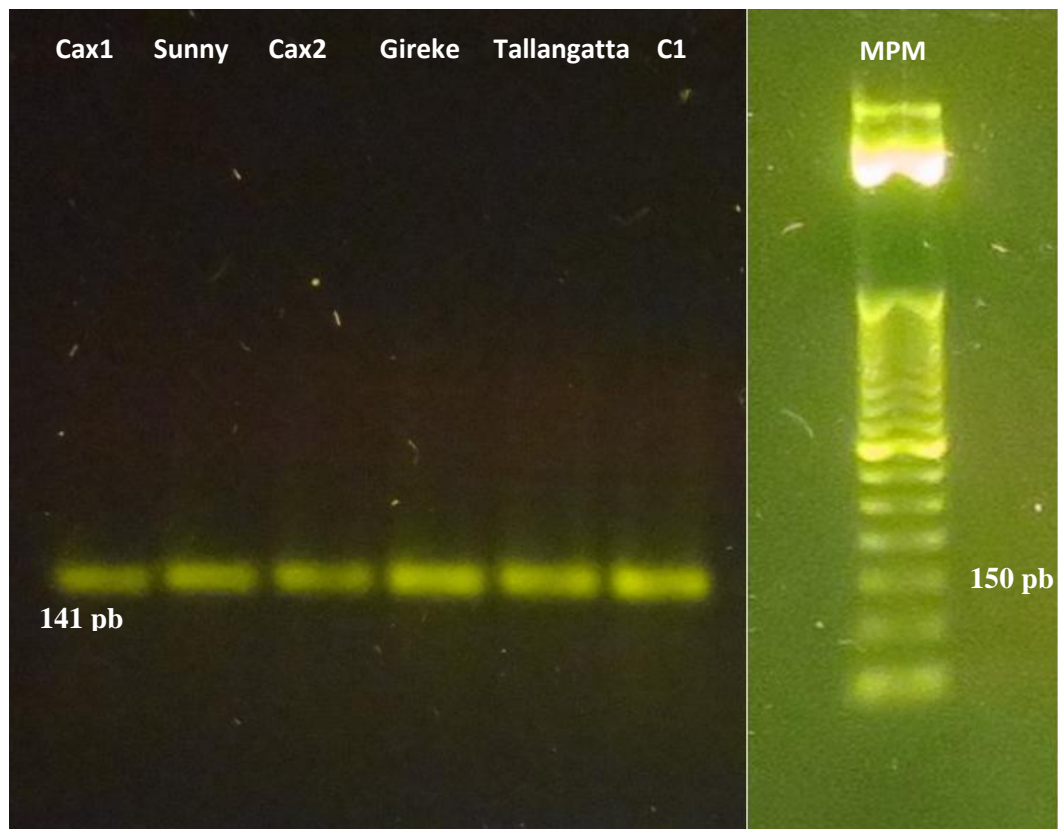


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando las bandas de 141 pb correspondientes a la FhSAP2 en cepas de *F. hepatica* de diferente origen geográfico, susceptibles y resistentes al TCBZ.

Cax1: cepa “Cajamarca” resistente al TCBZ, Sunny: cepa australiana “Sunny Corner” susceptible al TCBZ, Cax2: cepa de Cajamarca de sensibilidad desconocida al TCBZ, Gireke: cepa australiana resistente al TCBZ, Tallangatta: cepa australiana resistente al TCBZ, C1: control positivo de 150 pb (FhGADPH), MPM: marcador de peso molecular (50 pb DNA ladder).



Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando las bandas de FhSAP1 y FhSAP2 juntas, en cepas de *F. hepatica* de diferente origen geográfico, susceptibles y resistentes al TCBZ.

C: control positivo de 150 bp (FhGADPH), Cax: cepa “Cajamarca” resistente al TCBZ, Sunny: cepa australiana “Sunny Corner” susceptible al TCBZ, Gireke: cepa australiana resistente al TCBZ, Tallangatta: cepa australiana resistente al TCBZ, MPM: marcador de peso molecular (50 pb DNA ladder).

Durante el análisis preliminar de las secuencias nucleotídicas siempre es necesario eliminar el ruido del cromatograma (*background*), antes de obtener las secuencias de consenso correspondientes, lo cual fue realizado empleando los editores de secuencias o programas como FinchTV, Chromas-Lite y/o BioEdit, (Figuras 4 y 5). Al analizar los cromatogramas, se ve una alta homología o identidad en la secuencia de nucleótidos de las cepas comparadas, a excepción de la secuencia de FhSAP2 para la cepa resistente australiana “Gireke”, donde es notoria una diferencia al inicio de la secuencia (Figura 5), manifestada fundamentalmente por la presencia de un triplete GGG que no se observa en las otras secuencias. De manera preliminar, estos datos nos indican que no hay variabilidad molecular significativa en la expresión de estas proteínas, y dicho de otro modo, la expresión de las proteínas tipo saposinas en *F. hepatica* podrían no estar relacionados con los fenómenos de resistencia al TCBZ.

Respecto a la secuencia FhSAP2 de la cepa “Cajamarca” resistente al TCBZ, editada, consensuada y sometida a un alineamiento local en BLAST para nucleótidos, los resultados devueltos evidencian, como era esperado, alineamientos significativos con las bases de datos del *GenBank* para tres moléculas de tres trematodos distintos: *F. hepatica*, *Schistosoma mansoni* y *F. gigantica*, con homologías (identidad) de 100% con los dos primeros y de 93% con *F. gigantica* (Figura 6). La identidad con *S. mansoni* solo confirma lo que sugieren algunos estudios en cuanto a la existencia de genes ancestrales conservados en la filogenia de ambas especies (proteínas homólogas), lo cual explica además la existencia de epítomos en SAPs de reacción cruzada entre estos parásitos (85).

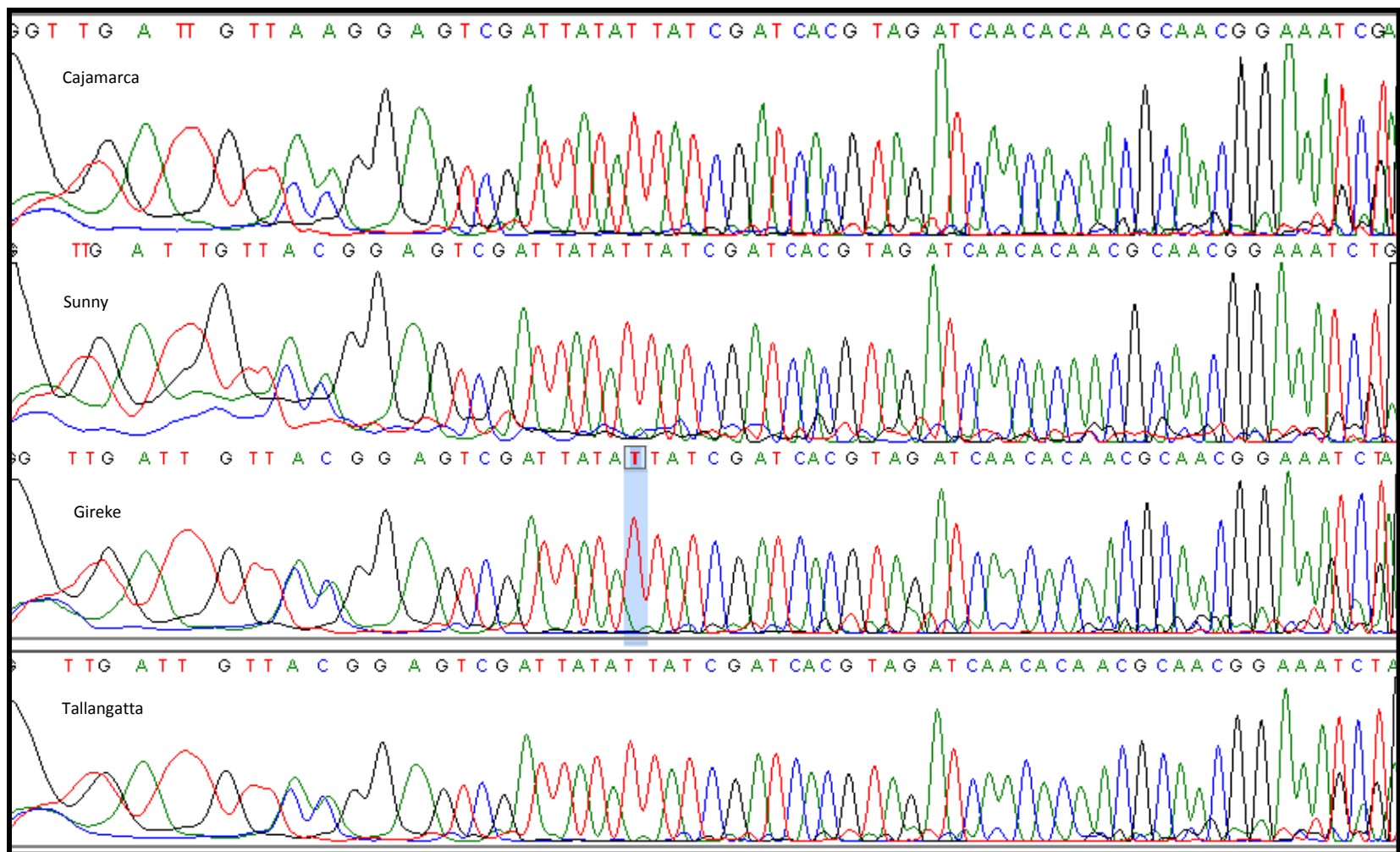


Figura 4. Cromatogramas de la FhSAP1 en cepas de *F. hepatica* de diferente origen geográfico, susceptibles y resistentes al TCBZ.

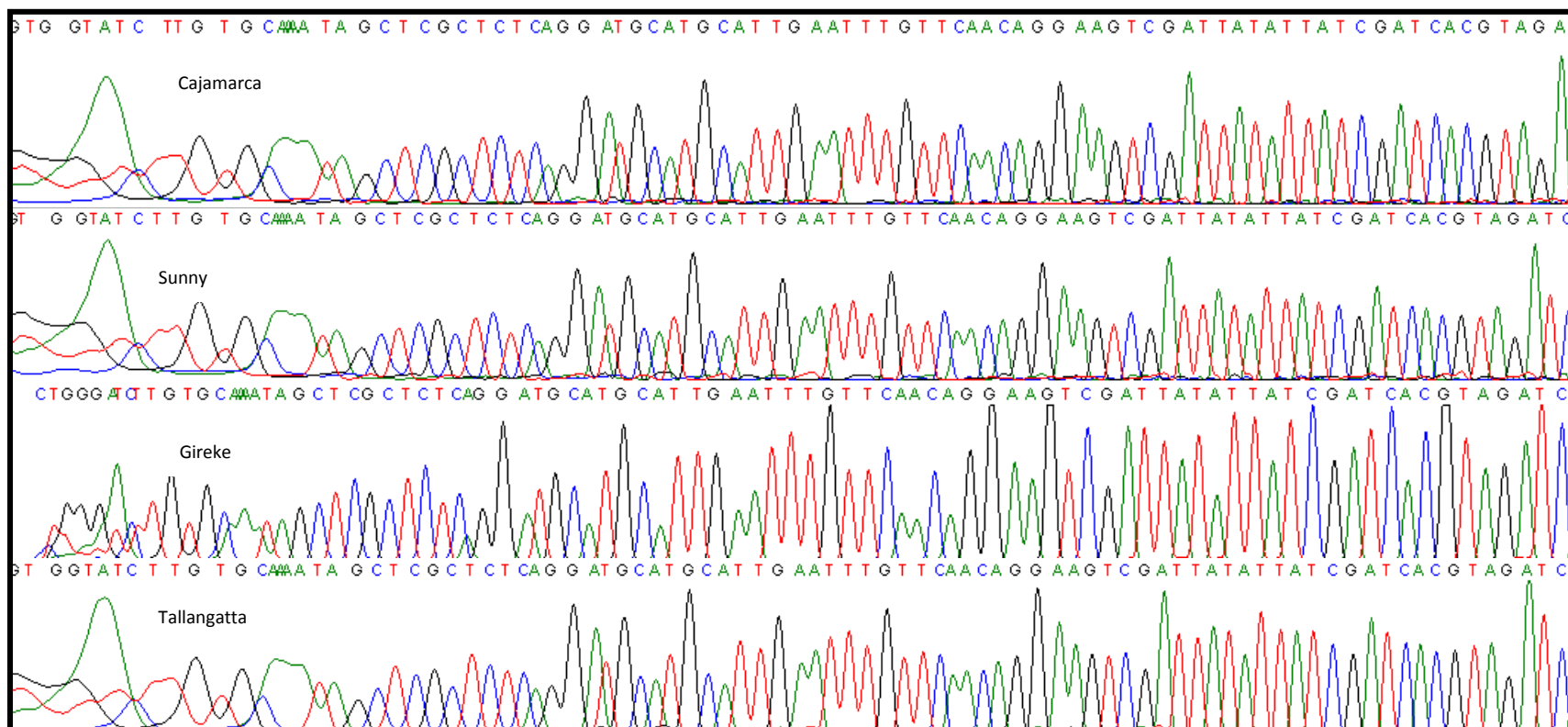


Figura 5. Cromatogramas de la FhSAP2 en cepas de *F. hepatica* de diferente origen geográfico, susceptibles y resistentes al TCBZ.

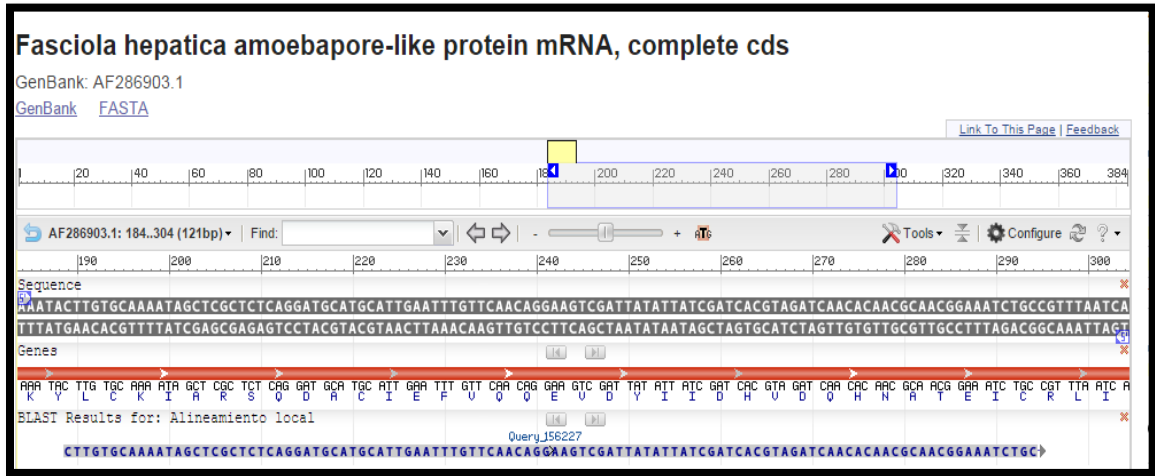
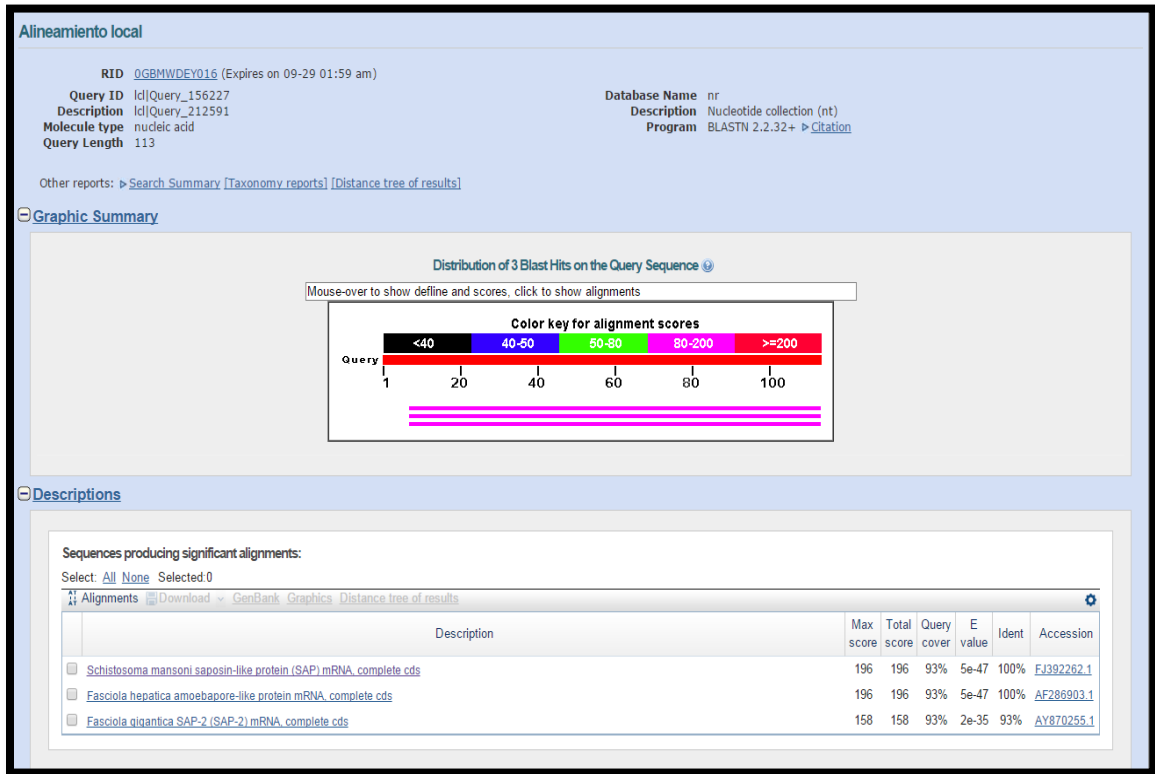
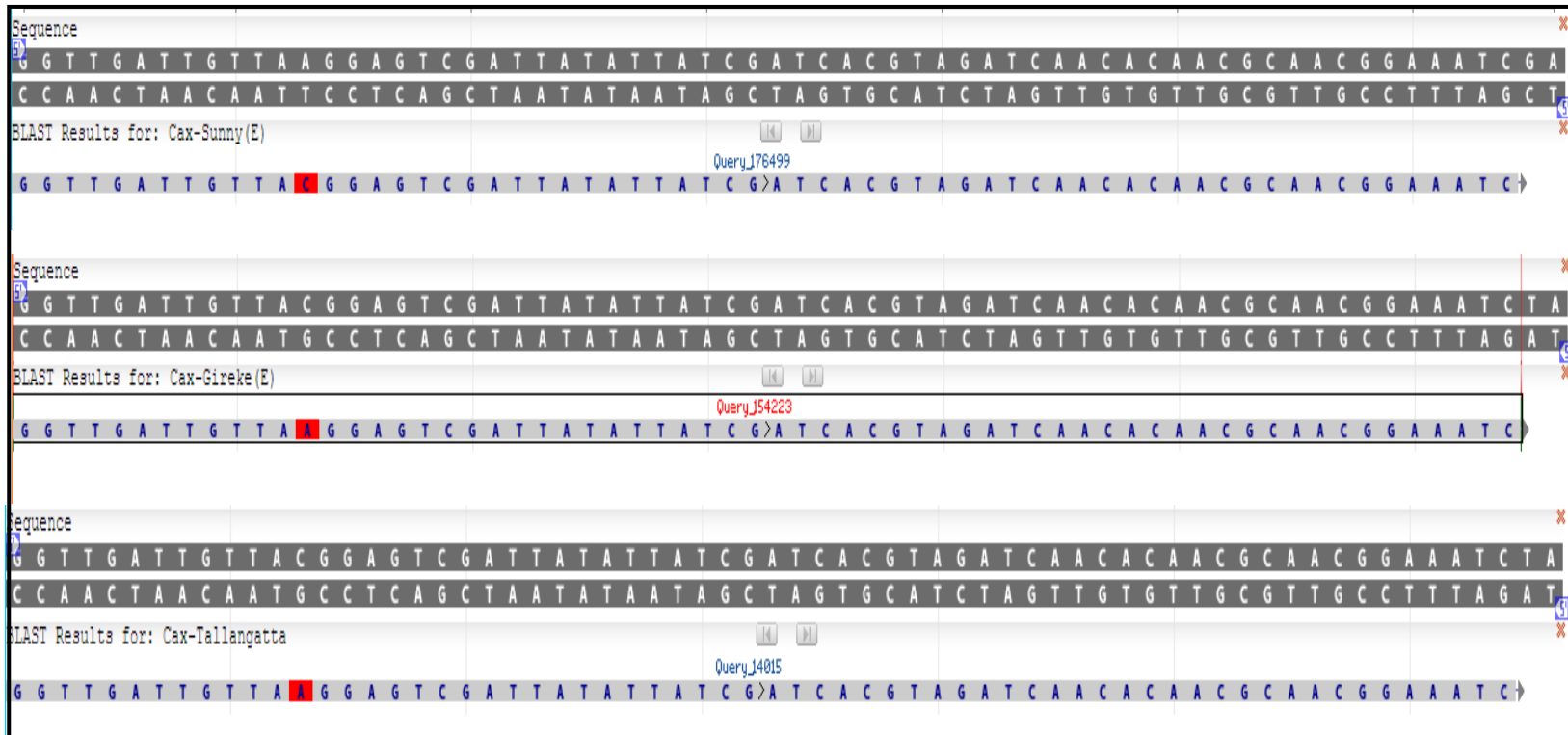


Figura 6. Alineamiento local *BLAST* de la secuencia de FhSAP2 de la cepa resistente “Cajamarca” con la colección de nucleótidos del *GenBank*.

Adicionalmente, en la figura 6 (recuadro inferior), se evidencia que no existe diferencias en la conformación de los aminoácidos al compararse la FhSAP2 de la cepa “Cajamarca” con la secuencia de la proteína reportada por Espino & Hillyer (80), con lo cual, más allá de que podemos remarcar que las SAPs de *F. hepatica* no servirían como marcadores de resistencia al TCBZ, su potencial como antígeno para el desarrollo de kits diagnósticos y para ensayos vacunales se ve favorecido, ya que este tipo de proteínas no sólo están entre los antígenos más fácilmente detectados en sangre (79;108), sino que además contiene una misma conformación de epítomos en diferentes regiones geográficas.

Durante los alineamientos por pares, de las secuencias de FhSAP1, enfrentando la cepa resistente “Cajamarca” con las demás del estudio, provenientes de Australia, se ha evidenciado diferencias nucleotídicas puntuales en un solo nucleótido, en este caso la cepa “Cajamarca” expresa una citosina (C), en lugar de las adeninas (A), que aparecen en todas las cepas de Australia, bajo un 97% de cobertura e identidad de 98% (Figura 7); sin embargo, en el alineamiento múltiple con una cobertura menor (de hasta 78,8%) la identidad de las secuencias llegó al 100% (Figura 8). Al parecer, estas pequeñas diferencias en la conformación de las secuencias no serían significativas para la expresión de la molécula en ninguno de los casos, ni por diferencias regionales ni por diferencias según la sensibilidad al TCBZ de los especímenes estudiados. De acuerdo con algunas investigaciones, se requieren diferencias significativas en la conformación de los aminoácidos para que estas tengan un impacto importante en la expresión de las enzimas del proteoma de *F. hepatica* (26;29).



Score de 61 b, Valor e: 2e-31, 98% de identidad, 0% de gaps, 1 mismatch y cobertura de 97%

Figura 7. Alineamiento por pares en *BLAST nucleotide*, de la secuencia de FhSAP1 de la cepa resistente “Cajamarca” (Cax) con cada una de las cepas australianas (Sunny Corner, Gireke y Tallangatta).

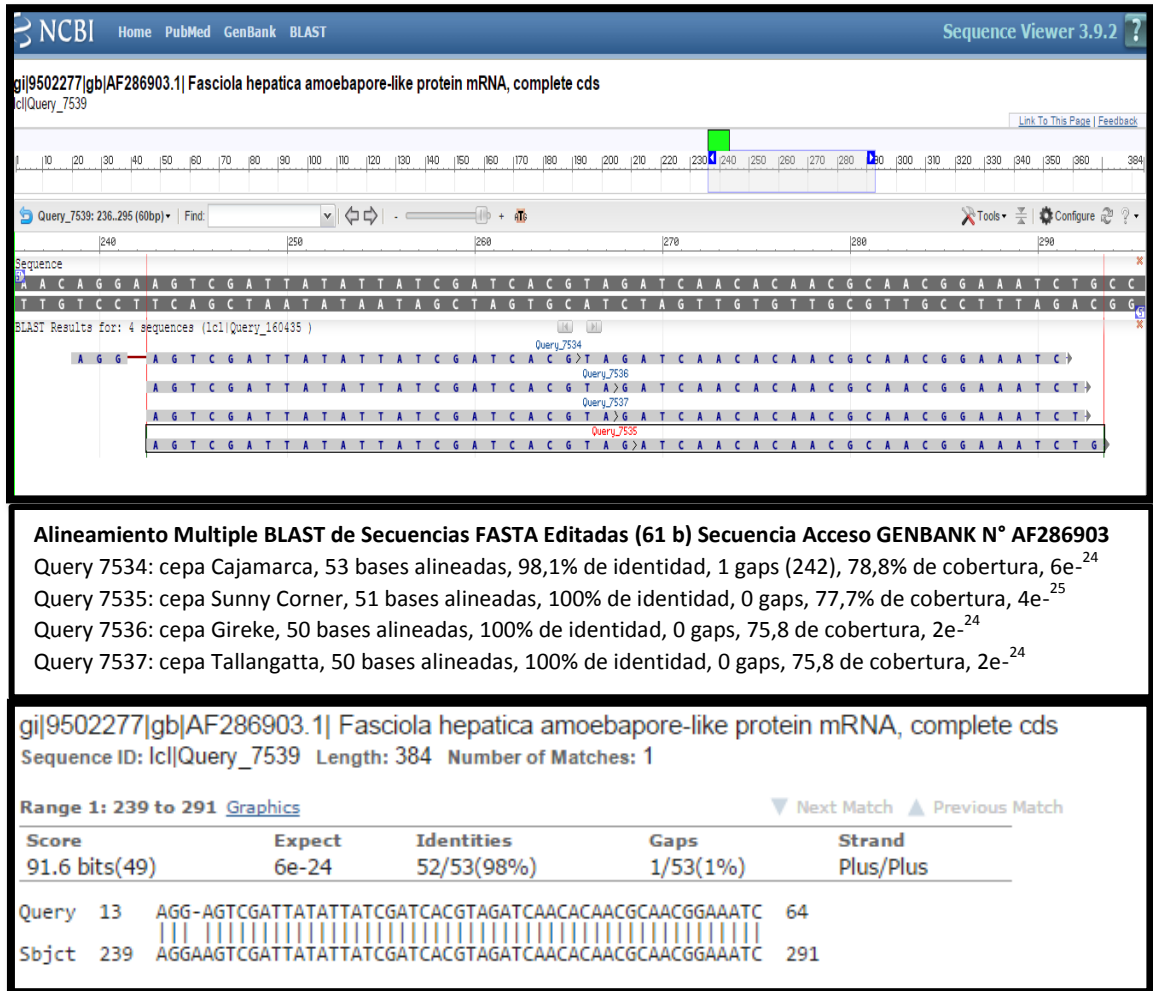
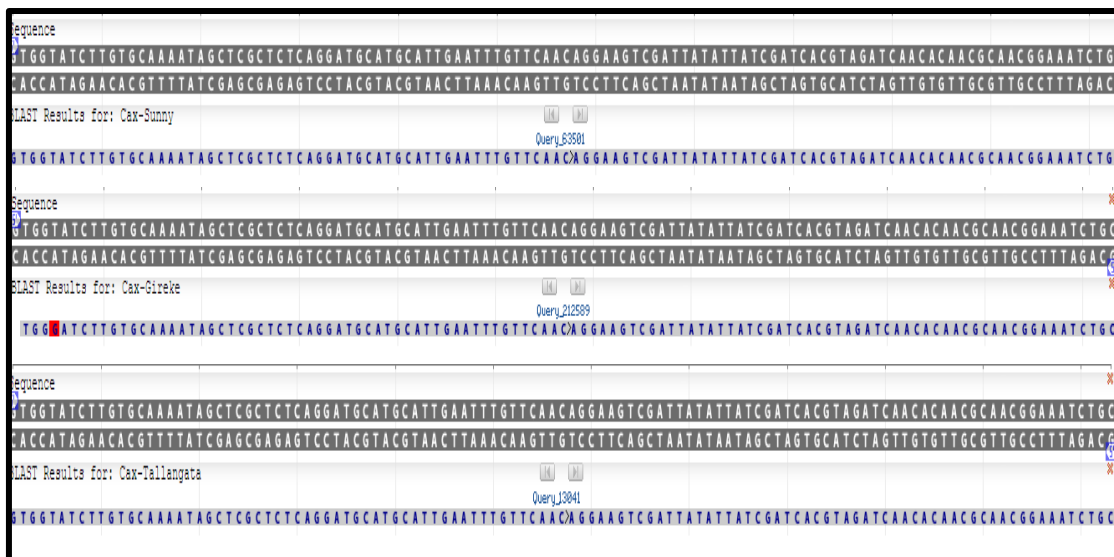


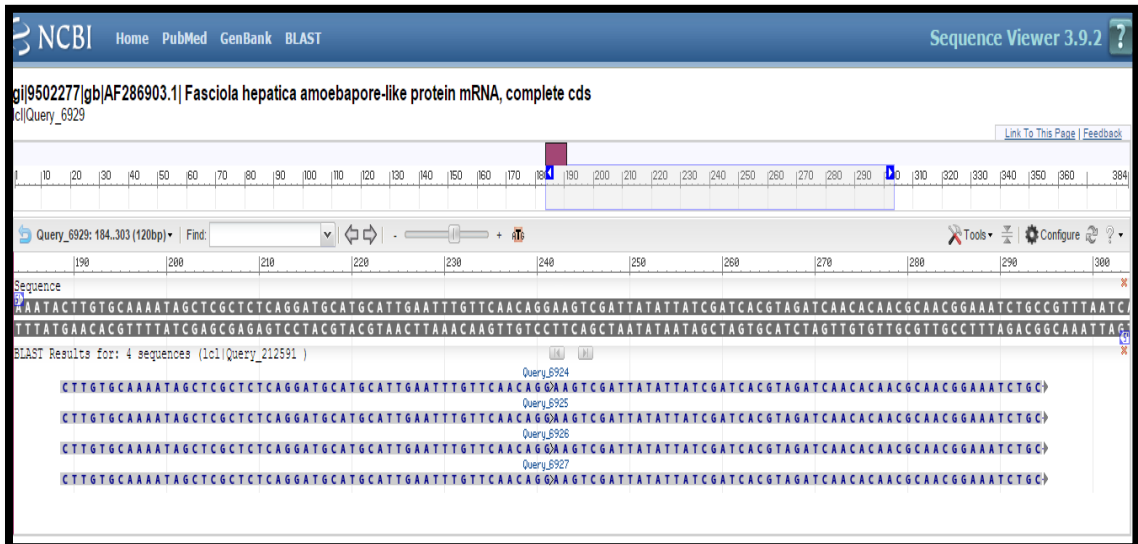
Figura 8. Alineamiento múltiple en *BLAST nucleotide*, de la secuencia de FhSAP1 de la cepa resistente “Cajamarca” con cada una de las cepas australianas (Sunny Corner, Gireke y Tallangatta).

Al comparar las secuencias de la proteína FhSAP2, se apreció algo similar. En este caso una guanina (G), en la cepa australiana “Gireke” reemplaza a una Adenina (A), en las demás cepas, incluyendo la cepa “Cajamarca”. El porcentaje de identidad alcanzó el 100 % en los otros pares comparados con cobertura de hasta 99 % (Figura 9), lo cual minimiza también la variación nucleotídica, ya que en el alineamiento múltiple la homología fue de 100 % con una cobertura máxima de 93,8 % en todos los casos (Figura 10). Es importante resaltar esta homología de 100 %, sobre todo porque la FhSAP2 es una molécula muy promisoría, con la que más se está investigando la obtención de vacunas, tipo recombinantes y tipo ADN (20;22;54).



Score de 112-113 bp, Valor e: 1e-57, 99,1-100% de identidad, 0% de gaps, 1 mismach y cobertura de 99%

Figura 9. Alineamiento por pares en *BLAST nucleotide*, de la secuencia de FhSAP2 de la cepa resistente “Cajamarca” (Cax) con cada una de las cepas australianas (Sunny Corner, Gireke y Tallangatta).



Alineamiento Múltiple BLAST de Secuencias FASTA Editadas (113 b) Secuencia Acceso GENBANK N° AF286903
 Query 6924: cepa Cajamarca, 106 bases alineadas, 100% de identidad, 0 gaps, 93,8% de cobertura, 2e⁻⁵⁵
 Query 6925: cepa Sunny-Corner, 106 bases alineadas, 100% de identidad, 0 gaps, 93,8% de cobertura, 2e⁻⁵⁵
 Query 6926: cepa Gireke, 106 bases alineadas, 100% de identidad, 0 gaps, 93,8% de cobertura, 2e⁻⁵⁵
 Query 6927: cepa Tallangatta, 106 bases alineadas, 100% de identidad, 0 gaps, 93,8% de cobertura, 2e⁻⁵⁵

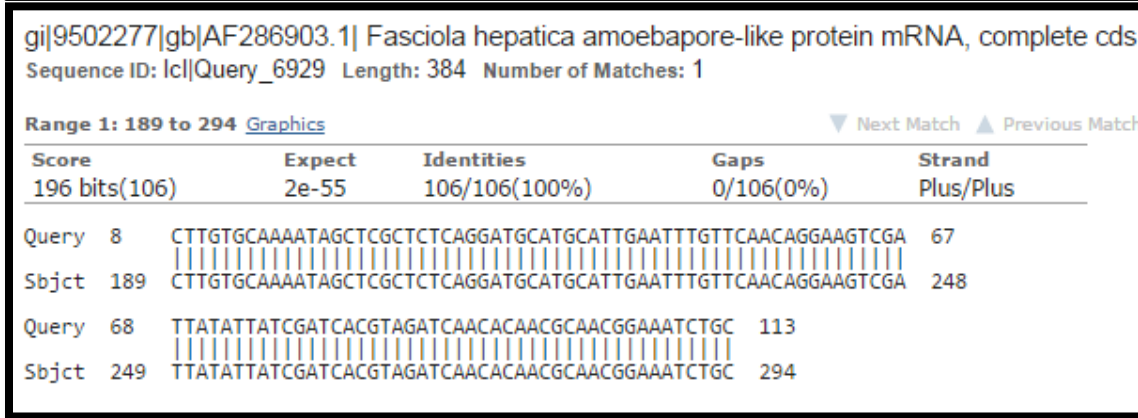


Figura 10. Alineamiento múltiple en *BLAST nucleotide*, de la secuencia de FhSAP2 de la cepa resistente “Cajamarca” con cada una de las cepas australianas (Sunny Corner, Gireke y Tallangatta).

En general, ante la falta de variación genética significativa en la secuencia de nucleótidos codificantes para proteínas FhSAP2 en las cepas de estudio, comparadas además con la secuencia reportada en el *GenBank* (80), podemos asumir que los avances en el desarrollo de técnicas diagnósticas y en los estudios de inmunización empleando éstas mismas moléculas podrían, en su momento, ser aplicadas en nuestra región. Por el contrario, si se hubieran hallado diferencias en las secuencias de aminoácidos, como las reportadas en la proteína Cat-L2 de cepas de *F. hepatica* también tomadas de áreas geográficas distintas (26;27), necesariamente se tendría que evaluar en cada zona geográfica la utilidad de la proteína FhSAP2 como herramienta diagnóstica, y se tendrían que implementar protocolos de prueba para ensayos vacunales con FhSAP2 obtenidas de cepas oriundas de cada región geográfica.

En los estudios mencionados se discute las implicancias que las diferencias nucleotídicas y su expresión de aminoácidos tienen sobre lo avanzado en inmunoprolifaxis y el diagnóstico, empleando antígenos como las Cat-L. En este sentido, los avances en el empleo de FhSAPs y sus moléculas recombinantes, como alternativas para el diagnóstico masivo y control de la enfermedad en animales y su prevención en humanos se ven fortalecidos con nuestros hallazgos, ya que empleados como antígenos para producir kits diagnósticos pueden ser útiles en cualquier lugar del mundo. Debido a que la inmunogenicidad de estas proteínas ya ha sido demostrada en diversos estudios (20;22;54), su empleo como vacuna para el control de la enfermedad en el ganado, en diferentes regiones geográficas, también se vería respaldada por la nula o escasa variación antigénica de las moléculas, hallada en este trabajo.

Es importante señalar que, entre otras limitaciones, en este estudio sólo se evaluaron algunas fracciones de las secuencias completas de las proteínas FhSAPs, por lo que sería sustancial completar las secuencias de ambos extremos y alinearlas nuevamente para establecer completamente la homología de ambas saposinas. De encontrarse, en un nuevo alineamiento, diferencias que no hemos hallado en esta investigación, estas tendrían que ser significativas en el número y en el tipo de nucleótidos y/o aminoácidos para afectar la inmunogenicidad del antígeno involucrado (74). Por otro lado, la ausencia de variaciones genéticas en estas proteínas, entre individuos de diferente sensibilidad al TCBZ, ayuda poco a entender los mecanismos del fenotipo resistente y su relación con los PES o las rutas metabólicas involucradas (93), y más bien sirven sólo para reconocer que tales transiciones se deben a la variación alélica normal en los genes que las codifican.

Frente a los hallazgos hasta ahora indicados, también se optó por alinear las secuencias sin edición en el Software BioEdit (Tablas 2 y 3) y en forma múltiple en el *Clustal-MAFFT* (Figuras 11 y 12). Los resultados confirman el alto nivel de identidad entre las secuencias de las diferentes cepas estudiadas, aunque muestran también algunas diferencias al inicio de las secuencias comparadas; sin embargo, de acuerdo con los cálculos estadísticos de los programas empleados, valores e por debajo de 10^{-6} son más que suficientes para afirmar que tales diferencias no son significativas, o para asegurar la alta homología entre las secuencias.

Tabla 2. Alineamiento de secuencias de nucleótidos, de la FhSAP1, de las cepas del estudio comparada con la secuencia FASTA de amoebapore-like de *F. hepatica* (disponible en el *GenBank*, con N° de acceso AF286903.1) en el programa BioEdit.

| Cepa/Origen de secuencia | SECUENCIA DE ACIDO NUCLEICO/PRODUCTO DE SECUENCIACIÓN |
|------------------------------------|---|
| <i>Amoebapore-like F. hepatica</i> | TTTGTTCAACAGGAAGTCGATTATATTATCGATCACGTAGATCAACACAACGCAACGGAAATCTG |
| FhSAP-1-CaxR | GGTTGATTGTTAAGGAGTCGATTATATTATCGATCACGTAGATCAACACAACGCAACGGAAATCTGA |
| FhSAP-1-Sunny.AusxS | GGTTGATTGTTACGGAGTCGATTATATTATCGATCACGTAGATCAACACAACGCAACGGAAATCTG |
| FhSAP-1-Gireke.AusxR | GGTTGATTGTTACGGAGTCGATTATATTATCGATCACGTAGATCAACACAACGCAACGGAAATCTA |
| FhSAP-1-Tallangatta.AusxRa | GGTTGATTGTTACGGAGTCGATTATATTATCGATCACGTAGATCAACACAACGCAACGGAAATCTA |
| FhSAP-1-Tallangatta_AusxRb | GGTTGATTGTTACGGAGTCGATTATATTATCGATCACGTAGATCAACACAACGCAACGGAAATCTA |

Tabla 3. Alineamiento de secuencias de nucleótidos, de la FhSAP2, de las cepas del estudio comparada con la secuencia FASTA de amoebapore-like de *F. hepatica* (disponible en el *GenBank*, con N° de acceso AF286903.1) en el programa BioEdit.

| Cepa/Origen de secuencia | SECUENCIA DE ACIDO NUCLEICO/PRODUCTO DE SECUENCIACIÓN |
|------------------------------------|---|
| <i>Amoebapore-like F. hepatica</i> | TGAAATAC TTGTGCAAAAATAGCTCGCTCTCAGGATGCATGCATTGAAATTTGTTCAAACAGGAAGTCGATTATATTATCGATCACGTAGATCAACAACGCAACGGAAATCTGC |
| FhSAP-2-CaxR | GTGGTATC TTGTGCAAAAATAGCTCGCTCTCAGGATGCATGCATTGAAATTTGTTCAAACAGGAAGTCGATTATATTATCGATCACGTAGATCAACAACGCAACGGAAATCTGC |
| FhSAP-2-Sunny.AusxS | GTGGTATC TTGTGCAAAAATAGCTCGCTCTCAGGATGCATGCATTGAAATTTGTTCAAACAGGAAGTCGATTATATTATCGATCACGTAGATCAACAACGCAACGGAAATCTGC |
| FhSAP-2-Gireke.AusxR | CTGGGATC TTGTGCAAAAATAGCTCGCTCTCAGGATGCATGCATTGAAATTTGTTCAAACAGGAAGTCGATTATATTATCGATCACGTAGATCAACAACGCAACGGAAATCTGC |
| FhSAP-2-Tallangatta.AusxRa | GTGGTATC TTGTGCAAAAATAGCTCGCTCTCAGGATGCATGCATTGAAATTTGTTCAAACAGGAAGTCGATTATATTATCGATCACGTAGATCAACAACGCAACGGAAATCTGC |
| FhSAP-2-Tallangatta_AusxRb | GTGGTATC TTGTGCAAAAATAGCTCGCTCTCAGGATGCATGCATTGAAATTTGTTCAAACAGGAAGTCGATTATATTATCGATCACGTAGATCAACAACGCAACGGAAATCTGC |

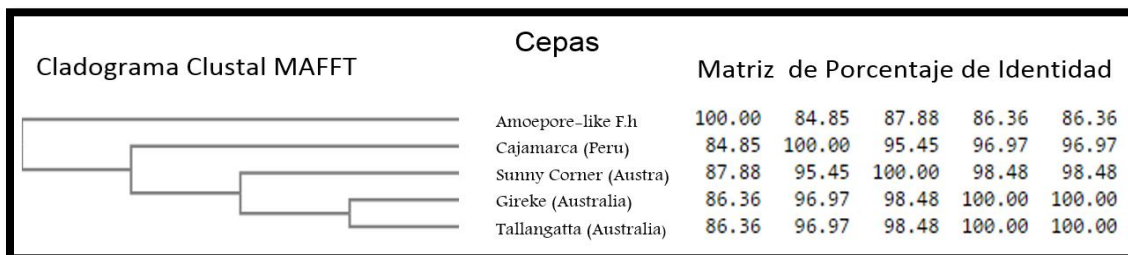
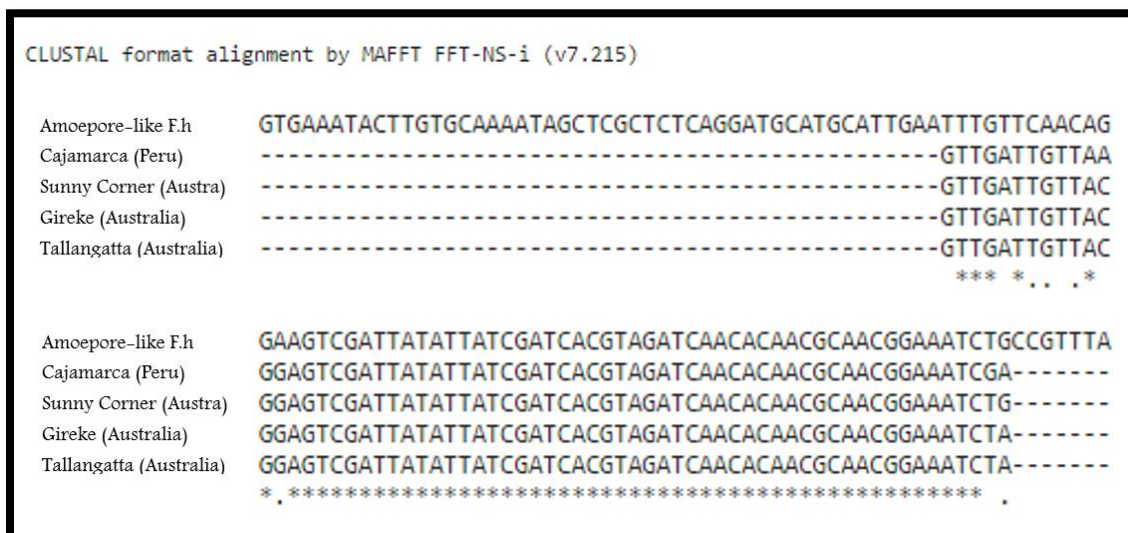


Figura 11. Alineamiento múltiple con *CLUSTAL-MAFFT* de las cepas en estudio para FhSAP1.

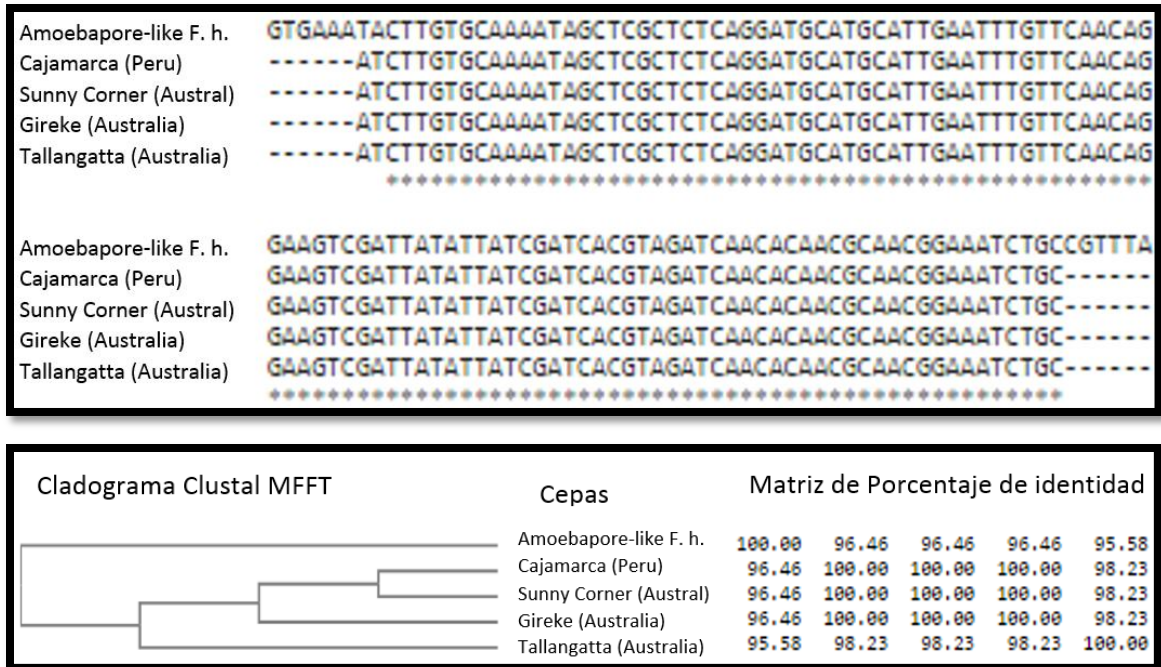


Figura 12. Alineamiento múltiple con *CLUSTAL-MAFFT* de las cepas en estudio para FhSAP2.

Finalmente, en la figura 13, empleando las pequeñas variaciones de las secuencias de nucleótidos no editadas de la FhSAP2, se ha establecido la relación filogenética de parentesco entre las cepas de estudio (de manera correcta, esta relación debería establecerse mediante estudios de variación genética en marcadores moleculares intraespecie). La figura muestra un mayor acercamiento filogenético entre las cepas “Gireke” de Australia y la cepa correspondiente a la de la secuencia reportada por Espino y cols. (80); estas a su vez, estarían mejor relacionadas con la cepa resistente “Cajamarca”. Sin embargo, las cepas “Sunny Corner” (susceptible al TCBZ) y “Tallangatta” (resistente al TCBZ), que aparecen en ramas separadas, tendrían un menor grado de parentesco con la cepa “Cajamarca” o quizá una historia evolutiva distinta.

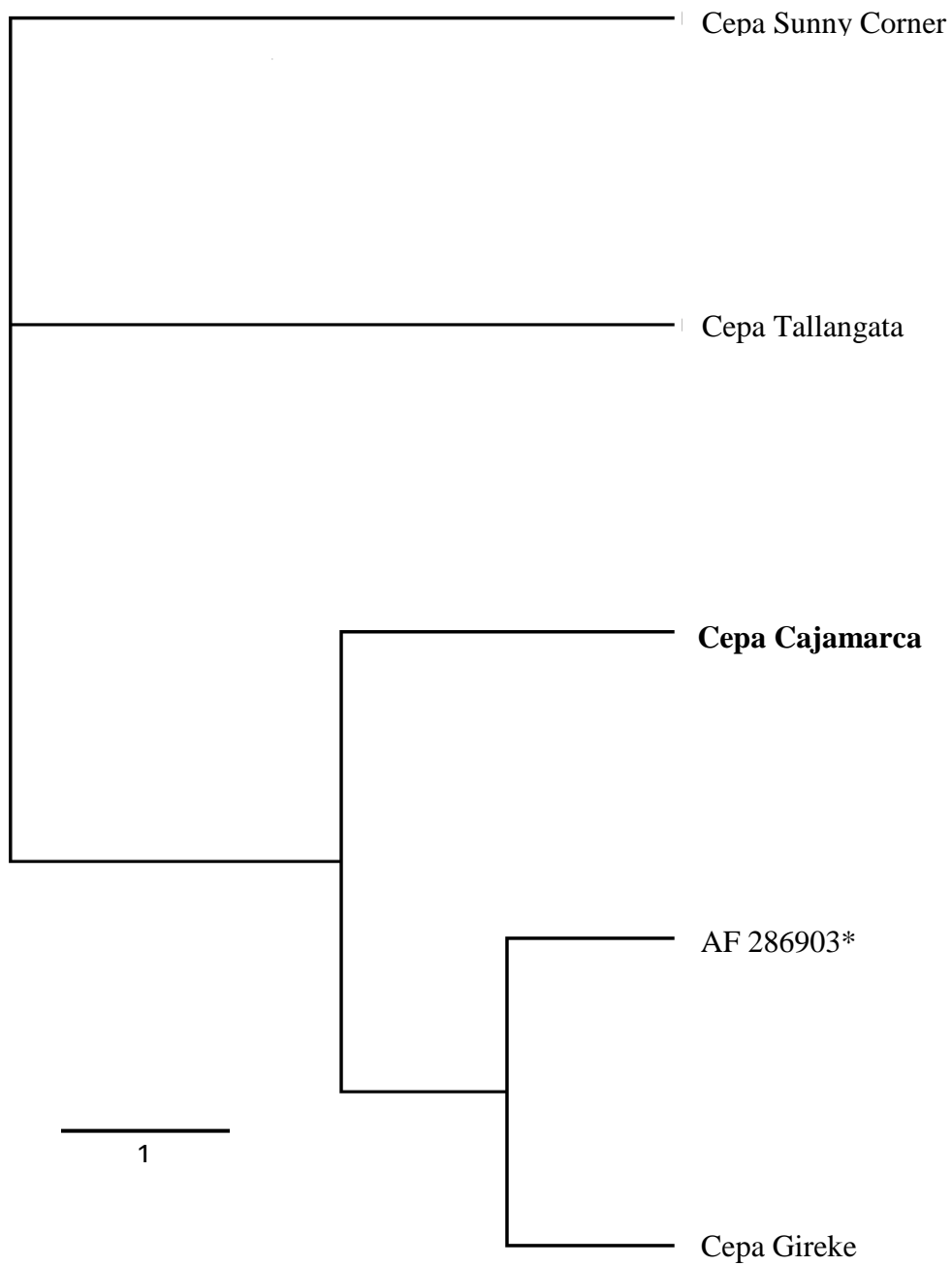


Figura 13. Árbol filogenético comparativo de las FhSAP2 para las cepas del estudio, empleando el software TreeView [*AF 286903 (80): *Amoebapore-like 2 protein*].

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. Este estudio concluye que, entre los fragmentos de ADN secuenciados, correspondientes a las saposinas FhSAP1 y FhSAP2 y provenientes de ARNm de las cepas Cajamarca (resistente) y las de Australia Sunny Corner (susceptible), Gireke (resistente) y Tallangata (resistente), no hubo variación nucleotídica significativa.
2. Consecuentemente, también se concluye que no hay variabilidad significativa en la expresión de los aminoácidos, correspondientes a las mismas fracciones de proteínas, en las cepas Cajamarca (resistente) y las de Australia Sunny Corner (susceptible), Gireke (resistente) y Tallangata (resistente).

5.2. Recomendaciones

1. Realizar estudios con un mayor número de especímenes adultos de *F. hepatica*, así como con especímenes en sus formas juveniles.
2. Aplicar la tecnología de la PCR cuantitativa para evaluar la expresión diferencial de las SAPs, en especímenes adultos y juveniles de *F. hepatica*.
3. Hacer estudios con oligonucleótidos que abarquen mayor longitud de la secuencia de nucleótidos para ambas enzimas (FhSAP1 y FhSAP2).

LISTA DE REFERENCIAS

- (1) Robinson MW, Dalton JP. Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiasis. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* 2009; 364:2763-76.
- (2) Toledo R, Bernal MD, Marcilla A. Proteomics of foodborne trematodes. *Journal of Proteomics* 2011; 74(9):1485-503.
- (3) Bernardo CdC, Carneiro MB, Avelar BR, Donatele DM, Martins IFM, Pereira MJS. Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economics losses. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2011; 20(1):49-53.
- (4) Nyindo M, Lukambagire A-H. Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. *BioMed Research International* 2015; 2015.
- (5) Espinoza JR, Terashima A, Herrera-Velit P, Marcos LA. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 2010; 27(4):604-12.
- (6) Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M, et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology* 2013; 195(1-2):118-21.
- (7) Marcos LA, Maco V, Terashima A, Samalvides F, Miranda E, Tantalean M, et al. Hiperendemicidad de Fasciolosis humana en el Valle del Mantaro, Perú: Factores de riesgo de la Infección por *Fasciola hepatica*. *Revista de Gastroenterología del Perú* 2004; 24(2):158-64.
- (8) Ortiz P, Cabrera M, Jave J, Claxton J, Williams D. Human fascioliasis: prevalence and treatment in a rural area of Peru. *Infectious Disease Review* 2000; 2(1):42-6.
- (9) Marcos L, Romaní L, Florencio L, Terashima A, Canales M, Nestares J, et al. Zonas Hiperendémicas y Mesoendémicas de la Infección por *Fasciola hepatica* aledañas a la Ciudad de Lima: Una Enfermedad Emergente? *Revista de Gastroenterología del Perú* 2007; 27(1):31-6.
- (10) González LC, Esteban JG, BARGUES MD, Valero MA, Ortiz P, Náquira C, et al. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Tropica* 2011; 120(1-2):119-29.

- (11) Marcos LA, Terashima A, Canales M, Espinoza JR, Gotuzzo E. La infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una enfermedad emergente. *Revista de Gastroenterología del Perú* 2007; 27(4):389-96.
- (12) Mas-Coma S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of Helminthology* 2005; 79:207-16.
- (13) Rinaldi L, Gonzáles S, Guerrero J, Aguilera LC, Musella V, Genchi C, et al. A One-Health integrated approach to control fascioliasis in the Cajamarca valley of Peru. *Geospatial Health* 2012; 6(3):S67-S73.
- (14) Marcos LA, Terashima A. Update on human fascioliasis in Peru: diagnosis, treatment and clinical classification proposal. *Neotropical Helminthology* 2007; 1(2):85-103.
- (15) Winkelhagen A, Mank T, de Vries PJ, Soetekouw R. Apparent triclabendazole-resistant human *Fasciola hepatica* infection, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 2012; 18(6):1028-9.
- (16) Gil L, Díaz A, Rueda C, Martínez C, Castillo D, Apt W. Resistant human fascioliasis: report of four patients. *Revista médica de Chile* 2014; 142(10):1330-3.
- (17) Cabada MM, Lopez M, Cruz M, Delgado JR, Hill V, White AC. Treatment failure after multiple courses of Triclabendazole among patients with Fascioliasis in Cusco, Peru: A case series. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2016; 10(1):e0004361.
- (18) Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP, Andrews SJ. Induction of Protective Immunity in Cattle against Infection with *Fasciola hepatica* by Vaccination with Cathepsin L Proteinases and with Hemoglobin. *Infection and Immunity* 1996; 64(12):5066-74.
- (19) Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PM. Liver fluke vaccines: Vaccination Against Fasciolosis by a Multivalent Vaccine of Recombinant Stage-Specific Antigens. *Procedia in Vaccinology* 2010; 2(1):82-5.
- (20) Espino AM, Osuna A, Gil R, Hillyer GV. *Fasciola hepatica*: Humoral and cytokine responses to a member of the saposin-like protein family following delivery as a DNA vaccine in mice. *Experimental Parasitology* 2005; 110(4):374-83.
- (21) Espino AM, Torres D, Morales A, Delgado B, Quetel J, Osuna A. *Fasciola hepatica*: Identification of CD4+ T-helper epitopes from the 11.5kDa saposin-like protein SAP-2 using synthetic peptides. *Experimental Parasitology* 2007; 117(1):65-73.

- (22) Espino AM, Hillyer GV. A novel *Fasciola hepatica* saposin-like recombinant protein with immunoprophylactic potential. *The Journal of Parasitology* 2004; 90(4):876-9.
- (23) Grams R, Adisakwattana P, Ritthisunthorn N, Eursitthichai V, Vichasri-Grams S, Viyanant V. The saposin-like proteins 1, 2, and 3 of *Fasciola gigantica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2006; 148(2):133-43.
- (24) Reed MB, Strugnell RA, Panaccio 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(2):297-303.
- (25) Scarcella S, Miranda-Miranda E, Solana MV, Solana H. Approach to molecular characterization of different strains of *Fasciola hepatica* using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitology Research* 2015; 114(4):1341-5.
- (26) Smooker PM, Whisstock JC, Irving JA, Siyaguna S, Spithill TW, Pike RN. A single amino acid substitution affects substrate specificity in cysteine proteinases from *Fasciola hepatica*. *Protein Science* 2000; 9:2567-72.
- (27) Baspinar S, Çelik V, Balik DT, Kaplan M. Regional Differences in the Amino Acid Sequences of *Fasciola hepatica* Cathepsin L2 from a Turkish Isolate. *Balkan Medical Journal* 2011; 28:269-73.
- (28) Wilkinson R, Law CJ, Hoey EM, Fairweather I, Brennan GP, Trudgett A. An amino acid substitution in *Fasciola hepatica* P-glycoprotein from triclabendazole-resistant and triclabendazole-susceptible populations. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2012; 186(1):69-72.
- (29) Fernandez V, Estein S, Ortiz P, Luchessi P, Solana MV, Solana H. A single amino acid substitution in isozyme GST mu in Triclabendazole resistant *Fasciola hepatica* (Sligo strain) can substantially influence the manifestation of anthelmintic resistance. *Experimental Parasitology* 2015; 159:274-9.
- (30) Brockwell Y, Elliott T, Anderson GR, Stanton R, Spithill TW, Sangster N. Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 2014; 4:48-54.
- (31) Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai T, Malone JB, et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology* 1995; 58:181-213.

- (32) González R, Pérez Ruano M, Brito S. Fasciolosis bovina. Evaluación de la principales pérdidas provocadas en una empresa ganadera. *Revista Salud Animal* 2007; 29(3):167-75.
- (33) Hossein Radfar M, Reza NS, Mohammadyari N. Bovine Fasciolosis: prevalence, relationship between faecal egg count and worm burden and its economic impact due to liver condemnation at Rudsar abattoir, Northern Iran. *Journal Parasitology Disease* 2015; 39(3):522-5.
- (34) Schweizer G, Braun U, Deplazes P, Torgerson PR. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record* 2005; 157(7):188-93.
- (35) Sariözkan S, YalÇing C. Estimating the total cost of bovine fasciolosis in Turkey. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2011; 105(6):439-44.
- (36) Ashrafi K, Bargues MD, O'Neill SM, Mas-Coma S. Fascioliasis: A worldwide parasitic disease of importance in travel medicine. *Travel Medicine and Infectious Disease* 2014; 12:636-49.
- (37) Marcos LA, Terashima A, Gotuzzo E. Update on hepatobiliary flukes: fascioliasis, opisthorchiasis and clonorchiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2008; 21:523-30.
- (38) Keiser J, Utzinger J. Emerging Foodborne Trematodiasis. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11(10):1507-14.
- (39) Fürst T, Duthaler U, Sripa B, Utzinger J, Keiser J. Trematode Infections. Liver and Lung Flukes. *Infectious Disease Clinics of North America* 2012; 26(2):399-419.
- (40) Marcos L, Maco V, Samalvides F, Terashima A, Espinoza JR, Gotuzzo E. Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2006; 100(2):158-66.
- (41) Esteban JG, González LC, Bargues MD, Angles R, Sánchez C, Náquira C, et al. High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Perú. *Tropical Medicine and International Health* 2002; 7(4):339-48.
- (42) Hotez P, Brindley P, Bethony J, King C, Pearce E, Jacobson J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 2008; 118(4):1311-21.
- (43) Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Diagnosis of human fascioliasis by stool and blood techniques: Update for the present global scenario. *Parasitology* 2014; 141(14):1918-46.

- (44) De la Torre Escudero E, Manzano-Román R, Valero L, Oleaga A, Pérez-Sánchez R, Hernández-González A, et al. Comparative proteomic analysis of *Fasciola hepatica* juveniles and *Schistosoma bovis* schistosomula. *Journal of Proteomics* 2011; 74:1534-44.
- (45) Barrett J, Jefferies JR, Bustin SA. Parasite Proteomics. *Parasitology Today* 2000; 16(9):400-3.
- (46) Knox DP. Technological advances and genomics in metazoan parasites. *International Journal for Parasitology* 2004; 34:139-52.
- (47) Jefferies JR, Campbell AM, van Rossum AJ, Barrett J, Brophy PM. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics* 2001; 1:1128-32.
- (48) Hillyer GV. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *Journal of Helminthology* 2005; 79:241-7.
- (49) Dalton JP, Neill SO, Stack CM, 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* 2003; 33:1173-81.
- (50) López-Abán J, Casanueva P, Nogal J, Arias M, Morrondo P, Diez-Baños P, et al. Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Veterinary Parasitology* 2007; 145(3-4):287-96.
- (51) Smooker PM, Steeper KR, Drew DR, Strugnell RA, Spithill TW. Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione S-transferase in *Fasciola hepatica*: effects of mode of vaccination and the cellular compartment of antigen expression. *Parasite Immunology* 1999; 21:357-64.
- (52) Smooker PM, Kennedy NJ, Steeper KR, Christopoulos H, Spithill TW. *Fasciola*: Kinetics and Quality of Humoral Responses to Fatty Acid Binding Protein and Cathepsin L Following Delivery as DNA Vaccines in Mice. *Experimental Parasitology* 2001; 97:154-60.
- (53) Figueroa-Santiago O, Delgado B, Espino AM. *Fasciola hepatica* saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; 70(3):355-61.
- (54) Espino AM, Morales A, Delgado B, Rivera F, Figueroa O, Suárez E. Partial immunity to *Fasciola hepatica* in mice after vaccination with FhSAP-2 delivered as recombinant protein or cDNA construct. *Ethnicity and Disease* 2010; 20(S1):17-23.

- (55) Cancela M, Ruétalo N, Dell'Oca N, da Silva E, Smircich P, Rinaldi G, et al. Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. BMC Genomics 2010; 11(227).
- (56) Hernández-González A, Valero ML, Pino MSd, Oleaga A, Siles-Lucas M. Proteomic analysis of in vitro newly excysted juveniles from *Fasciola hepatica*. Molecular and Biochemical Parasitology 2010; 172(2):121-8.
- (57) Robinson MW, Menon R, Donnelly SM, Dalton JP, Ranganathan S. 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 2009; 8(8):1891-907.
- (58) Cabán-Hernández K, Gaudier JF, Espino AM. Characterization and differential expression of a ferritin protein from *Fasciola hepatica*. Molecular and Biochemical Parasitology 2012; 182(1-2):54-61.
- (59) Cabán-Hernández K, Espino AM. Differential expression and localization of saposin-like protein 2 of *Fasciola hepatica*. Acta Tropica 2013; 128(3):591-7.
- (60) Wilson RA, Wright JM, de Castro-Borges W, Parker-Manuel SJ, Dowle AA, Ashton PD, et al. Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. International Journal for Parasitology 2011; 41(13-14):1347-59.
- (61) Chemale G, Morphew RM, Moxon JV, Morassuti AL, LaCourse EJ, Barrett J, et al. Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite, *Fasciola hepatica*. Proteomics 2006; 6:6263-73.
- (62) Fernandez V, Ortiz P, Solana MV, Solana H. Differential Activities of Glutathione S-Transferase Isoenzymes in Strains of *Fasciola hepatica* Susceptible and Resistant to Triclabendazole. American Journal of Animal and Veterinary Sciences 2014; 9(4):177-81.
- (63) Scarcella S, Lamenza P, Virkel G, Solana H. Expression differential of microsomal and cytosolic glutathione-S-transferases in *Fasciola hepatica* resistant at triclabendazole. Molecular and Biochemical Parasitology 2012; 181(1):37-9.
- (64) Fernandez V, Cadenazzi G, Miranda-Miranda E, Larsen K, Solana H. A Multienzyme Response is involved in the Phenomenon of *Fasciola hepatica* Resistance to Triclabendazole. Journal of Drug Metabolism & Toxicology 2015; 6(4).
- (65) Mas-Coma S, Funatsu IR, Bargues MD. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. Parasitology 2001; 123:S115-S127.

- (66) Mas-Coma S, Bargues MD. Human liver flukes: a review. *Research and Reviews in Parasitology* 1997; 53(3-4):145-218.
- (67) Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology* 2005; 35(11-12):1255-78.
- (68) Panaccio M, Trudgett A. Molecular Biology. In: Dalton JP, editor. Fascioliasis. CABI Publisher; 1999. p. 449-64.
- (69) Valero MA, Mas-Coma S. Comparative infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian Altiplano high human endemic region. *Folia Parasitologica* 2000; 47:17-22.
- (70) Cwiklinski K, Dalton JP, Dufresne PJ, La Course J, Williams D, Hodgkinson J, et al. The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biology* 2015; 16(71).
- (71) Hurtrez-Bousses S, Durand P, Jabbour-Zahab R, Guégan J-F, Meunier C, Bargues M-D, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Molecular Ecology Notes* 2004; 4:689-90.
- (72) Vargas D, Vega M, Gonzáles CG. Aproximación a una caracterización molecular de *Fasciola hepatica* por la técnica RAPDs-PCR. *Parasitología Latinoamericana* 2003; 58(1-2):11-6.
- (73) Walker SM, Prodöhl PA, Fletcher HL, Hanna REB, Kantzoura V, Hoey EM, et al. Evidence for multiple mitochondrial lineages of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within infrapopulations from cattle and sheep. *Parasitology Research* 2007; 101(1):117-25.
- (74) Kuk S, Kaplan M, Ozdarendeli A, Tonbak S, Felek S, Kalkan A. *Fasciola hepatica* cathepsin L1 from a Turkish isolate is related to Asiatic isolates. *Acta Parasitologica* 2005; 50(3):244-8.
- (75) Walker SM, Johnston C, Hoey EM, Fairweather I, Borgsteede FHM, Gaasenbeek CPH, et al. Population dynamics of the liver fluke, *Fasciola hepatica*: the effect of time and spatial separation on the genetic diversity of fluke populations in the Netherlands. *Parasitology* 2011; 138:215-23.
- (76) Bruhn H, Leippe M. Novel putative saposin-like proteins of *Entamoeba histolytica* different from amoebapores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2001; 1514(1):14-20.

- (77) Bruhn H. A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochemical Journal* 2005; 389:249-57.
- (78) Dzik JM. Molecules released by helminths parasites involved in host colonization. *Acta Biochimica Polonica* 2006; 53(1):33-64.
- (79) Kueakhai P, Changklungmoa N, Chaithirayanon K, Songkoomkrong S, Riengrojpitak S, Sobhon P. Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant saposin-like protein 2 of *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica* 2013; 125(2):157-62.
- (80) Espino AM, Hillyer GV. Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family. *The Journal of Parasitology* 2003; 89(3):545-52.
- (81) Changklungmoa N, Chaithirayanon K, Kueakhai P, Meemon K, Riengrojpitak S, Sobhon P. Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase from *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology* 2012; 131(3):283-91.
- (82) Smith AM, Dowd AJ, Heffernan M, Robertson CD, Dalton JP. *Fasciola hepatica*: A secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin. *International Journal for Parasitology* 1993; 23(8):977-83.
- (83) O'Neill SM, Parkinson M, Strauss W, Angles R, Dalton JP. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fasciolosis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1998; 58:417-23.
- (84) Cornelissen JBWJ, Gaasenbeek CPH, Boersma W, Borgsteede FHM, van Milligen FJ. Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a highly specific peptide-based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *International Journal for Parasitology* 1999; 29(5):685-96.
- (85) Torres D, Espino AM. Mapping of B-cell epitopes on a novel 11.5-kilodalton *Fasciola hepatica*-*Schistosoma mansoni* cross-reactive antigen belonging to a member of the *F. hepatica* saposin-like protein family. *Infection and Immunity* 2006; 74(8):4932-8.
- (86) Reed MB, Spithill TW, Strugnell RA, Panaccio M. *Fasciola hepatica*: stage-specific expression of novel gene sequences as identified by differential display. *Experimental Parasitology* 1998; 89:169-79.
- (87) Hillyer GV. Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis. In: Dalton JP, editor. *Fasciolosis*. CABI Publisher; 1999. p. 435-47.

- (88) Gaasenbeek CPH, Moll L, Cornelissen JBWJ, Vellema P, Borgsteede FHM. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology* 2001; 95(1):37-43.
- (89) Torgerson PR, Schnyder M, Hertzberg H. Detection of anthelmintic resistance: a comparison of mathematical techniques. *Veterinary Parasitology* 2005; 128(3-4):291-8.
- (90) Taylor MA, Hunt KR, Goodyear KL. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology* 2002; 103(3):183-94.
- (91) Ryan LA, Hoey E, Trudgett A, Fairweather I, Fuchs M, Robinson MW, et al. *Fasciola hepatica* expresses multiple α - and β -tubulin isotypes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2008; 159(1):73-8.
- (92) Fairweather I. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? *Veterinary Parasitology* 2011; 180(1-2):133-43.
- (93) Brennan GP, Fairweather I, Trudgett A, Hoey E, McCoy, McConville M, et al. Understanding triclabendazole resistance. *Experimental and Molecular Pathology* 2007; 82(2):104-9.
- (94) Lymbery AJ, Thompson RCA. The molecular epidemiology of parasite infections: Tools and applications. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2012; 181(2):102-16.
- (95) Archie EA, Ezenwa VO. Population genetic structure and history of a generalist parasite infecting multiple sympatric host species. *International Journal for Parasitology* 2011; 41(1):89-98.
- (96) Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposio on Quantitative Biology* 1986; 51:263-73.
- (97) Hunt PW, Lello J. How to make DNA count: DNA-based diagnostic tools in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology* 2012; 186(1-2):101-8.
- (98) Mahami-Oskouei M, Dalimi A, Forouzandeh-Moghadam M, Bokni MB. Molecular Identification and Differentiation of *Fasciola* Isolates Using PCR-RFLP Method Based on Internal Transcribed Spacer (ITS1, 5.8SrDNA, ITS2). *Iranian Journal of Parasitology* 2011; 6(3):35-42.
- (99) Teofanova D, Kantzoura V, Walker S, Radoslavov G, Hristov P, Theodoropoulos G, et al. Genetic diversity of liver flukes (*Fasciola hepatica*) from Eastern Europe. *Infection, Genetics and Evolution* 2011; 11:109-15.
- (100) Ai L, Weng YB, Elsheikha HM, Zhao GH, Alasaad S, Chen JX, et al. Genetic diversity and relatedness of *Fasciola* spp. isolates from different host

and geographic regions revealed by analysis of mitochondrial DNA sequences. *Veterinary Parasitology* 2011; 181(2-4):329-34.

- (101) Rokni MB, Mirhendi H, Behnia M, Fasihi HM, Jalalizand N. Molecular characterization of *Fasciola hepatica* isolates by RAPD-PCR and ribosomal ITS1 sequencing. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 2010; 12(1):27-32.
- (102) Shahbazi A, Akbarimoghaddam M, Izadi S, Ghazanchaii A, Bazmani A. Identification and genetic variation of *Fasciola* species from Tabriz, North-Western Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 2011; 6(3):52-9.
- (103) Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* 2004; 15(3):155-66.
- (104) Agrawal S. *Techniques in Molecular Biology*. 1 ed. India: International Book Distributing Co.; 2008.
- (105) Farrel RE. *RNA Methodologies Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. 4 ed. San Diego, USA: Academic Press Elsevier; 2010.
- (106) Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primer for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012; 13:134.
- (107) Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Flaircloth BC, Remm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 2012; 40(15):115.
- (108) Kueakhai P, Meemon K, Changklungmoa N, Chaithirayanon K, Riengrojpitak S, Sobhon P. Characterization and localization of saposin-like protein-2 (SAP-2) in *Fasciola gigantica*. *Parasitology Research* 2011; 108(6):1493-500.