



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**Caracterización Proteica de Intestino de *Fasciola hepatica* mediante
Electroforesis 2D Bidimensional**

TESIS

Para optar el Título Profesional de

MÉDICO VETERINARIO

Presentada por

DIANA ARACELI MARLO JAVIER

Asesor:

Dr. Severino Torrel Pajares

CAJAMARCA- PERÚ

2018



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Cajamarca, siendo las once horas del día quince de noviembre del dos mil dieciocho, se reunieron en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias "César Bazán Vásquez" de la Universidad Nacional de Cajamarca, los integrantes del Jurado Calificador, designados por el Consejo de Facultad, con el objeto de evaluar la sustentación de Tesis Titulada: **"CARACTERIZACIÓN PROTEICA DE INTESTINO DE *Fasciola hepatica* MEDIANTE ELECTROFORESIS 2D BIDIMENSIONAL"**, asesorada por el docente: **Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares** y presentada por la Bachiller en Medicina Veterinaria: **DIANA ARACELI MARLO JAVIER**.

Acto seguido el Presidente del Jurado procedió a dar por iniciada la sustentación, y para los efectos del caso se invitó a la sustentante a exponer su trabajo.

Concluida la exposición de la Tesis, los miembros del Jurado Calificador formularon las preguntas que consideraron convenientes, relacionadas con el trabajo presentado; asimismo, el Presidente invitó al público asistente a formular preguntas concernientes al tema.

Después de realizar la calificación de acuerdo a las Pautas de Evaluación señaladas en el Reglamento de Tesis, el Jurado Calificador acordó: **APROBAR** la sustentación de Tesis para optar el Título Profesional de **MÉDICO VETERINARIO**, con el Calificativo Final obtenido de **DIECISÉIS (16)**.

Siendo las doce horas del mismo día, el Presidente del Jurado Calificador dio por concluido el proceso de sustentación.

Dr. PEDRO LUIS ORTIZ OBLITAS
PRESIDENTE

Dr. RODOLFO GUSTAVO GAMARRA RAMIREZ
SECRETARIO

Dr. JUAN DE DIOS ROJAS MONCADA
VOCAL

Dr. TEÓFILO SEVERINO TORREL PAJARES
ASESOR



DEDICATORIA

Gracias a todas las personas importantes en mi vida, aquellas que siempre estuvieron conmigo para brindarme su apoyo incondicional. Me toca retribuir con un poco de todo lo que me han dado.

Con todo mi amor dedico esta tesis a Dios, por darme la vida, guiar mis pasos y permitirme culminar mi carrera.

A mis padres Lizardo Marlo e Idalia Javier, por todo su amor y esfuerzo para hacer de mí una mejor persona.

A mi esposo Eduardo Girón, por estar a mi lado en los momentos difíciles y alentarme a no rendirme para así culminar con esta tesis.

A mis hijos Dayron Jarick y Nicoll Estefania, por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y a así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

EL AUTOR



AGRADECIMIENTO

A Dios Padre, por haberme guiado durante todo el desarrollo y la culminación de la carrera.

Mi agradecimiento al PNIA, por el financiamiento para la ejecución del presente trabajo de Investigación.

A mi asesor el Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares por su apoyo en la realización de esta tesis y mi coasesor Dr. Marco Cabrera Gonzales.

Al Dr. Cristhian Hoban V. por la orientación, supervisión y seguimiento continuo que ha sabido brindarme; pero, sobre todo, por su motivación y apoyo generoso que me condujeron a la culminación satisfactoria de esta investigación.

Mi reconocimiento a la Universidad Peruana Cayetano Heredia por prestar las instalaciones y equipamiento especializado para la ejecución de los ensayos del presente estudio, al Prof. Mirko Zimic responsable del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular y al Blgo. Ricardo Antiparra V. por su colaboración y sus valiosos aportes a este estudio.

A todos mis amigos que de una u otra manera contribuyeron en el trabajo de esta tesis.

EL AUTOR



RESUMEN

La fascioliasis causada por el trematodo *Fasciola hepatica* es una infección parasitaria zoonótica importante de la ganadería en muchos países. Por ello y dada la importancia de la fascioliasis animal y humana en Cajamarca se planteó realizar el estudio sobre el perfil proteico de las proteínas de intestino de *Fasciola hepatica*, mediante el método de Electroforesis 2D Bidimensional. Los trabajos de investigación se desarrollaron en el Laboratorio de Bioinformática y Biología molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. La muestra de proteína de intestino de *Fasciola hepatica* se corrió en una primera dimensión en tiras de Poliacrilamida Immobiline™ DryStrip gels de 7cm, pH 3-10 NL, mediante Isoelectroenfoco (IEF), se realizó una segunda dimensión SDS-PAGE, en gel de Poliacrilamida al 15%. Para visualizar los "spots" se empleó la tinción Coomassie Brilliant Blue; la imagen del gel fue analizada con el software GelAnalyzer 2010®. Como resultado del análisis del gel 2D de intestino de *Fasciola hepatica* se identificaron 84 spots con diferentes pesos moleculares, enfocadas en distintos puntos isoeléctricos (pI) en un rango de 6-9.8. Este estudio de caracterización proteica de intestino de *Fasciola hepatica*, es necesario como línea base para futuros trabajos de investigación, así mismo como herramientas de diagnóstico y nuevas alternativas para tratamientos específicos contra este parásito.

Palabras clave: Electroforesis 2D, proteínas de Intestino *Fasciola hepatica*, bovinos, Cajamarca.



ABSTRACT

Fascioliasis caused by the fluke *Fasciola hepatica* is an important zoonotic parasitic infection of livestock in many countries. Therefore, given the importance of animal and human fascioliasis in Cajamarca, it was proposed to perform the study on the protein profile of *Fasciola hepatica* intestine proteins, by means of the Bidimensional 2D Electrophoresis method. The research works were developed in the Bioinformatics and Molecular Biology Laboratory of the Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. The *Fasciola hepatica* intestine protein sample was run in a first dimension in strips of Polyacrylamide Immobiline™ DryStrip gels of 7cm, pH 3-10 NL, by means of Isoelectric focusing (IEF), a second dimension SDS-PAGE was performed, in gel 15% polyacrylamide. To visualize the spots, the Coomassie Brilliant Blue stain was used; the image of the gel was analyzed with the GelAnalyzer 2010® software. As a result of the 2D gel analysis of *Fasciola hepatica* intestine, 84 spots with different molecular weights were identified, focused on different isoelectric points (pI) in a range of 6-9.8. This study of protein characterization of *Fasciola hepatica* intestine is necessary as a baseline for future research work, as well as diagnostic tools and new alternatives for specific treatments against this parasite.

Key words: 2D electrophoresis, proteins of the intestine *Fasciola hepatica*, bovine, Cajamarca.



LISTA DE ABREVIACIONES

- **E/S** : producto de excreción y secreción de *Fasciola hepatica*
- **CatL** : Catepsina L
- **kDa** : kilodaltons
- **IEF** : Isoelectroenfoque
- **mA** : miliamperios
- **mM** : milimolar
- **mg** : miligramo
- **ml** : mililitro
- **NEJ** : juveniles recién excitados
- **NL** : No lineal
- **PBS** : fosfato buffer salino
- **PM** : peso molecular
- **pI** : punto isoeléctrico
- **rpm** : revoluciones por minuto
- **SDS** : sulfato dodecil sódico
- **SDS-PAGE**: Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
- **Strip IPG**: tiras de Poliacrilamida Immobiline Gels™
- **Spots**: manchas de proteína
- **µl** : microlitro
- **2-DE** : electroforesis Bidimensional



ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

CAPÍTULO I 1

INTRODUCCIÓN 1

OBJETIVOS..... 2

1.1. Objetivo general. 2

CAPÍTULO II..... 3

MARCO TEÓRICO 3

2.1. Antecedentes teóricos de la investigación 3

2.2 Fascioliasis..... 5

2.3 Etiología 5

2.4 Taxonomía..... 5

2.5 Características Morfológicas. 5

2.6 Morfología del Intestino de *Fasciola hepatica*..... 6

2.7 Ciclo de vida 6

2.8 Proteínas de *Fasciola hepatica* 8

2.9 La Proteómica 10

2.10 Electroforesis de Proteínas..... 10

2.11 Electroforesis 2DE: Isoelectroenfoco (IEF) y SDS-PAGE 11

CAPÍTULO III 13

MATERIALES Y MÉTODOS 13

3.1. Localización..... 13



3.2. Materiales.....	14
3.3. Metodología:.....	17
3.4. Análisis estadístico.....	24
CAPÍTULO IV	25
RESULTADOS	25
CAPÍTULO V	29
DISCUSIÓN	29
CAPÍTULO VI	32
CONCLUSIONES	32
CAPÍTULO VII	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS	45
Anexo 1. Programación de voltajes en Sistema de Isoelectroenfoque PROTEAM IEF CELL®	45
Anexo 2. Reactivos para la preparación de Agarosa Sealing solution.	45
Anexo 3. Buffer de corrida para electroforesis 2DE Tris-glycine 10x.....	46
Anexo 4. Solución colorante Coomassie Brilliant Blue G-250.	46
Anexo 5. Solución decolorante.....	46
Anexo 6. Fotografías del proceso que se siguió para la metodología de la tesis.....	47
Fotografía 1. <i>Fasciola hepatica</i> en el estereomicroscopio.	47
Anexo 7. Análisis estadístico de los pesos moleculares de las proteína de intestino de <i>Fasciola hepatica</i>	52



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La fascioliasis es una enfermedad hepática que se caracteriza por la inflamación del hígado y de los conductos biliares, frecuentemente de carácter crónico, acompañado de trastornos nutritivos; que afecta al hombre y a numerosos mamíferos, tanto domésticos como silvestres entre ellos bovinos, ovinos, caprinos, camélidos, equinos, cerdos, conejos (Manga, 1999). La infección por *Fasciola hepatica* es considerada en el Perú como una enfermedad parasitaria emergente en la salud pública (Marcos *et al.*, 2007).

En el Perú, las más altas prevalencias de fascioliasis son en la sierra, principalmente en los valles andinos de Cajamarca, Junín, Cusco y Arequipa (Marcos *et al.*, 2005; Espinoza *et al.*, 2005). En la provincia de Cajamarca una de las cuencas lecheras más importantes del Perú, la fascioliasis constituye un problema importante, se han realizado estudios que demuestran una alta prevalencia de fascioliasis bovina; 80,8 % (Rojas, 2009).

Las pérdidas económicas producidas por la fascioliasis tienen influencia directa en la economía, debido a la reducción de la producción de leche, carne, decomisos de órganos en el camal además de costos asociados en su tratamiento antihelmíntico (Cordero *et al.*, 2002).

Actualmente en la región Cajamarca se ha determinado mediante diversos estudios que el parásito muestra resistencia antihelmíntica a fármacos utilizados en su control (Ortiz *et al.*, 2013), por lo que es necesario encontrar nuevas alternativas de lucha frente a este parásito, el desarrollo de una vacuna es una estrategia que podría controlar eficazmente el problema de la fascioliasis



(Mulcahy *et al.*, 1998; Dalton *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2006), sin embargo no es posible desarrollarla ya que se encuentra en una etapa experimental (Quiroz, 2011) y debido a vacíos de conocimiento sobre las características de las proteínas de *Fasciola hepatica* ya que estas son biomoléculas que participan en muchas funciones vitales del parásito (Fernández *et al.*, 2012).

Se han identificado proteínas de *Fasciola hepatica* involucradas en diferentes procesos biológicos, muchos de los cuales representan hallazgos originales para este organismo, así mismo son importantes para la supervivencia del parásito dentro del huésped y son candidatas a objetivos terapéuticos (Di Maggio *et al.*, 2016).

Es así que los estudios en proteómica han desarrollado avances progresivos; sin embargo en el Perú no se han realizado estudios de caracterización de las proteínas de intestino de *Fasciola hepatica*; por ello y dada la importancia de la fascioliasis animal y humana en la región Cajamarca se planteó realizar la caracterización del perfil proteico de intestino de *Fasciola hepatica*, mediante el método de Electroforesis 2D Bidimensional, con la finalidad de obtener nuevas herramientas de diagnóstico y alternativas para tratamientos específicos; este estudio será necesario como línea base para futuros trabajos de investigación.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo general.

Determinar el perfil proteico de las proteínas de intestino de *Fasciola hepatica* mediante el método de Electroforesis 2D Bidimensional.



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes teóricos de la investigación

En las últimas décadas muchos estudios realizados se centran en la identificación de las moléculas del parásito *Fasciola hepatica* como objetivos potenciales para nuevos tratamientos específicos y/o herramientas de diagnóstico, así como nuevas dianas de vacunas para la helmintiasis (Hotez *et al.*, 2008).

El trabajo de Dalton y Heffernan (1989), Yamasaki *et al.*, (1989), Smith *et al.*, (1993) y Wijffels *et al.*, (1994) demostraron que las cisteínas proteasas secretadas liberadas por *Fasciola hepatica* adulta son predominantemente de masa molecular aparente de 27-28 kDa.

Jefferies *et al.*, (2001) realizaron un análisis proteómico de los productos excretos y secretos (E/S) de *Fasciola hepatica* adulta, utilizando la técnica de electroforesis en gel bidimensional 2-DE, encontraron 60 proteínas prominentes de las cuales identificaron 29 proteínas.

Robinson *et al.*, (2009) en un estudio que combina datos transcriptómicos y proteómicos, se predijeron 160 proteínas secretadas; sin embargo, solo se encontraron 22 proteínas en trematodos adultos y se detectaron 29 proteínas en secreciones de juveniles recién excitados (NEJ) de *Fasciola hepatica* usando un enfoque proteómico 2-DE.

En 2011, un estudio sobre el acetilcolina de *Fasciola hepatica* adulta identificó 63 proteínas (Wilson *et al.*, 2011), mientras que en un artículo



publicado en el 2015 los autores identificaron 69 proteínas en vesículas extracelulares de *Fasciola hepatica* (Cwiklinski *et al.*, 2015).

Los avances en proteómica han facilitado la caracterización detallada de las moléculas de helmintos, este enfoque ha revelado que los helmintos secretan una amplia gama de proteínas; además, producen moléculas no proteicas (Robinson *et al.*, 2013).

Di Maggio *et al.*, (2016) proporcionaron un análisis proteómico en profundidad de la composición de proteínas en las etapas de vida de *Fasciola hepatica* dentro del mamífero, esta caracterización representa el mayor número de proteínas identificadas hasta la fecha para el endoparásito. Identificaron en total 689 proteínas; 575 proteínas solubles somáticas NEJ de *Fasciola hepatica*, 90 proteínas en los productos excreción y secreción (E/S) de NEJ y 202 proteínas en productos E/S de *Fasciola hepatica* adulta. Este estudio reveló la presencia de proteínas involucradas en diferentes procesos biológicos.

Estudios de investigación han caracterizado las proteínas secretadas por el parásito *Fasciola hepatica*, así como los productos de secreción/excreción (FhESP) (Ortiz *et al.*, 2000), Catepsina L1 (FhCL1) (Dalton *et al.*, 2003; O'Neill *et al.*, 2001), Glutación S Transferasa (GST) (Sexton *et al.*, 1994; Dowling *et al.*, 2010), Peroxirredoxin (FhPrx) (Donnelly *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2010).

Por electroforesis bidimensional se demostró que la Catepsina L (CatL) tiene naturaleza heterogénea, sin embargo, se han caracterizado dos formas importantes: CatL1 y CatL2 (Smith *et al.*, 1993; Dowd *et al.*, 1994). Estas dos enzimas tienen distintas características fisicoquímicas (tamaño molecular, pH óptimo) y especificidad de sustrato (Dowd *et al.*, 1994).



2.2 Fascioliasis

Enfermedad parasitaria que se debe a la presencia y acción del trematodo *Fasciola hepatica* en el parénquima y conductos biliares de bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados, otros animales silvestres y del hombre (Quiroz, 2011). Es una inflamación del hígado y de los conductos biliares, frecuentemente de proceso crónico que produce trastornos nutritivos (Manga, 1999).

2.3 Etiología

Fasciola hepatica, es un helminto hermafrodita de cuerpo ancho y aplanado dorso ventralmente (Manga, 1999).

2.4 Taxonomía

Clasificación taxonómica, según (Soulsby, 1987).

- Phylum: Platyhelminthes,
- Clase: Trematoda,
- Sub clase: Digenea,
- Familia: Fasciolidae,
- Género: Fasciola,
- Especie: hepatica.

2.5 Características Morfológicas.

El parásito adulto tiene un cuerpo aplanado dorso ventralmente de forma foliácea y ancha anteriormente, formando un cono posterior, mide de 18 a 50 por 4 a 14 mm (Quiroz, 2011); el tegumento está cubierto por numerosas espinas dirigidas hacia atrás (Urquhart *et al.*, 2001); posee una ventosa oral en el extremo superior y otra ventral a la altura de los hombros; el tubo digestivo se bifurca a poca distancia de la ventosa oral (Quiroz, 2011); los dos testículos ocupan la parte media corporal y el ovario al igual que útero están localizados anteriormente a los testículos (Manga, 1999). El tracto alimentario se puede dividir en dos regiones distintas: el intestino anterior, que comprende la boca, la faringe y el esófago, y posterior los ciegos intestinales cuyos divertículos laterales son altamente ramificados en la fasciola adulta (Dalton, 1999).



2.6 Morfología del Intestino de *Fasciola hepatica*

La importancia sobre la morfología del intestino de *Fasciola hepatica* está confinada a los ciegos, el revestimiento epitelial de los ciegos consiste en una sola capa continua de células de un tipo básico; las células en la fase secretora se caracterizan por la presencia de muchas vesículas secretoras densas, complejos de Golgi abundantes y activos, una red extensa de cisternas de Retículo endoplasmático granular (GER) y numerosas mitocondrias, características típicas de una célula secretora activa; los principales intestinos, ciegos muestran algunos signos de actividad secretora y autofágica, pero su función principal parece estar asociada con el movimiento del material hacia adelante y hacia atrás dentro del lumen de los ciegos principales y sus divertículos (Robinson y Threadgold, 1975). La actividad secretora en las células intestinales del parásito adulto se ha estudiado mediante autorradiografía de pulso-persecución que implica aminoácidos tritiados (tirosina, metionina, leucina y fenilamina) (Hanna, 1975). Las enzimas proteolíticas capaces de escindir hemoglobina e inmunoglobulinas han sido aisladas y parcialmente caracterizadas de productos excretores/secretores (E/S) (Dalton y Heffernan, 1989, Rege *et al.*, 1989). El parásito también posee enzimas proteinasas capaces de escindir sustratos de tripsina y quimotripsina a pH alcalino; la especificidad del sustrato de las enzimas indica papeles en la nutrición (en la digestión de los glóbulos rojos ingeridos) y en la evasión inmune (al evitar la unión mediada por anticuerpos de las células efectoras inmunes) (Hadjú *et al.*, 1979). *Fasciola hepatica* produce diferentes enzimas en diferentes etapas de desarrollo y esto puede estar asociado con cambios en el ambiente y la dieta durante la migración del trematodo y puede vincularse con los cambios morfológicos en el intestino que acompañan el desarrollo que se han descrito anteriormente (Dalton, 1999).

2.7 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Fasciola hepatica* consta de cinco fases: el paso de los huevos del huésped al entorno exterior y su posterior desarrollo; eclosión de miracidios, su búsqueda y penetración del huésped intermedio,



generalmente *Lymnaea truncatula* (caracol); desarrollo y multiplicación de los parásitos dentro del caracol; aparición de las cercarias en los caracoles y su enquistamiento; ingestión de metacercarias infecciosas por los huéspedes finales y desarrollo a gusanos adultos (Dalton, 1999).

Los huevos de *Fasciola hepatica* pasan del conducto biliar al duodeno y posteriormente son liberados en las heces, los huevos necesitan de varios factores fisicoquímicos para su desarrollo completo, especialmente la temperatura y la humedad (Thomas, 1883). El tiempo de desarrollo y nacimiento del miracidio dependen en gran parte de la temperatura, a 26°C eclosionan en 9 días, la acción fototrópica pasiva de la mancha ocular atrae al miracidio hacia la superficie del agua, nada activamente hasta que llega a un caracol del género *Lymnaea* (Quiroz, 2011).

Los miracidios pierden los cilios cuando penetran en el molusco y se transforman en esporocistos jóvenes, estos constituyen el primer estado larvario de *Fasciola hepatica* dentro del hospedador intermediario y se encuentran en la región periesofágica del caracol; a los 15 días ya existe una generación de redias (segundo estadio larvario intramolusco), se alimentan de los tejidos del hepatopáncreas del caracol; las redias dan lugar a las cercarias, este proceso se lleva a cabo generalmente de 8–10 semanas (Manga, 1999).

Las cercarias se enquistan en la hierba, el enquistamiento también puede tener lugar en la superficie del agua (Wright, 1927). La cola se separa del cuerpo y libera la capa externa del quiste, esta fase se denomina metacercaria, es la forma infectante para los hospedadores definitivos que ingresa por vía oral y en el intestino se desenquista y se transforma en forma juvenil, atraviesa el intestino, pasa a la cavidad peritoneal, migra hasta el hígado, luego se aloja en los canalículos biliares madura sexualmente y aproximadamente dos semanas después de la fecundación comienza a oviponer (Vignau *et al.*, 2005).



2.8 Proteínas de *Fasciola hepatica*

Fasciola hepatica, depende de la actividad proteolítica para muchas de sus actividades funcionales fundamentales en el huésped, incluida la penetración de tejidos, la migración, la alimentación y la evasión inmune (Dalton *et al.*, 2013). La comprensión de las proteasas y otras proteínas secretadas por *Fasciola hepatica* ha mejorado enormemente por la disponibilidad de datos del proteoma (Jefferies *et al.*, 2001; Morphew *et al.*, 2007). Se han descrito varios tipos de proteasas en *Fasciola hepatica*, que se utilizan en la degradación proteica para proporcionar sustratos con fines biosintéticos (Carmona *et al.*, 1993).

a) Glutación S-Transferasa (GST)

Las glutación S-transferasa, comprenden una familia de isoenzimas implicadas en la detoxificación celular de una amplia gama de sustratos químicos; las GSTs citosólicas de células de mamífero son enzimas dímeras funcionales compuestas de subunidades idénticas o no idénticas de 24-29 kDa; seis clases de GSTs citosólicas se han caracterizado (alfa, mu, pi, theta, sigma y kappa) (Meyer *et al.*, 1991; Pemble *et al.*, 1996). Las GSTs son muy abundantes y están presentes en todos los parásitos helmínticos caracterizados hasta la fecha (Brophy *et al.*, 1990). Tales altos niveles de GST infieren un papel importante para estas enzimas en la homeostasis y supervivencia del helminto y esto puede estar relacionado con el "tegumento desnudo" de los parásitos helmintos y su posible exposición a una amplia gama de xenobióticos (Brophy y Pritchard, 1994).

b) Catepsina L (FhCL)

Estas enzimas se almacenan como zimógenos inactivos (proenzimas) dentro de las vesículas secretoras de las células epiteliales gastrodérmicas y posteriormente se secretan en la luz del intestino del parásito en grandes cantidades, antes de ser liberadas externamente en los tejidos del huésped (Dalton y Heffernan, 1989; Collins *et al.*, 2004). *Fasciola hepatica* contiene una gran cantidad de enzimas proteolíticas, en particular en el material excretor-secretor (E/S), que se puede recoger



fácilmente del parásito adulto in vitro, esto fue demostrado por primera vez por Thorsell y Bjorkman (1965); los primeros experimentos demostraron que la actividad proteolítica en el material E/S era de la familia de cisteína proteasa (Chapman y Mitchell, 1982). Las cisteínas proteasas comprenden una gran familia con varias clases; la catepsina L y la Catepsina B, en particular se han estudiado en relación con la invasión del parásito, la alimentación, la evasión inmune y el potencial de vacuna (Knox, 1994). En *Fasciola hepatica*, se ha propuesto que las proteasas de catepsina L desempeñan varias funciones funcionales, incluida la promoción de la penetración tisular (Howell, 1966; Beresain *et al.*, 1997), adquisición de nutrientes. (Halton, 1967; Dowd *et al.*, 1994) y la producción de huevos (Dalton *et al.*, 1996; Spithill y Morrison, 1997).

c) Inhibidor de Serina Proteinasa de tipo Kunitz (KTM)

Se ha aislado un inhibidor de serina proteinasa de tipo Kunitz (Fh-KTM) de 6751 Da que pertenece a la familia del inhibidor de tripsina pancreática bovina (Kunitz) de *Fasciola hepatica* (Bozas *et al.*, 1995). Los estudios de inmunofluorescencia e inmunoglobulinas en *Fasciola hepatica* adulta revelaron que Fh-KTM es una molécula abundante localizada en la superficie luminal del intestino y todo el tegumento externo; la abundancia de Fh-KTM y el patrón de localización intestinal y tegumental sugirieron que esta molécula podría usarse como objetivo de vacuna ya que las moléculas asociadas al intestino se han usado con éxito como vacunas contra otros parásitos chupadores de sangre como *Boophilus microplus* y *Haemonchus contortus* (Willadsen *et al.*, 1995; Munn, 1997).

d) Peroxirredoxina (FhPrx)

Los helmintos utilizan una matriz de antioxidantes para la protección contra el estrés oxidativo (McGonigle y Dalton, 1995). Los análisis inmunocitoquímicos han revelado que Peroxirredoxina de *Fasciola hepatica* (FhPrx) está localizado en el epitelio intestinal de este parásito (Robinson *et al.*, 2013) y los estudios proteómicos han demostrado que, a pesar de carecer de un péptido señal N-terminal predicho, *Fasciola hepatica* secreta Peroxirredoxina FhPrx (Robinson *et al.*, 2009).



2.9 La Proteómica

La proteómica, se define como la disciplina que detalla idealmente el proteoma, analizando los niveles y la estructura de todas las proteínas presentes, incluyendo sus modificaciones pos traduccionales que tienen lugar en la vida de una célula o tejido (Honore' y Østergaard, 2003). El término "proteoma" fue acuñado en la década de 1990 para describir el conjunto de proteínas de una célula, tejido u organismo (Graves y Haystead, 2002; Gil, 2003). Las proteínas tienen una gran importancia, desempeñan varias funciones en el organismo y actúan como enzimas, anticuerpos, hormonas, componentes estructurales, indicadores celulares y varias otras funciones (Silva e Silva *et al.*, 2007).

Las diferentes técnicas de la proteómica han sido útiles para la comparación de proteomas y subproteomas (secretoma, proteínas de superficie, etc.) en microorganismos con el objetivo de encontrar proteínas altamente inmunogénicas, factores de virulencia, proteínas responsables de la producción de solventes o de la degradación de celulosa, así como proteínas responsables de la interacción hospedero patógeno; también para la caracterización de especies y la comparación de diferentes cepas y líneas clonales; así mismo se ha utilizado para el estudio de los mecanismos de acción de diferentes fármacos y la comparación de proteínas involucradas en diferentes rutas metabólicas (Sali *et al.*, 2003). La proteómica representa, por los motivos expuestos, una de las formas más eficientes de investigar las funciones y los procesos metabólicos de las proteínas producidas por las células y para el estudio funcional de los genes de organismos complejos (Silva e Silva *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2005).

2.10 Electroforesis de Proteínas

La electroforesis es un método de separación de proteínas que se basa en la movilidad de las biomoléculas en una fase líquida sometida a un campo eléctrico; las moléculas que posean carga negativa migrarán hacia el polo positivo de un aparato electroforético y viceversa (Smithies, 1955). La electroforesis de proteínas se utiliza para la purificación de proteínas o

determinación de la pureza, para determinar el tamaño, punto isoeléctrico (pI), y la actividad enzimática, o para proporcionar datos sobre la regulación de la expresión de proteínas (Dunn, 1993). La separación de las macromoléculas se lleva a cabo aplicando una capa delgada de una muestra a una matriz porosa; la poliacrilamida es la matriz más común para separar proteínas y proteínas pequeñas; durante la electroforesis, la movilidad depende de la carga, forma y tamaño de las moléculas, está influenciado por el tipo, la concentración y el pH del tampón, así mismo por la temperatura y la intensidad del campo; esta técnica se usa principalmente para el análisis y la purificación de moléculas grandes, como proteínas y ácidos nucleicos (Westermeier, 2002). Los campos principales de la aplicación de la electroforesis son la investigación biológica y bioquímica, la química de proteínas, la farmacología, la medicina forense, las investigaciones clínicas y la ciencia veterinaria, así como la biología molecular (Westermeier *et al.*, 2008).

2.11 Electroforesis 2DE: Isoelectroenfoque (IEF) y SDS-PAGE

En 1975 O'Farrell y otros investigadores demostraron que las proteínas podían separarse utilizando dos dimensiones, la primera, por isoelectroenfoque (IEF) de acuerdo con el punto isoeléctrico (PI) y la segunda según su masa molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida (O'Farrell, 1975). Esta metodología tiene un poder de resolución superior al de muchas otras utilizadas para el análisis de mezclas de proteínas extraídas de muestras complejas (tejidos, sangre, cultivos de microorganismos, cultivos de línea celular, etc.) y permite la visualización de miles de proteínas al mismo tiempo. El mayor problema de esta metodología era la reproducibilidad, debida principalmente a los gradientes de anfólitos utilizados para el IEF, estos inconvenientes se solucionaron con la aparición de los gradientes de pH inmovilizados en poliacrilamida IPG del inglés immobilized pH gradients (Bjellqvist *et al.*, 1982). Estas moléculas conocidas comercialmente como immobilines permiten preparar gradientes de pH desde 2,5 hasta 12, así se pueden tener rangos amplios (3-10) en los que se corre una muestra dada (Gorg *et al.*, 1999). La reproducibilidad, la facilidad de hacer comparaciones entre



muestras y la posibilidad de separar proteínas punto por punto en un gel micro preparativo, ha situado la metodología de separación de proteínas en geles de dos dimensiones (2D-PAGE) entre una de las más usadas e importantes técnicas para estudios en proteómica, enfocados a resolver preguntas biológicas (Rabilloud, 2002). Existen diferentes aproximaciones para obtener geles de proteínas de dos dimensiones; en resumen, la técnica consiste en utilizar tiras de geles equilibrados con gradientes inmobilizados de pH en el rango deseado para hacer el IEF, las cuales se rehidratan e impregnan con la muestra, ésta última disuelta en un buffer conteniendo úrea, un detergente no iónico, un agente reductor y anfólitos (O'Farrell, 1975; Rabilloud, 1996; Gorg *et al.*, 2000). El IEF debe realizarse comenzando con un voltaje bajo e incrementándolo hasta alcanzar un estado estacionario en el que la separación y localización de las proteínas sea constante, después del IEF las tiras con la muestra deben equilibrarse en un buffer que contenga SDS, un agente reductor y un agente alquilante, úrea y glicerol para que la transferencia al segundo gel (SDS-PAGE) sea completa y el corrido sea homogéneo; la electroforesis vertical de la segunda dimensión debe realizarse con un voltaje constante que permita la transferencia de las proteínas, generalmente 100 a 300 voltios. Las proteínas pueden ser visualizadas con diferentes métodos de tinción (Coomassie, Coomassie coloidal, tinción de plata) o realizando detección por fluorescencia (DIGE) (Gorg *et al.*, 2000).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

El trabajo de campo se realizó recolectando los parásitos *Fasciola hepatica* en el Camal Municipal de Cajamarca. La obtención de los intestinos de *F. hepatica* se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) - EEA Baños del Inca, Cajamarca. La Electroforesis 2D Bidimensional de las proteínas del intestino de *Fasciola hepatica* se realizó en el Laboratorio de Bioinformática y Biología molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.

La ciudad de Cajamarca presenta las siguientes características geográficas y meteorológicas (*).

Altitud	: 2 536 msnm
Latitud sur	: 7° 10'
Longitud Oeste	: 78°30'
Clima	: Templado seco.
Temperatura media anual (*)	: 15.2 °C
Precipitación pluvial anual (*)	: 767.8 mm
Humedad relativa media anual (*)	: 62.66 %
Presión barométrica (*)	: 740.5 milibares.

(*) Fuente: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología SENAHI, Cajamarca. 2017.

3.2. Materiales

3.2.1. Material biológico:

- Las muestras de estudio, en esta investigación fueron *Fasciola hepatica* adultas que se recolectaron de hígados de bovinos infectados beneficiados en el Camal Municipal de Cajamarca.

3.2.2. Material de campo:

- Mandil
- Botas
- Guantes
- Mango y hoja de bisturí
- Pinzas
- Recipientes estériles
- Cámara fotográfica
- Termo

3.2.3. Materiales de laboratorio

- Placas Petri estériles
- Microtubos 1.5 ml.
- Microtubos de 200 μ l.
- Tubos Falcom de 15ml y 50ml
- Mortero
- Cubeta para hielo
- Hielo picado
- Espátula
- Termómetro
- Tips (puntas) 1000 μ l, 100 μ l, 10 μ l y 2 μ l.
- Recipiente para descartar Tips
- Guantes de Nitrilo
- Recipientes para pesar
- Frascos de vidrio de distintos volúmenes.
- Marcadores para rotular
- Picetas



- Probetas de vidrio graduadas
- Vasos de precipitado /Erlenmeyer
- Gradillas para microtubos.
- Gradillas para tubos Falcom
- Peines para electroforesis
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Lámina extensible de parafina
- Recipiente para colorear el gel.

3.2.4. Equipos de laboratorio:

- Estereomicroscopio
- Espectrofotómetro
- Centrífuga refrigerada
- Micropipetas automáticas
- Agitador magnético
- Equipo de Isoelectroenfoco (IEF)
- Cámara para Hidratación de tiras IPG
- Cámara de electroforesis vertical y accesorios.
- Fuente de poder
- Baño María
- Horno Microondas
- Vórtex
- pH metro
- Balanza analítica
- Destilador
- Incubadora
- Cabina de Flujo Laminar
- Refrigeradora
- Nanodrop

3.2.4. Reactivos

- Cloruro de sodio (NaCl)
- Hidróxido de sodio (NaOH)



- Fosfato buffer salino (PBS)
- Nitrógeno líquido
- Kit de Extracción de proteínas (BugBuster® Protein Extracción Reagent)
- Tiras de Poliacrilamida Immobiline™ DryStrip gels de 7cm, pH 3-10 NL.
- IPG Buffer pH 3-10 NL
- Solución de rehidratación DeStreak™ Rehydration Solution.
- Aceite mineral Dry Strip Cover Fluid
- Tris-HCl
- Trizma Base
- Dodecilsulfato de Sodio (SDS)
- Persulfato de amonio (APS)
- Glicina
- Glicerol
- Azul de Bromofenol
- Dithiothreitol (DTT)
- Iodoacetamida
- β -mercaptoethanol
- Sulfato de Amonio
- Acrilamida
- Bisacrilamida
- Agarosa
- Urea
- TEMED (N,N,N',N' tetrametiletlenodiamina)
- Marcador de Peso molecular
- Agua Milli-Q
- Metanol
- Ácido acético
- Coomassie Brilliant Blue
- Ac. Clorhídrico (HCL)
- Etanol Absoluto
- Alcohol 70%
- H2O destilada



3.3. Metodología:

3.3.1. Trabajo de campo (camal)

- Se procedió a examinar los hígados de los bovinos para localizar la presencia de fasciolas adultas; los parásitos fueron extraídos y colocados en frascos con cloruro de sodio al 0,9% a 37°C, seguidamente se transportaron en un termo al Laboratorio de Biotecnología y Sanidad del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) en la E.E.A Baños del Inca - Cajamarca.

3.3.2. Trabajo de laboratorio

a) Obtención de los intestinos de *Fasciola hepatica*.

- Los parásitos adultos se lavaron varias veces con cloruro de sodio al 0,9% a una temperatura de 37°C hasta eliminar el contenido intestinal. (**Anexo 6, Fotografía 1**).
- Colocar los parásitos en placas petri graduadas y con la ayuda del estereomicroscopio diseccionar los intestinos de *Fasciola hepatica*. (**Anexo 6, Fotografía 2**). Se obtuvieron un total de 20 intestinos.
- Conservar los intestinos en microtubos de 1,5 ml, rotular y almacenar en congelación a una temperatura de – 20°C, hasta su procesamiento. Se utilizaron 20 intestinos para elaborar un pool de muestra, esta cantidad es necesaria para obtener la concentración de proteína requerida 20 mg/ml para realizar la electroforesis bidimensional.

b) Fragmentación y homogenización de intestino de *Fasciola hepatica* con nitrógeno líquido.

- Colocar un microtubo con los 20 intestinos de *Fasciola hepatica* en una cubeta con hielo.
- Introducir las muestras en nitrógeno líquido a -195°C por unos 20 segundos, (repetir este paso 3 veces).
- Colocar las muestras en el mortero y homogenizar hasta que los intestinos tomen consistencia de pasta. (**Anexo 6, Fotografía 3**).
- Recolectar la pasta y colocar en microtubos nuevos de 1,5 ml.

c) Extracción de proteína con el Kit de Extracción de Proteínas (BugBuster® Protein Extraction Reagent).

- Agregar 1500 µl de PBS (Fosfato buffer salino) al microtubo con la pasta de intestinos.
- Homogenizar en el vórtex hasta disgregar la muestra.
- Centrifugar en microtubos de 1,5 ml a 14,000 g durante 10 min a 4°C.
- Decantar y dejar secar el pellet a temperatura ambiente, eliminando la mayor cantidad de líquido.
- Suspender el sedimento con el reactivo BugBuster® a temperatura ambiente por pipeteado o agitación suave durante 20 minutos, usando 300 µl de BugBuster® para 500 ml de muestra. (**Anexo 6, Fotografía 4**).
- Incubar la suspensión en una plataforma agitadora en ajuste lento durante 10-20 minutos a temperatura ambiente.
- Eliminar los residuos celulares insolubles por centrifugación a 16,000 × g durante 20 minutos a 4 ° C.
- Almacenar la proteína a -20°C.

d) Cuantificación de concentración de proteína de muestras de intestino de *Fasciola hepatica* mediante método de Bradford (NanoDrop™ 2000).

- La muestra se cuantificó en el NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). (**Anexo 6, Fotografía 5**).
- Programar el Nanodrop para la cuantificación de proteína.
- Levantar el brazo de muestreo y pipetear 1ul de la muestra de intestino de *Fasciola hepatica* en el pedestal de medición inferior.
- Bajar el brazo de muestreo e iniciar una medición espectral utilizando el software en la PC.
- Cuando se completa la medición, levantar el brazo de muestreo y limpiar la muestra de los pedestales superior e inferior con una toalla de laboratorio.

e) Electroforesis 2d Bidimensional

- **Rehidratación de las tiras Immobiline DryStrip**

- Añadir el IPG Buffer pH 3-10 NL (Bio-rad) a la solución de rehidratación DeStreak™ (Bio-rad).
- Resuspender la proteína de intestino de *Fasciola hepatica* con el buffer de rehidratación (Tabla 1).
- Pipetear la solución de rehidratación en el carril de la cámara de rehidratación IPG Box™ (GE Healthcare). Distribuir la solución uniformemente.
- Retirar con unas pinzas la cinta protectora de la tira de poliacrilamida Immobiline™ DryStrip gels (IPG Strip) de 7 cm, pH 3-10 NL (Bio-rad). Colocar en el carril con el gel hacia abajo en contacto con la solución de rehidratación.
- Evitar que queden atrapadas burbujas de aire debajo de la tira.
- Sellar las tiras con 3 ml de aceite mineral DryStrip Cover Fluid (Bio-rad).
- Cerrar la cámara de rehidratación e incubar por 12 horas a temperatura ambiente. (**Anexo 6, Fotografía 6**).

Tabla 1. Volumen de la solución de rehidratación.

Rehidratación de tiras Immobiline DryStrip (7cm)	Volumen (ul)
Solución de Rehidratación DeStreak™	103,75
IPG Buffer pH 3-10	1,25
Muestra de proteína	20
Volumen final por tira	125 ul

Fuente: Lab. Biología Molecular UPCH. (2015).

- **Primera Dimensión: Isoelectroenfoque (IEF).**

- Colocar la tira Immobiline DryStrip rehidratada en la bandeja del equipo de Isoelectroenfoque PROTEAM IEF CELL® (Bio-rad), en dirección del polo positivo al negativo. (**Anexo 6, Fotografía 7**).

- Sellar la tira con 2 ml de aceite mineral DryStrip Cover Fluid.
 - Encender y programar el tiempo y los voltajes de corrida en el Sistema de Isoelectroenfoque (IEF) (**Anexo 01**).
 - Transcurrido el tiempo de la Primera Dimensión retirar las tiras y equilibrarlas para la Segunda Dimensión.
- **Equilibrio de las tiras Immobiline DryStrip**
 - Preparar el buffer de equilibrio (SDS Equilibración buffer solution) (Tabla 2).
 - El volumen de buffer por tira es de 10 ml.
 - Dividir el volumen del buffer de equilibrio en partes iguales 5 ml, en cada tubo Falcom. (**Anexo 6, Fotografía 8**).
 - Agregar al primer tubo 50 mg de DTT por 5 ml de solución de equilibrio.
 - Agregar al segundo tubo 125 mg de Iodoacetamida por 5 ml de solución de equilibrio.
 - Insertar la tira Immobiline DryStrip en el primer tubo. Tapar y sellar con papel parafilm durante 15 minutos.
 - Transcurrido el tiempo insertar la tira Immobiline DryStrip en el segundo tubo. Tapar y sellar durante 15 minutos.
 - Conservar la tira en un tubo Falcom.

Tabla 2. Buffer de equilibrio para tiras Immobiline DryStrip

SDS Equilibración buffer solution	Concentración final
Tris-Hcl pH 8.8	75 Mm
Urea	6 M
Glicerol	29.3% (w/v)
SDS	2%
Bromofenol blue	0.002% (w/v)
Agua MilliQ completar hasta	200 ml

Fuente: Lab. Biología Molecular UPCH. (2015).

• **Segunda Dimensión (SDS-PAGE)**

Preparación del gel de resolución:

- Limpiar y armar las placas del equipo de electroforesis vertical Mini Protean® System (Bio-rad).
- Realizar la preparación del gel de resolución a una concentración de 15%, mezclar de manera uniforme los componentes en el orden que se indica en la Tabla 3.
- Pipetear el volumen de la solución de resolución entre las placas de vidrio de la cámara de electroforesis.
- Añadir 100 ul de butanol sobre la solución de resolución para evitar el ingreso de moléculas de oxígeno que retarden la polimerización.
- Dejar polimerizar a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos.
- Una vez formado el gel eliminar la capa de butanol y lavar la parte superior del gel varias veces con agua destilada hasta eliminar completamente los restos de acrilamida no polimerizada y el butanol.

Tabla 3. Componentes del gel de resolución.

Gel de Resolución 15%	Volumen (ml)
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	2.5
Tampón: Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1.3
Agua Mili Q	1.1
SDS 10%	0.05
Persulfato de amonio (APS) 10%	0.05
TEMED	0.002
Volumen Total	5 ml

Fuente: Lab. Biología Molecular UPCH. (2015).

Preparación del gel Stacking o gel de Concentración

- Preparar el gel de concentración con los componentes de la Tabla 4. Agitar uniformemente evitando la formación de burbujas.
- Asegurar que el TEMED y el APS se distribuyan en todo el volumen de la solución.

- Pipetear la solución de concentración entre las placas de la cámara de electroforesis, sobre el gel de resolución ya polimerizado.
- Colocar entre ambas placas el peine adecuado para formar los pocillos para la tira Immobiline DryStrip y el marcador de peso molecular.
- Dejar polimerizar la poliacrilamida de la solución de concentración por 15 a 30 minutos a temperatura ambiente.
- Una vez formado el gel, retirar el peine cuidadosamente y lavar los pocillos con agua destilada.

Tabla 4. Componentes del Gel Stacking o Gel de concentración.

Gel de Concentración 5%	Volumen (ml)
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	0.17
Tris-HCl 1M pH 6.8	0.13
Agua Mili Q	0.68
SDS 10%	0.01
Persulfato de amonio APS 10%	0.01
TEMED	0.001
Volumen Total	1 ml

Fuente: Lab. Biología Molecular UPCH. (2015).

Electroforesis SDS-PAGE

- Colocar la tira Immobiline DryStrip equilibrada en el pocillo del gel, acoplar la tira al gel de concentración evitando los espacios entre ambos geles (**Anexo 6, Fotografía 9**).
- Colocar la tira en sentido horizontal del cátodo (-) al ánodo (+).
- Aplicar el marcador de peso molecular CSL-BBL Prestained Protein Ladder en el pocillo del gel de concentración.
- Cubrir la tira y el marcador de peso molecular con Agarosa Sealing Solution (**Anexo 02**), previamente calentar la solución en el microondas hasta que la agarosa este completamente disuelta.



- Introducir las placas con los geles en la cuba de electroforesis vertical y agregar el buffer de corrida Tris-glycine 10x. **(Anexo 03)**
- Tapar la cuba y asegurarse que los pocillos del gel estén totalmente cubiertos por el buffer.
- Conectar los electrodos uno positivo y otro negativo (rojo y negro) a la fuente de poder.
- Encender la fuente de poder, programar el voltaje y amperaje correspondiente.
- Realizar la electroforesis a 5 mA por 30 minutos para el gel de concentración y a 25 mA por 1 hora y 30 minutos aproximadamente para el gel de resolución, hasta que el frente de corrida haya llegado a la parte inferior.
- Desmontar el equipo al finalizar la electroforesis, remover el sistema que contiene el gel de poliacrilamida.
- Separar el gel de las placas de vidrio, hidratar con agua destilada.
- Conservar el gel en un recipiente con agua Mili Q.

f) Coloración y visualización de las proteínas

- Colocar 100 ml de solución colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 **(Anexo 04)** en un recipiente de plástico. Cierre el contenedor herméticamente.
- Colocar 250 ml de solución decolorante **(Anexo 05)** en otro recipiente de plástico. Cierre el contenedor herméticamente.
- Precalentar el contenido de ambos recipientes a 55 ° C en el baño de agua caliente.
- Agregar el gel (1,5 mm de espesor) a la solución de tinción e incubar durante 5 min. **(Anexo 6, Fotografía 10)**.
- Enjuagar el gel con agua destilada.
- Transferir el gel teñido al recipiente que contiene la solución decolorante mantenida a 55 ° C por 45 minutos.
- Transferir el gel a un recipiente que contenga agua ultrapura y desteñir el gel durante 10-30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.
- Conservar el gel en agua Milli Q hasta ser analizado.



3.4. Análisis estadístico

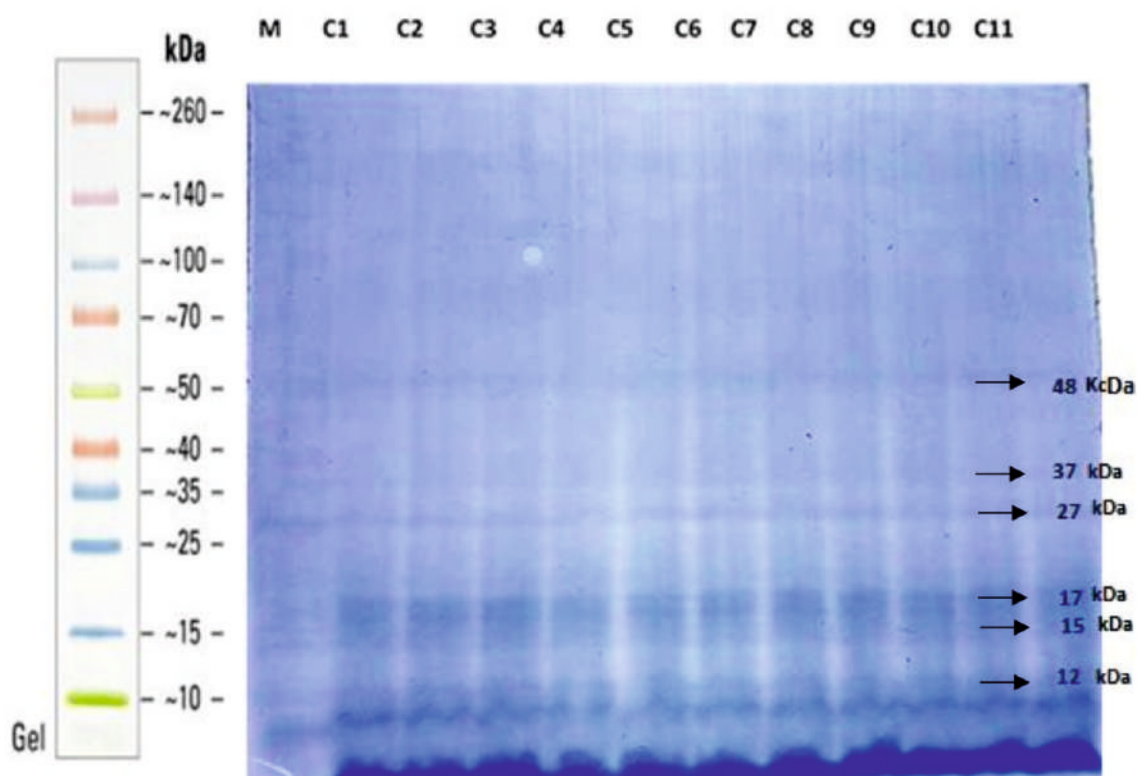
Se realizó un análisis de tablas de promedios y desviación estándar de los pesos moleculares obtenidos.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Figura 1. Gel de Electroforesis SDS-PAGE de intestino de *Fasciola hepatica*.



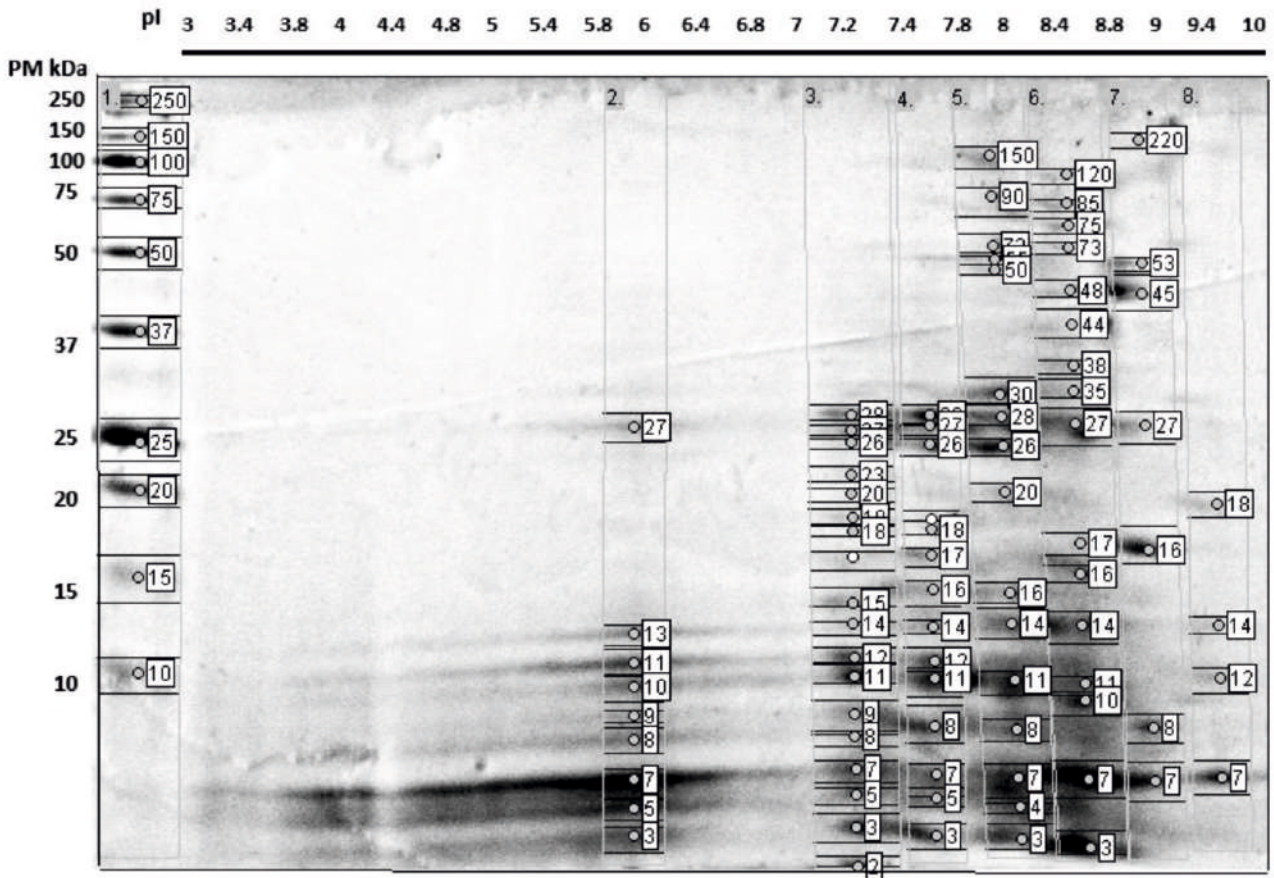
Electroforesis SDS-PAGE, gel de poliacrilamida al 15%. Las proteínas fueron extraídas con el kit BugBuster[®] Protein Extraction Reagent. Tinción con Coomassie Brilliant Blue. Se aplicó 5 ul de marcador CSL-BBL Prestained Protein Ladder. Los pesos moleculares de las bandas son entre 12, 15, 17, 20, 27, 37 y 48 kDa.

M: Marcador de proteína.

C1-C11: Muestras de Intestino de *Fasciola hepatica*. Se aplicó 10 ul.

Lectura de Espectrofotómetro Método de Bradford: 1.018 ug/ml

Figura 2. Se muestra el gel de Electroforesis 2D Bidimensional de intestinos de *Fasciola hepatica*, el cual revelo proteínas de diferentes pesos moleculares y puntos isoeléctricos en un rango de 6-9.8



Perfil proteómico del proteoma de intestino de *Fasciola hepatica*. El gel 2D muestra las manchas de proteínas caracterizadas por Electroforesis 2D Bidimensional. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con Coomassie Brilliant Blue. El gel 2D se analizó con el software GelAnalyzer. El eje X es la escala del punto isoeléctrico (pI). El eje Y es la escala de peso molecular en kiloDaltons. Las proteínas se enfocaron utilizando un rango de pH no lineal de 3 a 10 como primera dimensión y una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) como segunda dimensión.

Figura 3. Se muestran los patrones de spots de proteínas identificados con el software GelAnalyzer 2010®.

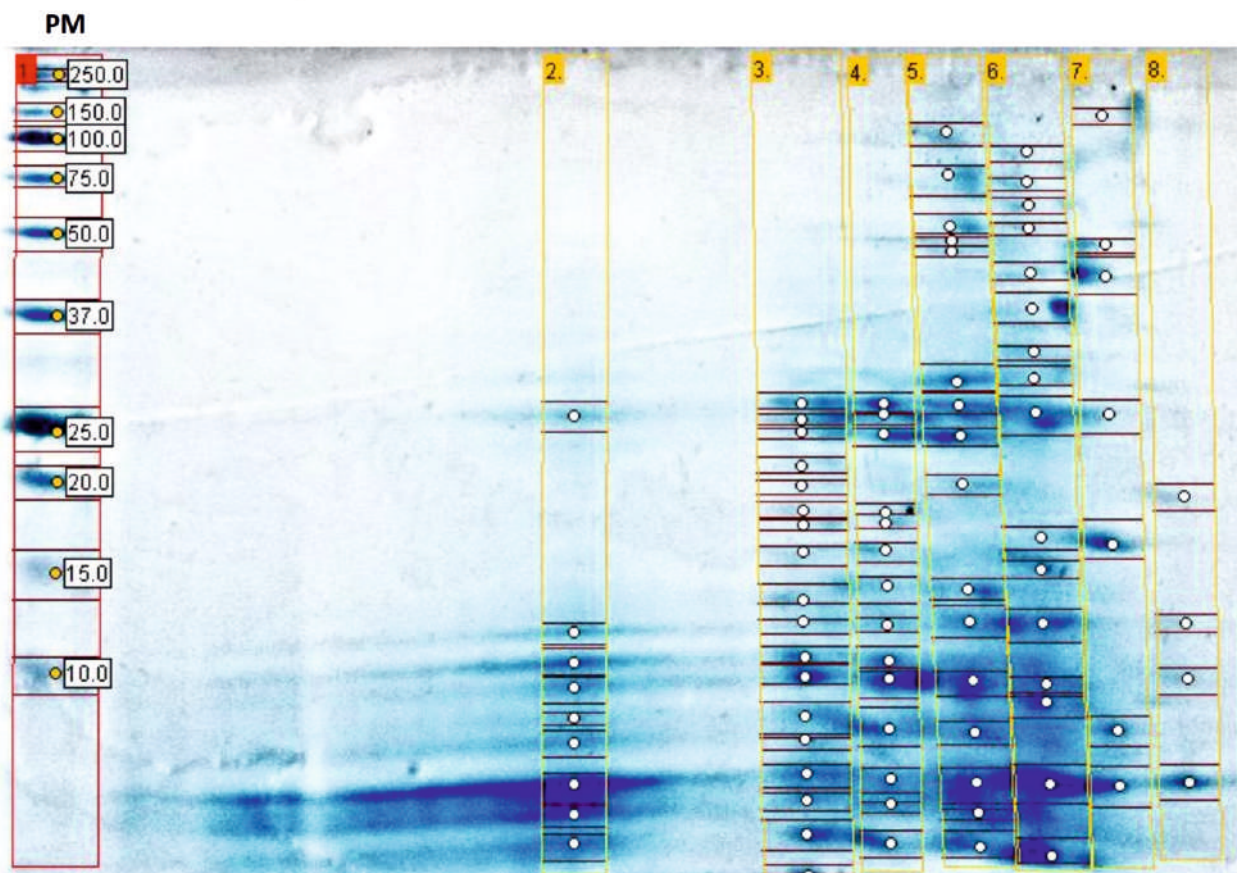


Figura 3. Análisis del Gel de electroforesis 2D con el programa GelAnalyzer 2010®. La muestra corresponde a un conjunto de 20 intestinos de *Fasciola hepatica*. Estas proteínas se separaron en una primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF) y una segunda dimensión (SDS-PAGE). Se identificaron 84 spots de proteínas de intestinos de *Fasciola hepatica* en un rango de pH de 6-9.8. Se utilizó el marcador de proteína Presicion Plus Protein Standards.

Carril 1: Marcador de peso molecular.

Carril 2-8: Muestra de intestino de *Fasciola hepatica*.



Tabla 1. Resultados de Electroforesis 2D Bidimensional de las proteínas del intestino de *Fasciola hepatica*. Los carriles y spots se indican con números correlativos. Se detalla los diferentes pesos moleculares (PM) identificados.

Carril	N° de Spot	PM
2	1	27
2	2	13
2	3	11
2	4	10
2	5	9
2	6	8
2	7	7
2	8	5
2	9	3
3	1	28
3	2	27
3	3	26
3	4	23
3	5	20
3	6	19
3	7	18
3	8	14
3	9	15
3	10	14
3	11	12
3	12	11
3	13	9
3	14	8
3	15	7
3	16	5
3	17	3
3	18	2
4	1	28
4	2	27
4	3	26
4	4	15
4	5	18
4	6	17
4	7	16
4	8	14
4	9	12
4	10	11
4	11	8
4	12	7
4	13	5
4	14	3
5	1	150

Carril	N° de Spot	PM
5	2	90
5	3	73
5	4	55
5	5	50
5	6	30
5	7	28
5	8	26
5	9	20
5	10	16
5	11	14
5	12	11
5	13	8
5	14	7
5	15	4
5	16	3
6	1	120
6	2	85
6	3	75
6	4	73
6	5	48
6	6	44
6	7	37
6	8	35
6	9	27
6	10	17
6	11	16
6	12	14
6	13	11
6	14	10
6	15	7
6	16	3
7	1	220
7	2	53
7	3	45
7	4	27
7	5	16
7	6	8
7	7	7
8	1	18
8	2	14
8	3	12
8	4	7



CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se utilizó para la caracterización de proteínas de intestino de *Fasciola hepatica* la técnica de separación de proteínas mediante Electroforesis 2D; la cual permite desarrollar estudios de los mapas de proteínas de diferentes especímenes (Itagaki *et al.*, 2003; Goswami *et al.*, 2009), siendo un complemento adecuado a las técnicas de inmunodiagnóstico y vacunas las cuales tienen problemas asociados con la descripción de nuevas moléculas entre ellas proteasas (Gasser y col. 2004).

Por ello se ha desarrollado el presente estudio de caracterización de proteínas de intestino de *Fasciola hepatica* mediante Electroforesis 2D bidimensional obteniendo 84 spots de proteínas los cuales fueron expresados en un rango de puntos isoeléctricos (pI) de 6-9.8.

En una investigación reciente, se identificaron de 29 a 60 manchas de proteínas de los productos de excreción y secreción (E/S) de *Fasciola hepatica* mediante 2-DE, incluidas; Catepsina L-proteasa, catepsina L1 secretada, catepsina L tipo proteinasa, Proteína antioxidante específica del tiol, superóxido dismutasa (SOD), tiorredoxina peroxidasa (TPx), glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a ácidos grasos (FABP), actina, enzima glucolítica enolasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; todas estas enzimas pueden desempeñar un papel en la migración, desintoxicación, escape del sistema inmunológico y supervivencia de la *Fasciola hepatica* en el cuerpo del huésped (Gourbal *et al.*, 2008).

En este estudio, la mancha de proteína con un peso molecular de 32 kDa en comparación con estudios pasados similares puede relacionarse con la proteína



catepsina L que pertenece a la familia de la peptidasa C1 con actividad de peptidasa tipo cisteína. La proteasa tipo catepsina L, se conserva pasivamente en los lisosomas de las células epiteliales intestinales y se secreta en gránulos secretorios. Las enzimas digestivas tienen un papel crítico en la descomposición de las proteínas extracelulares del huésped. La mancha proteica con peso molecular de 30 kDa, puede estar relacionada con la Catepsina L tipo proteinasa (Faridi *et al.*, 2014).

Así mismo, en los resultados del presente trabajo de investigación los spots de 27 kDa se asemejan a los pesos moleculares de 27,5 kDa de las proteasas catepsina L1 y L2, obtenido de productos de excreción/secreción de *Fasciola hepatica* (Smith *et al.*, 1993), siendo las dos proteasas importantes expresadas in vitro de formas adultas, estas se encuentran en un rango de 27 kDa como catepsina L1 y con 29 kDa como catepsina L2. Otros estudios realizados también concuerdan con los resultados de este trabajo habiendo encontrado proteínas predominantes en formas adultas estas son enzimas cisteíno proteasas homólogas a la CatL lisosomal de mamífero (Heussler y Dobbelaere, 1994). Estas enzimas tienen distintas características fisicoquímicas (tamaño molecular, pH óptimo) y especificidad de sustrato (Dowd *et al.*, 1994).

En nuestro estudio también se detectaron proteínas con un peso molecular de 28 kDa, lo cual se puede comparar con estudios realizados en productos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (FhES) y somático donde también se identificaron proteínas de 28 kDa (Ortiz, 1997). La actividad de la proteinasa catepsina se ha detectado dentro de una fracción de 28 kDa aislada a partir de productos E/S de *Fasciola hepatica adulta* y se sabe que las catepsinas L1 y L2 de *Fasciola hepatica* son componentes principales de los productos de excreción y secreción (E/S) (Dalton *et al.*, 1996). Por lo tanto, es probable que la molécula de 28 kDa en productos E/S reconocidos por anticuerpos de bovinos naturalmente infectados sean proteinasas de catepsina (Ortiz, 1997).

Existe un grupo reducido de spots con pesos moleculares entre 2 a 220 kDa, no menos importantes, los pesos moleculares de estas proteínas, también fueron identificados en un grupo de proteínas de 60-66 kDa en productos de E/S, y en productos de superficie de *Fasciola hepatica*, se analizaron mediante Isoelectroenfoco y ELISA. Estos resultados confirman hallazgos previos en los



que se identificaron proteínas inmunogénicas dentro de los rangos de 64-69 y 117 kDa de peso molecular en los productos somáticos de parásitos adultos (Itagaki *et al.*, 1995).

En esta investigación se realizó Electroforesis SDS-PAGE de intestino de *Fasciola hepatica* en geles de poliacrilamida al 15% (Fig. 1), nuestro análisis identifico bandas entre 12, 15, 17, 27, 37 y 48 kDa. Rivera Marrero *et al.*, (1988) estudiaron el patrón electroforético SDS-PAGE del producto de excreción y secreción (E/S) de *Fasciola hepatica* y encontraron fracciones de 25 a 48 kDa, de 12 a 14 kDa y de 150 a 160 kDa. Sampaio Silva *et al.*, (1996) identificaron 11 bandas de péptidos en *Fasciola hepatica*, con pesos moleculares entre 12.4 y 116 kDa. Otros estudios empleando SDS-PAGE en condición de reducción, de los extractos somáticos y de E/S de *Fasciola hepatica*, demostraron una gran cantidad de bandas de 20, 25 y 30 kDa, las que luego de la electrotransferencia se determinó que varias fracciones antigénicas eran promisorias para el inmunodiagnóstico de la etapa prepatente y patente de la fasciolosis (Gorman *et al.*, 1994).



CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Habiendo analizado los resultados del presente estudio se concluye lo siguiente:

- En el análisis del gel 2D de proteínas de intestino de *Fasciola hepatica*, se obtuvo 84 spots de proteínas con diferentes pesos moleculares, enfocadas en distintos puntos isoeléctricos (pI) en un rango de 6-9.8.



CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berasain, P., Goni, F., McConigle, S., Dowd, A., Dalton, J., Frangione, B. and Carmona, C. 1997. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *Journal of Parasitology* 83, 1–5.

Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R., et al. 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*; 6(4), pp. 317-39.

Boray J., Crowfoot P., Strong M., Allison J., Schellenbaum M., M Von Orelli, Sarasin G. 1983. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Veterinary Record*; 113, 315-317.

Bozas, S., Panaccio, M., Creaney, J., Dosen, M., Parsons, J., Vlasuk, G., Walker, I. and Spithill, T. 1995. Characterisation of a novel Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 74, 19–29.

Brophy, P., Crowley, P. and Barrett, J. 1990. Relative distribution of glutathione transferase, glyoxalase I and glyoxalase II in helminths. *International Journal for Parasitology*; 20, 259–261.



Brophy, P. and Pritchard, D.I. 1994. Parasitic helminth glutathione S transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. *Experimental Parasitology*; 79, 89–96.

Carmona, C., Dowd, A., Smith, A. and Dalton, J. 1993. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 62, 9–18.

Chapman, C. and Mitchell, G. 1982. Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*; 11, 165–178.

Collins P, Stack C, O'Neill S, Doyle S, Ryan T, et al. 2004. Cathepsin L1, the Major Protease Involved in Liver Fluke (*Fasciola hepatica*) Virulence: Propeptide Cleavage Sites and Autoactivation of the Zymogen Secreted from Gastrodermal Cells. *Journal of Biological Chemistry* 279: 17038–17046.

Cordero, M., Rojo, F., Martínez, A., Sánchez, M., Hernández, S., Navarrete, I., Diez, P., Quiroz, H., Carvalho, M., 2002. *Parásitología Veterinaria*. 3ra. Reimpresión. Editorial Mc Graw- Hill. México. Madrid, España. Pp225-271.

Cwiklinski, K. et al. 2015. The Extracellular Vesicles of the Helminth Pathogen, *Fasciola hepatica*: Biogenesis Pathways and Cargo Molecules Involved in Parasite Pathogenesis. *Molecular and cellular proteomics: MCP* 14, 3258–3273.

Dalton, J. and Heffernan, M. 1989. Thiol proteases in vitro by *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 35, 161–166.

Dalton, J., McGonigle, S., Rolph, T. and Andrews, S.J. 1996. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and hemoglobin. *Infection and Immunity*; 64, 5066–5074.

Dalton, J.P. 1998. Fasciolosis. 1° Edición. Reino Unido en University Press, Cambridge.

Dalton J , Neill S , Stack C , Collins P , Walshe A , Sekiya M , Doyle S , Mulcahy G , Hoyle D , Khaznadji E , Moiré N , Brennan G , Mousley A , Kreshchenko N , Maule A , Donnelly S., 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology*; 33: 1173–1181.

Dalton J., Robinson M., Mulcahy G., O'Neill, S., Donnelly, S. 2013. Moléculas inmunomoduladoras de *Fasciola hepatica*: candidatas tanto para la vacuna como para el desarrollo inmunoterapéutico. *Veterinario. Parasitology*. 195 (3-4): 272-285.

Dawes, B. 1963. The migration of juvenile forms of *Fasciola hepatica* L. through the wall of the intestines in the mouse, with some observations on food and feeding. *Parasitology*; 53, 109–122.

Di Maggio, L. S. et al. 2016. Across intra-mammalian stages of the liver fluke *Fasciola hepatica*: a proteomic study. *Scientific Reports*; 6, 32796.

Donnelly S., O'Neill M., Sekiya, G., Mulcahy, Dalton J., 2005. Peroxidasa tiorredoxina secretada por *Fasciola hepatica* induce la activación alternativa de macrófagos. *Infection and Immunity*; (7), pp. 166-173.

Dowd A., Smith A., McGonigle S. and Dalton J. 1994. Purification and characterisation of a second cathepsin L protease secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *European Journal of Biochemistry*; 223, 91–98.

Dowling D., Hamilton C., Donnelly, S., La Course, J., Brophy, P., Dalton, J., O'Neill, S., 2010. Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. *Infection and Immunity*; 78(2):793-801.



Dunn, M. 1993. Gel electrophoresis of proteins. Oxford, Reino Unido. Bios Scientific Publishers. pp 176.

Espinoza J., Timoteo O., Herrera-Velit P. 2005. Fas2-ELISA in the detection of human infection by *Fasciola hepatica*. Journal of Helminthology; 79(3):235-40.

Espinoza J., Terashima A., Herrera-Velit P., Marcos LA. 2010. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública; 27(4):604-12.

Fairweather I. 2009. Triclabendazole progress report, 2005- 2009: an advancement of learning? J Helminthology; 83, 139-150.

Faridi A., Farahnak A., Golmohammadi T., Eshraghian M., Sharifi Y., Molaei Rad M. 2014. Triclabendazole (Anthelmintic Drug) Effects on the Excretory- Secretory Proteome of *Fasciola hepatica* in Two Dimension Electrophoresis Gel. Iranian Journal Parasitology; Vol. 9, No.2, pp.202-208

Fernández, V., Solana, M., Estein, S., Solana, H. 2012. Vaccines for the prevention of fasciolosis in ruminants a challenge yet unresolved. In Veterinary; 14(1): 47-57.

Gasser, R., Zarlenga, D., Thompson, C., Zarlenga, D., Rosa, G. La Pozio, E., Hodgkinson, J. 2004. Molecular systematics and diagnosis. Veterinary Parasitology; 125, (1-2) 69-92.

Gil, C., 2003. La metodología proteómica, una herramienta para la búsqueda de función. Actualidad SEM (35), pp. 12-20.

Gorg, A., Obermaier, C., Boguth G., Weiss W. 1999. Recent developments in two dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. Electrophoresis. 20(4-5):712-717.



Gorman, T., Concha V., Fredes F., Ferreira A., Valdes A., Alcaino H. 1991. Detección de antígenos de interés diagnóstico en infecciones animales por *Fasciola hepatica*, *Parasitology al Día*. 18(1-2): 26-32.

Goswami, L., Prasad, P., Tandon, V., Chatterjee, A., 2009. Molecular characterization of *Gastrodiscoides hominis* (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea) inferred from ITS rADN sequences analysis. *Parasitology Research*. 104, 1485-1490.

Gourbal BEF, Guillou F., Mitta G., Sibille P., Thèron A., Pointier J-P., et al. 2008. Excretory–secretory products of larval *Fasciola hepatica* investigated using a two-dimensional proteomic approach. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 161(1):63–6.

Graves, R. & Haystead, A., 2002. *Molecular Biologist's Guide to Proteomics*. *Microbiology and Molecular Reviews*, 66(1), pp. 39-63.

Hadjú, É. ási, I. and Juhász, S. 1979. *Fasciola hepatica* (L., 1758): studies on protease and protease inhibitor activity. *Parasitologia Hungarica* 12, 21–30.

Halton, D., 1967. Observations on the nutrition of digenetic trematodes. *Parasitology*; 57, pp. 639–660.

Hanna, R. 1975. *Fasciola hepatica*: an electron microscope autoradiographic study of protein synthesis and secretion by gut cells in tissue slices. *Experimental Parasitology*; 38, 167–180.

Hernández G., Valero M., Sánchez del Pino M., Oleaga A., Siles-Lucas M. 2010. Proteomic analysis of in vitro newly excysted juveniles from *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 172, 121–128

Heussler, V. and Dobbelaere, D. 1994. Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 64, 11–23.



Honore´ B. and Østergaard M. 2003. Transcriptomics and proteomics: integration? In: Cooper DN, editor. Nature Encyclopedia of the Human Genome. London: Nature Publishing Group. p. 579–584.

Hotez, P., Brindley, P., Bethony, J., Rey, C., Pearce, E., et al., 2008. Las infecciones por helmintos: Las grandes enfermedades tropicales desatendidas. Journal of Clinical Investigation. 118 (4), pp. 1311-1321.

Howell, R. 1966. Collagenase activity of immature *Fasciola hepatica*. Nature 209, 713–714.

Itagaki, T., Tsutsumi, K-I., Sakamoto, T., Tsutsumi, Y. and Itagaki, H. 1995. Characterization of genetic divergence among species within the genus *Fasciola* by PCR-SSCP. Japanese Journal of Parasitology; 44, 244–247.

Itagaki, T., Tsumagari, N., Tsutsumi, K., Chinone, S., 2003. Discrimination of three Amphistome Species by PCR-RFLP based on rADN ITS2 markers. Journal Veterinary Medical Science. 65, 931-933.

Jefferies, J.R., Campbell, A. M., Van Rossum, A. J., Barrett, J. & Brophy, P. M. 2001. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. Proteomics; 1 1128–1132.

Kelly, R. 2007 “Detection of Triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica* (Alicuya) infected cattle in the Northern Andean Region of Cajamarca, Peru”. Tesis de maestría de la Universidad de Liverpool.

Kennedy, N., Spithill, T., Tennent, J., Word, P., Piedrafita, D., 2006. DNA vaccines in sheep: CTLA-4 mediated targeting and CpG motif enhance immunogenicity in a DNA prime/protein boost strategy Vaccine. 24, pp.970–979.

Knox, D.P. 1994. Parasite enzymes and the control of roundworm and fluke infestation in domestic animals. British Veterinary Journal 150, 319–337.



Maleewong W, Wongkham C, Intapan P., Pipitgool V. 1999. *Fasciola gigantica*-specific antigens. Purification by a continuous-elution method and its evaluation for the diagnosis of human fascioliasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 61: 648- 51.

Manga, Y. 1999. 'Trematodos', en M. Cordero del Campillo, Parasitología Veterinaria, 2^a ed. Editorial Mc Graw Hill – Interamericana. España.

Marcos L., Maco V., Florencio L., Terashima A. 2005. Altas tasas de prevalencia de fasciolosis humana en el Perú: Una enfermedad emergente. Revista Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales. 3:8-13.

Marcos L., Terashima A, Leguía G, Canales M, Espinoza J., Gotuzzo E. 2007. La infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una enfermedad emergente. Revista de Gastroenterología. 27(4):389-96.

McGonigle, S. and Dalton, J.P. 1995 Isolation of *Fasciola hepatica* hemoglobin. Parasitology 111, 209–215.

Mendes, R., Pérez-Écija, R., Zafra, R., Buffoni, L., Martínez-Moreno, A., Dalton, J.P., Mulcahy, G., & Pérez, J. 2010. Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. Vaccine, 28, (16) 2832-2840.

Meyer, D., Coles, B., Pemble, S., Gilmore, K., Fraser, G. and Ketterer, B. 1991. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. Biochemical Journal; 274, 409–414.

Morphew, R., Wright, H., La Course, E., Woods, D. & Brophy, P. 2007. Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during in vitro culture ex host. Molecular & cellular proteomics: MCP 6 (6): 963–972.



Mulcahy G., O'Connor F., McGonigle S., Dowd A., Clery DG, Andrews SJ, Dalton JP . 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16 (9-10): 932-939.

Munn, E. 1997. Rational design of nematode vaccines: hidden antigens. *International Journal for Parasitology* 27, 359–366.

O'Farrell, P., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal Biochemical*, 250(10), pp. 4007-21.

O'Neill, S., Mills, K., & Dalton, J. 2001. *Fasciola hepatica* cathepsin L cysteine proteinase suppresses Bordetella pertussis-specific interferon gamma production in vivo. *Parasite Immunology*, 23, (10) 541-547.

Ortiz, P. 1997. Humoral immune response to *Fasciola hepatica* in experimentally infected calves and in cattle naturally exposed to fasciolosis in Cajamarca, Peru. Ph.D. Thesis. University of Liverpool, Liverpool, 217 pp

Ortiz, P., Claxton, J., Clarkson, M., McGarry, J., & Williams, D. 2000. The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 93, (2) 121-134.

Ortiz, P., Scarcella, S., Cerna, C., Rosales, C., Cabrera, M., Guzmán, M., Lamenza, P., & Solana, H., 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*, 195, (1-2), pp. 118-121.

Overend, D. and Bowen, F. 1995. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian Veterinary Journal* 72, 275–276.

Pemble, S., Wardle, A. and Taylor, J. 1996. Glutathione S -transferase class Kappa: characterisation by the cloning of the rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochemical Journal* 319, 749–775.

Quiroz, H. 2011. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. Editorial Limusa S.A., México. pp. 232-25.

Rabilloud T. 1996. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis*. 17(5):813-829.

Rabilloud T. 2002. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*. 2(1):3-10.

Rege, A., Herera, P., Lopez, M. and Dresden, M. 1989. Isolation and characterisation of a cysteine proteinase from *Fasciola hepatica* adult worms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 35, 89–96.

Rivera Marrero C., Santiago N, Hillyer GV. 1988. Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *Journal Parasitology*. 74: 646-52.

Robinson, G. and Threadgold, L. 1975. Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. XIII. The fine structure of the gastrodermis *Experimental Parasitology* 37, 20–36.

Robinson M., Menon R., Donnelly S., Dalton J., Ranganathan S. 2009. An Integrated Transcriptomics and Proteomics Analysis of the Secretome of the Helminth Pathogen *Fasciola hepatica*: Proteins Associated With Invasion and Infection of the Mammalian Host. *Molecular & Cellular Proteomics* 8: 1891–1907.

Robinson, M., Dalton, J., 2009. Zoonotic helminth infections with particular emphasis on 705 fasciolosis and other trematodiasis *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 2763-2776.

Robinson, M., Dalton, J., O'Brien, B., & Donnelly, S. 2013. *Fasciola hepatica*: The therapeutic potential of a worm secretome. *International Journal for Parasitology*, 43(3-4), 283–291.



Rocha, T.; Costa, P.; Magalhaes, J.; Evaristo, R.; Vasconcelos, E.; Coutinho, M.; Paes, M.; Silva, M.; Grossi-De-Sa, M. 2005. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. Comunicado Técnico 136, Brasília – DF 12p. 34.

Rojas, J. 2009. Impacto económico por decomiso de hígados infectados con *Fasciola hepatica* en camales de la Región Cajamarca, 2008. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Perú.

Sali A, Glaeser R, Earnest T, Baumeister W. 2003. From words to literature in structural proteomics. Nature. 422 (6928):216-225.

Sampaio Silva M, Correa da Costa J, Viana da Costa A *et al.* 1996. Antigenic components of excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* recognized in human infections. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 54: 146-8.

Sexton, J., Milney, A., Panaccio, M., Waddington, J., Wijffels, D., Thompson, C., et al., 1994. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. Journal of Immunology, 145, pp. 3905-3910.

Silva e Silva, A.; Correa, G.; Reis, E. 2007. Proteómica – Un enfoque funcional del estudio del genoma. Universidade do Grande rio. Saúde e Ambiente em Revista, Duque de Caxias, V2, pp. 1 – 10.

Smith, A., Dowd, A., McGonigle, S., Keegan, P., Brennan, G., Trudgett, A. y Dalton, J. 1993. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. Molecular and Biochemical Parasitology 62, 1–8.

Smithies, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochemical Journal, 61(4), 629-641.

Spithill T. and Morrison C. 1997. Molecular vaccines for the control of *Fasciola hepatica* infection in ruminants. In: Boray, J. (ed.) Immunology, Pathophysiology



and Control of Fasciolosis. Round table conference at the VIIIth International Congress of Parasitology, Izmir, Turkey. Merck AgVet, Rahway pp. 29–35.

Soulsby, E., 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos, 7ª edición, editorial Interamericana, México. pp. 22-34.

Thomas, A. 1883. The natural history of the liver-fluke and the prevention of rot. Journal of the Royal Agricultural Society of England 19, 276–305.

Thorsell, W. and Bjorkman, N. 1965. Morphological and biochemical studies on absorption and secretion in the alimentary tract of *Fasciola hepatica*. Journal of Parasitology; 51, 217–223.

Threadgold, L. 1968. Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. VI. The ultrastructural localisation of phosphatases. Experimental Parasitology; 23, 264

Urquhart, G., Armour, J., Duncan, J.; Dunn, A.; Jennings, F., 2001. Parasitología Veterinaria, 2ª edición, Edit. Acribia, S.A. Zaragoza, España. P.117-126.

Vignau, M., Venturini, L., Romero, J., Eiras, D., Basso, W. 2005. Parasitología Práctica y Modelos de Enfermedades Parasitarias en los Animales domésticos. 1ª edición, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Argentina. Pp 64-69.

Westermeier, R. & Naven, T., 2002. Proteomics in Practice. A laboratory manual of proteome analysis. Wiley-VCH Verlag-GmbH (Eds). Weinheim, Germany.

Westermeier Reiner N. 2008. Proteomics in Practice. Second ed. Weinheim, Germany.

Wijffels G, Panaccio M, Salvatore L, Wilson L, Walker ID, et al. 1994. The secreted cathepsin L-like proteinases of the trematode, *Fasciola hepatica*, contain 3-hydroxyproline residues. Biochemical Journal 299: 781–790.



Wilson, R., Wright, J., Castro-Borges, W., Parker-Manuel, S., Dowle, A. Ashton P.D., Young, N., Gasser, R., Spithill, T., 2011. Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. *International Journal Parasitology*; 41, 1347–1359.

Willadsen, P., Bird, P., Cobon, S. and Hungerford, J. 1995. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*; 110, S43–50.

Wright, W. 1927. Studies on larval trematodes from North Wales. Part I. Observations on the redia, cercaria, and cyst of *Fasciola hepatica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*; 21, 47–56.

Yamasaki, H., Aoki, T. and Oya, H. 1989. A cysteine proteinase from the liver fluke *Fasciola* spp.: purification, characterisation, localisation and application to immunodiagnosis. *Japanese Journal of Parasitology*; 38, 373–384.

ANEXOS

Anexo 1. Programación de voltajes en Sistema de Isoelectroenfoque PROTEAM IEF CELL®

PASOS	VOLTAJE	TIEMPO
Paso 1	300	1:30'
Paso 2: Gradiente	1000	0:30'
Paso 3: Gradiente	5000	1:30'
Paso 4:	5000	0:30'

Anexo 2. Reactivos para la preparación de Agarosa Sealing solution.

Agarosa Sealing solution

Tris Base	25 mM
Glicine	192 mM
SDS	0,1%
Agarosa	0,5%
Azul Bromophenol	0,002% (w/v)
Volumen final	100 ml



Anexo 3. Buffer de corrida para electroforesis 2DE Tris-glycine 10x.

Tris-glycine 10x

Tris Base	121,1 g
Glicine	576 g
SDS 20%	200 ml
Agua destilada hasta	400 ml

Anexo 4. Solución colorante Coomassie Brilliant Blue G-250.

Solución Colorante

Coomassie Brilliant Blue G-250	250 mg
Metanol	60 ml
Ácido acético	7,5 ml
Agua destilada hasta	100 ml

Anexo 5. Solución decolorante.

Solución decolorante

Metanol	50 ml
Ácido acético	ml
Agua destilada hasta	50 ml

Anexo 6. Fotografías del proceso que se siguió para la metodología de la tesis.



Fotografía 1. *Fasciola hepatica* en el estereomicroscopio.



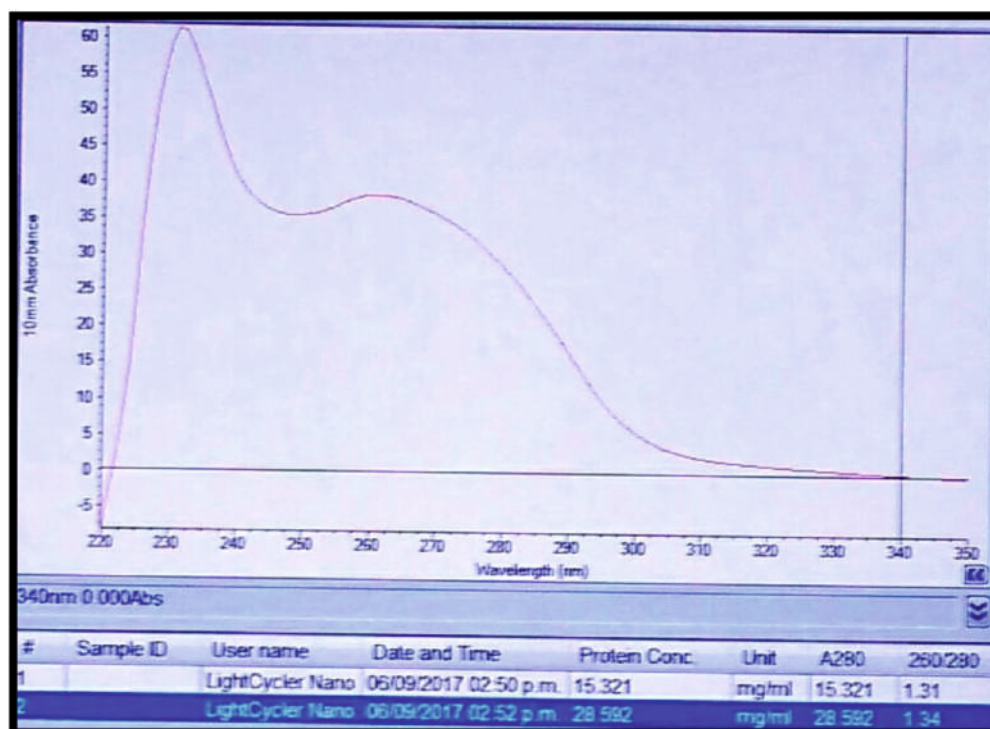
Fotografía 2. Disección del intestino de *Fasciola hepatica*.



Fotografía 3. Fragmentación de intestino de *Fasciola hepatica* con nitrógeno líquido.

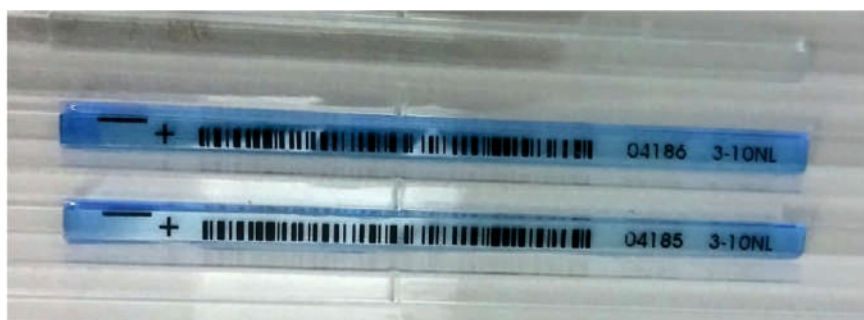


Fotografía 4. Extracción de proteína con el kit BUGBUSTER® PROTEIN EXTRACTION REAGENT.



#	Sample ID	Date	Protein. Conc.	Unit	A280	260/280	Sample Type
1	<i>F. hepatica</i>	06/09/2017	15,321	mg/ml	15,321	1,31	1 Abs = 1mg/ml
2	<i>F. hepatica</i>	06/09/2017	28,592	mg/ml	28,592	1,34	1 Abs = 1mg/ml

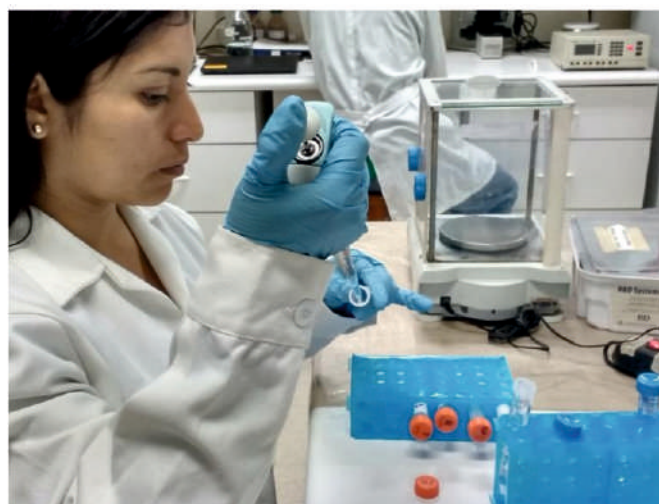
Fotografía 5. Lectura de la concentración de proteína de intestino de *Fasciola hepatica* en el NanoDrop. La muestra contiene un total de 20 intestinos.



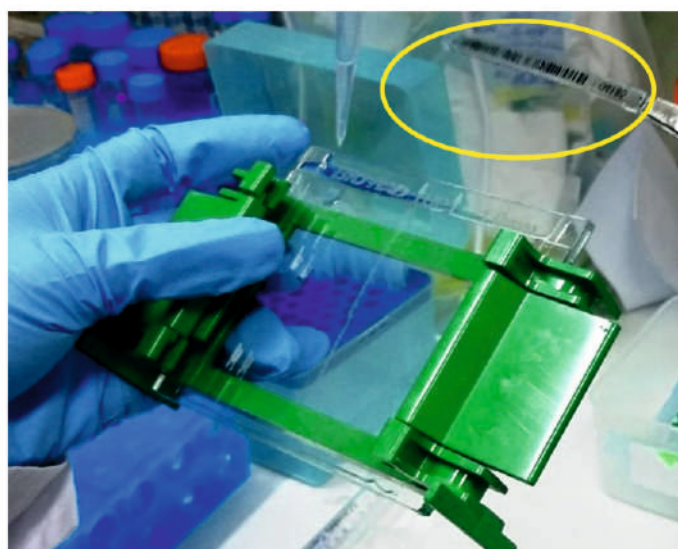
Fotografía 6. Cámara de Rehidratación con las tiras Immobiline™ DryStrip gels (IPG Strip) de 7 cm, pH 3-10 NL.



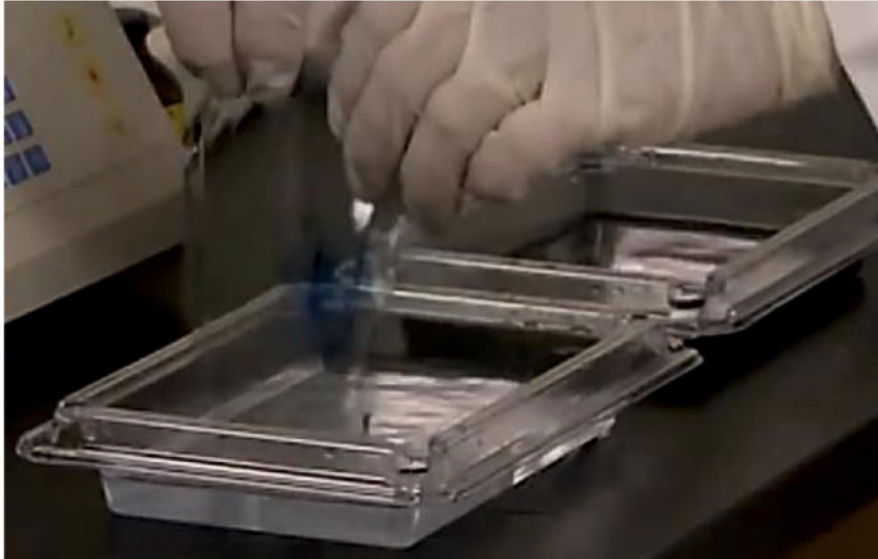
Fotografía 7. Primera Dimensión: Isoelectroenfoque. Las proteínas se separan según sus puntos Isoeléctricos.



Fotografía 8. Equilibrio de las tiras Immobiline™ DryStrip gels.



Fotografía 9. Segunda Dimensión: Electroforesis SDS-PAGE. La tira IPG STRIP se acopla en el gel de concentración y se sella con solución de Agarosa.



Fotografía 10. Coloración y decoloración del Gel 2D. Se empleó tinción con Coomassie Brilliant Blue.



Anexo 7. Análisis estadístico de los pesos moleculares de las proteínas de intestino de *Fasciola hepatica*.

Cuadro 1. Resultados de la evaluación estadística de los pesos moleculares obtenidos.

Estadísticos

Peso Molecular

N	Válido	84
	Perdidos	0
Media		26,1429
Desviación estándar		33,64454
Varianza		1131,955



Cuadro 2. Frecuencia de los pesos moleculares analizados.

Peso Molecular

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	2,00	1	1,2	1,2	1,2
	3,00	5	6,0	6,0	7,1
	4,00	1	1,2	1,2	8,3
	5,00	3	3,6	3,6	11,9
	7,00	7	8,3	8,3	20,2
	8,00	5	6,0	6,0	26,2
	9,00	2	2,4	2,4	28,6
	10,00	2	2,4	2,4	31,0
	11,00	5	6,0	6,0	36,9
	12,00	3	3,6	3,6	40,5
	13,00	1	1,2	1,2	41,7
	14,00	6	7,1	7,1	48,8
	15,00	2	2,4	2,4	51,2
	16,00	4	4,8	4,8	56,0
	17,00	2	2,4	2,4	58,3
	18,00	3	3,6	3,6	61,9
	19,00	1	1,2	1,2	63,1
	20,00	2	2,4	2,4	65,5
	23,00	1	1,2	1,2	66,7
	26,00	3	3,6	3,6	70,2
	27,00	5	6,0	6,0	76,2
	28,00	3	3,6	3,6	79,8
	30,00	1	1,2	1,2	81,0
	35,00	1	1,2	1,2	82,1
	38,00	1	1,2	1,2	83,3
	44,00	1	1,2	1,2	84,5
	45,00	1	1,2	1,2	85,7
	48,00	1	1,2	1,2	86,9
	50,00	1	1,2	1,2	88,1
	53,00	1	1,2	1,2	89,3
	55,00	1	1,2	1,2	90,5
	73,00	2	2,4	2,4	92,9
	75,00	1	1,2	1,2	94,0
	85,00	1	1,2	1,2	95,2
	90,00	1	1,2	1,2	96,4
	120,00	1	1,2	1,2	97,6
	150,00	1	1,2	1,2	98,8
	220,00	1	1,2	1,2	100,0
	Total	84	100,0	100,0	

Gráfico 1. Frecuencia de los pesos moleculares de las proteínas de intestino de *Fasciola hepatica*.

