

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

MENCIÓN: SALUD PÚBLICA

TESIS:

**DIFERENCIA MOLECULAR DE LA GLUTATIÓ N S TRANSFERASA EN
CEPAS DE *Fasciola hepatica* DE DISTINTO ORIGEN, RESISTENTES AL
TRICLABENDAZOL**

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presentada por:

Bachiller: SILVIA CHILÓN YOPLA

Asesor:

Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

Cajamarca – Perú

2019

COPYRIGHT © 2019 by

SILVIA CHILÓN YOPLA

Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

MENCIÓN: SALUD PÚBLICA

TESIS APROBADA:

**DIFERENCIA MOLECULAR DE LA GLUTATIÓN S TRANSFERASA EN
CEPAS DE *Fasciola hepatica* DE DISTINTO ORIGEN, RESISTENTES AL
TRICLABENDAZOL**

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presentada por:

Bachiller: SILVIA CHILÓN YOPLA

JURADO EVALUADOR

Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto
Asesor

Dr. Carlos Manuel Rosales Loredó
Jurado Evaluador

Dr. Guissepe Martín Reyna Cotrina
Jurado Evaluador

M. Cs. Herdert Martín Albán Olaya
Jurado Evaluador

Cajamarca – Perú

2019



Universidad Nacional de Cajamarca
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 080-2018-SUNEDU/CD
Escuela de Posgrado
CAJAMARCA - PERU



PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS


ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 16:00 horas, del día 10 de octubre de dos mil diecinueve, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por el **Dr. CARLOS MANUEL ROSALES LOREDO**, **Dr. GIUSSEPE MARTÍN REYNA COTRINA**, **M.Cs. HERDERT MARTÍN ALBÁN OLAYA**, y en calidad de Asesor el **Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO** Actuando de conformidad con el Reglamento Interno y el Reglamento de Tesis de Maestría de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se dio inicio a la Sustentación de la Tesis titulada “**DIFERENCIA MOLECULAR DE LA GLUTATIÓN S TRANSFERASA EN CEPAS DE *Fasciola hepatica* DE DISTINTO ORIGEN, RESISTENTES AL TRICLABENDAZOL**”, presentada por la **Bach. en Farmacia y Bioquímica SILVIA CHILÓN YOPLA**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó APROBAR...con la calificación de Diecisiete (17) Excelente.....la mencionada Tesis; en tal virtud, la **Bach. en Farmacia y Bioquímica SILVIA CHILÓN YOPLA**, está apta para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como **MAESTRO EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de la Salud, con Mención en **SALUD PÚBLICA**

Siendo las 17:15 horas del mismo día, se dio por concluido el acto.


.....
Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto
Asesor


.....
Dr. Carlos Manuel Rosales Loredo
Jurado Evaluador


.....
Dr. Giuseppe Martín Reyna Cotrina
Jurado Evaluador


.....
M.Cs. Herdert Martín Albán Olaya
Jurado Evaluador

DEDICATORIA

A Dios quien ha sido el soporte de mi vida y por permitirme culminar con éxito mis estudios, para Él mi agradecimiento infinito.

A mis padres: Demetrio y Sebastiana, por su esfuerzo, perseverancia y su incondicional apoyo, consejos y comprensión constante que me han dado para seguir avanzando y lograr mis metas, gracias por tu persistencia y confianza en mí.

AGRADECIMIENTO

A mi hijo César Augusto, quien es el mayor motivo de mi superación, en cada momento de mi vida para poder ser un ejemplo para él.

A mis hermanos: Marlene, Jaime, Wilson, Ernesto, Elard y Ronald, por estar siempre presentes, acompañándome en cada paso que doy.

A mi asesor, el Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto, por incentivar mi deseo de seguir el camino de la investigación, por inculcarme responsabilidades, por su paciencia, conocimiento y amistad, para poder culminar el presente trabajo de investigación.

Al responsable del laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, Dr. Pedro Ortiz Oblitas, por su apoyo y facilidades para mi entrenamiento en biología Molecular, necesario para la realización de esta tesis.

Al M.V. Christian Ángel Hobán Vergara, por su importante colaboración en el laboratorio.

La autora

La autora de la presente tesis expresa su sincero agradecimiento al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innóvate Perú) de acuerdo al contrato N° 406-PNICP-PIBA-2014, del proyecto de investigación “DIFERENCIA MOLECULAR DE LA GLUTATIÓ N S TRANSFERASA EN CEPAS DE *Fasciola hepatica* DE DISTINTO ORIGEN, RESISTENTES AL TRICLABENDAZOL, llevado a cabo en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca.



CONTENIDO

ÍTEMS	Paginas
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
CONTENIDO	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
GLOSARIO	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	01
1.1. Planteamiento del problema	01
1.2. Justificación del estudio	03
1.3. Objetivo general y específicos de la investigación	03
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	05
2.1. Antecedentes del estudio	05
2.2. Bases teóricas del objeto de estudio	07
2.2.1. Fascioliasis	07
2.2.2. El ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i>	09
2.2.3. Resistencia al Triclabendazol	11
2.2.4. La enzima Glutación S Transferasa (GST)	13
2.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	14
2.3. Hipótesis de investigación	16

2.3.1. Hipótesis	16
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	17
3.1. Diseño y tipo de estudio	17
3.2. Unidad de análisis	17
3.3. Muestra	17
3.4. Técnicas e instrumento de recolección de datos	17
3.4.1. Mantenimiento de los parásitos adultos	17
3.4.2. Preparación previa y extracción del ARN parasitario	17
3.4.3. Evaluación de la calidad del ARN Nanodrop 2000	20
3.4.4. Diseño de <i>primers</i> con secuencias completas del <i>GenBank</i>	21
3.4.5. Obtención del ADN complementario (ADNc) por RT-PCR	21
3.4.6. Amplificación del gen GST por PCR a partir de ADNc	22
3.4.7. Detección de fragmentos amplificados (bandas) por electroforesis en gel	23
3.4.8. Secuenciamiento de los productos amplificados y análisis	24
3.5. Procesamiento y análisis de datos	25
3.5.1. Análisis de los fragmentos amplificados	25
3.5.2. Análisis de los amplicones	25
3.6. Consideraciones éticas	26
3.7. Limitaciones para el estudio	26

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	41
RECOMENDACIONES	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gel de agarosa teñido con SYBRsafe (*Invitrogen*) mostrando los productos de la PCR del gen GST de *F. hepatica*, cepas de origen animal y humano resistentes al tricabendazol. 27
- Figura 2.** Resultado del alineamiento múltiple de los consensos, de las secuencias de GST de *F. hepatica* resistentes al TCBZ, de origen animal (SO1, SO2, SO3, SO4, SO5 y SO6) en el programa Clustal a través del programa BioEdit. 29,
- Figura 3.** Resultado del alineamiento múltiple de los consensos, de las secuencias de GST de *F. hepatica* resistentes al TCBZ, de origen humano (SH7, SH8, SH9 y SH12) en el programa Clustal a través del programa de BioEdit. 30
- Figura 4.** Comparación de las secuencias consenso animal vs humano para la GST proveniente de cepas de *F. hepatica* resistentes al TCBZ. 31
- Figura 5.** Alineamiento local *BLAST* de la secuencia de GST de *F. hepatica* provenientes de ovinos (A) y humanos (B) con la colección de nucleótidos del *GenBank*. 32
- Figura 6.** Alineamiento múltiple del gen de la de GST de *F. hepatica* resistentes al TCBZ de Cajamarca, con cepas del *GenBank* empleando la herramienta bioinformática Clustal Omega (ver anexo 6). 33
- Figura 7.** Árbol filogenético de las cepas de *F. hepatica* de Cajamarca, de origen animal (GST5) y humano (GST9) comparadas con otras cepas en el *GenBank* 34

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Cromatograma de la GST de <i>F. hepatica</i> de origen animal, de la cepa SO1, resistente al TCBZ determinada con el primer Forward (5'→3').	50
Anexo 2.	Resultado del alineamiento de las secuencias de GST de <i>F. hepatica</i> de origen animal, SO1 y SO2, y obtención del consenso en el programa BioEdit.	51
Anexo 3.	Cromatograma de GST de <i>F. hepatica</i> de origen humano de la cepa SH8 resistente al TCBZ determinada con el <i>primer</i> Forward (5'→3').	52
Anexo 4.	Resultado del alineamiento de las secuencias de GST de <i>F. hepatica</i> de origen humano, SH8 y SH9, y obtención del consenso en el programa BioEdit.	53
Anexo 5.	Resultado del alineamiento de las secuencias de consenso de GST de <i>F. hepatica</i> resistentes al TCBZ comparadas las de origen animal con las de origen humano. Nótese las sustituciones nucleotídicas en la GST de origen humano en las posiciones 8, 76, 86, 118 y 511.	54
Anexo 6.	Interfaz de <i>Clustal - Omega</i> para el alineamiento múltiple de secuencias.	55
Anexo 7.	Evaluación de la concentración y calidad del ARN de la muestra 9 (SH9) mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000.	57
Anexo 8.	Concentraciones y calidad del ARN extraído de 11 cepas de <i>F. hepatica</i> adultas resistentes al Triclabendazol.	58

GLOSARIO

Cepa: En biología viene a ser la población de células de una sola especie descendientes de una única célula, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.

Molécula: Es la partícula más pequeña que presenta todas las propiedades físicas y químicas de una sustancia, y se encuentra formada por dos o más átomos.

Glutación: Es una sustancia presente en todo el organismo, su función es proteger a las células contra la oxidación y contra los radicales libres. El glutación permite también desintoxicar el organismo de los metales pesados como el plomo o el mercurio.

Transferasa: Es una enzima que cataliza la transferencia de un grupo funcional, por ejemplo un metilo o un grupo fosfato, de una molécula donadora a otra aceptora.

Resistencia antihelmintica: Es la capacidad de un parasito helmíntico para resistir los efectos de un antibiótico. La resistencia se produce naturalmente por selección natural a través de mutaciones producidas por azar.

RESUMEN

La fascioliasis es una enfermedad parasitaria del hígado y de las vías biliares de animales y humanos, y es considerada un problema de Salud Pública por su alta prevalencia como infección humana, especialmente en niños, y un problema veterinario con un importante impacto económico. El objetivo del presente estudio fue comparar la conformación molecular nucleotídica de la enzima Glutathion S Transferasa (GST) en cepas de *Fasciola hepatica* resistentes al Triclabendazol (TCBZ). Para ello, se obtuvo ADN complementario mediante la técnica molecular RT-PCR, a partir del ARN mensajero extraído de fasciolas adultas resistentes al TCBZ, 06 provenientes de ovinos infectados experimentalmente con cepa bovina resistente al TCBZ y 06 de infección humana resistente, obtenidos mediante infección experimental en ovinos. Todos los especímenes fueron provistos por el Laboratorio de Inmunología e Investigación de la UNC. Luego, mediante PCR convencional y el uso de cebadores específicos se amplificó un fragmento de ADN codificante para GST de todas las cepas; la calidad y concentración del producto de gen amplificado fue evaluado en el Nanodrop 2000 y el peso molecular de las bandas se evaluó por electroforesis en gel antes de la secuenciación en Macrogen-Korea. La evaluación y obtención de las secuencias de consenso GST se realizó con el programa BioEdit y el alineamiento de las secuencias con los genes del GenBank se hizo mediante el programa BLAST del NCBI. En cuanto a los resultados, se confirmó la alta homología de las secuencias del gen GST de *F. hepatica* de cepas de Cajamarca con las secuencias reportadas en otros estudios. Se estableció una única variación nucleotídica importante, una mutación no sinónima transversional del gen GST, que se presentó al comparar las cepas de *F. hepatica* de origen animal y humano, provenientes de Cajamarca. Finalmente, se concluye que la presencia de sustituciones nucleotídicas en el gen GST de cepas resistentes al TCBZ en Cajamarca, podrían estar relacionadas con el fenómeno de resistencia al antihelmíntico.

Palabras claves: *Fasciola hepatica*, Glutathion S Transferasa, Resistencia, Triclabendazol, reacción en cadena de polimerasa.

ABSTRACT

Fascioliasis is a parasite disease found in liver and bile ducts of animals and humans, a public health problem due to its high prevalence as a human infection, especially in children, and a veterinary problem with a significant economic impact. The objective of study was to compare the nucleotides molecular conformation of the enzyme Glutathione S Transferase (GST) in Triclabendazole (TCBZ) resistant *Fasciola hepatica* strains. To make this, complementary DNA was obtained using the molecular technique RT-PCR, from messenger RNA extracted from TCBZ resistant adult fasciolas, 06 from infected ovine experimentally with TCBZ resistant bovine strain and 06 from resistant human infection obtain by experimental infection in sheep. All specimens were provided by Laboratory de Immunology e Investigation - UNC. Then, a DNA fragment coding for GST of all the strains was amplified by means of conventional PCR and the use of specific primers; the quality and concentration of the amplified gene product was evaluated in the Nanodrop 2000 and the molecular weight of the bands was evaluated by gel electrophoresis before sequencing in Macrogen-Korea. The evaluation and obtaining of the sequences of GST was carried out with the BioEdit program and the alignment of the sequences with the GenBank genes was done by the BLAST program from NCBI. In the results, the high homology of the GST gene sequences of *F. hepatica* from Cajamarca strains with sequences other studies is confirmed. A single important nucleotide variation was established, a non-synonymous transversional mutation of the GST gene, which was found in a comparison of *F. hepatica* strains from animal and human origin, in Cajamarca city. Finally, in conclusion the presence of nucleotide substitutions in the GST gene of TCBZ - resistant strains in Cajamarca, may be related to the phenomenon of anthelmintic resistance.

Key words: *Fasciola hepatica*, Glutathione S Transferase, Resistance, Triclabendazole, polymerase chain reaction.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del Problema

Las enfermedades parasitarias han influido en forma determinante en la evolución de la historia del hombre, siendo en algunos casos, causa de alta mortalidad (1). Las infecciones zoonóticas son responsables de hasta el 60 por ciento de las enfermedades infecciosas en humanos, y un 75 por ciento de nuevas infecciones, entre ellas la fascioliasis (2). *Fasciola hepatica*, es la causa de la fascioliasis humana y animal en diversas regiones del Perú, incluyendo Cajamarca y un problema de Salud Pública desde la década de los 90 (3), que viene siendo controlada con Triclabendazol (TCBZ), el fármaco de elección para el tratamiento animal y la única opción terapéutica para humanos (4), hecho que se agrava porque el uso indiscriminado de este antihelmíntico ha ocasionado la aparición de la resistencia al TCBZ (5). Además, a pesar de la alta prevalencia de la fascioliasis humana, aún son pocos los países que han reportado casos de resistencia al TCBZ en fasciolas de origen humano (6,7,8).

Los parásitos evitan los xenobióticos mediante diversos mecanismos, entre ellos la mutación del receptor de la molécula, la sobreexpresión de bombas de eflujo y/o la modificación genética de vías específicas de detoxificación. Debido a que en *Fasciola hepatica* resistente al TCBZ no se han demostrado los mecanismos antes mencionados, la resistencia podría explicarse a través del desarrollo de modificaciones genéticas o metabólicas relacionadas con las diversas enzimas que produce el parásito (9).

La Glutación S Transferasa (GST), es una de las enzimas implicadas en los procesos de detoxificación de xenobióticos mediante su conjugación con el Glutación, una proteína oxidante que se encuentra principalmente en el hígado del

hospedero; esto explicaría en alguna medida el fenómeno de resistencia frente a xenobióticos (10). La GST de *Fasciola hepatica* viene siendo estudiada por diversos grupos de investigación en busca de establecer con precisión su relación con la resistencia al TCBZ, sin embargo, los hallazgos aún no son concluyentes.

Los problemas asociados con la resistencia al TCBZ son de carácter importante no sólo para la ciencia en general sino para muchos científicos de diversas áreas que incluyen a la salud pública, en Perú y en el mundo; estos problemas vienen siendo investigados a nivel genético y celular en pro de encontrar alternativas de control viables frente a la diseminación de la resistencia, así como para hallar nuevos tratamientos y combatir la infección que afecta a las poblaciones de bajos recursos (11).

En ese sentido, y siendo el valle de Cajamarca zona hiperendémica de fascioliasis humana y animal (12) de resistencia al TCBZ ya reportados, el aporte de esta investigación es comparar molecularmente la GST de cepas de *F. hepatica* resistentes, provenientes tanto de infección humana como de infección animal, a través de la obtención y estudio de la secuencia molecular de nucleótidos que conforman dicho gen, con las de otras secuencias de GST del parásito reportados por otros investigadores en otros lugares del mundo, para establecer la posible relación entre las mutaciones en la secuencia y la resistencia al TCBZ.

Delimitación de la investigación.

La presente investigación pretende contribuir al conocimiento sobre los fenómenos de resistencia al TCBZ, uno de los antihelmínticos que ha sido utilizado indiscriminadamente para el tratamiento de la fascioliasis animal en nuestro país,

incluyendo Cajamarca. Así mismo se podrá determinar si existe o no diferencias moleculares en cuanto al GST en cepas de *F. hepatica* resistentes al TCBZ, lo cual contribuirá a esclarecer el fenómeno de resistencia.

1.2. Justificación del estudio

La infección por *F. hepatica* e incluso la resistencia del parásito al TCBZ, tanto en animales como humanos, es abordada por diversos grupos de investigación en el mundo, y estudiada desde diversos puntos de vista que van desde los aspectos epidemiológicos hasta la biología molecular. Sin embargo, aún existen vacíos teóricos en cuanto a la constitución y expresión de diversos genes y moléculas que explicarían la resistencia a los antihelmínticos, entre ellos la GST, en ese sentido, esta investigación pretende aportar al conocimiento mediante la comparación molecular de sus secuencias, a fin de determinar si existen diferencias en la constitución nucleotídica de esta molécula en cepas resistentes al TCBZ provenientes de distintos hospederos.

1.3. Objetivos

➤ Objetivo General

Establecer las diferencias moleculares en la conformación nucleotídica del gen que codifica la enzima Glutación S Transferasa en cepas de *Fasciola hepatica* provenientes de hospederos animales y humanos resistentes al Triclabendazol.

➤ **Objetivos Específicos**

1. Analizar las secuencias nucleotídicas del gen de la Glutación S Transferasa, en cepas de *Fasciola hepatica* resistentes al TCBZ de origen animal y de origen humano.
2. Determinar las variaciones de las secuencias moleculares del gen de la Glutación S Transferasa, en cepas de *Fasciola hepatica* resistentes al TCBZ de origen animal y de origen humano.
3. Comparar las secuencias nucleotídicas del gen de la Glutación S Transferasa, de cepas de *Fasciola hepatica* resistentes al TCBZ provenientes de Cajamarca con las cepas de otros lugares del mundo.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

En los Países Bajos, entre los años 1998 y 1999, se realizó uno de los primeros estudios que reportó la resistencia de *F. hepatica* al TCBZ en ovinos y vacunos, muchos de los cuales murieron infectados con el parásito resistente (13,14). A partir de allí, el fenómeno de la resistencia frente a los antihelmínticos fue creciendo en todo el mundo, y particularmente, la resistencia al TCBZ se hizo importante en Salud Pública debido a que es la única molécula disponible para el tratamiento de la infección en humanos, y de acuerdo a diversos estudios se debería a varios procesos de biotransformación dentro del parásito. Algunos estudios muestran que *F. hepatica* puede metabolizar el sulfóxido de TCBZ (TCBZ-SO₂), hasta su metabolito de sulfona de TCBZ (TCBZ-SO) relativamente inerte. En esos experimentos la conversión de TCBZ-SO₂ en TCBZ-SO fue en promedio 20, 29 % mayor en los parásitos resistentes en comparación con cepas susceptibles (15).

Pero *F. hepatica* viene siendo reportada como resistente frente a muchas drogas, y la enzima GST solo sería una de las responsables de esta resistencia, ya que es parte del sistema de desintoxicación del parásito y, por lo tanto, es un importante blanco para buscar un tratamiento contra la fascioliasis (16). Recientemente, se ha demostrado una participación activa de esta familia de enzimas en la desintoxicación de TCBZ y en el fenómeno de resistencia en *F. hepatica*, parásito del que se ha reportado hasta ocho isoenzimas de GST. Dado que diferentes isoenzimas no tienen necesariamente igual actividad metabólica, ese estudio evaluó la actividad citosólica de los tipos *mu* y *pi* (isoenzimas) de la GST en fasciolas resistentes a TCBZ (cepas *Sligo* y *Oberón*)

y susceptibles a TCBZ (cepa *Cullompton*), se confirmó que, aunque ambas isoenzimas están involucradas en diferentes procesos de desintoxicación en *F. hepatica*, sólo la isoenzima GST *mu* estaría implicada en la manifestación de resistencia a TCBZ (17). Así mismo Fernández en otro estudio, afirma que la GST *mu*, una de las enzimas, estudiada en cepas *Cullompton* y *Sligo*, se expresan como proteínas distintas desde la diferencia de dos nucleótidos, indicando que estas variaciones genéticas pueden generar cambios en la susceptibilidad de un individuo frente a moléculas tóxicas, así como afectar la toxicidad y eficacia de las drogas, coincidiendo con la sobreexpresión del sistema enzimático metabólico de los parásitos y que tienen exposición a diferentes xenobióticos aún sin cambios en la actividad biológica en los aminoácidos relacionados con el sitio activo de la enzima (18).

Algunas otras moléculas vienen siendo estudiadas en este sentido, por ejemplo, un estudio determinó la constitución nucleotídica de las saposinas (FhSAP1 y FhSAP2) en cepas *F. hepatica* realizándose análisis del ARN del parásito mediante RT-PCR, electroforesis, y herramientas bioinformáticas, en cepas de distinta sensibilidad al TCBZ, provenientes de áreas diferentes (Australia y Cajamarca), concluyendo que no existe diferencias moleculares importantes en la secuencia de nucleótidos de las saposinas entre ambos tipos de cepas (6).

Diversos países en Sudamérica, como Argentina, Perú y Bolivia reportan casos de fascioliasis animal desde hace muchos años; y en el caso de Cajamarca, incluso se ha reportado fascioliasis resistente al TCBZ en ganado vacuno (7). En Chile, en el 2014, un estudio en cuatro pacientes adultos humanos con infección por *F. hepatica*, tratados con TCBZ, concluye en la resistencia del parásito a este antihelmíntico (19).

En Cusco, Cabada y colaboradores, reportaron a *F. hepatica* resistente al TCBZ en siete pacientes humanos, concluyendo que es un problema emergente en los Andes del Perú (8).

2.2. Bases Teóricas del objeto de estudio

2.2.1. Fascioliasis

La fascioliasis es una enfermedad muy importante en Salud Pública, que afecta tanto a animales como al ser humano, en especial a los niños en edad escolar, quienes presentan síntomas y signos no patognomónicos, como dolor abdominal en el cuadrante superior derecho, fiebre, y eosinofilia con pruebas anormales de función hepática (20). Así mismo, en zonas con alta prevalencia de *F. hepatica* en ganado, la infección humana es reportada esporádicamente (21). En la fase aguda, los síntomas comunes son el dolor epigástrico, el dolor abdominal superior y la fiebre, pero en la fase crónica (estadio biliar), el cólico biliar y la ictericia son las principales manifestaciones causadas por la obstrucción del conducto biliar. En los análisis hematológicos ha podido observarse anemia y leucocitosis con eosinofilia, principalmente en niños y adolescentes recién infectados (22).

Aunque la mortalidad directa es baja, las infecciones intestinales por helmintos contribuyen a la morbilidad general y se han asociado con anemia, crecimiento atrofiado, estado nutricional deficiente y disminución de las capacidades físicas e intelectuales (23). En ciudades como Lima, los casos corresponden a pacientes procedentes de zonas ganaderas, los cuales presentan ictericia y eosinofilia, y la infección se atribuye al consumo de jugo de alfalfa y de plantas acuáticas como ensaladas (24).

La fascioliasis, también es una zoonosis preocupante en el campo médico sanitario, por las enormes pérdidas económicas que ocasiona el trematodo del genero *Fasciola* (*F. hepatica* y *F. gigantica*) (25). En Irán se reportó 17.000 mil casos humanos desde 1989, con pérdidas económicas de 2 mil millones de dólares (26). En Argentina, las pérdidas económicas van de 2 mil a 3 mil millones de dólares anuales por la infección en animales y humanos, teniendo como tratamiento eficaz al TCBZ, pero al mismo tiempo con una creciente preocupación por la resistencia del parásito frente a este antihelmintico (27).

Este problema tiene un impacto económico de 50 millones de dólares por año en nuestro país, donde las poblaciones más pobres, dedicadas a la agricultura, son más propensas a la enfermedad (28). Recientemente, en el distrito de Baños del Inca (Cajamarca), en una muestra de 269 niños en edad escolar, se encontró 33 % de niños positivos a *F. hepatica*, demostrándose la alta prevalencia del parásito en esta zona que ha sido clasificada como mesoendémica para la enfermedad (29).

En otro estudio epidemiológico realizado en tres provincias de Cajamarca (San Marcos, Cajabamba y Celendín), se halló una prevalencia del 10 % utilizando una prueba de Elisa, y como factores de riesgo se encontró a la distribución geográfica y el clima, así como los estilos de vida y saneamiento inadecuados, el consumo de agua no tratada, entre otros (30). Por otro lado, en el distrito de Baños del Inca (caseros: Shaullo Chico y Tartar Chico), zonas endémicas a fascioliasis humana debido a las condiciones geográficas y ecológicas, se realizó un estudio piloto con madres de familia para determinar el nivel de conocimiento referente a esta

enfermedad, encontrándose condiciones para la implementación de medidas que permitan el control y prevención de esta parasitosis (31).

Desde la década de 1990, se ha encontrado muchos conceptos relacionados a la enfermedad de *F. hepatica* en humanos, pero cabe mencionar que no es una simple enfermedad a la cual se pueda tratar, pues diversos estudios demuestran que la fascioliasis humana presenta una clara heterogeneidad en humanos y animales (32).

2.2.2. El ciclo biológico de *Fasciola hepatica*

Los huevos producidos por *F. hepatica* llegan a la bilis y pasan al intestino del hospedero definitivo siendo eliminados con sus heces, donde pueden permanecer viables entre 10 y 24 semanas, dependiendo de la temperatura y la humedad. Siendo ideal para su desarrollo del ciclo vital en agua dulce, donde tienen una mayor capacidad de dispersión. Una vez liberados los huevos de la materia fecal empieza la maduración del embrión y la formación de una larva ciliada; las enzimas proteolíticas rompen la cáscara a la altura del opérculo y se libera el miracidio. El miracidio, para continuar su desarrollo, penetra en un caracol, especialmente del género *Lymnaea* sp., desde el momento del ingreso toma el nombre de esporocisto. El esporocisto es de 70-150 micras de largo y forma las radías que alcanzan una longitud de 1-3 mm dentro del caracol; dando lugar a la formación de las cercarías, un estado larvario móvil que saldrá del caracol. El proceso del esporocisto hasta cercaría puede durar 80 días a 15°C, 50 días a 20°C y menos de 20 días a 30°C. Para el adecuado desarrollo de los estadios intermedios se necesita de 10 °C a 30 °C. No obstante, ésta se puede desarrollar hasta por

debajo de 0 °C. Esta temperatura se debe a que los caracoles hibernan durante 3 a 4 meses hasta el cambio de temperatura y humedad; es decir, que los esporocistos, redias y cercarías, (fases intermedias de *F. hepatica*), buscan ambientes que les permitan superar las bajas temperaturas y asegurar la supervivencia de la especie (33).

La cercarúa mide desde 250-350 micras de longitud; posee dos manchas oculares y una cola que mide dos veces la longitud de su cuerpo. El tracto digestivo de la cercarúa está formado por una faringe, un esófago, un doble intestino y un sistema excretorio pareado. Bajo condiciones de laboratorio los caracoles pueden albergar en promedio 186 redias y 1 443 cercarías. La salida de las cercarías desde el caracol es a través del poro situado entre el ano y el neumóstomo. Las salidas por lugares inusuales pueden matar al caracol (33).

Posteriormente, las cercarías dan lugar a las metacercarias, las formas infectantes del hospedero mamífero. Las personas y animales se infectan por comer o beber alimentos contaminados con esta forma evolutiva del parásito. Las metacercarias se desenquistan en el intestino por acción de la bilis y otros jugos digestivos, permitiendo la salida de una forma larvaria (estadio juvenil), que atraviesa la pared intestinal para migrar hasta el hígado, penetrar la cápsula de Glisson, atravesar el parénquima hepático y más tarde alojarse en los canalículos biliares donde madurará el parasito para producir huevos (34).

Es importante mencionar que dentro del complejo ciclo biológico que presenta este parásito, la presencia de hospedadores intermediarios puede contribuir a la mezcla de genotipos parasitarios antes de la formación de las infrapoblaciones en el hospedador definitivo, muchos estudios mencionan que *F. hepatica* tiene diversos hospederos definitivos, ganado vacuno, ovino, caprino, camélidos, roedores, etc. (34).

La intensidad de parasitación también es un factor que influye en la evolución del parásito. En general, cuanto mayor es la intensidad parasitaria del hospedero definitivo, mayor es el tamaño efectivo de su población, pues, son mayores los grupos en los que tiene lugar la reproducción sexual que dará lugar a la siguiente generación. Está demostrado que *F. hepatica* produce hasta 2000 huevos por día (33).

2.2.3. Resistencia al Triclabendazol (TCBZ)

El TCBZ es un tiol - benzimidazol que ha mostrado excelente eficacia frente a parásitos jóvenes y adultos, y según la OMS es el antihelmíntico de elección, el único en realidad para el tratamiento de la fascioliasis humana, siendo efectivo en el control del parásito ubicado en las vías biliares y de las larvas que migran por el hígado; su eficacia sobre parásitos sensibles es cercana al 100 % y su aplicación recomendada a dosis única es de 10 mg/kg de peso corporal (35).

Los antihelmínticos benzimidazoles son ampliamente utilizados contra parásitos nemátodos, cestodos y tremátodos. El blanco de acción del TCBZ es la proteína celular parasitaria denominada Tubulina, a la que el

antihelmíntico se adhiere provocando disrupción ultraestructural de los procesos vitales del parásito, tales como la alimentación y digestión de nutrientes, entre otros efectos (36).

Por otro lado, se conoce que la acción del TCBZ puede provocar un estrés oxidativo secundario en el parásito, lo que puede manifestarse como un incremento observado en las actividades de diversas enzimas (por ejemplo, carboxilesterasas, GST y carbonil reductasas), como un mecanismo defensivo, existiendo la posibilidad de participar activamente en el desarrollo de la resistencia al TCBZ en *F. hepatica* (37).

La resistencia al TCBZ se ha convertido en un problema que no solo afecta a los animales sino también al tratamiento de las personas infectadas con cepas resistentes, al punto que ahora es tan importante comprender los mecanismos de resistencia, así como buscar nuevas estrategias de tratamientos alternativos. Los cambios que presentan muchos genes o su expresión en respuesta a la presencia del fármaco permiten sobrevivir al parásito, esto sería el reflejo de su evolución en un ambiente tóxico, donde la resistencia a la droga permite la persistencia del más capaz (38).

En vista de la resistencia que viene observándose en la práctica clínica, algunos investigadores recomiendan considerar por lo menos dos dosis de 10 mg/kg vía oral de TCBZ en dos días continuos para los infectados (18). Además, todo indica que se necesitarán nuevos regímenes de terapia o drogas contra *F. hepatica*.

2.2.4. La enzima Glutación S Transferasa (GST)

La GST de los parásitos representa el principal mecanismo de detoxificación de los compuestos hidrofóbicos y electrofílicos. Son una familia de enzimas versátiles de gran importancia, cuyo principal mecanismo es inactivar una amplia gama de moléculas tóxicas exógenas/endógenas y convertirlas en compuestos solubles en agua, y han sido altamente conservados a lo largo de la evolución y son particularmente abundantes en helmintos parasitarios (39).

La GST es una molécula dimérica de aproximadamente 657 pb, que en parte generan su diversidad de sustrato por existir en múltiples isoformas. Esta diversidad hace que la familia de enzimas GST se adapten bien al proceso de desintoxicación celular. Basados en estudios de especificidad de sustrato y estructura primaria se han identificado GSTs citosólicas y otros isotipos han sido identificados en intestino y tejido subtegumental. Todas las GSTs de *F. hepatica* comparten una identidad de secuencia de aminoácidos importantes, aunque presentan especificidades de sustrato distintas (40).

La resistencia al TCBZ viene siendo reportada en todo el mundo y la GST es una de las enzimas metabolizantes xenobióticas relacionadas con la desactivación metabólica del parásito y por tanto con la resistencia al fármaco. En *F. hepatica*, la GST se ubica en la membrana, tejidos musculares, células parenquimatosas y el intestino, constituyendo el 4 % de su proteína, y siendo importante en la desintoxicación de los parásitos adultos (actividad citosólica de GST en fase II) así como antioxidante que suprime la toxicidad oxidativa del fármaco (41).

La enzima GST de las clases alfa, mu y pi humanas vienen siendo productoras de al menos seis locus genéticos: A1, A2 (clase alfa), M1, M2, M3, M4, M5 (clase mu) y P1 (pi- clase), siendo muy probable que la GST evoluciona a partir de un gen común, a excepción del GST microsomal (42). La GST de *F. hepatica* en fase II no solo tiene funciones de desintoxicación y limpieza, sino que ha demostrado que es una candidata potencial para vacuna protectora, si es purificada a partir de fracciones citosólicas de trematodos adultos (43).

En un estudio realizado de GST se evaluó como vacuna en ovinos contra *F. hepatica* empleando varios compuestos adyuvantes. La inhibición de la actividad de la enzima GST “*in vitro*” por los antisueros de ganado no se correlacionó con la reducción de parásitos. En resumen, los resultados indican que el GST de *F. hepatica*, cuando se usa como vacuna, puede proteger significativamente al ganado contra la enfermedad del hígado, pero sólo cuando esté adecuadamente formulada (44).

2.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método “*in vitro*” que permite obtener y amplificar un fragmento de la secuencia de ADN de cualquier célula. Sus múltiples copias se logran obtener a través de repetidos ciclos, con diferentes periodos de tiempo y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN (45).

La PCR consta de tres fases, la primera fase es la desnaturalización de la molécula de ADN, donde la doble cadena que se amplificará es separada mediante la aplicación de altas temperaturas, como de 95 °C durante 20-30 segundos. La segunda fase corresponde a la hibridación, en este periodo los oligonucleótidos que son pequeños fragmentos de ADN diseñados en un ordenador, se acoplan a una región complementaria del ADN molde, señalando una pequeña región que dará inicio a la clonación en doble cadena al ser reconocida por la polimerasa. Esta fase se encuentra a una temperatura entre 50 – 60 °C, durante 10 a 60 segundos, la estabilidad y especificidad será eficiente. La tercera fase es la extensión, la enzima incorpora los nucleótidos complementarios (dNTP's), a la cadena molde, en el sentido 5'-3' a partir de los oligonucleótidos previamente pegados; la temperatura es de 72 °C, y el tiempo dependerá del tamaño de la región a amplificar, utilizando 1 minuto por cada 1000 nucleótidos de extensión como regla general (46).

Los productos obtenidos serán visualizados en geles de agarosa. El posicionamiento de la banda en el gel está basado en el tamaño de fragmento amplificado, la concentración de agarosa dependerá del tamaño de los productos a migrar. Un gel con alta concentración permitirá una mejor separación de pequeños fragmentos de ADN, mientras que una baja concentración es utilizada para la observación de fragmentos grandes de ADN (46).

2.3. Hipótesis de investigación

2.3.1 Hipótesis

La enzima Glutación S Transferasa de *Fasciola hepatica* en cepas resistentes al TCBZ presenta variaciones moleculares en la cadena de nucleótidos según la especie de hospedero.

III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Diseño y tipo de estudio

Investigación Básica, descriptiva.

3.2. Unidad de análisis

El ADNc de las 12 cepas de *Fasciola hepatica* resistentes al TCBZ proporcionados por el Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.3. Muestra: La muestra se obtuvo por conveniencia (muestreo no probabilístico) y estuvo constituido por 6 parásitos adultos de *F. hepatica* resistentes al TCBZ pertenecientes a la cepa resistente de animal y 6 parásitos adultos de *F hepatica* pertenecientes a la cepa resistente de humano.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1. Mantenimiento de los parásitos adultos.

Las muestras parasitarias se mantuvieron adecuadamente etiquetadas (parásitos adultos obtenidos del cepario correspondiente), congeladas a menos 70 °C, en solución RNA *later* que protege el ARN del parásito hasta su procesamiento.

3.4.2. Preparación previa y extracción del ARN parasitario

El ARN total de los parásitos fue extraído por el método del trizol, empleándose 1 mL del reactivo por espécimen de *F. hepatica* (100 µg de peso aproximadamente), de acuerdo con el protocolo siguiente (47, 48).

- 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 1M para eliminar toda contaminación por ARNasas. Estos materiales, una vez secos, fueron enfriados a -70 °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 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).
- Manteniendo el mortero en la caja de tecnoport 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 tome consistencia pastosa o como polvo. El pilón se mantuvo frío para evitar el choque térmico sobre el ARN a extraer.
- Se agregó 1 mL de trizol dentro del mortero con la muestra, homogenizando el contenido varias veces con la misma punta y luego se

colecto el machacado en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL libre de nucleasas.

- Se incubó las muestras durante 5 min a 30 °C en baño maría previamente calentado, para la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas.
- Se añadió 200 µL de cloroformo y se agito enérgicamente a mano durante 15 segundos y luego se incubó a 30 °C en baño maría por 3 minutos más.
- Se centrifugó a 14 000 rpm por 20 minutos a temperaturas entre 2 a 8 °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 y se incubó en 10 min. a temperatura ambiente, el ARN precipitó formando un pellet semitransparente en el fondo del tubo.
- Se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm por 20 minutos entre 2 a 8 °C.
- Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol frío al 70 % agitándose muy bien.
- Se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm por 5 minutos entre 2 a 8 °C, este proceso se repitió 3 veces, para lavar el pellet de ARN.
- Se secó el pellet en la estufa (a 37 °C de temperatura), dejando el tubo invertido sobre papel de filtro hasta que no queden restos de etanol en el tubo.
- Se re-suspendió el ARN con 50 µL de agua grado molecular libre de ARNasas.
- Se aplicó un vortex de 5 segundos.

- Se incubó a 56 °C por 10 minutos en baño maría.

3.4.3. Evaluación de la calidad del ARN en el Nanodrop 2000.

Las muestras de ARN fueron evaluadas mediante espectrofotometría en Nanodrop 2000 (Thermo Fisher), a 260 nm y 280 nm. Para determinar la concentración de ARN se midió a 260 nm y su pureza (calidad) se determinó mediante la relación de absorbancia 260/280. También se midió a 230 para ver el grado de contaminación por trizol mediante la relación de absorbancia 260/230. El protocolo empleado fue el siguiente:

- Se levantó la tapa del equipo y se colocó en el pedestal 1 µL de agua grado molecular para limpiarlo, cerrando la tapa. Luego de abrirla se limpió con papel toalla estéril, de arriba hacia abajo con mucho cuidado.
- Se colocó 1 µL de agua grado molecular en el pedestal para realizar el blanco, debe indicar la pureza del agua antes de medir las muestras.
- Para evaluar las muestras, se indica el nombre de la muestra y se hace click en el botón *measure* (medir); las mediciones de concentración y pureza del ARN se evidencian en la pantalla del computador. Los valores leídos se almacenan en una hoja de datos que se muestra en la parte inferior de la pantalla con el nombre de la muestra, los valores de las lecturas y la fecha.
- Después de leer todas las muestras, se colocó 1 µL de agua molecular para limpiarlo. Las muestras de ARN obtenidas fueron conservadas a -70 °C.

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

Los *primers* para la amplificación correspondientes a la GST fueron diseñados a partir de las secuencias completas de nucleótidos de la GST disponibles en el GenBank con los números de acceso: KF680281 y KF680282. Los *primers* utilizados fueron: *Primer* GST-Forward 5' → 3' ATG CCA GCC AAA TCC GGA TAC, y el *Primer* GST-Reverse 5' → 3' TCA AGC CGG TGC AGC GTC TCC A; los *primers* fueron similares utilizado por Fernández et al, (2014) en otra investigación relacionado a la GST (49).

3.4.5. 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 un kit comercial (invitrogen), siguiendo el protocolo correspondiente:

- Se mezcló y centrifugó brevemente cada componente antes de usar el Kit de la muestra.
- En un tubo eppendof de 200 µL (estéril), se combinó: (n) µL de 5 µg total ARN, 1µL de *primer* oligo/dT 50 µM, 1µL de dNTP mix, y agua grado molecular libre de ARNsas hasta completar 10µL.
- Las muestras se incubaron en el termociclador a 65 °C por 5 minutos, luego se colocó en hielo al menos 1 minuto.
- Por separado, se preparó el mix para cDNA, agregando cada componente en el orden indicado por el fabricante: 2 µL Buffer RT

10X, 4 μL MgCl_2 25 Mm, 2 μL DTT 0,1M, 1 μL ARNAs Out, 1 μL SuperScrip RT III.

- Se añadió 10 μL de la mix de síntesis de cDNA a cada mix del cebador con ARN muestra, se mezcló suavemente y se concentró mediante centrifugación breve. Se incubó en el termociclador a 50 °C x 50 minutos, finalizando la reacción 85 °C durante 5 minutos.
- El ADNc sintetizado se preservó a menos 70 °C o puede usarse para PCR de forma inmediata.

3.4.6. Amplificación del Gen GST por PCR a partir de ADNc

La amplificación de la GST se realizó a partir de 1 μL del producto de la RT-PCR (ADNc, templado obtenido por retrotranscripción reversa). Para este proceso se empleó un kit comercial KOD Hot Start DNA Polymerase, siguiendo el protocolo del proveedor:

- Se mezcló brevemente cada componente del kit.
- En un microtubo estéril de 1,5 mL, se combinó por muestra: 32 μL de agua molecular, 5 μL de Buffer DNA, 3 μL de MgSO_4 , 5 μL dNTP, 1,5 μL de *primer forward*, 1,5 μL de *primer reverse*.
- El ADNc de cada cepa fue empleado como templado, se colocó 1 μL .
- Luego se colocó 1 μL *Taq* a cada muestra.
- Las condiciones de reacción en el termociclador fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridación a 52 °C por 45 segundos, extensión a 72 °C por 1 min, en 35 ciclos, y finalmente una extensión final a 72 °C por 3 min.
- Finalmente, las muestras amplificadas son conservadas a menos 70 °C hasta su secuenciamiento.

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

El producto de la PCR fue analizado mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5 % preparado con Tris Borato EDTA 0,5X (TBE), y teñido con SYBR Safe DNA Gel Stain (*Invitrogen*) (10 μ L), según el protocolo siguiente:

❖ Preparación del gel de agarosa al 1.5 %:

- Se pesó en la balanza analítica 1,5 gramos de agarosa.
- Se pasó a un matraz de vidrio y se agregó 100 mL de TBE.
- Se mezcló hasta disolver parcialmente la agarosa y se colocó al microondas por 60 minutos a máxima temperatura, para una completa homogenización.
- La agarosa tubo que estar bien disuelto para que se haya homogenizado completamente
- Se agregó 10 μ L de SYBRsafe (*Invitrogen*) y se mezcló bien la agarosa.
- Se preparó el equipo de electroforesis y se vació el contenido en el molde para gel de electroforesis evitando que se formen burbujas.
- Se colocó los peines adecuados y se llevó a refrigeración por unos 15 minutos hasta que solidificó.
- Se sacó de la refrigeradora y se retiró los peines con cuidado, evitando romper el gel.

❖ **Electroforesis y visualización de las bandas:**

- Se colocó el molde del gel en la cuba de electroforesis y se agregó el volumen de TBE necesario para cubrir el gel.
- Se sembró el marcador de peso molecular (4 μ L) en la primera calle. El marcador empleado fue el DNA Ladder 100 bp (Invitrogen).
- Se preparó las muestras mezclando 5 μ L de ADN amplificado y 1 μ L Gel Loading Buffer.
- En el primer pocillo o primera calle, se incorporará el marcador de peso molecular, luego en el segundo pocillo el control negativo (master mix sin ADN), y en los pocillos siguientes los amplificados preparados en el paso anterior.
- Las condiciones de corrida electroforética fueron: conectando el sistema a la fuente de poder se procedió a seleccionar el voltaje de 80 voltios por 10 minutos para iniciar la corrida, y después se subió a 100 voltios por 40 minutos.

Se retiró el gel de la cubeta con mucho cuidado (es muy frágil y puede romperse con facilidad) y luego se colocó en el transiluminador UV para verificar la presencia de las bandas correspondientes.

3.4.8. 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/μL en tubos Eppendorf de 200 μL, rotulados, y acompañados de los *primers* correspondientes a un volumen de 100 μL a concentración 10 μM. Las amplificaciones son secuenciadas en ambas direcciones, mediante secuenciador automático de ADN, empleando los mismos oligonucleótidos usados en la PCR convencional.

3.5. Procesamiento y análisis de datos

3.5.1 Análisis de los fragmentos amplificados

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

3.5.2. Análisis de los amplicones

Las secuencias obtenidas en el cromatograma fueron editadas y alineadas preliminarmente con el software BioEdit disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. La búsqueda de datos para la comparación de las secuencias de consenso se hizo con el programa FASTA en la base de datos del GenBank, luego fueron alineadas mediante el programa BLAST del NCBI, para nucleótidos, disponible en forma gratuita en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y finalmente fueron analizadas y comparadas con el programa Clustal Omega disponible en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

3.6. Consideraciones éticas

Las cepas de *F. hepatica* provienen de infecciones naturales de bovinos y humanos, las mismas que fueron conservadas en *RNA later*, y que fueron obtenidas por infección experimental en estudios previos (7, 28). Los estudios previos cumplieron con los requerimientos de los Comités de Ética para estudios en humanos y en animales. Las cepas se vienen manteniendo en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.7. Limitaciones para el estudio

Entre las limitaciones más importantes de este estudio está la dificultad actual para implementar protocolos estándar de purificación específica de GST lo que restringe realizar estudios genómicos y proteómicos completos; en este sentido, el estudio depende fundamentalmente de la calidad del ARN obtenido de cada parásito. Además, una limitación adicional está referida a la expresión cuantitativa de estas proteínas, ya que no nos es posible determinarla mediante las técnicas convencionales de análisis molecular, ya que requiere de equipos más sofisticados, como el que emplea la PCR cuantitativa o también llamado *PCR en tiempo real*. Por otro lado, el acceso a los servicios de secuenciación (lectura de los nucleótidos que constituyen el gen), sigue siendo una limitante en nuestro país debido a los altos costos del servicio, lo que nos limitó a secuenciar una parte (50 %) de las muestras finales procesadas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El par de *primers* para la amplificación de la GST fueron: *Primer* GST-Forward 5' → 3' ATG CCA GCC AAA TCC GGA TAC, y el *Primer* GST-Reverse 5' → 3' TCA AGC CGG TGC AGC GTC TCC A, diseñados a partir de dos secuencias completas de nucleótidos de la GST provistas por la base de datos *nucleotide* del GenBank, con códigos de acceso KF680281 y KF680282.

En la Figura 1 se muestran la amplificación del gen GST de *F. hepatica* de 6 cepas de origen animal (SO1, SO2, SO3, SO4, SO5 y SO6) y 6 cepas de origen humano (SH7, SH8, SH9, SH10, SH11 y SH12), siendo un total de 12 cepas, cuyos pesos moleculares fueron homogéneos, de aproximadamente de 675 pb.

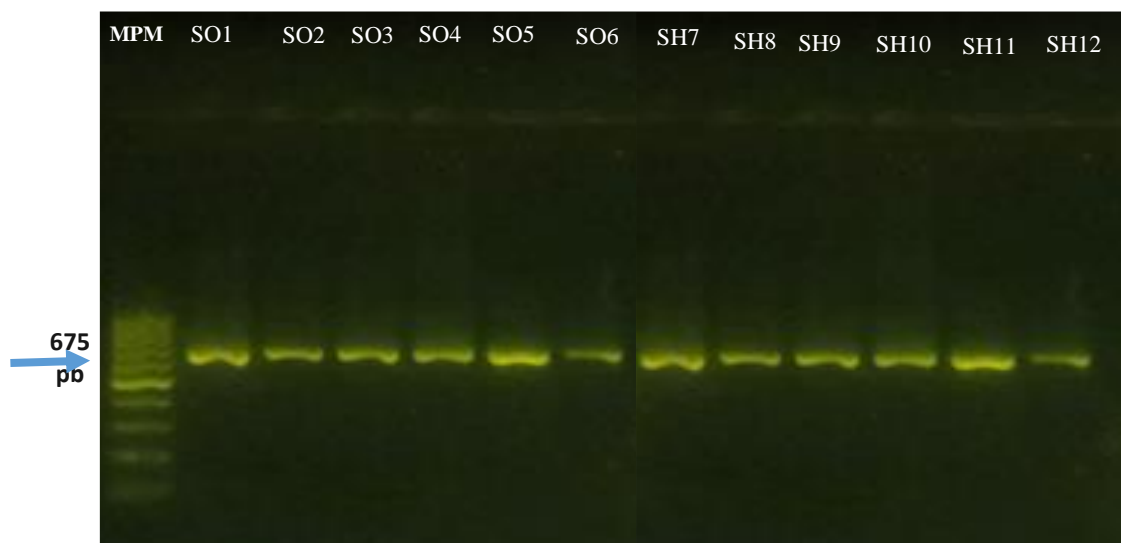


Figura 1. Gel de agarosa teñido con SYBRsafe (*Invitrogen*) mostrando los productos de PCR del gen GST de *F. hepatica*, cepas de origen animal y humano resistentes al tricabendazol.

BioEdit Sequence Alignment Editor - [Graphic Print: Untitled1]

File Edit Font File Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help

Note: This is a print preview. It may copy to the clipboard slightly large. To show control panel, press the red arrow (upper left)

Purinas A y G
Pirimidinas T y C

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
CONS SO1  CCCACTCGATACTGGAAAATAAGAGGGCTCCAACAACCCGTTTC-GACTCTTGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTACGAAGAACATTTGTACG
CONS SO2  CCCACTCGATACTGGAAAATAAGAGGGCTCCAACAACCCGTTTC-GACTCTTGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTACGAAGAACATTTGTACG
CONS SO3  CCCACTCGATACTGGAAAATAAGAGGGCTCCAACAACCCGTTTC-GACTCTTGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTATGAAGAACATCTGTACG
CONS SO4  CCCACT-GGTACTGGAAAATAAGAGGGCTCCAACAACCCGTTCCGACTCTTGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTAYGAAGAACATTTGTACG
CONS SO5  CCCACTGGATACTGGAAAATAAGAGGGCTCCAACAACCCGTTCCGACTCTTGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTACGAAGAACATTTGTACG
CONS SO6  CCCACTCGATACTGGAAAATAAGAGGGCTCCAACAACCCGTTCCGACTCTTGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTATGAAGAACATCTGTACG
Clustal  ***** * *****

      110     120     130     140     150     160     170     180     190
CONS SO1  GATAGGGAGAAATGGTTTGGCGGATAAATTC AACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTACATTGACGATAAGTGCAAAC TGACTCA
CONS SO2  GATAGGGAGAAATGGTTTGGCGGATAAATTC AACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTACATTGACGATAAGTGCAAAC TGACTCA
CONS SO3  GATAGGGAGAAATGGTTTGGCGGATAAATTC AACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTACATTGACGATAAGTGCAAAC TGACTCA
CONS SO4  GATAGGGAGAAATGGTTTGGCGGATAAATTC AACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTACATTGACGATAAGTGCAAAC TGACTCA
CONS SO5  GATAGGGAGAAATGGTTTGGCGGATAAATTC AACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTACATTGACGATAAGTGCAAAC TGACTCA
CONS SO6  GATAGGGAGAAATGGTTTGGCGGATAAATTC AACATGGGATTGGATTTGCCAAATTTACCATACTACATTGACGATAAGTGCAAAC TGACTCA
Clustal  *****

      210     220     230     240     250     260     270     280     290
CONS SO1  CCATAATGCGGTACATTTGCGGATAAGCATGGAATGCTTGGTTTCCACACCCGAGGAACGAGCTCGAATTTTCGATGATCGAAGGAGCTGCAATG
CONS SO2  CCATAATGCGGTACATTTGCGGATAAGCATGGAATGCTTGGTTTCCACRCCCAGGGAACGAGCTCGAATTTTCGATGATCGAAGGAGCTGCAATG
CONS SO3  CCATAATGCGGTACATTTGCGGATAAGCATGGAATGCTTGGTTTCCACACCCGAGGAACGAGCTCGAATTTTCGATGATCGAAGGAGCTGCAATG
CONS SO4  CCATAATGCGGTACATTTGCGGATAAGCATGGAATGCTTGGTTTCCACACCCGAGGAACGAGCTCGAATTTTCGATGATCGAAGGAGCTGCAATG
CONS SO5  CCATAATGCGGTACATTTGCGGATAAGCATGGAATGCTTGGTTTCCACGCCCAGGGAACGAGCTCGAATTTTCGATGATCGAAGGAGCTGCAATG
CONS SO6  CCATAATGCGGTACATTTGCGGATAAGCATGGAATGCTTGGTTTCCACACCCGAGGAACGAGCTCGAATTTTCGATGATCGAAGGAGCTGCAATG
Clustal  *****

```

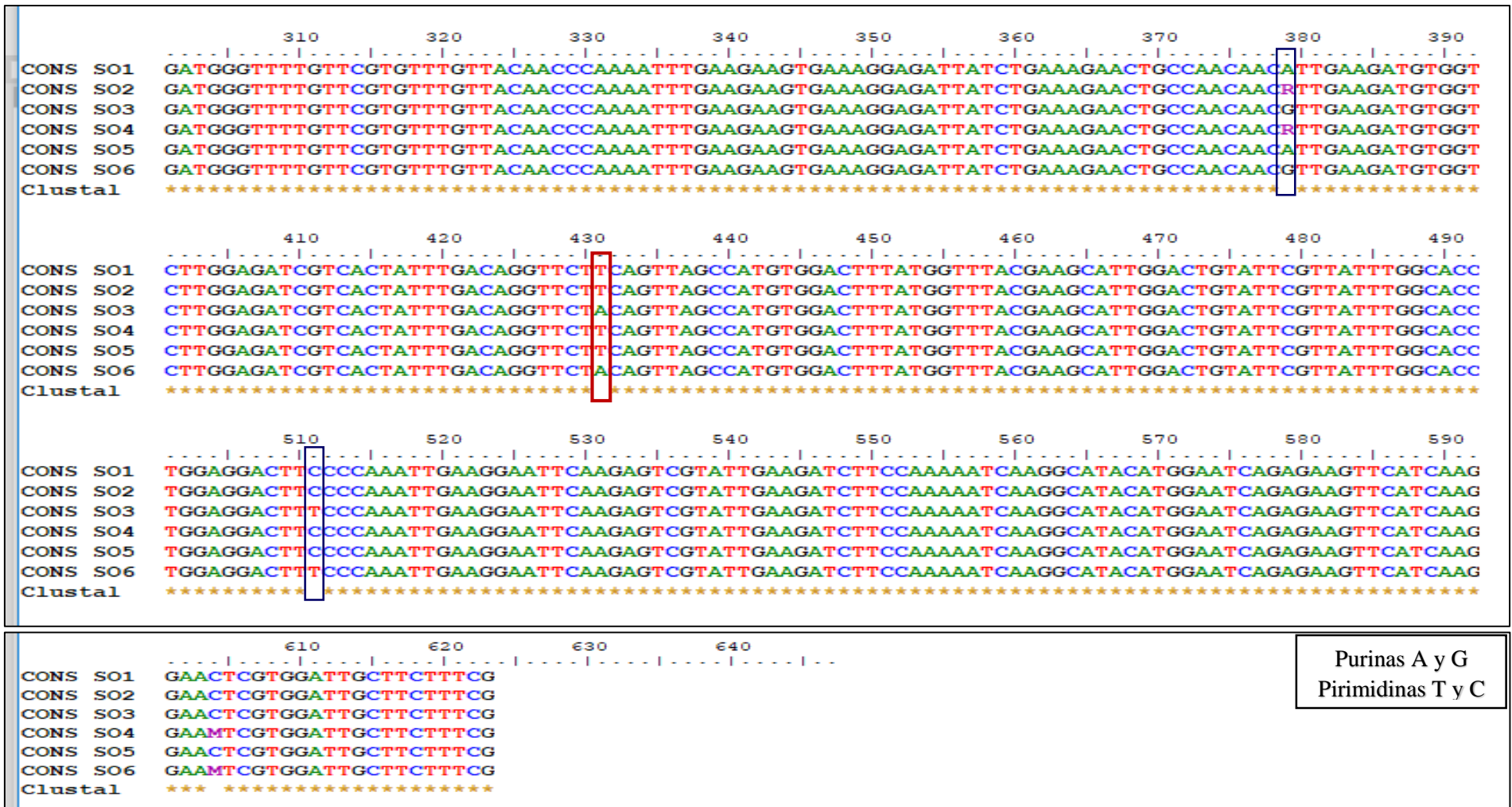


Figura 2: Resultado del alineamiento múltiple de los 6 consensos, de las secuencias de GST de *F. hepatica* resistentes al TCZBZ, de origen animal (SO1-SO6) en el programa Clustal a través del programa BioEdit. El recuadro azul nos indica variaciones transicionales por el cambio de un solo grupo (purinas o pirimidinas) y el recuadro rojo variaciones transversionales por el cambio de dos grupos (purina por pirimidina o viceversa).

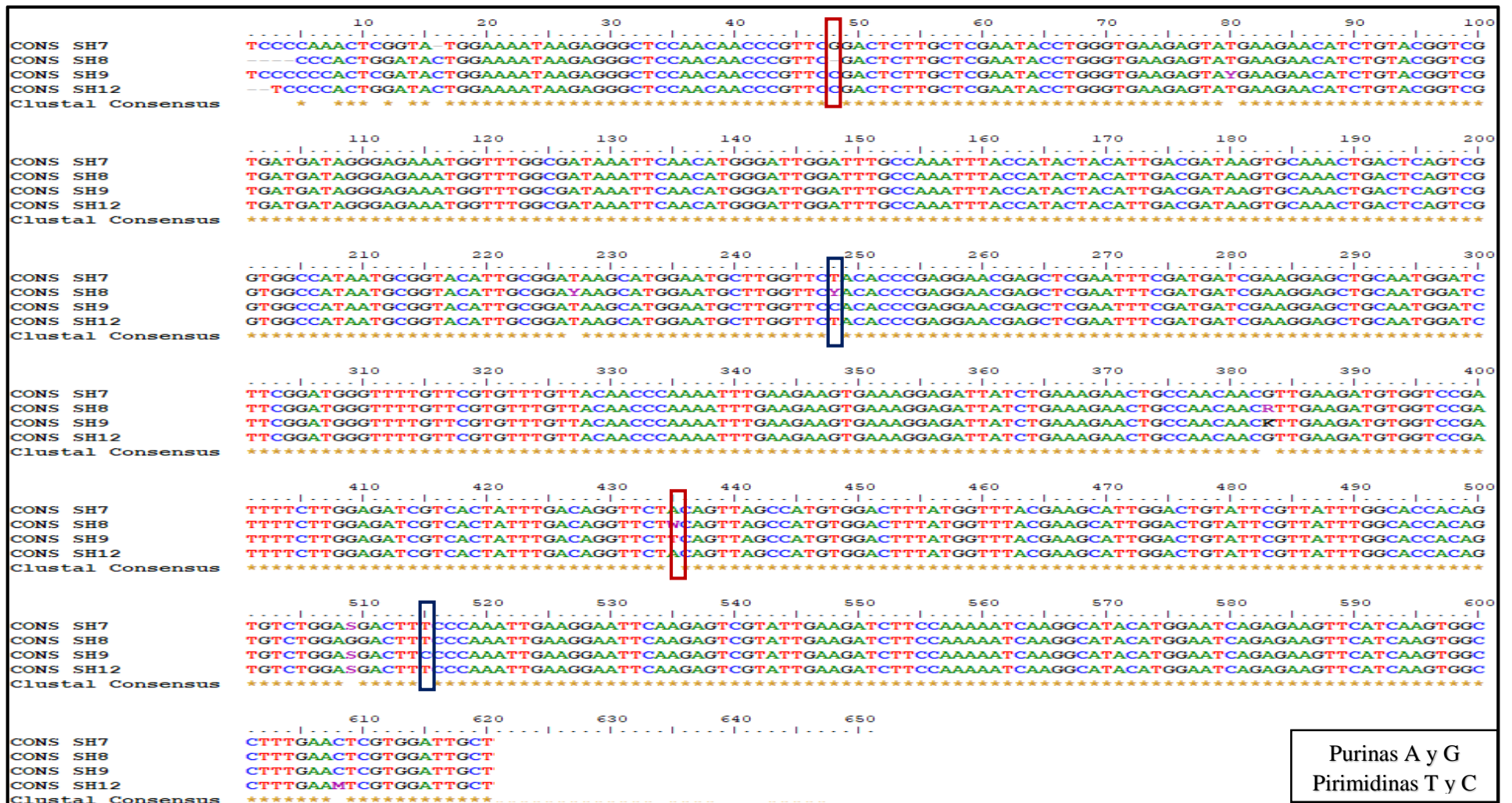


Figura 3. Resultado del alineamiento múltiple de los 4 consensos, de las secuencias de GST de *F. hepatica* resistentes al TCBZ, de origen humano (SH7, SH8, SH9 y SH12) en el programa Clustal a través del programa de BioEdit. El recuadro azul nos indica variaciones transicionales, (cambio de un solo grupo purinas o pirimidinas) y el recuadro rojo variaciones transversionales (cambio de dos grupos purina por pirimidina o viceversa).

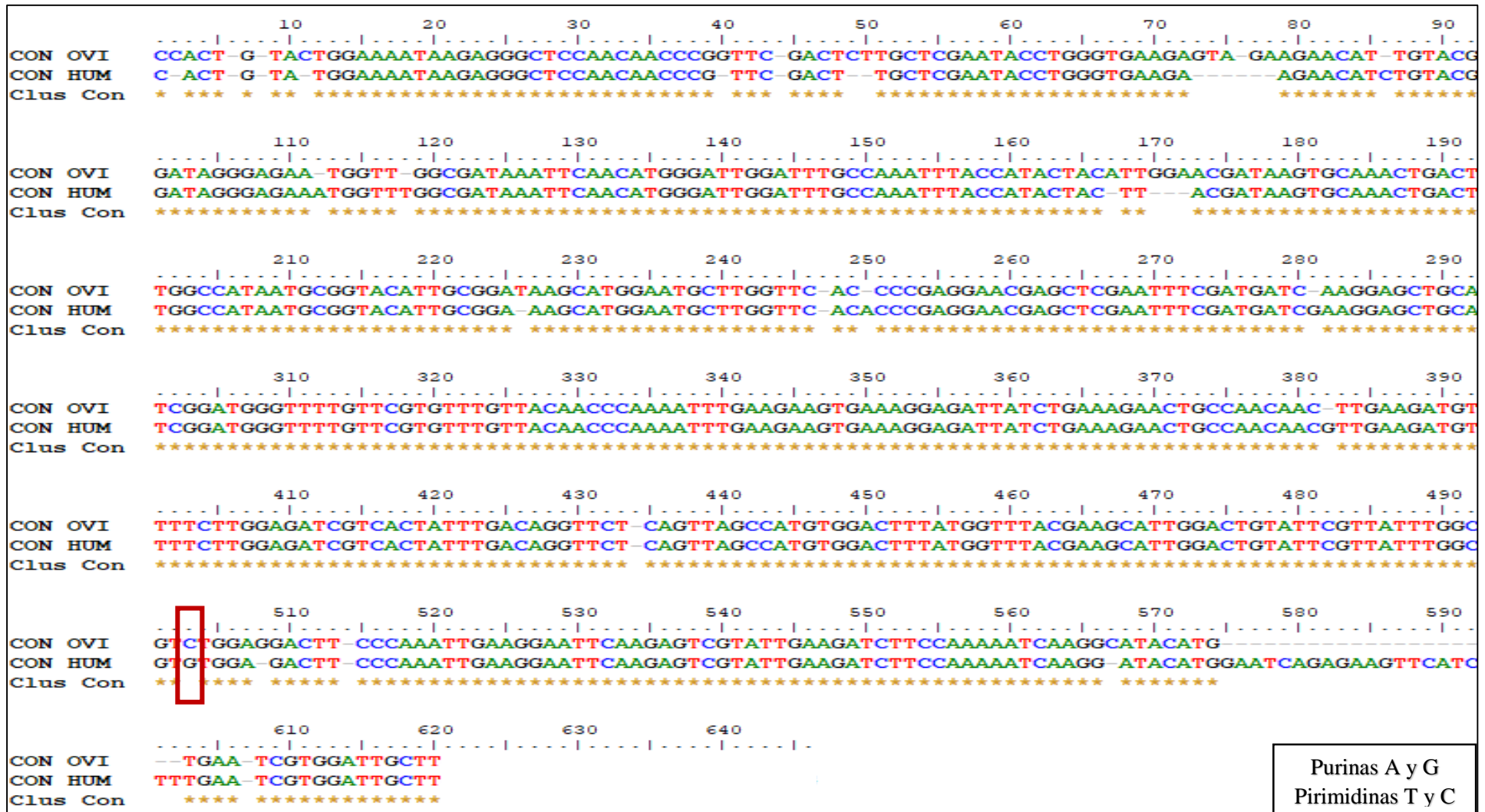


Figura 4. Comparación de las secuencias consenso animal vs humano para la GST proveniente de cepas de *F. hepatica* resistentes al TCBZ. El recuadro rojo nos indica un único polimorfismo de nucleótido que corresponde a una variación transversal por el cambio de dos grupos (purina con pirimidina o viceversa).



Figura 5 Alineamiento local *BLAST* de la secuencia de GST de *F. hepatica* provenientes de animales (A) y humanos (B) con la colección de nucleótidos del *GenBank*

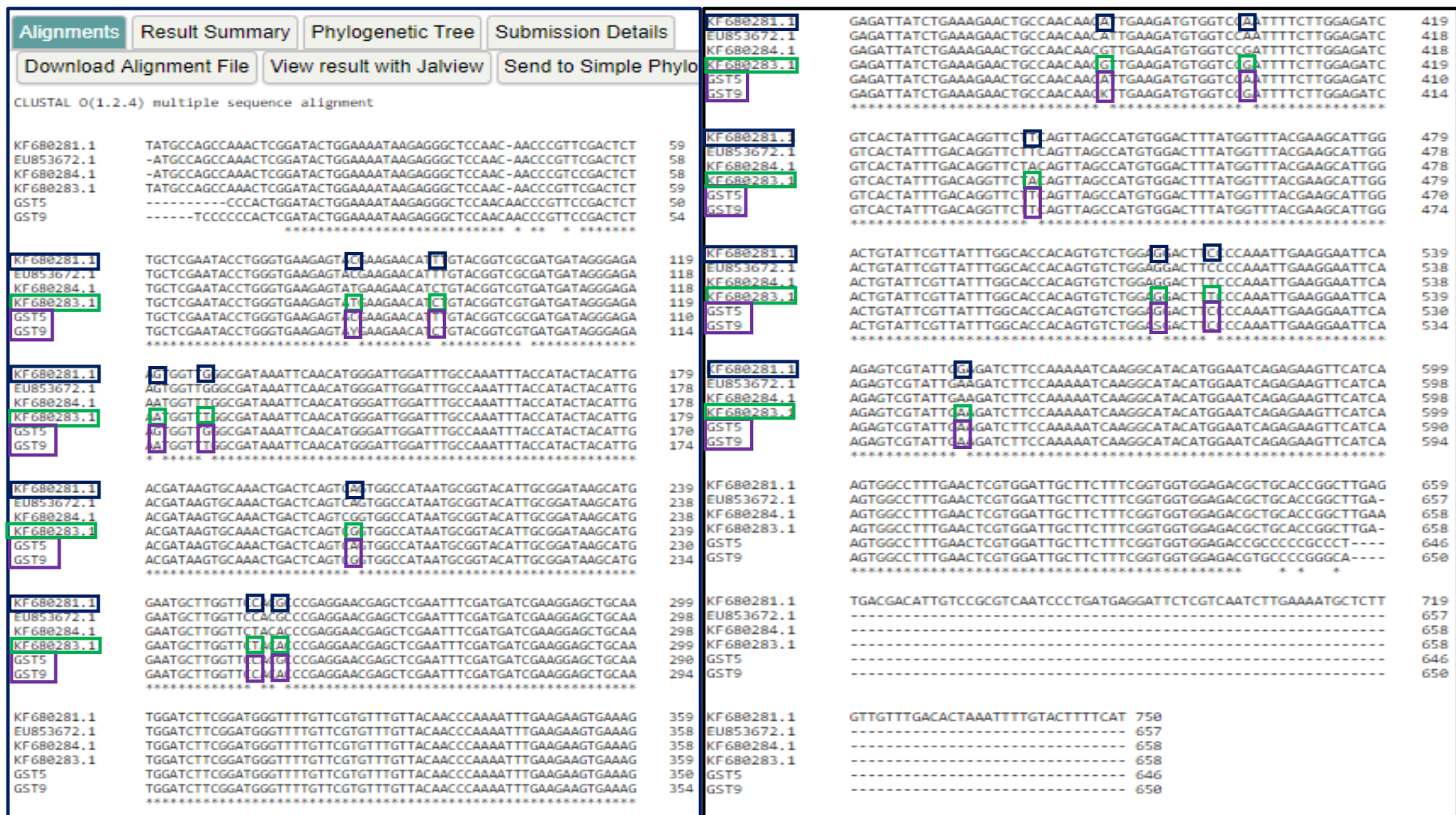


Figura 6. Alineamiento múltiple del gen de la GST de *F. hepatica* resistentes al TCBZ de Cajamarca (GST5 y GST9), comparadas con cepas reportadas en el GenBank, empleando la herramienta bioinformática Clustal Omega (anexo 7). Los recuadros azules y verdes indican la resistencia de otros estudios y los recuadros morados (cepas de Cajamarca), confirma que existe una coincidencia de resistencia entre ambas cepas.

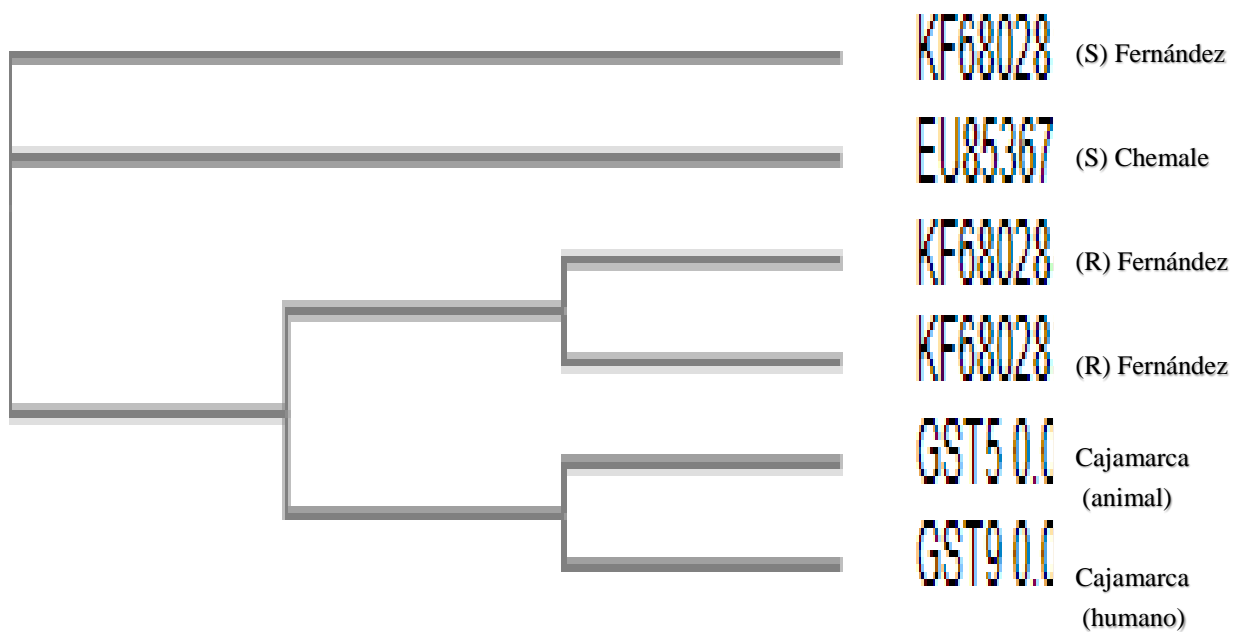


Figura 7. Árbol filogenético de las cepas de *F. hepatica* de Cajamarca, de origen animal (GST5) y humano (GST9), comparadas con otras cepas en el GenBank

En este trabajo, estudiamos la GST bajo la premisa de que sería una de las enzimas responsables de la desintoxicación parasitaria, eliminando al antihelmintico TCBZ, y desde un punto de vista molecular intentamos establecer si el origen hospedero del parásito podría relacionarse en alguna medida con la presencia de polimorfismos o mutaciones nucleotídicas en la enzima, que expliquen a su vez la resistencia al TCBZ (50). En un principio, mediante el análisis visual de los fragmentos y el programa Gel Analyzer, la secuencia de GST procedente de las cepas de *F. hepatica* resistentes al TCBZ, de origen animal (SO1, SO2, SO3, SO4, SO5 y SO6) y humanos (SH7, SH8, SH9, SH10, SH11 y SH12), mostraron fragmentos de tamaño compatible (657 pb) con lo reportado por la literatura, como puede evidenciarse en la Figura 1, sobre el gel de electroforesis en agarosa al 1,5 % teñido con SYBER Safe®.

En el análisis macromolecular de las bandas se puede observar que no habría variaciones que tengan que ver con diferencias en el tamaño de los fragmentos del gen amplificado. Todas las bandas están alineadas alrededor de los 675 pb, que es el fragmento que enmarcan los *primers* empleados en este estudio. Sin embargo, el tamaño de las bandas no necesariamente indica el tipo y ubicación de los nucleótidos que conforman el fragmento del gen, aspectos que son determinados durante el análisis de la conformación nucleotídica, y que finalmente esclarecen si hay o no diferencias en los fragmentos provenientes de hospederos distintos.

Las técnicas de identificación molecular de nuevos tipos o variedades parasitarias se complementan actualmente con el empleo de una variedad de herramientas bioinformáticas que nos acercan a un análisis de mayor precisión: así tenemos que durante el análisis preliminar de las secuencias nucleotídicas fue necesario eliminar el ruido del cromatograma (*background*) que apareció durante el proceso de secuenciamiento. Esta

limpieza se hizo antes de obtener las secuencias de consenso correspondientes (Anexo 1), empleando el editor de secuencias BioEdit al principio y al final de cada secuencia para obtener un equivalente de alineación. De manera preliminar, estos datos nos indican que no hay variabilidad molecular significativa en la expresión de estas proteínas y, dicho de otro modo, en la expresión de las proteínas de tipo GST de *F. hepatica* resistentes al TCBZ.

Por otro lado, al analizar los cromatogramas obtenidos de la secuenciación se encontraron secuencias muy homogéneas, tanto las provenientes de animales como las de humanos; sin embargo, mediante un primer análisis bioinformático con el programa BioEdit se logró establecer algunas variaciones nucleotídicas (transiciones y transversiones) en algunas de las secuencias, en cepas provenientes de ambos tipos de hospederos (Figura 2 y Figura 3). Es importante resaltar que este proceso implicó la obtención de secuencias de consenso en ambas reacciones de secuenciamiento, es decir, las secuencias obtenidas por reacción 5'→3' y aquellas obtenidas por reacción 3'→5' (cada gen fue clonado, en sus dos cadenas) para cada uno de los productos de PCR; finalmente, fueron alineadas en un primer momento para obtener la secuencia lo más completa posible del gen de la GST de cada cepa del parásito (Figura 4).

En la Figura 2, después del análisis de las secuencias de consenso del gen GST provenientes de fasciolas de origen animal, (SO1-SO6) se encontró hasta nueve diferencias, siete serían mutaciones sinónimas o transicionales (cambio de un solo grupo purinas o pirimidinas), en las posiciones 76, 86, 112, 244, 247, 379 y 511, y dos serían mutaciones no sinónimas o transversionales (cambio de dos grupos purina con pirimidina o viceversa), en las posiciones 118 y 431, lo que podría estar asociado de manera importante con la resistencia de las cepas de *F. hepatica* de Cajamarca al TCBZ,

concordando con lo que recientemente afirma Fernández *et al.* (49) quienes reportan diferencias en dos nucleótidos en las posiciones 233 y 524 en la GST de la cepa *Sligo*, resistente al TCBZ, concluyendo que estas mutaciones podrían explicar en parte la resistencia antihelmíntica.

Por otro lado, en la Figura 3, se muestra el resultado del alineamiento de cuatro secuencias consenso de la GST de *F. hepatica* de origen humano (SH7, SH8, SH9 y SH12), donde se observan cuatro variaciones en la conformación nucleotídica del gen, de las cuales dos serían mutaciones sinónimas o transicionales (cambio de un solo grupo purinas o pirimidinas), en las posiciones 248 y 515, y dos serían mutaciones no sinónimas o transversionales (cambio de dos grupos purina con pirimidina o viceversa) en las posiciones 48 y 435. En el mismo sentido, estas variaciones nucleotídicas, en las cepas de *F. hepatica* de origen humano, podrían ser importantes para explicar la resistencia al TCBZ, tal como lo señalan Fernández *et al.* (9), quienes estudiaron la GST en cepas *Cullompton* sensible al TCBZ, y *Sligo* resistente al TCBZ, afirmando que las diferencias y modificaciones en las secuencias de los ácidos nucleicos de GST serían mutaciones transicionales y transversionales relacionadas con la resistencia del parásito al TCBZ. Las secuencias consenso de las cepas SH10 y SH11 no fueron consideradas en el análisis debido a que se encontró mucho ruido en los respectivos cromatogramas.

En el presente estudio también comparamos las secuencias de GST de consensos finales de cepas de ambos tipos de hospedero, y pese a que observamos variación de carácter genético y diferencia molecular de la GST entre cepas de *F. hepatica* de origen animal (SO1-SO6) y humano (SH7, SH8, SH9 y SH12) (Figura 4), se nota claramente una única mutación no sinónima o transversional en la posición 504, (cambio de una purina con

pirimidina), lo que revelaría también algún nivel de diferencia en la secuencia de nucleótidos de ambos tipos de cepas (animal y humano).

En la figura 4 también se observan espacios vacíos o gaps, en ambas secuencias de consensos finales (animal y humano), los que podrían representar deleciones y/o inserciones que son detectadas por el BioEdit a lo largo de las secuencias comparadas, las mismas que posiblemente se asocien a una forma de expresión de la resistencia. Otros estudios, como el de Jedeppa *et al.* (51) estudiando a *F. gigantica* de búfalos, también han evidenciado mutaciones nucleotídicas, incluso determinan las consecuencias en la expresión de los aminoácidos donde hallaron hasta cuatro diferencias en la secuencia (de aminoácidos); ellos afirman que cuando los cambios o mutaciones son de cuatro aminoácidos a más, estos podrían tener algún efecto en la actividad biológica de la enzima GST.

Del mismo modo, las cepas de Cajamarca, muestran varios cambios en la constitución de sus nucleótidos, y probablemente tengan algún efecto en la actividad biológica como lo afirma Jedeppa *et al.* (51), aunque también cabe la posibilidad de que no haya mayor efecto en el sitio activo de la enzima, como lo afirma Fernández (11), sin embargo, Fernández *et al.* (49), con las cepas *Cullompton*, *Sligo* y *Oberon* de *F. hepatica* y otras provenientes de tres hospederos diferentes (ovinos, bovinos y cerdos), encontraron que solo la cepa resistente presentaba dos diferencias nucleotídicas en las secuencias de GST, lo que se tradujo en la diferencia de un aminoácido, afirmando que si existe una relación de esta diferencia con la resistencia de *F. hepatica* al TCBZ.

En la Figura 5 se muestra el alineamiento de las secuencias de GST de *F. hepatica* resistentes al TCBZ, de origen animal (A) y de origen humano (B), ambas de Cajamarca

(GST5 y GST9, respectivamente), consensuadas y sometidas a un alineamiento local con la herramienta BLAST para nucleótidos. Entre los resultados se evidencian alineamientos significativos con distintas secuencias reportadas por otros investigadores del mundo, contenidas en la base de datos *GenBank*, con las que se tienen porcentajes de identidad superiores a 99 % y coberturas cercanas al 100 %.

En la Figura 6, al comparar las secuencias de GST de las cepas de Cajamarca con las secuencias KF680281 y KF680283 (cepas *Cullompton* y *Sligo*), reportada por Fernández *et al.* (2014) (49), y EU853672 (cepas *Cullompton*) reportada Chemale *et al.* (2006) (50), se puede ver alta homología entre ellas, confirmando, por un lado, que el aislamiento del ARNm que traduce para esta enzima fue realizado correctamente en nuestro estudio, y por otro lado, que las diferencias aunque mínimas, corresponderían con diferencias que expliquen la resistencia al TCBZ, ya que dos de las cepas reportadas por Fernández *et al.* (2014) (49), en el GenBank, fueron demostradas como resistentes al antihelmíntico. Las secuencias de nucleótidos de los consensos de GST de *F. hepatica* resistentes al TCBZ de origen animal (GST5) y de origen humano (GST9), de Cajamarca, fueron comparadas con las secuencias del mismo gen en las cepas *Cullompton* (susceptible) y *Sligo* (resistente) provenientes del Reino Unido, empleando el programa Clustal Omega (Anexo 7), así mismo se nota claramente que en las secuencias nucleotídicas en cepas de GST de *F. hepatica* resistentes del Reino Unido (KF680284), coinciden con las cepas de GST de *F. hepatica* resistentes de origen humano (GST9) de Cajamarca.

En la figura 7, se muestra la relación filogenética y la distancia evolutiva de las cepas Cajamarquinas con respecto a las secuencias reportadas por Fernández *et al.* (49, 11, 28) y Chemale *et al.* (43). En este punto, la GST de cepas cajamarquinas de *F. hepatica*, resistentes al TCBZ (GST5 de ovinos y GST9 de humanos), muestran mayor homología

con las cepas provenientes del trabajo de Fernandez *et al.*, cepas con código de acceso en *GenBank* KF680284 (cepa *Cullompton* y *Sligo*) y KF680283 (cepa *Cullompton*), y están más distantes de las cepas KF680281 (cepas *Cullompton* y *Sligo*) y EU853672 reportada por Chemale *et al.* (cepas *Cullompton*), provenientes del Reino Unido.

De esta manera, los resultados del presente estudio demuestran que hay variación en la conformación de los nucleótidos de la GST de las fasciolas provenientes de ambas especies hospedadoras, cepas de animales y humanos, de Cajamarca; y estas variaciones, de acuerdo con los estudios señalados, podrían estar asociadas con la resistencia del parásito al antihelmíntico TCBZ. Cabe señalar que no podemos profundizar la comparación con otros estudios, ya que solamente se han realizado estudios de GST en fasciolas de animales y aun no se reportan estudios con cepas de origen humano, siendo la presente tesis la primera investigación que aborda la conformación molecular de GST de cepas que provienen de infección natural en humanos.

CONCLUSIONES

1. Se estableció que existe diferencias moleculares en la conformación nucleotídica del gen GST entre cepas de origen animal y humano; estas diferencias estarían relacionadas con la resistencia al antihelmíntico TCBZ.
2. Se estableció una única variación nucleotídica importante, una mutación no sinónima transversional del gen GST, que se presentó al comparar las cepas de *Fasciola hepatica* de origen animal y humano, provenientes de Cajamarca.
3. Las secuencias nucleotídicas del gen GST de cepas de *Fasciola hepatica* de Cajamarca, resistentes al TCBZ y provenientes de animales, presentaron más de 99% de identidad con las cepas resistentes, *Sligo* y *Oberon*, provenientes del Reino Unido.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar otros estudios referentes a la conformación de nucleótidos de la GST de *F. hepatica*, en cepas resistentes al TCBZ que provengan de toda la provincia de Cajamarca. También en cepas sensibles al TCBZ.
2. Aplicar los protocolos para extraer GST y su estudio en especímenes juveniles de *F. hepatica*.
3. Educar a la población sobre la infección de *F. hepatica*, resistente al TCBZ y orientar sobre las medidas necesarias para contrarrestar la infección resistente a este antihelmíntico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cordero del Campillo M, Rojo Vásquez FA. Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill-Interamericana. España. 2000; 84-486-0236.
2. Robinson MW, Dalton JP. Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other Trematodiasis. Philos Trans. R Soc. Lond. B. Biol Sci. 2009; 364: 2763-2776.
3. Marcos LA, Terashima A, Leguía G, Canales M, Espinoza JR, Gotuzzo E. *Fasciola hepatica* infection in Perú: An emergent disease Rev. Gastroenterol Perú. 2007; 27 (4): 389-396.
4. Saba R, Korkmaz M, Inan D, Mamikog L, Turhan O, Gunseren F. et al. Human fascioliasis. Clin. Microb. Infect. 2004; 10: 385–387.
5. Brennan GP, Fairweather I, Trudgett A, Hoey E, McCoy, McConville M, et al. Understanding triclabendazole resistance. Exp. and Mol. Pathol. 2007; 82: 104–109.
6. Rivera-Jacinto MA. Caracterización molecular de las Saposinas de *Fasciola hepatica* en cepas de distinto origen y sensibilidad al Triclabendazol. Tesis Doctoral Universidad Nacional de Cajamarca - UNC. 2016.
7. Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M, et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Perú): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. Vet. Parasitol. 2013; 195 (1-2):118-21.

8. Kaya M, Bestas R, Cetin S. Clinical presentation and management of *Fasciola hepatica* infection: Single-Center Experience. *World J. Gastroenterol.* 2011; 17(44): 4899-904.
9. Fernández V, Lamenza P, Ortiz-Oblitas P, Solana H. Identificación del gen Glutathión S-Transferasa en *Fasciola hepatica* sensible y resistente a Triclabendazole. XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología FLAP. 2013.
10. Ketterer B, Coles B, Meyer DJ. The Role of Glutathione in Detoxication. *Environ Health Perspec.* 1983; 49: 59-69.
11. Edited by Toshiki Asao. Md Asaduzzaman. Identification and Differential Activity of Glutathione S-Transferase Mu in Strains of *Fasciola hepatica* Susceptible and Resistant to Triclabendazole. *Amino Acid - New Insights and Roles in Plant. and Animal.* Reino Unido. 2017; 522: 273-284.
12. 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 Trop.* 2011; 120: 119– 29.
13. Moll L, Gaasenbeek CP, Vellema P, Borgsteede FP. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet. Parasitol.* 2000; 91 (1-2):153-158.
14. Diaz AV, Netherton CL, Dixon LK, Wilson AJ. Apparent Triclabendazole Resistant Human *Fasciola hepatica* Infection, the Netherlands. *Emerg. Infect Dis.* 2012; 18 (6): 1028-1029.

15. Robinson MW, Lawson J, Trudgett A, Hoey EM, Fairweather I. The comparative metabolism of triclabendazole sulfoxide by triclabendazole susceptible and Triclabendazole-resistant-*Fasciola hepatica*. Parasitol. Res. 2004; 92(3):205-10.
16. Alirahmi H, Farahnak A, Golmohamadi T, Esharghian MR. Comparative assay of glutathione S-transferase (GSTs) Activity of Excretory-Secretory Materials and Somatic Extract of Fasciolas spp Parasites. Acta Med. Iran. 2010; (6):367-370.
17. Fernández 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 J. Animal and Vet. Sciences. 2014; 9 (4) 177.181.
18. Terashima A, Marcos L. Fracaso de dosis única de Triclabendazole para el Tratamiento de Fasciolosis humana. Acta Med. Per. 2016; 33(3): 228-31.
19. Gil LC, Díaz A, Rueda C, Martínez C, Castillo D, Werner APT. Fascioliasis hepatica humana: resistencia al tratamiento con Triclabendazol. Rev. Méd. Chile. 2014; 142 (10): 1330-1333.
20. Cabada MM, López 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. Negl. Trop. Dis. 2016; 10(1): 1-8.
21. Yadegari D, MD, Talaie H. Massoud J. Clinical Trial of Triclabendazole on Human Fascioliasis: Long Term Follow Up. Med. J. of the Islamic Republic of Iran. 1999; 13 (2).

22. Faltah el kholy ZA, Heshmat MG, Essam El-Dim Shaheen N, Gomaaa A. Bile Acids Assessment in Fascioliasis As a Hepatobiliary Disease. JMRI, 2008; (29): 47- 52.
23. Geerts S, Gryseels B. Drug. Resistance in Human Helminths: Current Situation and Lessons from livestock. Clin. Microbiol. Rev. 2000; 13(2): 207–22.
24. Marcos L, Maco V, Samalvides F, Terashima A, Espinoza JR, Gotuzzo E. Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2006, 100 (2): 158-166.
25. Scarcella SA. Caracterización morfofisiológica del trematode *Fasciola hepatica*. Su vinculación con el fenómeno de resistencia antihelmíntica. Fac. de Cien. Vet. U.N.C.P.B.A. 2016; 116.
26. Rokni MB, Mirhendi H, Behnia M, Fasihi Harandi M, Jalalizand N. Molecular Characterization of *Fasciola hepatica* Isolates by RAPD-PCR and Ribosomal ITS1 Sequencing. IRCMJ. 2010; 12(1): 27-32.
27. Fernández V, Estein S, Ortiz P, Luchessi P, Solana V, 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. Exp. Parasitol. 2015; (159): 274-279.
28. Espinoza JR, Terashima A, Herrera P-Velit, Marcos L.A. Human and animal fascioliasis in Peru: impact in the economy of endemic zones. Rev. Perú Med. Exp. Salud Publica. 2010; 27(4): 604-12.

29. Rodríguez-Ulloa C, Rivera-Jacinto MA, Ortiz-Oblitas P, Vergara-Hoban CA. Fascioliasis in schoolchildren in the inter andean valley of Cajamarca, Perú. 25th International Conference of the World Association for the Advancement of Vet. Parasitol, At Liverpool, England. 2015.
30. León D. Cabanillas O. Factores de riesgo asociados a fasciolosis humana en tres provincias del departamento de Cajamarca, Perú. Salud Tecnol. Vet. 2014; (2): 7-13.
31. Rivera-Jacinto M, Rodríguez-Ulloa C, Rojas-Huamán Y, Valdivia-Meléndez Y, Saucedo-Duran T. Conocimientos, actitudes y prácticas sobre fascioliasis en madres de una zona rural Andina del Norte Peruano. Rev. Perú Med. exp. Salud Publica. 2010; 27(1): 59-62.
32. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. Adv. Parasitol. 2009; (69): 41-146.
33. Reyna GM. Caracterización Molecular de *Fasciola hepatica* procedente de diferentes hospederos bovino, ovino y porcino mediante marcadores moleculares ITS-1, ITS-2 y COX, en el distrito de Cajamarca-Perú. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Cajamarca, 2013.
34. Carrada-Bravo T. *Fasciola hepatica*; Ciclo Biológico y Potencial Biótico. Rev. Mex. de Patolog. Clín. 2007; 54, (1): 21-27.
35. Bedoya FM. Triclabendazol Laboratorios TIERWELT – 2010.

36. Scarcella S, Solana MV, Fernández V, Lamenza P, Ceballos L, Solana H. Increase of Glutathione S-Transferase, Carboxyl Esterase and Carbonyl Reductase in *Fasciola hepatica* recovered from triclabendazole treated sheep. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2013; 191(2): 63-5.
37. Cadenazzi GV, Miranda-Miranda E, Larsen K, Solana HA. Multienzyme response is involved in the Phenomenon of *Fasciola hepatica* Resistance to Triclabendazole. *J. of Drug Metabolism Toxicology.* 2015, 6:4.
38. James JE, Hudson AL, Davey MW. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends Parasitol.* 2009, 25(7): 328-335.
39. Kelley JM, Elliott PE, Beddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill TW. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol.* 2016; 32(6): 458-69.
40. Rossjohn J, Feil SC, Wilce MC, Sexton JL, Spithill TW, Parker MW. Crystallization, Structural Determination and Analysis of a Novel Parasite Vaccine Candidate: *Fasciola hepatica* Glutathione S-Transferase. *J. Mol. Biol.* 1997; 273: 857-872.
41. Torres-Rivera A, Landa A. Glutathione Transferases from Parasites: A Biochemical view. *Acta Trop.* 2008; 105 (2): 99–112.
42. Wilce MC, Parker MW. Structure and Function of Glutathione S-Transferases. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1205(1):1-18.
43. Chemale G, Morphew R, 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): 6263-6273.

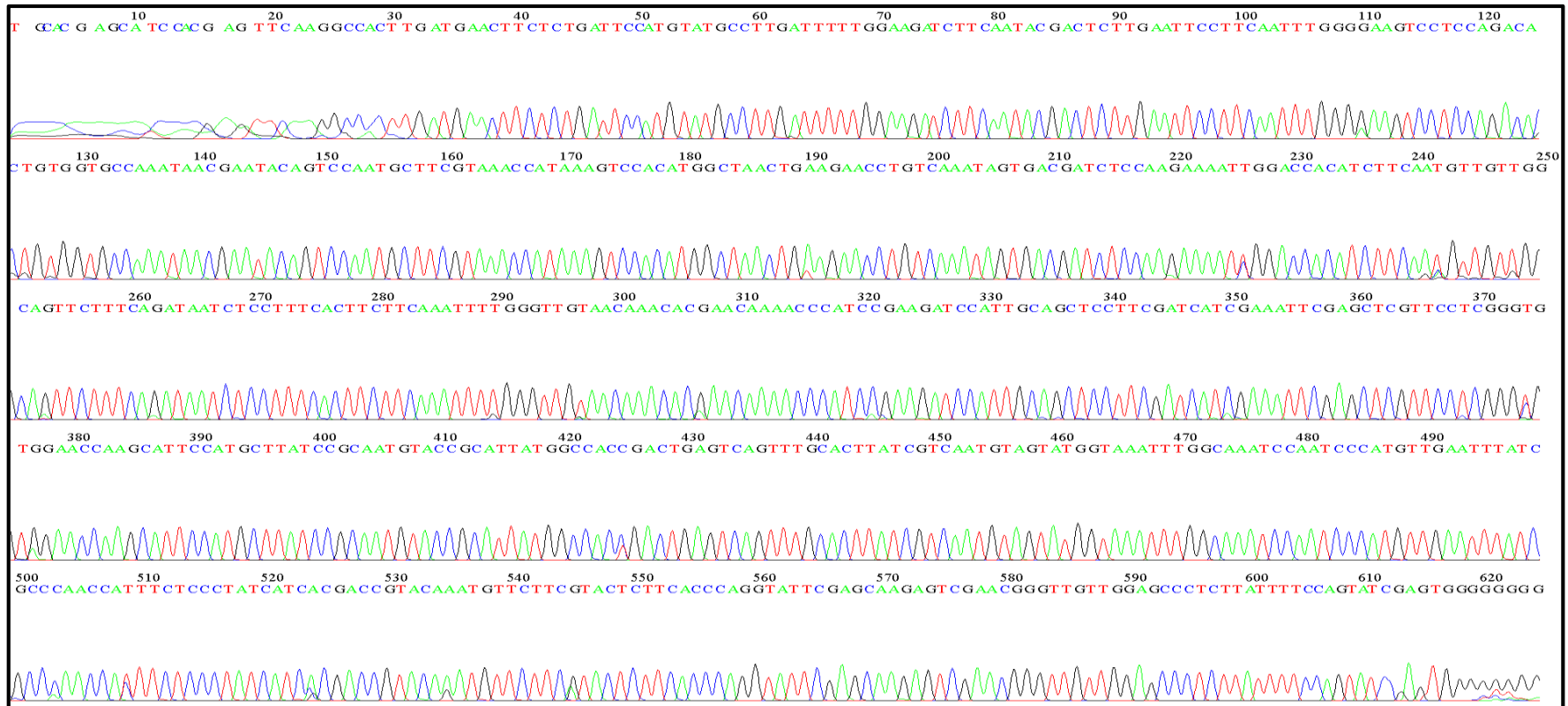
44. Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T, Spithill TW. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase Vaccine. 1996; 14 (17-18): 1603-1612.
45. Rodríguez IP. Barrera HA. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos Décadas de su invención. Ciencia UANL. 2004; 7: 321-335.
46. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en Tiempo Real. Tec. en salud. 2013; (2): 70-78.
47. Agrawal S, Techniques in Molecular Biology. 1 ed. India: IBDC. 2008.
48. Farrell RE. RNA. Methodologies Laboratory Guide for Isolation and Characterization. Academic Press Elsevier; 2010.
49. Fernández V. Estein SM, Ortiz P. Solana H. Análisis genético comparativo de la Glutación S-transferasa de *Fasciola hepatica* procedente de distintos huéspedes definitivos. RAZ y EIE. 2014; 9(3): 25-29.
50. Checa MA. Polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 2007; 20(3): 213-221.
51. Jedeppa A, Raina OK, Samanta S, Nagar G, Kumar N, Varghese A, et al. Molecular cloning and Characterization of a Glutathione S-Transferase in the tropical liver fluke, *Fasciola gigantica*. J. Helminthol. 2010; 84(1): 55–60.

ANEXOS

File: SO1_GST-R.ab1
Sample: SO1_GST-R

Run Ended: 2019/2/22 22:6:44
Lane: 5 Base spacing: 15.810834

Signal G:2652 A:3190 C:4724 T:4055
1289 bases in 15427 scans Page 1 of 2



Anexo 1. Cromatograma de la GST de *F. hepatica* de origen animal, de la cepa SO1, resistente al TCBZ determinada con el primer Forward (5'→3').

BioEdit Sequence Alignment Editor - [Graphic Print: Untitled4]

File Edit Font File Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help

Note: This is a print preview. It may copy to the clipboard slightly large. To show control panel, press the red arrow (upper left)

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
cons SO1 CCCCAC TCGATA CTGGAAAA TAAGAG GGGCTCCA ACAACCCG TTTCGACT CTTGCT CGAATACCTGGGT GAAGAG TACGAAGA ACATTTGTAC
CONS SO2 .....
Consensus .....

110     120     130     140     150     160     170     180     190
cons SO1 GATAGGGAGAAA TGGTTGGG CGATAAATTCAACATGGGATTGGATTGCCAAATTTACCATACTACATTGACGATAAGTGCAAAC TGACTC
CONS SO2 .....
Consensus .....

210     220     230     240     250     260     270     280     290
cons SO1 CCATAATGCGGTACATTGCGGATAAGCATGGAATGCTTGGTTCCACACCCGAGGAACGAGCTCGAATTTGATGATCGAAGGAGCTGCAAT
CONS SO2 .....
Consensus .....

310     320     330     340     350     360     370     380     390
cons SO1 GATGGGTTTTGTTTCGTTGTTTACAACCCAAAATTTGAAGAAGTGAAAGGAGATTATCTGAAAGAACTGCCAACAAACATTGAAGATGTTGG
CONS SO2 .....
Consensus .....

410     420     430     440     450     460     470     480     490
cons SO1 CTTGGAGATCGTCACTATTTGACAGGTTCTTCAGTTAGCCATGTGGACTTTATGGTTTACGAAGCATTTGGACTGTATTCTGTTATTTGGCAC
CONS SO2 .....
Consensus .....

510     520     530     540     550     560     570     580     590
cons SO1 TGGAGGACTTCCCCAAAATTGAAGGAATTC AAGAGTCGTATTGAAGATCTTCCAAAATCAAGGCATACATGGAATCAGAGAAGTTCATCAA
CONS SO2 .....

610     620     630     640
cons SO1 GAACTCGTGGATTGCTTCTTTCGGTGGTGGAGACG
CONS SO2 .....TGCCCCGGCCTTG
Consensus .....TGCCCCGGCCTTG

```

Anexo 2. Resultado del alineamiento de las secuencias de GST de *F. hepatica* de origen animal, SO1 y SO2, y obtención del consenso en el programa BioEdit.

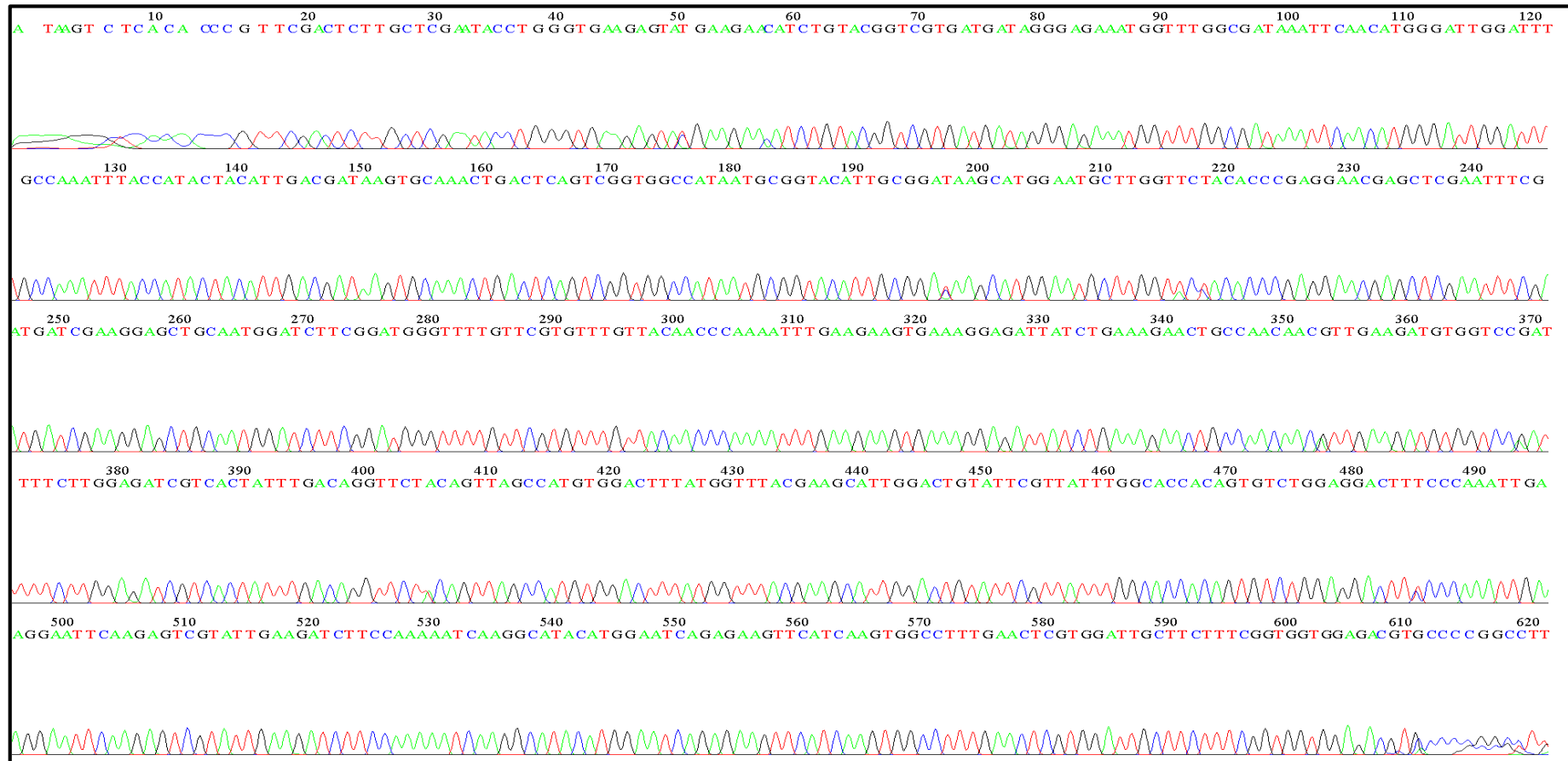
File: SH8_GST-F.ab1
Sample: SH8_GST-F

Run Ended: 2019/2/22 22:6:44
Lane: 27

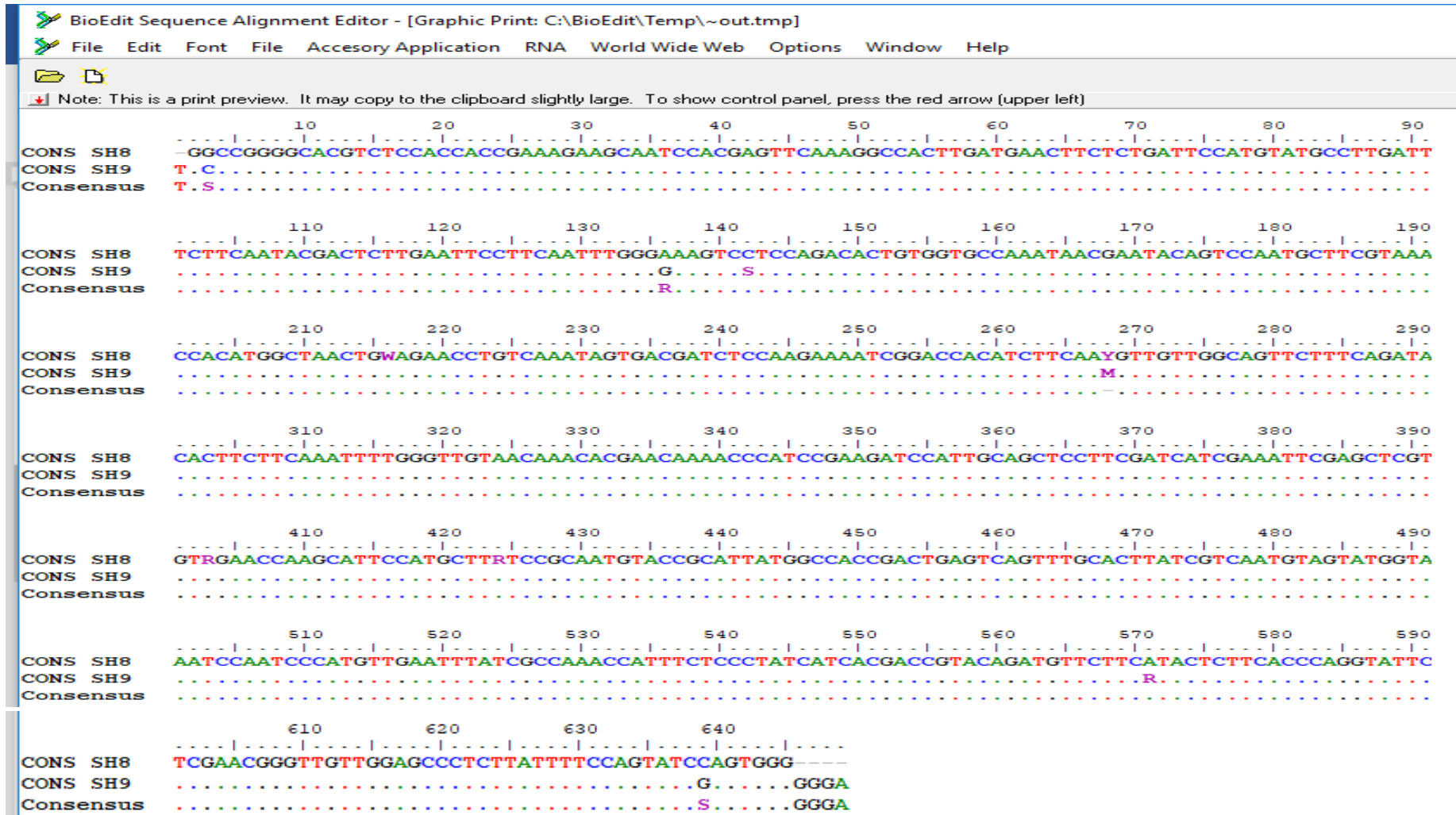
Signal G:3587 A:4306 C:4714 T:4590
Base spacing: 15.531062 1322

bases in 16195 scans

Page 1 of 2



Anexo 3. Cromatografía de GST de *F. hepatica* de origen humano de la cepa SH8 resistente al TCBZ determinada con el primer Forward (5'→3').



Anexo 4. Resultado del alineamiento de las secuencias de GST de *F. hepatica* de origen humano, SH8 y SH9, y obtención del consenso en el programa BioEdit.



Anexo 5. Resultado del alineamiento de las secuencias de consenso de GST de *F. hepatica* resistentes al TCBZ comparadas las de origen animal con las de origen humano. Nótese las sustituciones nucleotídicas en la GST de origen humano en las posiciones 8, 76, 86, 118 y 511.

European Bioinformatics Institute [GB] | <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

EMBL-EBI Services Research Training Industry About us

75%

Clustal Omega

Input form Web services Help & Documentation Bioinformatics Tools FAQ Feedback Share

Tools > Multiple Sequence Alignment > Clustal Omega

Multiple Sequence Alignment

Clustal Omega is a new multiple sequence alignment program that uses seeded guide trees and HMM profile-profile techniques to generate alignments between three or more sequences. For the alignment of two sequences please instead use our [pairwise sequence alignment tools](#).

Important note: This tool can align up to 4000 sequences or a maximum file size of 4 MB.

STEP 1 - Enter your input sequences

Enter or paste a set of

DNA

sequences in any supported format:

```
>SGT5
CCCCTGGATACTGGAAAATAAGAGGGCTCCAACAACCCGTTCCGACTCTTGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTACGAAACATTGTACGGTCGCGATG
ATAGGGAGAAGTGGTTGGGCATAAATCAACATGGGATTGGATTGCCAAATTTACCATACTACATTGACGATAAGTGCAAACCTGACTCAGTCAGTGGCCAT
AATGCGGTACATTGCGGATAAGCATGGAATGCTTGGTTCCACGCCGAGGAACGAGCTCGAATTCGATGATCGAAGGAGCTGCAATGGATCTCGGATG
GGTTTTGTTCGTGTTTGTACAACCCAAAATTTGAAGAAGTGAAGGAGATTATCTGAAAGAAGTCCCAACAACATTGAAGATGTGGTCCAATTTCTTGGGA
GATCGTCACTATTTGACAGGTTCTTCAGTTAGCCATGTGGACTTTATGGTTTACGAAGCATTGGACTGTATTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGACT
TCCCAAATGAAGGAATCAAGAGTCGATTGAAGATCTTCCAAAATCAAGGCATACATGGAATCAGAGAAGTTCATCAAGTGGCCTTTGAACTCGTGGGA
TCTCTTTTCCCTCTCTCAAGCCCCCCCCCT
```

Or, upload a file: Ningún archivo seleccionado [Use an example sequence](#) | [Clear sequence](#) | [See more example inputs](#)

STEP 2 - Set your parameters

OUTPUT FORMAT

Anexo 6. Interfaz de *Clustal-Omega* para el alineamiento múltiple de secuencias.

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

Procedimiento de la toma de muestras para procesar *Fasciola hepatica*.

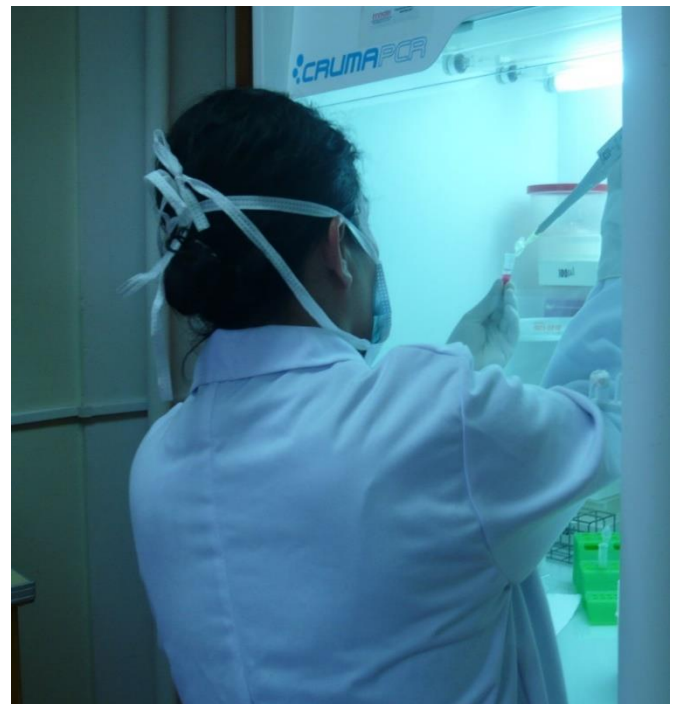
- ❖ **Foto 1.** Preparacion previa y extraccion del ARN de *Fasciola hepatica* adulta.



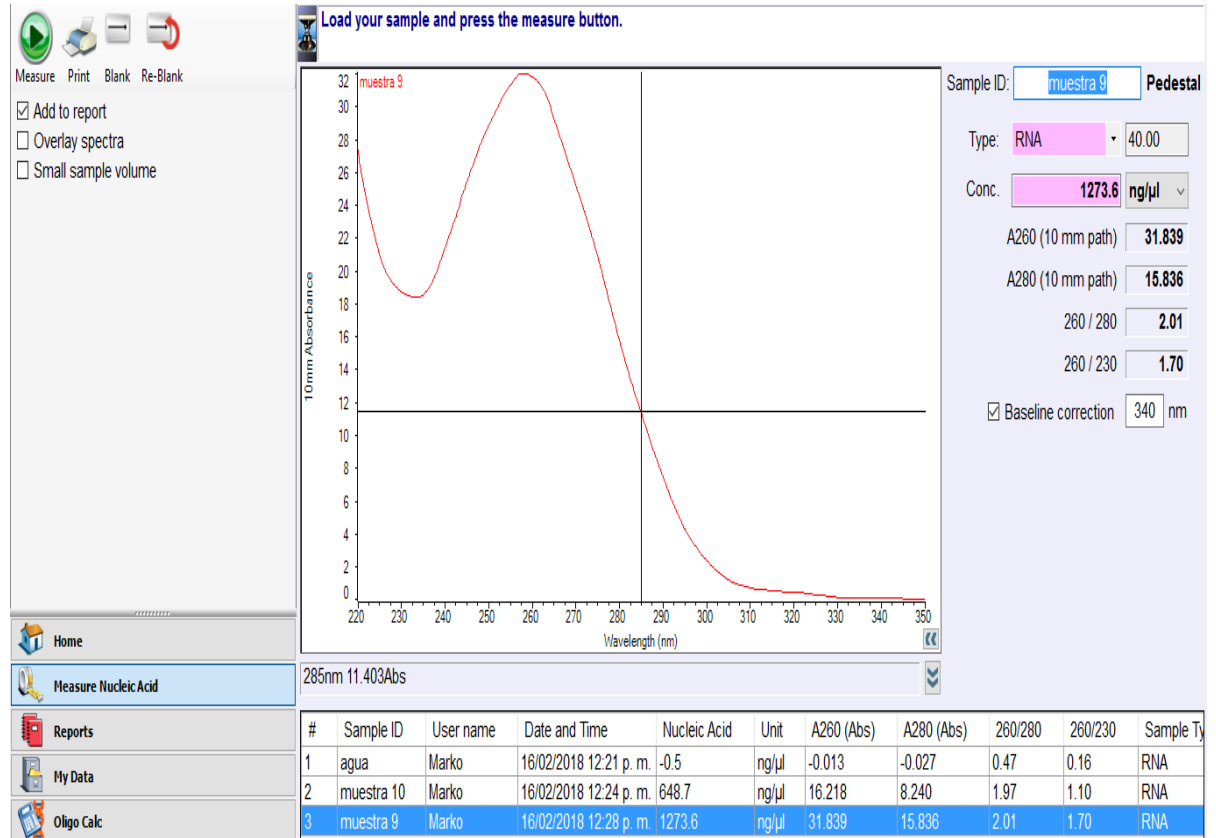
Foto 2. Extraccion del ARN con Trizol 1ml. Por especimen de *Fasciola hepatica*.



Foto 3. La fase acuosa que contiene ARN se pasa a un tubo de Eppendorf



Anexo 7. Evaluación de la concentración y calidad del ARN de la muestra 9 (SH9) mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000.



En el anexo 7, se observa una alta concentración de ARN (1273.6 ng/ul) proveniente de la muestra 9; además se ve un cociente 260/280 mayor a 2, lo cual es indicativo de buena calidad, así como baja contaminación por trizol y proteínas.

Anexo 8. Concentraciones y calidad del ARN extraído de 12 cepas de *Fasciola hepatica* adultas resistentes al Triclabendazol.

N°	Cepas <i>F. hepatica</i>	Concentración de ARN (ng/ul)	260/280
1	SO1	891,7	1,73
2	SO2	1031,6	1,92
3	SO3	937,6	1,87
4	SO4	1392,6	1,92
5	SO5	649,2	1,78
6	SO6	857,1	1,74
7	SH7	718,3	1,83
8	SH8	648,7	1,77
9	SH9	1273,6	2,01
10	SH10	957,5	1,73
11	SH11	1063	1,99
12	SH12	711,1	1,82

En el anexo 8 se indica, las 12 muestras procesadas de *F. hepatica* de las cuales se extrajo ARN. Las muestras fueron elegidas por su alta concentración y la buena calidad encontrada (cociente 260/280 mayor a 1,78).

❖ **Procedimiento para hacer el corrido de las bandas en la electroforesis**

Foto 1. Se preparó las muestras 5ul. de ADN amplificado y 1 ul. Gel Loading Buffer.

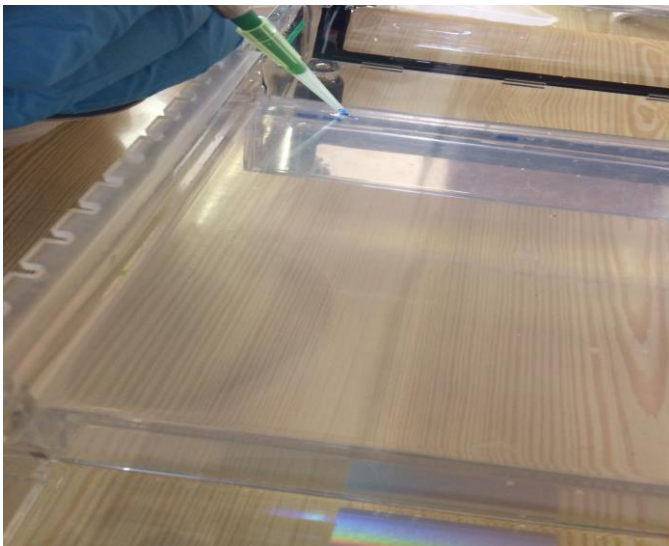
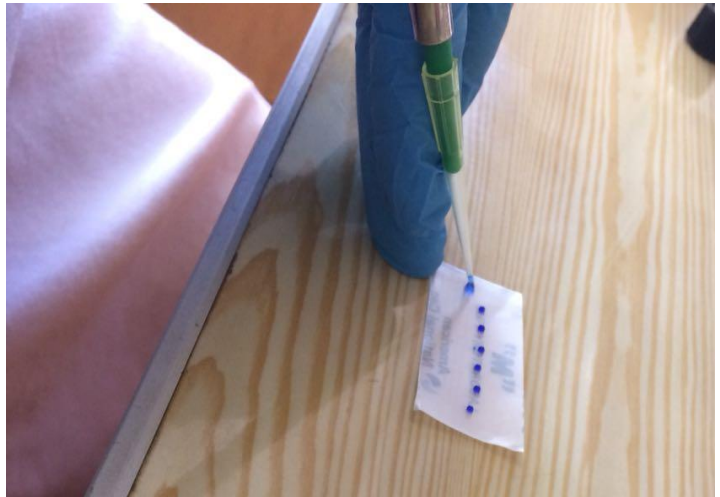


Foto 2. Se incorpora el marcador de peso molecular luego las muestras

Foto 3. Las condiciones de corrida fueron conectadas al sistema para electroforesis

