



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**“CARACTERIZACIÓN POR PESO MOLECULAR DE PROTEÍNAS
SOMÁTICAS DE PARAMPHISTOMIDOS EN BOVINOS
FAENADOS EN EL MATADERO MUNICIPAL DE CAJAMARCA,
2024”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

Bach. CHARITO JENNYFER FERNANDEZ MENDOZA

ASESORA:

Dra. Mblga. CLAUDIA CAROLINA RODRÍGUEZ ULLOA

CO-ASESORES:

Dr. MARCO ANTONIO CABRERA GONZÁLEZ

MCs. CRISTIAN ANGEL HOBÁN VERGARA

CAJAMARCA – PERÚ

2025

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador: **Charito Jennyfer Fernandez Mendoza**
DNI: 74297923
Escuela Profesional/Unidad UNC: ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
2. Asesor:
Dra. CLAUDIA CAROLINA RODRIGUEZ ULLOA
Facultad/Unidad UNC: FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
3. Grado académico o título profesional al que accede:
 Bachiller Título profesional Segunda especialidad
 Maestro Doctor
4. Tipo de Investigación:
 Tesis Trabajo de investigación Trabajo de suficiencia profesional
 Trabajo académico
5. Título de Trabajo de Investigación:
**CARACTERIZACIÓN POR PESO MOLECULAR DE PROTEÍNAS SOMÁTICAS DE
PARAMPHISTOMIDOS EN BOVINOS FAENADOS EN EL MATADERO MUNICIPAL DE
CAJAMARCA, 2024**
6. Fecha de evaluación del antiplagio: 26/8/2025
7. Software antiplagio: TURNITIN URKUND (OURIGINAL) (*)
8. Porcentaje de Informe de Similitud: 12%
9. Código Documento: oid:3117:487098124
10. Resultado de la Evaluación de Similitud:
 APROBADO PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO

Cajamarca, 27 de agosto del 2025



* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

Copyright©

Fernandez Mendoza Charito Jennyfer

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Fernandez, C. 2025. **Caracterización por peso molecular de proteínas somáticas de paramphistomidos en bovinos faenados en el Matadero Municipal de Cajamarca, 2024**/ Charito Jennyfer Fernandez Mendoza

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesora: Dra. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Co-asesores: Dr. Marco Antonio Cabrera González

MCs. Cristian Angel Hobán Vergara

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo
UNC 2025.

**CARACTERIZACIÓN POR PESO MOLECULAR DE PROTEÍNAS SOMÁTICAS
DE PARAMPHISTOMIDOS EN BOVINOS FAENADOS EN EL MATADERO
MUNICIPAL DE CAJAMARCA, 2024**

Autor : Bach. Fernandez Mendoza Charito Jennyfer
Asesor : Dra. Mblga. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa
Co-asesores : Dr. Marco Antonio Cabrera González
 MCs. Cristian Angel Hobán Vergara

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



.....
PRÉSIDENTE

PhD. Ronald Fernando Zelada Mazmela



.....
SECRETARIO (A)

MCs. William Edgardo Soriano Castillo



.....
VOCAL

MCs. Néstor Estuardo Carbajal Caballero

Cajamarca, 2025 - Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 10:00 am del 22 de agosto del 2025, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 11-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada:

Caracterización por peso molecular de proteínas somáticas de Paramphistomidos en bovinos faenados en el matadero Municipal de Cajamarca, 2024

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Charito Jennyfer Fernandez Mendoza

Siendo las 11:20 am del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: MUY BUENO, con el calificativo de 17, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra APTA para la obtención del Título Profesional de: BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.

Table with 2 columns: Miembros Jurado Evaluador (Nombres y Apellidos) and Firma. Rows include Presidente (Dr. Ronald Fernando Zelada Mazmela), Secretario(a) (M.C. William Edgardo Soriano Castillo), Vocal (M.C. Néstor Estuardo Carbajal Caballero), Accesitaria, Asesor (a) (Dra. Mblga. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa), and Asesor (a) (Dr. Marco Antonio Cabrera González).

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

MUY BUENO (17-18)

BUENO (14-16)

REGULAR (12-13)

REGULAR BAJO (11)

DESAPROBADO (10 a menos)

A:

Dios por brindarme la fortaleza para mantenerme firme y avanzar hasta esta etapa de mi vida. A mi madre, Carmen Rosario Mendoza Rodríguez, y a mi padre, Richard Fernandez Maguiña, por su incondicional apoyo, siendo pilares fundamentales para alcanzar esta meta. A mis abuelitos Santos y Manuel, quienes son una fuente constante de inspiración y motivación para cumplir mis sueños. Y, por supuesto, a toda mi familia, cuyo respaldo ha sido esencial en este camino

Agradecimiento

A Dios, por su guía constante y fortaleza en cada etapa de este proceso, permitiéndome alcanzar este importante paso en mi formación profesional. A mis padres y abuelos, por ser el pilar fundamental en mi vida, cuyo apoyo incondicional ha sido esencial para lograr esta meta.

A mi asesora, Dra. Mblga. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa, y a mis coasesores, Dr. Marco Antonio Cabrera González y MCs. Cristian Angel Hobán Vergara, por sus valiosos conocimientos científicos compartidos, así como por su dedicación, tiempo y constante acompañamiento. Sus aportes y orientaciones contribuyeron significativamente a la consolidación de este trabajo académico.

Expreso también mi agradecimiento al PROMEG Nacional por el financiamiento de esta investigación, y al Laboratorio de Biotecnología en Sanidad Animal de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), por la disposición de sus instalaciones y recursos, que hicieron posible la ejecución de esta tesis.

Tabla de Contenido

DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTO	viiv
LISTA DE ILUSTRACIONES.....	xi
LISTA DE ABREVIACIONES	xii
GLOSARIO.....	xiii
TÍTULO.....	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1 Antecedentes de la Investigación	4
2.2 Bases Teóricas.....	7
2.2.1 Parasitosis gastrointestinales en bovinos.....	7
2.2.1.1 Paramfistomosis.....	7
Epidemiología	8
Ubicación taxonómica.....	10
Estadios evolutivos.....	12
Ciclo biológico.....	14
Hospederos	16
Paramfistomosis aguda o intestinal.....	17
Paramfistomosis crónica o ruminal.....	18
Diagnóstico.....	19
Vacunas.....	20
2.2.2 Proteómica.....	21
2.2.2.1 Proteínas somáticas en helmintos	21
Rol fisiológico de las proteínas somáticas con capacidad inmunogénica ...	22
Proteínas somáticas identificadas en paramphistomidos.....	24

2.2.2.2 Caracterización por peso molecular de proteínas somáticas	25
SDS-PAGE	26
Electroforesis Bidimensional (2D)	26
Huella digital de masa de péptidos (PMF)	27
Espectrometría de masas en tándem (MS/MS).....	27
Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS)	28
CAPÍTULO III.....	29
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPOTESIS.....	29
3.1 Nivel de Investigación.....	29
3.2 Tipo y Diseño de Investigación.....	29
3.3 Diseño Metodológico	29
3.3.1 Localización del lugar de muestreo	29
3.3.2 Material biológico	30
3.3.3 Recolección de parásitos	30
3.3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	30
3.3.5 Extracción de proteínas somáticas.....	30
3.3.6 Cuantificación de proteínas somáticas	32
3.3.7 SDS-PAGE	32
3.3.8 Determinación del peso molecular	33
3.3.9 Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	34
CAPÍTULO IV	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1 Resultados	35
4.2 Discusión.....	39
CAPÍTULO V	47
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
5.1 Conclusiones	47
5.2 Recomendaciones.....	47
LISTA DE REFERENCIAS	49
APÉNDICES	69
ANEXOS.....	69

LISTA DE ILUSTRACIONES

- Figura 1.** Diagrama generalizado de la organografía de la forma adulta de *Cotylophoron panamensis* (López y Velásquez, 2012). 1414
- Figura 2.** Ciclo biológico de *Calicophoron daubneyi*. 1: huevos no embrionados, 2: huevos embrionados, 3: miracidios, 4: hospedero intermediario, 4a: esporocistos, 4b: redias, 4c: cercarias, 5: metacercarias, 6: hospedero definitivo, 7: desenquiste, 8: parásitos adultos (Huson, Oliver y Robinson, 2017). 1616
- Figura 3.** Ubicación geográfica del Matadero Municipal de Cajamarca. Centro poblado Iscocongá, Cajamarca, Perú, 2024. Elaborado mediante ArcGIS versión gratuita 10.8.. 2929
- Figura 4.** Imagen completa del perfil electroforético de proteínas del extracto somático de 20 paramphistomidos adultos, analizado mediante SDS-PAGE y revelado por tinción con plata. L1-L10 representan a muestras independientes de extracto proteico somático, cada una obtenida a partir de 20 paramphistomidos; C: control (BSA, 250 µg/mL) y MP: estándares de peso molecular..... 3636
- Figura 5.** Perfil electroforético de proteínas del extracto crudo somático de 20 paramphistomidos adultos (726,5 µg/mL) analizados mediante SDS-PAGE. MP presenta los estándares de peso molecular; L8 (21 bandas proteicas) y C (control- BSA, 250 µg/mL). 3737

LISTA DE ABREVIACIONES

APS: Persulfato de amonio

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Seroalbúmina bovina

FABP: Proteína de unión a ácidos grasos

GST: Glutación S-transferasa

kDa: Kilodalton

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

TEMED: Tetrametiletilendiamina

GLOSARIO

Hospedero: Organismo que alberga al parásito y le proporciona las condiciones necesarias para su supervivencia, como alimento, estímulos hormonales que favorecen su desarrollo y maduración sexual, o un ambiente protector. El hospedero definitivo permite su fase adulta y reproducción sexual, mientras que en el intermediario se desarrollan formas inmaduras o asexuales (Saredi, 2006).

Inmunogenicidad: Capacidad de una sustancia para inducir una respuesta inmunitaria específica en el organismo (Carrascosa, 2013).

Marcador molecular: Conjunto de proteínas con diferentes pesos moleculares conocidos. Este patrón, al separarse por electroforesis, se utiliza como referencia para estimar el peso molecular de proteínas de interés en estudios separarse por electroforesis (Ríos *et al.*, 2009).

Periodo prepatente: Intervalo de tiempo entre la entrada del estadio infectante de un parásito en el hospedero definitivo y la aparición de formas diagnósticas detectables en muestras clínicas, como huevos, larvas o quistes (Pardo y Buitrago, 2005).

Trematodos: Grupo de parásitos pertenecientes a la clase *Trematoda* del filo *Platyhelminthes*, conocidos como duelas. Presentan un cuerpo plano, no segmentado y ventosas que les permiten adherirse a los tejidos del hospedero. La mayoría son endoparásitos de vertebrados y requieren un hospedero intermediario, habitualmente un molusco acuático (Roberts y Janovy, 2009).

**“CARACTERIZACIÓN POR PESO MOLECULAR DE
PROTEÍNAS SOMÁTICAS DE PARAMPHISTOMIDOS EN
BOVINOS FAENADOS EN EL MATADERO MUNICIPAL DE
CAJAMARCA, 2024”**

Resumen

El escaso conocimiento sobre las proteínas somáticas de los parásitos responsables de la paramfistomosis limita una comprensión detallada de su biología, fisiología e interacción con el hospedador, lo que dificulta el desarrollo de investigaciones orientadas al control de la enfermedad y favorece su persistencia en zonas endémicas como Cajamarca, donde continúa afectando al ganado y ocasionando pérdidas económicas. Frente a esta problemática, el objetivo del presente estudio fue caracterizar por peso molecular proteínas somáticas de parásitos adultos de la familia Paramphistomidae en bovinos faenados en el Matadero Municipal de Cajamarca. Se obtuvo el extracto proteico somático de paramphistomidos, cuya concentración fue determinada mediante el método de Bradford. El número de bandas proteicas y sus pesos moleculares se analizaron a través de la técnica SDS-PAGE. Los resultados indicaron una concentración proteica promedio de 726,5 µg/mL y revelaron 21 bandas con pesos moleculares de 15, 21, 23, 24, 26, 33, 38, 40, 46, 50, 56, 59, 63, 70, 77, 91, 96, 100, 105, 113 y 119 kDa. De estas, ocho bandas mostraron una mayor intensidad, correspondientes a 105, 63, 33, 26, 24, 23, 21 y 15 kDa. Este estudio representa un aporte preliminar al perfil proteico somático de los paramphistomidos, enmarcado dentro de la biología molecular parasitaria. Al proporcionar datos iniciales sobre su composición proteica, se busca sentar las bases para futuras investigaciones más especializadas, como análisis proteómicos o la identificación de proteínas funcionales mediante técnicas complementarias. Esta caracterización amplía el conocimiento científico sobre estos parásitos, cuya importancia sanitaria y económica en zonas ganaderas como Cajamarca exige estrategias de control más eficaces y contextualizadas.

Palabras clave: Paramfistomosis; Paramphistomidae; proteínas somáticas; SDS-PAGE; peso molecular (kDa)

Abstract

Limited knowledge about the somatic proteins of the parasites responsible for paramphistomiasis restricts a detailed understanding of their biology, physiology, and interactions with the host. This lack of information hampers the development of targeted research for disease control and contributes to the persistence of the infection in endemic areas such as Cajamarca, where it continues to affect livestock and cause economic losses. In response to this problem, the objective of this study was to characterize the molecular weights of somatic proteins from adult parasites of the Paramphistomidae family in cattle slaughtered at the Cajamarca Municipal Slaughterhouse. A somatic protein extract was obtained from the paramphistomids, and its concentration was determined using the Bradford method. The number of protein bands and their molecular weights were analyzed using SDS-PAGE. The results indicated an average protein concentration of 726.5 µg/mL and revealed 21 bands with molecular weights of 15, 21, 23, 24, 26, 33, 38, 40, 46, 50, 56, 59, 63, 70, 77, 91, 96, 100, 105, 113, and 119 kDa. Among these, eight bands showed higher intensity, corresponding to 105, 63, 33, 26, 24, 23, 21, and 15 kDa. This study provides a preliminary contribution to the characterization of the somatic protein profile of paramphistomids within the field of molecular parasitology. By offering initial data on their protein composition, it lays the groundwork for future, more specialized research, such as proteomic analyses or the identification of functional proteins using complementary techniques. This characterization broadens scientific understanding of these parasites, whose health and economic relevance in livestock-producing regions like Cajamarca calls for more effective and context-specific control strategies.

Keywords: Paramphistomosis, Paramphistomidae, somatic proteins, SDS-PAGE, molecular weight (kDa)

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La paramfistomosis es una enfermedad parasitaria gastrointestinal emergente de distribución global, causada por trematodos de la familia Paramphistomidae (Eduardo, 1983; Huson, Oliver y Robinson, 2017) que afecta significativamente la industria ganadera. Su impacto económico se debe a la disminución de la productividad láctea y cárnica (Torrel y Paz, 2015; Rubab *et al.*, 2022), los altos costos de tratamiento y, en casos no atendidos, a una elevada mortalidad (Kilani *et al.*, 2003; Li, 2011; Chaudhry *et al.*, 2017; Hotessa y Kanko, 2020).

El diagnóstico de esta enfermedad sigue siendo un desafío, debido a que depende principalmente de exámenes coproparasitológicos ineficaces en infecciones de baja carga parasitaria o durante el periodo prepatente cuando la identificación de etapas inmaduras del parásito, responsables de la mayor patogenicidad, resulta inviable (Horak, 1971; Rieu *et al.*, 2007). Asimismo, la ausencia actual de una vacuna eficaz agrava la situación epidemiológica.

En este contexto, la proteómica se ha consolidado como una herramienta clave para el estudio de proteínas parasitarias, al permitir el análisis de la interacción parásito-hospedero y la identificación de proteínas inmunogénicas con potencial como biomarcadores para el diagnóstico, blancos terapéuticos y formulación de vacunas. Estos avances han sido aplicados con éxito en distintos trematodos (Van der Ree y Mutapi, 2015; Sripa, Laha y Sripa, 2017; Watakulsin *et al.*, 2023). En helmintos, las proteínas somáticas han demostrado ser altamente inmunogénicas, lo que resalta su relevancia en la investigación de estas infecciones (Stutzer *et al.*, 2018). Su caracterización representa

un punto de partida para la identificación de proteínas inmunodominantes con aplicaciones en el control de la enfermedad (Sripa, Laha y Sripa, 2017).

El conocimiento sobre el perfil electroforético de proteínas somáticas de los parásitos de la familia Paramphistomidae continúa siendo limitado, y en el Perú no se han realizado estudios al respecto. En particular, la información disponible sobre *Calicophoron microbothrioides*, hasta el momento la única especie identificada como agente etiológico de la paramfistomosis en Cajamarca, es escasa (Torrel y Paz, 2015). Esta falta de estudios adquiere especial relevancia en esta región, reconocida como la principal cuenca lechera y la tercera en producción de carne de vacuno del país (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, 2024 a,b) y que, además, enfrenta el desafío de ser una zona endémica para esta enfermedad poco estudiada. Según el estudio de Torrel *et al.* (2023), la paramfistomosis presenta una prevalencia del 34,2% en el valle de Cajamarca, superando el 15,3% registrado para *Fasciola hepatica*. Su propagación está influenciada por factores como el clima, la vegetación, las prácticas de crianza extensiva y mixta, el riego por inundación y la falta de normativas en el transporte ganadero (Torrel y Paz, 2015; Jones *et al.*, 2017; Rafiq *et al.*, 2022; Torrel *et al.*, 2023). A ello se suma la confusión de los productores pecuarios debido a la similitud sintomática con la fasciolosis, lo que ha favorecido la administración de tratamientos inadecuados y perpetuado la persistencia del problema (Howell y Williams, 2020; Hoyle *et al.*, 2022).

A partir de lo expuesto, el objetivo de la presente investigación fue caracterizar según su peso molecular, proteínas somáticas de parásitos adultos de la familia Paramphistomidae en bovinos faenados en el Matadero Municipal de Cajamarca. Para ello, se cuantificó la concentración de proteínas somáticas mediante el método de Bradford y se determinó su peso molecular a través de la técnica SDS-PAGE. Este estudio aporta información de

base en el campo de la biología molecular parasitaria. Los resultados obtenidos constituyen un punto de partida para futuras investigaciones orientadas a una mejor comprensión de estos parásitos y al desarrollo de estrategias de control adaptadas a contextos endémicos como Cajamarca.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

Vijayashanthi *et al.* (2020) realizaron un estudio en la India en el que evaluaron el perfil electroforético de proteínas somáticas de *Cotylophoron cotylophorum*, aislado del rumen de ovejas faenadas en un centro de beneficio. Para la obtención del extracto proteico, los ejemplares fueron triturados en un mortero con PBS en una proporción de 20 duelas por 10 mL de PBS, sometidos posteriormente a un proceso de sonicación y centrifugación a 12 000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. La concentración de proteínas se determinó mediante el método BCA, la caracterización proteica se realizó por SDS-PAGE al 12% revelando las bandas con tinción de azul brillante de Coomassie. Los resultados mostraron las concentraciones proteicas entre 1 237 y 2 172 mg/mL, con una extracción total de 50,2 mg de proteína a partir de 480 ejemplares adultos y múltiples bandas entre 10 a 100 kDa. Se concluyó que estos hallazgos son relevantes para el desarrollo de estudios inmunológicos y podrían contribuir a la identificación de posibles candidatos antigénicos para el desarrollo de vacunas contra la paramfistomosis ovina y para el diagnóstico temprano de la infección.

Una investigación realizada en India por Abdullah, Tak y Gani (2019) tuvo como objetivo analizar el perfil de proteínas somáticas de *Paramphistomum cervi* aislado de ovejas mediante SDS-PAGE. Para la obtención de las proteínas, los parásitos fueron lavados con PBS y procesados a través de las técnicas de precipitación con sulfato de amonio, diálisis y concentración por evaporación. La concentración proteica fue determinada por el método de Lowry. La electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida al 12%, y las bandas fueron reveladas mediante tinción con azul brillante de Coomassie. El patrón electroforético mostró varias bandas entre 10 y 150 kDa, destacando las bandas de 10,

18, 23, 40, 50 y 75 kDa y la concentración proteica fue aproximadamente de 11 mg/mL. Los autores concluyeron que estas proteínas podrían someterse a análisis adicionales para determinar su potencial en el serodiagnóstico o en el desarrollo de vacunas.

Jadav *et al.* (2018) realizaron un estudio en India que tuvo como objetivo caracterizar proteínas somáticas de *Paramphistomum epiclitum*, aislado de cabras y ovejas. Los parásitos fueron lavados con PBS, y para la extracción proteica se suspendieron 4 g de polvo seco del parásito en 100 mL de PBS, se centrifugó a 5 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue sometido a una segunda centrifugación a 10 000 rpm durante 45 minutos. La concentración de las proteínas se estimó usando un espectrofotómetro Nanodrop, y la caracterización se realizó por SDS-PAGE al 15%. Los resultados demostraron la presencia de 16 bandas proteicas con pesos moleculares de 14; 16; 21; 23; 25,8; 27; 29; 32; 37; 39; 42; 43; 47; 52; 57 y 76 kDa y la concentración proteica fue de 6 mg/mL. Se concluyó que, en futuras investigaciones de inmunotransferencia, algunas de estas proteínas podrían evaluarse como herramientas diagnósticas para la detección temprana de infecciones por *P. epiclitum* en rumiantes.

Una investigación realizada en India por Shafi *et al.* (2016) tuvo como objetivo evaluar el perfil electroforético de proteínas somáticas de *Paramphistomum cervi*, aislado de bovinos. Para la extracción de proteínas somáticas, los parásitos fueron lavados y homogeneizados con PBS utilizando un homogeneizador eléctrico. El extracto somático fue centrifugado a 10 000 x g durante 30 minutos a 4 °C, los pesos moleculares fueron determinados a través de SDS-PAGE al 12% y las bandas proteicas se visualizaron con tinción azul brillante de Coomassie y tinción con plata. Los resultados manifestaron múltiples bandas entre 12 y 100 kDa, siendo las bandas principales de aproximadamente 66, 52, 31, 26, 22 y 12 kDa. El estudio concluye que la diversidad de proteínas somáticas

identificadas podría someterse a análisis adicionales para evaluar su potencial en el serodiagnóstico o en el desarrollo de vacunas contra la paramfistomosis.

En Tailandia Anuracpreeda, Chawengkirttikul y Sobhon (2016) identificaron proteínas somáticas de *Paramphistomum gracile*, aislado de bovinos. Para la extracción de proteínas, los parásitos fueron lavados con NaCl al 0,85%, homogeneizados en buffer de lisis y sometidos a sonicación. Posteriormente, el extracto somático fue incubado con agitación continua durante toda la noche a 4 °C y centrifugado a 5000 g durante 20 minutos a la misma temperatura, recolectándose el sobrenadante para el análisis. Las proteínas del extracto se separaron por SDS-PAGE al 12,5% y las bandas proteicas se revelaron mediante tinción con plata. El análisis reveló 26 bandas con pesos moleculares entre 12 y 170 kDa. Los autores destacaron que la proteína de 16 kDa, identificada tras los análisis de purificación e inmunotransferencia, podría ser un antígeno potencial para el inmunodiagnóstico de la paramfistomosis bovina causada por *P. gracile*, aunque señalaron que es necesario continuar con su caracterización y validación.

Salib *et al.* (2015) desarrollaron un estudio en Egipto que tuvo como objetivo caracterizar las proteínas somáticas de *Paramphistomum* spp. aisladas de bovinos. Para la extracción proteica, los trematodos fueron homogeneizados en PBS y sometidos a sonicación. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y el sobrenadante obtenido se filtró. La concentración proteica se determinó por el método de Lowry, la caracterización de los polipéptidos se llevó a cabo por SDS-PAGE y las bandas se visualizaron mediante tinción con azul brillante Commassie R-250. Los resultados indicaron un contenido proteico somático de 3,3 mg/mL. Asimismo, se revelaron 14 bandas con pesos moleculares de 11,5; 13,5; 19; 25; 29; 46; 52; 63; 66; 72; 87; 102; 120 y 174 kDa. Se concluyó que, en investigaciones complementarias, algunas proteínas

somáticas podrían tener valor diagnóstico, destacando la banda inmunogénica de 63 kDa como candidata potencial para el desarrollo de pruebas inmunológicas específicas.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Parasitosis gastrointestinales en bovinos

Las enfermedades parasitarias son una de las patologías más frecuentes que generan problemas significativos en la salud del ganado (Pulido *et al.*, 2022). Entre ellas, las parasitosis gastrointestinales constituyen el principal desafío sanitario en bovinos a nivel mundial, siendo causadas principalmente por protozoos y helmintos (Pinilla *et al.*, 2018).

En particular, las infecciones por trematodo son altamente prevalentes en el ganado y son consideradas las de mayor impacto dentro de los helmintos que afectan al ganado. Estas infecciones se asocian con una variedad de efectos negativos, como reducción en la producción de leche y carne, pérdida de peso, trastornos reproductivos, mayor susceptibilidad a otras enfermedades y, en casos graves, mortalidad. Todo ello conlleva significativas pérdidas económicas para el sector pecuario (Megersa, Hussein y Shemsu, 2024; De Waal y Mehmood, 2021).

2.2.1.1 Paramfistomosis

Es una enfermedad parasitaria gastrointestinal emergente y de distribución cosmopolita, producida por trematodos de la familia Paramphistomidae, es denominada también helmintiasis del rumen, distomatosis ruminal, anfistomosis, trematodosis gastrointestinal y miasis ruminal. Estos parásitos afectan principalmente a rumiantes salvajes y domésticos; aunque también existen casos de infección en humanos y porcinos por la especie *Gastrodiscoides hominis* (Trejo, 2000; Horak, 1971; Sah, Acosta y Toledo, 2019; Ghatani y VeenaTandon, 2024).

El ciclo biológico de los paramphistomidos involucra moluscos pulmonados como hospederos intermediarios, y la infección se produce tras la ingestión de metacercarias. Los géneros más comunes causan infección en el pre estómago e intestino de bovinos, ovinos, caprinos y búfalos, etc. (Benavides y Romero, 2001). Sin embargo, el género *Gigantocotyle* se localiza específicamente en los conductos biliares de los búfalos (Haque, Mohan y Ahmad, 2011).

Epidemiología

La paramphistomosis afecta principalmente a bovinos jóvenes de 1 año, debido a que son más susceptibles a la invasión de los parásitos. La tasa de mortalidad en poblaciones de animales con infecciones masivas puede alcanzar hasta el 80 o 90% (Torrel y Paz, 2015; Chowdhury *et al.*, 2019).

La mayoría de brotes suelen tener lugar en otoño, a finales de verano y principios de invierno, periodos en que los pastos están altamente contaminados con metacercarias y son accesibles a los rumiantes durante el pastoreo. La endemicidad de la enfermedad está relacionada a zonas húmedas y vegetación abundante. Estas condiciones favorecen la proliferación de caracoles, que actúan como hospederos intermediarios del parásito (Torrel y Paz, 2015).

En Europa, se han reportado especies como *Paramphistomum leydeni* (Morariu *et al.*, 2023), *Paramphistomum cervi*, *Paramphistomum microbothrium*, *Paramphistomum ichikawai*, *Paramphistomum daubneyi*, *Paramphistomum gotoi*, *Cotylophoron* (Postal, 1984) y *Calicophoron daubneyi*, siendo esta última la más frecuente (Fenemore, Floyd y Mitchell, 2021). La especie *P. ichikawai* se encuentra principalmente en África, Asia y Australia (Wenzel *et al.*, 2019). En el continente asiático, se ha descrito la presencia de esta parasitosis en Pakistán (*Paramphistomum* spp.) (Rizwan *et al.*, 2022), Turquía (C.

daubneyi y *P. leydeni*) (Padak y Karakuş, 2021) y en la India *Paramphistomum epiclitum* (Jadav *et al.*, 2018).

En Europa y Asia, se han alcanzado altas prevalencias, destacando un 77 % en Irlanda (Martinez-Ibeas *et al.*, 2016), 75,2% en Sarawak (Harizt *et al.*, 2021), en Alemania prevalencias del 64% y 57% de *C. daubneyi* (Teschner *et al.*, 2025), 59% en Gales (Jones *et al.*, 2017), 55,9% en Italia (Sanna *et al.*, 2016), 56,25% en Pakistán (Rizwan *et al.*, 2022) y 53,8% en Irlanda del Norte (Atcheson *et al.*, 2022). Asimismo, en ciertas áreas del Reino Unido, la prevalencia de paramfistomosis supera a la de la fasciolosis (Huson, Oliver y Robinson, 2017).

En África, se han registrado los géneros *Calicophoron phillerouxi*, *Cotylophoron* sp., *Calicophoron raja*, *Calicophoron microbothrium*, siendo este último la especie más común (Laidemitt *et al.*, 2017). En cuanto a la prevalencia de paramfistomosis en África, se ha reportado el 62,8 % en Tanzania; sin embargo, en algunas aldeas del país se han registrado tasas de hasta el 100% (Nzalawahe *et al.*, 2015).

En Cuba, también se ha registrado una prevalencia del 68,54% de *Cotylophoron cotylophorum* en bovinos (León *et al.*, 2020).

En cuanto a América Latina, diversos estudios han confirmado la presencia de esta enfermedad en varios países. Se han reportado casos en México (Hernández *et al.*, 2023); en Brasil asociados a la especie *P. leydeni* (Lopes, López y Pinto, 2024); en Colombia (Arroyo *et al.*, 2022); Chile (Cerdeira *et al.*, 2019); Perú (Cueva-Rodríguez *et al.*, 2024); Argentina (Sanabria, Moré y Romero, 2011); Venezuela, con registros de la especie *Cotylophoron* spp. (Urbina-Andueza *et al.*, 2025); Ecuador, por *Paramphistomum* spp. (Espinoza *et al.*, 2024); y en Uruguay, con presencia de *C. daubneyi* (Sanchís *et al.*, 2012).

En Colombia, las especies reportadas en bovinos incluyen *Cotylophoron cotylophorum* y *Cotylophoron panamensis* (Alarcón y Velásquez, 2009; López y Velásquez, 2012).

En Perú, esta parasitosis se ha descrito mayormente en el norte del país. En San Martín se ha identificado a *Cotylophoron* spp. (Rojas *et al.*, 2015), en Loreto a *Cotylophoron cotylophorum* (Sánchez *et al.*, 2009; Pinedo *et al.*, 2010). En Chachapoyas, La Libertad y Cajamarca a *Calicophoron microbothrioides* (Cueva *et al.*, 2022; Aranda, 2017; Manrique *et al.*, 2013; Torrel *et al.*, 2023).

La prevalencia de infección por *Calicophoron microbothrioides* en ganado vacuno del distrito de Cajamarca, según un estudio reciente de Torrel *et al.* (2023), fue del 34,2%, con los valores más altos registrados en los caseríos de Huacariz (36,8%), La Colpa (42,9%) y Huayrapongo (54,4%). Estas cifras superan la prevalencia de fasciolosis reportada en el mismo distrito, la cual fue del 15,3%. De manera similar, en el distrito de Baños del Inca, la prevalencia general alcanzó el 38,5%, destacando Columbo con el valor más alto (65,2%), seguido de Tartar grande (39,1%) y Tartar chico (33,35%); todos con valores superiores a la prevalencia de infección por *F. hepatica* registrada en esta zona, que fue del 22,6%. Por otro lado, en el distrito de La Encañada, se reportó una prevalencia de *C. microbothrioides* del 30,3% en la localidad de Santa Rosa.

Ubicación taxonómica

La paramfistomosis es causada por tres géneros de gran relevancia en la medicina veterinaria: *Paramphistomum*, *Cotylophoron* y *Calicophoron* (Cordero *et al.*, 2002). Sin embargo, la familia *Paramphistomidae* incluye diversos géneros adicionales como *Explanatum*, *Gigantocotyle*, *Gastrodiscoides*, *Indosolenorchis*, *Leiperocotyle*, *Nilocotyle*, *Orthocoelium*, *Stichorchis* (Schoch *et al.*, 2020). A continuación, se presenta la clasificación taxonómica de los principales géneros de los parásitos pertenecientes a la

familia Pararamphistomidae (Tabla 1) (Schoch *et al.*, 2020).

Tabla 1. Ubicación taxonómica de los tres géneros más relevantes dentro de la familia Paramphistomidae.

Reino	Animalia
Filo	Platyhelminthes
Clase	Trematoda
Subclase	Digenea
Orden	Plagiorchiida
Familia	Paramphistomidae
Género	Paramphistomum
Especies	<i>P. cervi</i>
	<i>P. microbothrioides</i>
	<i>P. liarchis</i>
	<i>P. ichikawai</i>
	<i>P. microbothrium</i>
Género	Cotylophoron
Especies	<i>C. cotylophoron</i>
	<i>C. streptocoelium</i>
Género	Calicophoron
Especies	<i>C. microbothrioides</i>
	<i>C. calicophoron</i>
	<i>C. ijimai</i>
	<i>C. daubneyi</i>

Estadios evolutivos

Huevo. Semejantes a los huevos de *Fasciola hepatica*, pero más grandes (140-150 μm de largo por 63-71 μm de ancho) y de color claro. De forma ovalada, con el polo operculado más fino que el polo opuesto. El cigoto se ubica en la posición media posterior, a diferencia del huevo de *F. hepatica*, en el que el cigoto se localiza en la región media anterior (Torrel y Paz, 2015; Cordero del Campillo *et al.*, 2002).

Miracidio. Forma infectiva para el hospedero intermediario, es ovoide y alargado, presenta en su parte anterior una glándula apical que facilita la penetración en el caracol, posee cilios para su desplazamiento en el agua y de dos a tres manchas oculares (Torrel y Paz, 2015; Cordero del Campillo *et al.*, 2002).

Esporocisto. Primera forma larval que se desarrolla al interior del caracol, con una estructura sacciforme y tamaño de 93 μm por 53 μm . Posterior a 11 días los esporocistos alcanzan la madurez y contienen máximo 8 redias cada uno (Torrel y Paz, 2015; Cordero del Campillo *et al.*, 2002; Soulsby, 1993).

Redia. Es de forma alargada, existen una o dos generaciones de redias, se alimentan de tejidos del caracol y de hemolinfa, especialmente de las células glandulares digestivas. Algunas especies desarrollan digestión externa mediante enzimas hidrolíticas segregadas por el tegumento, provocando en el molusco lisis de células que rodean la redia (Torrel y Paz, 2015; Cordero del Campillo *et al.*, 2002).

Cercaria. Presentan color marrón oscuro, dos manchas oculares, una cola propulsora y miden de 350 μm por 280 μm . Las cercarias abandonan los caracoles cuando hay mayor intensidad solar y nadan cerca de la superficie del agua hasta fijarse en las plantas (Torrel y Paz, 2015).

Metacercaria. Forma quística infectiva, ingerida por hospederos definitivos. Las cercarias pierden la cola y se enquistan en metacercarias que poseen membranas resistentes, se fijan a las plantas. Los quistes tienen un tamaño de 250 μm (Torrel y Paz, 2015; Cordero del Campillo *et al.*, 2002).

Adulto. Piriforme de forma cónica no aplanada, cóncavo ventralmente y convexo dorsalmente, color rojo claro o rosado. El cuerpo está recubierto por papilas, poseen una ventosa oral (organela de alimentación) en el polo anterior más delgado, un poro genital al final del primer tercio corporal (organela de fijación) y una ventosa ventral (Figura 1). Miden entre 5-10 mm de largo y de 2-4 mm de ancho. El diámetro de la ventosa oral es de aproximadamente 1 mm, mientras que la ventosa ventral mide en promedio $1,5 \pm 0,5$ mm de diámetro. Están localizados generalmente en el rumen y en raras ocasiones se encuentran en el retículo, abomaso y omaso del hospedero definitivo rumiante (Dirksen, Gründer y Stober, 2005; Torrel y Paz, 2015).

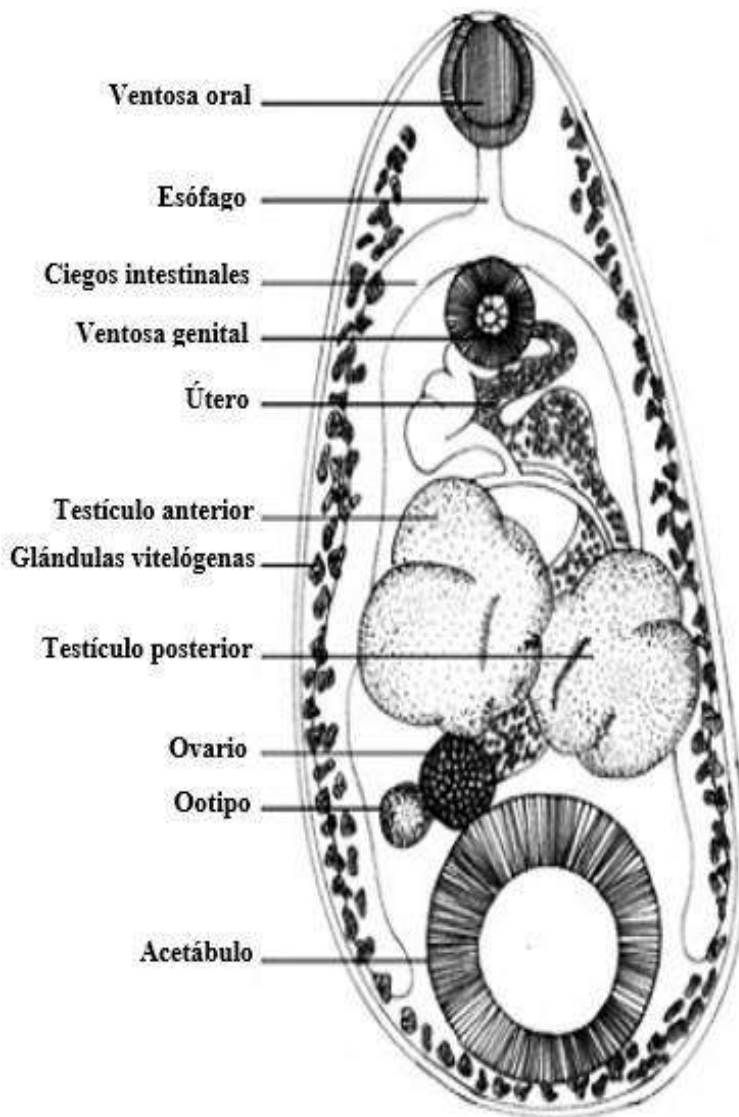


Figura 1. Diagrama generalizado de la organografía de la forma adulta de *Cotylophoron panamensis* (López y Velásquez, 2012).

Ciclo biológico

El ciclo biológico indirecto de trematodos de la familia Paramphistomidae está basado en el caracol de agua dulce como hospedero intermediario, mientras que los bovinos son los hospederos definitivos más importantes seguidos por ovinos y caprinos. La infestación del hospedero definitivo es debido a la ingesta de la forma quística metacercaria presente en el pasto, posteriormente el desenquistamiento se lleva a cabo en el abomaso donde se liberan los parásitos (trematodos juveniles recién exquistados) que migran al intestino

delgado situándose en la submucosa para alimentarse durante 6 a 8 semanas aproximadamente (trematodos inmaduros). Incluso pueden alimentarse de los tejidos del hospedero hasta tres meses ocasionando un grave daño tisular (Huson *et al.*, 2018 a), luego los parásitos se desplazan y se fijan en las papilas o pared ruminal a través de su acetábulo muscular (duelas pequeñas recién migradas) donde maduran (duelas adultas maduras) para producir huevos en un promedio de 96-130 días y ser expulsados a través de las heces. El tiempo de eclosión depende de la temperatura y varía entre 12 a 21 días; sin embargo, en condiciones *in vitro*, se ha demostrado que los huevos eclosionan en el medio acuático alrededor de 44 días a 16 °C y aparecen larvas o miracidios que nadan en el agua y penetran al caracol a través de la cavidad respiratoria o mediante partes expuestas (Cordero del Campillo *et al.*, 2002; Torrel y Paz, 2015; Huson, Oliver y Robinson, 2017; Huson *et al.*, 2021).

En el interior del caracol hospedero, los parásitos se desarrollan a través de tres estadios larvarios (esporocistos, redias y cercarias). Alrededor de 12 horas, los miracidios pierden los cilios superficiales convirtiéndose en esporocistos y se desplazan a través de vasos sanguíneos o canales linfáticos hacia áreas con alta disponibilidad de nutrientes, al cabo de 11 días los esporocistos maduros contienen cada uno máximo 8 redias en su interior, estas se liberan produciendo redias hijas y luego de 39 días redias nietas presentes en las glándulas del intestino medio. Posteriormente, se originan por cada redia entre 9 y 32 cercarias, las cuales completan su desarrollo en 2 semanas dentro del hospedero intermediario. Las cercarias abandonan los caracoles estimulados por la luz y nadando en la superficie del agua, son activas algunas horas y luego se enquistan formando metacercarias adheridas al pasto que permanecen infectivas en verano hasta por cinco meses y en invierno por tres meses (Figura 2) (Cordero del Campillo *et al.*, 2002; Huson, Oliver y Robinson, 2017; Torrel y Paz, 2015).

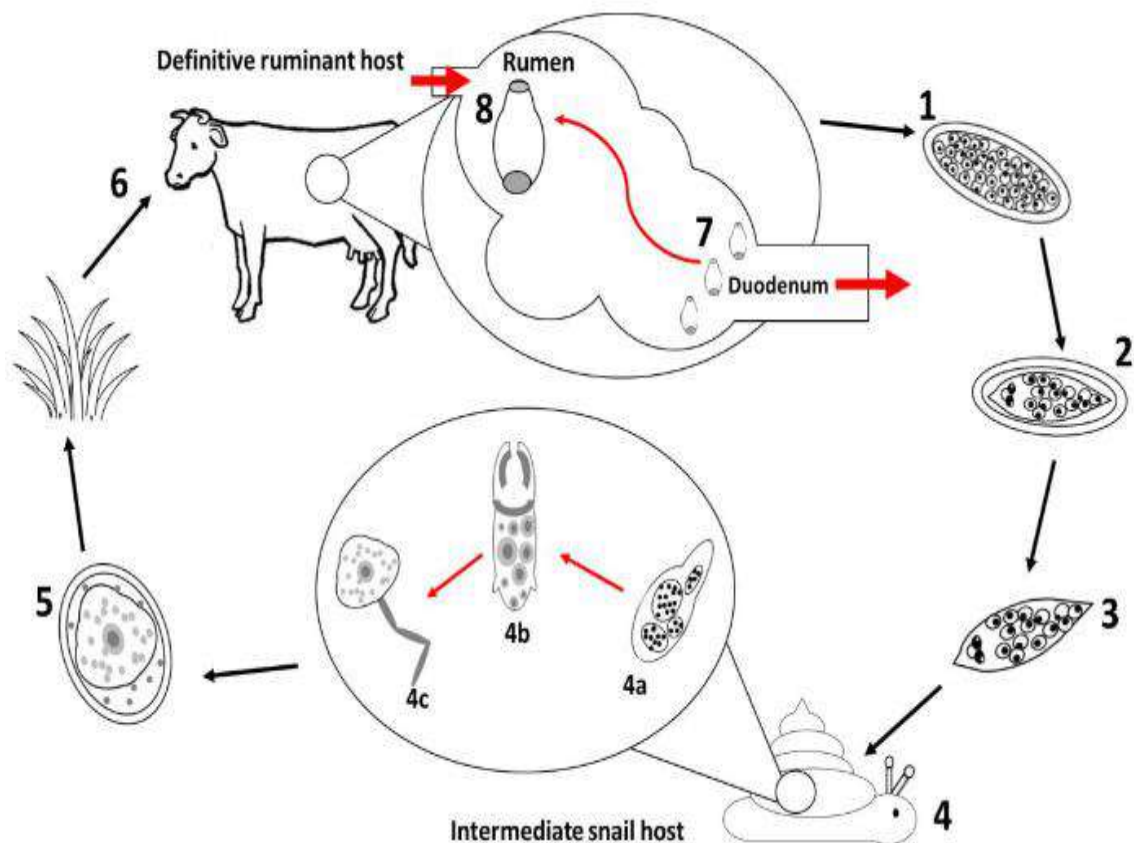


Figura 2. Ciclo biológico de *Calicophoron daubneyi*. 1: huevos no embrionados, 2: huevos embrionados, 3: miracidios, 4: hospedero intermediario, 4a: esporocistos, 4b: redias, 4c: cercarias, 5: metacercarias, 6: hospedero definitivo, 7: desenquite, 8: parásitos adultos (Huson, Oliver y Robinson, 2017).

Hospederos

Los hospederos definitivos abarcan una amplia variedad de rumiantes, tanto domésticos como salvajes. En el caso de los domésticos, los más comunes son los bovinos y los búfalos de agua, seguidos por las ovejas, cabras (Cordero del Campillo *et al.*, 2002) y yaks (Fu *et al.*, 2023). Entre los rumiantes salvajes se incluyen los cérvidos (Sindičić *et al.*, 2017), antílopes (Pfukeny y Mukaratirwa, 2018; Ikeuchi *et al.*, 2022) y corzos (Morariu *et al.*, 2023). Además, se ha documentado el parásito en camélidos (El-Khabaz, Abdel-Hakeem y Arfa, 2019), cerdos y equinos (Ghatani y VeenaTandon, 2024) e incluso la especie *Gastrodiscoides hominis* Lewis y McConnell, 1876 ha sido reportada en humanos (Kumar, 1980; Sah, Acosta y Toledo, 2019).

La paramfistomosis involucra una amplia variedad de hospederos intermediarios, que son moluscos pulmonados de agua dulce, en los cuales se desarrollan las fases de esporocistos, redias y cercarias. Estos moluscos pertenecen a las familias Planorbidae (Planorbis, Indoplanorbis, Biomphalaria, Ceratophallus, Helicorbis, Gyraulus, Anisus, Armiger, Segmentina, etc.), Bulinidae (Bulinus, *Bulinus tropicus*, *Bulinus truncatus*, *Bulinus forskalii*) y Lymnaeidae (Lymnaea, *Galba truncatula*; *Omphiscola glabra*). La familia Planorbidae y Bulinidae son comunes en África, Asia y Australia; mientras que la tercera es predominante en América y Europa (Cordero del Campillo *et al.*, 2002; Elsokkary, Heikal y Otify, 2009; Ates y Umur, 2021; Nyagura, Malatji y Mukaratirwa, 2024).

Paramfistomosis aguda o intestinal

Esta fase de la enfermedad, causada por tremados inmaduros, presenta mayor patogenicidad. La migración masiva de parásitos a través del tracto intestinal desencadena gastroenteritis aguda, especialmente en rumiantes jóvenes. Asimismo, los trematodos inmaduros se adhieren a la mucosa del duodeno y yeyuno, y pueden penetrar hasta la capa *Muscularis mucosae*. Esta invasión ocasiona hemorragias, petequias, erosiones, necrosis, hiperemia, congestión severa, úlceras y protrusiones nodulares en las capas superficiales del epitelio y en las criptas de Lieberkuhn. Además, se produce la destrucción de glándulas digestivas del intestino delgado y abomaso, lo que conduce a un síndrome de mala digestión y mala absorción (Cordero del Campillo *et al.*, 2002; Radostits *et al.*, 2002; Quiroz, 2005; Tehrani *et al.*, 2015).

El análisis microscópico del intestino delgado ha evidenciado dilatación de las glándulas intestinales, destrucción de las glándulas superficiales, infiltración difusa de células inflamatorias y enteritis fibrinonecrótica (Tehrani *et al.*, 2015). Las manifestaciones clínicas a partir de las dos semanas de infección incluyen anemia, emaciación, anorexia,

dolor abdominal, retraso del crecimiento, disminución de la condición corporal, atrofia muscular, pérdida del apetito, sed intensa, deshidratación, hidropericardio, hidrotórax, edema pulmonar, edema submandibular, ascitis y enteritis hemorrágica. Otros signos característicos son pelo hirsuto, diarrea de características fétidas, profusas o sanguinolentas (Cordero del Campillo *et al.*, 2002) y, en casos severos, mortalidad que puede alcanzar hasta el 90% (O'Shaughnessy *et al.*, 2018; Urquhart *et al.*, 2001).

Además, los ganglios linfáticos pueden presentarse edematosos, distendidos o rotos, los conductos biliares dilatados y la vesícula biliar distendida. Algunos paramphistomidos inmaduros pueden perforar la pared intestinal, alcanzando la serosa o el líquido peritoneal, y en algunos casos, localizarse en la vesícula biliar (Quiroz, 2005).

Paramfistomosis crónica o ruminal

Esta fase se desarrolla por la presencia de duelas adultas que se adhieren a la mucosa del rumen, retículo u omaso (Dirksen, Gründer y Stober, 2005; Torrel y Paz, 2015). Aunque esta etapa de la enfermedad exhibe una menor patogenicidad, puede ocasionar atrofia de papilas ruminales con ulceración en los extremos, necrosis papilar focal, alteración de las células basales del epitelio, daño mecánico en la pared ruminal e hiperqueratosis paraqueratósica, que se manifiesta como un oscurecimiento difuso en la mucosa del rumen, retículo y omaso. Generalmente, la fase ruminal es tolerada por el hospedero definitivo, incluso en presencia de carga parasitaria elevada, por lo que no causa sintomatología visible. No obstante, estas alteraciones se traducen en debilidad, timpanismo ruminal recurrente, atonía ruminal y disminución en la producción láctea, especialmente en casos de infecciones graves (Alzieu y Dorchies, 2007; Fuertes *et al.*, 2015; Rizwan *et al.*, 2022).

Diagnóstico

El diagnóstico práctico de la paramfistomosis se basa en la identificación de huevos parasitarios mediante un examen coproparasitológico, específicamente utilizando la técnica de sedimentación y decantación. Sin embargo, este método puede presentar resultados erróneos al carecer de sensibilidad en infecciones con baja carga parasitaria o durante la enfermedad subclínica (Horak, 1971; Bida y Schillhorn van Veen, 1977; Rieu *et al.*, 2007).

El diagnóstico de la paramfistomosis en su fase prepatente es fundamental para la detección temprana de la enfermedad. Sin embargo, este objetivo resulta complicado de alcanzar mediante métodos coprológicos convencionales (Elsheikha *et al.*, 2011). En este contexto, el inmunodiagnóstico podría representar una herramienta más confiable para la detección de la paramfistomosis (Anuracpreeda, Wanichanon y Sobhon, 2008).

En la actualidad, no existe una prueba inmunodiagnóstica comercial disponible para la paramfistomosis. Sin embargo, en los últimos años, diversas investigaciones se han enfocado en el desarrollo de métodos inmunodiagnósticos, destacando la utilidad de antígenos somáticos o de excreción/secreción nativos de parásitos. Por ejemplo, Jaiswal *et al.* (2018) evaluaron la prueba ELISA indirecta como herramienta diagnóstica para *Paramphistomum epiclitum*, indicando su posible aplicación, debido a que presentó una sensibilidad del 100 % y Huson *et al.* (2021) desarrollaron el primer ELISA basado en coproantígenos para el diagnóstico de *Calicophoron daubneyi*. Por su parte, Anuracpreeda, Tepsupornkul y Chawengkirttikul (2017) desarrollaron una prueba ELISA tipo sándwich para la detección del antígeno somático de 16 kDa de *Paramphistomum gracile*, demostrando un excelente potencial para el diagnóstico preciso de la paramfistomosis.

Se ha descrito que la prueba ELISA indirecta es una herramienta confiable para el diagnóstico temprano de la paramfistomosis en diferentes hospederos (Anuracpreeda *et al.*, 2013). Sin embargo, en estos ensayos, se requiere estudiar los títulos de anticuerpos IgM e IgG, dado que la presencia de IgM indica una infección activa, mientras que los anticuerpos IgG pueden permanecer detectables incluso después de la eliminación de la infección, lo que permite diferenciar entre infecciones recientes y pasadas (Rubab *et al.*, 2022).

Vacunas

Actualmente no existe vacuna contra la paramfistomosis. Se ha desarrollado un estudio donde se empleó hemoglobina recombinante de *Paramphistomum epiclitum* para inmunizar bovinos; sin embargo, no se observaron efectos positivos protectores (Dewilde *et al.*, 2008).

Las proteínas somáticas pueden ser comunes o específicas entre diferentes especies dentro de un mismo género o familia de parásitos; sin embargo, aquellas que son particulares de una especie y presentan propiedades antigénicas son las más indicadas como candidatas vacunales, porque inducen una respuesta inmune específica que previene la paramfistomosis causada exclusivamente por la especie identificada, minimizando el riesgo de reacciones cruzadas con otros parásitos (Abdolahi Khabisi y Sarkari, 2016)

No obstante, la proteómica también contribuye al diseño de vacunas con reactividad cruzada, capaces de actuar frente a diferentes especies de helmintos. Por ejemplo, en un estudio se identificaron antígenos con esta propiedad en extractos proteicos intestinales de los nemátodos *Mecistocirrus digitatus* y *Haemonchus contortus*, ambos pertenecientes a la misma familia, lo que sugiere que una vacuna formulada para una especie podría brindar protección parcial contra otra (Dicker *et al.*, 2014). Asimismo, la proteómica ha

facilitado el desarrollo de vacunas multiepítopo, mediante la combinación de antígenos conservados presentes en distintas especies de helmintos. Este tipo de vacunas tiene el potencial de generar una respuesta inmunitaria amplia que protege al hospedero contra diversas infecciones por helmintos (Sharma *et al.*, 2024).

2.2.2 Proteómica

La proteómica es una disciplina que, a través de técnicas moleculares, estudia las interacciones, la función, la composición, la estructura y las actividades celulares de las proteínas, permitiendo, además, la identificación de epítomos antigénicos específicos (Totomoch, Brito y Manterola, 2021; Wilkins *et al.*, 1996).

La proteómica desempeña un papel crucial en la caracterización de las proteínas expresadas por parásitos (proteoma). La información derivada de enfoques proteómicos en la interacción parásito-hospedero, como la identificación de proteínas somáticas de helmintos y proteínas antigénicas que son altamente inmunogénicas, es fundamental para reconocer biomarcadores en el diagnóstico, objetivos farmacológicos y candidatos vacunales. Además, permite comprender la bioquímica y fisiología del parásito, así como la respuesta inmune del hospedero y su modulación por parte del parásito (Qian y Chandramouli, 2009; Van der Ree y Mutapi, 2015).

2.2.2.1 Proteínas somáticas en helmintos

Las proteínas somáticas están presentes en el soma o cuerpo del parásito, están asociadas con los tejidos del parásito y se obtienen por fragmentación y homogenización de parásitos completos. Estas proteínas se localizan predominantemente en el esófago y los intestinos (Espino *et al.*, 1987; Morales y Ludovisi *et al.*, 2021), y se ha demostrado que algunas de ellas poseen actividad inmunológica (Johnston, MacDonald y McKay, 2009), por lo que han sido utilizadas como antígenos somáticos en el inmunodiagnóstico de

infecciones parasitarias, como en el caso de *Haemonchus contortus* (Javare, 2017). Además, cumplen un rol relevante en la respuesta inmunitaria frente a helmintos gastrointestinales, razón por la cual algunas de ellas se han evaluado como candidatas a vacunas (Sakthivel *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019).

Rol fisiológico de las proteínas somáticas con capacidad inmunogénica

Se han identificado diversas proteínas con capacidad inmunogénica en el proteoma somático de helmintos; a continuación, se detallan aquellas que destacan por su mayor potencial inmunogénico.

Las FABPs son proteínas intracelulares de bajo peso molecular (12-15 kDa), que desempeñan una función esencial en la supervivencia de los helmintos, ya que participan en la oxidación de lípidos. Esta función es relevante, ya que estos parásitos carecen de la maquinaria celular necesaria para la biosíntesis de lípidos, por lo que dependen de los ácidos grasos obtenidos del hospedero. Asimismo, las FABPs inhiben la síntesis de óxido nítrico en el hospedero, lo que suprime los procesos inflamatorios y modula la respuesta inmune. Por estas razones, estas proteínas inmunogénicas se proponen como objetivos prometedores para el desarrollo de vacunas, diagnóstico o tratamiento (Figueroa y Espino, 2014; Sripa, Laha y Sripa, 2017). Las mismas están presentes en alta concentración en células parenquimatosas y tejidos reproductivos, y en menor proporción en el tegumento y el epitelio cecal (Sirisriro *et al.*, 2002).

La GST es una proteína (23-28 kDa), cuya función principal es la desintoxicación de xenobióticos que es importante en la prevención del estrés oxidativo de los parásitos (Torres y Landa, 2008). Su potencial como posible antígeno diagnóstico ha sido demostrado en la detección de infecciones por *Gigantocotyle explanatum*, con niveles más elevados de esta proteína en extractos somáticos del parásito. Se ha identificado que

las glándulas vitelinas constituyen la principal fuente de GST en este trematodo (Rehman *et al.*, 2020). Además, debido a su alta inmunogenicidad, las GST han sido consideradas como candidatas a vacunas (Sánchez *et al.*, 2024).

En *Schistosoma japonicum*, la proteína disulfuro isomerasa (PDI), con un peso molecular aproximado de 55 kDa, es esencial en las interacciones parásito-hospedero, lo que la posiciona como un candidato prometedor para futuras investigaciones orientadas al desarrollo de herramientas diagnósticas y vacunas para el control de la esquistosomiasis. Además, esta proteína es crucial para el correcto plegamiento de proteínas, regula el equilibrio redox intracelular y protege al parásito contra el estrés oxidativo. Se ha demostrado que, en *S. japonicum*, la PDI se distribuye mayormente en el tegumento y el parénquima del parásito (Nordberg y Arner, 2001; Cao *et al.*, 2014).

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima glucolítica de aproximadamente 36 kDa, además de su función metabólica, modula las respuestas inmunitarias del hospedero (Perez-Casal y Potter, 2016). En *S. japonicum*, se ha caracterizado como una diana vacunal protectora (Tang *et al.*, 2019).

Otra enzima glucolítica es la malato deshidrogenasa (MDH) (36 kDa aproximadamente), esencial en el metabolismo energético de los trematodos, participando en procesos aeróbicos y anaeróbicos vitales para su supervivencia. Debido a su rol fundamental, la MDH resulta un objetivo potencial para el desarrollo de vacunas (Chetri, Shukla y Tripathi, 2020). Asimismo, la inhibición de esta proteína podría constituir una estrategia para diseñar agentes antiparasitarios (Kayamba *et al.*, 2021).

La mioglobina, una hemoproteína de 17 kDa aproximadamente, se encuentra en altas concentraciones en trematodos (Ren *et al.*, 2014). En *Clonorchis sinensis*, está distribuida por todo el cuerpo del parásito, incluyendo el tegumento, la ventosa oral y la vitelaria

(Sim, Park y Yong, 2003). Esta proteína desempeña funciones clave para la supervivencia de trematodos, como el almacenamiento de oxígeno en condiciones anaeróbicas, la reserva de hemo para la producción de huevos y la capacidad de captar peróxido de hidrógeno, protegiendo al parásito contra el daño oxidativo. Esta protección contra el estrés oxidativo sugiere que la mioglobina influye en la evasión de la respuesta inmunológica del hospedero y puede tener propiedades inmunomoduladoras (Ren *et al.*, 2014). Asimismo, en *Opisthorchis viverrini*, la mioglobina se ha considerado como una candidata potencial para el desarrollo de vacunas; sin embargo, se requiere una mayor verificación experimental para confirmar su eficacia en este ámbito (Prasopdee *et al.*, 2019).

Proteínas somáticas identificadas en paramphistomidos

En paramphistomidos se han identificado algunas proteínas somáticas; sin embargo, aún no se ha comprobado su antigenicidad e inmunogenicidad. No obstante, se ha caracterizado una proteína de aproximadamente 16 kDa en el extracto somático de *Paramphistomum gracile*, que muestra potencial como candidata para el inmunodiagnóstico de la paramphistomosis en rumiantes. Esta proteína no presenta reacciones cruzadas con antígenos de parásitos frecuentes en rumiantes, tales como *Eurytrema pancreaticum*, *Gigantocotyle explanatum*, *Schistosoma spindale*, *Moniezia benedeni*, *Avitellina centripunctata*, *Haemonchus placei*, *Trichuris* sp. y *Setaria labiatopapillosa* (Anuracpreeda, Tepsupornkul y Chawengkirttikul, 2017).

En particular, en *Calicophoron daubneyi*, las FABPs destacan en el proteoma somático, así como las deshidrogenasas/reductasas, las globinas y las GST (Huson *et al.*, 2018 b).

Específicamente, en ejemplares adultos de *Calicophoron daubneyi* se han identificado las 50 proteínas más abundantes del proteoma somático mediante SDS-PAGE 2D seguido

de LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem), entre las cuales se encuentran las FABPs, las GST, mioglobina, disulfuro isomerasa, malato deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, la peptidil-prolil isomerasa, triosafosfato isomerasa, familia de deshidrogenasas/reductasas de cadena corta, proteína de choque térmico de 70 kDa, familia de chaperoninas (proteína de choque térmico de 60 kDa), enolasa, miosina, espectrina, piruvato carboxilasa, propionil-CoA carboxilasa, glucógeno fosforilasa, proteína de shock térmico de 90 kDa, filamina, proteínas de control de división celular, alfa macroglobulina, proteína de bóveda mayor, urocanato hidratasa, dihidrolipoamida deshidrogenasa, calpaína, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, glutamato deshidrogenasa, citrato sintasa, leucotrieno hidrolasa, succinato CoA-transferasa, aspartato aminotransferasa, β -tubulina, antígeno del tegumento, etc. y proteínas que aún no han sido caracterizadas (Huson *et al.*, 2018 b; Allen, 2019).

2.2.2.2 Caracterización por peso molecular de proteínas somáticas

El peso molecular es uno de los parámetros fundamentales para la caracterización de proteínas. Su determinación puede realizarse mediante diversas técnicas, entre las que destacan el SDS-PAGE y la espectrometría de masas (Santilli *et al.*, 2021). Para la aplicación de estas técnicas, las proteínas somáticas deben ser previamente extraídas, proceso que implica diversas etapas, como la lisis celular, la centrifugación bajo parámetros controlados de tiempo y temperatura para preservar la integridad de las proteínas, el uso de reactivos detergentes y, de forma opcional, la precipitación proteica con agentes como el sulfato de amonio. La lisis celular puede realizarse mediante métodos de ruptura física, como la homogeneización mecánica, la sonicación, los ciclos de congelación-descongelación y la trituración manual (Walker, 2009).

SDS-PAGE

Esta técnica permite separar proteínas desnaturalizadas según el tamaño molecular, lo que posibilita estimar su peso molecular comparando las bandas obtenidas con un marcador estándar (Walker, 2002). Está basada en dos componentes principales: el SDS, un detergente que desnaturaliza las proteínas y les confiere una carga negativa uniforme; y el gel de poliacrilamida, que funciona como una matriz porosa para su separación. Al aplicar un campo eléctrico, las proteínas se desplazan hacia el ánodo (electrodo positivo), y su velocidad de migración es inversamente proporcional a su peso molecular. En consecuencia, las proteínas más pequeñas migran más rápido a través del gel, mientras que las de mayor tamaño avanzan lentamente. Finalmente, para el revelado de las proteínas en gel, los métodos más utilizados son la tinción con azul de Coomassie y la tinción con plata (Nelson y Cox, 2021).

Electroforesis Bidimensional (2D)

Esta técnica combina dos métodos de electroforesis diferentes. En la primera dimensión, las proteínas se separan según su carga eléctrica (punto isoelectrico, pI) y en la segunda dimensión por masa molecular (SDS-PAGE). En la primera etapa, se utiliza una tira de gel con un gradiente de pH inmovilizado, que suele abarcar valores de pH entre 3 y 10. La muestra proteica se aplica sobre la tira, luego de haber sido previamente desnaturalizada, por ejemplo, mediante el uso de urea, la cual actúa rompiendo los puentes de hidrógeno. Al aplicar un campo eléctrico, las proteínas migran a través del gel: si el pH es menor que su pI, adquieren carga positiva y migran hacia el cátodo; si el pH es mayor que su pI, se cargan negativamente y migran hacia el ánodo. La migración se detiene cuando las proteínas alcanzan el pH igual a su pI, ya que en ese momento su carga neta es cero. Posteriormente, la tira del enfoque isoelectrico se coloca sobre un gel de poliacrilamida vertical y se realiza el SDS-PAGE. El resultado final es un gel con

múltiples manchas o puntos (spots), cada uno correspondiente a una proteína individual. Para su visualización, el gel se tiñe con plata o azul de Coomassie (Magdeldin *et al.*, 2014).

Huella digital de masa de péptidos (PMF)

Las proteínas son inicialmente separadas mediante electroforesis en gel o cromatografía líquida. Luego, se someten a una digestión enzimática utilizando, por lo general, tripsina, que fragmenta las proteínas en péptidos con un tamaño promedio de 8 a 10 aminoácidos. Los péptidos obtenidos son analizados mediante espectrometría de masas, lo que genera una lista de picos correspondiente a sus masas moleculares. Posteriormente, se realiza una digestión *in silico*, donde un software simula la acción de la misma enzima utilizada experimentalmente sobre las secuencias de proteínas almacenadas en bases de datos y se obtiene una lista teórica de picos. Finalmente, el patrón experimental de masas es comparado con los patrones teóricos generados por el software. La coincidencia entre ambos permite identificar la proteína problema y conocer su peso molecular. Entre los programas más utilizados para este proceso se encuentran Mascot, MS-Fit y Profound. (Martínez de Bartolomé, 2013; Calabrese, 2019).

Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

El análisis consta de dos fases: en la primera se obtienen las huellas peptídicas para adquirir los espectros de masas de los péptidos (MS), en la segunda fase (MS/MS) algunos de esos péptidos son fragmentados de manera controlada, utilizando métodos como la colisión inducida por gas, la reacción ión-molécula o la fotodisociación. Los fragmentos resultantes son detectados por un segundo analizador de masas, generando un nuevo espectro. A partir de estos datos, se comparan las masas de los fragmentos observados con masas teóricas generadas *in silico*, utilizando bases de datos de secuencias proteicas. Esta técnica tiene otro enfoque denominado secuenciación *de novo*, el cual permite

identificar proteínas extrayendo directamente la información de su secuencia contenida en los espectros de fragmentación, sin recurrir a bases de datos proteicas (Martínez de Bartolomé, 2013).

Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS)

Luego de la extracción de proteínas, estas son sometidas a digestión enzimática, ya sea directamente desde el extracto proteico o luego de una separación previa mediante SDS-PAGE o electroforesis bidimensional cuando se requiere identificar proteínas específicas asociadas a bandas definidas en el gel. Los péptidos generados se introducen en un sistema de cromatografía líquida, donde son separados en función de su hidrofobicidad. Esta etapa es fundamental, ya que permite reducir la complejidad de la muestra y evitar interferencias entre los péptidos, lo que garantiza su ingreso ordenado y progresivo al espectrofotómetro de masas. De este modo, se mejora considerablemente la sensibilidad, resolución y exactitud del análisis. A continuación, los péptidos separados pasan por una fuente de ionización, normalmente ionización por electropulverización (ESI) que transforma los compuestos líquidos separados en iones que puedan ingresar al espectrómetro de masas donde son analizados en dos pasos consecutivos: MS y MS/MS. Finalmente, la identificación de las proteínas se logra comparando los espectros MS/MS obtenidos experimentalmente con espectros teóricos generados *in silico* a partir de bases de datos que contienen las secuencias de proteínas conocidas (Suna y Mayr, 2018; Huson *et al.*, 2018 b; Morchón *et al.*, 2014).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPOTESIS

3.1 Nivel de Investigación

Descriptivo

3.2 Tipo y Diseño de Investigación

Investigación de tipo básica con diseño descriptivo y dimensión transversal.

3.3 Diseño Metodológico

3.3.1 Localización del lugar de muestreo

El Matadero Municipal de Cajamarca está ubicado en el Centro Poblado Isoconga ($7^{\circ} 12' 04.6''$ S, $78^{\circ} 26' 57.4''$ O), distrito Llacanora, región Cajamarca, Perú (Figura 3). Este matadero funciona conforme a lo establecido en el Reglamento Sanitario para el Sacrificio de Animales de Abasto del Perú (D.S. N° 015-2012-AG).

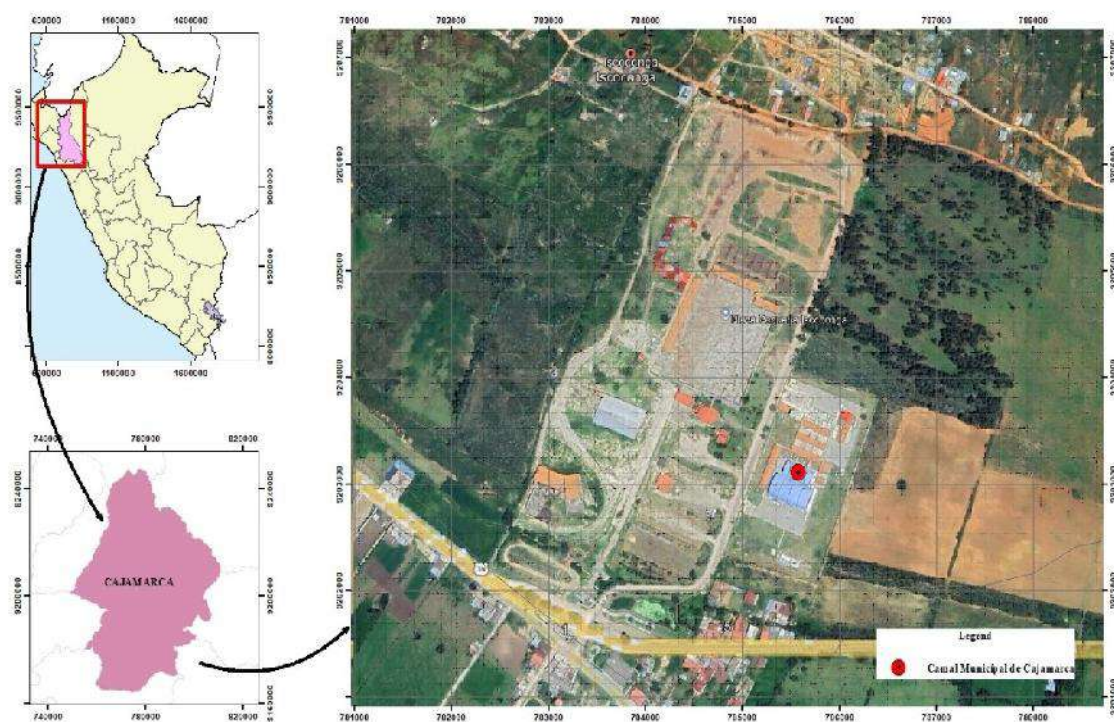


Figura 3. Ubicación geográfica del Matadero Municipal de Cajamarca. Centro poblado Isoconga, Cajamarca, Perú, 2024. Elaborado mediante ArcGIS versión gratuita 10.8.

3.3.2 Material biológico

Parásitos adultos de la familia Paramphistomidae obtenidos mediante observación directa del rumen y retículo de bovinos faenados en el matadero municipal de Cajamarca (Apéndice 1).

3.3.3 Recolección de parásitos

Muestras de rumen y retículo de bovinos faenados fueron revisados. El contenido de ambas cavidades fue vertido en un recipiente y, posteriormente, se procedió al lavado cuidadoso de las estructuras con la finalidad de obtener los especímenes adultos de paramphistomidos. Siguiendo la metodología descrita por Abdolahi Khabisi y Sarkari (2016), los parásitos recolectados con pinzas anatómicas fueron lavados cinco veces con PBS (pH 7,2) (Apéndice 2) y transferidos a tubos de 50 mL que contenían PBS. Posteriormente, fueron transportados a 37 °C al Laboratorio de Biotecnología en Sanidad Animal de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).

3.3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se emplearon fichas de recolección de datos para registrar la obtención de muestras de paramphistomidos y para documentar la distancia de migración (cm) de las bandas del marcador molecular y de las bandas proteicas de la muestra problema, con el fin de determinar posteriormente su peso molecular (Apéndice 3).

3.3.5 Extracción de proteínas somáticas

La extracción de proteínas somáticas se realizó conforme al protocolo propuesto por Cabrera, Chávez y Ravines (2020). Se distribuyeron 10, 20 y 30 parásitos en microtubos individuales de 2 mL y se conservaron en una cubeta con hielo. Posteriormente, los microtubos fueron sumergidos en nitrógeno líquido a -195 °C durante aproximadamente 20 segundos, repitiendo este proceso tres veces.

Inmediatamente después del último congelamiento, los microtubos que contienen las muestras fueron rotos manualmente para permitir la extracción del contenido. Durante este procedimiento, se retiraron cuidadosamente los fragmentos de plástico resultantes, asegurando que solo el material biológico fuera procesado. Posteriormente, las muestras fueron trituradas hasta obtener una consistencia pastosa (Apéndice 4). La pasta se colectó en nuevos microtubos de 2 mL, se añadió 1,5 mL de PBS y se homogenizó en un vórtex (VWR[®], Vortexer Mini 230V, EE. UU). Las muestras se centrifugaron a 14 000 g durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se dejó secar a temperatura ambiente.

El pellet se suspendió en el reactivo de extracción de proteínas BugBuster[®] (Novagen[®], EE. UU) siguiendo las especificaciones del fabricante, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en una plataforma de agitación lenta (Apéndice 4). Se agregó 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Sigma[®], EE. UU) como inhibidor de proteasas y se continuó la incubación durante otros 20 minutos bajo las mismas condiciones.

Finalmente, los residuos celulares insolubles fueron eliminados mediante centrifugación a 16 000 g, a 4 °C, durante 20 minutos y el sobrenadante se colocó a un nuevo microtubo de 2 mL. La proteína se almacenó a -20 °C para su posterior análisis.

Es importante señalar que este procedimiento se repitió utilizando un total de 200 parásitos, distribuidos en grupos de 20 en microtubos individuales de 2 mL, ya que esta cantidad permitió obtener una mayor resolución de las bandas en los perfiles electroforéticos, en comparación con las evaluaciones previas realizadas con 10 y 30 parásitos.

3.3.6 Cuantificación de proteínas somáticas

La concentración de proteínas somáticas se determinó mediante el método modificado de Bradford (1976), utilizando un espectrofotómetro (Thermo Scientific, NanoDrop™ 2000, EE. UU). Se empleó el reactivo colorante concentrado para el ensayo de proteínas (Bio-Rad, #5000006, EE. UU) siguiendo las instrucciones del fabricante y BSA como estándar del ensayo (Spinreact®, España) (Anexo 1, Apéndice 5).

3.3.7 SDS-PAGE

Los extractos proteicos fueron analizados por SDS-PAGE según lo descrito por Cabrera, Chávez y Ravines (2020) y Alonso *et al.* (2020), con ligeras modificaciones. Se prepararon un gel de separación al 12% y un gel de concentración al 5% (Anexo 2), en ese orden, ya que el gel de separación debe verse primero entre las placas de vidrio ensambladas del sistema de electroforesis vertical (Labnet International Inc., ENDURO™ VE10, EE. UU) y dejarse polimerizar completamente antes de añadir el gel de concentración.

Para su desnaturalización, las proteínas se mezclaron en una proporción 1:1 con buffer de carga (20 µL de buffer de carga + 20 µL de muestra); la composición del buffer de carga se detalla en el Anexo 2. Luego se sometieron a 95 °C durante 5 minutos en baño maría.

Las placas de vidrio con los geles fueron colocadas en la cuba de electroforesis, y se añadió el buffer de corrida (ver composición en el Anexo 2). Posteriormente, se cargaron 10 µL del marcador molecular de proteínas de amplio espectro Spectra™ Multicolor (Thermo Scientific, EE. UU) y 29 µL de cada muestra en los pocillos correspondientes. Adicionalmente, se utilizó 29 µL de BSA a una concentración de 250 µg/mL, con un peso molecular de ~ 66,5 kDa como control (Spinreact®, España). La corrida electroforética se llevó a cabo utilizando el sistema de electroforesis en gel vertical a un voltaje constante

de 50 V durante 30 minutos para el gel de concentración, y a 120 V durante 2 horas y 50 minutos para el gel de resolución (Apéndice 6). La tinción del gel se realizó con el kit comercial Silver Stain Plus™ (Bio-Rad, EE. UU), siguiendo las especificaciones del fabricante para su estandarización (Anexo 3, Apéndice 7).

3.3.8 Determinación del peso molecular

Las bandas proteicas del extracto somático obtenidas en el gel fueron analizadas para estimar su peso molecular (PM), conforme a la metodología descrita por Matsumoto *et al.* (2019). Para ello, se midieron con una regla en centímetros las distancias de migración de cada banda proteica de interés, así como del frente del colorante, directamente sobre el gel de electroforesis.

Posteriormente, se calcularon los valores de movilidad relativa (R_f) de las bandas del marcador molecular y de cada banda proteica de interés, en función de la distancia de migración del frente del colorante:

$$R_f = \frac{\text{distancia de migración de la banda proteica (cm)}}{\text{distancia de migración del frente del colorante (cm)}}$$

Se calculó el logaritmo en base 10 de cada uno de los pesos moleculares del marcador proteico (10, 15, 25, 35, 40, 50, 70, 100, 140 y 260 kDa). Luego, se graficaron estos valores de \log_{10} (PM) en el eje Y frente a los valores de R_f del marcador en el eje X (\log_{10} (PM) vs. R_f). A partir de esta relación, se generó una ecuación de regresión lineal de la forma $y = mx + b$.

Los valores de R_f de cada banda proteica de interés fueron interpolados en dicha ecuación, reemplazando el valor de x para obtener el logaritmo en base 10 del peso molecular. Finalmente, se aplicó el antilogaritmo en base 10 a los valores obtenidos, con el objetivo de estimar el peso molecular aproximado de cada banda.

3.3.9 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Las distancias de migración (cm) de las bandas del marcador molecular y de las bandas proteicas de interés, registradas en la ficha de recolección de datos, fueron ingresadas en una base de datos elaborada en el programa Microsoft Excel 2019. Estos datos fueron procesados para calcular los valores de movilidad relativa (R_f) tanto del marcador molecular como de las bandas analizadas, así como para realizar la interpolación de los valores de R_f de cada una en la ecuación de regresión lineal, lo que permitió la determinación estimada del peso molecular de cada banda proteica.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Los resultados que se presentan a continuación corresponden al extracto proteico somático obtenido a partir de 20 paramphistomidos adultos por muestra, con un total de 10 muestras analizadas por SDS-PAGE (Figura 4). La elección de 20 parásitos por muestra se basó en que esta cantidad permitió una mejor resolución de las bandas electroforéticas, en comparación con los extractos obtenidos de 10 y 30 paramphistomidos (Apéndice 8).

4.1.1 Cuantificación proteica del extracto somático

La concentración proteica promedio del extracto somático obtenido a partir de 20 paramphistomidos adultos por muestra, con un total de 10 muestras, fue de 726,5 µg/mL (725,3; 727,3; 725,9; 727,6; 725,6; 727,5; 726,1; 727,0; 726,2 y 726,5 µg/mL). La cuantificación se realizó mediante el método de Bradford (Apéndice 9). Las concentraciones proteicas correspondientes a extractos somáticos de 10 y 30 paramphistomidos adultos, se presentan en el Apéndice 10.

4.1.2 Caracterización por peso molecular de proteínas somáticas

Al analizar el perfil electroforético, se identificaron un total de 21 bandas, con pesos moleculares que oscilaron entre 15 y 119 kDa (15, 21, 23, 24, 26, 33, 38, 40, 46, 50, 56, 59, 63, 70, 77, 91, 96, 100, 105, 113 y 119 kDa) (Figura 5, Tabla 2, Apéndice 11 y 12). Se observó mayor intensidad en 08 bandas, correspondientes a los pesos moleculares de 105, 63, 33, 26, 24, 23, 21 y 15 kDa.

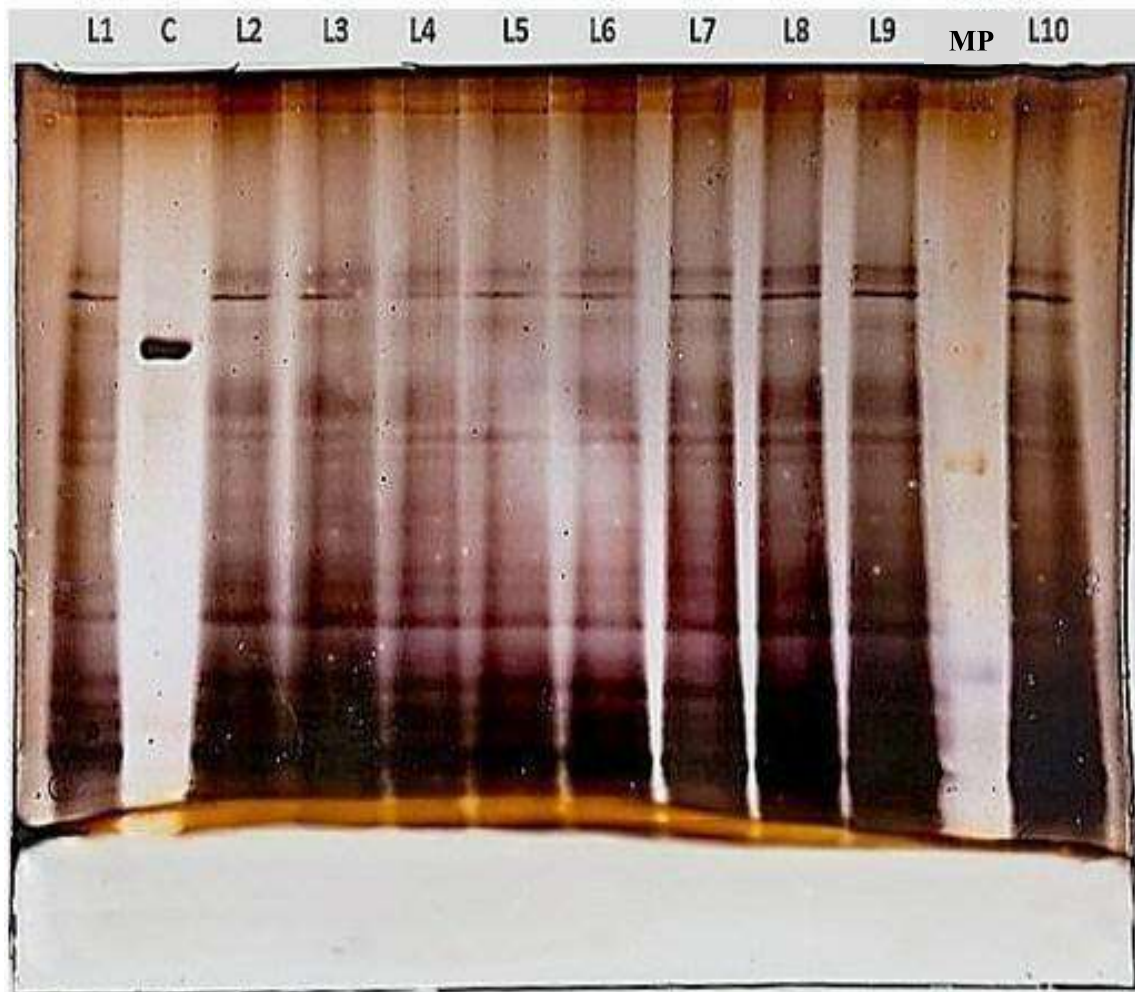


Figura 4. Imagen completa del perfil electroforético de proteínas del extracto somático de 20 paramphistomidos adultos, analizado mediante SDS-PAGE y revelado por tinción con plata. L1-L10 representan muestras independientes de extracto proteico somático, cada una obtenida a partir de 20 paramphistomidos; C: control (BSA, 250 µg/mL) y MP: estándares de peso molecular.

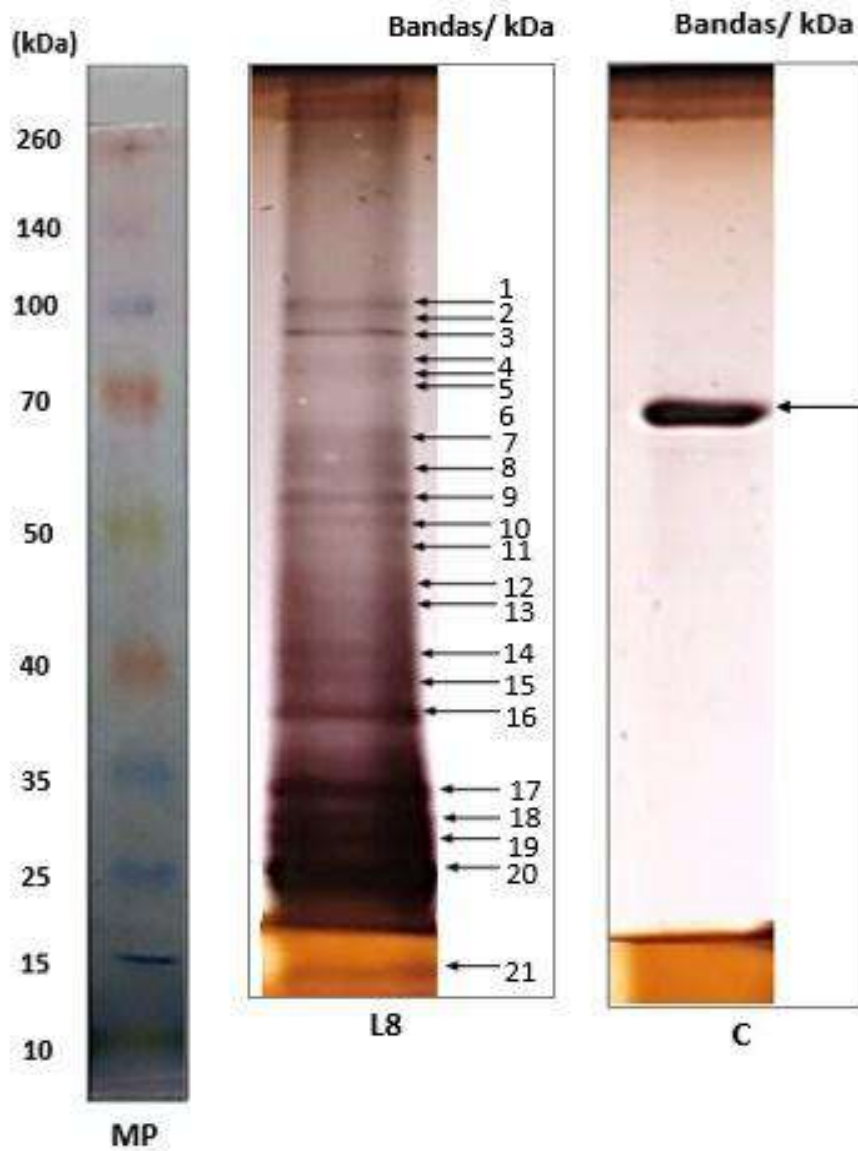


Figura 5. Perfil electroforético de proteínas del extracto crudo somático de 20 paramphistomidos adultos analizados mediante SDS-PAGE. MP presenta los estándares de peso molecular; L8 (21 bandas proteicas) y C (control BSA, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) *Debido a la incompatibilidad entre la tinción con plata y el marcador molecular, las bandas del marcador fueron fotografiadas previamente antes de la tinción del gel. Por ello, la imagen del marcador se presenta por separado, aunque corresponde al mismo gel. Para su ensamblaje, se conservaron las proporciones originales del gel, alineando las bandas del marcador con las de las muestras.

Tabla 2. Peso molecular estimado de las proteínas presentes en el extracto crudo somático de parásitos adultos de la familia Paramphistomidae.

Número de banda	Peso molecular (kDa)	
	Carril L8	Carril C
	Extracto proteico somático de 20 paramphistomidos	Control (BSA 250 µg/mL)
1	119	
2	113	
3	105	
4	100	
5	96	
6	91	
7	77	
8	70	
9	63	66,5
10	59	
11	56	
12	50	
13	46	
14	40	
15	38	
16	33	
17	26	
18	24	
19	23	
20	21	
21	15	

4.2 Discusión

La paramfistomosis en rumiantes continúa siendo una enfermedad subestimada, a pesar de su impacto significativo en la salud animal y en la economía global, debido a su carácter emergente y a las elevadas tasas de morbimortalidad que puede ocasionar en el ganado (Sivajothi y Sudhakara, 2014; Iglesias-Piñeiro *et al.*, 2016; Qureshi, Javed y Khan, 2021; Torrel-Pajares *et al.*, 2022). En particular, en la región Cajamarca, principal zona productora de leche fresca en Perú, esta parasitosis ha recibido escasa atención en términos de investigación y control, a pesar de ser endémica y presentar una alta prevalencia que es favorecida por un nicho ecológico propicio, con condiciones de temperatura y humedad que facilitan el desarrollo del ciclo biológico del parásito.

Actualmente, el diagnóstico de esta enfermedad se basa principalmente en el examen coprológico, un método con limitaciones para la detección temprana de la infección. Además, no se dispone de una vacuna eficaz para su prevención (Anuracpreeda, Chawengkirttikul y Sobhon, 2016). En este contexto, la proteómica ha permitido identificar proteínas clave responsables de la modulación inmunitaria del parásito; por tal razón, el inmunodiagnóstico resulta ser una herramienta más precisa para el reconocimiento de una infección temprana. Para ello, resulta fundamental conocer el perfil antigénico del parásito, siendo también un paso esencial para el desarrollo de vacunas (Johnston, MacDonald y McKay, 2009; Anuracpreeda, Chawengkirttikul y Sobhon, 2016). No obstante, la caracterización del proteoma de parásitos de la familia Paramphistomidae, que constituye el punto de partida para estas investigaciones, sigue siendo limitada, dificultando el avance en el control de la enfermedad.

En este sentido, el presente estudio constituye la primera investigación a nivel nacional sobre el perfil electroforético de proteínas somáticas de parásitos de la familia Paramphistomidae aislados de bovinos mediante la técnica SDS-PAGE. Estos hallazgos

contribuyen al conocimiento de la biología del parásito y proporcionan las bases para futuras investigaciones orientadas al desarrollo de herramientas de diagnóstico y de control más eficientes. Los resultados obtenidos revelaron la presencia de 21 bandas proteicas con pesos moleculares entre 15 y 119 kDa (15, 21, 23, 24, 26, 33, 38, 40, 46, 50, 56, 59, 63, 70, 77, 91, 96, 100, 105, 113 y 119 kDa) en parásitos adultos de la familia Paramphistomidae, aislados de bovinos en Cajamarca, los cuales han sido caracterizados molecularmente en estudios anteriores como pertenecientes a la especie *Calicophoron microbothrioides*.

Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Anuracpreeda, Chawengkirttikul y Sobhon (2016), quienes identificaron 26 bandas con pesos moleculares entre 12 y 170 kDa en *Paramphistomum gracile*. De manera similar, se observan concordancias con la investigación de Abdullah, Tak y Gani (2019), quienes caracterizaron proteínas somáticas de *Paramphistomum cervi* en un rango de 10 y 150 kDa, y con los hallazgos de Salib *et al.* (2015), quienes detectaron 14 bandas proteicas en *Paramphistomum* spp. con pesos moleculares entre 11,5 y 174 kDa. Jyoti, Prasad y Singh (2014), a partir de sus estudios en *Paramphistomum epiclitum*, también informaron la presencia de 15 bandas entre 8-169,3 kDa.

Las ligeras diferencias observadas entre los estudios mencionados anteriormente y los resultados de la presente investigación, así como la notable diferencia respecto al hallazgo reportado por Hussain (2013), quien registró seis bandas de proteínas somáticas de *Gigantocotyle explanatum* con pesos moleculares entre 39 y 130 kDa, podrían estar relacionadas con la variabilidad de las especies analizadas en cada estudio y probablemente se deban a la heterogeneidad genómica (Mattison *et al.*, 1994). Lo cual es coherente con lo reportado por Huson *et al.* (2018 b), quienes encontraron en

Paramphistomum cervi coincidencias significativas únicamente en 38 de sus 50 componentes genéticos al compararlos con el perfil del proteoma somático de *Calicophoron daubneyi*.

La interacción entre el parásito y su hospedero determina la expresión proteica del parásito. En este sentido, la adaptación del parásito a diferentes tipos de hospederos también podría inducir variaciones en su perfil electroforético de proteínas; puesto que, los mecanismos moleculares y las respuestas inmunológicas del hospedero tienen un impacto directo en la producción de proteínas del parásito. Esto ha sido demostrado en el estudio de Hong *et al.* (2011), donde se encontró que la variabilidad en el tipo de hospedero puede inducir cambios en el perfil electroforético de proteínas del trematodo *Schistosoma japonicum*. Asimismo, De Vera *et al.* (2009) compararon el perfil electroforético de proteínas de *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica* entre bovinos (*Bos taurus*) y búfalos de agua (*Bubalus bubalis*), y determinaron que varias bandas eran exclusivas de los búfalos de agua para *F. hepatica* y *F. gigantica*. De manera similar, Jadav *et al.* (2018) identificaron 16 bandas proteicas entre 14 y 76 kDa en *Paramphistomum epiclitum* aislado de cabras y ovejas; estos resultados difieren parcialmente de los reportados por Hussain (2013), quien obtuvo 23 bandas de 14 a 115,5 kDa a partir de *P. epiclitum* procedentes de búfalos. Estos hallazgos podrían explicar en parte, las discrepancias entre la investigación actual, que se enfocó en paramphistomidos obtenidos de bovinos, y otros estudios realizados en diferentes hospederos definitivos.

Las diferencias observadas en el perfil electroforético de proteínas somáticas de los parásitos de la familia Paramphistomidae en este estudio, en comparación con otras investigaciones, también podrían estar asociadas con la ubicación geográfica de los parásitos, parámetros ecológicos y con los métodos de aislamiento de las proteínas somáticas (Jadav *et al.*, 2018; Abdullah, Tak y Gani, 2019). Según el estudio de Farjallah

et al. (2009), se han identificado variaciones en las secuencias de nucleótidos de los espaciadores transcritos internos (*ITS-1* e *ITS-2*) del ADN ribosómico de *Fasciola* spp. provenientes de distintas localidades. Estas variaciones reflejarían diferencias evolutivas entre poblaciones, posiblemente vinculadas a procesos de adaptación genética tanto al entorno ambiental como a los hospederos locales. Dichas divergencias genéticas podrían influir directamente en la expresión diferencial de proteínas en los parásitos.

En el presente estudio, las bandas proteicas con mayor intensidad de tinción fueron las de 105, 63, 33, 26, 24, 23, 21 y 15 kDa. Esta elevada intensidad podría sugerir una mayor abundancia relativa de estas proteínas en la muestra analizada. Resultados con cierto grado de similitud fueron reportados por Shafi *et al.* (2016), quienes identificaron bandas intensas a 66, 52, 31, 26, 22 y 12 kDa en muestras de *Paramphistomum cervi*. De manera análoga, Abdullah, Tak y Gani (2019) registraron bandas de alta intensidad a 75, 50, 40, 23, 18 y 10 kDa en la misma especie. Las bandas más intensas observadas en esta investigación podrían estar asociadas con proteínas comúnmente abundantes en el proteoma somático de paramphistomidos, como las reportadas en *Calicophoron daubneyi*, cuyos pesos moleculares se asemejan con los registrados en este estudio (Huson *et al.*, 2018 b). Entre ellas, destacan las FABPs con pesos moleculares entre 12 y 15 kDa (Figueroa y Espino, 2014); la GST entre 23-28 kDa (Allen, 2019); la mioglobina, cercana a los 17 kDa (De Guzman *et al.*, 2007) y la familia de deshidrogenasas/reductasas de cadena corta entre 25-30 kDa aproximadamente (Kavanagh *et al.*, 2008). Sin embargo, para la identificación puntual de estas proteínas, se requieren técnicas de análisis complementarios, como la espectrometría de masas.

Dentro de este grupo de proteínas, las FABPs son una posible diana para el desarrollo de fármacos, vacunas y herramientas de diagnóstico; debido a su inmunogenicidad y su

participación en la oxidación de ácidos grasos, un proceso importante para la supervivencia del parásito (Figueroa y Espino, 2014; Sripa, Laha y Sripa, 2017). La inhibición de estas proteínas afecta la membrana del tegumento, altera los mecanismos de desintoxicación (Timanova-Atanasova *et al.*, 2004) y disminuye la fecundidad del parásito (Hillyer, 2005).

Las GST, también han sido reportadas en *Gastrothylax crumenifer*, un trematodo de la superfamilia Paramphistomoidea (Zainab *et al.*, 2023). Estas proteínas son consideradas altamente inmunogénicas y cumplen una función importante en la desintoxicación de fármacos. Asimismo, han sido caracterizadas como antígenos diagnósticos significativos en el paramphistomido *Gigantocotyle explanatum*, mostrando una mayor actividad enzimática en el extracto somático en comparación con los huevos y los productos de excreción-secreción (Rehman *et al.*, 2020). Igualmente, investigaciones en otros helmintos han sugerido su potencial como blanco para el serodiagnóstico, el desarrollo de fármacos y como candidatos vacunales (Perally *et al.*, 2008; LaCourse *et al.*, 2012; Radio *et al.*, 2018).

Asimismo, otras proteínas somáticas en menor proporción han sido identificadas en *Calicophoron daubneyi*, pero con relevancia para el diagnóstico y desarrollo de vacunas, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el disulfuro isomerasa, la malato deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa (Allen, 2019), cuyos pesos moleculares aproximados son de 36 kDa (UniProt, 2025 a), 55 kDa (UniProt, 2025 b), 36 kDa (Uniprot c) y 48-52 kDa (Uniprot, 2025 d; UniProt, 2025 e), respectivamente. Dado su peso molecular, estas proteínas podrían relacionarse con las proteínas somáticas caracterizadas en el presente estudio.

La GAPDH, es una proteína con función protectora frente al sistema inmune del hospedero a través de la inhibición del complemento C3 (Sahoo *et al.*, 2013). Esta proteína ha sido identificada también en el trematodo *Schistosoma mansoni*, y propuesta como candidata vacunal (Wang *et al.*, 2013). Por otro lado, la aldehído deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa también han sido reportadas en trematodos como *Dicrocoelium dendriticum*, estas proteínas son importantes en la interacción con el sistema inmune del hospedero, lo cual las convierte en atractivas para el desarrollo de vacunas o estrategias de control (Martínez-Ibeas, González y Manga, 2013). De manera similar, el disulfuro isomerasa ha sido documentada en diversos helmintos y se le atribuye un rol fundamental en la interacción parásito-hospedero (Cao *et al.*, 2014).

En relación con la concentración de proteínas somáticas de paramphistomidos obtenida en el presente estudio, se determinó un promedio de 726,5 µg/mL, a partir de la extracción realizada con 20 parásitos, utilizando el método de Bradford. Este valor difiere del reportado por Vijayashanthi *et al.* (2020), quienes obtuvieron múltiples bandas de 10 a 100 kDa con concentraciones entre 1 237 y 2 172 µg/mL en *Cotylophoron cotylophorum*. Asimismo, se encontraron diferencias con los resultados de Salib *et al.* (2015), quienes registraron concentraciones de 3300 µg/mL en *Paramphistomum* spp., y a los hallazgos de Jadav *et al.* (2018), con una concentración de 6000 µg/mL en *Paramphistomum epiclitum*. Estas variaciones pueden explicarse por diferencias en los métodos de extracción proteica, en la cantidad de parásitos procesados o por la heterogeneidad genómica entre las especies analizadas (Mattison *et al.*, 1994; Huson *et al.*, 2018 b).

Además, al comparar el perfil electroforético de proteínas somáticas de paramphistomidos obtenidos en esta investigación con el de otros trematodos no pertenecientes a la familia Paramphistomidae, como *Fasciola* spp., se observan

diferencias notables. Es importante destacar la estrecha relación entre estos parásitos, ya que pueden generar confusión diagnóstica dado que ambos provocan signos clínicos similares en rumiantes, lo que a su vez podría conducir a la administración de tratamientos inapropiados contra la duela del rumen (Hoyle *et al.*, 2022). En el estudio de Dezhabad *et al.* (2023), se identificaron 12 bandas de proteína en *Fasciola* spp. con pesos moleculares de 26, 37, 40, 49, 55, 66, 70, 85, 95, 145, 185 y 263 kDa. Por otro lado, Shafi *et al.* (2017), reportaron 10 bandas principales en *Fasciola gigantica* (16, 23, 24, 27, 33, 40, 46, 51, 62 y 68 kDa), mientras que se observaron 7 bandas en *Fasciola hepatica* (16, 23, 27, 33, 42, 54 y 62 kDa). Estas diferencias pueden deberse a la divergencia metabólica entre géneros, dado que *Fasciola* spp. parasita el hígado y los conductos biliares mientras que los paramphistomidos se localizan en el rumen (Mattison *et al.*, 1994). Por ejemplo, en el proteoma somático de *F. hepatica* en su fase adulta predominan proteínas como catepsinas L y B, legumaínas y ferritina; las cuales, en su mayoría, no suelen estar presentes en los paramphistomidos (Di Maggio *et al.*, 2016).

Se observa una situación similar en el paramphistomido *Gigantocotyle explanatum*, cuyo microhábitat también es el hígado y el conducto biliar. De igual manera, la diferencia en el número de bandas y el peso molecular obtenidos (seis bandas entre 39 y 130 kDa) podría estar relacionado con la divergencia metabólica, influenciada por las condiciones fisicoquímicas de su microambiente en comparación con el microambiente ruminal. Según Hussain (2013), la presencia de menos bandas proteicas puede deberse a la liberación de grandes cantidades de proteasas por parte del parásito, que pueden degradar diferentes proteínas rápidamente.

Es importante destacar que, en el presente estudio se identificaron 21 bandas proteicas con pesos moleculares aproximados de 15, 21, 23, 24, 26, 33, 38, 40, 46, 50, 56, 59, 63,

70, 77, 91, 96, 100, 105, 113 y 119 kDa. Sin embargo, se requieren investigaciones complementarias para determinar la antigenicidad, inmunogenicidad o inmunodominancia de dichas proteínas. Algunas de estas bandas podrían estar asociadas a proteínas previamente reportadas en la literatura, como aquellas de alta especificidad que no presentan reactividad cruzada con otros parásitos, tales como la proteína inmunogénica de 16 kDa purificada de *Paramphistomum gracile* (Anuracpreeda, Chawengkirtikul y Sobhon, 2016); las proteínas purificadas inmunodominantes de 37 a 40 kDa obtenidas de *Paramphistomum epiclitum* (Arora *et al.*, 2010); la proteína antigénica de 90 kDa identificada en infecciones mixtas que comprenden a *Cotylophorum cotylophorum*, *Gastrothylax crumenifer* y *Paramphistomum cervi* (Meshgi, Eslami y Halajian, 2009); y la proteína antigénica de 52 kDa de *P. cervi* (Anuracpreeda, Wanichanon y Sobhon, 2008). Adicionalmente, se ha documentado la inmunogenicidad de una proteína de 63 kDa en *Paramphistomum* spp., cuya reactividad cruzada aún no ha sido evaluada (Salib *et al.*, 2015). También se han identificado antígenos inmunodominantes de 27, 29 y 60 kDa compartidos entre *C. cotylophorum* y *G. crumenifer* (Vijayashanthi *et al.*, 2020).

En conjunto, estas proteínas representan candidatos prometedores para el desarrollo de kits serológicos orientados al diagnóstico temprano de la paramfistomosis, así como para la formulación de vacunas. No obstante, es indispensable realizar estudios de validación a mayor escala, que incluyan la purificación de los antígenos inmunogénicos, la evaluación detallada de su reactividad cruzada, y la identificación específica de las proteínas involucradas en la respuesta inmunitaria del hospedero.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- La caracterización por peso molecular de las proteínas somáticas de parásitos adultos de la familia Paramphistomidae, aislados de bovinos faenados en el Matadero Municipal de Cajamarca, reveló 21 bandas proteicas entre 15 y 119 kDa (15, 21, 23, 24, 26, 33, 38, 40, 46, 50, 56, 59, 63, 70, 77, 91, 96, 100, 105, 113 y 119 kDa).
- La cuantificación de proteínas somáticas de parásitos adultos de la familia Paramphistomidae, mediante el método de Bradford, reveló una concentración promedio de 726,5 $\mu\text{g/mL}$ obtenido a partir de 20 paramphistomidos. Esta concentración resultó la más adecuada para lograr una resolución óptima de las bandas electroforéticas, en comparación con las otras concentraciones evaluadas (500 $\mu\text{g/mL}$ y 1979,5 $\mu\text{g/mL}$).
- Las bandas proteicas que presentaron mayor intensidad fueron ocho, correspondientes a pesos moleculares aproximados de 15, 21, 23, 24, 26, 33, 63 y 105 kDa.

5.2 Recomendaciones

- Se sugiere complementar el análisis del perfil electroforético de proteínas somáticas mediante técnicas avanzadas, como espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS) para determinar con precisión sus masas moleculares y facilitar su identificación mediante comparación con bases de datos proteómicos.

- Ampliar el estudio a otras especies de la familia Paramphistomidae para identificar similitudes y diferencias en sus perfiles proteicos, además de establecer comparaciones con otros trematodos de importancia veterinaria, como *Fasciola hepatica*, una especie de alta prevalencia en la región Cajamarca. Asimismo, se recomienda analizar la variabilidad del perfil electroforético de las proteínas somáticas en distintos hospederos, como bovinos y ovejas, dado que la adaptación del parásito a cada hospedero podría influir en su expresión proteica.
- Se recomienda llevar a cabo un análisis proteómico comparativo entre las proteínas somáticas, los productos excretores/secretores y el proteoma de los huevos de paramphistomidos, con el objetivo de identificar proteínas adicionales con potencial inmunogénico.

LISTA DE REFERENCIAS

- Abdolahi Khabisi, S. and Sarkari, B. (2016) 'Detection of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* common and uncommon antigens, using rabbit hyper immune serum raised against their excretory–secretory and somatic antigens', *J Parasit Dis*, 40, pp. 1552–1557. <https://doi.org/10.1007/s12639-015-0726-5>
- Abdullah, I., Tak, H. and Gani, S.A. (2019) 'Protein profile of somatic antigens of *Paramphistomum cervi*', *International Journal of Zoology and Applied Biosciences*, 4(6), pp. 275–277. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3602582>.
- Alarcón, E. y Velásquez, L. (2009) 'Descripción morfológica de *Cotylophoron cotylophorum* (Digenea: Paramphistomidae) hallado en bovinos de Rionegro, Antioquia, Colombia', *Rev Colomb Cienc Pecu*, 22, pp. 168–177. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/324383/20781552>
- Allen, N. (2019) Molecular approaches to uncover the fundamental biology of *Calicophoron daubneyi*, Postgraduate Thesis, United Kingdom: Aberystwyth University. Available in: https://pure.aber.ac.uk/ws/portalfiles/portal/49906429/Allen_Nathan.pdf
- Alonso, S.M. *et al.* (2020) 'A protocol for recombinant protein quantification by densitometry', *Microbiologyopen*, 9(6), pp. 1175–1182. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1027>
- Alzieu, J.P. and Dorchies, P. (2007) 'Réémergence de la paramphistomose bovine en France: Synthèse des connaissances actuelles épidémiologiques, physiopathologiques et diagnostiques', *Bull. Acad. Vet. France*, 160(2), pp. 93–99. <https://doi.org/10.4267/2042/47872>
- Anuracpreeda, P. *et al.* (2013). 'Antigenic components, isolation and partial characterization of excretion–secretion fraction of *Paramphistomum cervi*', *Exp Parasitol*, 133(3), pp. 327–33. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.12.006>
- Anuracpreeda, P., Chawengkirttikul, R. and Sobhon, P. (2016) 'Antigenic profile, isolation and characterization of whole body extract of *Paramphistomum gracile*', *Parasite Immunol*, 38(7), pp. 431–438. [10.1111/pim.12330](https://doi.org/10.1111/pim.12330).

Anuracpreeda, P., Tepsupornkul, K. and Chawengkirttikul, R. (2017) 'Immunodiagnosis of paramphistomosis using monoclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of *Paramphistomum gracile* circulating 16 kDa antigen', *Parasitology*, 144(7), pp. 899–903. <https://doi.org/10.1017/S003118201600264X>

Anuracpreeda, P., Wanichanon, C. and Sobhon, P. (2008) '*Paramphistomum cervi*: Antigenic profile of adults as recognized by infected cattle sera', *Experimental Parasitology*, 118(2), pp. 203–207. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.08.005>.

Aranda, C. (2017) Análisis morfométrico de los Paramphistomideos en bovinos beneficiados en el matadero San Francisco, Distrito de Salaverry – Trujillo, Perú, Tesis de Pregrado, Universidad Privada Antenor Orrego. Disponible en: https://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12759/3660/REP_MED_VE%20OTE_CARINA.ARANDA_AN%c3%81LISIS.MORFOM%c3%89TRICO.PARAMP%20HISTOMIDEOS.BOVINOS.BENEFICIADOS.MATADERO.SAN.FRANCISCO.%20DISTRITO.SALAVERRY.TRUJILLO.PER%c3%9a.pdf?sequence=1&isAllowed=%20y

Arora, R. *et al.* (2010) 'Immunoaffinity chromatographic analysis for purification of specific diagnostic antigens of *Paramphistomum epiclitum*', *Journal of Parasitic Diseases*, 34(1), pp. 57–61. <https://doi.org/10.1007/s12639-010-0011-6>.

Arroyo, M.I. *et al.* (2022) 'Prevalencia de *Fasciola hepatica* y Paramphistomidae en bovinos de doble propósito en una hacienda del trópico bajo andino colombiano', *Rev. Med. Vet. Zoot.*, 69(1), pp. 9–32. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v69n1.101530>

Acheson, E. *et al.* (2022) 'The effect of naturally acquired rumen fluke infection on animal health and production in dairy and beef cattle in the UK', *Front Vet Sci*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.968753>

Ates, C. and Umur, S. (2021) 'Paramphistome Species in Water Buffaloes and Intermediate Hosts in the Kızılırmak Delta in Samsun Province, Turkey', *Acta Parasitol*, 66(1), pp. 213–21. <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00278-z>

Benavides, O. and Romero, N.A. (2001) 'Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades. El control de los parásitos internos del ganado en sistemas de pastoreo en el trópico

colombiano’, *Carta Fedegan*, 71, 88–111. Disponible en: https://www.academia.edu/108516124/Control_de_parasitos_internos

Bida, S.A. and Schillhorn van Veen, T. (1977) ‘Enteric paramphistomiasis in Yankasa sheep’, *Trop Anim Health Prod*, 9(1), pp. 21–23. <https://doi.org/10.1007/BF02297385>

Bio-Rad Laboratories (1994) Bio-Rad Protein Assay Instruction Manual. Available in: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf>

Bio-Rad Laboratories (2016) Silver Stain Plus Instruction Manual. Available in: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT-442.pdf>

Bradford, M. (1976) ‘A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding’, *Anal Biochem*, 72(1–2), pp. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Cabrera, M., Chávez, S. y Ravines, J. (2020) Manual: Protocolos de laboratorio en la elaboración de vacunas para el control inmunológico de *Fasciola hepatica* en rumiantes. Martínez Compañón Editores, Lima. ISBN: 978-9972-44-050-2.

Calabrese, B. (2019) ‘Experimental Platforms for Extracting Biological Data: Mass Spectrometry, Microarray, Next Generation Sequencing’, in: Ranganathan, S., Gribskov, M., Nakai, K., Schönbach, C. (eds) *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. New York: Academic Press, pp. 126–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20412-3>

Cao, X. *et al.* (2014) ‘Cloning, expression and characterization of protein disulfide isomerase of *Schistosoma japonicum*’, *Experimental Parasitology*, 146, pp. 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.09.004>

Carrascosa, J. (2013) ‘Inmunogenicidad en terapia biológica. Implicaciones en Dermatología’, *Actas Dermosifiliogr*, 104(6), pp. 471–479. [10.1016/j.ad.2013.02.005](https://doi.org/10.1016/j.ad.2013.02.005)

Cerda, C. *et al.* (2019) ‘Morphological and molecular identification with frequency analysis of *Calicophoron microbothrioides* in central Chile’, *Rev Bras Parasitol Vet* 28(4), pp. 582–591. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019076>

- Chaudhry, U. *et al.* (2017) ‘Morphological and molecular identification of *Explanatum explanatum* in domestic water buffalo in Pakistan’, *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, 8, pp. 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.02.002>
- Chetri, P.B., Shukla, R. and Tripathi, T. (2020) ‘Identification and characterization of cytosolic malate dehydrogenase from the liver fluke *Fasciola gigantica*’, *Sci Rep*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70202-y>
- Chowdhury, T. *et al.* (2019) ‘Coproscopic and Slaughter House Study of Paramphistomiasis in Cattle at Sylhet Division of Bangladesh’, *J. Adv. Parasitol*, 6(3), pp. 35–40. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.jap/2019/6.3.35.40>
- Cordero del Campillo, M. *et al.* (2002) *Parasitología Veterinaria*. 3^a ed. Madrid: Editorial McGraw- Hill Interamericana.
- Cueva, M. *et al.* (2022) ‘Morfometría de paramfistomidos en fresco (Trematoda: Digenea) recolectados del Centro de Beneficio Municipal de Chachapoyas, Amazonas, Perú’, *Rev. investig. vet. Perú*, 33(5). <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v33i5.21994>.
- Cueva-Rodríguez, M. *et al.* (2024) ‘Prevalence of *Fasciola hepatica* and *Calicophoron* spp. in extensively reared cattle in the Florida district (Amazonas), Peru’, *Rev Mex Cienc Pecu*, 15(2), pp. 376–392. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v15i2.6496>
- De Guzman, J. *et al.* (2007) ‘Molecular characterization of two myoglobins of *Paragonimus westermani*’, *J. Parasitol.*, 93, pp. 97–103. <https://doi.org/10.1645/GE-846R3.1>
- De Vera, M. *et al.* (2009) Comparison of protein profile of co-existing *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* parasite in *Bos taurus* (cattle) and *Bubalus bubalis* (Philippine water buffalo)’, *J. Protozool. Res*, 19(1), pp. 1-9. https://doi.org/10.32268/jprotozoolres.19.1_1
- De Waal, T. and Mehmood, K. (2021) ‘Editorial: Trematode Infection in Ruminants’, *Front. Vet. Sci*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.719577>
- Dewilde, S. *et al.* (2008) ‘The hemoglobins of the trematodes *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum epiclitum*: A molecular biological, physico-chemical, kinetic, and

vaccination study’, *Protein Sci*, 17 (10), pp. 1653–1662.
<https://doi.org/10.1110/ps.036558.108>

Dezhabad, A. *et al.* (2023) ‘Secretory Excretory and Somatic Immunogenic Antigens Profiles of Adult *Fasciola spp*’, *Arch Razi Inst*, 78(1), pp. 435–443.
[10.22092/ARI.2022.359262.2393](https://doi.org/10.22092/ARI.2022.359262.2393)

Di Maggio, L. *et al.* (2016) ‘Across intra-mammalian stages of the liver fluke *Fasciola hepatica*: a proteomic study’, *Sci Rep*, 6(32796). <https://doi.org/10.1038/srep32796>

Dicker, A.J. *et al.* (2014) ‘Proteomic analysis of *Mecistocirrus digitatus* and *Haemonchus contortus* intestinal protein extracts and subsequent efficacy testing in a vaccine trial’, *PLoS Negl Trop Dis*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002909>

Dirksen, G., Gründer, H. y Stober, M. (2005) *Medicina interna y cirugía del bovino*. 4^a ed. Argentina: Intermedica.

Eduardo, S. (1983) ‘The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. III Revision of the genus *Calicophoron* Näsmark, 1937’, *Syst Parasitol*, 5, pp. 25–79.
<https://doi.org/10.1007/BF00010983>

El-Khabaz, K., Abdel-Hakeem, S. and Arfa, M. (2019) ‘Protozoan and helminthes parasites endorsed by imported camels (*Camel dromedaries*) to Egypt’, *J Parasit Dis*, 43(4), pp. 607–615. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01138-y>

Elsheikha, A. *et al.* (2011) *Essentials of Veterinary Parasitology*. Great Britain: Caister Academic Press. Available in:
https://books.google.com.ec/books?id=A_XDxqc56JQC&pg=PA86&dq=par+amphistomosis&hl=es&sa=X&ei=nxvRT6AMoPq8wSvqJ1Q&redir_esc=y#%20v=onepage&q=paramphistomosis

Elsokkary, D., Heikal, F. and Otify, Y. (2009) ‘Incidence of rumen fluke in Beheria province, Egypt’, *Alex.J. Vet. Sci.*, 28 (1), 117–124. Available in:
<http://nile.enal.sci.eg/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=45938>

- Espino, A.M. *et al.* (1987) 'Immuno-diagnosis of human fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay using excretory secretory products', *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 37(3), pp. 605–608. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.37.605>
- Espinoza, M.A. *et al.* (2024) 'Prevalence of gastrointestinal parasites in pre-slaughter cattle in the municipality of Quevedo, Ecuador', *Rev. Med. Vet. Zoot.*, 71(3). <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v71n3.116553>
- Farjallah, S. *et al.* (2009) 'Genetic characterization of *Fasciola hepatica* from Tunisia and Algeria based on mitochondrial and nuclear DNA sequences', *Parasitol Res*, 105(6), pp. 1617–1621. [10.1007/s00436-009-1601-z](https://doi.org/10.1007/s00436-009-1601-z)
- Fenemore, C., Floyd, T. and Mitchell, S. (2021) 'Rumen Fluke in Great Britain', *Journal of Comparative Pathology*, 184, pp. 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2021.01.012>.
- Figueroa, O. and Espino, A. (2014) '*Fasciola hepatica* fatty acid binding protein induces the alternative activation of human macrophages', *Infect. Immun.*, 82 (12), pp. 5005-5012. <https://doi.org/10.1128/iai.02541-14>
- Fu, Y. *et al.* (2023) 'Identification and prevalence of fluke infection in yak and Tibetan sheep around Qinghai Lake, China', *Parasitol Res*, 122, pp. 1709–1714. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07877-5>
- Fuertes, M., *et al.* (2015) 'Pathological changes in cattle naturally infected by *Calicophoron daubneyi* adult flukes', *Vet Parasitol*, 209(3–4), pp. 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.034>
- Ghatani, S. and VeenaTandon (2024) 'Amphistomes' in: Toledo, R., Fried, B. (eds), *Digenetic Trematodes*, 3^a ed., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1154. New York: Springer, Cham, pp. 323–347. https://doi.org/10.1007/978-3-031-60121-7_9
- Haque, M., Mohan, C., and Ahmad, I. (2011) 'Natural trematode infection in liver of water buffalo (*Bubalus bubalis*): histopathological investigation', *J Parasit Dis*, 35(1), pp. 50–53. [10.1007/s12639-011-0022-y](https://doi.org/10.1007/s12639-011-0022-y)

- Harizt, A.M. *et al.* (2021) ‘Gastrointestinal parasitic infections of buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Sarawak Borneo: Prevalence, risk factors, and farming practices’, *Trop Biomed*, 38(3), pp. 318–326. <https://doi.org/10.47665/tb.38.3.072>
- Hernández, J. *et al.* (2023) ‘Prevalence of flukes (*Fasciola hepatica* and paramphistomids) in cattle in south-eastern Mexico’, *Helminthologia*, 60, pp. 141–151. <https://doi.org/10.2478/helm-2023-0017>
- Hillyer, G. (2005) ‘Fasciola antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis’, *J Helminthol*, 79 (3), pp. 241–247. <https://doi.org/10.1079/JOH2005304>
- Hong, Y. *et al.* (2011) ‘Proteomic Analysis of Schistosoma japonicum Schistosomulum Proteins that are Differentially Expressed Among Hosts Differing in Their Susceptibility to the Infection’, *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(8). <https://doi.org/10.1074/MCP.M110.006098>.
- Horak, I. (1971) ‘Paramphistomiasis of domestic ruminants’, *Adv Parasitol*, 9, pp. 33–72. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60159-1](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60159-1)
- Hotessa, A. and Kanko, D. (2020) ‘Review on Paramphistomosis’, *Adv Biol Res*, 14, pp. 184–192. <https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2020.184.192>
- Howell, A. and Williams, D. (2020) ‘The Epidemiology and Control of Liver Flukes in Cattle and Sheep’, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 36(1), 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.002>
- Hoyle, R.C. *et al.* (2022) ‘A survey of sheep and/or cattle farmers in the UK shows confusion over the diagnosis and control of rumen fluke and liver fluke’, *Veterinary Parasitology*, 312, p. 109812. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2022.109812>.
- Huson, K., Oliver, N. and Robinson, M. (2017) ‘Paramphistomosis of Ruminants: An Emerging Parasitic Disease in Europe’, *Trends in Parasitology*, 33(11), pp. 836–844. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.07.002>
- Huson, K.M. *et al.* (2018a) ‘Optimized conditions for the in vitro excystment of *Calicophoron daubneyi* metacercariae’, *Parasitology*, 145(8), pp. 1015–1019. [10.1017/S0031182017002220](https://doi.org/10.1017/S0031182017002220)

- Huson, K.M. *et al.* (2018b) ‘Polyomic tools for an emerging livestock parasite, the rumen fluke *Calicophoron daubneyi*; identifying shifts in rumen functionality’, *Parasit Vectors*, 11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3225-6>
- Huson, K.M. *et al.* (2021) ‘Transcriptome and Secretome Analysis of Intra-Mammalian Life-Stages of *Calicophoron daubneyi* Reveals Adaptation to a Unique Host Environment’, *Molecular & Cellular Proteomics*, 20. <https://doi.org/10.1074/MCP.RA120.002175>.
- Hussain, K. (2013) *Immunological and molecular characterization of common amphistomes infecting ruminants*, Master's Thesis, Indian Veterinary Research Institute (Deemed University). Available in: <https://krishikosh.egranth.ac.in/assets/pdfjs/web/viewer.html?file=https%3A%2F%2Fkrishikosh.egranth.ac.in%2Fserver%2Fapi%2Fcore%2Fbitstreams%2F4736bbe5-5150-4bea-be0a-e894a04dbad2%2Fcontent>
- Iglesias-Piñeiro, J. *et al.* (2016) ‘Transmission of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in Galicia (Spain): Temporal follow-up in the intermediate and definitive hosts’, *Parasit Vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1892-8>
- Ikeuchi, A. *et al.* (2022) ‘Morphological and molecular characterization of *Calicophoron raja* (Näsmark, 1937) collected from wild Bovidae in South Africa’, *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 19, pp. 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.08.003>
- Jadav, M. *et al.* (2018) ‘Immunodiagnostic potency of homologous antigens for natural *Paramphistomum epiclitum* infection in small ruminants in plate and paper enzyme linked immunosorbent assay’, *Indian J Anim Res*, 52(1), pp. 83–91. [10.18805/ijar.v0i0F.7890](https://doi.org/10.18805/ijar.v0i0F.7890)
- Jaiswal, A.K. *et al.* (2018) ‘Diagnostic potential of low molecular weight excretory secretory proteins of *Paramphistomum epiclitum* for caprine amphistomosis’, *Veterinary Parasitology*, 257, pp. 5–9. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2018.05.009>.
- Javare, A. (2017) ‘Immunodiagnosis of *Haemonchus contortus* infection in sheep by counter immuno-electrophoresis using somatic antigen’, *J Parasit Dis*, 41(2), pp. 352–355. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0801-6>

- Johnston, M.J., MacDonald, J.A. and McKay, D.M. (2009) 'Parasitic helminths: a pharmacopeia of anti-inflammatory molecules', *Parasitology*, 136(2), pp. 125–147. <https://doi.org/10.1017/S0031182008005210>
- Jones, R. *et al.* (2017) 'Rumen fluke (*Calicophoron daubneyi*) on Welsh farms: prevalence, risk factors and observations on co-infection with *Fasciola hepatica*', *Parasitology*, 144(2), 237–247. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001797>
- Jyoti, Prasad, A., and Singh, N.K (2014) 'Evaluation of Antibody Response to Various Developmental Stage Specific Somatic Antigens of *Paramphistomum epiclitum* in Goats', *Biomed Res Int.* <https://doi.org/10.1155/2014/505484>.
- Kavanagh, K. *et al.* (2008) 'The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes', *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, pp. 3895–3906. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8588-y>
- Kayamba, F. *et al.* (2021) 'Lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase: Potential antiparasitic targets for drug development studies', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 50. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2021.116458>.
- Kilani, M. *et al.* (2003) 'Helminthoses digestives' in: Lefèvre PC, Blancou J, Chermette R (eds), *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et Régions chaudes*. Paris: Lavoisier, pp. 1400–1410. https://www.persee.fr/doc/bavf_0001-4192_2005_num_158_1_7500_t12_0077_0000_1
- Kumar, V. (1980) 'The digenetic trematodes, *Fasciolopsis buski*, *Gastrodiscoides hominis* and *Artyfechinostomum malayanum*, as zoonotic infections in South Asian countries', *Ann Soc Belg Med Trop*, 60(4), pp. 331–339. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7016049/>
- LaCourse, J. *et al.* (2012) 'The Sigma Class Glutathione Transferase from the Liver Fluke *Fasciola hepatica*', *PLoS Negl Trop Dis*, 6(5) <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001666>
- Laidemitt, M.R. *et al.* (2017) 'Loads of trematodes: discovering hidden diversity of paramphistomoids in Kenyan ruminants', *Parasitology*, 144(2), 131–147. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001827>

León, Y. *et al.* (2020) ‘Determinación de la paramfistomosis en bovinos de sacrificio en la provincia Camagüey’, *Rev. Prod. Anim*, 32(2), pp. 36–48. Disponible en: <https://revistas.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e3475>

Li, XR. (2011) *Color atlas of animal parasitosis*, 2^a ed. Beijing: Agriculture Press.

Lopes, A.S., López-Hernández, D. and Pinto, H.A. (2024) ‘Morphological and molecular data confirm the occurrence of *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Paramphistomidae) in ruminants from Southern Brazil’, *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 52. <https://doi.org/10.1016/J.VPRSR.2024.101050>.

López, J. y Velásquez, L. (2012) ‘*Cotylophoron panamensis* (digenea: paramphistomidae) en bovinos del Meta y del Guaviare, Colombia’, *Acta Biológica Colombiana*, 17 (2), 421–430. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319028028015.pdf>

Magdeldin, S. *et al.* (2014) ‘Basics and recent advances of two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis’, *Clin Proteom*, 11(16). <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-16>

Manrique, A. *et al.* (2013) Molecular identification of Paramphistomes from cattle in Cajamarca, Peru. 24 th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Perth, Australia. Available in: https://www.researchgate.net/publication/256636709_Molecular_identification_of_Paramphistomes_from_cattle_in_Cajamarca_Peru

Martínez de Bartolomé, S. (2013) Métodos de validación de identificaciones a gran escala de proteínas y desarrollo e implementación de estándares en proteómica, Tesis de Posgrado, Universidad Autónoma de Madrid. Disponible en: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/660124/martinezdebartolome_izquierdo_salvador.pdf?sequence=4&isAllowed=y

Martínez-Ibeas A.M. *et al.* (2016) ‘Rumen fluke in Irish sheep: prevalence, risk factors and molecular identification of two paramphistome species’, *BMC Vet Res*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0770-0>

- Martínez-Ibeas, A., González, C. y Manga, M. (2013) ‘Proteomic analysis of the tegument and excretory–secretory products of *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) adult worms’, *Experimental Parasitology*, 133(4), pp. 411–420. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2013.01.010>.
- Matsumoto, H., Haniu, H. y Komori, N. (2019) ‘Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE’, in: Kurien, B., Scofield, R. (eds) *Electrophoretic Separation of Proteins. Methods in Molecular Biology*, 1855. New York: Humana Press, pp. 101–105. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_10
- Mattison, R.G. *et al.* (1994) ‘Preliminary studies in numerical systematics of the Paramphistomoidea (Digenea) from domestic Artiodactyla of Northern India’, *Syst Parasitol*, 27, pp. 81–103. <https://doi.org/10.1007/BF00012268>
- Megersa, B., Hussein, B. and Shemsu, J. (2024) ‘Trematode infection in ruminants and diversity of snail hosts across three agro-ecological zones in Ethiopia’, *BMC Vet Res*, 20(197). <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04049-0>
- Meshgi, B., Eslami, A. and Halajian, A. (2009) ‘Determination of diagnostic antigens in cattle Amphistomiasis using Western blotting’, *Iran. J. Parasitol.*, 4(2), pp. 32–37. Available in: <https://ijpa.tums.ac.ir/index.php/ijpa/article/view/95>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (2024a) ‘Leche y derivados’, *Commodities*. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/6797543/5316298-commodities-leche-y-derivados-n-02-2024.pdf?v=1724099146>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (2024b) ‘Anuario Estadístico Producción Ganadera y Avícola 2023’. Disponible en: https://siea.midagri.gob.pe/portal/phocadownload/datos_estadisticas/anuarios/pecuaria/pecuaria_2023.pdf
- Morales, M.Á.G. and Ludovisi, A. (2021) ‘Immunodiagnosis’, *Trichinella* and *Trichinellosis*, pp. 369–393. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821209-7.00011-1>.
- Morariu, S. *et al.* (2023) ‘Molecular Identification of *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) and *Paramphistomum leydeni* (Nasmark, 1937) in Wild Ruminants from Romania’, *Vet Sci*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/vetsci10100603>

- Morchón, R. *et al.* (2014) ‘Proteomic analysis of the somatic and surface compartments from *Dirofilaria immitis* adult worms’, *Veterinary Parasitology*, 203(1–2), pp. 144–152. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2014.02.005>
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2021) *Lehninger principles of biochemistry*. 8th ed. New York: W.H. Freeman.
- Nordberg, J. and Arner, E. (2001) ‘Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system’, *Free Radical Bio Med*, 31(11), pp. 1287–1312. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9)
- Nyagura, I., Malatji, M. and Mukaratirwa, S. (2024) ‘The prevalence and infection rates of amphistome species in intermediate snail hosts: a systematic review and meta-analysis’, *Front. Vet. Sci*, 11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1418979>
- Nzalawahe, J. *et al.* (2015) ‘Associations between trematode infections in cattle and freshwater snails in highland and lowland areas of Iringa Rural District, Tanzania’, *Parasitology*, 142(11), pp. 1430–1439. <https://doi.org/10.1017/S0031182015000827>
- O’Shaughnessy, J. *et al.* (2018) ‘Epidemiological investigation of a severe rumen fluke outbreak on an Irish dairy farm’, *Parasitology*, 145, pp. 948–952. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002086>
- Padak, Y. and Karakuş, A. (2021) ‘Molecular identification of paramphistomidae obtained from ruminants in van province’, *Ankara Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 68(3), pp. 223–228. <https://doi.org/10.33988/auvfd.727842>.
- Pardo, E. y Buitrago, M. (2005) *Parasitología Veterinaria I*. Managua: Universidad Nacional Agraria. Facultad de Ciencia Animal. Disponible en: <https://repositorio.una.edu.ni/2426/1/nl70p226p.pdf>
- Perally, S. *et al.* (2008) ‘Heme transport and detoxification in nematodes: subproteomics evidence of differential role of glutathione transferases’, *J Proteome Res*, 7, pp. 4557–4565. [10.1021/pr800395x](https://doi.org/10.1021/pr800395x)

- Perez-Casal, J. and Potter, A.A. (2016) ‘Glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase as a suitable vaccine candidate for protection against bacterial and parasitic diseases’, *Vaccine*, 34(8), pp. 1012–1017. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2015.11.072>.
- Pfukenyi, D. and Mukaratirwa, S (2018) ‘Amphistome infections in domestic and wild ruminants in East and Southern Africa: A review’, *Onderstepoort J Vet Res*, 85(1), pp. 1–13. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v85i1.1584>
- Pinedo, R. *et al.* (2010) ‘Prevalencia de tremátodes de la familia paramphistomatidae en bovinos del distrito de Yurimaguas, provincia de Alto Amazonas, Loreto’, *Rev Inv Vet Perú*, 21 (2), pp. 161–167. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172010000200003#:~:text=La%20prevalencia%20de%20trem%C3%A1todes%20de,Yurimaguas%2C%20provincia%20de%20Alto%20Amazonas.
- Pinilla, J. *et al.* (2018) ‘Prevalencia del parasitismo gastrointestinal en bovinos del departamento Cesar, Colombia’. *Rev. investig. vet. Perú*, 29(1), pp. 278–287. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14202>
- Postal, J.M. (1984) Les paramphistomoses gastro duodenales des ruminants. Contribution à l'étude de leur épidémiologie: Cas du foyer vendéen, These Méd. Vét., École Nationale Veterinaire D'Alfort.
- Prasopdee, S. *et al.* (2019) ‘A comprehensive review of omics and host-parasite interplays studies, towards control of *Opisthorchis viverrini* infection for prevention of cholangiocarcinoma’, *Acta Tropica*, 196, pp. 76–82. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2019.05.011>.
- Pulido, M. *et al.* (2022) ‘Diagnosis of gastrointestinal parasites in bovines of the department of Boyacá, Colombia’, *Revista Científica*, 44 (2), pp. 272–281. <https://doi.org/10.14483/23448350.18500>
- Qian, K. and Chandramouli, K. (2009) ‘Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity’, *Hum Genomics Proteomics*. <https://doi.org/10.4061/2009/239204>

Quiroz, H. (2005) *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos*. México: Editorial Limusa S.A.

Qureshi, A.W., Javed, B. and Khan, L. (2021) ‘Analysis of internal transcribed spacer1 (ITS1) region of rDNA for genetic characterization of *Paramphistomum* sp.’, *Saudi J Biol Sci*, 28(10), pp. 5617-5620. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.079>

Radio S. *et al.* (2018) ‘Pleiotropic alterations in gene expression in Latin American *Fasciola hepatica* with different susceptibility to drugs’, *Parasit. Vectors*, 11(1). [10.1186/s13071-017-2553-2](https://doi.org/10.1186/s13071-017-2553-2)

Radostits, O., *et al.* (2002) *Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. 9ª ed. España: Editorial Mc Graw- Hill Interamericana.

Rafiq, N. *et al.* (2022) ‘Changes in the Prevalence of Natural *Paramphistomum* Cercariae Infection in *Indoplanorbis* and *Lymnaea* Intermediate Hosts Influenced by Meteorological Factors’, *J Trop Med*. <https://doi.org/10.1155/2022/8719834>

Rehman, A. *et al.* (2020) ‘Glutathione-S-transferase: an important diagnostic antigen of liver amphistome *Gigantocotyle explanatum*, infecting the Indian water buffalo’, *Acta tropica*, 205. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105400>

Ren, M. *et al.* (2014) ‘Molecular characterization of *Clonorchis sinensis* secretory myoglobin: delineating its role in anti-oxidative survival’, *Parasit Vectors*, 7(250). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-250>

Rieu, E. *et al.* (2007) ‘Reliability of coprological diagnosis of *Paramphistomum* sp. infection in cows’, *Vet Parasitol*, 146(3-4), pp. 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.033>

Ríos, E., Mejía, H. y Álvarez, S. (2009) ‘Marcadores moleculares: una revolución en la zoología’, *Ciencia*. Disponible en: https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/60_3/PDF/01-496-Marcadores-moleculares.pdf

- Rizwan, H.M., *et al.* (2022) 'Prevalence of Ruminant Paramphistomosis and Comparative Histopathology of the Infected Ruminants in Narowal District, Punjab, Pakistan', *Helminthologia*, 59(4), pp. 377–384. <https://doi.org/10.2478/helm-2022-0041>
- Roberts, L. and Janovy, J. (2009) *Foundations of Parasitology*. 8th ed. New York: McGraw-Hill.
- Rojas, K. *et al.* (2015) 'Presencia de *Cotylophoron* sp. en Bovinos de la Provincia de Moyobamba, Perú', *Rev Inv Vet Perú*, 26(3), pp. 519-524. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11179>.
- Rubab, A. *et al.* (2022) 'Serological diagnostic potential of the 38-72 kDa somatic antigen of *Gastrothylax crumenifer* in buffalos using the Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay', *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 73(2), pp. 4105–4112. <https://doi.org/10.12681/jhvms.26565>
- Sah, R., Acosta, L. and Toledo, R. (2019) 'A case report of human gastrodiscoidiasis in Nepal', *Parasitol Int*, 71, pp. 56–58. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.03.014>
- Sahoo, S. *et al.* (2013) 'Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the parasitic nematode *Haemonchus contortus* binds to complement C3 and inhibits its activity', *Parasite Immunol*, 35(12), pp. 457–467. <https://doi.org/10.1111/pim.12058>
- Sakthivel, D. *et al.* (2018) 'Proteomic identification of galectin-11 and 14 ligands from *Haemonchus contortus*', *PeerJ*, (6). <https://doi.org/10.7717/peerj.4510>
- Salib, F. *et al.* (2015) 'Evaluation of Indirect ELISA and Western Blotting for the Diagnosis of Amphistomes Infection in Cattle and Buffaloes', *International Journal of Livestock Research*, 5(3). [10.5455/ijlr.20150303070028](https://doi.org/10.5455/ijlr.20150303070028)
- Sanabria, R., Moré, G. and Romero, J. (2011) 'Molecular characterization of the ITS-2 fragment of *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Paramphistomidae)', *Veterinary Parasitology*, 177(1–2), pp. 182–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.023>.
- Sánchez, L. *et al.* (2024) 'Sigma-Class Glutathione Transferases (GST σ): A New Target with Potential for Helminth Control', *Trop. Med. Infect. Dis.*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9040085>

- Sánchez, N. *et al.* (2009) 'Presencia de *Cotylophoron cotylophorum* (Trematoda, Taramphistomidae) en bovinos de Loreto, Perú', *Rev. peru. biol.*, 16(1), pp. 141–142. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v16n1/a21v16n1.pdf>
- Sanchís, J. *et al.* (2012) 'Infection by Paramphistomidae trematodes in cattle from two agricultural regions in NW Uruguay and NW Spain', *Vet. Parasitol.*, 191(1–2), pp. 71–165. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.028>
- Sanna, G. *et al.* (2016) '*Calicophoron daubneyi* in sheep and cattle of Sardinia, Italy', *Helminthologia*, 53(1), 87–93. [10.1515/helmin-2015-0069](https://doi.org/10.1515/helmin-2015-0069)
- Santilli, R. *et al.* (2021) 'The Penn State Protein Ladder system for inexpensive protein molecular weight markers', *Sci Rep*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96051-x>
- Saredi, N. (2006). *Manual práctico de parasitología médica*. 2ª ed. Buenos Aires: Laboratorios Andrómaco. Disponible en: https://www.andromaco.com/Portals/0/publicaciones/Libro_parasitologiaII_Compaginado.pdf
- Schoch, C.L., *et al.* (2020) 'NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools', *Database (Oxford)*. PubMed: [32761142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32761142/). Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=27852>
- Shafi, J. *et al.* (2016) 'Protein Profiling of Whole Worm Extract of *Paramphistomum cervi* Isolated from Local Cattle Breeds of Kashmir Using SDS-PAGE', *J Agric & Environ Sci*, 16(7), pp.1327–1330. [10.5829/idosi.aejaes.2016.16.7.12945](https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2016.16.7.12945)
- Shafi, J. *et al.* (2017) 'Comparative Analysis of Somatic Protein Profiles of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and *Dicrocoelium dendriticum* (Three Liver Flukes in Sheep) Using SDS-PAGE', *Global Veterinaria*, 18 (4), pp. 315–321. [10.5829/idosi.gv.2017.315.321](https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2017.315.321)
- Sharma, S. *et al.* (2024) 'An Inclusive Approach to Design a Multi-Epitope Chimeric Vaccine for Taenia Infections by Integrating Proteomics and Reverse Vaccinology', *Front. Trop. Dis.*, 5. <https://doi.org/10.3389/fitd.2024.1393570>

Sim, S., Park, G. and Yong, T. (2003) 'Cloning and characterization of Clonorchis sinensis myoglobin using immune sera against excretory–secretory antigens', *Parasitol Research*, 91(4), 338–343. doi:10.1007/s00436-003-0869-7

Sindičić, M, *et al.* (2017) 'Molecular identification of the rumen flukes *Paramphistomum leydeni* and *Paramphistomum cervi* in a concurrent infection of the red deer *Cervus elaphus*', *J Helminthol*, 91(5), pp. 637–641. <https://doi.org/10.1017/S0022149X16000699>

Sirisriro, A. *et al.* (2002) 'Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant fatty acid binding protein of *Fasciola gigantica*', *Veterinary parasitology*, 105(2), pp. 119-129. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00007-9)

Sivajothi, S. and Sudhakara, B. (2014) 'Immature paramphistomosis in a sheep herd', *Int. J. Biol. Res.*, 2(2), pp. 140–142. <https://doi.org/10.14419/ijbr.v2i2.3398>

Soulsby, E.J.L. (1993) *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7^a ed. México: Interamerica.

Sripa J., Laha, T. and Sripa, B. (2017) 'Characterization and functional analysis of fatty acid binding protein from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*', *Parasitol Int*, 66(4), pp. 419–425. [10.1016/j.parint.2016.04.009](https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.04.009)

Stutzer, C. *et al.* (2018) 'Metazoan Parasite Vaccines: Present Status and Future Prospects', *Front Cell Infect Microbiol*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00067>

Suna, G. and Mayr, M. (2018) 'Proteomics', *Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine*, pp. 166-180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809657-4.99573-5>.

Tang, Cl. *et al.* (2019) 'Anti-CTLA-4 monoclonal antibody improves efficacy of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein vaccine against *Schistosoma japonicum* in mice'. *Parasitol Res*, 118, 2287–2293. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06363-1>

Tehrani, A. *et al.* (2015) 'Prevalence and pathological study of *Paramphistomum* infection in the small intestine of slaughtered ovine', *J Parasit Dis*, 39(1), pp. 100–106. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0287-4>

Teschner, V. *et al.* (2025) 'Impact of the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* on milk production parameters, β -hydroxybutyrate, fertility and feces consistency in southern German dairy cows', *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 58. <https://doi.org/10.1016/J.VPRSR.2025.101200>.

Timanova-Atanasova, A. *et al.* (2004) 'A native 13-kDa fatty acid binding protein from the liver fluke *Fasciola hepatica*', *Biochim Biophys Acta*, 1674 (2), pp. 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.06.018>

Torrel, S. *et al.* (2023) 'Trematodos del ganado vacuno lechero al pastoreo en Cajamarca, Perú: *Fasciola hepatica* y *Calicophoron microbothrioides*', *Rev Inv Vet*, 34(4). <https://doi.org/10.15381/rivep.v34i4.24296>

Torrel, T. y Paz, A. (2015) *Paramphistomosis en Bovinos y Ovinos en Cajamarca*. Cajamarca: Martínez Compañón Editores.

Torrel-Pajares, T.S. *et al.* (2022) 'Occurrence of paramphistomosis (Trematoda: Digenea) in sheep in northern Peru', *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, 34. <https://doi.org/10.1016/J.VPRSR.2022.100763>.

Torres, A. and Landa, A. (2008) 'Glutación transferasas de parásitos: una perspectiva bioquímica', *Acta Trop*, 105(2), pp. 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.08.005>

Totomoch, A., Brito, C. y Manterola, C. (2021) 'La proteómica como herramienta en el desarrollo de una vacuna contra la toxocariasis', *Rev. chil. infectol*, 38 (5), pp. 727-728. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182021000500727>

Trejo, C.L. (2000) *Importancia de la Paramphistomiasis en México*, Departamento de *Helmintología*, Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, pp. 1–7.

UniProt (2025a) 'UniProtKB entry A0A2H1BWY6_FASHE'. Available in: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A2H1BWY6/entry#sequences>

UniProt (2025b) 'UniProtKB entry A0AAV2TUZ4_CALDB'. Available in: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0AAV2TUZ4/entry#sequences>

UniProt (2025c) ‘UniProtKB entry A0AAV2TT92_CALDB. Available in: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0AAV2TT92/entry#sequences>

UniProt (2025d) ‘UniProtKB entry A0AAV2TGP2_CALDB. Available in: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0AAV2TGP2/entry#sequences>

UniProt (2025e) ‘UniProtKB entry A0AAV2TFR5_CALDB. Available in: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0AAV2TFR5/entry#sequences>

Urbina-Andueza, A. *et al.* (2025) ‘Prevalence and control of *Cotylophoron* spp.: An emerging parasitic infection among dairy cattle herds established in rural areas of the tropical Andes, Merida, Venezuela’, *Revista Científica de la Facultad de Veterinaria*, 35(1), pp. 1–11. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e35514>.

Urquhart, G. *et al.* (2001) *Parasitología Veterinaria*. 2^a ed. Zaragoza: Acribia.

Van der Ree, A. and Mutapi, F. (2015) ‘The helminth parasite proteome at the host–parasite interface—Informing diagnosis and control’, *Experimental parasitology*, 157, pp. 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.06.007>

Vijayashanthi, R. *et al.* (2020) ‘Isolation and immunoblotting of somatic antigens of *Cotylophoron cotylophorum* and *Gastrothylax crumenifer*’, *Indian Journal of Animal Sciences*, 90(1), pp. 35–37. <https://doi.org/10.56093/ijans.v90i1.98173>.

Walker, J. (2002) ‘The Protein Protocols Handbook’, 2^a ed. Totowa, NJ: Humana Press. Available in: https://www.researchgate.net/profile/Robert-Akins/publication/14678357_The_Protein_Protocols_Handbook/links/0fcfd50eafc84294e7000000/The-Protein-Protocols-Handbook.pdf

Walker, J. (2009) ‘The Protein Protocols Handbook’, 3^a ed. New York: Springer-Verlag New York, LLC.

Wang, J. *et al.* (2013) ‘Identification of proteins inducing short-lived antibody responses from excreted/secretory products of *Schistosoma japonicum* adult worms by immunoproteomic analysis’, *Journal of Proteomics*, 87, pp. 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.003>

Wang, T. *et al.* (2019) ‘Somatic proteome of *Haemonchus contortus*’, *Int J Parasitol*, 49(3–4), pp. 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.12.003>

Watakulsin, K. *et al.* (2023) ‘Distinct antibody response in susceptible and non-susceptible hosts of the carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* infection’, *Parasitology*, 150 (8), pp.653–660. <https://doi.org/10.1017/S0031182023000112>

Wenzel, C. *et al.* (2019) ‘Paramphistomidosis - an overview on epidemiology and clinical signs’. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 47(3), pp. 184–191. [10.1055/a-0880-6381](https://doi.org/10.1055/a-0880-6381)

Wilkins, M.R., *et al.* (1996) ‘Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It’, *Biotechnol Genet Eng Rev*, 13, pp. 19–50. [10.1080/02648725.1996.10647923](https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923)

Zainab, T. *et al.* (2023) ‘Assessment of antioxidant enzymes during the development of the digenetic trematode parasite *Gastrothylax crumenifer*, infecting the rumen of Indian water buffalo, *Bubalus bubalis*’, *Journal of Parasitic Diseases*, 47(2), pp. 271–279. <https://doi.org/10.1007/s12639-023-01564-z>

APÉNDICES

Apéndice 1. Recolección de paramphistomidos adultos del rumen y retículo de bovinos faenados en el Matadero Municipal de Cajamarca.



Apéndice 2. Paramphistomidos adultos lavados con PBS (pH 7,2).



Apéndice 3. Fichas de recolección de datos.

REGISTRO DE MUESTRAS DE PARAMPHISTOMIDOS	
Código de recolección:	
Hora y fecha de recolección:	

PERFIL ELECTROFORÉTICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA			
BANDAS DEL MARCADOR MOLECULAR		BANDAS PROTEICAS DE INTERÉS	
Pesos moleculares (kDa)	Distancia de migración (cm)	Nº de banda	Distancia de migración (cm)
260		1	
		2	
140		3	
		4	
100		5	
		6	
70		7	
		8	
50		9	
		10	
40		11	
		12	
35		13	
		14	
25		15	
		16	
15		17	
		18	
10		19	
		20	
		21	

Apéndice 4. Extracción de proteínas somáticas de paramphistomidos adultos.



Fragmentación de paramphistomidos con nitrógeno líquido a $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$



Extracción del contenido proteico somático con el reactivo BugBuster®

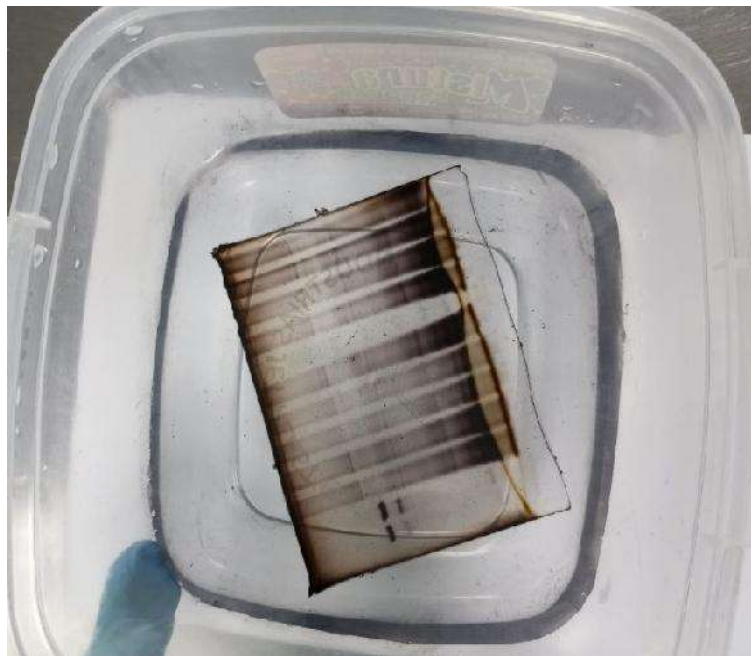
Apéndice 5. Cuantificación de las proteínas somáticas a través del método de Bradford en el espectrofotómetro (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific).



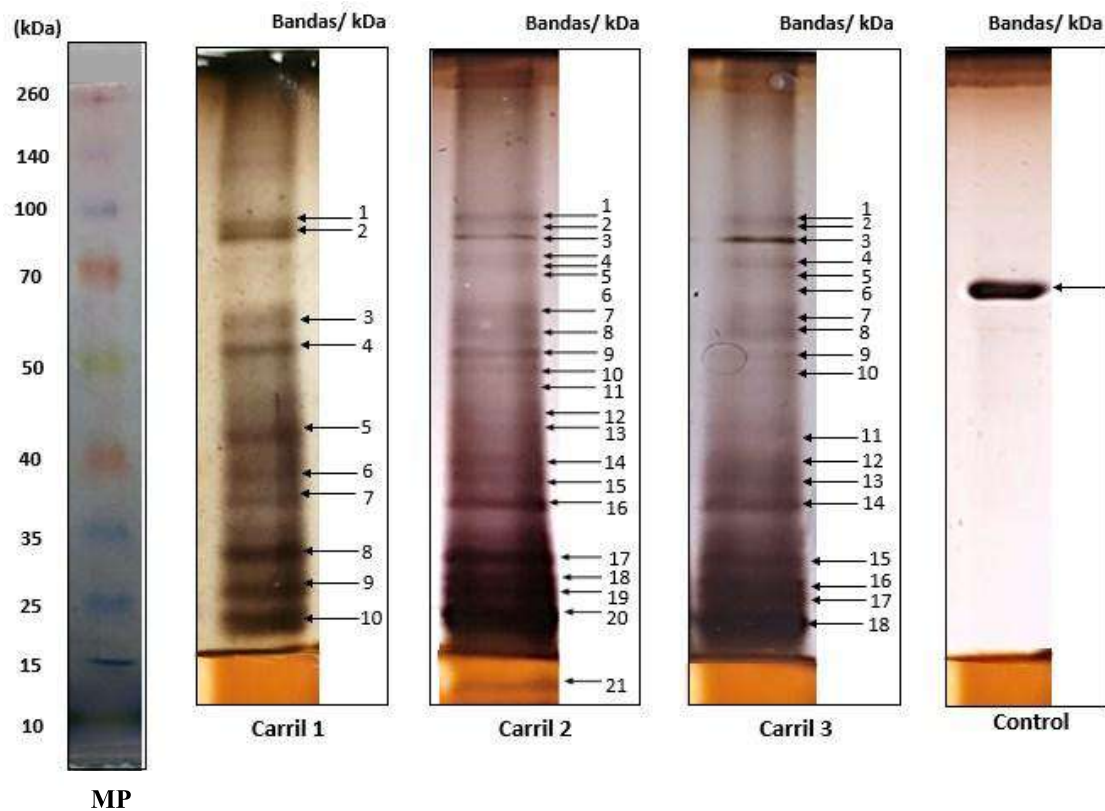
Apéndice 6. SDS-PAGE del extracto proteico somático de paramphistomidos adultos.



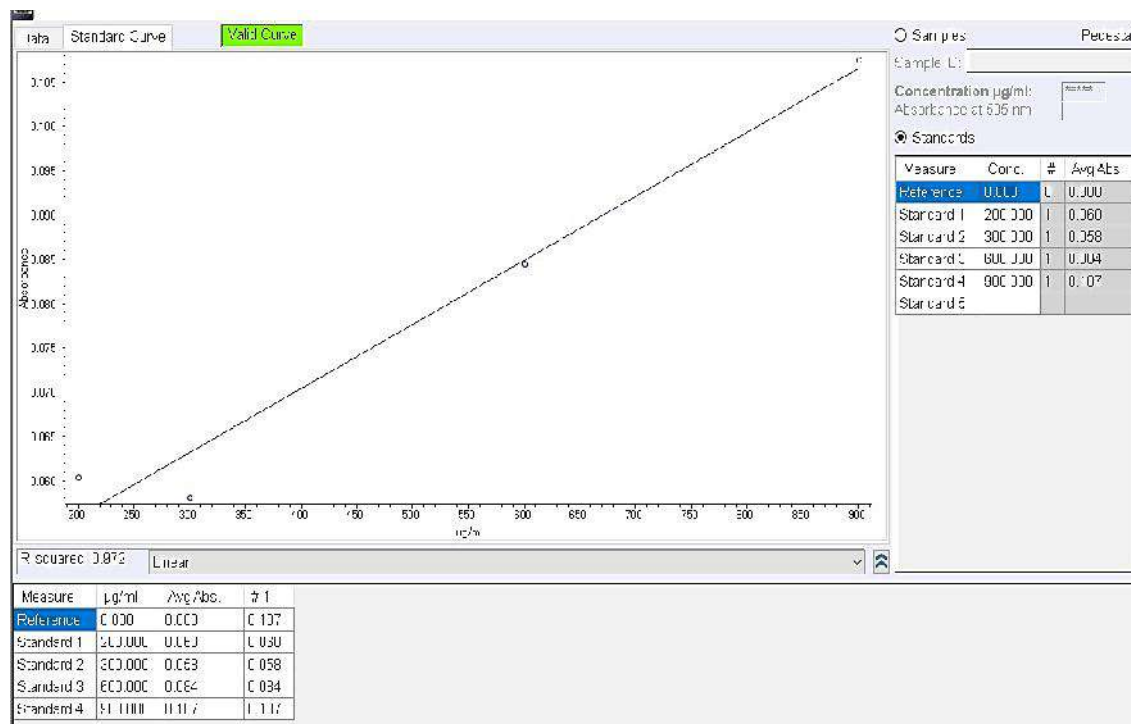
Apéndice 7. Revelado del gel por tinción con plata mediante el kit comercial Silver Stain Plus™ (Bio-Rad).



Apéndice 8. Perfil electroforético de proteínas obtenido mediante SDS-PAGE, a partir de extractos proteicos somáticos de 10, 20 y 30 paramphistomidos adultos. El carril 1 corresponde al extracto de 10 parásitos (10 bandas); el carril 2 al extracto de 20 parásitos (21 bandas); y el carril 3 al extracto de 30 parásitos (18 bandas). MP indica los estándares de peso molecular. El control corresponde a BSA (250 µg/mL), con un peso molecular aproximado de 66,5 kDa.



Apéndice 9. Curva estándar para la cuantificación espectrofotométrica de proteínas del extracto crudo somático de parásitos adultos de la familia Paramphistomidae, mediante el método de Bradford.

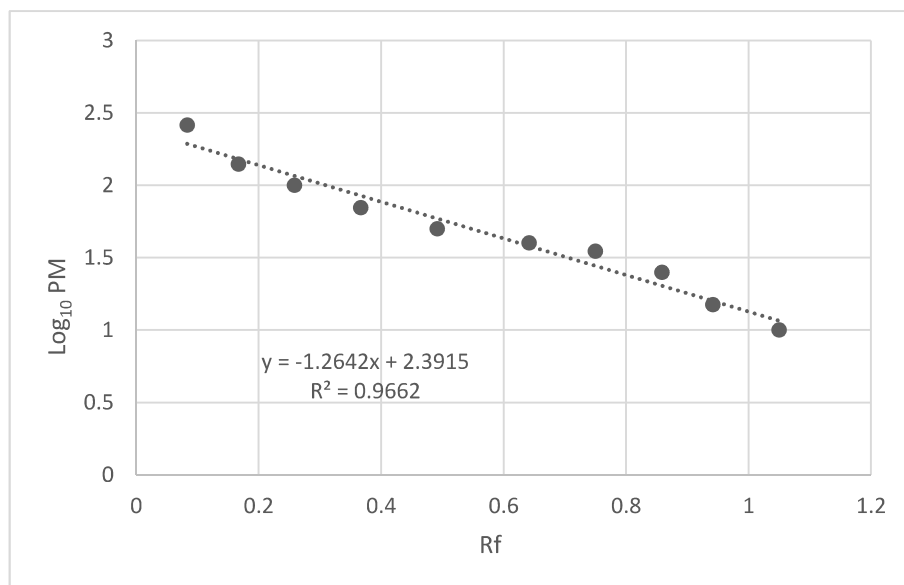


Apéndice 10. Cuantificación proteica por espectrofotometría del extracto somático de parásitos adultos de la familia Paramphistomidae, mediante el método de Bradford.

MUESTRA	FECHA	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	UNIDAD
Extracto somático de 10 paramphistomidos	14/10/2024	500	µg/mL
Extracto somático de 20 paramphistomidos	14/10/2024	Promedio: 726,5	µg/mL
Extracto somático de 30 paramphistomidos	14/10/2024	1979,5	µg/mL

Apéndice 11. Movilidad relativa (R_f) del marcador molecular y ecuación de regresión lineal obtenida.

		MARCADOR MOLECULAR			
		PM (kDa)	Distancia de migración (cm)	Log ₁₀ PM (Eje Y)	R_f (Eje X)
Frente del colorante	Distancia de migración 6 cm	260	0,5	2,414973348	0,083333333
		140	1	2,146128036	0,166666667
		100	1,55	2	0,258333333
		70	2,2	1,84509804	0,366666667
		50	2,95	1,698970004	0,491666667
		40	3,85	1,602059991	0,641666667
		35	4,5	1,544068044	0,75
		25	5,15	1,397940009	0,858333333
		15	5,65	1,176091259	0,941666667
		10	6,3	1	1,05



Apéndice 12. Determinación del peso molecular estimado de las proteínas presentes en el extracto crudo somático de paramphistomidos adultos, a partir de las bandas obtenidas mediante SDS-PAGE.

BANDAS PROTEICAS					
N° de bandas	Distancia de migración (cm)	R_f	Interpolación de R_f en regresión lineal	Antilogaritmo en base 10 de valores interpolados	Peso molecular estimado (kDa)
1	1,50	0,25	2,07545	118,973435	119
2	1,60	0,266666667	2,05438	113,339163	113
3	1,75	0,291666667	2,022775	105,384078	105
4	1,85	0,308333333	2,001705	100,393362	100
5	1,95	0,325	1,980635	95,6389942	96
6	2,05	0,341666667	1,959565	91,1097804	91
7	2,40	0,4	1,88582	76,8811728	77
8	2,60	0,433333333	1,84368	69,7718117	70
9	2,80	0,466666667	1,80154	63,3198679	63
10	2,95	0,491666667	1,769935	58,8755531	59
11	3,05	0,508333333	1,748865	56,0873602	56
12	3,30	0,55	1,69619	49,6809624	50
13	3,45	0,575	1,664585	46,1939394	46
14	3,75	0,625	1,601375	39,9369597	40
15	3,85	0,641666667	1,580305	38,0456493	38
16	4,15	0,691666667	1,517095	32,8923574	33
17	4,60	0,766666667	1,42228	26,4411293	26
18	4,80	0,8	1,38014	23,9960634	24
19	4,90	0,816666667	1,35907	22,8596723	23
20	5,05	0,841666667	1,327465	21,2551904	21
21	5,80	0,966666667	1,16944	14,7720238	15

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo estandarizado del método de Bradford para cuantificación de proteínas (Bio-Rad Laboratories, 1994).

Se consideró el reactivo colorante concentrado para el ensayo de proteínas (Bio-Rad, #5000006), compuesto por colorante, ácido fosfórico y metanol. En condiciones ácidas, el colorante se encuentra predominantemente en su forma catiónica de color rojo ($A_{\max} = 470 \text{ nm}$). Al unirse a las proteínas, se transforma en una forma aniónica de color azul, con un máximo de absorbancia a 595 nm. Se aplicó el procedimiento estándar (200 a 1400 $\mu\text{g/mL}$):

1. Colocar el reactivo colorante concentrado a temperatura ambiente.
2. Preparar el reactivo colorante diluyendo 1 parte del reactivo con 4 partes de agua destilada (6 mL de reactivo + 24 mL de agua destilada), filtrar para eliminar las partículas. Este reactivo diluido se puede utilizar durante 2 semanas aproximadamente si se conserva a temperatura ambiente.
3. Preparar 3 a 5 diluciones de una proteína estándar (BSA, solución madre: 220 000 $\mu\text{g/mL}$). El rango lineal del ensayo para BSA es de 200 $\mu\text{g/mL}$ a 900 $\mu\text{g/mL}$.
4. Pipetear 100 μL de cada dilución en un tubo de ensayo limpio y seco, y agregar 5 mL de reactivo colorante diluido a cada tubo. Agitar suavemente.
5. Incubar a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos.
6. Cuantificar las diluciones en el NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific) para la obtención de la curva de calibración. Medir la absorbancia a 595 nm. Dado que la absorbancia incrementa con el tiempo, las muestras no deben incubarse a temperatura ambiente por más de 1 hora.

7. Adicionar 5 mL del reactivo colorante diluido en cada tubo de ensayo y agregar 100 μ L de cada muestra problema. Agitar suavemente.
8. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos (el color es estable en 1 hora).
9. Cuantificar las muestras problema en el NanoDrop™ 2000, midiendo la absorbancia a 595 nm frente al blanco.

Viales para diluciones	BSA (220 000 μ g/mL)	Agua destilada	Diluciones	Reactivo colorante diluido	Concentración (μ g/mL)
0 (blanco)	-	4 400 μ L	100 μ L	5 mL	0
1	4 μ L	4 396 μ L	100 μ L	5 mL	200
2	6 μ L	4 394 μ L	100 μ L	5 mL	300
3	12 μ L	4 388 μ L	100 μ L	5 mL	600
4	18 μ L	4 382 μ L	100 μ L	5 mL	900

Anexo 2. Soluciones según protocolo estandarizado para SDS-PAGE (Cabrera, Chávez y Ravines, 2020; Alonso *et al.*, 2020).

Solución de acrilamida stock (30%)	
Acrilamida	29,2 g
Bis-acrilamida	0,8 g
Agua destilada	100 mL
Disolver, filtrar y almacenar a 4 °C en oscuridad.	

Buffer Tris (1,5 M/ pH 8,8)	
Tris base	18,15 g
Agua destilada	50 mL
Disolver y ajustar el pH a 8,8 con HCl. Llevar a 100 mL con agua destilada.	

Buffer Tris (0,5 M/ pH 6,8)	
Tris base	3 g
Agua destilada	25 mL
Disolver y ajustar el pH a 6,8 con HCl. Llevar a 50 mL con agua destilada.	

SDS (10%)	
SDS	2 g
Agua bidestilada	20 mL
Disolver y ajustar el pH a 6,8 con HCl. Llevar a 50 mL con agua destilada.	

APS 10% (Preparar al momento de uso)	
APS	0,05 g
Agua destilada	500 µL

Gel de separación o de resolución 12,5%	Volumen
Solución de acrilamida stock	6,25 mL
Buffer Tris: 0,5M/pH 8,8	5,6 mL
Agua destilada	3,1 mL
SDS 10%	150 µL
APS 10%	100 µL
TEMED	40 µL

Gel de concentración 5%	Volumen
Solución de acrilamida stock	1,67 mL
Buffer Tris: 0,5M/ pH 6,8	1,25 mL
Agua destilada	7,03 mL
SDS 10%	100 μ L
APS 10%	150 μ L
TEMED	30 μ L

Buffer de corrida	
Tris base	3,03 g
Glicina	14,42 g
SDS	1 g
Agua destilada	1 L

Azul de bromofenol (0,1%)	
Azul de bromofenol	0,01 g
Agua destilada	10 mL
Diluir 0,139 g de DTT (ditiotretitol) en 600 μ L de la solución de azul de bromofenol. Alicuotar 100 μ L en tubos Eppendorf y almacenar a -20 °C.	

Coctel de muestra (Preparar antes del uso)	
Buffer Tris 0,5M/ pH 6,8	1,88 mL
Glicerol	3 mL
SDS (10 %)	6 mL
Agua destilada	2,2 mL

Buffer de carga	
Coctel de muestra	650 μ L
DTT/Azul de bromofenol	100 μ L
Almacenar en alícuotas de 500 μ L a -20 °C.	

Anexo 3. Protocolo para tinción de plata en geles de poliacrilamida utilizando el kit comercial Silver Stain Plus™ (Bio-Rad) (Bio-Rad Laboratories, 2016).

Preparación de reactivos para la tinción de 1 minigel:

Solución aceleradora de desarrollo	
Para un volumen de 50 mL	
Reactivo acelerador de desarrollo	2,5 g
Agua destilada en recipiente que contenga barra agitadora recubierta de PTFE	50 mL
Usar a temperatura ambiente, conservar a 4° C.	

Solución potenciadora de fijación		
Para un volumen de 200 mL		
Metanol	50 % v/v	100 mL
Ácido acético	10 % v/v	20 mL
Concentrado potenciador fijador	10 % v/v	20 mL
Agua destilada	30 % v/v	60 mL

Solución de tinción	
Para un volumen de 200 mL	
Preparar 5 minutos antes de su uso, en el orden indicado:	
Agua destilada en vaso precipitado con barra PTFE	35 mL
Solución de complejo de plata	5 mL
Solución moderadora de reducción	5 mL
Reactivo revelado de imágenes	5 mL
Inmediatamente antes de su uso, agregar 50 mL de la solución aceleradora de desarrollo a temperatura ambiente.	

Procedimiento de tinción:

1. Preparar la solución aceleradora de desarrollo. Utilizar a temperatura ambiente y conservar a 4° C (plazo de conservación: 3 meses).
2. Preparar la solución potenciadora de fijación.

3. Preparar una solución de ácido acético al 5% (10 mL de ácido acético + 190 mL de agua destilada).
4. **Fijación:** Después de la electroforesis, colocar los geles en la solución potenciadora de fijación. Con agitación suave, fijar los geles durante 20 minutos.
5. **Enjuague:** Decantar la solución potenciadora de fijación y enjuagar los geles con 200 mL de agua destilada durante 10 minutos bajo agitación suave. Decantar el agua y repetir el enjuague con otros 200 mL de agua destilada durante 10 minutos adicionales. Finalmente decantar nuevamente.
6. **Tinción y desarrollo:** Preparar la solución de tinción (antes de los 5 minutos de su uso). Justo antes de teñir el gel, añadir 50 mL de la solución aceleradora de desarrollo a temperatura ambiente, agitar bien y verter inmediatamente en el recipiente de tinción que contiene el gel. Teñir bajo agitación suave durante aproximadamente 15 minutos o hasta que sean visibles las bandas.
7. **Stop:** Una vez alcanzada la tinción deseada, colocar los geles en ácido acético al 5% para detener la reacción de tinción mínimo 15 minutos. Enjuagar los geles en agua destilada durante 5 minutos.