



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



Centro de Investigación en Biotecnología

**"Análisis proteómico-transcriptómico de carboxil-
esterasas del trematodo parásito zoonotico *Fasciola*
hepatica"**

**PROYECTO DE INVESTIGACION
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A:
IBT. Yaretzi Jaqueline Pedroza Gómez**

**Codirección de Tesis:
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Dr. Estefan Miranda Miranda**

CUERNAVACA, MORELOS

Noviembre, 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) antes Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), INIFAP por la facilitación del laboratorio de helmintología donde se llevó a cabo la fase experimental de este trabajo.

Le agradezco al Dr. Estefan Miranda Miranda por abrirme, de nueva cuenta, las puertas del laboratorio de helmintología para poder realizar la maestría. Gracias por confiar en mis capacidades, por motivarme a ser mejor profesionista y por darme la oportunidad de aprender de la mejor manera posible.

Agradezco también a SENASICA (Servicios Nacionales de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria) de la SAGARPA, por la facilitar el material biológico para poder iniciar este trabajo de investigación.

Mi agradecimiento al Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por haberme aceptado para realizar la maestría. Agradezco a la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente del Laboratorio de Biología Molecular de Hongos por haber aceptado ser mi tutora durante el posgrado, por haberme apoyado desde principio a fin, por contribuir a mi formación y llevarme a ser mejor profesionista

Le agradezco a mi comité tutorial, a la Dra. Raquel Cossío Bayúgar, a la Dra. Deyanira Pérez Morales y al Dr. José Augusto Ramírez Trujillo, por haber contribuido a mi formación y por apoyarme a mejorar como profesionista.

Le agradezco a Conacyt por la beca otorgada durante la realización de este proyecto.

Esta tesis fue financiada por el Conacyt proyecto PDCPN 2015-021.

Dedicatorias

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir” (Albert Einstein). Le agradezco a Dios por darme la paciencia y la sabiduría para concluir mi proyecto de maestría. Le agradezco por todas esas lecciones que me dio en el transcurso de este camino, que al principio veía lejano, y que ahora por fin logre llegar a la meta.

Para mi madre, Alicia Gómez García, gracias por todo el apoyo y el amor que siempre me has dado. Gracias por llevarme puntual a cada una de mis clases cuando no me era posible caminar, gracias por estar en cada caída y en cada logro, gracias por ser una gran mujer a la cual amo y admiro muchísimo. Simplemente eres uno de los motivos por los que nunca me rindo.

Para mi padre, Rogelio Pedroza Wences, gracias por apoyarme en todas las decisiones que tomo y por siempre estar al pendiente de mi bienestar y el de mis hermanos, es tu forma de demostrarnos tu cariño y que siempre podemos contar contigo. Gracias por siempre pedirme dar lo mejor de mí en cada circunstancia, gracias a eso soy mejor cada día. Te amo papá.

Para mis hermanos, Brayan y Andrea, gracias por apoyarme en los momentos difíciles y alegrarse por mis logros. Son los mejores compañeros de vida que alguien puede tener, mi amor es inmenso hacia ustedes.

Para mis tías, Verónica y Goya, muchas gracias por creer en mí y en todos mis sueños. Gracias por seguir siendo luz en mi vida.

Para mis primos Chema, Johana, Jorge y Jimena. Gracias por ser una motivación para que siempre busque superarme y ser buena persona.

Para mi mejor amiga, Nayeli Carvajal, muchas gracias por estar conmigo incondicionalmente desde hace ya 10 años. Gracias por creer en mí y por darme motivación cuando más lo necesitaba.

Para mi amiga Ariadna Linares, muchas gracias por todo ese apoyo que aún en la distancia me has brindado. Eres de las amistades más sinceras que tengo, gracias por decirme y motivarme en todas mi decisiones, gracias por escucharme y por hacerme ver que la distancia solo son números cuando se trata de amistad.

Para mi amiga Denny Olvera, muchas gracias por haber sido una luz al final del túnel. Gracias por haber estado conmigo cuando sentía que no podía más y gracias por seguir en mi vida motivándome a ser mejor persona.

Para mis amigas Nancy Ibarra, Itzel Tapia y Carla Aguayo, muchas gracias por compartir muchas experiencias conmigo fuera del deporte. Gracias por estar en los buenos y malos momentos.

Para mi amiga y compañera del laboratorio, Tania Tapia, gracias por compartir todos los momentos de frustración cuando un experimento no me salía y por los de emoción cuando lo lográbamos. Gracias por todo tu apoyo y tu cariño, dentro y fuera del laboratorio.

Para mis amigos del posgrado Cande, Lety y Nalle. Gracias por todas las experiencias vividas alrededor de estos dos años, por los momentos que pasamos de estrés, de felicidad y de satisfacción al llegar a nuestro objetivo.

Para mis compañeros del laboratorio y los compañeros de maestría, de este último grupo en particular, a mi compañero José quién me auxilió el día del sismo del 19 de septiembre de 2017.

ÍNDICE GENERAL.

Índice de tablas

Índice de figuras

Abreviaturas

Resumen.....	17
1. Introducción.....	18
2. Antecedentes	
2.1. Taxonomía de <i>Fasciola hepatica</i>	20
2.2. Ecosistema de <i>Fasciola hepática</i>	21
2.3. Morfología y ubicación parasitaria de <i>Fasciola hepatica</i>	21
2.4. Distribución geográfica.....	24
2.5. Hospederos.....	24
2.5.1 Hospedero Intermediario.....	24
2.5.2 Hospedero definitivo.....	26
2.5.3. Localización de <i>Fasciola hepatica</i> en el hospedero definitivo.....	27
2.5.4. Actividad estacional de la fase parasitaria de <i>Fasciola hepatica</i>	27
2.5.4.1 Fasciolosis estacional.....	28
2.5.4.2 Fasciolosis permanente.....	29
2.5.4.3 Fasciolosis otoñal.....	30
2.6. Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i>	30
2.7. Lesiones ocasionadas por <i>Fasciola hepatica</i>	32
2.8. Epidemiología.....	34
2.9. Situación actual en México.....	35
2.10. Triclabendazol como método de control contra <i>Fasciola hepatica</i>	36
2.11. Metabolismo de xenobióticos.....	37
2.12.1 Fases del metabolismo de xenobióticos.....	38
2.12. Enzimas metabolizantes de xenobióticos.....	38
2.12.1 Carboxilesterasas.....	40

2.13. Diagnóstico de resistencia de los parásitos a los antiparasitarios....	41
3. Justificación.....	43
4. Hipótesis.....	44
5. Objetivos	
5.1. Objetivo general.....	44
5.2. Objetivo específicos.....	44
6. Materiales y métodos	
6.1. Sitio de estudio.....	45
6.2. Material biológico.....	45
6.3. Preparación de extractos proteicos.....	45
6.4. Extracción de ácidos nucleicos.....	46
6.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.....	46
6.6. Detección enzimática en PAGE.....	47
6.7. Densitometría.....	47
6.8. Determinación de punto isoeléctrico	48
6.9. Secuenciación masiva.....	48
6.10. Análisis bioinformático.....	48
6.11. Detección de carboxilesterasas mediante ensayos de PCR punto final.....	49
6.12. Detección de carboxilesterasas mediante ensayos de PCR tiempo real.....	49
7. Resultados	
7.1 Infestaciones experimentales.	51
7.2 Perfiles proteicos de <i>F. hepatica</i>	52
7.3 Detección de la actividad enzimática de esterasas.....	52
7.4 Isozimas de carboxilesterasas de <i>F. hepatica</i> en PAGE nativo.....	56
7.5 Detección de carboxilesterasas de <i>F. hepatica</i>	57
7.6 Análisis densitométrico de <i>F. hepatica</i> en fase juvenil y en fase adulto.....	58
7.7 Isozimas de carboxil-esterasas de <i>F. hepatica</i> en IEF PAGE.....	59

7.8	Secuenciación de carboxilesterasas	
7.8.1	Extracción de RNA total y purificación de mRNA.....	60
7.8.2	Secuenciación Masiva en ILLUMINA HISEQ®	
7.8.2.1	Secuenciación de lecturas de filtrado.....	62
7.8.2.2	Mapeo del genoma.....	65
7.8.2.3	Predicciones de transcripciones NOVEL.....	66
7.8.3	Reporte de secuenciación masiva	
7.8.3.1	Mapeo y expresión genética.....	66
7.8.3.2	Cobertura de lectura y análisis de distribución de transcripciones.....	67
7.8.3.3	La distribución de la expresión génica.....	69
7.9	Análisis Bioinformático de las secuencias obtenidas.....	72
7.9.1	Marcos de lectura abiertos.....	74
7.9.2	Alineamiento de las secuencias	74
7.9.2.1	Secuencia 1	74
7.9.2.2	Secuencia 2	76
7.9.2.3	Secuencia 3	78
7.9.2.4	Secuencia 4	79
7.9.3	Análisis de la secuencia BN1106_s4004b000028g.....	80
7.9.3.1	Caracterización de la esterasa BN1106_s4004b000028g.....	81
7.9.3.2	Análisis del número GO de la esterasa BN1106_s4004b000028g.....	81
7.9.3.3	Análisis de dominios de la esterasa BN1106_s4004b000028g.....	82
7.9.4	Análisis de la secuencia BN1106_s4004b000525g.....	83
7.9.4.1	Caracterización de la esterasa BN1106_s80B000525g.....	83
7.9.4.2	Análisis del número GO de la esterasa BN1106_s80B000525g.....	84

7.9.4.3	Análisis de dominios de la esterasa BN1106_s80B000525g.....	84
7.9.4.4	Predicción de estructura 3D de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g.....	86
7.10	Detección de carboxilesterasas por PCR punto final.....	87
7.10.1	Análisis de exones de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g.....	89
7.11	Detección de los exones de la carboxilesterasa por PCR punto final BN1106_s80B000525g.....	94
7.12	Detección del exón 1 de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g en F. hepatica provenientes de distintos hospederos.....	95
7.13	Detección del exón 1 por qPCR.....	98
8.	Discusión.....	103
9.	Conclusiones.....	109
10.	Bibliografía.....	111
11.	Apéndices	
11.1	Apéndice A: Protocolo Laemmli SDS- PAGE.....	121
11.2	Apéndice B: Tinción de Plata.....	124

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Fasciola hepatica</i>	20
Tabla 2. Descripción de las diferentes etapas de desarrollo de <i>Fasciola hepatica</i>	22
Tabla 3. Fases de vida libre y parasitaria de <i>F. hepatica</i>	23
Tabla 4. Clasificación taxonómica de caracoles del genero <i>Lymnaea</i>	25
Tabla 5. Resistencia a la infestación de <i>F. hepatica</i> de algunos huéspedes.....	27
Tabla 6. Enzimas metabolizantes de xenobióticos.....	39
Tabla 7. Clasificación histoquímica de las carboxilesterasas.....	40
Tabla 8. Determinación de masas moleculares de esterasas de suero de conejo.....	53
Tabla 9. Determinación de masas moleculares de esterasas de <i>C. elegans</i>	54
Tabla 10. Muestras de RNA total de <i>F. hepatica</i> , enviadas a secuenciación.....	61
Tabla 11. Métrica de lectura limpia.....	63
Tabla 12. Resumen de la asignación del genoma.....	66
Tabla 13. Resumen de Transcritos NOVEL.....	66
Tabla 14. Resumen de la proporción de mapeo de genes.....	67
Tabla 15. Estadísticas de genes y transcripciones.....	67
Tabla 16. Identificación de las secuencias encontradas como carboxilesterasa.....	72
Tabla 17. Datos obtenidos mediante ORF FINDER.	74
Tabla 18. Secuencia de los oligonucleótidos para la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g.....	87
Tabla 19. Oligonucleótidos diseñados para detectar los exones de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g.....	93

Tabla 20. Oligonucleótidos que se utilizaron para la detección de exones.....	93
Tabla 21. Claves de los oligonucleótidos utilizados en PCR punto final para detectar los exones en el DNA genómico de <i>F. hepatica</i>	94
Tabla 22. Relación de burros analizados para determinar la resistencia.....	98
Tabla 23. Oligonucleótidos utilizados en el ensayo de PCR tiempo real.....	99

Índice de Figuras

Figura 1. Comparación de estructura teórica y estructura real de una <i>Fasciola hepatica</i> en etapa adulta.....	23
Figura 2. Diferentes vistas de los caracoles del genero <i>Lymnaea</i>	26
Figura 3. Focos de infestación de <i>Fasciola hepatica</i>	26
Figura 4. Desarrollo de la Fasciolosis estacional en México durante un año.....	29
Figura 5. Huevo de <i>F. hepatica</i>	31
Figura 6. Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i>	31
Figura 7. Conductos biliares de oveja tapados por la presencia de <i>Fasciola hepatica</i>	33
Figura 8. Hígados infestados por <i>Fasciola hepatica</i>	33
Figura 9. Distribución mundial de <i>Fasciola hepatica</i> y <i>F.gigantica</i>	34
Figura 10. Distribución global de la fasciolosis.....	35
Figura 11. Mapa de incidencia de <i>Fasciola hepatica</i> en México.....	36
Figura 12. Ruptura de un éster carboxílico catalizada por carboxilesterasas.....	40
Figura 13. Hígado de conejo dañado por fasciolosis severa.	51
Figura14. Muestra de las fasciolas extraídas de los hígados de conejo al día 65 postinfestación.....	51
Figura 15. Patrón electroforético obtenido con SDS-PAGE de extractos de <i>F. hepatica</i> en fase juvenil y en fase adulta, teñido con azul de Coomassie.....	52
Figura 16. Detección de la actividad de esterasa en el suero de conejo.....	54
Figura 17. Detección de la actividad de esterasa en el nematodo de referencia <i>C. elegans</i>	55

Figura 18. Detección de la actividad esterasa en extractos de <i>Fasciola hepatica</i> en fase adulta.....	55
Figura 19. Detección de la actividad de esterasa en extractos de <i>Fasciola hepatica</i> en fase juvenil y fase adulta.....	56
Figura 20. Perfiles de actividad de esterasa en extractos de <i>F. hepatica</i> en fase adulta y en fase juvenil.	57
Figura 21. Zimograma 2D de extractos proteicos de <i>F. hepatica</i> en fase adulta...58	
Figura 22. Análisis densitométrico de dos diferentes estadios de <i>F. hepatica</i>	59
Figura 23. Determinación del punto isoeléctrico de las isozimas de carboxilesterasa de <i>Fasciola hepatica</i>	60
Figura 24. Flujo de trabajo experimental del transcriptoma.....	61
Figura 25. Gráfico de composición del filtro de datos brutos.....	62
Figura 26. Distribución del contenido de bases en lecturas limpias.....	64
Figura 27. Distribución de la calidad de las base en lecturas limpias.....	65
Figura 28. Cobertura de lecturas de las transcripciones.....	68
Figura 29. Distribución de lecturas en las transcripciones.....	68
Figura 30. Diagrama de caja de expresión génica.....	69
Figura 31. Mapa de densidad de expresión génica.	70
Figura 32. Distribución de la expresión genética.....	71
Figura 33. Estadísticas de genes nuevos y genes conocidos.....	71
Figura 34. Distribución de expresión de genes nuevos y conocidos.....	72
Figura 35. Grafica de FPKM en cada una de las muestras de <i>Fasciola hepatica</i>	73
Figura 36. SMART BLAST de la secuencia 1.....	76

Figura 37. SMART BLAST de la secuencia 2.....	78
Figura 38. SMART BLAST de la secuencia 3.....	79
Figura 39. SMART BLAST de la secuencia 4.....	80
Figura 40. FPKMK de la secuencia BN1106_s4004b000028g.....	81
Figura 41. Reporte del número GO de la carboxilesterasa BN1106_s4004b000028g.....	82
Figura 42. Resultado del análisis de dominios en InterPro de la carboxilesterasa BN1106_s4004b000028g.....	82
Figura 43. FPKMK de la secuencia BN1106_s80B000525g.....	83
Figura 44. Reporte del número GO de la secuencia BN1106_s80B000525g.....	84
Figura 45. Resultado del análisis de dominios en InterPro.....	85
Figura 46. Posible estructura de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g.....	86
Figura 47. Predicción de la estructura 3D de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g.....	87
Figura 48. Electroforesis de las muestras de cDNA y DNA genómico de <i>F. hepatica</i>	88
Figura 49. Análisis de exones de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g en un proyecto de genoma completo de <i>F. hepatica</i> de Liverpool, Reino Unido.....	89
Figura 50. Análisis de exones de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g en un proyecto de genoma completo de <i>F. hepatica</i> de Oregon, EUA.....	90

Figura 51. Análisis de exones de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g en un proyecto de genoma completo de <i>F. hepatica</i> de Liverpool, Reino Unido.....	90
Figura 52. Localización de exones en la secuencia BN1106_s80B000525g.....	91
Figura 53. Diseño de oligonucleótidos para detectar los exones en el DNA genómico.....	92
Figura 54. Electroforesis de las muestras de DNA genómico de <i>F. hepatica</i>	95
Figura 55 Electroforesis de las muestras de DNA genómico de <i>F. hepatica</i> extraídas de diferentes hospederos.	96
Figura 56. Alineamiento de las secuencias de los aminoácidos del exón 1 de muestras de DNA genómico de <i>F. hepatica</i> provenientes de diferentes hospederos.....	96
Figura 57. Cambio del aminoácido E-K en el sitio activo de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525.....	97
Figura 58 Secuencia de la carboxilesterasa en el burro 21.....	97
Figura 59 Resultados del primer ensayo de PCR tiempo real utilizando muestras de cDNA y gDNA de <i>F. hepatica</i>	99
Figura 60 Electroforesis de las muestras de cDNA y DNA genómico de <i>F. hepatica</i>	100
Figura 61 Resultados del segundo ensayo de PCR tiempo real utilizando muestras de cDNA y gDNA de <i>F. hepatica</i>	101
Figura 62 Resultados del tercer ensayo de PCR tiempo real utilizando muestras de cDNA y gDNA de <i>F. hepatica</i>	102

Abreviaturas

AA	Aminoácidos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
APS	Solución de Persulfato de Amonio
BGI	Instituto de Genómica de Pekín
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CE	Carboxilesterasa
CENID-PAVET	Centro Nacional de Investigación Interdisciplinaria en Parasitología Veterinaria
cm	Centímetros
E	Ácido glutámico
EMXs	Enzimas Metabolizantes de Xenobióticos
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
FJ	<i>F. hepatica</i> en fase juvenil sin tratamiento
FPKM	Fragmentos por kilobase de modelo de exón por millón de lecturas mapeadas.
FST	<i>F. hepatica</i> fase adulta sin tratamiento
FT	<i>F. hepatica</i> fase adulta tratada con Triclabendazol
FT2	<i>F. hepatica</i> fase adulta tratada con Albendazol
g	Gramos
<i>g</i>	Gravedades
gDNA	DNA genómico
h	Horas
IEF	Isoelectroenfoque
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
K	Lisina
kDa	Kilodaltones
KEGG	Enciclopedia Kyoto of Genes and Genomas

MM	Masas Moleculares
ml	Mililitros
mm	Milímetros
µl	Microlitros
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pI	Punto Isoeléctrico
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
Rf	Movilidad electroforética relativa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
TCBZ	Triclabendazol
TEMED	Tetrametiletilendiamina
V	Volts
Vol/Vol	Volumen/ Volumen
°C	Grados Celsius
3D	Tercera dimensión

RESUMEN

El diagnóstico de la resistencia de los helmintos a los tratamientos antiparasitarios constituye un problema, por lo que se requiere un análisis entre organismos de una misma especie, para identificar aquellas variaciones genéticas y bioquímicas que los hacen resistentes. Esto ha llevado al diseño de bioensayos complicados que permitan identificar la resistencia de estos organismos a los diferentes químicos comerciales disponibles. Algunos de estos bioensayos se hacen *in vitro* con cepas de helmintos de referencia cultivados en laboratorio a la par de los helmintos que se desea diagnosticar, lo que hace que cada ensayo requiera de altos costos operativos y de un tiempo considerable para llevarse a cabo. Una alternativa al problema de diagnóstico de resistencia, son las técnicas moleculares y bioquímicas que han demostrado ser muy útiles en la detección de artrópodos resistentes a los pesticidas, y actualmente se utilizan en la identificación de cepas de artrópodos y helmintos resistentes a diferentes productos químicos. En este estudio se pretende diseñar un procedimiento para detectar a las carboxilesterasas, enzimas que permiten metabolizar xenobióticos de *F. hepatica*, por medio de zimogramas y qPCR. Este procedimiento intentará detectar carboxilesterasas en cepas de parásitos cultivadas *in vitro* que muestren diferentes niveles de susceptibilidad y/o resistencia a los productos fasciolicidas comerciales y también permitirá diferenciar un complejo patrón de isozimas en diferentes etapas de desarrollo del trematodo. Los procedimientos desarrollados en este estudio permitirán identificar características fenotípicas, tales como la resistencia o susceptibilidad a los tratamientos fasciolicidas, algo necesario para implementar medidas de control, prevención y tratamiento de la fasciolosis.

1. Introducción

El tratamiento antiparasitario basado en productos químicos con propiedades antihelmínticas, actualmente constituye la base de la prevención y el tratamiento contra los helmintos parásitos de plantas, animales de interés pecuario, animales domésticos y humanos (Miranda-Miranda *et al* 1994; 1995; Scarcella *et al* 2012). Como efecto adverso, la exposición de los helmintos a diferentes productos químicos, ha generado en estos una respuesta adaptativa que activa un proceso de decodificación bioquímico-metabólico que origina tolerancia y/o resistencia a los tratamientos químicos, lo que evita o disminuye el control de la helmintiasis parasitaria en cualquier especie afectada (Miranda *et al* 2006; 2008; 2009). El proceso de resistencia a los contaminantes químicos ambientales ajenos a un ecosistema, también conocidos como xenobióticos, se ha desarrollado durante el proceso evolutivo de la mayoría de los organismos metazoarios; en los helmintos este proceso se facilita por la acción de un grupo de enzimas metabolizantes de xenobióticos (EMX) (Virkel *et al* 2006; Gregus *et al* 2006). El complejo EMX confiere una resistencia que protege a los helmintos de la acción tóxica de los xenobióticos naturales, como las toxinas y/o venenos producidos por ciertos microorganismos, plantas o animales (Virkel *et al* 2006; Gusson *et al* 2006). En general, los helmintos tanto parásitos como de vida libre, tienen un complejo EMX eficiente (Álvarez *et al* 2005; Virkel *et al* 2006; Lindblom y Doll 2006; Laing *et al* 2010) que puede conferir nuevas propiedades químicas y funciones metabólicas, alterando la hidrofiliidad y toxicidad de los xenobióticos en un proceso denominado biotransformación (Scarcella *et al* 2012; Gusson *et al* 2006; Gregus *et al* 2006; Virkel *et al* 2006; Lindblom y Doll 2006; Laing *et al* 2010). Las EMX de los helmintos incluyen enzimas tales como, citocromo P-450, monoxigenasas dependientes de flavina, alcohol y aldehído deshidrogenasas, glutatión S transferasas y carboxilesterasas (Gregus *et al* 2006; Virkel *et al* 2006; Lindblom y Doll 2006; Laing *et al* 2010). Se ha reportado que diversos helmintos expuestos ante una variedad de compuestos químicos, sobre expresan su complejo EMX, afectando no solo el tiempo de acción de los químicos sino la susceptibilidad a

estos, originando tolerancia y/o resistencia (Gusson *et al* 2006; Scarcella *et al* 2012).

La fasciolosis es una zoonosis distribuida mundialmente provocada por el tremátodo parásito equinostómido digenético *Fasciola hepatica*, el cual afecta equinos, bovinos, ovinos, caprinos, cerdos y en algunos casos a el hombre (Bowman 1995, Miranda-Miranda *et al* 1994, 1995, Solana *et al* 2001., Scarcella *et al* 2012). La fasciolosis del ganado es tratada principalmente con triclabendazol (TCBZ) que es un derivado halogenado del tiol-benzimidazol (Solana *et al* 2001; Álvarez *et al* 2005; WHO 2007). El TCBZ ha mostrado eficacia contra fases juveniles y maduras de *F. hepatica* cuando se administra de manera oral en ganado infectado. Los tremátodos parásitos metabolizan TCBZ mediante su complejo EMX y la exposición de *F. hepatica* a estos antihelmínticos ha generado resistencia y/o tolerancia al TCBZ en varias regiones del mundo (Álvarez *et al* 2005; Devine *et al* 2009; 2010; 2011; Scarcella *et al* 2012).

Sin embargo solo unos pocos estudios se han concentrado en las mediciones del complejo EMX en helmintos resistentes (Álvarez *et al* 2005; Brennan *et al* 2007; Scarcella *et al* 2012). En México existen pocos datos sobre la resistencia de este parásito al TCBZ a pesar de que se utiliza en el tratamiento de la fasciolosis del ganado desde hace décadas, por lo que es urgente abordar el tema.

Una alternativa al problema de diagnóstico de resistencia, son las técnicas bioquímicas y moleculares, que han demostrado ser muy útiles en la detección de resistencia de los artrópodos y de los helmintos a los productos químicos.

2. Antecedentes

2.1. Taxonomía de *Fasciola hepatica*

Fasciola hepatica es un trematodo invertebrado del reino Animalia y del filo platelminto. Es el agente causal de la fasciolosis, una enfermedad zoonótica de distribución mundial que afecta el hígado de bovinos, ovinos, caprinos, roedores, equinos, porcinos y también se presenta en humanos por consumir frutas y verduras crudas contaminadas con la fase infectante (Urquhart *et al* 2001; Bowman 1995; Miranda-Miranda *et al* 1994; 1995; Solana *et al* 2001; Scarcella *et al* 2012).

Los trematodos son gusanos aplanados dorsoventralmente, habitualmente tienen forma de hoja u ovoide y tienen cuerpo insegmentado (Quiroz, 2005). Estos parásitos muestran un ciclo de vida complejo que requiere uno o más hospederos, es decir, un hospedero intermediario como los moluscos y un hospedero definitivo como distintos vertebrados (Quiroz, 2005).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Fasciola hepatica* (Urquhart *et al* 2001)

Reino	Animalia
Filum	Platelminto
Clase	Trematodo
Subclase	Digenea
Orden	Echinostomida
Familia	Fasciolidae
Género	<i>Fasciola</i>
Especie	<i>F. hepatica</i>



2.2 Ecosistema de *Fasciola hepatica*

F. hepatica es endémico en los lugares en donde existan caracoles del género *Lymnaea spp.* Estos moluscos habitan ambientes húmedos y cálidos, generalmente en cuerpos de agua somera y estancada con abundante vegetación semiacuática (Martínez, Sánchez *et al* 2012). En México las condiciones favorables se presentan en todo el territorio nacional y se ha reportado la presencia del hospedero intermediario en todos los estados (Quiroz, 2005). Existen diversos elementos que contribuyen a la permanencia del ciclo biológico de *Fasciola hepatica*, tales como factores climáticos, biológicos, geográficos y humanos que hacen que la incidencia de la enfermedad fluctúe a lo largo del año. Entre los factores más importantes se encuentran las bajas temperaturas, climas húmedos, presencia de ganado y vegetación silvestre cerca de fuentes de agua renovables, además de la falta de drenajes. En los casos de infestación en humanos un factor importante es el consumo de vegetales crudos de tallo corto y del agua de manantiales, canales o acequias (Martínez, Sánchez *et al* 2012).

2.3 Morfología y ubicación parasitaria de *Fasciola hepatica*

F. hepatica es un trematodo parásito hermafrodita de aspecto carnosos, alargado, en forma de ovalo, mide aproximadamente de 1 a 2 cm de longitud y de 20 mm a 50 mm de ancho (Figura 1) (Quiroz, 2005). Tiene varias etapas de desarrollo (Tabla 2), las cuales pueden ser de vida libre o parasitaria, mismas que se describen en la Tabla 3.

En el caso particular de este parásito y debido a su localización en el hospedero definitivo y su forma aplanada recibe los nombres comunes de duela del hígado, palomilla del hígado, orejuela, conchuela, duela del carnero, entre muchos otros (Olaechea, 2007; Mendoza Panamá *et al* 1984). En los animales infestados se localiza principalmente en los conductos biliares, pero durante su migración del intestino al hígado puede hospedarse en pulmones, conductos sanguíneos y tráquea (Pintor, 2006). Su estructura está conformada por dos

ventosas (una oral y una ventral), intestino ciego, canal de Laurer, poro genital, conducto eferente y en su etapa adulta por dos aparatos reproductores (Pintor, 2006).

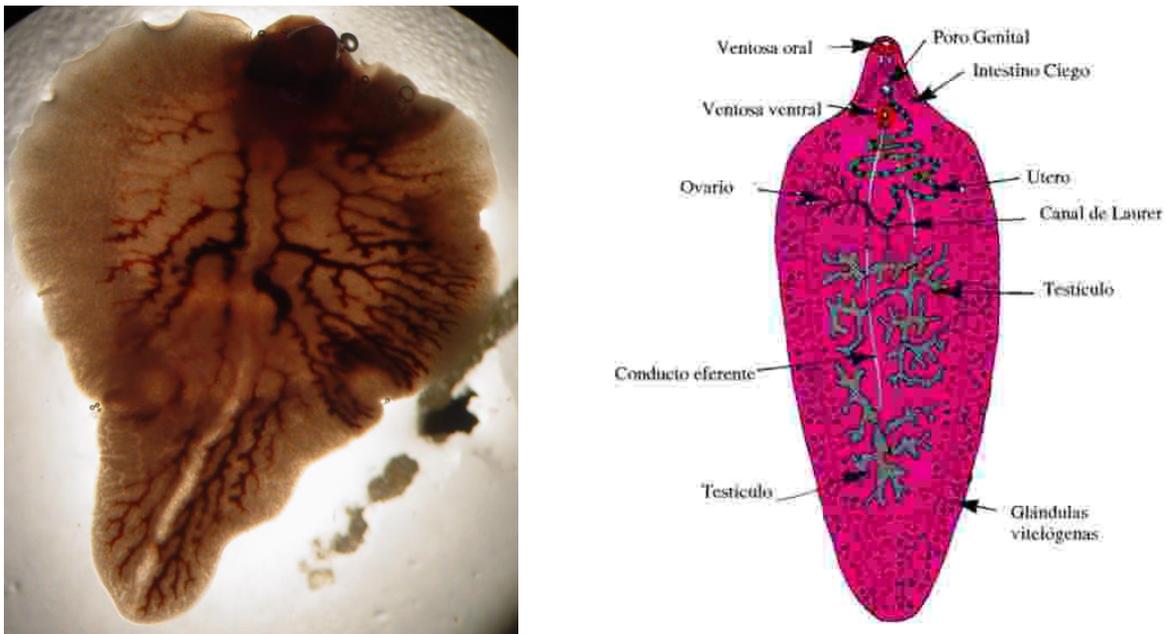
Tabla 2. Descripción de las diferentes etapas de desarrollo de *Fasciola hepatica* (Romero, 2007).

Etapas de desarrollo	Características
Huevos	Son ovalados y operculados, generalmente miden 140 μm por 75 μm .
Miracidio	Cuentan con una papila cónica en la parte proximal. Su cuerpo está lleno de cilios de gran movilidad y miden 128 μm por 25 μm .
Esporoquiste	Tienen forma de ovalo, alargada, y en ocasiones semiesférica, con un extremo cónico y otro redondo, miden 550 μm .
Redia	Su longitud es de 1 a 3 mm, presentan masas germinales en diferentes etapas de desarrollo.
Cercaria	Tienen una cabeza redonda en reposo y alargada en actividad. Continúa con una cola, que le da movilidad y mide 700 μm , miden de 270 a 340 μm de largo y 270 μm de ancho.
Metacercaria	Miden aproximadamente 0.5 mm.
Juvenil	Su longitud es de 3 a 5 mm.
Adulta	Es la fase madura del parásito. Puede medir de 1 a 2 cm de largo y de ancho de 20 a 50 mm.

Tabla 3. Fases de vida libre y parasitaria de *F. hepatica*. Además se representa aquellas que están presentes en los hospederos intermedio y definitivo.

Fase parasitaria en el hospedero intermedio	Fase de vida libre	Fase parasitaria en el hospedero definitivo
Miracidio Esporoquiste Redia Cercaria	Huevos *Miracidio +Cercaria	Metacercaria Juvenil Adulta
*Mientras no encuentre al caracol del género <i>Lymnaea</i> . +Mientras no encuentre una planta a la cual adherirse.		

En la Figura 1 se muestra una comparación entre la estructura real y la estructura teórica de *Fasciola hepatica* adulta (imagen adaptada de Pintor, 2006), mostrando una mejor localización de las ventosas y el poro genital con respecto a las partes restantes que son menos apreciables.



Adaptada de Pintor, 2006.

Figura 1. Comparación de la estructura real y la estructura teórica de una *Fasciola hepatica* en etapa adulta, en este estadio es donde presenta órganos más desarrollados, en comparación con sus etapas anteriores.

2.4 Distribución geográfica

Los trematodos parásitos del género *Fasciola* spp., se caracterizan por tener una distribución mundial. *F. gigantica* se encuentra distribuida en países de África y en algunos países de Asia, mientras que *F. hepatica* se encuentra distribuida en países de Europa y América (Pintor, 2006).

En México, *Fasciola hepatica* se encuentra en mayor o menor prevalencia en el Litoral del Golfo y del Pacífico, en los Valles del Altiplano, en las llanuras del norte; es endémica en animales o enzoótica en Veracruz, Tabasco, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Querétaro y México (Mendoza *et al* 1984).

En estos estados se presentan las zonas de mayor incidencia enzoótica a nivel nacional (Pintor, 2006). Su distribución está establecida durante determinados meses del año por las condiciones óptimas del medio ambiente que permiten el desarrollo de los moluscos del género *Lymnae* (Pintor, 2006).

2.5 Hospederos

Como se mencionó, *F. hepatica* es un parásito que para completar su ciclo de vida requiere de un hospedero intermediario, caracoles del género *Lymnaea*, de un hospedero definitivo, entre los que se encuentran los mamíferos, incluyendo al humano (Olaechea, 2007).

2.5.1 Hospedero intermediario

El hospedero intermediario es imprescindible para el desarrollo ulterior de *F. hepatica* y está condicionado casi exclusivamente a caracoles del género *Lymnaea*, los cuales en México pueden ser *L. bulimoides*, *L. cubensis* y *L. humilis* (Gasque, 2008; Olaechea, 2007). Estos moluscos de agua dulce son hospederos intermediarios obligatorios de *F. hepatica* y llegan a producir cerca de 3,000 huevos por mes, habitualmente se encuentran en zonas con presencia de agua poco profunda, no estancada o bien pueden vivir en barro húmedo (Olaechea, 2007; Reyes, 2011). A continuación, se muestra una tabla en donde se puede observar la clasificación taxonómica de este hospedero (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación taxonómica de caracoles del género <i>Lymnaea</i> (Reyes,2011)	
Reino	Animalia
Phylum	Mollusca
Clase	Gastropoda
Orden	Basommatophora
Familia	Lymnaeidae
Género	<i>Lymnaea</i>

En la Figura 2 se observan diferentes perfiles de los caracoles del género *Lymnaea*, así como las diferencias en su color, el cual muchas veces puede variar debido a las condiciones del ambiente (Reyes, 2011). Estos caracoles tienen la capacidad de adaptarse a condiciones de sequía o frío (temperaturas menores a 10°C inhiben la actividad de estos), donde tanto el caracol como los estadios intermediarios de *F. hepatica* disminuyen su actividad metabólica pero pueden sobrevivir varios meses hasta que las condiciones sean favorables para seguir desarrollándose (Boray, 1969).

Una manera de controlar la introducción y propagación de *F. hepatica* es ejerciendo control del hospedero intermediario mediante el uso de barreras naturales o proliferación de aguas salobres y duras (agua con cantidades considerables de Ca^{2+} y Mg^{2+}), o aquellas que contienen gran cantidad de cloruro de calcio, nitratos y sulfatos, así como carbonatos de calcio y magnesio (Olaechea, 2004).

Un factor que contribuye al incremento de hábitats potenciales de los caracoles del género *Lymnaea* es el uso de agua de riego destinada a mejorar la calidad y la cantidad de los pastizales, así como las inundaciones por lluvias o desbordes de ríos y canales. Cabe mencionar que la humedad definirá las zonas endémicas del caracol, constituyendo puntos de diseminación donde las poblaciones de caracoles tienen las mejores condiciones de supervivencia (Olaechea, 2007).



Figura 2. Diferentes vistas de los caracoles del género *Lymnaea* (Foto adaptada de Reyes, 2011).

2.5.2 Hospedero definitivo

F. hepatica utiliza como hospederos definitivos a una gran diversidad de mamíferos, pero todos ellos presentan cierta resistencia a la infestación de este parásito. En la Tabla 5 se muestra una comparación de resistencia de diferentes mamíferos a este parásito (Olaechea, 1994). *F. hepatica* puede llegar a infestar a roedores como los conejos y también a los humanos (Alatoom *et al* 2008).



Figura 3. Focos de infestación de *Fasciola hepatica*. En estas fotos se puede apreciar una de las formas en las que los animales de pastoreo pueden llegar a infestarse con *F. hepatica*, dichos animales pueden adquirir al parásito debido a la exposición a las aguas contaminadas y a las plantas que crecen alrededor, que también se encuentran infestadas con este parásito (Fotos tomadas de los trabajos de Flores, 2005 y Reyes, 2011).

Entre los mamíferos más vulnerables a la fasciolosis y más importantes en el aspecto económico y epidemiológico se encuentran los bovinos y ovinos, estos últimos presentando mayor incidencia de muerte (Olaechea, 2007).

Tabla 5. Resistencia a la infestación, de algunos huéspedes, a *F. hepatica* (Tomado de Olaechea 2007).

	RESISTENCIA		
	Alta	Moderada	Baja
HUESPED	Equino Porcino	Bovino Hombre Conejo Liebre Ciervo	Ovino Caprino Guanaco Laucha Rata Hámster

2.5.3 Localización de *Fasciola hepatica* en el hospedero definitivo

Fasciola hepatica en estados larvarios pueden migrar a través del parénquima hepático y la vesícula biliar, el parásito inmaduro pasa a través de la pared intestinal al peritoneo y la cápsula hepática para después buscar los canales biliares y desarrollarse a su etapa adulta en 3 o 4 meses, en su etapa parasitaria adulta se puede localizar en los canalículos biliares del hígado de su hospedero definitivo (Martínez, Sánchez *et al* 2012; Reyes, 2011). En ocasiones este parásito puede llegar accidentalmente a nódulos linfáticos, peritoneo, páncreas, musculatura, bazo, pulmones, piel y útero (Reyes, 2011).

2.5.4. Actividad estacional de la fase parasitaria de *Fasciola hepatica*

Debido a factores como la humedad y la temperatura, la enfermedad parasitaria denominada fasciolosis enzoótica puede presentarse a lo largo del país de tres formas diferentes que son fasciolosis estacional, fasciolosis permanente y fasciolosis otoñal (Flores, 2005).

2.5.4.1 Fasciolosis estacional

La fasciolosis estacional sucede en todos los lugares de riego y en el altiplano de México que muestra lluvias monzónicas con estaciones secas bien definidas. Los caracoles sobrevivientes a la sequía se reproducen con las primeras lluvias de mayo o junio y son infestados por las formas de vida libre de *F. hepatica* en julio y agosto, esto significa que para el mes de septiembre la pastura está altamente contaminada con metacercarias infestivas y en el bimestre noviembre-diciembre ocurren los casos de fasciolosis aguda (Flores, 2005).

Regularmente pueden aparecer casos en animales que pastan cerca de un canal de riego, donde se depositan huevecillos en la ribera (Flores, 2005) (Figura 3). Una vez instalada la duela adulta en los conductos hepato-biliares del hospedero, ocurre la primera ovoposición del año entre los meses de enero y febrero, pero la fase crónica de la enfermedad solo aparece en los meses de marzo y abril.

En época de lluvias las inundaciones arrastran múltiples metacercarias que son esparcidas a sembradíos, la mayoría de las veces de alfalfa, que posteriormente se utilizan en la alimentación del ganado, los cuales presentarán severas parasitosis, aunque nunca hayan pastoreado (Flores, 2005).

En la Figura 4 se muestra cómo se desarrolla la fasciolosis estacional en México alrededor de un año, se aprecia la época en la que se pueden encontrar mayor cantidad de metacercarias y huevecillos del parásito, así como caracoles del género *Lymnaea spp.*

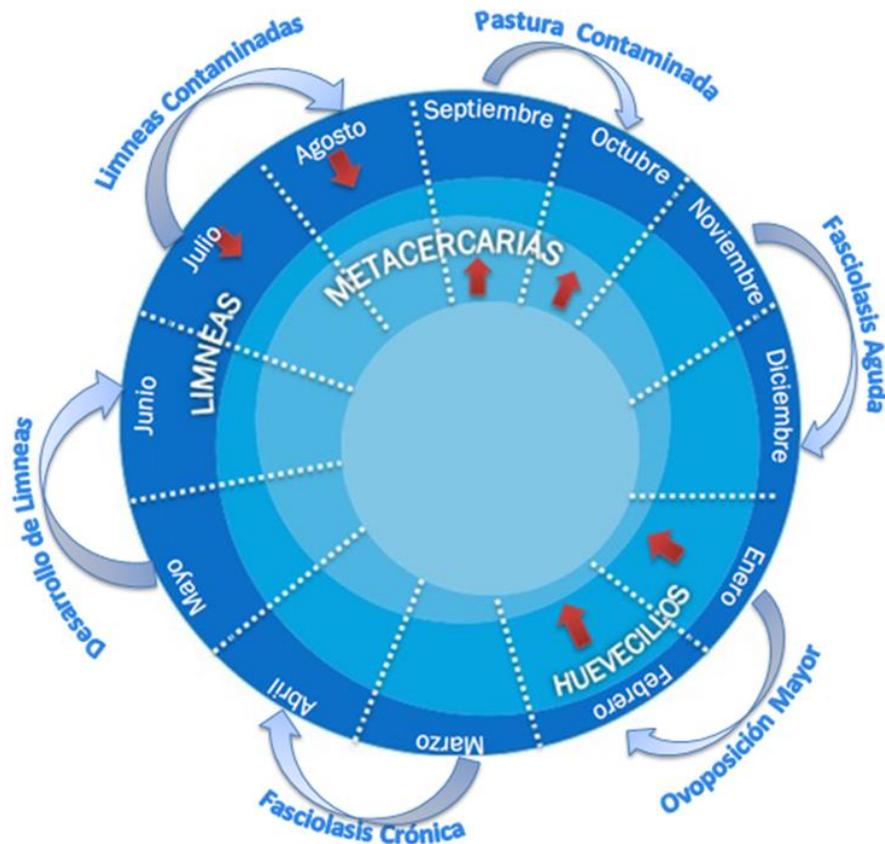


Figura 4. Desarrollo de la Fasciolosis estacional en México durante un año (Adaptado de Flores, 2005). Las flechas rojas indican los meses en los que se pueden encontrar más cantidad de huevecillos, metacercarias y limneas de *F. hepatica* (mismos que se encuentran representados en los distintos tonos de color azul).

2.5.4.2 Fasciolosis permanente

La fasciolosis está presente todo el año en zonas donde las condiciones resultan favorables para el desarrollo de caracoles y metacercarias principalmente en las vertientes de las Sierras Madre Oriental y Occidental, así como en zonas del trópico húmedo de México. Los lugares de excepción son la península de Yucatán, ya que en esta zona la filtración del agua impide que las condiciones de humedad resulten favorables y la capa de suelo fértil impide la formación de un microclima en la época de calor, y en las costas de Oaxaca y Guerrero el clima caluroso y la falta de una capa de suelo fértil imposibilitan el crecimiento y desarrollo del parásito (Flores, 2005).

2.5.4.3 Fasciolosis otoñal

Se presenta en las vertientes de los ríos de las cadenas montañosas, específicamente en la región del Golfo de México, en donde es habitual encontrar brotes agudos. En el norte de Veracruz, entre Nautla y Tuxpan, en la cuenca de Papaloapan y en la del río Grijalva, durante la época de ciclones y tormentas tropicales que corresponden a los meses de mayo a septiembre se acumulan numerosas metacercarias y caracoles, esto se debe a que las aguas los arrastran hacia las zonas bajas cercanas al mar (Flores, 2005).

2.6. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria de importancia económica y ganadera que afecta principalmente a bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados y en algunos casos al hombre (Gasque, 2008; Martínez, Sánchez *et al* 2012). Para poder llevar a cabo la infestación por este parásito se requiere de un ciclo biológico muy complejo (Figura 6) que inicia en los conductos biliares de los hospederos definitivos, en estos produce sus huevos, que tienen forma ovalada y miden alrededor de 130- 150 x 60-90 μm y presentan en uno de sus extremos un opérculo claramente visible al microscopio (Figura 5). Los huevos salen al intestino con la bilis donde posteriormente serán eliminados al medio con la materia fecal. Para que el ciclo pueda continuar es necesario que los huevos expulsados se depositen en el agua dulce para dar lugar a la forma larvaria que sale por el opérculo llamada miracidio. Una vez liberado, el miracidio ciliado nada en el agua hasta encontrar e invadir a un molusco de la familia Lymnaeidae. En el interior del caracol el parásito lleva a cabo otro ciclo, el cual está conformado por tres fases de transformación del parásito en donde pasa de miracidio ciliado a esporoquiste, de esporoquiste a redia y finalmente de redia a cercaria; donde esta última tiene cola no bifurcada y su cuerpo es de forma redonda, la cual nadará hasta encontrar una planta a la cual adherirse y convertirse en metacercaria (en esta forma el parásito mide alrededor de 0.5 mm). *Fasciola hepatica* infesta a sus

hospederos definitivos mediante el consumo de las plantas a las que se adhieren, ya que la mayoría de dichos hospederos ingiere las plantas infestadas con metacercarias. Una vez dentro del hospedero definitivo pasa por la pared intestinal, el peritoneo y la cápsula hepática hasta llegar a los conductos biliares en donde se desarrolla a adulto de 3 a 4 meses y en donde provoca su mayor daño al alimentarse del hospedero y causarle lesiones severas (Martínez, Sánchez *et al* 2012).

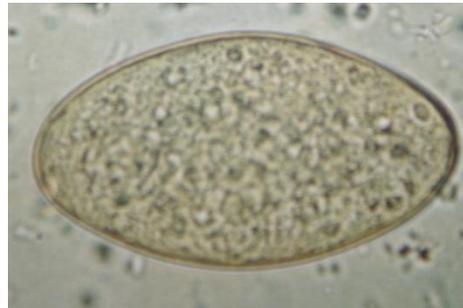


Figura 5. Huevo de *F. hepatica* vista al microscopio óptico a 40X.

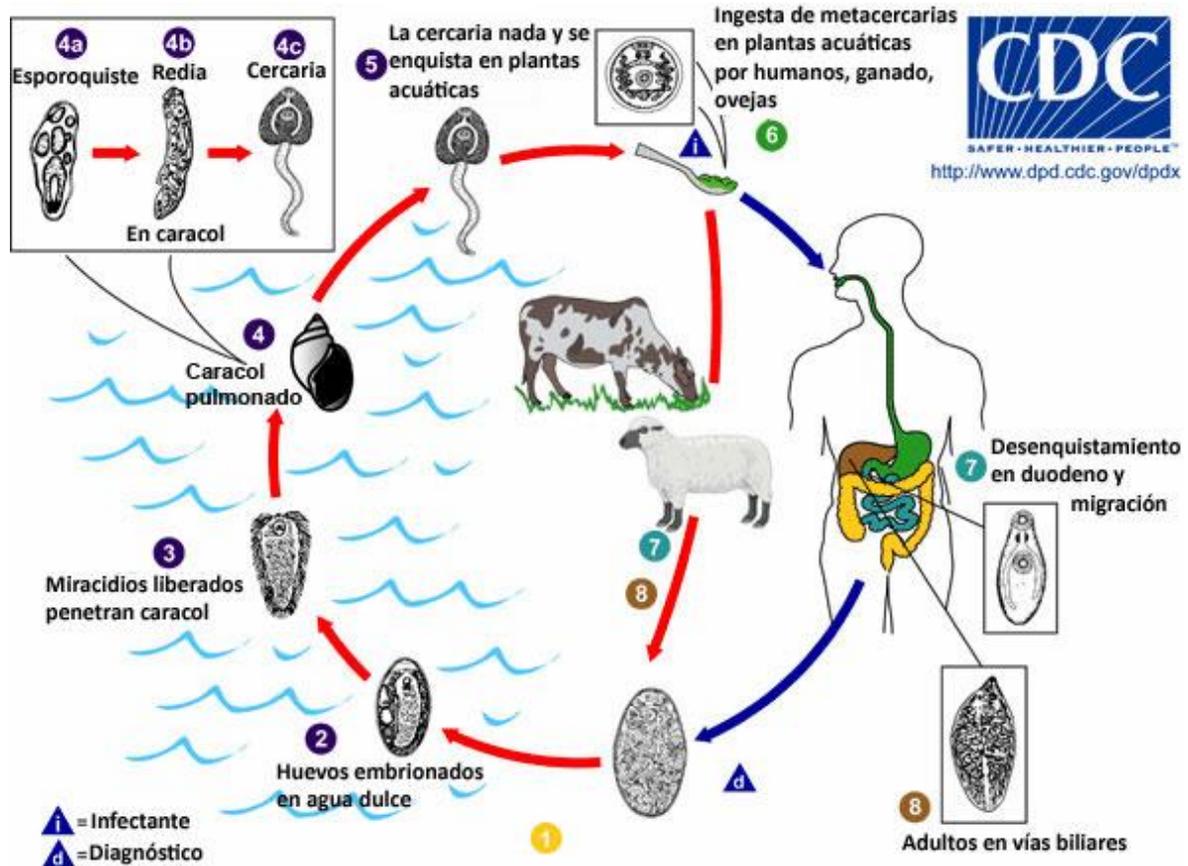


Figura 6. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica* tomado de CDC, 2017

2.7 Lesiones ocasionadas por *Fasciola hepatica*

Como ya se mencionó anteriormente, una forma de infestación de *Fasciola hepatica* puede darse por el consumo de alimentos y de aguas contaminadas con metacercarias (Alatoom *et al* 2008). Estas llevan a cabo el desenquistamiento en dos fases. La primera fase o “activación”, ocurre en el rumen, es iniciada por altas concentraciones de dióxido de carbono en un ambiente reductor y a una temperatura de 39°C. Una vez que el parásito se encuentra en el intestino delgado comienza la segunda fase, por debajo de la desembocadura del conducto colédoco y es desencadenada por la bilis y el parásito. Se disuelve la membrana quística dejando libres a los trematodos jóvenes que atraviesan la pared intestinal, alcanzando la cavidad peritoneal en un lapso de 2 a 28 horas aproximadamente. Después penetra el hígado, logrando en 90 horas perforar la cápsula de Glisson, en donde las fasciolas miden cerca de 1 a 2 mm y tienen forma lanceolada. Posteriormente, de 4 a 6 días llegan al tejido hepático, en donde se mantienen entre 6 y 8 semanas, para alojarse definitivamente en los conductos biliares, como se muestra en las Figuras 7 y 8; en donde alcanzan la madurez sexual y pueden permanecer vivos hasta un año (Gasque, 2008; Solórzano, 1999; Reyes, 2011).

Las fasciolas jóvenes se alimentan con sangre y tejidos hepáticos; las adultas con sangre, bilis y tejido epitelial proliferado. Además, durante su migración, pueden debilitar y perforar la cápsula hepática causando una peritonitis.

Las fasciolas se mueven sobre la pared de los conductos biliares, por medio de su revestimiento espinoso, causando una fuerte irritación; igualmente, los productos metabólicos y secreciones causan inflamaciones crónicas en las vías biliares y por la conducción linfática de productos irritantes causa cirrosis hepática. El período prepatente es de 55 a 60 días (Gasque, 2008; Solórzano, 1999; Reyes, 2011).



Figura 7 Conductos biliares de oveja tapados por la presencia de *Fasciola hepatica*, imagen tomada de Reyes, 2011

En roedores, ovinos y humanos este parásito puede ocasionar hepatitis, ictericia e incluso la muerte. Por otro lado, en los bovinos y conejos es mortal cuando se presentan cantidades grandes de infestación; debido a esto, no se le toma el cuidado suficiente y se llegan a generar grandes pérdidas en la producción de leche y carne, decomisos de hígados, pérdida de espacios y tiempo de agostaderos por retraso en el crecimiento (Flores, 2005).

Como parásito errático, puede llegar a diversos órganos como páncreas, pulmón, musculatura, ganglios linfáticos, peritoneo, bazo, piel y útero (Reyes, 2011).



Figura 8. Hígados infestados por *Fasciola hepatica* (Tomado de Reyes, 2011).

2.8 Epidemiología

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicados en Abril del 2017, las enfermedades ocasionadas por los trematodos existentes provocan cerca de 2 millones de muertes por año alrededor del mundo (OMS, 2017).

Específicamente para la fasciolosis, se reporta que cerca de 17 millones de personas resultan afectadas por esta helmintiasis zoonótica y es una de las más ignoradas en las campañas de salud mundial. En la Figura 9 se presenta un mapa de la distribución mundial de la fasciolosis, en color rojo se observa la prevalencia de *Fasciola hepatica*, en verde *Fasciola gigantica* y en azul, ambas especies (Torgerson y Claxton, 1999). Además, se reporta que cerca de 91 millones de personas viven en zonas endémicas, por lo que están en constante riesgo potencial de contraer dicha enfermedad (Scarcella *et al* 2015). En la Figura 10 se presenta un mapa en el que se observa que, se han reportado casos de fasciolosis en más del 90% del mundo.

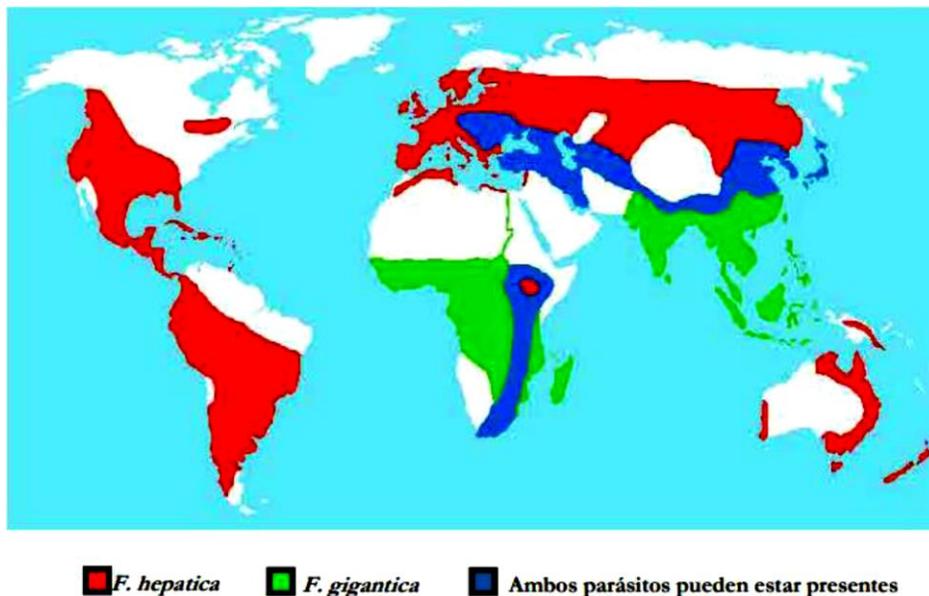


Figura 9. Distribución mundial de *Fasciola hepatica* y *F. gigantica* (Torgerson y Claxton, 1999)



Figura 10. Distribución global de la fascioliasis adaptado de Nyindo y Lukambagire, 2015. En color azul se muestran los países que han reportaron casos de fascioliasis.

2.9 Situación actual en México

En México, la fascioliasis del ganado es la parasitosis más común de las vías biliares, resaltando como zonas endémicas los estados de Puebla, México e Hidalgo, además del área general del río Lerma que comprende los estados de Michoacán, Querétaro, Guanajuato y Jalisco (Sánchez *et al* 2000).

La fascioliasis, representa un riesgo para la industria ganadera ya que genera baja producción de leche y carne. Además, se tienen reportes de animales sacrificados con un 70% de prevalencia, por lo que se recurre al decomiso de las vísceras y la carne, ya que no son aptas para el consumo humano (Miranda *et al* 1994; 1995).

En la Figura 11 se muestra un mapa con la incidencia de *Fasciola hepatica* a lo largo del país, en donde se puede apreciar que la zona del Golfo de México es una de las de mayor incidencia.

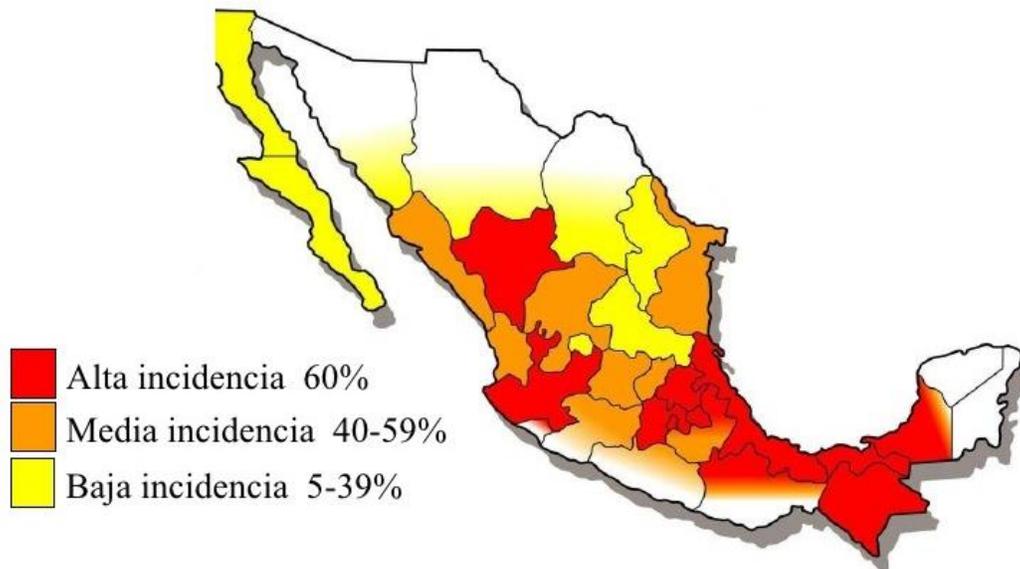


Figura 11. Mapa de incidencia de *Fasciola hepatica* en México. Tomado de Virbamec, 2009

2.10 Triclabendazol como método de control contra *Fasciola hepatica*

Entre las drogas más efectivas para el control de esta zoonosis se encuentra el Triclabendazol (TCBZ) el cual forma parte de la familia de los bencimidazoles. Los bencimidazoles se caracterizan por ser antiparasitarios de amplio espectro, es decir, tiene efectos nematocidas, larvicidas, cestocidas y ovicidas (Tang y Ruíz, 2005).

El mecanismo de acción del Triclabendazol se basa en bloquear la función de los microtúbulos mediante la conjugación con la tubulina del parásito, esto a su vez ocasiona que el parásito no absorba los nutrientes necesarios para realizar sus funciones vitales (Tang y Ruíz, 2005; Cruz y Camargo, 2000).

Una característica importante de los bencimidazoles es que presentan mayor afinidad por las tubulinas del parásito con respecto a las de los mamíferos, por lo que resulta muy útil y presenta baja toxicidad al combatir parasitosis en animales domésticos (Tang y Ruíz, 2005).

El triclabendazol es uno de los compuestos químicos más utilizados y que presenta mayor eficacia en el tratamiento de enfermedades endoparasitarias en animales domésticos (Tang y Ruíz, 2005). Se comenzó a aplicar en la década de los 80 y ha sido ampliamente aceptado a nivel mundial. En diferentes estudios ha

mostrado una eficacia del 100% en infecciones de 6 meses, utilizando una dosis de 10 mg/kg (Boray *et al* 1983); de 99% a 100% en infecciones de 4 a 14 semanas (Boray, 1997) y de 99% en infecciones de 1 a 12 semanas (Smeal y Hall, 1983). Actualmente, es el tratamiento para combatir esta enfermedad en humanos (Chávez *et al* 2012).

Una ventaja de utilizar el triclabendazol sobre otros compuestos como rafoxanida, nitroxinil, clorsulón y albendazol, es que ejerce un mayor efecto fasciolicida al combatir a *Fasciola hepatica* en cualquiera de sus estadios (Tang y Ruíz, 2005).

Sin embargo, se ha mostrado cierta resistencia debido a la falta de alternancia de los fasciolicidas, a desparasitaciones frecuentes, a la subdosificación, etcétera (Chávez *et al* 2012).

2.11 Metabolismo de xenobióticos

La resistencia antihelmíntica puede definirse como la capacidad que tienen ciertos parásitos para soportar dosis tóxicas de fármacos que serían letales para la mayoría de los parásitos de una población normal de la misma especie (Márquez *et al* 2008). Los parásitos adquieren resistencia gracias a su capacidad para metabolizar xenobióticos (Solana, 2013).

El metabolismo xenobiótico es el conjunto de reacciones que modifican la estructura química de los xenobióticos, que son compuestos ajenos a la bioquímica normal de un organismo (Castell, 2009), mediante la acción de diferentes enzimas metabolizantes de xenobióticos (Brunton *et al* 2012).

La mayoría de los productos xenobióticos son sustancias químicas lipófilas que, a través de las enzimas metabolizantes de xenobióticos, son transformadas en productos hidrófilos y así facilitar su eliminación (Castell, 2009; Brunton *et al* 2012).

2.11.1 Fases del metabolismo de xenobióticos

El metabolismo de xenobióticos se lleva a cabo en dos fases, la fase 1 de oxidación y la fase 2 de conjugación (Brunton *et al* 2012).

Las reacciones que las enzimas metabolizantes de xenobióticos llevan a cabo en la fase 1 son las de oxidación, reducción e hidrólisis, con la finalidad de introducir grupos polares o reactivos en los xenobióticos (Brunton *et al* 2012). En esta fase, las enzimas permiten la introducción de grupos funcionales como –O, –OH –COOH, –SH– o NH₂, la adición no ayuda a incrementar la hidrosolubilidad del fármaco, pero sí altera de forma significativa sus propiedades biológicas. Además, las enzimas conducen a la desactivación del fármaco. Sin embargo, en algunos casos el metabolismo, por lo general la hidrólisis de un enlace amida o éster, provoca la bioactivación del fármaco (Brunton *et al* 2012).

En la fase 2, las enzimas catalizan la conjugación de los productos de la fase 1 con una segunda molécula (transferasa) (Brunton *et al* 2012).

Las enzimas de la fase 2 facilitan la eliminación de los fármacos y la desactivación de los metabolitos electrófilos y potencialmente nocivos que se producen por oxidación. Las reacciones de la fase 2 producen un metabolito más hidrosoluble, facilitando la eliminación del fármaco de los tejidos. (Brunton *et al* 2012).

Finalmente, en la tercera fase, los xenobióticos conjugados pueden procesarse adicionalmente, antes de ser reconocidos por transportadores de flujo de salida y bombeados fuera de las células (Brunton *et al* 2012).

2.12 Enzimas metabolizantes de xenobióticos

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes enzimas que están involucradas en la degradación de xenobióticos. A continuación, se presenta una

tabla con las enzimas involucradas en las diferentes fases del metabolismo de xenobióticos.

Tabla 6. Enzimas metabolizantes de xenobióticos. Adaptado de Brunton, 2012 y Rodríguez, 2015.

Enzimas que metabolizan xenobióticos	
Enzimas	Reacciones
Fase 1 Oxidación	
Citocromo P450 (P450 o CYP)	Oxidación C y O, desalquilación, otras.
Flavina monooxigenasas (FMO)	Oxidación N,S y P
Fase 1 Reducción	
NADPH-citocromo P450 reductasa	Transferencia de electrones al citocromo P450
Citocromo P450 (reducido)	Gana un electrón de radicales libres
Fase 1 Hidrólisis	
Esterasas	Rompe enlaces éster en alcoholes y ácidos
Amidasas	Cataliza la hidrólisis de una amida.
Epóxido hidrolasas (mEH, sEH)	Hidrólisis de epóxidos
Transferasas de la fase 2	
Sulfotransferasas (SULT)	Adición de sulfato
UDP-glucuroniltransferasas	Adición de ácido glucurónico
Glutación-S-transferasas (GST)	Adición de glutatión
N-acetiltransferasas (NAT)	Adición de un grupo acetilo
Metiltransferasas (MT)	Adición de un grupo metilo
Otras enzimas	
Alcohol deshidrogenasas	Reducción de alcoholes
Aldehído deshidrogenasas	Reducción de aldehídos
NADPH-quinona oxidoreductasa (NQO)	Reducción de quinonas

En este trabajo nos enfocaremos en el estudio de las enzimas de hidrólisis de la fase 1, específicamente en el grupo de esterasas llamadas carboxilesterasas.

2.12.1 Carboxilesterasas

Las carboxilesterasas pertenecen al grupo de las hidrolasas que rompen el enlace éster carboxílico, dando como resultado un ácido carboxílico y un alcohol (Martínez Rodríguez *et al* 2008).

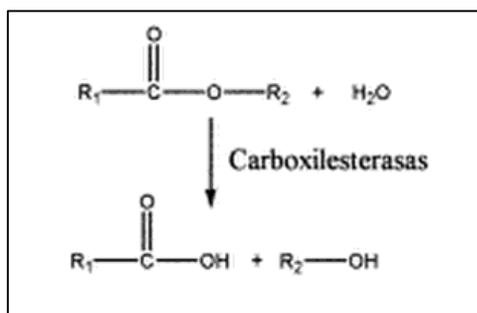


Figura 12. Ruptura de un éster carboxílico catalizada por carboxilesterasas (Martínez Rodríguez *et al* 2008)

En este grupo de carboxil-esterasas se encuentran las esterasas, las colinesterasas y las lipasas. Las colinesterasas actúan sobre ésteres carboxílicos de la colina, las lipasas sobre ésteres de cadena larga y las esterasas sobre los de cadena corta.

De acuerdo a la acción inhibitoria de compuestos fosforados, las carboxilesterasas pueden clasificarse en dos grupos, los cuales se describen en la Tabla 7 (Martínez Rodríguez *et al* 2008).

Tabla 7. Clasificación histoquímica de las carboxilesterasas. Adaptada de Martínez *et al* 2008.

Tipo de Carboxilesterasas	Nombre	Compuesto fosforado en el que actúan
Carboxilesterasas insensibles a eserina	Esterasas-A	Arilesterasas: esterasas resistentes a organofosforados (DFP-esterasas o E-600 esterasas en bancos informáticos)
	Esterasas-B	Alilesterasas: esterasas sensibles a organofosforados

	Esterasas-C	Acetilesterasas:esterasas resistentes a organofosforados y sensibles al inhibidor sufhidrilo
Carboxilesterasas sensibles a eserina	Colinesterasas inespecíficas	Sensibles a DFP en concentraciones de $10^{-4} M$
	Acetilcolinesterasas	Poco sensibles a DFP en concentraciones de $10^{-4} M$

2.13 Diagnóstico de resistencia de los parásitos a los antiparasitarios

Actualmente las técnicas zimográficas son útiles para determinar las diferencias genéticas en organismos de una misma especie que difieren en comportamiento y/o propiedades fenotípicas y por lo mismo, estas técnicas son usadas en una gran variedad de procedimientos diagnósticos (Manchenko, 1994). El fenómeno de la resistencia de los helmintos a los antihelmínticos constituye un problema, por lo que sería útil detectar sutiles variaciones genéticas que los hacen resistentes. *Haemonchus contortus* es un nematodo parásito de rumiantes que ha desarrollado resistencia hacia formulaciones comerciales basadas en bencimidazoles e ivermectinas (Campos *et al* 1990;García *et al* 2003). El problema de resistencia ha obligado a utilizar estratégicamente las diferentes fórmulas de antihelmínticos, por lo que se ha requerido de ensayos que implican el recuento de huevos del parásito aislados de las explotaciones pecuarias cuidadosamente controladas y tratadas con diferentes productos (Montalvo *et al* 2003); así como ensayos *in vitro* con cepas de referencia (García *et al* 2003).Esto con la finalidad de identificar los niveles de resistencia a los diferentes químicos, pero a su vez, estos ensayos necesitan de tiempo y conllevan a altos costos de operación.

Una opción para el diagnóstico de resistencia, son las técnicas zimográficas, que han demostrado ser muy eficientes en la detección de resistencia de los artrópodos hacia los pesticidas (Field y Foster, 2003; Karunaratne y Heminway, 2001).

La detección de enzimas se ha aplicado en helmintos parásitos, como *H. contortus*, correlacionando espectrofotométricamente los niveles de fosfatasa ácida y colinesterasa, con los niveles de resistencia a bencimidazoles e

ivermectinas (Echevarria *et al* 1992; Gimenez-Pardo *et al* 2003). Otros estudios correlacionan el metabolismo protector de diferentes compuestos antihelmínticos con la acción de glutatión S transferasa y el intercambio de gases de los nematodos (Ecobichon, 1996; Van Rossum *et al* 2004; Kawwalek *et al* 1984; Kerboeuf y Aycardi 1999). Sin embargo, son escasos los trabajos en los que se utilizan los zimogramas en la detección de la actividad de enzimas tales como esterasa, fosfodiesterasa y glutatión S transferasa; las cuales forman parte del fenómeno de resistencia a los compuestos antihelmínticos (Miranda-Miranda *et al* 2006).

3. Justificación

Debido a que en los últimos años, los parásitos han mostrado resistencia a los antihelmínticos, es necesario entender cuáles son estos mecanismos de defensa y cuáles genes y/o proteínas podrían estar involucrados en esa defensa, con la idea de generar un método de diagnóstico para identificar la presencia de estos mecanismos y proponer medidas eficientes en la aplicación de antihelmínticos.

Actualmente la identificación de esta resistencia se hace mediante complicados bioensayos que requieren helmintos de referencia que son expuestos a diferentes productos, lo que significa altos costos operativos y largos tiempos de ensayos. Por otra parte, la detección de actividad enzimática por medio de zimogramas, permite tener una representación gráfica de las enzimas probablemente involucradas en la resistencia, y la metodología es de bajo costo operacional. Este proyecto propone implementar un procedimiento, para distinguir cepas resistentes y sensibles a las formulaciones antihelmínticas, aplicable como un diagnóstico eficiente y de bajo costo. El procedimiento propuesto consiste en la determinación de la actividad de carboxilesterasas por densitometría de zimogramas, a partir de extractos proteicos de cepas de referencia resistentes al triclabendazol de *F. hepatica*. También se pretende implementar un sistema para detectar oportunamente aquellos parásitos que presenten resistencia al triclabendazol por medio de qPCR, que coadyuven a los programas de manejo de control de la fasciolosis bovina, de acuerdo a los niveles de resistencia de los parásitos en las diferentes regiones afectadas.

4. Hipótesis

El incremento en la expresión de las carboxilesterasas de *Fasciola hepatica*, está directamente relacionado con la capacidad metabolizante del parásito a los tratamientos antihelmínticos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Identificar las carboxilesterasas de *Fasciola hepatica* relacionadas con la capacidad metabolizante a los antihelmínticos.

5.2 Objetivos específicos

- Analizar los perfiles de expresión de carboxilesterasas en aislados de *F. hepatica* con distinta susceptibilidad al TCBZ.
- Identificar los genes de carboxilesterasas presentes en las cepas de *F. hepatica* mediante secuenciación masiva.
- Analizar las secuencias de carboxilesterasas identificadas por secuenciación masiva a través de análisis bioinformáticos.
- Detectar, mediante ensayos de qPCR, los genes de las carboxilesterasas de *F. hepatica* que estén involucrados en el fenómeno de la resistencia antihelmíntica.

6. Materiales y métodos

6.1 Sitio de estudio

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Helmintología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) antes Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), INIFAP en Jiutepec, Morelos, México.

6.2. Material biológico

Se utilizaron cepas de *F. hepatica* proporcionadas por los Servicios Nacionales de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria de la SAGARPA (SENASICA), las cuales fueron aisladas, identificadas y seleccionadas por su resistencia a los productos antiparasitarios comerciales y/o susceptibilidad a compuestos antihelmínticos

Se infestaron tres conejos raza Nueva Zelanda con 60 metacercarias cada uno, administradas vía oral con ayuda de una jeringa. Se hizo un monitoreo constante del material fecal a partir de los 60 días postinfestación para identificar los huevos del parásito, lo que indica la presencia de los parásitos adultos en los conductos biliares, posteriormente se sacrificó a los animales para la extracción de los hígados.

La disección quirúrgica de los hígados se realizó con el fin de identificar y extraer los parásitos adultos de los conductos biliares y el parénquima hepático. Se depositaron en solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF), pH 7.2 para una limpieza exhaustiva y posterior procesamiento.

6.3 Preparación de extractos proteicos

Se utilizaron 100 mg de trematodos y se maceraron en 1ml de SSAF. El extracto se centrifugó a 14,000 x g durante 5 minutos y al sobrenadante se le determinó el contenido proteico acorde al método descrito en el Apéndice B (Bradford, 1976). Los extractos obtenidos se almacenaron en alícuotas de 30 µl a -70° C.

Se usaron los extractos proteicos a -70°C y fueron descongelados a temperatura ambiente para posteriormente utilizarlos en las corridas de los geles de poliacrilamida para proteína.

Se usaron muestras del nematodo de referencia *Caenorhabditis elegans*, suero e hígado de conejo como controles de la actividad que fue observada en los zimogramas.

6.4 Extracción de ácidos nucleicos

Para obtener DNA genómico total los trematodos se procesaron acorde a las instrucciones del kit ADN Wizard Genomic (Promega).

El ARN total de los helmintos se extrajo siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante del kit RNAqueous® 4PCR kit (Ambion). El ARN se transcribió a cDNA usando iniciadores decaméricos aleatorios siguiendo las instrucciones de un kit comercial (High capacity cDNA Reverse transcription kit Applied Biosystems).

6.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Se utilizó un método desnaturalizante en SDS usando el método discontinuo de Laemmli (Apéndice A, Protocolo Laemmli SDS- PAGE) en geles de 100 X 82 X 1.5 mm con 15 pozos de muestras con 75 μg de proteína de extracto proteico por cada pozo y utilizando un marcador comercial de alto peso molecular (Sigma-Aldrich). Con gel concentrador al 4% y gel separador al 8%. La separación electroforética se realizó a 15 mA durante 90 min.

Además, se utilizó un sistema de PAGE nativo con un gel de poliacrilamida continuo al 6% en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.375 M pH descrito por SINO biologicals Inc. (<http://www.assay-protocol.com/molecular-biology/electrophoresis/native-page>) aplicando 15 mA durante 90 min.

Las proteínas en el gel fueron teñidas durante dos horas en una solución que contenía 0.1% de Colorante Azul Coomassie R250, 50% de metanol y 16% de ácido acético. Posteriormente fueron desteñidas con una solución de 10% metanol y 7.5% de ácido acético, en este paso se hicieron varios cambios de esta solución hasta obtener un gel libre de colorante Azul Coomassie.

6.6 Detección enzimática en PAGE

Las proteínas fueron separadas por PAGE-SDS y PAGE nativo y fueron teñidas *in situ* para determinar la actividad de esterasas usando el procedimiento de tinción AZO con Naftil éster como sustrato enzimático y Fast Garnet como agente de acoplamiento. La renaturalización fue realizada mediante la incubación del gel en solución salina amortiguadora de fosfatos, conteniendo 1% de tritón X100, durante 30 minutos y realizando tres cambios de la solución. El gel fue colocado en una solución amortiguadora de fosfatos 0.15 M, pH 7,2, conteniendo 0.04% de α -Naftil acetato y 0.8 mg/ml de Fast Garnet. Los geles fueron incubados en esa solución a temperatura ambiente, con agitación lenta durante 4 horas. Después de la tinción los geles fueron fijados en 5% de ácido acético y 15% de etanol (V/V).

6.7 Densitometría

Se procesaron las imágenes digitales de cada gel en la modalidad de densitometría del paquete de programas de computadora LabWorks 4.0 (UVP Life Sciences. www.uvp.com) y se calibró el densitómetro para cuantificar la densidad óptica de cada banda enzimática obtenida. Las densitometrías se conjuntaron para complementar las zimografías junto con la movilidad electroforética relativa (Rf) y Masa Molecular (MM). Para lograr lo anterior, se utilizaron las proteínas marcadoras de peso molecular preteñidas Page Ruler (Fermentas Life Sciences www.fermentas.com) con un rango de 11 a 170 kDa que fueron separados simultáneamente con los extractos de nematodos, para formar una curva de calibración de MM, a partir de la cual el programa de computadora se calibró para hacer de manera automática el cálculo de la Rf, la correspondiente MM, así como la densidad óptica de cada banda presente en los zimogramas.

Se determinó la Rf de cada isozima acorde al procedimiento descrito por Experimental Biosciences (<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/rf.html>). Se compararon los niveles de actividad enzimática específica de cada cepa y se hizo una correlación estadística con los niveles de resistencia.

6.8 Determinación del punto isoelectrico

Para determinar el punto isoelectrico (pI) de las enzimas detectadas, se utilizaron geles de isoelectroenfoque (IEF) Novex® pH 3-10, a los que se les cargaron 30 µl de extractos de la fase juvenil y 30 µl de la fase adulta de *F. hepatica* y los marcadores de punto isoelectrico BIORAD (con un rango de pI entre 4.4 -9.6). La cámara superior se llenó con 200 ml del buffer cátodo IEF (1X) y la cámara inferior con 600 ml del buffer ánodo IEF (1X). Se corrió a 7 mA y 100 V durante 1 hora, posteriormente se aumentó el voltaje a 200 V durante una hora y finalmente se mantuvo a 500 V durante 30 minutos.

Una vez que las muestras fueron separadas por electroforesis, se procesaron para identificar las isozimas de carboxilesterasa, mediante su tinción enzimática específica (previamente descrita).

6.9 Secuenciación masiva

Se enviaron muestras de RNA total de cuatro cepas de *F. hepatica* (fase juvenil, fase adulta sin tratamiento, adulta tratadas con TCBZ y adulta tratadas con albendazol) a BGI Genomics Co Ltd para la secuenciación de transcriptoma en un equipo de secuenciación masiva Illumina HiSeq®. De los datos obtenidos, se buscaron aquellas secuencias que correspondían únicamente a carboxilesterasas según el reporte recibido.

6.10 Análisis Bioinformático

De las secuencias encontradas en la secuenciación masiva que correspondían a carboxilesterasas, se buscaron los marcos de lectura abiertos y usando los algoritmos Uniprot y BLAST se determinó su predicción como carboxilesterasas. Los dominios funcionales proteicos se encontraron mediante el algoritmo InterPro. Se usaron los algoritmos InParanoid y MultiParanoid para identificar las agrupaciones génicas ortólogas. Se hizo un análisis de diversidad entre genomas usando el alineador Bowtie2 y los archivos resultantes se canalizaron al paquete

de programas GATK para alineamiento entre genomas y búsqueda de polimorfismos no sinónimos de un solo nucleótido o SNPs.

Además se realizaron alineamientos de secuencias adicionales y análisis filogenéticos usando los algoritmos Clustal Omega y Mega 6, respectivamente.

6.11 Detección de carboxilesterasas mediante ensayos de PCR punto final

Para identificar las carboxilesterasas se amplificó el gen encontrado en la secuenciación masiva como carboxilesterasa y que además tiene como posible función la degradación de pesticidas. Para ello se utilizaron tres pares de iniciadores, con las siguientes concentraciones de reactivos: 10 μ l de GoTaq® Colorless Master Mix, iniciadores 1 μ l (c/u), 6 μ l de agua libre de nucleasas y 2 μ L de cDNA de *F. hepatica* a una concentración de 200 ng en un volumen final de 20 μ l. Para el caso de DNA genómico fueron 10 μ l de GoTaq® Colorless Master Mix, iniciadores 1 μ l (c/u), 7 μ l de agua libre de nucleasas y 1 μ L de DNA genómico de *F. hepatica* a una concentración de 200 ng en un volumen final de 20 μ l.

Las condiciones del programa de PCR incluyen una temperatura de activación de 95°C por cinco minutos, posteriormente 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos; finalmente una extensión de 72°C por cinco minutos.

6.12 Detección de carboxilesterasas mediante ensayos de PCR tiempo real

La detección de transcritos se hizo usando el ensayo fluorogénico SYBR-Green en el equipo MyGoPro real-time PCR. Se utilizó el kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX, las condiciones experimentales de los PCRs fueron diseñados para ser compatibles con el mRNA de los genes codificantes de carboxilesterasa de *F. hepatica* de acuerdo a las secuencias determinadas en los experimentos de secuenciación genómica y del transcriptoma.

El termociclador se programo con las siguientes condiciones:

- Un ciclo de pre-melt hold a 50°C por 2 minutos.
- Un ciclo de desnaturalización a 95°C por 10 minutos.

- 45 ciclos de amplificación en 3 pasos: primer paso a 95°C durante 15 segundos, segundo paso a 66°C por 30 segundos y tercer paso a 72°C por 30 segundos.

7. Resultados

7.1 Infestaciones experimentales

Los conejos de la raza Nueva Zelanda, infestados experimentalmente con 60 metacercarias cada uno, mostraron claros síntomas de la enfermedad a partir del día 50 postinfestación, pero los huevos del parásito se identificaron por coproparasitoscopia a partir del día 65 (fecha en que fueron sacrificados para remover quirúrgicamente los hígados parasitados). Los hígados disectados mostraron un aspecto necrosado de la cápsula hepática con claros signos de daño al parénquima, características de fasciolosis severa (Figura 13).



Figura 13. Hígado de conejo dañado por fasciolosis severa. A los conejos infestados experimentalmente con *F. hepatica* se les extrajo el hígado al día 65 postinfestación en el cual se pudo observar un daño severo debido a la infestación.

Los parásitos se extrajeron de los hígados, por disección del parénquima, y se identificaron 29 fasciolas adultas y 90 juveniles (Figura 14).



Figura 14. Muestra de las fasciolas extraídas de los hígados de conejo al día 65 postinfestación. Los parásitos fueron removidos y depositados vivos en SSAF para limpieza.

7.2 Perfiles proteicos de *F. hepatica*

Con el objetivo de saber si los patrones proteicos de las fasciolas adultas y juveniles eran diferentes, se realizó un SDS-PAGE. Los patrones electroforéticos obtenidos a partir de los extractos proteicos de *F. hepatica* en fase juvenil y en fase adulta, mostraron un patrón complejo de al menos 50 bandas teñidas con azul de Coomassie (Figura 15).



Figura 15. Patrón electroforético obtenido con SDS-PAGE de extractos de *F. hepatica* en fase juvenil y en fase adulta, teñido con azul de Coomassie. En el carril 1 se colocaron 75 mg de extracto de *F. hepatica* en fase juvenil y en el carril 2 se colocaron 75 mg de extracto de *F. hepatica* en fase adulta. Se muestra un patrón complejo con al menos 50 bandas peptídicas en ambos extractos. La masa molecular aproximada se encuentra a la derecha del gel. En este caso particular no se utilizó un marcador molecular ya que no se contó con alguno libre de SDS.

7.3 Detección de la actividad enzimática de esterasas

Como primer paso se realizó la estandarización de los zimogramas para detectar la actividad de esterasa, utilizando las siguientes muestras como control positivo de actividad: suero e hígado de conejo (que fue el hospedero definitivo utilizado para este estudio) y extractos del nematodo *C. elegans*.

Usando α - Naftil acetato y Fast Garnet como sustrato, los zimogramas mostraron actividad específica de esterasa y se detectaron 6 bandas con actividad enzimática en el suero del conejo.

En la Tabla 8 se muestra el peso molecular de cada una de las bandas detectadas, así como su Rf, mientras que en la Figura 16 se observa el zimograma obtenido.

El zimograma obtenido de los extractos de *C. elegans* mostró al menos 4 bandas con actividad de esterasa (Figura 17). En la Tabla 9 se muestra su Rf y sus respectivas MM de las bandas detectadas.

Tabla 8. Determinación de masas moleculares de esterases de suero de conejo. Se utilizaron las Rf de las bandas y las masas moleculares de los marcadores para calcular los pesos moleculares de las bandas que presentaron actividad esterasa.

Esterasa	Rf	Peso Molecular
1	0.92	15 kDa
2	0.71	24 kDa
3	0.35	47 kDa
4	0.25	74 kDa
5	0.13	100 kDa
6	0.0686	150 kDa

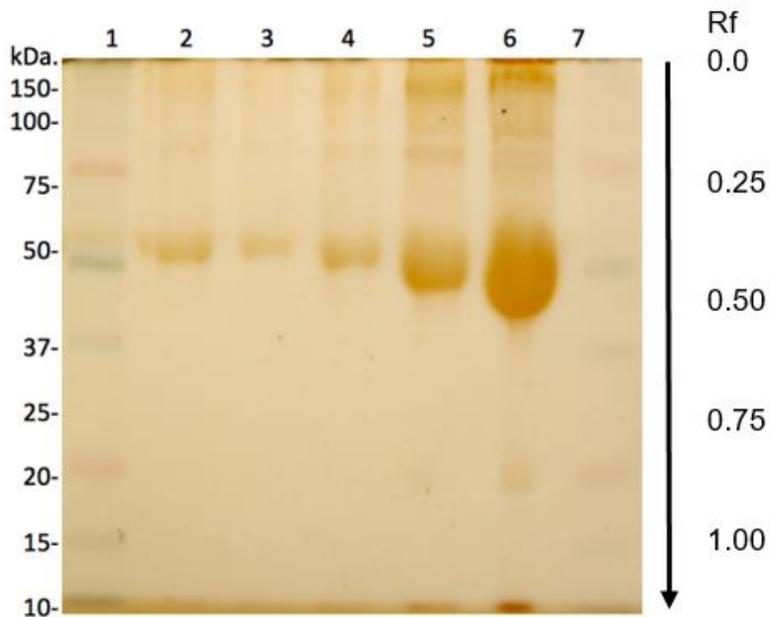


Figura 16. Detección de la actividad de esterases en el suero de conejo. Se realizaron diluciones seriadas del suero de conejo en los carriles 2 al 6, con un factor de dilución de 0.5, se detectaron 6 bandas con actividad de esterasa, visibles por su coloración rojiza. Se utilizó un marcador Precision Plus Protein standards BIO-RAD en los carriles 1 y 7, las masas moleculares se indican a la izquierda del gel.

Tabla 9. Determinación de masas moleculares de esterases de *C. elegans*. Se utilizaron las Rf de las bandas enzimáticas además de las masas moleculares de los indicadores de masas moleculares para calcular las masas de las enzimas identificadas.

Esterasa	Rf	Peso Molecular
1	0.325	34 kDa
2	0.183	55 kDa
3	0.116	72 kDa
4	0.075	95 kDa

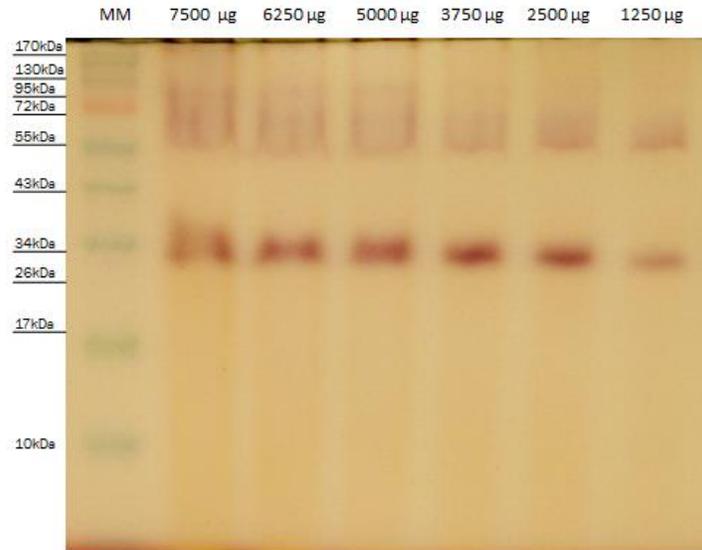


Figura 17. Detección de la actividad de esterasa del nematodo de referencia *C. elegans*. En este zimograma se pueden observar 4 bandas con actividad de esterasa, el objetivo era detectar las bandas que pudieran coincidir con de *F. hepatica*.

Se realizó un zimograma con diluciones dobles seriadas de extractos de *F. hepatica* en fase adulta. Se puede observar la presencia de 3 posibles esterasas, de las cuales resalta una banda de 90 kDa que muestra una actividad intensa, además de dos bandas adicionales con menor actividad que se detectaron en 300 y 60 kDa.

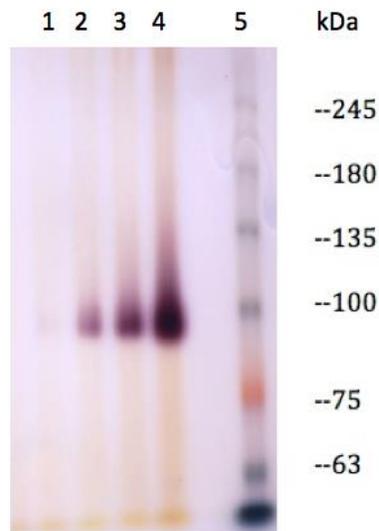


Figura 18. Detección de la actividad de esterasa en extractos de *Fasciola hepatica* en fase adulta. Se hizo una separación electroforética de extractos de *F. hepatica* en fase adulta usando

diluciones dobles seriadas iniciando en 500 ng en el carril 4. En el carril 5 se encuentra el marcador para proteínas de Fermentas Life Sciences PageRuler™ y cuyas masas se indican a la derecha del gel.

Posteriormente se realizó un zimograma utilizando extractos de *F. hepatica* en fase adulta y en fase juvenil, además de extracto de hígado como muestra control. Se encontraron tres bandas con actividad esterasa, destacando la que se señala en la Figura 19 y que tiene una masa aproximada de 90 kDa. En la muestra control (hígado) la banda con mayor actividad migra alrededor de 60 kDa y coincide con una banda de la misma masa en los extractos de *Fasciola*, por lo que se descartó para futuros análisis.

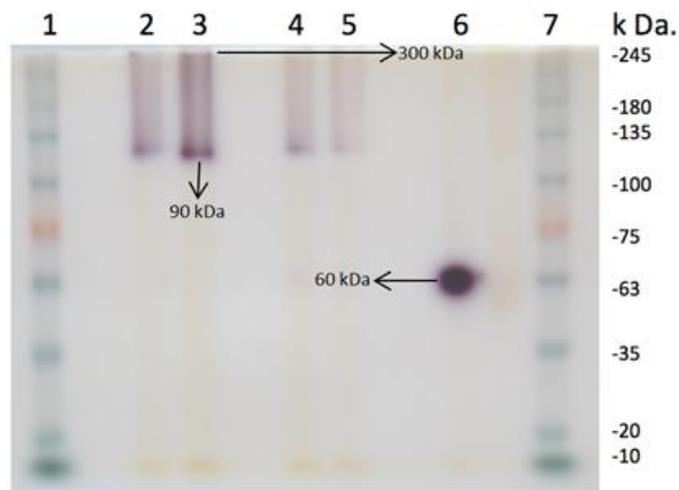


Figura 19. Detección de la actividad de esterasa en extractos de *Fasciola hepatica* en fase juvenil y en fase adulta. Se hizo una separación electroforética de extractos de dos estadios, fase adulta (carriles 2 y 3) y fase juvenil (carriles 4 y 5) y de la muestra control de extracto de hígado (carril 6). Se observan 3 posibles bandas de actividad esterasa, de las cuales resalta la banda de 90 kDa que aparece con mayor actividad en todas las muestras. Otras bandas de actividad esterasa se detectan con pesos aproximados de 300 y 60 kDa.

7.4 Isozimas de carboxilesterasas de *F. hepatica* en PAGE nativo

Con el fin de detectar isoenzimas con actividad esterasa que nos permitieran identificar distintos patrones de actividad en los diferentes estadios de desarrollo, se obtuvieron extractos proteicos de *F. hepatica* juvenil y adulta, y se

realizó un PAGE nativo. Se detectaron alrededor de 7 isoenzimas para extractos de *F. hepatica* adulta (carril 1), mientras que para los estadios juveniles se observaron 4 (carril 2). Todas estas isozimas corresponden a la banda de 90 kDa identificada por SDS-PAGE. La movilidad electroforética relativa de las enzimas se registró para subsanar la falta de marcador de masa y/o carga eléctrica.

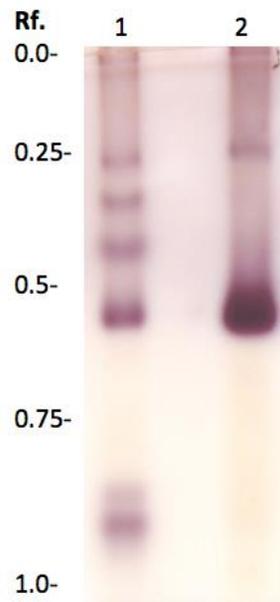


Figura 20. Perfiles de actividad de esterasa en extractos de *F. hepatica* en fase adulta y en fase juvenil. Se identificó un patrón de isozimas diferente para cada fase de desarrollo, detectándose alrededor de 7 isoenzimas para extractos de *F hepatica* adulta (carril 1), mientras que para los estadios juveniles se observaron 4 (carril 2).

7.5 Detección de carboxilesterasas de *F. hepatica*

Se hizo la separación electroforética del extracto de *F. hepatica* adulta usando un gel nativo, después de esta se cortaron los carriles para una segunda separación en SDS-PAGE, posteriormente se tiñó con Fast Garnet y α -Naftil acetato para la detección de las carboxilesterasas y finalmente se contratiñó mediante la técnica de tinción de plata. En el zimograma obtenido se puede apreciar que fue detectada una mancha color rojo, que corresponde a una proteína con actividad enzimática (Figura 21).

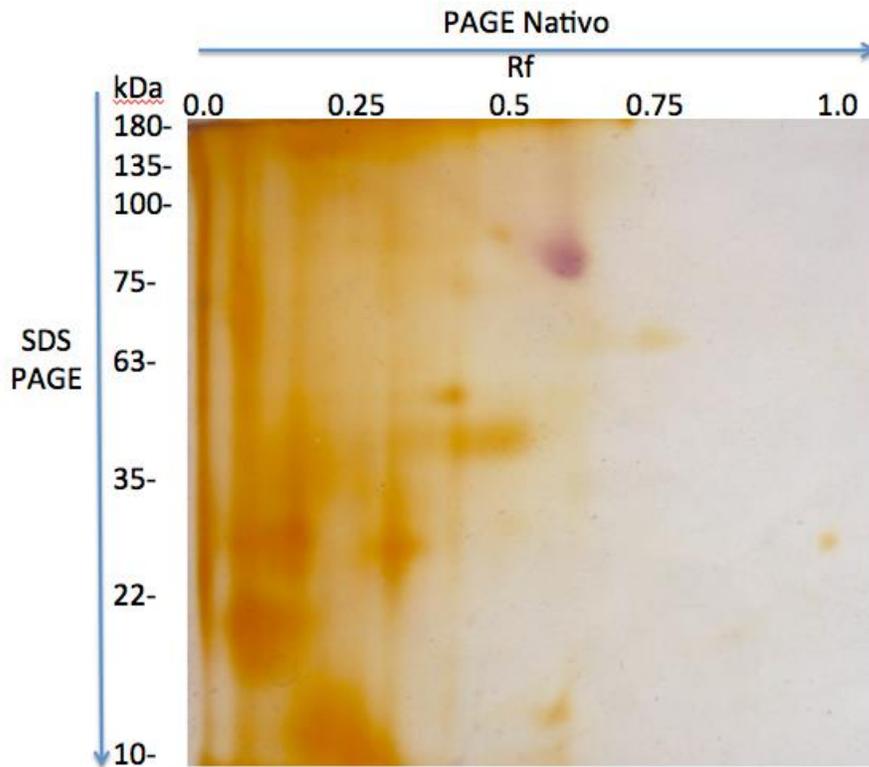


Figura 21. Zimograma 2D de extractos proteicos de *F. hepatica* en fase adulta. Se utilizaron extractos de *Fasciolas* en fase adulta y se sometieron a electroforesis PAGE 2D, los geles así procesados se revelaron mediante sustratos enzimáticos cromogénicos. La actividad enzimática se identifica como manchas rojas en el gel. Las manchas color marrón corresponden a proteínas contrateñidas sin actividad enzimática. Se muestran las masas de los marcadores en kDa. Para la dimensión desnaturalizante en SDS y la movilidad electroforética relativa (Rf) en la dimensión nativa.

7.6 Análisis densitométrico de *F. hepatica* en fase juvenil y en fase adulta

Para el análisis densitométrico se utilizaron dos estadios diferentes de *Fasciola hepatica* (juvenil y adulto) (Figura 22). Los análisis mostraron que las diferentes isoformas tienen una actividad enzimática específica distintiva para los diferentes estadios de desarrollo, lo que refuerza la hipótesis de que la actividad de esta enzima también modula la maduración de la duela hepática.

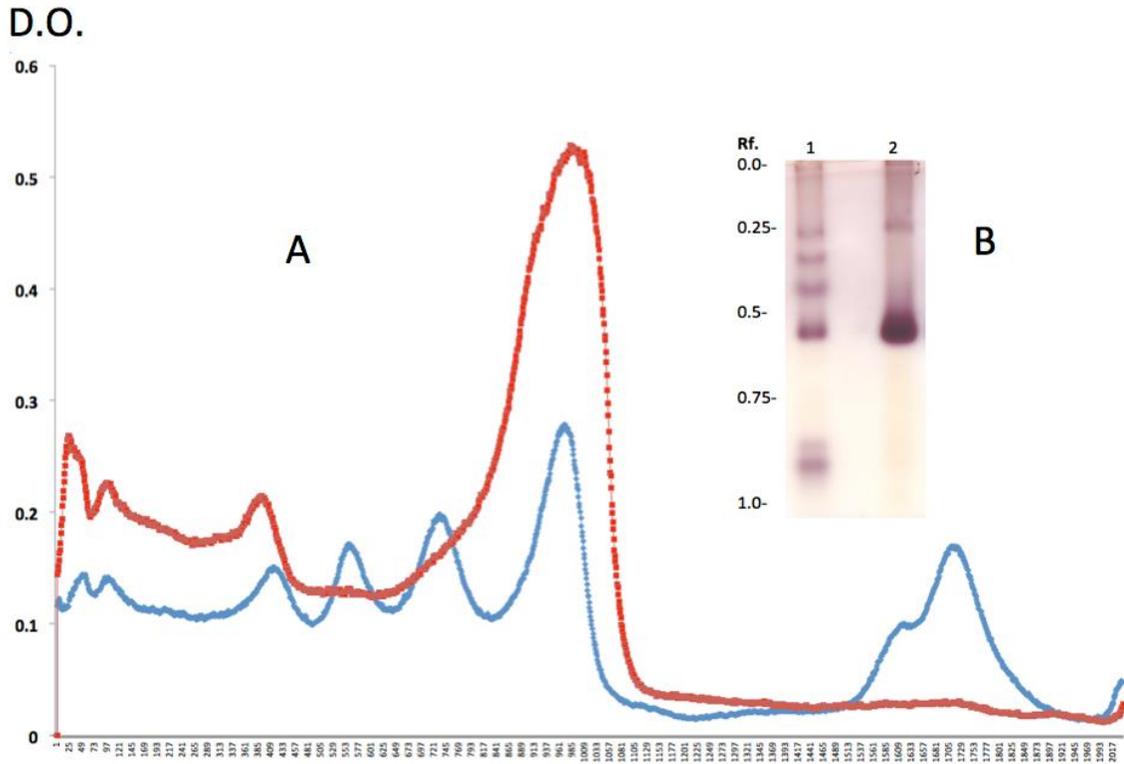


Figura 22. Análisis densitométrico de dos diferentes estadios de *F. hepatica*. Se hicieron extractos de diferentes cepas del parásito y se encontró un diferente patrón de isozimas que muestra lecturas fácilmente identificables por densitometría (A). Las líneas rojas corresponden al fenotipo enzimático de la fase adulta en el carril 1 de B, mientras que el carril 2 corresponde a la línea azul del gráfico y al fenotipo enzimático de la fase juvenil.

7.7 Isozimas de carboxil-esterasas de *F. hepatica* en IEF-PAGE

Se realizó el cálculo del pI de las isozimas visualizadas en el gel nativo, mediante geles Novex pH 3-10. Se observó que las isozimas tienen un punto isoeléctrico que se encuentra en un rango de 4.6 a 6.2 aproximadamente.

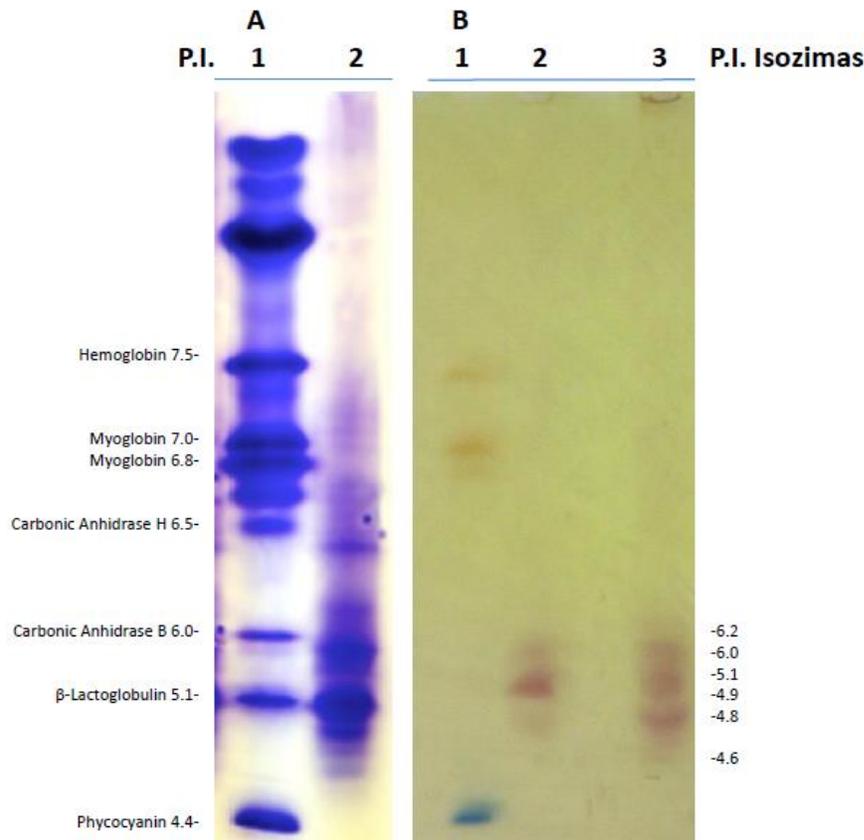


Figura 23. Determinación del punto isoeléctrico de las isozimas de carboxilesterasa de *Fasciola hepatica*. Se usaron geles Novex pH 3-10, los extractos del parásito se aplicaron junto con marcadores de punto isoeléctrico BIORAD con nueve proteínas con un rango de pI entre 4.4 -9.6, una vez separadas por electroforesis, las muestras se procesaron para identificar las isozimas de carboxilesterasa mediante tinción enzimática específica y se registraron las diferentes isozimas comigrando con los marcadores de pI conocido. A1 Marcadores de pI teñido con ácido acético, A2 extracto de *F. hepatica* teñido con ácido acético, B1 marcadores de pI, B2 extracto de *F. hepatica* fase juvenil, B3 extracto de *F. hepatica* adulta.

7.8 Secuenciación de carboxilesterasas

7.8.1 Extracción de RNA total y purificación de mRNA

El RNA total de los helmintos se extrajo siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante del kit RNAqueous® 4PCR kit (Ambion).

Se enviaron cuatro muestras (descritas en la Tabla 10) de RNA total a BGI Genomics Co., Ltd para el procedimiento de secuenciación de transcriptoma en un

equipo de secuenciación masiva Illumina HiSeq® y de cada muestra se generaron aproximadamente 10.03 Gb de información sobre cada transcrito encontrado, su homología con secuencias previamente reportadas, así como su probable función biológica y expresión diferencial comparando unas con otras. Las muestras fueron procesadas de acuerdo con el procedimiento descrito en la Figura 24.

Tabla 10. Muestras de RNA total de *F. hepatica* enviadas a secuenciación

Abreviatura	Descripción
FJ	<i>Fasciolas</i> juveniles
FST	<i>Fasciolas</i> adultas sin tratamiento
FT	<i>Fasciolas</i> adultas tratadas con triclabendazol
FT2	<i>Fasciolas</i> adultas tratadas con albendazol



Figura 24. Flujo de trabajo experimental del transcriptoma. Los mRNA se aíslan del RNA total con el método de oligo (dT). Luego, los mRNA se fragmentan bajo ciertas condiciones. A continuación, se sintetizan cDNA de la primera cadena y cDNA de la segunda cadena. Los fragmentos de cDNA se purifican con un tampón de elución para la reparación final y la adición de un solo nucleótido A (adenina). Después de eso, los fragmentos de cDNA están unidos con los adaptadores. Esos fragmentos de cDNA con un tamaño adecuado se seleccionan para la amplificación por PCR.

Agilent 2100 Bioanalyzer y ABI StepOnePlus Real-Time PCR System se utilizan en la cuantificación y calificación de esas bibliotecas.

Se obtuvo una tasa promedio de mapeo del genoma de 81.29% y la tasa promedio de mapeo de genes fue de 62.81%. Se identificaron 30,105 genes, de los cuales 28,669 son genes conocidos y 1,237 son genes nuevos.

7.8.2 Secuenciación Masiva en ILLUMINA HISEQ®

7.8.2.1 Secuenciación de lecturas de filtrado

Las secuencias de lecturas que contienen baja calidad, adaptador contaminado o un alto contenido de bases desconocidas (N), debe procesarse para eliminarse antes de los análisis posteriores. El rendimiento de los datos originales se muestra en la Figura 25. Las métricas de calidad de lectura limpia se muestran en la Tabla 11. La distribución del contenido de bases y la calidad se muestran en la Figura 26 y la Figura 27, respectivamente.

Clasificación de Lecturas de Datos Crudos (FST)

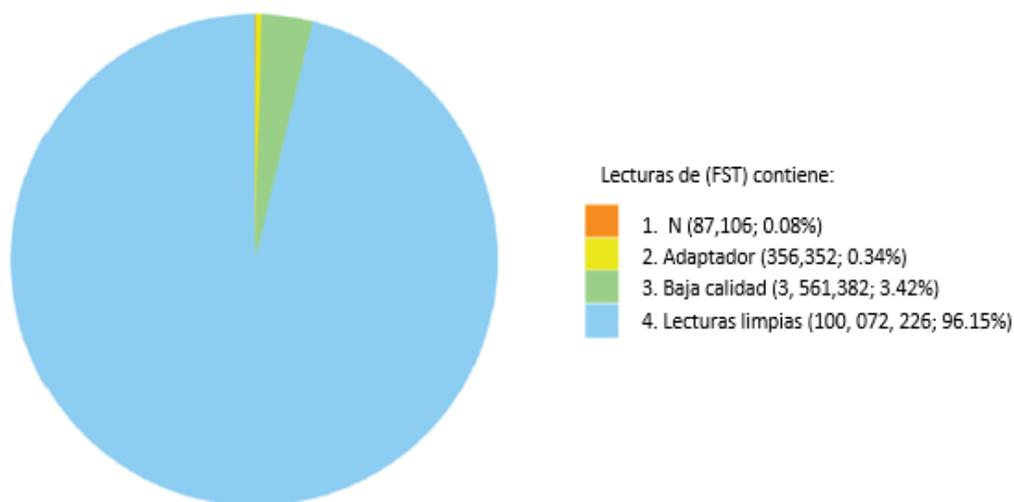


Figura 25. Gráfico de composición del filtro de datos brutos.

Tabla 11. Métrica de lectura limpia						
Muestra	Total de lecturas sin procesar (Mb)	Total de lecturas limpias (Mb):	Total de bases limpias (Gb):	Lectura limpia Q20 (%):	Lectura limpia Q30 (%):	Proporción de lecturas limpias (%):
FST	104.08	100.07	10.01	99.36	97.74	96.15
FT	106.34	100.32	10.03	98.67	95.22	94.34
FT2	106.34	100.64	10.06	99.28	97.62	94.64
FJ	105.08	100.02	10.01	99.40	97.70	96.15

Respecto a la secuenciación de alta calidad, la curva A (base adenina) debe solaparse estrictamente con la curva T (base timina) y la curva G (base guanina) debe superponerse con la curva C (base citosina) según el principio de complementariedad del emparejamiento de bases, excluyendo las primeras seis posiciones de bases debido a la plataforma de secuenciación de Illumina usando un cebador hexámero aleatorio para sintetizar cDNA, lo que podría dar lugar a un sesgo de PCR. Se muestran grandes fluctuaciones en las primeras seis posiciones de la base a lo largo de la lectura, lo cual es una situación normal (Figura 26).

Composición porcentual de bases a lo largo de la lectura

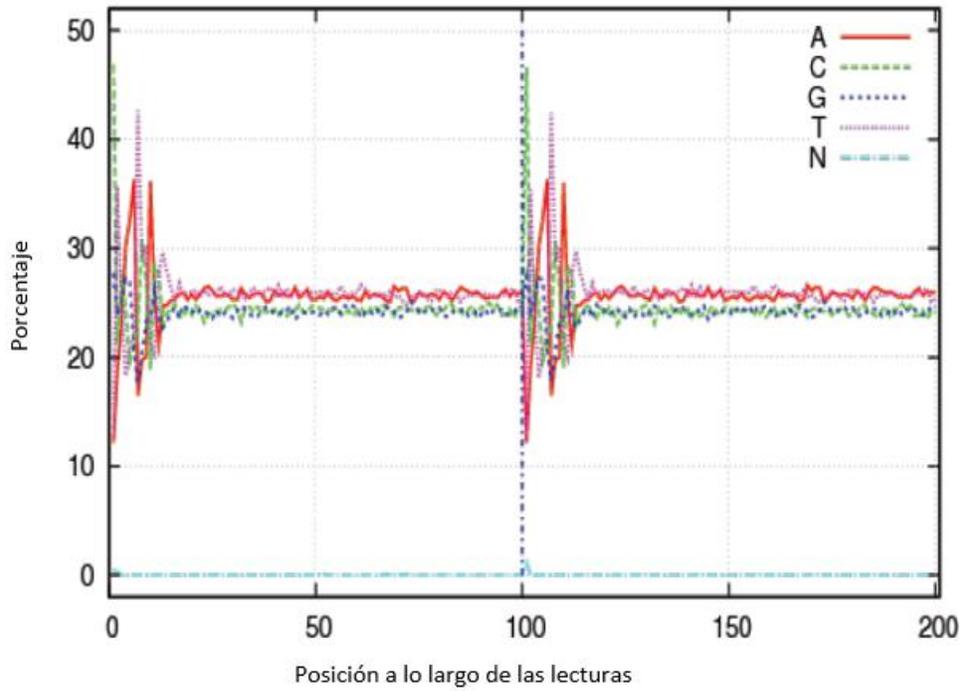


Figura 26. Distribución del contenido de bases en lecturas limpias. El eje X representa la posición de la base a lo largo de las lecturas. El eje Y representa el porcentaje de contenido de bases.

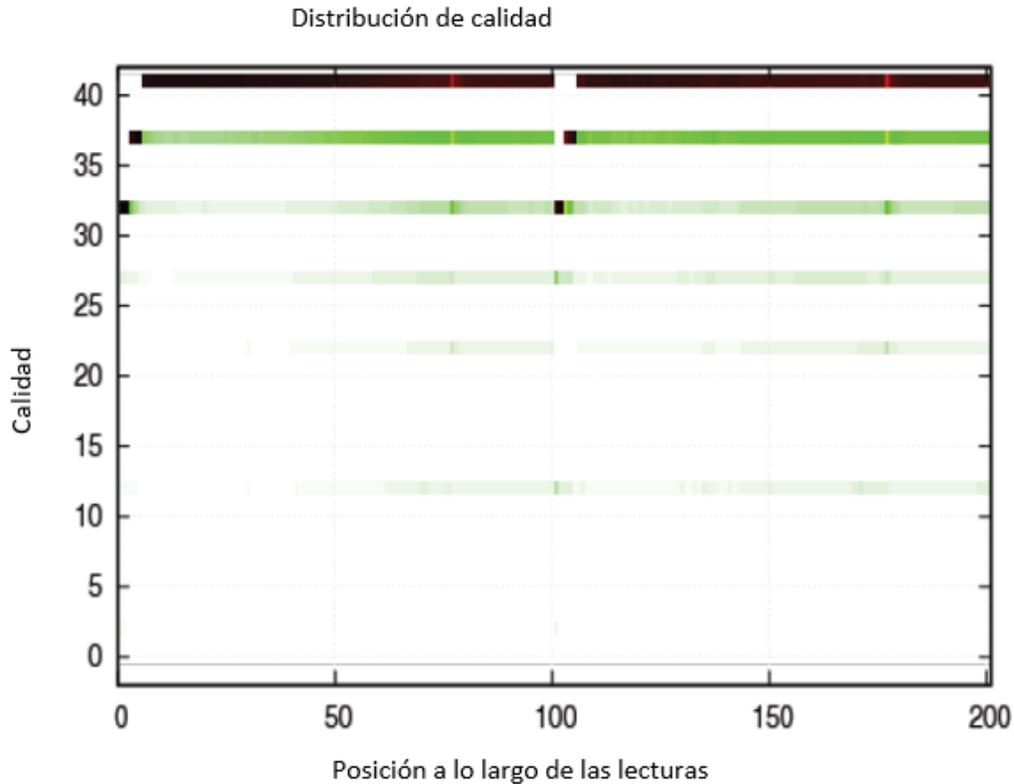


Figura 27. Distribución de la calidad de las bases en lecturas limpias. El eje X representa las posiciones de las bases a lo largo de las lecturas. El eje Y representa el valor de calidad de la base. Cada punto en la imagen representa el número total de bases con cierto valor de calidad de la base correspondiente a lo largo de las lecturas. El color de punto más oscuro significa un mayor número de bases. Si la proporción de bases con baja calidad (<20) es muy baja, eso significa que la calidad de secuencia de esta línea es buena.

7.8.2.2 Mapeo del genoma

Después de leer el filtrado, se mapearon las lecturas limpias para hacer referencia al genoma usando HISAT. En promedio, se mapearon lecturas con una cobertura del 81.29%, y la uniformidad del resultado del mapeo para cada muestra sugiere que las muestras son comparables entre si. Los detalles del mapeo se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Resumen de la asignación del genoma

Muestra	Total de lecturas limpias	Proporción total de mapeo	Proporción de mapeo único
FST	100,072,226	82.53%	44.51%
FT	100,316,766	77.31%	54.55%
FT2	100,642,128	84.03%	58.37%
FJ	100,716,766	87.31%	59.55%

7.8.2.3 Predicciones de transcripciones NOVEL

Después del mapeo del genoma, se reconstruyeron transcripciones utilizando StringTie y con la información de anotación del genoma, se identificaron nuevas transcripciones usando Cuffcompare y se predijo la capacidad de codificación de esas nuevas transcripciones utilizando CPC. En total, se identificaron 20,743 nuevas transcripciones, la información detallada se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Resumen de Transcritos NOVEL

Total de Transcritos NOVEL	Transcritos codificados	Transcritos no codificados	NOVELS esperados	Genes NOVEL
20,743	15,530	5,213	14,293	1,237

7.8.3 Reporte de secuenciación masiva

7.8.3.1 Mapeo y expresión genética

Después de la detección de transcripciones novedosas, se fusionaron nuevas transcripciones de codificación con transcripciones de referencia para obtener una referencia completa, luego se le asignaron lecturas limpias usando Bowtie2, posteriormente se calculó el nivel de expresión génica para cada muestra con RSEM. La relación de mapeo génico se muestra en la Tabla 14. Y el número de genes y transcripciones de cada muestra se muestra en la Tabla 15.

Tabla 14. Resumen de la proporción de mapeo de genes

Muestra	Total de Lecturas limpias	Proporción total de mapeo (%)	Proporción de mapeo exclusivo (%)
FJ	99,361,682	69.42	53.16
FST	100,072,226	52.46	33.21
FT	100,316,766	57.13	48.97
FT2	100,642,128	72.24	57.26

Tabla 15. Estadísticas de genes y transcripciones

Muestra	Número total de genes	Número de genes conocidos	Número de genes NOVEL	Número total de transcritos	Número de transcritos conocidos	Número de transcritos NOVEL
FJ	21,164	19,964	1,200	30,608	16,274	14,334
FST	25,423	24,209	1,214	35,036	20,681	14,355
FT	16,608	15,567	1,041	23,719	10,758	12,961
FT2	20,177	19,944	1,233	29,584	14,977	14,607

7.8.3.2 Cobertura de lectura y análisis de distribución de transcripciones

Posteriormente se calculó la cobertura de las lecturas y la distribución de cada transcripción detectada, las cuales se muestran en la Figura 28 y la Figura 29, respectivamente.

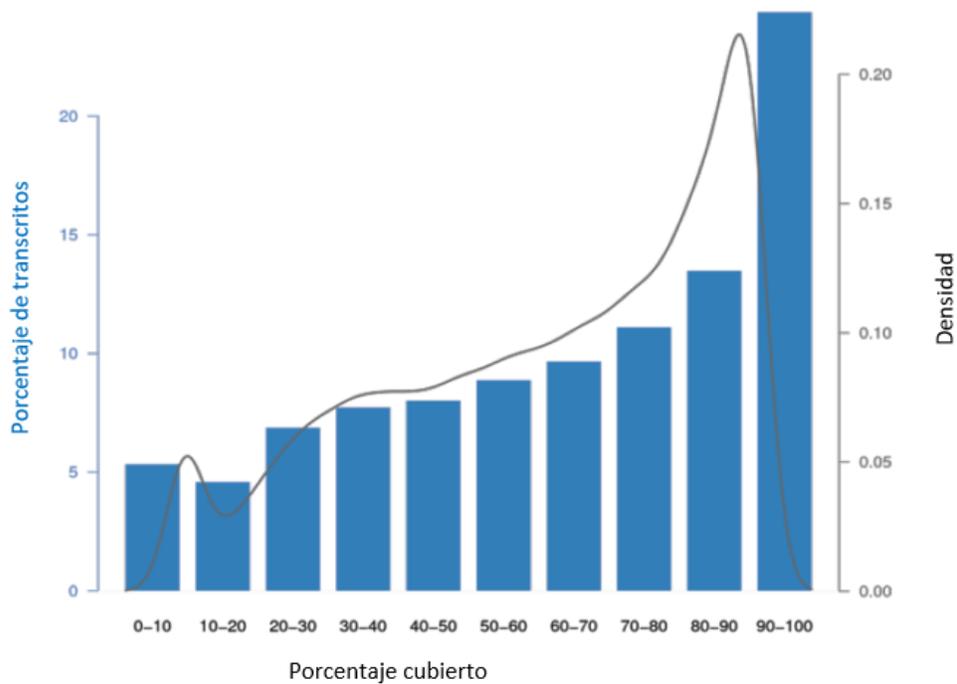


Figura 28. Cobertura de lecturas de las transcripciones. El eje X representa la cobertura de lectura. El eje Y del lado izquierdo representa el porcentaje de transcripciones. El eje Y del lado derecho representa la densidad de las transcripciones.

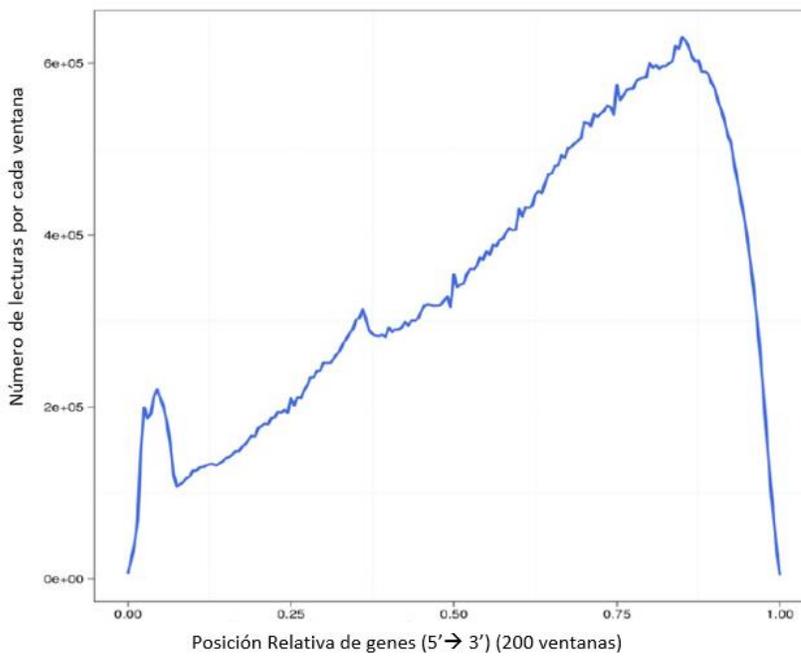


Figura 29. Distribución de lecturas en las transcripciones. El eje X representa la posición a lo largo de las transcripciones. El eje Y representa el número de lecturas.

7.8.3.3 La distribución de la expresión génica

Con base en la información de expresión, se diseñó el diagrama de caja para mostrar la distribución del nivel de expresión génica de cada muestra, además de que podemos observar la dispersión de la distribución (Figura 30). El mapa de densidad puede mostrar el cambio en la abundancia de genes y reflejar la concentración de expresión génica en el intervalo de muestra, como se observa en la Figura 31.

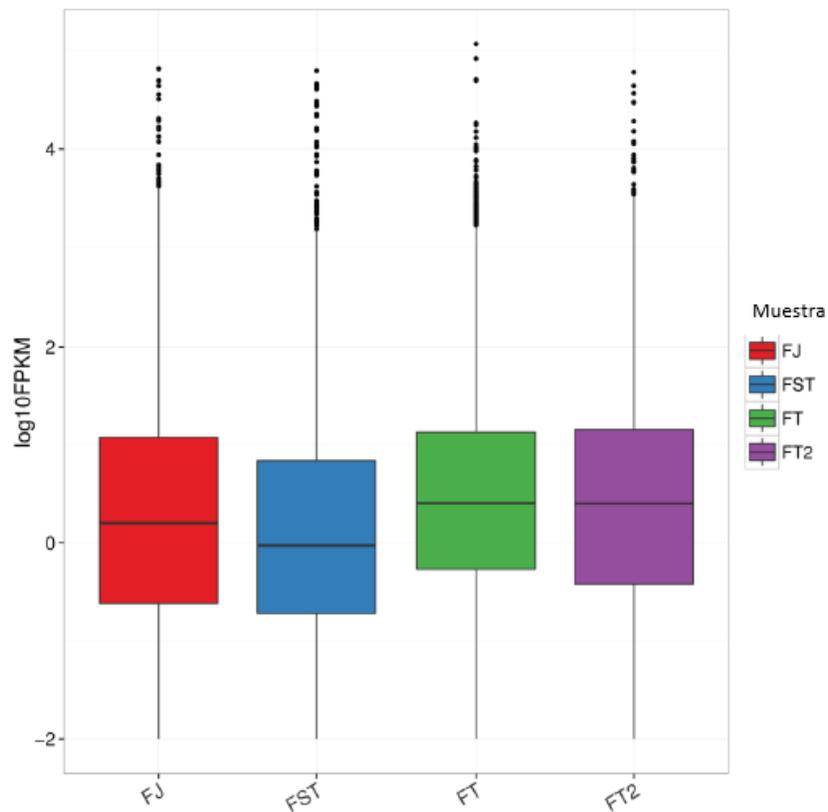


Figura 30. Diagrama de caja de expresión génica. El eje X representa el nombre de la muestra. El eje Y representa el valor log10FPKM.

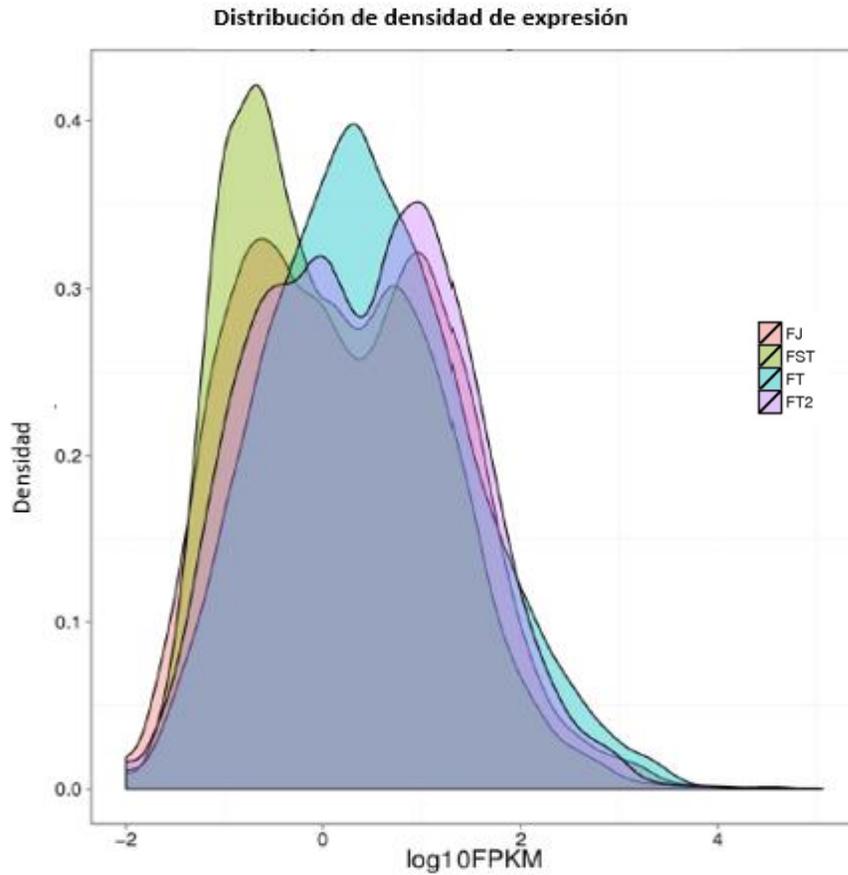


Figura 31. Mapa de densidad de expresión génica. El eje X representa el valor $\log_{10} \text{FPKM}$. El eje Y representa la densidad del gen.

Para mostrar la cantidad de genes con diferentes valores de FPKM, se calculó la cantidad de genes en tres rangos diferentes de FPKM ($\text{FPKM} \leq 1$, $\text{FPKM} 1 \sim 10$, $\text{FPKM} > 10$), lo cual se muestra en la Figura 32.

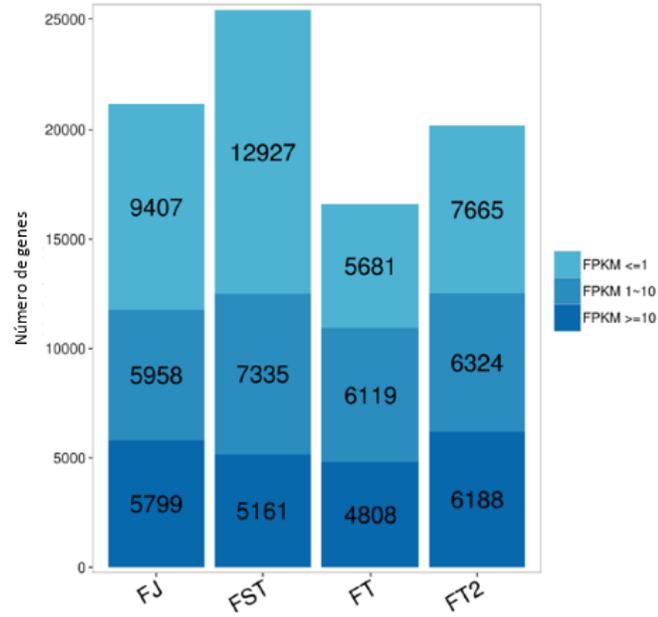


Figura 32. Distribución de la expresión genética. El eje X representa el nombre de la muestra. El eje Y representa la cantidad de genes. El color oscuro significa el nivel de expresión alto cuyo valor $FPKM \geq 10$, mientras que el color claro significa el nivel de expresión bajo cuyo valor $FPKM \leq 1$.

Para mostrar la cantidad de genes nuevos y genes conocidos, se calculó la cantidad de genes (Figura 33) y se analizó la relación de expresión (Figura 34).

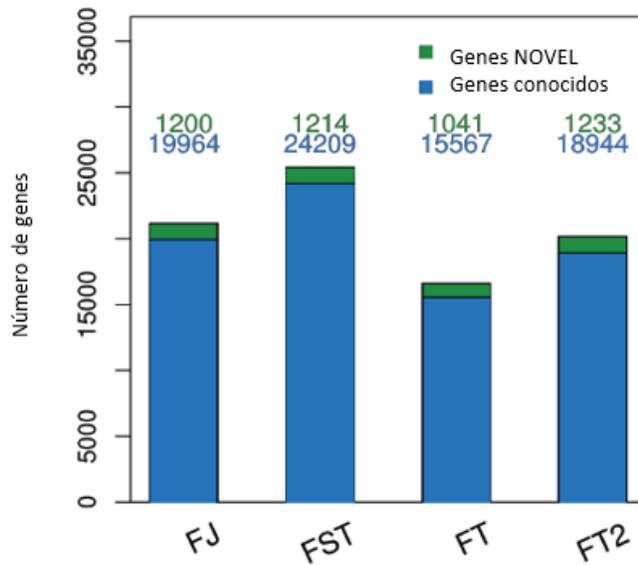


Figura 33. Estadísticas de genes nuevos y genes conocidos. El eje X representa el nombre de la muestra. El eje Y representa la cantidad de genes.

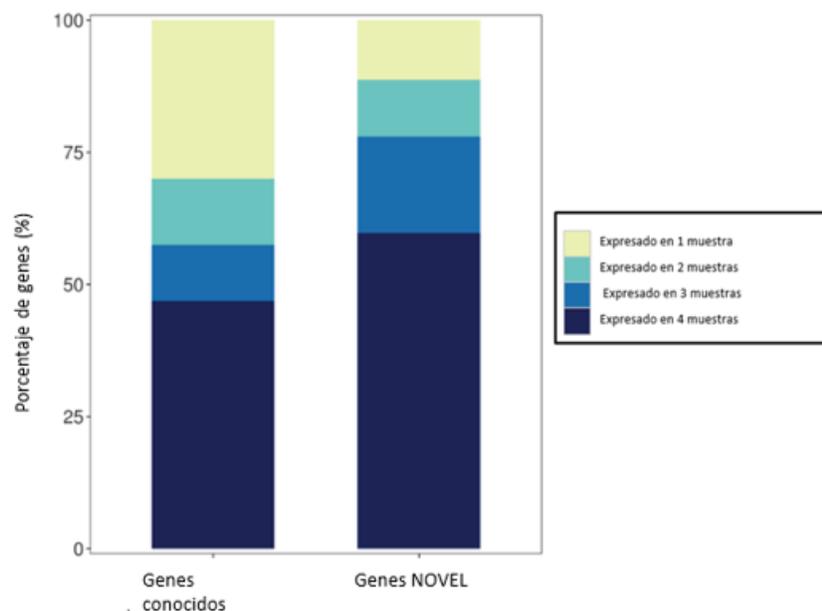


Figura 34. Distribución de expresión de genes nuevos y conocidos. El eje X representa el tipo de gen. El eje Y representa el porcentaje de genes expresados en diferentes muestras.

7.9 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

Del total de secuencias obtenidas, al analizarlas, se encontró que 4 probablemente pertenezcan a alguna carboxilesterasa. En la Tabla 16 se presentan algunas características obtenidas de la secuenciación.

Tabla 16. Identificación de las secuencias encontradas como carboxilesterasa

Número de Secuencia	Número de identificación	de Homología proyectos secuenciación reportadas en el GENBANK	con de Actividad biológica que presentan
1	BGI_novel_T000469 gene=BN1106_s80B0005 25g	BGI_novel_T000525, cl LN627097.1_mrna_2822	Componente integral de membrana (GO:0016021//integral component of membrane)
2	BGI_novel_T004515 gene=BN1106_s903B000	BGI_novel_T004962,BGI_novel_T004963, cl LN62	Además, presenta actividad de hidrolasa y

	404g	7920.1_mrna_25216	colinesterasa (GO:0052689//carboxylic esterhydrolase activity;GO:0004104//cholinesterase activity)
3	BGI_novel_T004516 gene=BN1106_s903B000 404g		
4	BGI_novel_T012214 gene=BN1106_s4004B000 0028g	BGI_novel_T013462,lcl LN631021.1_mrna_68960	Componente integral de membrana (GO:0016020//membrane;GO:0016021//integral component of membrane)

Se realizó una gráfica para comparar la cantidad de fragmentos existentes en cada una de las muestras por millón de kilobase (Figura 35).

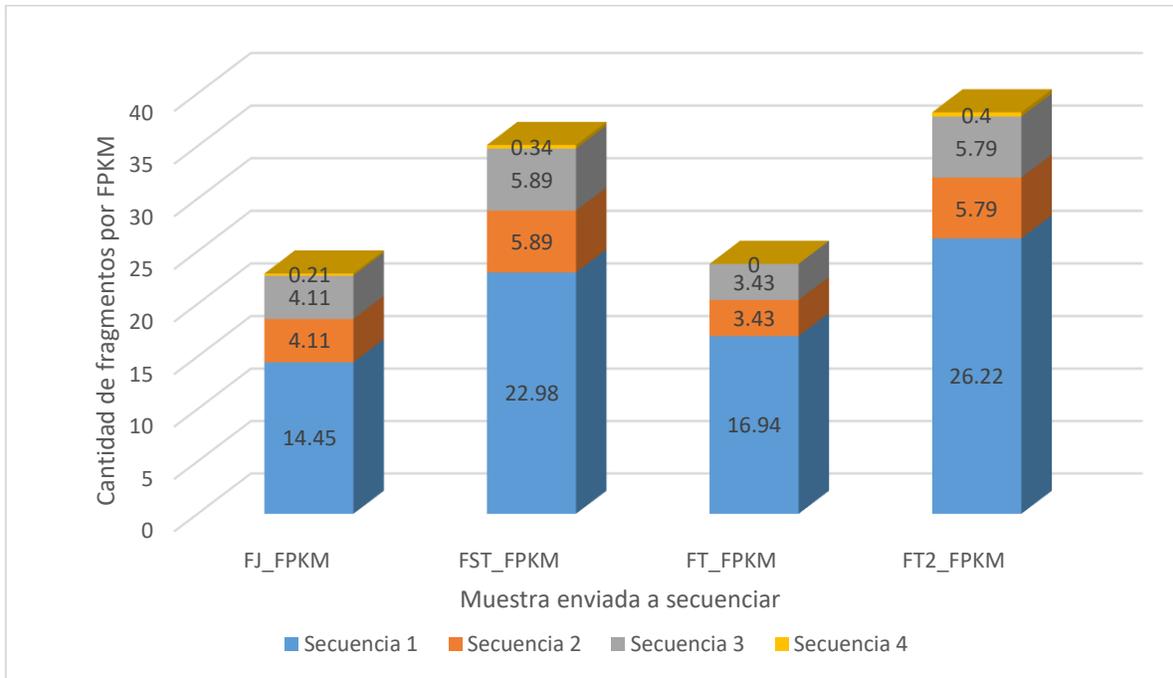


Figura 35 . Grafica de FPKM en cada una de las muestras de *Fasciola hepatica*.

7.9.1 Marcos de lectura abiertos

Se procedió a buscar los marcos de lectura abierto mediante la opción ORF FINDER del NCBI. En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos en forma de resumen.

Tabla 17. Datos obtenidos mediante ORF FINDER.

Secuencia	ORF	Cadena	Inicio	Fin	Tamaño (nt/aa)
1	8	+	791	2998	2208/735
2	4	+	844	2937	2094/697
3	7	+	120	1271	1152/383
4	2	+	565	>1836	1272/423

7.9.2 Alineamiento de las secuencias

A continuación, se muestran las secuencias completas con sus respectivos marcos de lectura abierto, además se presenta el SMART BLAST obtenido a partir de estos.

- **Secuencia 1:**

```
>BGI_novel_T000469_gene=BN1106_s80B000525g
taatcCTTTACTTCCTTTTATTAAGTGTACATCGAAGTTACAATATTTCTGAAAAGGGGTC
ACAGCCGATGAGACGCCATCTAAtaggaaatcaatcagagacGGTGAGAGTCGAACTCGG
AACAGCAAGGTGTAAAGGCTGCCAAGGTGCTCTTTATTATATAACACGTAAGGGGTTGGA
CGAGTTCAGTCTACGATAAGACAccaaaaggaaaaactccatgagctgaGGTTCAGTAAG
TCAGTCAACACGTACCAACACTCACAGTAAACGAGCACCAAAATGGTGGCCTGCAGTCTG
GCTGTACACTGCTCGCCTCaacaaaagaacactgtccgcTGTGTTATATACTCTCTCAT
CGCCACAAACCAACAGTATTCGGTTCCTGGGACCAGAAGATTCACAGTCTTGATTCGG
TTTTTACGTGACATCTGCATTTGTATTATACAGTTTCTTCTCATTTCTTCTTCGTTCTG
CGCTATCCATCTGTCCCTAGTGTGGTGTGCAGATAATGTGCAAGGAGTCGCGTACGTTAA
TCTGTCTCTGTTATAGATGGTAATAAACTATTGTGAGATTATATAAATAACAAAAGGCA
CTTAATAATCAGACCAGTCATAACCTGTGTGATAGATGTAAAGTAGTTGGTTCGAATGCTG
ACAGTTTTGACCACGTGATATTGCAGGGTACTAATTTTCGAATCTCTCTGAGATCAATCA
GTTGATCAATCGTGATTCGTGGGTTCAAAAAGTCCACTTGGACAATCCCATTACACTGT
CTCTGAGCCAATGGGACTCAAAGAGGGAGCGTCCCGTGCAGACAGTCGGGCAGTCTGCCGA
CGAACCTCCGGGTCCAAGCAAGGATGAGGAGAATGAAATGCCACTGGCAGATGGATCAGA
TGATCCGAATGTGCTACATGTACGTAATTACATGAGTCTGAATTCCTTACTACCCAGCCC
AGAAGAATGGGACGAAATTTGTATCGTCAAAAATGGAGAGAATCCGATTTTTGGTCCG
AGTGAGCATAACCTACCTAGTTTTATGGGTCGCGCATGCTCCTGTAGCCATTTGGAAAAC
ATGGTCTCTACAGAATAATGCCGAACCTCAAAGACTACTCTCTGATCGTCCCGGCTTGGG
ACAACCATTACCACCAACTGTATTGTCACAAAATGTGCTGCGTGTGTCCGGAACCTTC
GGACACAAAAGATTGGTACACATTGTTTCAAGTCCCGTACGCCACATTGCCACAACAGAG
TTCATATTTCTCCGCGGCCACCTATCCATTACATTTAAGGAATGCTATTTAGCTTATTG
GCATGGTGTGGCTAAGGAAAAGCGTCGATTTATAGATGGACAAAATTCGATTCATCGGACG
```

TGAGGCGAATGATGACGGCTCGGAATGTGCCcagttgaaaaataaaaaggGTGAATTGGT
TCCGGTCGGTAAACCTCAATCGTGTCTAACTTTGAGCTTTTATTATCCATGGTTTTAGTTC
CAGTCATacggaagagaaaacagtttcGAGGAATGCCAATCGTGGCTATATTGGTGGTTC
ATATCTGATGAATCATAGACCGCAATTACCATCACCGAAAATGGTTGCCGATTTGCGTGT
TCTCTATGTGGCTATCAGTTACCGATTtaggtgtgtttggattttctgatttcgggatcga
tGGTGCGGGACCCAATCACGGTGTGTCGGATGTGCGCGAAGCGTTGATTTGGATCCAAGA
ACACGCTCATCGTTTTGGCGGTGATCCGTCTCGCGTGTGTTGTACGGAGAGAATAGCGG
AGCCACGATTGCTGCTGCACTACTTTCATCCAGTGGTCTGGAGAATTTGATGGTCGGAGG
AGAGTCCCGTTTCGCTATTACAGTCATGTTTGGTTGGCGGATGGATCCGTTGTCATTCCGGA
TGTTCCCGATTACAGGATGCATTCCAACAGTTAGTCCTAAATGATCCATATCTGGCCGA
TGAGTGTAATAAATGGGTGCAGAAATCAGCCAAACATGCGCATATGGACCGCAGCCATCC
ACTTGCCCGAATGTACGAATGTTTGCACGATATGACTGTTCAACAATGGTTACAAAAAAC
TCCGCTAGCATGGCAAGATTACGAACCGCGGATACGACTTTGCTTCCGCAAGCGCATGA
AATGCGCACATCGTTGATTAACCGTATTGGAAAACCTCGTTGGTGAAAATCCGCTAGG
AATGCTTCATCCAAAAGCAACAGGTTGGACACACAGTATCAGAGATATGCCATTAGTGGT
ATTCTCGTTCGATGAATTACGCCTACGATCAATTCGGGAATCAGAACAGTTCGGATCATTG
GAATCTGGAAGAAACAGAACAGAAAGTTGAGAAATGCTTTGAATTCGTTTCGTAAGCCAC
TTCTCAATTGCCATATGCGGATGCCATGTGGAATGCCTATCAAGGCTACTTGAGAAATCT
GATTGCCCTGGCGGCGAGATGATCAGGCACCAGAGGAGATCAACTATAGAAATTTCTACGA
TGTGATTTCGAGGGGATTTGCGCGGGGCATGTCCGTACAATTTATACGAAAACATTTACA
ACTGGGACGATACATTATGGTGAATCCAATATATCGAATTTTGAACCGAATTCAAGTGCA
ACCGTATGTGGATGCGGACGGAGCACGGTGTGATGTGCCGTTCTTCTTGATTGATGAACA
TTTCTATTGTGGGGAAGGTAAGTACTCGACCACTGTACGAGGCATTGGAGCCGGAACAAAAGA
GGTTCCTCGTTTCGAGCATTGTTTTCAGTTCGCCTATTATGGTTCAATCTTAGGAGCTAGAGA
AATGCAGTATCCCCTCAGTTCCGATATGCCATCACTTGAAGCGACCTATAATATTCTCAC
AGAAATGGGTTTGACGACAGCTGGAACACGTGAGATCGCTTTCCTCAAAGCTTGCCAGAT
GTGGATTTCTGAGGAGGGTCTGTTTGAACATGTGATGAAGTATGCGCAAATGAACTGATG
GTTACAAGAACGTAAATTTATCGTTGGTATATCTGAAGGAGAGCTTTTATGACTGGCTGG
ACAATTTATACCCGTTTTAATGAGCTTTGCAACAAGTTTGGGTTAGCTTGTACTCTCCAG
TTACGAATATAAAAAATTGTACTGA

>lcl|ORF8

MGLKEGASRATVQSADEPPGPSKDEENEMPLADGSDDPNVLHVRNYMSL
NSLLPSPEEWDEICHRQKMERIRFLVGVSIYLVLVVAHAPVAIWKTWSL
QNNALKRLLSDRPGLGQPLPPNCIVTKCAALCPEPSDTKDWTFLFRIPY
ATLPPQSSYFSAATYPFTFKECYLAYWHGVAKKRRFIDQIRFIGREAN
DDGSECAQLKNKKGELVPVKGKPSCLTSLFHYWPFSSSHTEEKQFRGMPI
VAYIGGSYLMNHRPQLPSPKMVADLRVLYVAISYRLGVFGFSDFGIDGAG
PNHGVSDVREALIWIQEHARFGGDP SRVMLYGENSGATIAAALLSSSGL
ENLMVGGESRSLFSHVWLADGSVVI PDVPDSQDAFQQLVLNDPYLADECK
KWVQKSAKHAHMDRSHPLARMYECLHDMTVQQLKQTP LAWQDSRTADTT
LLPQAHEMRTSLIKRDLENSLVENPLGMLHPKATGWTHSIRDMP LVVVFSS
MNYAYDQFGNQNSSDHWNLEETEQLRNALNSFRKPTSQLPYADAMWNAY
QGYLRNLIAWRRDDQAPEEIN YRNFYDVIRGDLRGACPYNLYAKHLQLGR
YIMVNPIYRILNRIQVQPYVDADGARCDVPFFLIDEHFYCGEGTRPLYEA

LEPEQKEVLVRAFVQFAYYGSILGAREMQYPLSSDMP SLEATYNILTEMG

LTTAGTREIAFLKACQMWISEEGLFEHVMKYAQM N

Query: unnamed protein product

Query length: 735 aa



Figura. 36 SMART BLAST de la secuencia 1.

- **Secuencia 2:**

```
>BGI_novel_T004515 gene=BN1106_s903B000404g
TAGACTGTACACATGCAGGGAGAAAAGAGGAGGA ACTATAGTTTCCGCTTTTTAAATAGA
ATCGACCTTCTAAAAAAGGCATTCGTATCGTGCACCAATTATGTGCAACTTTTTACAGT
ACCTTCATAAATATTCCTCCTTTTCAATGATAACCAGCTGTTAAACATTTACGGACGTAG
ACTGACGCATCAGTACGGACAGTTTCTTGGTTTGTGAAGAAACAAAATGTAAGAACTTGTC
CAATATTTTGTAAGTTCTGGATGACCGGCGGTCTGCATCCGGTATCGTGGTGGACTATC
GGTCCATATGTCCCTCTTTGGAATCATCCCACGACCGCCGGTAGCCTTCTTTGATGAATA
GCGCCTTTTCTTAGCTATAATAGTATCACATTGTTGAACAATACAAGGAATTAGGTAGTA
GAATGAGAGCACTAGGATAGAAGGGAGATGAAGACGTATATACAGGCCATATGCAAATA
TTACAATGCCGAAATATGCATTTTAAATCCTTTACATATCAAATCACTCAGTAACGTTTg
agttttttattcatttaggaATCAGCAGCCATATTTACAATGCGGTTACTGATCACGGGA
AAATTGATGGCCTTCCAAAATCGTCATTCCTTATTGGTTAATTATTACCATAGTACGTGA
TTTGCAGACAGAATCGACCAATCATACTCTCGCCAGATCATGCAATGGATCATTGGCAC
ATCCCTGAAACACCTACAAATCCGACCTGCAAAAGATAAACGTTGTAATATCTTCGGGA
CATTTTGAAATCGGGTACATGTTTAGGCTGTAATCCTTGTGTAATACCTCCACATTCC
AACATGTTATCCTGTGCGACTAATTTATGGCTCTTAATATTGATATCTGAGATCATCAGG
GAGACTAATCTAGTGCGCCAGCTCCTACAATCACTCTGTCTCACGGAGGAAGAGTTCGT
GGCGCAACAGAAGAGGTGATTTTTCGGGATCAGAAGAAGAACGTGGATTATTTTCTCGGA
ATTCCCTTCGCCAAACCACCAGTTAAAGA ACTCAGATTCGCATCACCGGAAAATCATAAA
GGCTGGGAGGGTATAAGAGATGCCGTCAACCTCCCCCTACTTGTGGCAGTATATTTTT
ACTGGATTTGACATTGCAAATAATGGAGCTCGCATGTGGGTGAACAACACGGAAATGAGT
GAGGATTGCCTTTACCTGAATGTGTGGATGCCTTCaggaaaaataaatgcaactTACCC
GTTATGGTGTGGATTTACGGGGGAGGATACACCAGCGGA ACTTCGACACTTGATGTTTAC
AATGGGAAATTTTTAGCTGCCAAGCAGCACTTGATTGTCTCGTCTCAATGCAGTATCGTCTT
GGTGCATTTGGATTTCTGCGAATCGATCCCAAGCCCACTCGGTTCAACAGAGAATCGGAA
GGCTCGACAAA ACTAGCACTGGGGAATATGGGTCTGAAAGATCAACTGCTTGCATTGGAG
TGGGTTCAAAAAGAAATTAAGAACTTCGGCGGAAATCCAGACAAGTGACCGTGTGTTGGC
GAGTCACTGGGGCGGTGAGTGAACGGCACTGTGGACATCCCCAAAGACTAAAGCACTT
TTCAGACGCGCAATCGTTCAGTCGGGCTCAATTTTTGCTCGATGGGGTTTACATGATTTG
AAAGTTGCAAACCATCGAGCCGTGGTGTGTTTCCAAGGCATGCAACTGCCCTGACCCAACG
GTGGATCCTTCGACAAGTATAAAATGCCTACAGGATGTTGACCCGATGGTCTAGTGAAC
ACGTTGGACGCAGTTATTGAGGATGATGCGGTACAACGAAACAACACAATGTGGGAAAT
TTCTTTCACAAGCTCTCAGCTTCGAGATCGGCAATGGTCCATTCCCCGGCTGGGCTACC
```

AGCAGCCGTCGTTATTTTCGAGGTACCGTTTGCAGCTGTGATTGACGGAGATTTTCTGCCA
AATCATCCACGAAATGTACTTAAATCACCCAATTATAACCAGAGAATCTCCGGAAC TATTG
ATCGGTGTGAATCAGAATGAAGCGATCTACTTCATTCTCTACGGCCTTGCAATGCAAGAG
ACAATGTTTCTGAAAGAGGATGGAAACATCGTACTACCCGAGTCGATCAAAAAGGCCGGT
CTGCGGGAACCACGAAAAAGCGACGGTCAGAAAGCCGATTTTAGATGGATCACGGCATTG
GAATTCCTGGATAAGAGTTTTCTCATCCCGGACTAGCAGCAGCACCAGCAACTTTCTAC
GGTCTGCCAGTGAGTTTTCAACACAACACAGGAGTATGCCTATCCATATGACATAAAACTG
GCCGGAGAAGAGGT CATGAAACGAATCAGCGATTTGGCTTCAGATGCAGACTTCATCTGT
CCGACCTTGGAAATTCGCTGAAATGGCTTCACGACAGTCAAATGCAAAGGTTTACCTATAC
TACTTCCAACAAATGTCTCCCGTCTTCCCTGGCCTACTTGGGTTGGAGCAATGCATGGC
TACGAAATTCATTTGTATTTGGAATTCGATTCGAAAGAATTTATAAAAGAATTTTAT
GGCTTCACTTTGGAGGAAACTGAGTTTGGAGATAAAATGCAACAAC TATGGGTCAATTTTC
GCGAAATACGGTGATCCAAACCTGCCTGTTACCGACCAATATTCAGCTAAGTGGCCATTG
TACAAATCAAATGCGATTAGTGAAAAACAACCGGATCAATGGGATCATTACATTCTGGAT
GTAAACATGCGACCTGGTAGTCGACTCCGGGAGAAAGAATGCGGGTTTTGGTTGCATTTTC
ATGGACGCATATCAACGAGAAGTGCTCGCTGGGGCCATGGCAATATATCCGGCCAATCGA
ACTGGGCTCGTTCTCCTCTGGATATGTATCTTTCCGATAGCGGTTTTGTTGTACTGATCC
AGTCCCGGAGTACAAAAGACGGTTGCAAATATTCTCAAAACTACATAACGACTGTTTTATT
GTCTACCTGTCTTCTAGATATTTAAAGTCAAATGCTAGTGACTCACAGCAAGTTACTTTTC
AATAAagcattaaaaacatcaaaacaaaatttccatcCCGTA AAAAGAACAAGAGCAAAAACA
GGGTAGTCACGAATGTACACATGTTCTGTTCAAAGAACCGAAATAAAACAGGTATCCCT
AACAGTGTTTCGAGGTCAAATCCCCCATATTAGCTGATATTGAGTTGTGTATGTCCACTT
CCCTCTCTTtccaaattgTTTTctttctcctGCAGTCGATTCCCGTTTTATAAGTGATGA
AACAAACCAGTCTATTCTGATTCAAATGGCCATTCCCTCAGTAATCTTCAATGTATTAC
CTCGAATTTAATTCTATCCATCATAAAATTAACCACACAGACGTTCACTATAAAAAGATC
CCCGTCAACCTGTAACAACAAAGAGATGGAATTTCATATTACAAATACATGTTTTTCTGG
TG

>lcl | ORF4

MLSCATNLWLLILISEI IRETNSSAPAPTITLSHGGRVIRGATEEVI FRDQ
KKNVDYFLGIPFAKPPVKELRFASPENHKGWEGIRDAVNLPPTCWQYIFT
GFDIANNARMWVNNTSEMEDCLYLNVMPSGKINANLPVMVWIYGGGYT
SGTSTLDVYNGKFLAAKHDLIVVSMQYRLGAFGLRIDPKPTRFNRESEG
STKLALGNMGLKDQLLALWVQKE IKNFGGNPRQVTVFGESSGAVSVTAL
WTS PKTKALFRRAIVQSGSIFARWGLHDLKVANHRVVF SKACNCPDPTV
DPSTSIKCLQDVPMLVNTLDAVIEDDAVQRNNTMWFNFHKL SASEIG
NGPFPGWATSSRRYFEVPFAAVIDGDFLPNHPRNVLKS PNYTRESPELLI
GVNQNEAIYFILYGLAMQETMFLKEDGNIVLPESIKKAGLREPRKSDGQK
ADFRWITALEFLDKSFLI PGLAAAPATFYGLPVSFNNTQEYAYPYDIKLA
GEEVMKRISDLASDADFICPTLEFAEMASRQSNKVYLYYFQQMSSRLPW
PTWVGAMHGYEIPFVFGI PYSKEFIKEFYGF TLEETEFGDKMQQLWVNFA
KYGDPNLPVTDQYSAKWPLYKSNAISEKQPDQWDHYILDVNMRPGSRLRE
KECGFWLHFMDAYQREVLGAMAIYPANRTGLVLLWICIFRIAVLLY

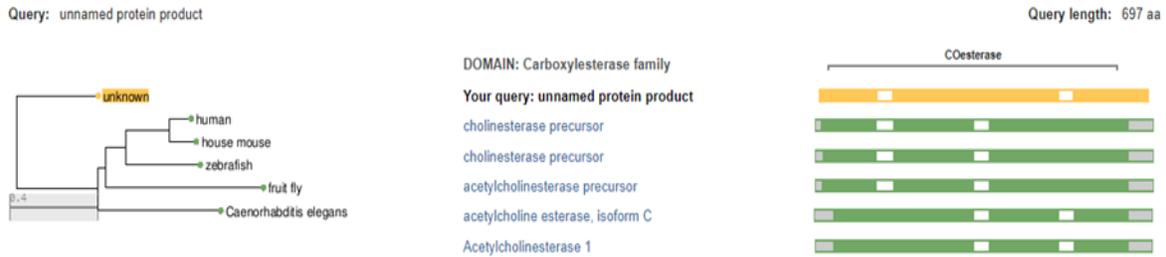


Figura 37. SMART BLAST de la secuencia 2.

- **Secuencia 3:**

```
>BGI_novel_T004516 gene=BN1106_s903B000404g
CTGGTATTCCCGCTAGTAAAATTGTGGTTTTACTGTGATTTTTTCCAAGGCATGCAACT
GCCCTGACCCAACGGTGGATCCTTCGACAAGTATAAAATGCCTACAGGATGTTGACCCGA
TGGTCTAGTGAACACGTTGGACGCAGTTATTGAGGATGATGCGGTACAACGAAACAACA
CAATGTGGGAAAATTTCTTTCACAAGCTCTCAGCTTCCGAGATCGGCAATGGTCCATTCC
CCGGCTGGGCTACCAGCAGCCGTCGTTATTTTCGAGGTACCGTTTGCAGCTGTGATTGACG
GAGATTTTCTGCCAAATCATCCACGAAATGTACTTAAATCACCCAATTATAACCAGAGAAT
CTCCGGAACATTTGATCGGTGTGAATCAGAATGAAGCGATCTACTTCATTCTCTACGGCC
TTGCAATGCAAGAGACAATGTTTCTGAAAGAGGATGGAAACATCGTACTACCCGAGTCGA
TCAAAAAGGCCGGTCTGCGGGAACCACGAAAAGCGACGGTCAGAAAAGCCGATTTTAGAT
GGATCACGGCATTTGGAATTCCTGGATAAGAGTTTTCTCATCCCGGGACTAGCAGCAGCAC
CAGCAACTTTCTACGGTCTGCCAGTGAGTTTCAACACAACACAGGAGTATGCCTATCCAT
ATGACATAAAAATGGCCGGAGAAGAGGTCATGAAACGAATCAGCGATTTGGCTTCAGATG
CAGACTTCATCTGTCCGACCTTGAATTCGCTGAAATGGCTTCACGACAGTCAAATGCAA
AGGTTTACCTATACTACTTCCAACAAAATGTCCTCCCGTCTTCCCTTGGCCTACTTGGGTTG
GAGCAATGCATGGCTACGAAATCCATTTGTATTTGGAATTCGGTATTCGAAAGAATTTA
TAAAAGAATTTTATGGCTTCACTTTGGAGGAACTGAGTTTGGAGATAAAATGCAACAAC
TATGGGTCAATTTTCGCGAAATACGGTGATCCAAACCTGCCTGTTACCGACCAATATTCAG
CTAAGTGGCCATTGTACAAATCAAATGCGATTAGTGAAAAACAACCGGATCAATGGGATC
ATTACATTTCTGGATGTAAACATGCGACCTGGTAGTCGACTCCGGGAGAAAGAATGCGGGT
TTTGGTTGCATTTTCATGGACGCATATCAACGAGAAGTGCTCGCTGGGGCCATGGCAATAT
ATCCGGCCAATCGAACTGGGCTCGTTCCTCTGGATATGTATCTTTCGGATAGCGGTTT
TGTTGTAAGTATCCAGTCCCGGAGTACAAAAGACGGTTGCAAATATTTCTCAAAACTACAT
AACGACTGTTTATTGTCTACCTGTCTTCTAGATATTAAGTCAAAATGCTAGTGACTCAC
AGCAAGTTACTTTCAATAAagcattaaaaacatcaaaacaaaatttccatcCCGTAAAAGA
ACAAGAGCAAAACAGGGTAGTCAGAAATGTACACATGTTTCTGTTCAAAGAACCGAAATA
AAACAGGTATCCCTAACAGTGTTTCGAGGTCAAATCCCCCATATTAGCTGATATTGAGTT
GTGTATGTCCACTTCCCTCTCTTtccaaattgttttcttctcctGCAGTCGATTCCCGT
TTTATAAGTGATGAAACAAACCAGTCTATTCTGATTCAAATTTGGCCATTCCTCAGTAAT
CTTCAATGTATTACCTCGAATTTAATTCTATCCATCATAAAATTAACCACACAGACGTTT
ACTATAAAAAGATCCCCGTCAACCTGTAACAACAAAGAGATGGAATTTTCATATTACAAAT
ACATGTTTTTCTGGTG
```

```

>lcl|ORF7
MVLVNTLDAVIEDDAVQRNNTMWENFFHKLSASEIGNGPFPGWATSSRRY
FEVPFAAVIDGDFLPNHPRNVLKSPNYTRESPELLIGVNQNEAIYFILYG
LAMQETMFLKEDGNIVLPESIKKAGLREPRKSDGQKADFRWITALEFLDK
SFLIPGLAAAPATFYGLPVSFNTTQEYAYPYDIKLAGEEVMKRISDLASD
ADFICPTLEFAEMASRQSNAKVYLYYFQQMSSRLPWPTWVGAMHGYEIPF
VFGIPYSKEFIKEFYGFTELEETEFGDKMQQLWVNFACYGDPNLPVTDQYS
AKWPLYKSNAISEKQPDQWDHYILDVNMRRPGSRLREKECGFWLHFMDAYQ
REVLGAMAIYPANRTGLVLLWICIFRIAVLLY

```



Figura 38. SMART BLAST de la secuencia 3.

- **Secuencia 4:**

```

>BGI_novel_T012214 gene=BN1106_s4004B000028g
TTGGGTTGTCACACGAGTTTGAAATTCGTCACCTTGCTGCGGAAGGAAGGTTAGTCGTT
GACTAGATGGCCTGGATATCTGTTCATACTTGTGCATCGTGTGGCATTTCGATAACTTAC
TTGACTCTTTCCAATGGCCAAAACCTGGTGAATTTTGAAGAGCAAAATCAATCCAAATAAA
CTCCCGCTGTTTACGCCACTACCAAATAAGCGATTCACCTCACGATCCGGAAATCAATAAG
TATGGACCATACCAAATGACGTTATAGTGAACATAACCAAAGTAAGCTGATTGTACCGAT
TGTATTGCAGACCCGGATTTGGTCGTTTTATCGGTTTCGTCTGTACTGGTTAATTACGACT
ATACGTGGTCGCAGTGGCCACCCGGCCGGTTCGGCTGGTAAATGAGTTCCTGGGAATTC
CTTTCGCTGCACCGCCGATCGGAGATCAACGATTCAGAGCAAGTGAATATTTAGTATCTC
GTAATTCATACTCCGCAGAATCCTGTCGTTTCATATTTGGATAACAAGATACCCGTGGTTC
GCGAAAAAATTGCGCCCAGCATGTATGCAACATGATGGATATTTGAAGGCATTTTTAAAG
GTCATTCCCTCCAATGAGTGAGGACTGTCTATATTTAAATATATTCTATCCGAACAGGACA
CATGAAGACCCGACCATTTCGTTATCCAGTGGTAATTCACATTCACGGTGGTAGCTATGTA
TGCGGTTCAAATCACTTATATCCTGGACATGTTCTAGCCTCTATGGGTGTTGTCTTCGTA
TCCATCAGCTATAGACTAGGACCTTTTGACCTGTTTCATCAAGTGATAATGATGTCCGGA
TCTGACTTGTCTGCTGGGCTGTGACCGATCCGAATCGTGTCCGTAGTAGATACTATGCC
ATTGAACTGGGACGTGCGTTAGGTTGCTCATCTGTGCTGGGCGACCGGTGGCTGCTTCC
CAGGCTGCAATGCGTGGAGAACAGTGGAAACCGTCAGGTGCCGCAGACGTACCGGAGGGT
CAATTTGGCAACGGCTCGGCTAAGCCACGACTGGCAATACCCCTTACCCTCGAATTGAT
GCCTCAGCACTGCTACGTTGTTTGCGCCATAAGAGTACAGCGGAAGAGATTGCCAACAAT
TCACTCCTCACTCCACTAGATGGTGCACCAAACCTTTGTTTGGTCTCCGGTGTAGACGGC
ACATCCGTTTTCTTGCCACGAGTTCACCTGGAGGAACGAAAACAGGGTCCGTTTTGATGCG
TTGCCACTTTTGGCAGGTGTCACTCACGACGAAGGCTCACAAGTTCGCTAAGTAATCTC
GCTCGCTGGGAGGAACGACGTTTTTCGTATCAAGGATTTACAGATGCAGTGGTCCGTCGA
ACGATTGGCAACTTCCATAGCGAGAAGGATTTTCGTTTCAAACAACATCGGAAGAA
CTGTACACTCGTTACACTTGGTGGCCCAATATGGCAAACAATTCGCCCCGTTGGGAAAAT

```

```

ATGGTAGCTCTTATTTTCGGACTATGTGATCAATTCACCCTTGGACACAGTGCTTCGATTT
CACGCATCTTCTAATCCCAAACCTATTTTTATGAATTCGCTTACTTGAGTCCGAACGAC
ACCCTTCGGACACCTGAACGAGGAGTCTATCACGGGGCGGAACAGCCGTTTCTATTTGGC
TTTCCTTTTTTGGATGTGGAATTTTGGCAGCGCTATTTTCGGTAGCAAAGATTTGCCGAGA
CTCGCTAACCGGACCTATTTCTACCCGCACGACACAAACGTGAGCGAATGGGTTATGCAA
CGGTGGACTAACTTCGCGAAATACGGGTATGTGATCA

```

```
>lcl|ORF2
```

```

MQHDGYLKAFLKVI PPMSEDCLYLNI FYPNRTHEDPTIRYPVVIHIHGGG
YVCGSNHLYPGHV LASMGVVFVSI SYRLGPFDFLHQVIMMSGSDLSCWAV
TDPNRVRSRYAIE LGRALGCSSVLGDRVAASQAAMRGEQWKPSGAADVP
EGQFGNGSAKPR LAIPFTARIDASALLRCLRHKSTAE EIANNLLTPLDG
APNFVWSPVVDG TSGFLPRVPLEERKQGRFDALPLLAGVTHDEGSQVLLS
NLARWEERRFRI KDFTDAVVRRTIGNFLNSEKVFRFQTTSEELYTRYTWW
PNMANN SARWENMVALISDYVINSPLD TVLRFHASSNPKTYFYEFAYLSP
NDTLRTP ERGVYHGAEQPFLFGFPFLDVEFWQRYFGSKDL PRLANRTYFY
PHDTNVSEWVMQ AWTNFAKYGYVI

```

Query: unnamed protein product, partial



Figura 39. SMART BLAST de la secuencia 4.

Con base en los resultados del SMART BLAST, se determinó que para fines de este trabajo, las secuencias 2 y 3 no son relevantes, ya que presentan funciones más cercanas a las acetilcolinesterasas.

7.9.3 Análisis de la secuencia BN1106_s4004b000028g

Según lo indicado en el reporte de secuenciación, esta secuencia presentó homología con las carboxilesterasas responsables de la ecdisis en *Opisthorchis viverrini* (tremátodo).

Además en el reporte nos proporciona cuál es su expresión diferencial en las cuatro muestras. Se observa que en la muestra de *F. hepatica* en fase adulta tratada con TCBZ, no está presente esta carboxilesterasa (Figura 40).

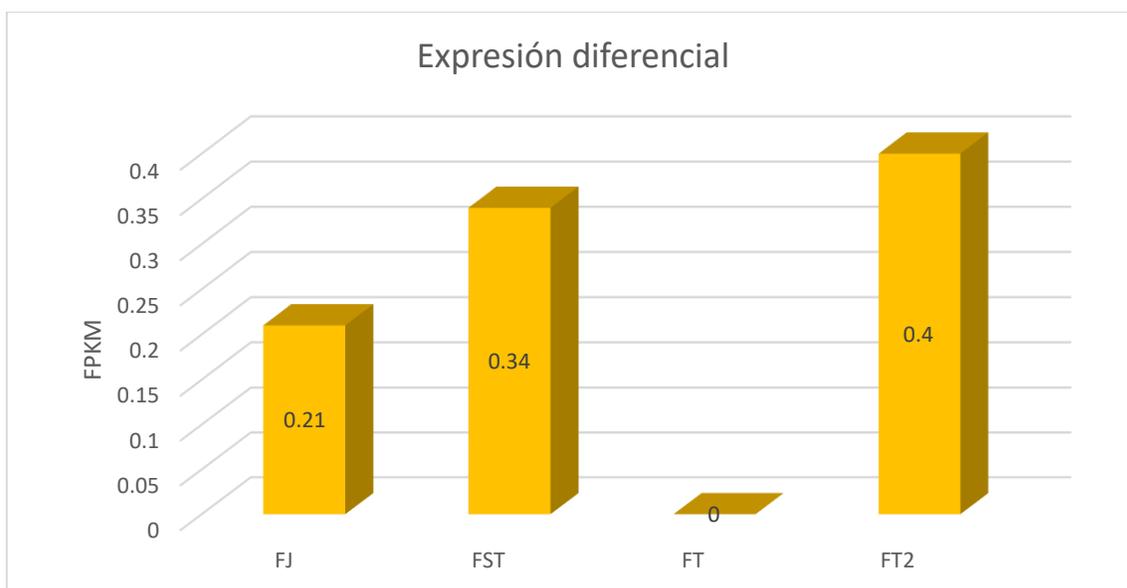


Figura 40. FPKM de la secuencia BN1106_s4004b000028g. Donde las muestras son: FJ, *F. hepatica* en fase juvenil sin tratamiento; FST, *F. hepatica* fase adulta sin tratamiento; FT, *F. hepatica* fase adulta tratada con TCBZ; FT2, *F. hepatica* fase adulta tratada con albendazol.

7.9.3.1 Caracterización de la esterasa BN1106_s4004b000028g

En el sitio https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_toolTheoretical se calculó un punto isoeléctrico de 7.20 y una masa molecular de 48.248 kDa para la secuencia BN1106_s4004b000028g.

En los zimogramas elaborados, es posible observar una banda en el rango de 50 kDa con un muy bajo nivel de expresión.

7.9.3.2 Análisis del número GO de la esterasa BN1106_s4004b000028g

El reporte otorga el número GO: 0016020//membrane, el sitio <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0016020>, lo define como componente de la membrana (Figura 46). Además de que comparte el número GO: 0016021//integral component of membrane con respecto a la CE BN1106_s80B000525, que está definido como un componente de la membrana (Figura 41).

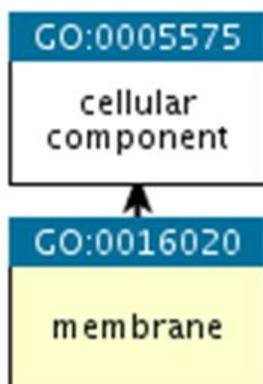


Figura 41. Reporte del número GO de la carboxilesterasa BN1106_s4004b000028g.

7.9.3.3 Análisis de dominios de la esterasa BN1106_s4004b000028g

La secuencia BN1106_s80B000028g de 424 AA contiene los siguientes dominios:

1. AA 1-125, 168-421 Alfa-Beta hidrolasa
2. AA 16-181, 172-421 Carboxilesterasa tipo B

Detailed signature matches

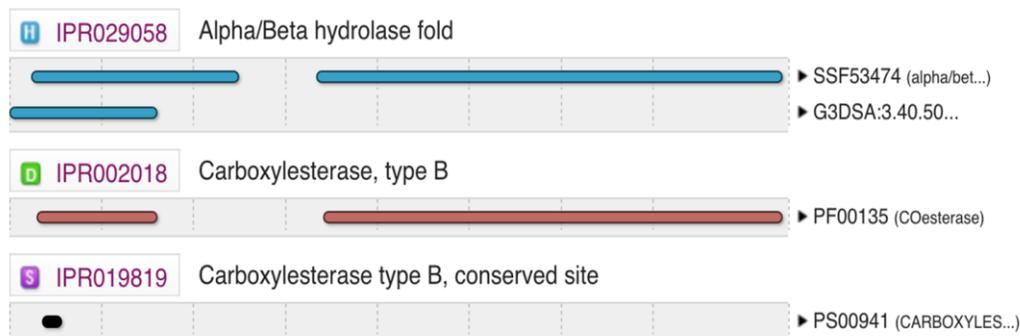


Figura 42. Resultado del análisis de dominios en InterPro de la carboxilesterasa BN1106_s4004b000028g.

Asimismo, esta secuencia carece de dominios transmembranales, lo que quiere decir que circula libremente en los tejidos y/o el interior de las células. Presenta los dominios alfa-beta hidrolasa y los que la identifican como una esterasa B.

Para fines del proyecto nos enfocamos en la secuencia BN1106_s80B000525g para analizar el fenómeno de la resistencia y establecer algún método de detección.

7.9.4 Análisis de la secuencia BN1106_s80B000525g

El reporte muestra que esta secuencia muestra homología con una carboxilesterasa previamente reportada de *O. viverrini*. Además, se indica cuál es su expresión (fragmentos existentes por millón de kilobases) en cada una de las muestras enviadas a secuenciar, dicha expresión se presenta en la siguiente gráfica:

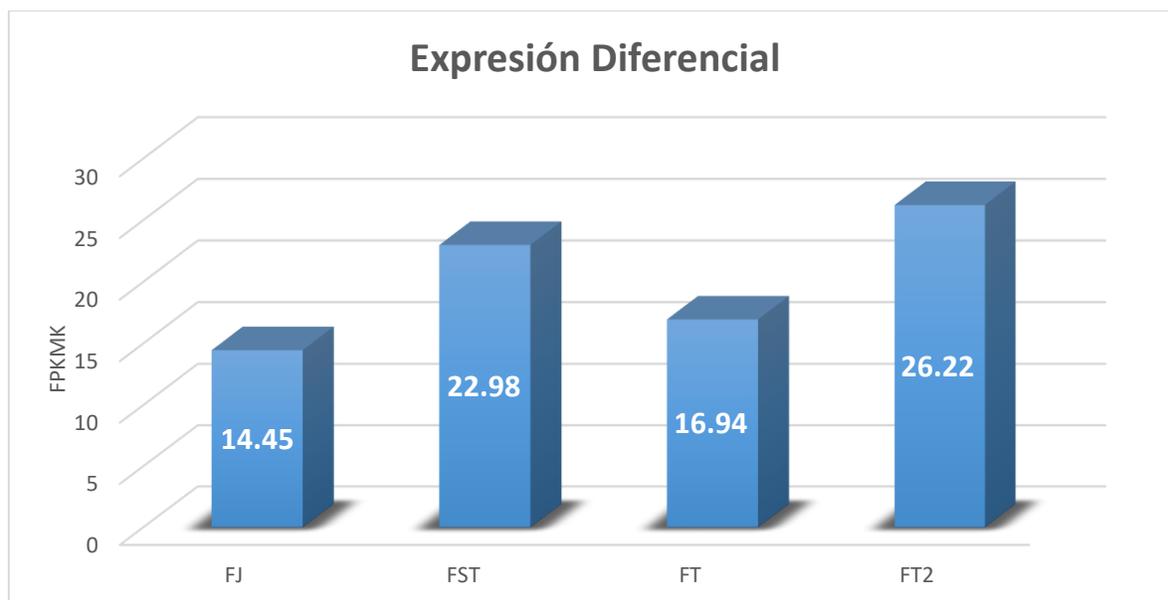


Figura 43. FPKM de la secuencia BN1106_s80B000525g. Dónde las muestras son: FJ, *F. hepatica* en fase juvenil sin tratamiento; FST, *F. hepatica* fase adulta sin tratamiento; FT, *F. hepatica* fase adulta tratada con TCBZ; FT2, *F. hepatica* fase adulta tratada con albendazol.

7.9.4.1 Caracterización de la esterasa BN1106_s80B000525g

En el sitio https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_toolTheoretical se calculó un pI 5.79 y una masa molecular de 83.567 kDa para esta esterasa. Si consideramos las modificaciones postraduccionales que pudiera tener, es consistente con los pI de 5.1 y 6.0 y la masa de la carboxilesterasa de 85 kDa

identificada en los zimogramas hechos previamente durante el desarrollo de este proyecto.

7.9.4.2 Análisis del número GO de la esterasa BN1106_s80B000525g

El reporte otorga el número GO:0016021//integral component of membrane, el sitio QuickGo, lo define como un componente de membrana, lo que quiere decir que contiene un péptido de anclaje a la membrana celular.

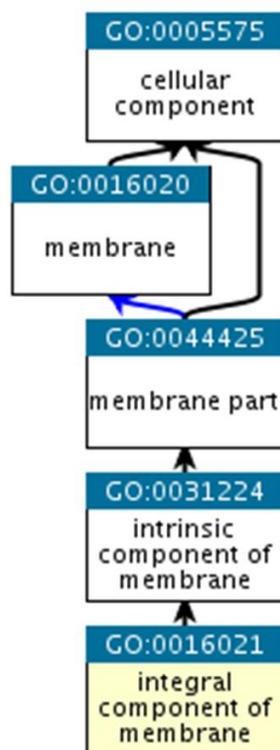


Figura 44. Reporte del número GO de la secuencia BN1106_s80B000525g.

7.9.4.3 Análisis de dominios de la esterasa BN1106_s80B000525g

La esterasa BN1106_s80B000525g de 735 AA se sometió a análisis de dominios en el sitio <https://www.ebi.ac.uk/interpro/> InterPro, el análisis nos arrojó que contiene los siguientes dominios:

1. AA 141-184, 214-281 Alfa-Beta hidrolasa
2. AA 197-681 Carboxilesterasa tipo B
3. AA 1-73 Dominio citoplasmático
4. AA 93-735 Dominio no citoplasmático

5. AA 172-672 Carboxilesterasa
6. AA 73-93 Hélice transmembranal
7. AA 74-95 Péptido transmembranal

Detailed signature matches

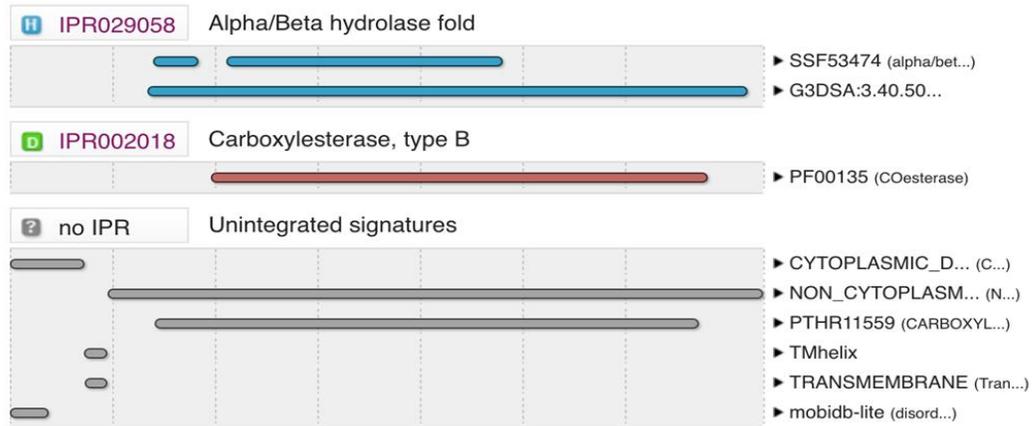
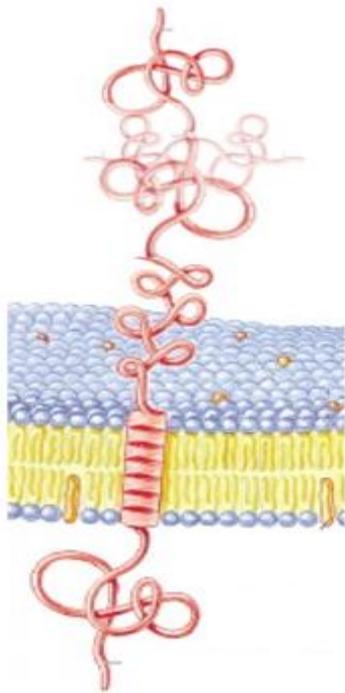


Figura 45. Resultado del análisis de dominios en InterPro.

La predicción de dominios nos indica que esta es una proteína con función de hidrolasa, cuya estructura es homóloga a la carboxilesterasa tipo B, además está anclada a la membrana mediante 73 aa en el citoplasma y un péptido transmembranal de 21 aminoácidos, mientras que el resto de la proteína es extracelular (Figura 46). Además, se realizó un análisis de los dominios en <https://www.genome.jp/kegg/> KEGG, dando como resultado lo siguiente:



AA 93-735 Dominio no citoplasmático contiene la actividad enzimática el No KEGG K03927 indica que está involucrada en el metabolismo de diferentes drogas.

AA 73-93 Hélice transmembranal

AA 1-73 Dominio citoplasmático

KEGG K01050 Indica que este dominio interacciona con enzimas de la mitocondria como CYP450 mediante señalización.

Figura 46. Posible estructura de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g. Se representa cómo podría estar formada la esterasa, además de presentarse la posible función de los dominios que la conforman, según el número KEGG.

7.9.4.4 Predicción de estructura 3D de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g

El sitio http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4ubj/portfolio/?view=entry_index#ad-image-2 predice una estructura 3D, semejante a la carboxilesterasa B de *Lucilia cuprina*, que tiene capacidad de hidrolizar pesticidas y ligandos fosfodiéster, además de xenobióticos carboxiester.

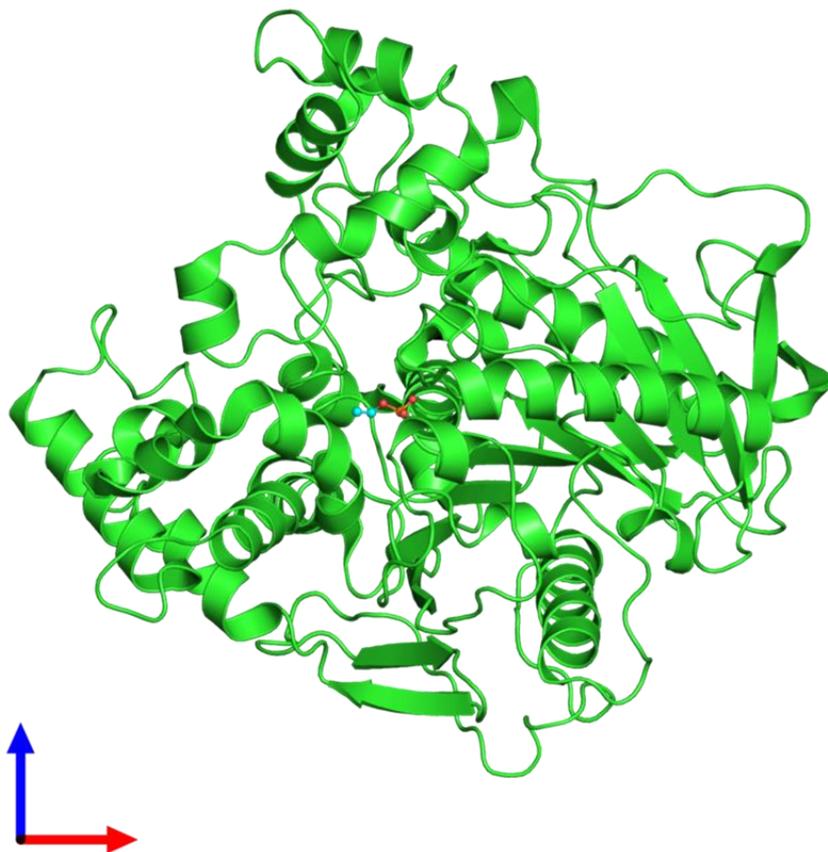


Figura 47. Predicción de la estructura 3D de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g.

7.10 Detección de carboxilesterasas por PCR punto final

Para lograr detectar la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g se utilizaron tres pares de oligonucleótidos en la reacción de PCR, que están descritos en la Tabla 18, con la finalidad de encontrar aquellos que fueron los óptimos para la detección.

Tabla 18. Secuencia de los oligonucleótidos para la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g.

Par	Clave del Oligo	Secuencia
1	FoFaCe1	CGGGTCCAAGCAAGGATGAG
	ReFaCe1	AAGCGATCTCACGTGTTCCA
2	FoFaCe2	GTCCAAGCAAGGATGAGGAG

	ReFaCe2	AGGTCGCTTCAAGTGATGGC
3	FoFaCe3	CAGCCCAGAAGAATGGGACG
	ReFaCe3	CAGACCCTCCTCAGAAATCCAC

Una vez terminados los ciclos de PCR, se preparó un gel de agarosa al 10% y se corrieron las muestras durante 1:30 horas a 100 V. Después se visualizó el gel en transiluminador, obteniendo la imagen que se presenta a continuación:

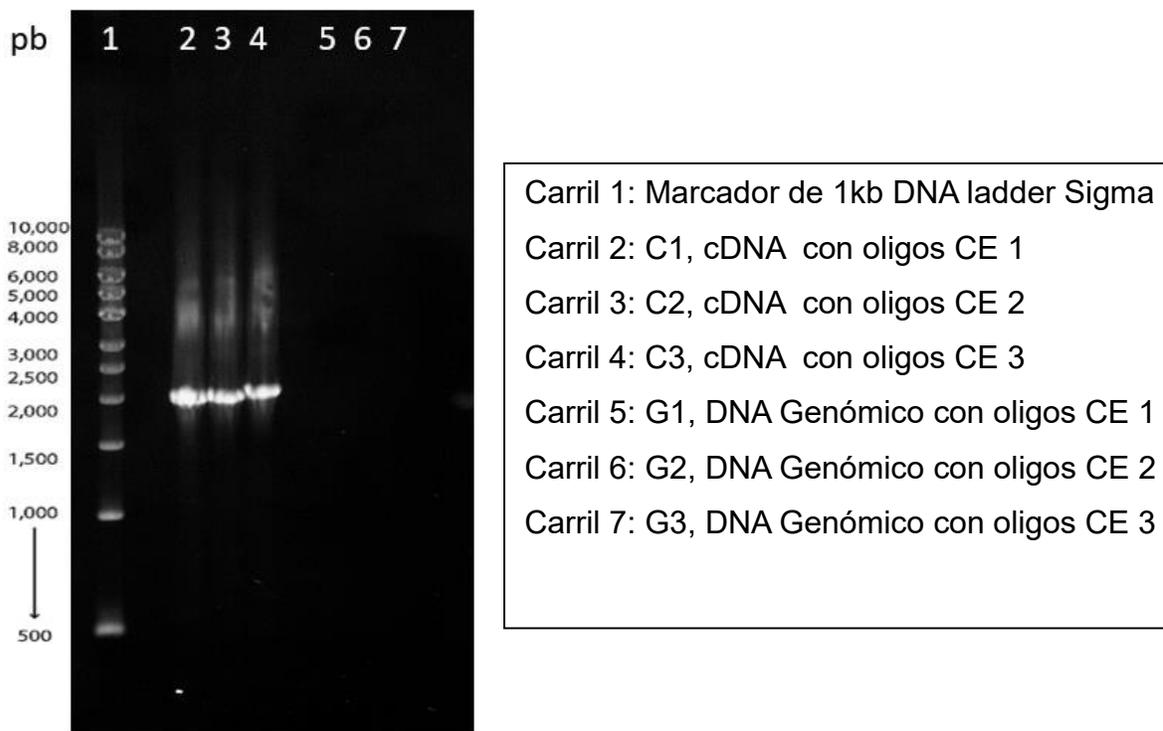


Figura 48. Electroforesis de las muestras de cDNA y DNA genómico de *F. hepatica*.

Gel de agarosa al 10% donde se observan los productos de PCR realizados a partir de las muestras de cDNA y DNA genómico de *F. hepatica* que amplificaron la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g.

Como se puede apreciar en la Figura 48, solo se pudo visualizar la esterasa en aquellas muestras en las que se utilizó cDNA. Por tal motivo se recurrió a hacer un análisis de intrones y exones para ver si ese era el motivo por el cual la esterasa no pudo ser observada en las muestras de DNA genómico de *F. hepatica*.

7.10.1 Análisis de exones de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g

Con el objetivo de realizar el análisis de intrones y exones de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g, se realizó la búsqueda de esta en algunos trabajos de genoma completo de *F. hepatica* ya reportados en las bases de datos.

Al buscar la carboxilesterasa en el proyecto “*Fasciola hepatica* genome assembly *Fh_reapr10kb*, contig contig_4086, whole genome shotgun sequence. ID: CDMT01004086.1” de Liverpool, se encontró que está formada por dos exones y un intron, el cual se encuentra en medio de los exones y tiene un tamaño de 20,084 pb (Figura 49).

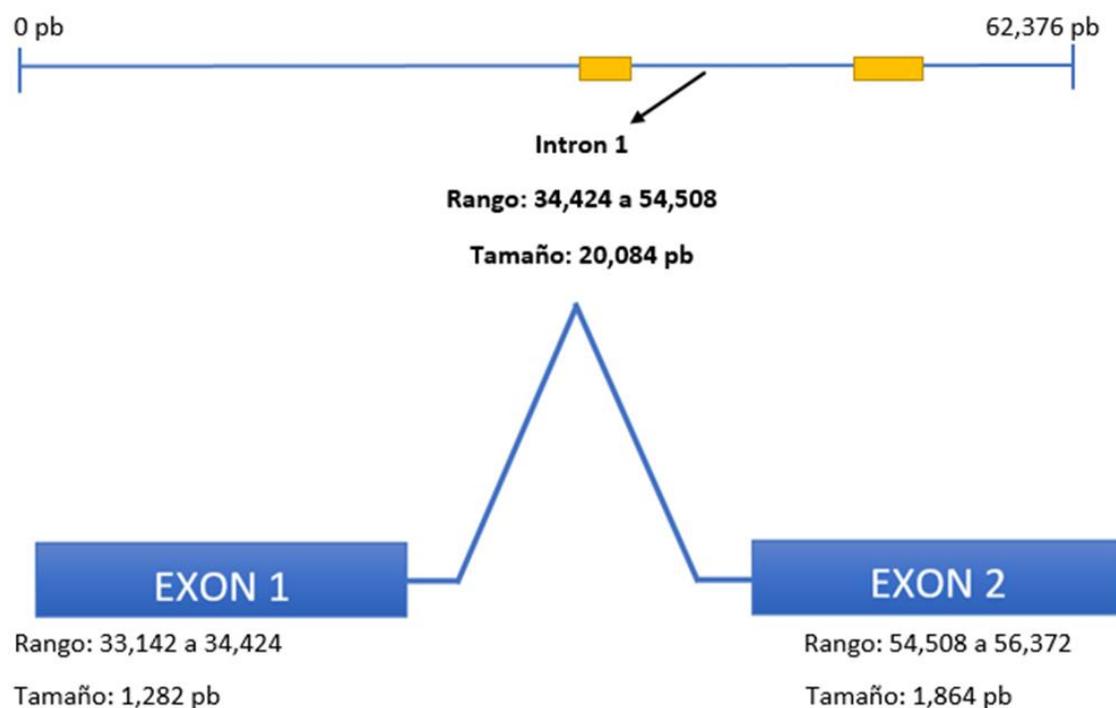


Figura 49. Análisis de exones de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g en un proyecto de genoma completo de *F. hepatica* de Liverpool, Reino Unido.

En una segunda búsqueda de la carboxilesterasa en el proyecto “*Fasciola hepatica* *F_hepatica*-1.0_Cont32.20, whole genome shotgun sequence. ID: JXXN01001140.1”, se encontró que sólo contiene un exón de 1,864 pb (Figura 50).

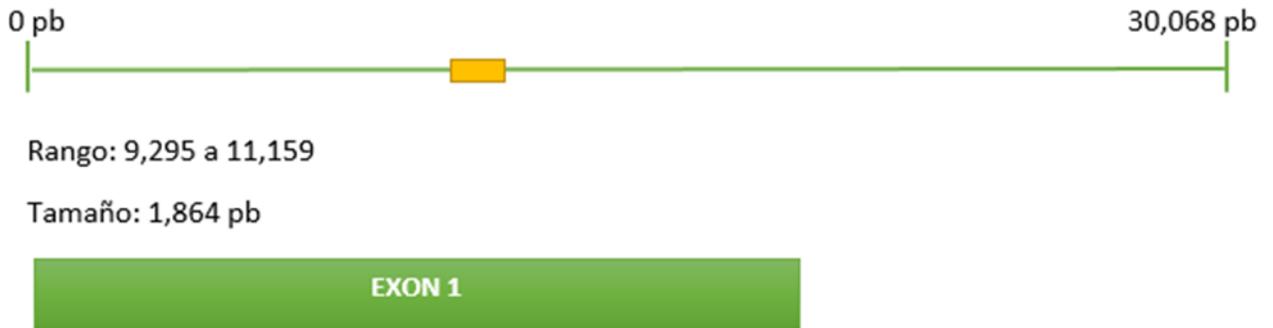


Figura 50. Análisis de exones de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g en un proyecto de genoma completo de *F. hepatica* de Oregon, EUA.

Finalmente se realizó una tercer búsqueda en el proyecto “*Fasciola hepatica* strain Shrewsbury genome assembly, contig: contig_58221, whole genome shotgun sequence. ID: OMOY01058219.1”. Se localizaron, de nueva cuenta, dos exones y un intrón de 19,403 pb (Figura 51).

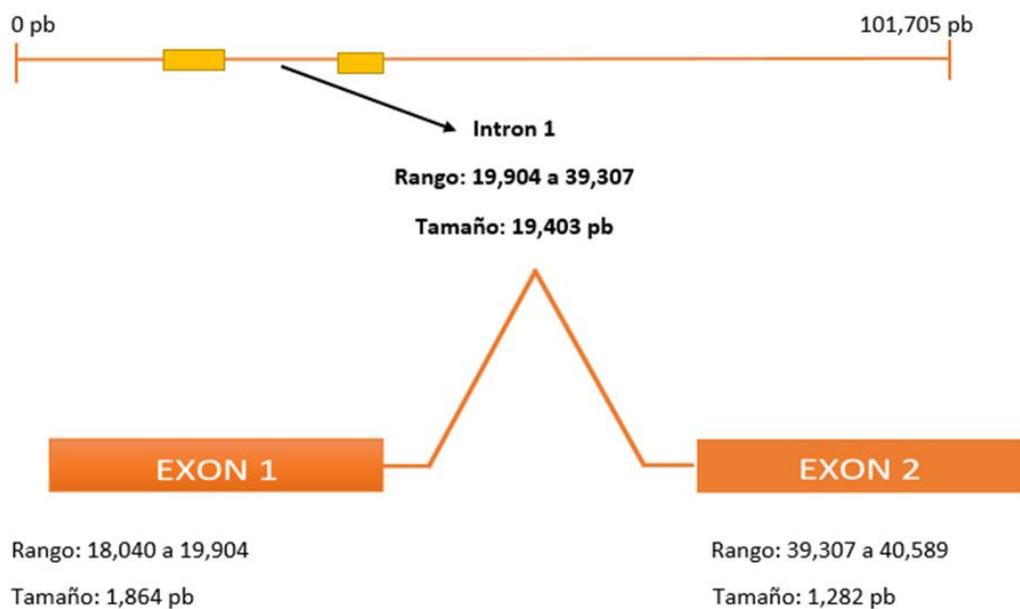


Figura 51. Análisis de exones de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g en un proyecto de genoma completo de *F. hepatica* de Liverpool, Reino Unido.

Una vez finalizado el análisis de los exones, se tomó la secuencia BN1106_s80B000525g y se localizaron ambos exones (Figura 52).

```

>BGI_novel_T000469_gene=BN1106_s80B000525g
taateCTTTACTTCCTTTATTAAGTGTACATCGAAGTTACAATATTTCTGAAAAGGGGTC
ACAGCCGATGAGACGCCATCTAAataggaaatcaatcagagacGGTGAGAGTCGAACTCGG
AACAGCAAAGGTGTAAAGGCTGCCAAGGTGCTCTTTATATATAACACGTAAGGGGTGGGA
CGAGTTCAAGTCTACGATAAGACAccaaaaggaaaaactccatgagctgaGGTTCAGTAAG
TCAGTCAACACCGTACCACACTCACAGTAAACGAGCACCAAAATGGTGGCCTGCAGTCTG
GCTGTCACTGCTCGCCTCaacaaaagaacactgtccgcTGTGTATATACTCTCTCAT
CGCCACAAACCAACAGTATTCCGGTTCAGTGGGACCAGAAAGATTCACAGTCTTGGATTCCG
TTTTACGTGACATCTGCATTTGTATTATACACGTTTCTTCTCATTCTTCTTCTGTTCTG
CGCTATCCATCTGTCCCTAGTGTGGTGTGCAGATRAATGTGGAAGGAGTCGCGTACGTTAA
TCTGTCTCTGTTATAGATGGTAATAAAACTATTGTGAGATTATATAAATAACAAAAGGCA
CTTAATAATCAGACCAGTCAATAACCTGTGTATAGATGTAAGTAGTGGTTCGAATGCTG
ACAGTTTGGACCCAGTATTTGACAGGTTACTAATTTTCGAATCTCTCTGAGATCAATCA
GTTGATCAATCGTGAATTCGTGGGTTTCAAAAAGTCCACTTGGACAAATCCCATTAACAGT
CTCTGAGCCAAATGGGACTCAAAGAGGGAGCGTCCCGTGGCAGCAGTCGGGCGAGTCTGCCGA
CGAACCTCCGGGTCCAAGCAAGGATGAGGAGAATGAAATGCCACTGGCAGATGGATCAGA
TGATCCGAATGTGCTACATGTACGTAATTACATGAGTCTGAATTTCTTACTACCCAGCCC
AGAAGAATGGGACGAAATTTGTCATCGTCAAAAAATGGAGAGAATCCGATTTTTGGTCCG
AGTGAGCATAACCTACCTAGTTTTATGGGTCCGCGATGCTCCTGTAGCCATTTGGAAAAC
ATGGTCTCTACAGAATAATGCCGAAGTCAAAGACTACTCTCTGATCGTCCCGGCTTGGG
ACAAACATTACCACCCAACTGTATTGTACAAAAATGTGCTGCGTGTGTCCGGAACCTTC
GGACACAAAAGATTGGTACACATTGTTCAAGAATCCCGTACGCCACATTGCCACAACAGAG
TTCATATTTCTCCGGGCCACCTATCCATTACATTTAAGGAATGCTATTTAGCTTATTG
GCATGGTGTGGCTAAGGAAAAGCGTCGATTTATAGATGGACAAATTCGATTCATCGGACG
TGAGCCGAATGATGACGGCTCGGAATGTGCCcagttgaaaaataaaaaaggTGAATGGT
TCCGGTCCGTAACCTCAATCGTGTCTAACTTTGAGCTTTCATTATCCATGGTTTAGTTC
CAGTCATAcggaagagaaacagtttcGAGGAATGCCAATCGTGGCCTATATTGGTGGTTC
ATATCTGATGAATCATAGACCCCAATTACCATCACCGAAAATGGTTGCCGATTTGCCGTGT
TCTCTATGTGGCTATCAGTTACCGATTAggtgtgttttgattttctgatttcgggatcga
tggTGGGGGACCAATCACGGTGTGTCCGATGTGCCGGAAGCGTTGATTTGGATCCAAGA
ACACGCTCATCGTTTTGGCGGTGATCCGTCTCCGCTGATGTTGTACGGAGAGAATAGCGG
AGCCACGATTTGCTGCTGCACTACTTTCATCCAGTGGTCTGGAGAATTTGATGGTCCGAGG
AGAGTCCCGTTCCGCTATTTCAGTCATGTTTGGTTGGCGGATGGATCCGTTGTCATTCGCGA
TGTTCCCGATTCCAGGATGCAATCCAAACAGTTAGTCCATAATGATCCATATCTGGCCGA
TGAGTGTAAAAAATGGGTGCGAATAACAGCCAAACATGCCATATGGACCCGACGCCATCC
ACTTGCCCGAATGTACGAATGTTTGCACGATATGACTGTTCAACAAATGGTTACAAAAAC
TCCGCTAGCATGGCAAGATTACGAACCCGCGGATACGACTTTGCTTCCGCAAGCGCATGA
AATGCGCACATCGTTGATTAACAGTGAATTTGGAAAACCTCGTTGGTGGAAAATCCGCTAGG
AATGCTTCATCCAAAAGCAACAGGTTGGACACACAGTATCAGAGATATGCCATTAGTGGT
ATTCTCGTGCATGAATACCGCTACGATCAATTCGGGAATCAGAACAGTTCGGATCATTG
GAATCTGGAAGAAAACAGAACAGAAGTTGAGAAATGCTTTGAATTCGTTTCGTAAGCCAC
TTCTCAATTCGCATATGCGGATGCCATGTGGAATGCCATCAAGGCTACTTGAGAAATCT
GATTGCCCTGGCGGGCAGATGATCAGGCACCCAGAGGAGATCAACTATAGAAATTTCTACGA
GTGATTCGAGGGGATTTGCCCGGGGCATGTCCGTAACAATTTATACGCAAAAACATTTACA
ACTGGGACGATACATTATGGTGAATCCAATATATCGAATTTTGAACCGAATTCAGTGCA
ACCGTATGTGGATGCGGACGGAGCACGGTGTGATGTGCCGTTCTTCTGATGATGAACA
TTTCTATTGTGGGGAAGGTACTCGACCACTGTACGAGGCATTGGAGCCGGAACAAAAAGA
GGTTCTCGTTCCAGCATTGTTTCAGTTCGCCATTTATGGTTCAATCTTAGGAGCTAGAGA
AATGCAGTATCCCTCAGTTCGGATATGCCATCACTTGAAGCGACCTATAATATTCTCAC
AGAAATGGGTTTGACGACAGCTGGAACACGTGAGATCGCTTTCCCTCAAAGCTTGCCAGAT
GTGGATTTCTGAGGAGGGTCTGTTTGAACATGTGATGAAGTATGCCAAATGAAGTATG
GTTACAAGAAGTAAATTTATCGTTGGTATATCTGAAGGAGAGCTTTTATGACTGGCTGG
ACAAATTTATACCCGTTTTAATGAGCTTTGCAACAAGTTTGGGTTAGCTTGTACACTCCAG
TTACGAATATAAAAATGTACACTGA

```

Figura 52. Localización de exones en la secuencia BN1106_s80B000525g. La parte subrayada en color amarillo corresponde al exón 1. La parte sin subrayar corresponde al exón 2.

A partir de esa localización, se procedió nuevamente a diseñar dos pares de oligonucleótidos para poder identificar ambos exones por PCR en el DNA genómico.

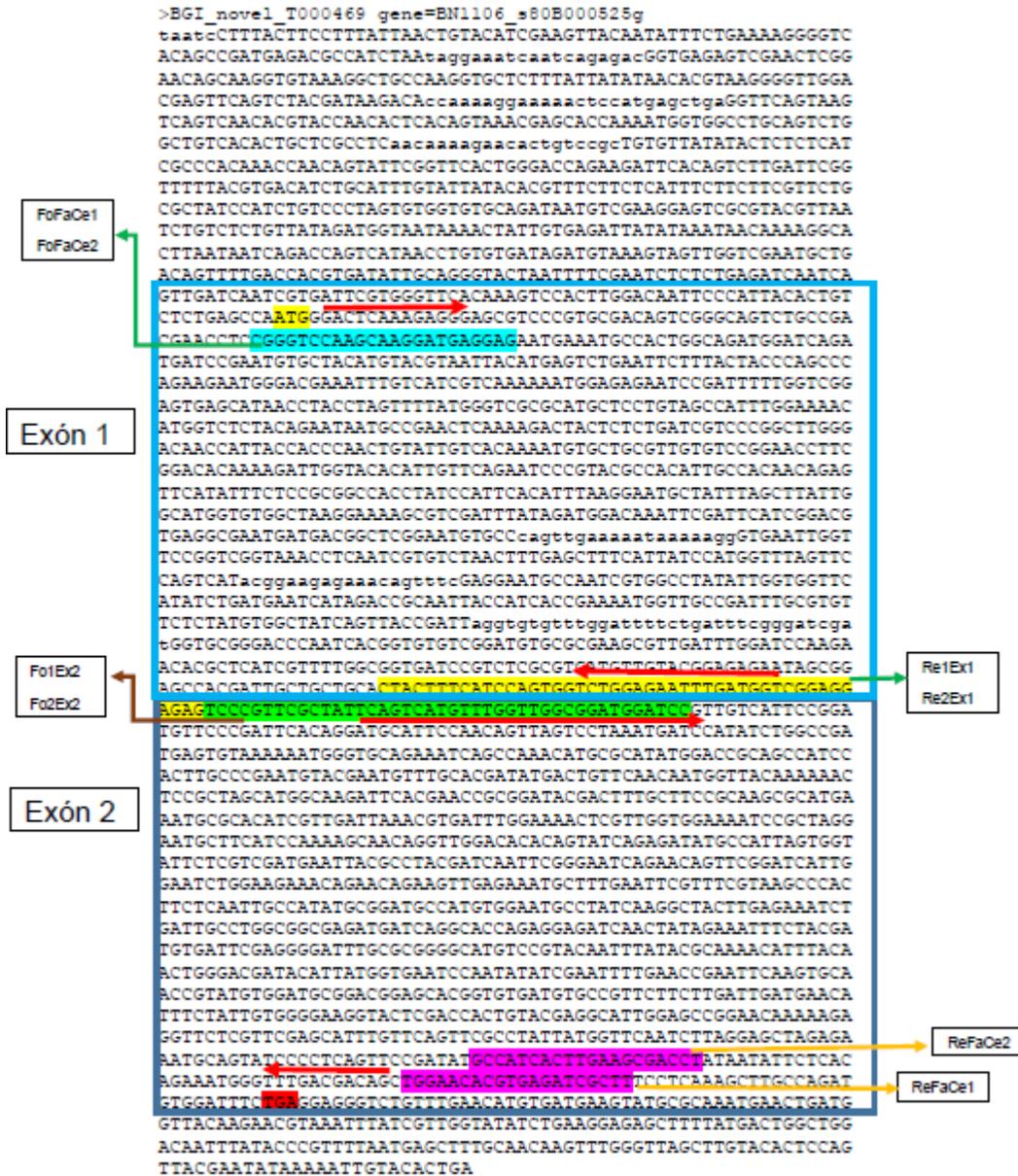


Figura 53. Diseño de oligonucleótidos para detectar los exones en el DNA genómico.

Los oligonucleótidos que se diseñaron fueron dos pares del oligonucleótido antisentido para detectar el exón 1 y dos pares del oligonucleótido sentido para detectar el exón 2 (Tabla 19).

Tabla 19. Oligonucleótidos diseñados para detectar los exones de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g.

Exón	Clave del Oligo	Secuencia
1	Re1Ex1	CTCTCCTCCGACCATCAAATTC
	Re2Ex1	TCCAGACCACTGGATGAAAGTAG
2	Fo1Ex2	TCCCGTTTCGCTATTCAGTCATG
	Fo2Ex2	TTTGTTGGCGGATGGATCC

Además se utilizaron dos pares de los oligonucleótidos anteriores para usarlos como oligos sentido y antisentido de los exones (Tabla 20).

Tabla 20. Oligonucleótidos que se utilizaron para la detección de exones. Los oligonucleótidos FoFaCe1 y FoFaCe2 servirán como oligonucleótido 5' para el exón 1. Los oligonucleótidos ReFaCe1 y ReFaCe2 serán los oligonucleótidos 3' para el exón 2.

Par	Clave del Oligo	Secuencia
1	FoFaCe1	CGGGTCCAAGCAAGGATGAG
	ReFaCe1	AAGCGATCTCACGTGTTCCA
2	FoFaCe2	GTCCAAGCAAGGATGAGGAG
	ReFaCe2	AGGTCGCTTCAAGTGATGGC

Se hicieron las mezclas de los oligonucleótidos para llevar a cabo la identificación de los exones por PCR. Las mezclas se describen en la Tabla 21.

Tabla 21. Claves de los oligonucleótidos utilizados en PCR punto final para detectar los exones en el DNA genómico de *F. hepatica*. Los primero cuatro pares corresponden al exón 1, mientras que los últimos cuatro son para el exón 2.

Exón	Clave	Oligo FW	Oligo RV
1	Re11	FoFaCe1	Re1Ex1
1	Re12	FoFaCe2	Re1Ex1
1	Re21	FoFaCe1	Re2Ex1
1	Re22	FoFaCe2	Re2Ex1
2	Fo11	Fo1Ex2	ReFaCe1
2	Fo12	Fo1Ex2	ReFaCe2
2	Fo21	Fo2Ex2	ReFaCe1
2	Fo22	Fo2Ex2	ReFaCe2

7.11 Detección de los exones de la carboxilesterasa por PCR BN1106_s80B000525g

Una vez finalizados los ciclos de PCR, se preparó un gel de agarosa al 10% y se corrieron las muestras durante 1:45 horas a 100 V. Después se visualizó el gel en transiluminador y se obtuvo lo mostrado en la Figura 54.

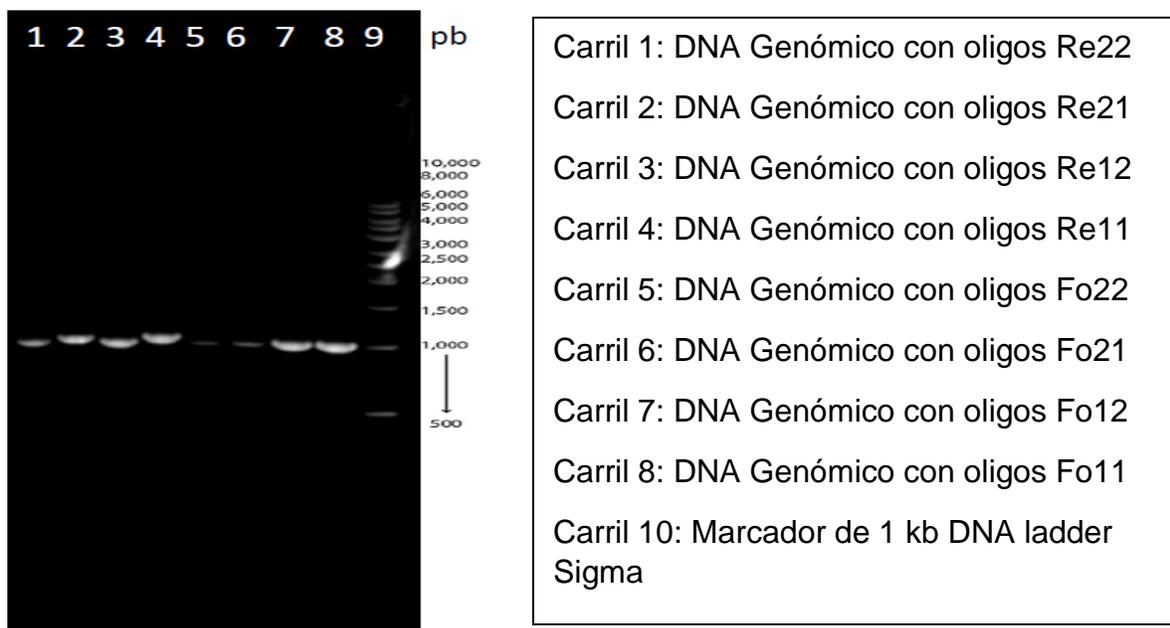


Figura 54. Electroforesis de las muestras de DNA genómico de *F. hepatica*. Gel de agarosa al 10% donde se observan los productos de PCR hechos a partir de las muestras DNA genómico de *F. hepatica* que amplificaron los exones de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g.

7.12 Detección del exón 1 de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525g en *F. hepatica* provenientes de distintos hospederos

Los primers del exón 1 se compartieron con colaboradores de Argentina (Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires con sede en Tandil), quienes pudieron detectarlo en diferentes hospederos (Figura 54). Además, enviaron algunos de sus amplicones para ser secuenciados y analizados.

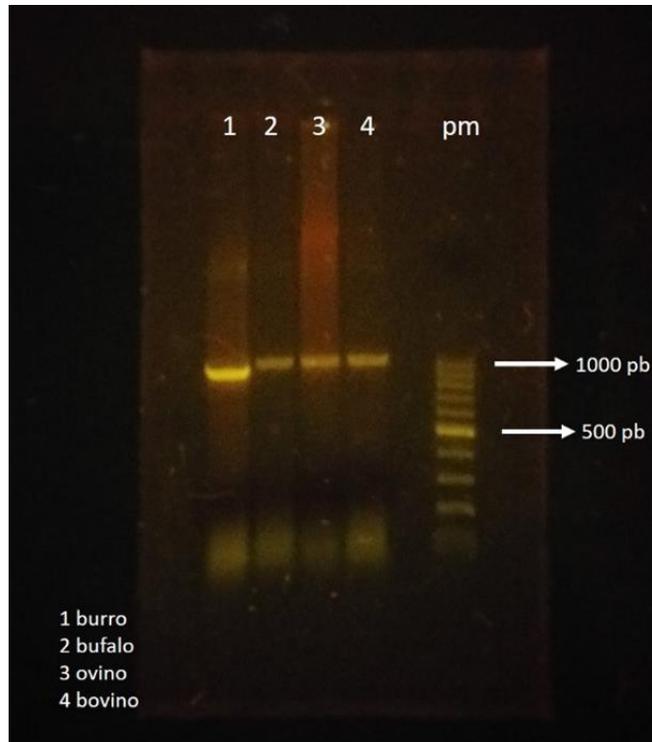


Figura 55. Electroforesis de las muestras de DNA genómico de *F. hepatica* extraídas de diferentes hospederos. El exón 1 fue localizado en los cuatro hospederos burro (carril1), bufalo (carril 2), ovino (carril 3) y bovino (carril 4).

Las secuencias obtenidas indicaron que la mitad de los parásitos aislados de diferentes hospederos presentan una sustitución funcional en el aminoácido 215 de K a E, lo cual implica un cambio de un aminoácido ácido a uno básico (Figura 56).

CE	DDGSECAQLKNKKG E LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
Burro7	DDGSECAQLKNKKG E LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
Burro9	DDGSECAQLKNKKG E LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
Burro10	DDGSECAQLKNKKG E LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
Burro12	DDGSECAQLKNKKG E LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
Burro14	DDGSECAQLKNKKG E LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
Burro15	DDGSECAQLKNKKG E LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
Burro13	DDGSECAQLKNKKG K LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
Burro17con	DDGSECAQLKNKKG K LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
Burro19	DDGSECAQLKNKKG K LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
Burro8	DDGSECAQLKNKKG K LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
PIS92016.1	DDGSECAQLKNKKG K LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
Ovino	DDGSECAQLKNKKG K LVPVGKPKQSCLTLSFHYPWFSSSHTEEKQFRGMPI
	*****:*****

Figura 56. Alineamiento de las secuencias de los aminoácidos del exón 1 de muestras de DNA genómico de *F. hepatica* provenientes de diferentes hospederos.

El programa COACH de predicción de sitios activos en zhanglab.ccmh.med.umich.edu/COACH/, localiza la sustitución E-K en el sitio activo de la enzima (Figura 57) y predice que tiene la capacidad de hidrolizar esteres de diversos ligandos.

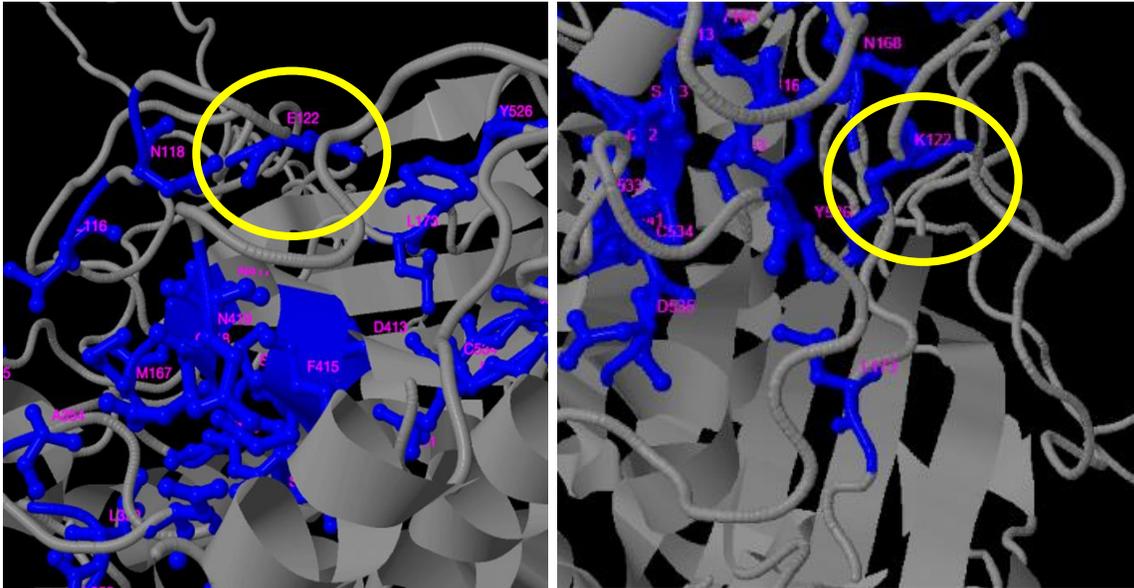


Figura 57. Cambio del aminoácido E-K en el sitio activo de la carboxilesterasa BN1106_s80B000525.

Además, se revisó el historial de tratamiento antihelmíntico de estos animales, para correlacionar la sustitución con el fenotipo de la resistencia. Se encontró que el burro 21 (Figura 58) es el primer caso confirmado de burros con *Fasciolas* resistentes.

```
>Burro21CEcompleto
MGLKEGASRATVGGQSADEPPGSPKDEENEMPLADGSDDPNVLHVRNYMSL
NSLLPSPPEEWDEICHRQKMERIRFLVGVSITYLVLVVAHAPVAIWKTWSL
QNNNAELKRLSDRPLGQPLPPNCIVTKCAALCPEPSDTKDWYTLFRIPY
ATLPQQSSYFAAATYPPTFKECYLAYWHGVAKKRRFIDGQIRFIGREAN
DDGSECAQLKNKKKGLVPANKPQSCLTSLFHYPWFSSSHTTEEKQFRGMPI
VAYIGGSYLMNHRPQLPSPKMOVADLRVLYVAISYRLGVFGFSDFGIDGAG
PNHGVSDVREALIWIQEHAFRFGGDP SRVMLYGENSGATIAAALLSSSGL
ENLMVGGESRSLFSHVWLDAGSVVIPDVPDSQDAFQQQLVNLNDPYLADECK
KVVQKSAKHAHMDRSHPLARMYECLHDMTVQQWLQKTPLAWQDSRTADTTL
LPQAHMRTSLIKRDLENSLVENPLGMLHPKATGWTHSIRDMPLVVFSSM
NYAYDQFGNQNSSDHWNL EETEQLRNALNSFRKPTSQLPYADAMWNAYQ
GYLRNLIAWRRDDQAP E EINYRNFYDVIRGDLRGACPNLYAKHLQLGRY
IMVNPIYRILNRIQVQPYVDADGARC DVFFFLIDEHFYCGEGTRPLYEAL
EPEQKEVLVRAVFVQFAYYGSILGAREMQYPLSSDMP SLEATYNILTEMG
LTTAGTREIAFLKACQMWI SEEGLFEHV MKY AQMN
```

Figura 58. Secuencia de la carboxilesterasa en el burro 21. Es el primer caso confirmado de burros con *F. hepatica* resistente a los antihelmínticos, en color rojo se puede observar el aminoácido K que es el fenotipo resistente.

Una vez obtenida esta información, y con los resultados de la secuenciación de los amplicones del exón 1 del grupo de animales analizados, se pudo hacer una correlación para saber cuáles son susceptibles y/o resistentes (Tabla 22).

Tabla 22. Relación de burros analizados para determinar la resistencia. Se tomo la secuencia en donde se encuentra la mutación para determinar cuáles eran las resistentes y cuáles las susceptibles.

Animal	Secuencia	Nucleótidos	Cambio de base	Número de base	Aminoácidos	Cambio de aminoácido	Resistente o Susceptible
Burro 7	17852.F007	AAGGGTGAATTGGTT	GAA	555	KGELV	E	Susceptible
Burro 8	17853.F008	AAGGGTAAATTGGTT	AAA	555	KGKLV	K	Resistente
Burro 10	17854.F010	AAGGGTRAATTGGTT	RAA	555	KGXLV	X	Resis/Suscep
Burro 12	17856.F012	AAGGGTRAATTGGTT	RAA	554	KGXLV	X	Resis/Suscep
Burro 13	17857.F013	AAGGGTAAATTGGTT	AAA	556	KGKLV	K	Resistente
Burro 14	17858.F014	AAGGGTAAATTGGTT	AAA	556	KGKLV	K	Resistente
Burro 15	17859.F015	AAGGGTGAATTGGTT	GAA	555	KGELV	E	Susceptible
Burro 19	17862.F019	AAGGGTAAATTGGTT	AAA	556	KGKLV	K	Resistente
Burro 21	17863.F021	AAGGGTAAATTGGTT	AAA	556	KGKLV	K	Resistente
Ovino	17864.F002	AAGGGTAAATTGGTT	AAA	554	KGKLV	K	Resistente

Estos resultados, al compararlos con la carboxilesterasa detectada en nuestro análisis, coinciden ya que el parásito que se utilizó para este estudio presenta susceptibilidad a los antihelmínticos y además tiene el aminoácido E (contrario al resistente que presenta el aminoácido K).

7.13 Detección del exón 1 mediante qPCR

Debido a que la carboxilesterasa detectada tiene un intrón de un tamaño considerable, se procedió a detectar únicamente el exón 1 de la misma.

Se utilizó el par de oligonucleotidos mostrados a continuación:

Tabla 23. Oligonucleotidos utilizados en el ensayo de PCR tiempo real.

Clave del Oligo	Secuencia
FoFaCe1	CGGGTCCAAGCAAGGATGAG
Re1Ex1	CTCTCCTCCGACCATCAAATTC

Se utilizaron muestras de cDNA y DNA genómico de *F. hepatica* con una concentración de aproximadamente 100 ng/ μ l , además de un control negativo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 59, en donde se puede observar que las muestras con cDNA y gDNA (líneas de color azul y color verde, respectivamente) empezaron a amplificar a partir del ciclo 20, pero también se pudo observar que el control negativo (línea de color rojo) empezó su fase exponencial a partir del ciclo 28.

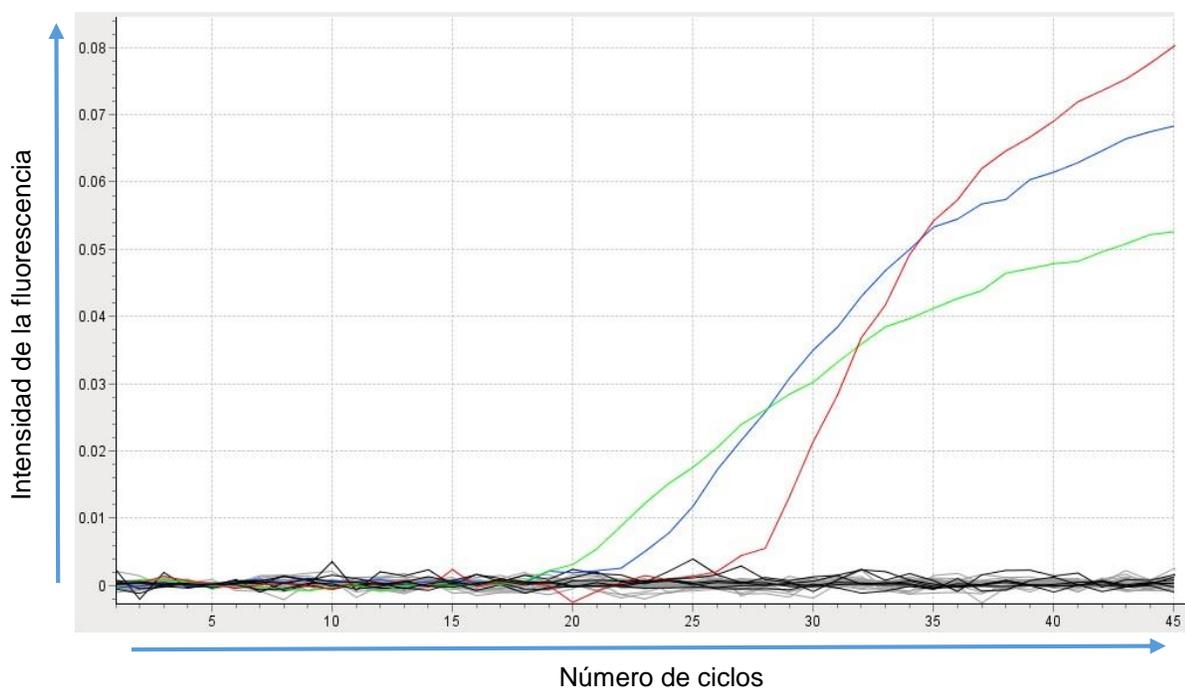
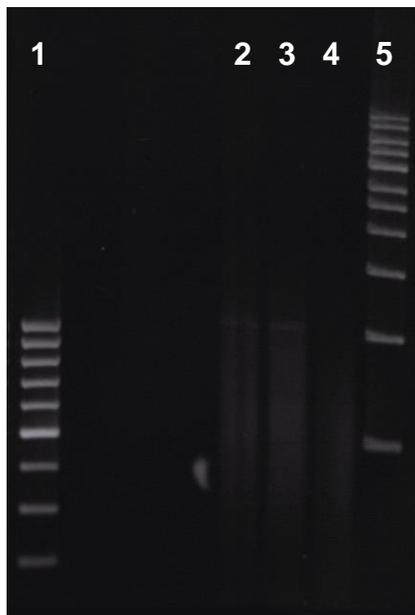


Figura 59. Resultados del primer ensayo de PCR tiempo real utilizando muestras de cDNA y gDNA de *F. hepatica*. La línea de color azul representa la muestra de cDNA de *F. hepatica*, la línea de color verde la muestra con gDNA y la línea de color rojo el control negativo (muestra con agua).

Para descartar la presencia de DNA en la muestra con el control negativo, una vez finalizada la reacción de PCR, se corrió un gel de agarosa para visualizar los resultados de la amplificación. El resultado obtenido y representado en la Figura 60 nos muestra que para las muestras con cDNA y gDNA sí se obtuvo el amplicon esperado, mientras que en el control negativo no se pudo observar dicho amplicon, lo que nos podría estar indicando la formación de dímeros los cuales pueden ser detectados con el SYBR GREEN.



Carril 1: Marcador GeneRuler 100 pb DNA ladder
Carril 2: cDNA
Carril 3: gDNA
Carril 4: Control negativo
Carril 5: Marcador de 1kb DNA ladder Sigma

Figura 60. Electroforesis de las muestras de cDNA y DNA genómico de *F. hepatica*.

Se realizó un segundo ensayo, esta vez colocando cada muestra por triplicado, y conservando la programación del termociclador. En este ensayo se pudo observar de nueva cuenta el control negativo pero en esta ocasión la fase exponencial empezó después del ciclo 30.

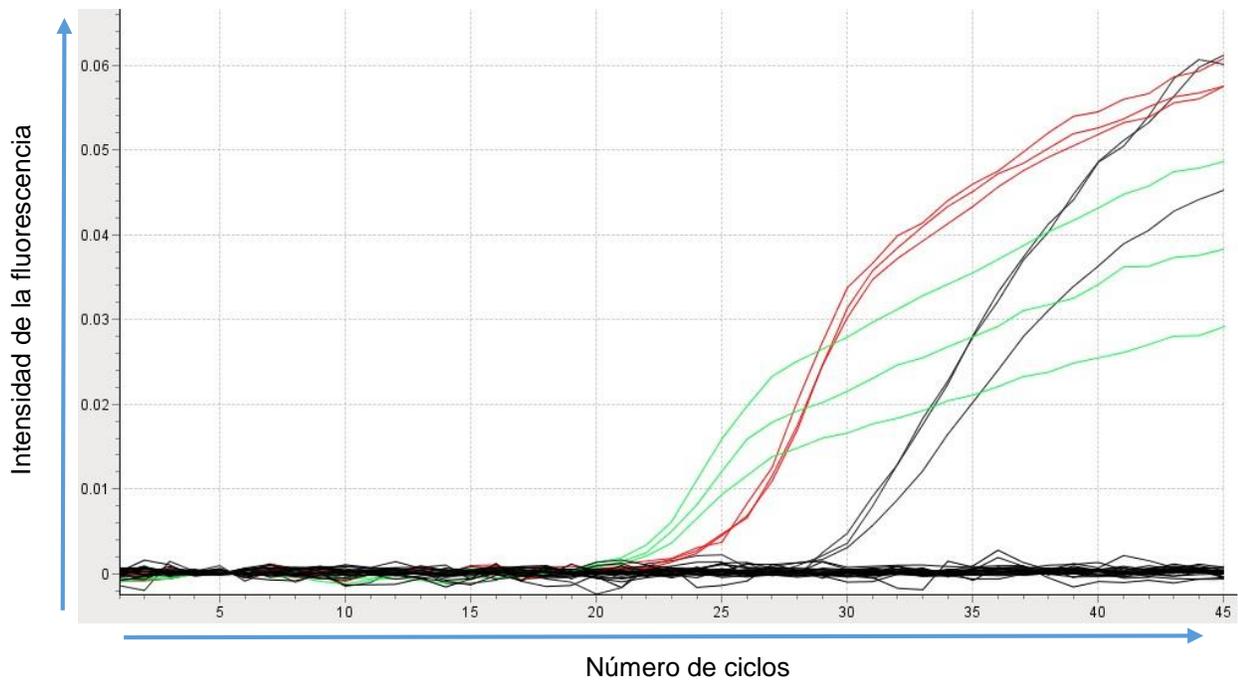


Figura 61. Resultados del segundo ensayo de PCR tiempo real utilizando muestras de cDNA y gDNA de *F. hepatica*. Las líneas de color rojo representan las muestras de cDNA de *F. hepatica*, las líneas de color verde las muestras con gDNA y las líneas de color negro el control negativo (muestras con agua).

Se realizó un último ensayo conservando todas las condiciones experimentales. En este ensayo se pudo observar de nueva cuenta el control negativo y al igual que el ensayo anterior la fase exponencial empezó después del ciclo 30.

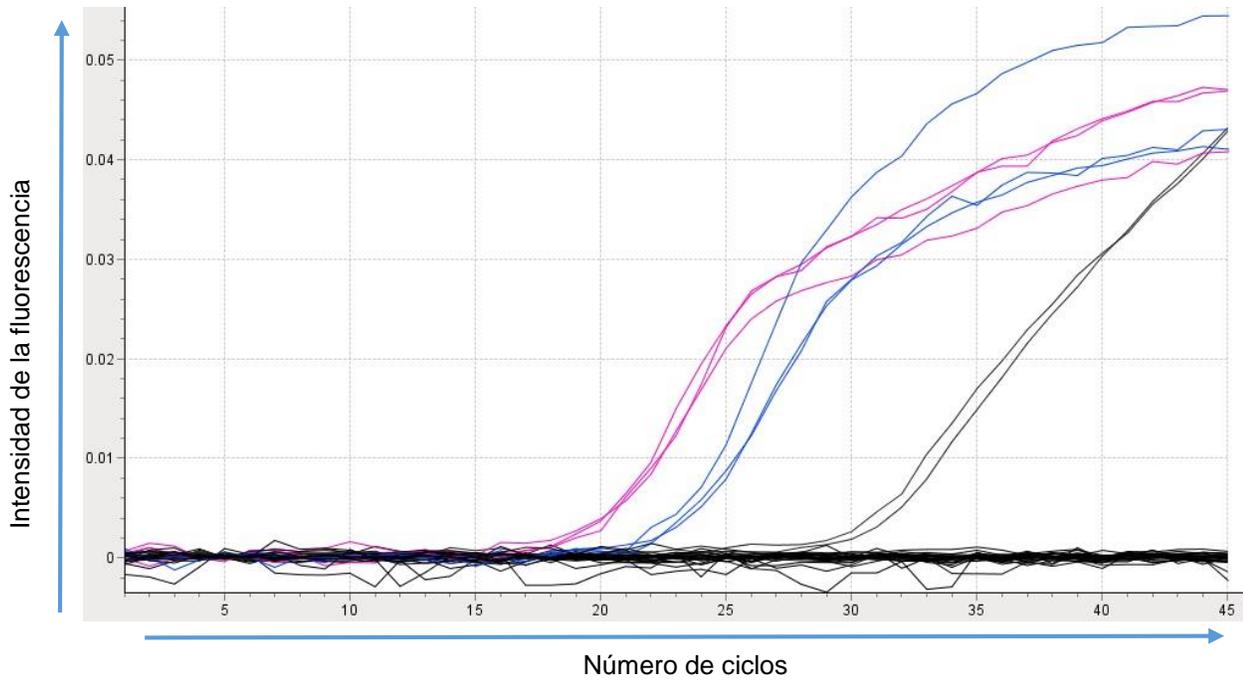


Figura 62. Resultados del tercer ensayo de PCR tiempo real utilizando muestras de cDNA y gDNA de *F. hepatica*. Las líneas de color azul representan las muestras de cDNA de *F. hepatica*, las líneas de color rosa las muestras con gDNA y las líneas de color negro el control negativo (muestras con agua).

8. Discusión

Las enzimas metabolizantes de xenobióticos son la primera línea de defensa de cualquier organismo expuesto a un ambiente tóxico, es por esto que todo esfuerzo encaminado al estudio del fenómeno de resistencia a los antihelmínticos en los diferentes trematodos parásitos, debe de iniciar por entender cómo se expresan diferencialmente las EMXs en parásitos sometidos a diferentes tratamientos. En el presente trabajo nos hemos concentrado en identificar, mediante un análisis transcriptómico comparativo, al grupo de EMXs que incluye las carboxilesterasas que pudiesen estar involucradas de manera directa y/o indirecta en la degradación de los antihelmínticos y/o en la reparación del daño ocasionado por los diferentes químicos a nivel celular y molecular, representando un aspecto poco comprendido de los helmintos. Lo anterior, a pesar de que el fenómeno de la resistencia implica altos costos operativos y pérdida del control sobre la incidencia de la enfermedad en animales y humanos, por lo que nuestro análisis pretende llenar el vacío que hay actualmente. Existen pocos reportes en la literatura científica sobre el posible papel de esterasas en la resistencia de *F. hepatica* a productos antihelmínticos, atribuyendo a este grupo de EMXs parte del efecto neutralizador a la degradación hidrolítica que estas enzimas ejercen sobre la estructura química de los diferentes productos antiparasitarios (Gimenes-Pardo *et al* 2004., Echevarria *et al* 1999).

Nuestro estudio sugiere que existen diferencias en los niveles de expresión de al menos cuatro mRNA de carboxilesterasas presentes en el transcriptoma de *F. hepatica* sometidas a tratamiento antihelmíntico, estas diferencias incluidas en el reporte del transcriptoma, se pueden interpretar como una respuesta del sistema EMXs de los parásitos para neutralizar el efecto tóxico de los antiparasitarios. La inducción de las carboxilesterasas en *F. hepatica* sometidas a TCBZ ha sido previamente demostrada experimentalmente por nuestro grupo de investigación y el presente análisis lo confirma (Scarcella *et al* 2012). Para nuestro análisis seleccionamos solo aquellas carboxilesterasas que mostraran cierta identidad con aquellas previamente reportadas en los bancos de secuencias de genes y, que adicionalmente mostraran su participación en el sistema EMXs, por

lo que dos carboxilesterasas que se identificaron como colinesterasas fueron descartadas para análisis posteriores (Tabla 15). De entre estas carboxilesterasas una se identificó como BN1106_s80B000028g, la cual tiene un marco de lectura abierto de 424 aminoácidos y al realizar el análisis de dominios se observó que carece de dominios transmembranales (Figura 42), lo que sugiere que circula libremente en los tejidos y/o el interior de las células. Además presenta los dominios de alfa-beta hidrolasa y los que la identifican como una esterasa B. Sin embargo, mostró homología con una esterasa responsable de la ecdisis en el trematodo parásito *Opisthorchis viverrini*, por lo que asumimos que su función en *F. hepatica* debe de ser la misma y no puede ser tomada en cuenta para el análisis de susceptibilidad a los antihelmínticos.

La segunda esterasa identificada como BN1106_s80B000525g exhibe un marco de lectura abierto de 735 aminoácidos y al realizar la predicción de dominios nos indicó que es una proteína con función de hidrolasa, cuya estructura es homóloga a la carboxilesterasa tipo B. Posee 73 aminoácidos localizados en el citoplasma y está anclada a la membrana mediante un péptido transmembranal de 21 aminoácidos, el resto de la proteína es extracelular (Figura 45). Además, el análisis bioinformático mediante InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) sugiere que su función es de hidrolizar ésteres en compuestos xenobióticos, como un componente integral de la membrana (Figura 44). El mismo algoritmo nos sugiere que la masa molecular teórica de la esterasa BN1106_s80B000525g es de 83.57 kDa, la cual se aproxima a la masa molecular de 85 kDa de la enzima dominante que se observa en los zimogramas de los extractos de parásitos que se trabajan rutinariamente en nuestro laboratorio. No obstante, acorde a nuestros zimogramas, la esterasa de 85 kDa muestra múltiples isozimas con la misma masa pero diferente Rf cuando las enzimas se someten a PAGE nativo en diferentes etapas de desarrollo del parásito (Figura 20). Nosotros hipotetizamos que los resultados obtenidos de la predicción bioinformática respecto a la esterasa de 83-85 kDa representan la misma enzima y las diferentes isozimas se explican por el proceso de síntesis. En este proceso, el complejo ribosoma-mRNA se ubica alrededor del retículo endoplásmico, de manera que la proteína madura va

pasando por las múltiples membranas del retículo endoplásmico y adquiere modificaciones por glicosilación en el proceso, sí esta glicosilación es diferente en cada órgano del parásito, el resultado será una isoforma diferente para cada órgano y el extracto de adulto muestra un mayor número de isoformas porque tiene más órganos que el juvenil y esa es la razón por la que los adultos del parásito presentan una mayor cantidad de isoformas (Figura 20). Durante el procesamiento de las imágenes de zimogramas, encontramos que el análisis densitométrico de las diferentes isoformas separadas por PAGE nativo, muestra que las dos fases de desarrollo analizadas pueden distinguir no solo el número de isoformas presentes, sino también los niveles catalíticos de cada isoforma medidos por densidad óptica, dándonos un parámetro cuantitativo del que carecen los zimogramas solos, esto es útil en el diseño de posteriores ensayos bioquímicos de identificación de resistencia en el parásito que podrían ser explorados en estudios futuros (Figura 22). Al determinar el punto isoeléctrico de la esterasa BN1106_s80B000525g, se encontró que las diferentes isoformas se encontraban entre un rango de pH de 4.6 a 6.2, lo cual también se explica por las modificaciones post-traduccionales que pudiera tener en los diferentes órganos del parásito, aún así los valores experimentales son aproximadamente consistentes con el cálculo del punto isoeléctrico teórico que fue de 5.79, pero no tomando en cuenta que las glicosilaciones, fosforilaciones y acetilaciones post-traduccionales alteran este valor (Figura 23).

El objetivo de este estudio es proponer procedimientos que constituyan un ensayo de diagnóstico de resistencia antihelmíntica en *F. hepatica*. Para lograr este objetivo, se diseñaron diferentes juegos de oligonucleótidos que pudiesen funcionar para amplificar la secuencia de la esterasa BN1106_s80B000525g por medio de la técnica de fpPCR, RT-PCR y qPCR en muestras de ácidos nucleicos provenientes de parásitos aislados en campo, el RNA fue convertido a cDNA mediante reacción por retrotranscriptasa y junto con el gDNA se usaron como punto de partida en un procedimiento de amplificación. Los resultados muestran que, únicamente es posible detectar aquellos transcritos de la carboxilesterasa

BN1106_s80B000525g a partir de cDNA de extractos de *F. hepatica* adulta pero no en las muestras de gDNA. Por tal motivo se realizó el análisis de exones e intrones de la esterasa BN1106_s80B000525g, este análisis nos sirvió para saber que la esterasa estaba conformada por dos exones (1282 pb y 1864 pb) y en medio de estos se encontraba un intrón, de aproximadamente 19000 a 20000 pb, que estaba interfiriendo en la detección en las muestras de DNA genómico mediante fpPCR(Figura 49 y Figura 51). A su vez, este análisis mostró que la esterasa BN1106_s80B000525g se encontraba completa en proyectos de ensamble del genoma de *F. hepatica* de Inglaterra (I.D.CDMT01004086.1, I.D. OMOY01058219.1) lo que sirvió para rediseñar los oligonucleótidos y poder usar el gDNA en nuestros procedimientos de PCR(Figura 53).Una vez rediseñados los oligonucleótidos, ambos exones de la esterasa BN1106_s80B000525g fueron detectados por medio de fpPCR en las muestras de DNA genómico de *F. hepatica* (Figura 53).

Debido a que es necesario aplicar nuestro ensayo de PCR a muestras de parásitos provenientes del campo en zonas endémicas con fuertes problemas de resistencia al TCBZ, los oligonucleótidos utilizados para la detección del exón 1 (1282 pb) fueron proporcionados a los colaboradores de Argentina, para el análisis de gDNA en parásitos provenientes de diferentes hospederos y ellos a su vez nos enviaron sus amplicones para realizar la secuenciación y el análisis de los resultados (Figura 55), encontramos que la mitad de las muestras consistentemente mostró alelos en el nucleótido 645 al cambiar de A a G, e incluso algunas muestras mostraron heterocigosis con picos de ambos nucleótidos de las mismas dimensiones en el cromatograma de las secuencias en la posición 645. Al buscar los marcos de lectura abiertos y el alineamiento de las secuencias enviadas desde Argentina, se observó que los alelos del nucleótido 645 codifica el codón 215 y este cambio de A a G origina una substitución funcional en el aminoácido 215 cambiando de K a E, esta es una substitución funcional significativa ya que cambia de ácido a básico (Figura 56). El programa COACH3DCE predice que esta substitución se encuentra en el sitio activo de la

enzima, por lo que consideramos que este hallazgo debe seguirse evaluando como potencial marcador de resistencia al TCBZ en *F. hepatica* (Figura 57).

También se pudo confirmar mediante los registros de tratamientos de animales en Argentina, que la variación del aminoácido K está presente en los parásitos resistentes, mientras que la E se encuentra en aquellos susceptibles a las formulaciones antihelmínticas. Un análisis más profundo de los resultados de secuenciación de los amplicones muestran que algunas muestras de parásitos provenientes de campo tienen ambos alelos, lo que interpretamos como heterocigosis, lo que quiere decir que *Fasciola hepatica* es un organismo diploide y tiene un par de cada cromosoma, esto quiere decir que al menos existen dos copias de la CE525 y en los parásitos heterocigóticos una copia es K215 y en otra es E215. Esto es algo que podría ser relevante en la forma en que se hereda la resistencia antihelmíntica en *F. hepatica*. Estos datos también sugieren que la resistencia antihelmíntica podría ser un fenómeno de tres niveles de resistencia-susceptibilidad, el cual implicaría que las fasciolas homocigóticas E215 son susceptibles mientras que las heterocigóticas E215/K215 son moderadamente resistentes y finalmente los parásitos homocigóticos K215 son altamente resistentes. Esto es consistente con lo que se ha observado durante años en el campo, ya que los ganaderos han reportado la resistencia antihelmíntica como moderada o severa.

La metodología de PCR-secuenciación hasta aquí descrita, tiene una gran ventaja sobre el sistema tradicional de diagnóstico de resistencia y deberá ser estudiada a profundidad sobre poblaciones de trematodos provenientes de campo. Esta metodología puede proporcionar resultados en días en lugar de semanas, solo requiere pequeñas cantidades de muestras provenientes de cepas de referencia y poblaciones de campo, que pueden ser congeladas por tiempo indefinido para ser procesadas en el momento más oportuno, razones por las cuales abatiría los elevados costos del diagnóstico que actualmente se hace. Por todo lo anterior, creemos que podría ser una buena alternativa de procedimiento para diagnosticar resistencia antihelmíntica en muestras provenientes de campo.

Finalmente se realizaron ensayos de qPCR para ver si era posible realizar la detección del exón 1. Se puso observar que el exón 1 fue detectado en los tres ensayos a partir del ciclo 20 aproximadamente; pero se observa que los controles negativos amplifican a partir del ciclo 30. Al correr un gel de agarosa para verificar la amplificación del control negativo, no fue posible visualizar un amplicon del tamaño esperado y solo se formaron dímeros entre los oligonucleotidos y que al utilizar SYBR GREEN llegar a ser detectados ya que este reactivo reconoce cualquier unión de DNA de doble cadena aunque no sean específicos, esto es fácilmente superable modificando las condiciones de mayor astringencia del PCR y cortando la obtención de datos a menos de 30 ciclos. También es posible hacer un nuevo diseño de oligonucleotidos para detectar un fragmento del exón 1, con un análisis más detallado de los oligonucleotidos excluyendo homodimeros y heterodimeros mediante condiciones de PCR mas astringentes, para poder tener una mejor optimización de la técnica. Este nuevo procedimiento implicaría hacer un oligonucleótido iniciador de PCR que reconozca los nucleótidos adyacentes al A/G 645 de manera que reconozca que tipo de alelo tiene la muestra analizada.

9. Conclusiones

En el análisis del transcriptoma de cuatro tratamientos distintos de *Fasciola hepatica* se identificaron 30,105 genes, de los cuales 28,669 son genes conocidos y 1,237 genes son nuevos o con una función desconocida. Al enfocarnos únicamente en aquellos genes que tuvieran actividad de carboxilesterasa, detectamos cuatro secuencias de genes con esta función enzimática. De las cuatro secuencias de genes de carboxilesterasas que fueron analizadas por procedimientos bioinformáticos, sólo una carboxilesterasa identificada como CE525, demostró tener capacidad de metabolizar drogas como los antihelmínticos y pesticidas, acorde a la ontología y ortología empleada durante el procedimiento bioinformático. La CE525 muestra un ORF de 735 aminoácidos y un dominio citoplasmático al que el algoritmo Interpro le asignó un No Kegg K01050 que acorde al sitio KEGG interacciona con otras EMXs, particularmente P450 que ha sido reportada como una proteína involucrada en la resistencia antihelmíntica. También se encontró una hélice transmembranal, lo que implica que muy probablemente está anclada a las membranas celulares, así como un dominio extracelular que contiene la función enzimática. Este dominio con actividad enzimática tiene un Kegg K03927 que le asigna una función metabolizante de drogas y pesticidas semejantes a carboxilesterasas previamente reportadas como involucradas en la resistencia a pesticidas en moscas.

Los datos teóricos de CE525 coinciden en punto isoelectrico y en masa con las bandas con actividad enzimática detectadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, nativos y de isoelectroenfoque que nos permiten identificar el producto de expresión de CE525 mediante procedimientos de zimogramas que pueden ser análisis proteómicos complementarios en el diagnóstico de resistencia antihelmíntica mediante procedimiento transcriptómicos/genómicos.

El análisis de CE525 en parásitos obtenidos de diferentes hospederos, mediante PCR punto final y secuenciación de amplicones, demostró que existen alelos en el

nucleótico 645 que cambia de A a G. este alelo modifica el codón 215 en el marco abierto de lectura lo que origina una substitución funcional en donde se cambia el aminoácido Lisina al Ácido Glutámico, esta substitución es altamente significativa ya que se encuentra en el sitio activo de la carboxilesterasa y el algoritmo COACH predice una modificación conformacional del sitio activo. También se confirmó que aquellos parásitos que tenían el aminoácido Lisina en posición 215 de la CE525 son los que presentan resistencia a los antihelmínticos.

Nuestros análisis sugieren que CE525 podrá ser utilizada para la detección de la resistencia de *F. hepatica* a los antihelmínticos mediante diagnóstico molecular basado en RT-PCR o qPCR complementados con secuenciación y zimogramas, estos análisis permiten asociar un polimorfismo de un solo nucleótido en la posición 645 que origina una substitución funcional en el aminoácido 215 de E a K, este análisis que involucra PCR y secuenciación permite identificar aquellos parásitos con K215 y de esta manera confirmar la presencia de resistencia al TCBZ en *fasciola hepatica*. Nuestro procedimiento también permite identificar la presencia de heterocigosis/homocigosis en el alelo A/G 645 de la CE525 lo que nos permitirá deducir el nivel de resistencia al TCBZ en una muestra en particular proveniente de una región específica lo que no permitirá indicar el nivel de resistencia al TCBZ en esa región.

10. Bibliografía

- Alatoon A, Cavuoti D, Southern P, Gander R. *Fasciola hepatica* Infection in the United States. *LabMedicine*, 39, 425-428. 2008.
- Alcaino, H.A., N.F. Baker, and R.A. Fisk, Enzyme polymorphism in *Fasciola hepatica* L.: esterases. *Am J Vet Res*, 1976 37(10): p. 1153-7.
- Alvarez, L.I., et al., Altered drug influx/efflux and enhanced metabolic activity in triclabendazole-resistant liver flukes. *Parasitology*, 2005. 131: p. 501-10.
- Angulo F, Molero M, Escalona F, Muñoz J, y Ramírez R. 2007. Prevalencia y dinámica de hpg mensual de *fasciola* hepática y otros helmintos en un rebaño bovino de una zona inundable tropical. *Revista Científica, Maracaibo*.v 17 n. 2. Venezuela.
- Bencharit S, Morton CL, Xue Y, Potter PM, Redinbo MR. Structural basis of heroin and cocaine metabolism by a promiscuous human drug-processing enzyme. *Nat. Struct. Biol.* 2003a;10:349-56.
- Bencharit S, Morton CL, Hyatt JL, Kuhn P, Danks MK, Potter PM, Redinbo MR. Crystal structure of human carboxylesterase 1 complexed with the Alzheimer's drug tacrine. From binding promiscuity to selective inhibition. *Chem. Biol.* 2003b;10:341-9
- Boray, J.C. Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, 7: 95-209, 1969.
- Boray JC. 1997. Chemotherapy of infections with Fasciolidae. In: Boray JC (ed). *Immunology, pathobiology and control of Fasciolosis*. New Jersey, USA: MSD AGVET. p 83-97.
- Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schellenbaum M, Von Orelli M, Craigand Huey R. 1983. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet Rec* 113: 315-317.
- Bowman, D.D., Georgis' *Parasitology for veterinarians*. 6 th ed. 1995, Philadelphia: W. B. Saunders Company. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248

- Brennan, G.P., et al., Understanding triclabendazole resistance. *Exp Mol Pathol*, 2007. 82(2): p. 104-9.
- Brunton, L. Laurence., Chabner, A. Bruce., Knollmann, C. Björn. Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª edición. Mc Graw Hill. 2012. México, D.F. PP 123-126.
- Campos RR, Herrera DR, Quiroz RH, Olazarán JS. Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. *Tec Pec Mex* 1990; 28: 30-34.
- Castell, JV: El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos. Cap. 3 pp 95-123. Disponible en : [http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo de farmacos](http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_farmacos) (Consultada en mayo 2018)
- Centers for Disease Control and Prevention, DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern , Page last reviewed: December 8, 2017. Recuperado de : <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>
- Chávez, VA, Sánchez RL, Arana, DC, Suárez, AF. Resistencia a antihelmínticos y prevalencia de fasciolosis bovina en la ganadería lechera de Jauja, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. Volumen 23 No. 1. Lima 2012
- Cossío-Bayúgar R, Miranda-Miranda E, Portilla-Salgado D, Osorio-Miranda J. 2009. Quantitative pcr detection of cholinesterase and carboxylesterase expression levels in acaricide resistant *Ripicephalus (boophilus) microplus*. *Journal of Entomology*, 6(2):117-123.
- Cossío-Bayúgar R, Miranda-Miranda E, Ortiz-Nájera A, Neri-Orantes S, Olvera F. 2008. cytochrome p-450 monooxygenase gene expression supports a multifactorial origin for acaricide resistance in *Ripicephalus microplus*. *Research journal of parasitology*. 3(2): 59-66
- Cossío-Bayúgar R, Miranda-Miranda E, Ortiz-Nájera A, Neri-Orantes S. 2008. *Boophilus microplus* pyrethroid resistance associated to increased

levels of monooxygenase enzymatic activity in field isolated mexican ticks. Journal of Biological Sciences. 8(2): 404-409

- Cruz-López O, Pimentel AA, Tamariz- Cruz OJ, Muñoz- López A, Cruz-López MC, Cruz- López ME, Muñoz- López S. Fasciolosis hepática diagnosticada en fase de estado. México. 2006
- Cruz, Reyes Alejandro. Camargo, Camargo Blanca. Glosario de términos en Parasitología y Ciencias Afines. Plaza y Valdes.2000. Página 303.
- Cvilink, V., J. Lamka, and L. Skalova, Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. Drug Metab Rev, 2009. 41(1): p. 8-26.
- Devine, C., Brennan G.P., Lanusse C.E., Alvarez L.I., Trudgett A., Fairweather I. Effect of the metabolic inhibitor, methimazole on the drug susceptibility of a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica*. Parasitology, 2009. 136(2): p. 183- 92.
- Devine, C., Brennan G.P., Lanusse C.E., Alvarez L.I., Trudgett A., Fairweather I. Inhibition of cytochrome P450-mediated metabolism enhances ex vivo susceptibility of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. Parasitology, 2010. 137(5): p. 871- 80.
- Devine, C., Brennan G.P., Lanusse C.E., Alvarez L.I., Trudgett A., Fairweather I. Piperonyl butoxide enhances triclabendazole action against triclabendazole- resistant *Fasciola hepatica*. Parasitology, 2011. 138(2): p. 224-36.
- Diez, Baños Pablo. *Fasciola* y fasciolosis: un problema antiguo con nuevas soluciones impulsadas por la relación pluridisciplinar de la parasitología con otras ciencias. NINO-Centro de Impresión Digital Rosalía de Castro, 58 Santiago de Compostela. 2011.
- Echevarria FA, Gennari SM, Tait A. Isoenzyme analysis of *Haemonchus contortus* resistant or susceptible to ivermectin. Vet Parasitol 1992; 44(1-2):87-95.
- Ecobichon DJ. Toxic effect of pesticides. En: Klaassen CD, editor. Casarett & Doull's Toxicology. 5ta Ed. New York:McGraw-Hill; 1996. p. 643-689.

- Field LM, Foster SP. Amplified esterase genes and their relationship with other insecticide resistance mechanisms in English field populations of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Manag Sci* 2002; 58(9):889-94.
- Flores-Toro Arturo René. La Fasciolosis bovina.2005. Virbac AL Día Bovinos No. 6 Septiembre 2005.
- García FA, Vázquez PV, López AME, Liébano HE, Mendoza DGP. *In vitro* and *in vivo* diagnosis of antihelminthic resistance in *Haemonchus contortus* infected sheep in México. En: Proceedings V International Seminar in Animal Parasitology. Mérida Yucatán México. 2003: 194-199.
- Gasque- Gómez Ramón. Primera edición. Enciclopedia Bovina. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México, D.F. 2008. P. 153-156
- Gimenez-Pardo C, Martinez-Grueiro MM, Gomez-Barrio A, Rodriguez-Cabeiro F. Cholinesterase and phosphatase activities in adults and infective-stage larvae of Levamisole-resistant and levamisole-susceptible isolates of *Haemonchus contortus*. *Vet Res Commun* 2003; 27(8):61-623.
- Gimenez-Pardo C, Martinez-Grueiro MM, Gomez-Barrio A, Rodriguez-Cabeiro F. Ivermectin resistant and susceptible third-stage larvae of *Haemonchus contortus*: cholinesterase and phosphatase activities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(2):223-226.
- Gregus, Z. and C.D. Klaassen, Mechanisms of toxicity, in Casarett and Doull's toxicology. The basic Science of Poisons, C.D. Klaassen, Editor. 2006, McGraw Hill: New York.
- Gusson, F., et al., Comparison of hydrolytic and conjugative biotransformation pathways in horse, cattle, pig, broiler chick, rabbit and rat liver subcellular fractions. *Vet Res Commun*, 2006. 30(3): p. 271-83.
- Haites, N., M. Don, and C.J. Masters, Heterogeneity and molecular weight inter-relationships of the esterase isoenzymes of several invertebrate species. *Comp Biochem Physiol B*, 1972. 42(2): p. 303-22
- Halton, D.W., Histochemical studies of carboxylic esterase activity in *Fasciola hepatica*. *J Parasitol*, 1967. 53(6): p. 1210-6.

- Hodes ME, Retz JE. A positive zymogram for distinguishing among Rnase and phosphodiesterases I and II. *Anal Biochem* 1981; 110:150.
- Hunter RL, Markert CL . Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 1957;125: 1294.
- Karunaratne SH, Hemingway J. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bull World Health Organ* 2001; 79:1060-1064.
- Kawalek JC, Rew RS, Heavner J. Glutathione S-transferase, a possible drug-metabolizing enzyme, in *Haemonchus contortus*—comparative activity of a cambendazole-resistant and a susceptible strain. *Int J Parasitol* 1984; 14:173–175.
- Kerboeuf D, Aycardi J. Unexpected increased thiabendazole tolerance in *Haemonchus contortus* resistant to anthelmintics by modulation of glutathione activity. *Parasitol Res* 1999; 85:713–718.
- Laing S.T., Ivens A., Laing R., Ravikumar R. S., Butler V., Woods D.J. and John S. Gilleard J.S. 2010. Characterization of the xenobiotic response of *Caenorhabditis elegans* to the anthelmintic drug albendazole and the identification of novel drug glucoside metabolites. *Biochem. J.* 432, 505–514
- Lindblom T. H. and Dodd A. K. 2006. Xenobiotic Detoxification in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 305(9): 720–730.
- Manchenko GP. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. Boca Raton Florida: CRC Press; 1994: 1-2.4. Campos RR, Herrera DR, Quiroz RH, Olazarán JS. Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. *Tec Pec Mex* 1990; 28: 30-34.
- Market CL, Moller F. Multiple form of enzymes: tissue ontogenetic, and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1959; 45: 753
- Márquez, Dildo; Jiménez, Gabriel; García, Fredy; Garzón, Clara. Resistencia a los antihelmínticos en nematodos gastrointestinales de bovinos en municipios de Cundinamarca y Boyacá Corpoica. *Ciencia y*

Tecnología Agorpecuaria. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Cundinamarca, Colombia. Vol. 9, núm. 1, enero-junio, 2008, pp. 113-123

- Martínez, Rodríguez Ricardo. Gragera, Martínez Raquel R. Plumet, Ortega Joaquín. Martínez, Murillo Ricardo. Capilla, San Martín Javier. Fundamentos teóricos y prácticos de la Histoquímica. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. 2008. Páginas 579-582.
- Martínez-Sánchez R., Domenech- Cañete I., Millán-Marcelo J.C., Pino-Santos A. Fascioliasis, revisión clínico – epidemiológica y diagnóstico. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología Vol. 50 No. 1. Ciudad de la Habana, Cuba. Enero- Abril 2012. P. 1-4
- Mendoza- Panamá RA, Hernández- Cruz JJ. Prevalencia de *Fasciola hepatica* en el municipio de Ignacio de la Llave Veracruz; por los métodos de Intradermorreacción y coproparasitoscópico (sedimentación). Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia. México. 1984
- Miranda E, Cossío-Bayúgar R, Téllez-Alanís MR, García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Ortiz-Estrada M. An enzymatic marker for ixodicide resistance detection in the cattle tick *Boophilus microplus*. Adv Agric Res 1995; 4(3): 001-008.
- Miranda-Miranda E, Cossío-Bayúgar R, Quezada-Delgado MDR, Olvera F, Neri-Orantes S 2009. Age-induced carboxylesterase expression in acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus*. Research Journal of Parasitology 4(3): 70-78
- Miranda-Miranda E, Zamora-Ruiz A, Cossio-Bayugar R. 2009. molecular cloning and expression of a *Caenorhabditis elegans* cathepsin b-like protease. Biotechnology 8(2): 242-247.33.
- Miranda-Miranda E, Cossío-Bayúgar R; Liébano-Hernández E. 2008. Genotyping of athelmintic resistant *Haemonchus contortus* reveals new β -tubulin allelic variants. Journal of Animal and Veterinary Advances. Vol 7 (1): 27-31.

- Miranda-Miranda E, Murillo-Sánchez MH, Cossío-Bayúgar R. 2008. expression of a *Haemonchus contortus* cysteine protease in the baculovirus system. *Electronic Journal of Biotechnology*. 10(4):49-55
- Miranda-Miranda E Liébano-Hernandez E. López-Arellano M.E.; Mendoza-de-Gives P; Cossío- Bayúgar R. Marcadores enzimáticos como indicadores de resistencia a los antihelmínticos en el nematodo parásito gastroentérico de rumiantes *Haemonchus contortus*. 2006. *Bioquímica* 31(1). p. 6-12
- Miranda M.E y García-Vázquez Z. 1994. Aislamiento e identificación in situ de antígenos de *Fasciola hepatica* . *Vet, Mex.* 25(3): 267-281
- Miranda M.E. y García-Vázquez Z. 1995. Identificación de antígenos de diferentes fases de desarrollo de *Fasciola hepatica*. *Tec. Pecu. Mex.* 33(1): 8-15.
- Montalvo XA, Vázquez PV, López AME, Liébano HE. Presence of antihelmintic resistance against gastro-intestinal nematodes in sheep farms in Tlaxcala, Mexico. En: *Proceedings V International Seminar in Animal Parasitology*. Mérida Yucatán México. 2003: 298-306.
- Mottier, L., et al., Triclabendazole biotransformation and comparative diffusion of the parent drug and its oxidized metabolites into *Fasciola hepatica*. *Xenobiotica*, 2004. 34(11-12): p. 1043-57
- Nyindo, Mramba and Lukambagire, Abdul-Hamid. Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2015, Article ID 786195, 8 pages.
- Olaechea FV. 1994. Epidemiología y control de *Fasciola hepática* en la Argentina. Nari, A; Fiel, C. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Montevideo, Hemisferio Sur, Cap. 10: 213-232.
- Olaechea FV. *Fasciola hepatica* en ovinos. Grupo Salud Animal- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. INTA Bariloche. 2007.
- Parkinson, A., Biotransformation of xenobiotics, in Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, C.D. Klassen, Editor. 1996, McGraw Hill: New York. p. 113-196.

- Pedroza G, Yarezi J, y Miranda-Miranda E. 2014. Caracterización bioquímica de carboxilesterasas relacionadas con la resistencia antihelmíntica del trematodo parásito *Fasciola hepatica*.
- Pérez de la Rosa D, Pérez de la Rosa JJ, Cossío-Bayúgar R, Miranda-Miranda E, Lozano L, Bravo-Díaz MA, Rocha-Martínez MK, Sachman-Ruiz B. 2015. Complete genome sequence of *Paenibacillus* larvae MEX14, isolated from honey bee larvae from the Xochimilco quarter in Mexico City. *Genome Announc* 3(4):e00968-15. doi:10.1128/genomeA.00968-15.
- Pintor- Torres Juan Bosco. Estimación de pérdidas económicas, por decomiso de hígados de ganado bovino infectado con *Fasciola hepatica* y sacrificados en el rastro municipal de Morelia, Michoacán. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Enero 2006. P 1-5.
- Quiroz, Romero Hector. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. 2005. Editorial LIMUSA, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. México, D.F. P. 220-230.
- Reyes-López LM. Determinación de la presencia de *Fasciola hepatica*, en rebaños de ovinos en la sierra de los cuchumatanes del departamento de Huehuetenango por medio de la técnica de sedimentación AMS III. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONCYT, Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología SENACYT, Fondo Nacional de Ciencia y tecnología FONACYT. Guatemala. 2011.
- Ricci G, Bello ML, Caccuri AM, Galiazzo F, Federici G. Detection of glutathione transferase activity on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1984; 143: 226.
- Rodríguez, Arnaiz Rosario. Metabolismo de las toxinas ambientales. Primera edición electrónica. Fondo de Cultura Económica. 2015. México.
- Romero, Caballero Raúl. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana, 2007. México. P 1509- 1510

- Sánchez-Sosa S, Rojas- Ortega S, Reed-San Roman G. Torres- Santana MA. Fasciolosis hepatobiliar masiva. 2000
- Scarcella S., Miranda-Miranda E., Solana M. V. and Solana H. Approach to molecular characterization of different strains of *Fasciola hepatica* using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction.
- Parasitol Res. 2015 Apr;114(4):1341-5. doi: 10.1007/s00436-015-4310-9
- Scarcella S, Miranda-Miranda E, Cossío-Bayúgar R, Ceballos L, Fernandez V, Solana H. Increase of carboxylesterase activity in *Fasciola hepatica* recovered from triclabendazole treated sheep. Mol Biochem Parasitol. 2012. 185:151-153
- Shehab, A.Y., et al., Detoxifying and anti-oxidant enzymes of *Fasciola gigantica* worms under triclabendazole sulphoxide (TCBZ-SX): an *in* study. J Egypt Soc Parasitol, 2009. 39(1): p. 73-83.
- Smeal MG, Hall CA. 1983. The activity of triclabendazole against immature and adult *Fasciola hepatica* infections in sheep. Austr Vet J 60: 329-331.
- Solana, H.D., J.A. Rodriguez, and C.E. Lanusse, Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites. Parasitol Res, 2001. 87(4): p. 275-80
- Solana, Hugo. *Fasciola hepatica* resistente a triclabendazole Un creciente problema mundial. Conferencia Electrónica 2013 de la Red de Helmintología de FAO para América Latina y el Caribe “Importancia, prevención y control de las helmintiasis que afectan principalmente a pequeños productores de ganado en Latinoamérica y el Caribe”
- Solórzano Cermeño, LF.1,999. Prevalencia de *Fasciola hepática* en bovinos del municipio de Tactic, departamento de Alta Verapaz. Tesis Lic. Med. Vet. Guatemala, GT, USAC/FMVZ. 53 p.
- Sutherland, I.A., D.L. Lee, and D. Lewis, Colorimetric assay for the detection of benzimidazole resistance in trichostrongyles. Res Vet Sci, 1989. 46(3): p. 363-6.
- Tang, Ploog José Fernando. Ruíz, Herrera Jorge Fabián. Evaluación de Eficacia y Tolerancia de una Suspensión oral de Triclabendazole al 15%

(Trivante®15)*combinada con una Solución Inyectable sobre la base de Abamectina al 1% en vehículo de larga acción (Abamectin L.A.) en el Tratamiento de Parasitosis en Alpacas de la Sierra Central**

- Ticona SD, Chávez VA, Casas VG, Chavera CA, Li EO. Prevalencia de *Fasciola hepatica* en bovinos y ovinos de Vilcashuamán, Ayacucho. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. Volumen 21, No. 2 Lima. Julio-Diciembre 2010.
- Torgerson, P. (1999). Bovine fasciolosis - An update and refresher. BCVA, 7: 177-187.
- Torgerson, P.; Claxton, J. (1999). Epidemiology and Control. In: Fasciolosis. Dalton, J.P. Editor. CAB International: 113-150.
- Urquhart, G., J. Armour, J. Duncan, A. Dunn, y F. Jennings. 2001. Parasitología veterinaria. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España.
- Van Rossum AJ, Jefferies JR, Rijsewijk FA, LaCourse EJ, Teesdale-Spittle P, Barrett J, et al. Binding of Hematin by a New Class of Glutathione Transferase from the Blood-Feeding Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. Infection and immunity 2004; 72(5): 2780-2790.
- Virkel, G., et al., Assessment of the main metabolism pathways for the flukicidal compound triclabendazole in sheep. J Vet Pharmacol Ther, 2006. 29(3): p. 213-23.
- WHO informal meeting on use of triclabendazole in Fasciolosis control. WHO headquarters 2007.

11. Apéndices

11.1 Apéndice A: Protocolo Laemmli SDS- PAGE

A continuación se describe el protocolo para elaboración y corrida de geles de proteínas de acuerdo a Laemmli usando Miniprotean® II de BioRad.

Protocolo

1. Tomar dos espaciadores, un peine, un placa pequeña de vidrio y una grande,
2. Limpiar las placas de vidrio con etanol.
3. Ensamblar el sándwich, tomar de los bordes inferiores de las placas de vidrio y los espaciadores para que estén bien alineados. De lo contrario todo se escapará cuando se vierta el gel.
4. Preparar una solución 10% (p/v) de Amonio Persulfato (APS), dicha solución se debe preparar en el instante que se va a utilizar.
5. Preparar la mezcla del gel separador (al menos 10 ml por gel cuando se utilizan espaciadores de 1.5 mm). En la tabla que se presenta a continuación se muestran las cantidades necesarias para realizar la mezcla del gel separador con respecto al porcentaje del gel.

	30% acrilamida	Buffer I	MilliQ
10% gel	3.3 ml	2.5 ml	4.0 ml
12% gel	4.0 ml	2.5 ml	3.3 ml
15% gel	5.0 ml	2.5 ml	2.3 ml
18% gel	6.0 ml	2.5 ml	1.3 ml

Tabla 1. Cantidades necesarias para preparar las mezclas de los geles separadores, según el porcentaje del gel.

6. Añadir 100 µl de SDS al 10%, 80 µl de APS al 10% y 10 µl de TEMED.
7. Verter el gel dejando 2 cm libres desde la parte superior de la placa de vidrio inferior. Cuidadosamente agregar agua o isobutanol en la parte superior para crear la superficie superior lisa.

8. Cuando el gel de separación ha polimerizado, preparar la mezcla del gel superior (Acrilamida al 3.75 %):

2.4 ml MilliQ
1.0 ml Buffer II
0.5 ml de Acrilamida al 30%
40 µl de SDS al 10%

Tabla 2. Cantidades necesarias para preparar el gel superior

9. Verter el agua desde la parte superior del gel separador (gel inferior).
10. Añadir APS y TEMED a la mezcla del gel superior, verter en la parte superior y colocar el peine. Tener precaución de no introducir burbujas de aire en el gel. Dejarlo polimerizar.
11. Unir el sándwich del gel al conjunto de electrodos. Engrase las juntas para evitar derrames. Si solo se corre un gel, girar la junta desde el otro lado y poner el bloque de acrílico.
12. Verter el running buffer dentro del equipo del gel. El buffer debe cubrir y estar en contacto con el gel. Dejar reposar por algunos minutos mientras las muestras se preparan para checar si hay fugas. En caso de no existir fugas, llenar la cámara exterior con el buffer para cubrir el fondo de los geles.
13. Preparar las muestras mezclando un volumen de la muestra y un volumen del buffer de muestra. Calentar a 95°C por algunos minutos y cargar el gel.
14. Correr el gel 150 V por 1 hora 20 minutos.

Soluciones necesarias

A continuación se presentan las cantidades necesarias para preparar las soluciones.

- Preparación de Buffers

Buffer I (4x): 1.5 M Tris – HCl pH 8.8

Buffer II (4x): 0.5 M Tris – HCl pH 6.8

A ambas soluciones se debe añadir 0.4% SDS. Después de añadir el SDS se debe ajustar el pH y mantener a temperatura ambiente.

- Preparación de Running Buffer 5x

Sustancia	Cantidad
0.125 M Trizma	15.1 g
0.96 M Glicina	72.0 g
0.5 % SDS	5.0 g
Agua	Ajustar a 1 litro

Guardar a temperatura ambiente

- Preparación de Buffer de muestra 5x

Sustancia	Cantidad
Glicerol	5 ml
SDS	1 g
β Mercapto etanol	2.56 ml
Buffer II	2.13 ml
Azul de Bromofenol	Gotas

Guardar en alícuotas de 1ml a -20°C .

11.2 Apéndice B: Tinción de Plata

1. El gel es incubado en 1 litro de una solución de ácido acético al 10%, en constante agitación por 20 min.
2. Luego se lava 3 veces con agua bidestilada (2 min c/lavado).
3. Se incuba el gel en 1 litro de una solución de Nitrato de Plata 0,1 % + 1 ml de formaldehído 36% y se mantiene en agitación constante por 20min. (Se recomienda ya en esta etapa cubrir la solución para evitar la exposición con la luz)
4. Eliminar la solución de nitrato de plata y lavar nuevamente el gel por aproximadamente 5 segundos (esta etapa es crítica tiempo de lavados más prolongados pueden provocar que el gel no se tiña)
5. Incubar el gel en oscuridad en un litro de solución reveladora (Carbonato de Sodio 2,5%, 1 ml Formaldehído 36% y 1 ml Tiosulfato 2%) hasta que aparezcan las bandas y alcancen la intensidad de color suficiente para analizar el gel (aproximadamente a los 10 minutos de transcurrida la incubación se comienzan a observar las primeras bandas).
6. Para la detención de la reacción se incuba nuevamente el gel en la solución de ácido acético 10% (la misma que fue utilizada al principio de este proceso) por 10 minutos en agitación constante.
7. Finalmente depositar el gel en agua y lavar por 20 minutos en agitación constante. Luego tomar una fotografía con la cámara digital en el transiluminador de luz blanca.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 6 Septiembre del 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor)
Dr. Estefan Miranda Miranda (Co Tutor)
Dra. Raquel Cossío Bayúgar
Dra. Deyanira Pérez Morales
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Análisis proteómico-transcriptómico de carboxil-esterasas del trematodo parásito zoonotico *Fasciola hepatica*"

Alumno que la presenta a revisión: **YARETZI JAQUELINE PEDROZA GOMEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. RAQUEL COSSIO BAYUGAR



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 16 de Septiembre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor)
Dr. Estefan Miranda Miranda (Co Tutor)
Dra. Raquel Cossío Bayúgar
Dra. Deyanira Pérez Morales
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Análisis proteómico-transcriptómico de carboxil-esterasas del trematodo parásito zoonotico *Fasciola hepatica*"

Alumno que la presenta a revisión: **YARETZI JAQUELINE PEDROZA GOMEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DR. ESTEFAN MIRANDA MIRANDA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 20 de septiembre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor)
Dr. Estefan Miranda Miranda (Co Tutor)
Dra. Raquel Cossío Bayúgar
Dra. Deyanira Pérez Morales
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Análisis proteómico-transcriptómico de carboxil-esterasas del trematodo parásito zoonotico *Fasciola hepatica*"

Alumno que la presenta a revisión: **YARETZI JAQUELINE PEDROZA GOMEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 20 de octubre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor)
Dr. Estefan Miranda Miranda (Co Tutor)
Dra. Raquel Cossío Bayúgar
Dra. Deyanira Pérez Morales
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Análisis proteómico-transcriptómico de carboxil-esterasas del trematodo parásito zoonotico *Fasciola hepatica*"

Alumno que la presenta a revisión: **YARETZI JAQUELINE PEDROZA GOMEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 04 de noviembre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor)
Dr. Estefan Miranda Miranda (Co Tutor)
Dra. Raquel Cossío Bayúgar
Dra. Deyanira Pérez Morales
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Análisis proteómico-transcriptómico de carboxil-esterasas del trematodo parásito zoonotico *Fasciola hepatica*"

Alumno que la presenta a revisión: **YARETZI JAQUELINE PEDROZA GOMEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DRA. DEYANIRA PEREZ MORALES