

Perfil electroforético 2D de las proteínas del intestino de *Fasciola hepatica*

2D electrophoretic profile of *Fasciola hepatica* intestine proteins

Marco Cabrera-González* , Diana Marlo-Javier , Carlos Quilcate-Pairazamán² , Héctor V. Vásquez²  y Medali Cueva-Rodríguez 

¹Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Dirección de Desarrollo Tecnológico Agrario, Estación Experimental Baños del Inca. Baños del Inca, Cajamarca, Perú.

²Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Dirección de Desarrollo Tecnológico Agrario. La Molina, Lima, Perú.

*Correo electrónico: mcabrera9@gmail.com

RESUMEN

Siendo la fasciolosis una infección parasitaria importante en rumiantes de muchos países y dada la alta prevalencia en humanos y animales en Cajamarca, Perú, se planteó realizar el estudio sobre el perfil de las proteínas de intestino de *Fasciola hepatica* con el objetivo de conocer el número de proteínas y el rango de pH de secreción/excreción de intestino del parásito que expresa mediante el método de electroforesis 2D-bidimensional. Las muestras adultas de *F. hepatica* se recolectaron de hígados de bovinos en el Camal Municipal de Cajamarca. Fueron trasladadas al laboratorio de Biotecnología en Sanidad Animal de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca, INIA – Cajamarca, para su procesamiento. La corrida electroforética permitió separar 82 proteínas con diferentes pesos moleculares, enfocadas en distintos puntos isoelectrónicos en un rango de pH de 6,0 a 9,4. Se concluye que mediante el análisis del gel 2D de proteínas de intestino de *F. hepatica*, se conocieron 84 spots de proteínas con distintos pesos moleculares, enfocadas en distintos puntos isoelectrónicos en un rango de 6,0 a 9,4.

Palabras clave: Bovinos; fasciolosis; electroforesis 2D; parásitos

ABSTRACT

Being fasciolosis an important parasitic infection in ruminants in many Countries and given the high prevalence in humans and animals in Cajamarca, Peru. It was proposed to carry out the study on the profile of the intestinal proteins of *Fasciola hepatica* with the objective of knowing the number of proteins and the pH range of secretion/excretion of the intestine of the parasite that it expresses by means of the 2D-bidimensional electrophoresis method. Adult samples of *F. hepatica* were collected from bovine livers in the Cajamarca Municipal Slaughterhouse. They were transferred to the Animal Health Biotechnology Laboratory of the Baños del Inca Agrarian Experimental Station, INIA – Cajamarca, for processing. The electrophoretic run allowed to separate 82 proteins with different molecular weights, focused at different isoelectric points in a pH range of 6.0 – 9.4. It is concluded that by analyzing the 2D gel of *F. hepatica* gut proteins, 84 protein spots with different molecular weights were identified, focused on different isoelectric points in a range of 6.0 – 9.4.

Key words: Bovine; fasciolosis; 2D electrophoresis; parasites

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis [1], causada por el tremátodo *Fasciola hepatica*, es una enfermedad parasitaria zoonótica [28], se encuentra distribuida a nivel mundial, según su cuadro clínico puede clasificarse en dos fases: aguda y crónica [2]. El sitio de predilección de *F. hepatica* madura son los conductos biliares en el hígado, las fasciolas adultas arrojan huevos al tracto gastrointestinal que son liberados posteriormente al medio ambiente y se convierten en miracidios, proceso que se da en una temperatura de 10°C como mínima y de 22 a 26°C óptima [24, 26]. Una vez desarrollados, los miracidios penetran en un caracol hospedador de moluscos de la familia *Lymnaeidae*, cuya especie en particular varía según la ubicación geográfica actúa como el principal hospedador intermediario en Europa [41].

Por lo que los estadios adultos ubicados en los conductos biliares de mamíferos herbívoros requieren caracoles *Lymnaea* como hospedadores intermedios para su transmisión [36]. El desarrollo de la *F. hepatica* depende evidentemente de las características ambientales [21], la fasciolosis ocasiona disminución en la producción de carne, leche y la fertilidad, pero adicionalmente las infecciones bacterianas secundarias debido a la inmunosupresión durante las infecciones por *F. hepatica* contribuyen a las pérdidas económicas [29, 31], el parásito está localizado en los conductos biliares y vesícula biliar de los animales, lo cual produce hepatitis traumática grave durante la etapa migratoria y biliar teniendo como resultado el camino a la pérdida del funcionamiento hepático [35], ocasiona daño al parénquima hepático y a los conductos biliares, lo que puede conducir a fibrosis hepática [25].

El cuerpo del parásito adulto es oval y aplastado, en la cara ventral destacan dos ventosas: una ventosa anterior (llamada también oral, porque suele rodear a la boca) y otra ventral (llamada también acetábulo). Las dimensiones de los adultos son muy variables según la especie: los más pequeños no miden más de 30 micrómetros (μm), en tanto que los más grandes pueden superar los 3 centímetros (cm) de longitud. Presentan coloración pálida, blanquecina, y si muestran algún color vivo se debe a los productos ingeridos que se aprecian por transparencia. En los trematodos digenéticos adultos y sexualmente maduros se distinguen varios tipos morfológicos, basados principalmente, en el número y disposición de las ventosas. El cuerpo está relleno de parénquima, que rodea a los órganos y el líquido corporal que circula entre sus células constituye el medio de transporte de diversas sustancias. El tubo digestivo es incompleto, pues, salvo alguna excepción, carecen de ano, y los desechos son regurgitados. La boca se abre en la porción anterior del cuerpo rodeada por la ventosa oral y se comunica con una faringe musculosa, a la que sigue un esófago que se bifurca en dos ciegos intestinales, a menudo ramificados como se aprecia en la FIG.1 [30].

El Triclabendazol (TCBZ) es el medicamento de elección para el control de fasciolosis y los informes de *F. hepatica* resistente a este medicamento, de una amplia gama de regiones geográficas son muy preocupantes [6]. En varios países se han informado de cepas de ganado resistentes a los medicamentos y, lo que es más preocupante, ha surgido en América del Sur la resistencia a los medicamentos en casos humanos, causando enfermedades hepáticas y pulmonares en millones de personas y ganado bovino (*Bos taurus*) [5, 7, 34], considerándose un problema importante de seguridad alimentaria y salud pública [36, 43], las fuentes de infección en humanos se dan por ingesta de alimentos y agua, considerando que las plantas silvestres de agua dulce como los berros (*Nasturtium officinale*) son la fuente principal, que han infectado a 17 millones de personas [27].

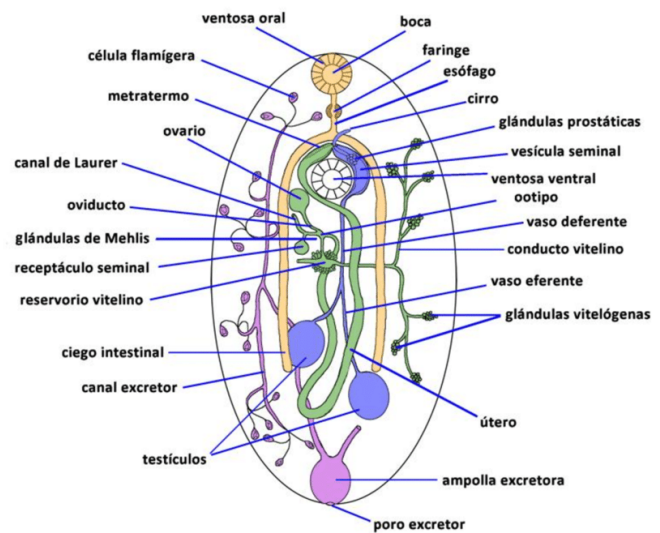


FIGURA 1. Morfología de Fasciola hepatica adulta. Fuente: Moreno y cols., 2011

Al no existir una vacuna en la actualidad para prevenir la fasciolosis, el tratamiento depende exclusivamente del TCBZ y el uso excesivo e inadecuado ha llevado a una resistencia generalizada, comprometiendo el control futuro del medicamento, [31]. Por ello, el parásito ha adquirido la capacidad de modular la respuesta inmune del hospedador en su propio beneficio mediante la liberación de productos excretores-secretores [E/S]. En consecuencia, los productos E/S se han considerado como una fuente potencial de inmunomoduladores / bioterapéuticos para una serie de enfermedades inflamatorias en humanos como diabetes, esclerosis múltiple, asma, lesión pulmonar aguda, ofreciendo una oportunidad para el desarrollo de nuevas terapias para este tipo de enfermedades [39].

La fasciolosis es de gran importancia económica en todo el mundo considerada como una amenaza a nivel global para la salud pública, el bienestar animal, productividad agrícola y la seguridad alimentaria [42], causando enormes pérdidas económicas en la agricultura [4, 10]. Según su cuadro clínico, puede clasificarse en dos fases: aguda y crónica, actualmente el diagnóstico se realiza durante la fase crónica, sin embargo, la detección temprana permitiría brindar un tratamiento eficaz y oportuno [33].

Dentro del hospedador se ha demostrado que, para prolongar su supervivencia, la *F. hepatica* influye en las respuestas inflamatorias del hospedador [19]. Otros estudios demuestran el efecto del parásito sobre la respuesta inmunitaria global de los hospedadores infectados, la cual se modula hacia un estado de tipo 2 no proliferativo después de un desafío natural, lo cual tiene implicaciones al momento de la administración de los programas de vacunación y de la susceptibilidad del hospedador a los patógenos co-infectantes [2]. Formas juveniles de *F. hepatica* secretan proteasas como las catepsinas [12, 40], las cuales permiten penetrar la pared intestinal, salir a la cavidad peritoneal y trasladarse al hígado, en donde penetran y migran a través del parénquima hepático dejando huellas en forma de túneles fibróticos hasta alcanzar una ubicación permanente en los conductos biliares. Por otro lado, se ha reportado que, las proteínas biológicas, como la Catepsina L, la glutatión s-transferasas, entre otras, participan en la migración y el establecimiento de *F. hepatica*, son expresadas

y secretadas por estos parásitos. Además, se menciona que los productos E/S son proteínas clave en la comprensión de la interacción hospedador-parásito e inmunoterapia [32].

Así, debido a su ubicación en la interfaz hospedador/parásito, la caracterización de las secreciones del parásito es importante para desentrañar las interacciones moleculares que rigen las relaciones entre los parásitos helmintos y sus hospedadores [3]. Por otro lado, Hanna y col. [20] reportan en su investigación sobre inmunolocalización e inmunodetección de los antígenos E/S de *Fasciola gigantica* provenientes del ciego intestinal, glándulas vitales, gónadas y tegumento parasitario. Con lo cual se generó el perfil e identificación de polipéptidos inmunogénicos; utilizando la técnica de Western blotting, la cual es una técnica de laboratorio utilizado para detectar una proteína específica en una muestra de sangre o tejido. El método implica el uso de electroforesis en gel para separar las proteínas de la muestra, la cual es una prueba que tiene especificidad y predicción positiva de 100 % y negativa de 95,71 %, respectivamente, encontrando 12 polipéptidos con capacidad inmunogénica [15].

Otros estudios, realizados por Jefferies y col. [23] mediante análisis proteómico de productos E/S de formas adultas de *F. hepatica*, utilizando la técnica de electroforesis en gel bidimensional 2-D, reportó hasta 60 proteínas prominentes de las cuales fueron identificadas 29 proteínas. Así también, Robinson y col. [38] manifestaron que, el análisis proteómico de proteínas secretadas por formas larvales y adultas de *F. hepatica* mostró que estas proteasas están reguladas en su desarrollo y se correlacionan con el paso del parásito a través de los tejidos del hospedador y sus encuentros con diferentes macromoléculas del mismo hospedador, siendo las proteasas como FhCL3 y Catepsina B, las que permiten la activación de larvas y la penetración de la pared intestinal, mientras que FhCL2, FhCL5 son necesarias para la penetración del hígado y la alimentación de tejidos y sangre. Además de las proteasas, los parásitos secretan una serie de moléculas antioxidantes que son regulados de acuerdo a su migración a través de los tejidos del hospedador.

Numerosos protocolos de laboratorio son utilizados para identificar proteínas, siendo la técnica electroforesis 2D, importante para la separación de proteínas por su peso molecular (PM) y carga eléctrica [14], siendo la técnica muy utilizada en la determinación de la composición proteica de muestras biológicas, además de ser utilizada desde hace algunos años para determinar la presencia del lipopolisacárido (LPS). Es una técnica que demostró ser altamente sensible; es más sencilla que las de resonancia magnética nuclear (RMN) y cromatografía gaseosa acoplada a masas, no requiere de complejos equipamientos y por lo general en los laboratorios de control de proceso de vacunas se cuenta con el equipamiento y los reactivos necesarios para su utilización [9].

Por ello, dicha técnica se ha empleado para comparar los productos de E/S de formas adultas de *F. hepatica* [3]. De esa manera, muchos autores han evidenciado que los productos de S/E muestran un conjunto de proteínas. Dentro de éstos, están los trabajos de Khan y col. [19], quienes determinaron que, en productos solubles de *F. gigantica* y *Gigantocotyle explanatum* en búfalo (*Bubalus bubalis*) de agua en la India, el número máximo de bandas observadas en la electroforesis correspondían a proteínas entre 10 - 160 kilodaltons (kDa) con puntos isoeléctricos (pI) entre 7,0 - 9,0 seguidos por un intervalo de pI de 5,0 - 7,0; 9,0 - 10,0 y 3,0 - 5,0, esto se observó en ambos parásitos. Por otro lado, Becerro y col. [3] realizaron un trabajo en muestras de suero de ovino (*Ovis orientalis aries*) de 4 a 12 semanas (sem) post

infección con *F. hepática*, el cual utilizaron mediante electroforesis 2D para la separación de proteínas, observando pI entre 5,0 y 9,8 y con un PM comprendido entre 10 y 170 kDa; observándose 12 bandas con pI menor a 5; además la tinción con nitrato de plata reveló un total de 448 bandas de productos de E/S. En otra investigación se realizó el análisis de proteínas de tegumento mediante electroforesis 2D de formas adultas de *F. hepatica* encontrando 14 bandas en la fracción citosólica con la mayoría de ellos entre un rango de pH de 4,7 a 5,9 seguido del rango de 7,0 a 10,0 [26].

Asimismo, en otro estudio se realizó la identificación de mapa de proteínas en productos de E/S y somático en *F. hepatica* y *F. gigantica* provenientes de hígados infectados de ovejas, encontrándose 40 y 19 bandas en *F. hepatica*. Además, 28 y 12 bandas proteicas en *F. gigantica*, respectivamente, [37]. La presente investigación tuvo como objetivo conocer el número de proteínas y el rango de pH de E/S de intestino del parásito que expresa mediante el método de electroforesis 2D-bidimensional [23].

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y cultivo de parásitos

Se recolectaron 220 fasciolas adultas de un total de 20 hígados infectados de ganado bovino provenientes del centro de beneficio local [Camal Municipal Cajamarca, Cajamarca, Perú]; se inspeccionaron los hígados de los bovinos para localizar las fasciolas adultas con la ayuda de guantes estériles y pinzas metálicas de acero inoxidable, todo el proceso se realizó con asepsia. Las formas adultas de *F. hepatica* fueron colocadas y trasladadas en dos recipientes de vidrio cerrados y rotulados, que contenían 50 mililitros (mL) de suero fisiológico al 0,9 % y fueron mantenidas en un termo [Cooler 32 L/Wenco/Perú] a 37°C, hasta su llegada al laboratorio de Biotecnología en Sanidad Animal de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca - INIA, en el laboratorio se lavaron 3 veces en 100 mL de tampón fosfato salino (PBS) 1X (pH 7,2) y se cultivaron en medio RPMI 1640 modificado [SAFC Biociencias con 2,05 miniMolar (mM) L-Glutamina, 25 mM HEPES] suplementado con 10 microlitros (µL) de penicilina-estreptomina durante 16 horas (h) a 37°C y 5 % de dióxido de carbono (CO₂), hasta que las formas adultas eliminaron todo su contenido intestinal [23]. Una vez que los parásitos fueron cultivados y eliminaron sus productos de E/S, se colocaron en la incubadora de dióxido de carbono (CO₂) [Memmert/ICO-50/Schwabach/ Alemania].

Obtención de intestino de *Fasciola hepatica*

Los parásitos fueron colocados en placas Petri estériles y con la ayuda de un estereomicroscopio (NIKON, SMZ645, NIKON, Francia) y un bisturí (Printer, Profesional, KEHR SURGICAL PRIVATE LIMITED, Alemania) se diseccionaron los intestinos y fueron colocados en micro tubos de 1500 microlitros (µL) conteniendo 100 µL de PBS 1X [pH 7,2] siendo almacenados en congelación a -20°C (Samsung, RT35K5930S8/PE, Samsung, México), hasta su uso.

Fragmentación y homogenización de intestino de *F. hepatica*

Los 20 intestinos se introdujeron en un tubo ependorff de 1500 µL, luego se colocaron en nitrógeno líquido a -195°C durante 20 segundos (seg) por 3 veces, los intestinos fueron fragmentados y homogenizados completamente con la ayuda de un mortero hasta adquirir una consistencia pastosa, las cuales fueron colocadas en un micro tubo estéril de 1500 µL y fueron almacenados en congelación a -20°C (Samsung, RT35K5930S8/PE, Samsung, México) hasta su uso.

Extracción y cuantificación de proteína de intestino de *F. hepatica*

La extracción de proteína de intestino de *F. hepatica* se realizó utilizando el kit comercial BugBuster® [Protein Extraction Reagent], según indicaciones del fabricante, se utilizó 300 µL de reactivo BugBuster® para 500 mL de muestra homogenizada de intestino en PBS 1X. [pH 7,2] y se centrifugó a 16.000 xG. durante 20 minutos (min) a 4°C en centrífuga (Centrifuge 5430/5430R, Eppendorf, Alemania).

La concentración de proteínas fue determinada con el método de la espectrofotometría, utilizando un espectrofotómetro (PCR MAX, Lambda, Beacon Road – Stone, Reino Unido), según instrucciones del fabricante se evaluó la absorbancia de la solución de extracción de proteína a 595 nanómetros (nm).

Electroforesis

Se realizó electroforesis en 2D utilizando la cámara de rehidratación [IPG Box™, GE Healthcare, Darmstadt, Alemania], se sellaron los carriles con 3 mL de aceite mineral DryStrip Cover Fluid [Bio-Rad] y se incubó 12 horas (h) a temperatura ambiente.

Se hizo rehidratación de tiras Immobiline DryStrip, las cuales se utilizan para obtener un programa general de las proteínas de E/S de *F. hepatica* [3] con pH de 3,0-10,0 No Lineal (NL), 7 centímetros (cm) [7 x 3 x 0,5 milímetros (mm)] [Bio-Rad] en la cual se homogenizó 20 µL de proteína suspendida de intestino en 1,25 mL de gradiente de pH inmovilizado (IPG) con pH 3,0-10,0 NL [Bio-Rad], se colocó en el carril con el gel de la tira hacia abajo para que hiciera contacto con la solución resuspendida en la cámara de rehidratación.

Primera dimensión (Isoelectroenfoque – IEF)

La tira inmóvil DryStrip rehidratada en la primera dimensión [Isoelectroenfoque – IEF] se colocó en el equipo de Isoelectroenfoque PROTEAM IEF CELL® (Bio-Rad), la técnica de IEF se estandarizó con un coeficiente de variación entre 0,24 a 0,89 [23], en dirección del polo positivo al negativo, se selló la tira con 2 mL de aceite mineral y se programó el tiempo y voltajes de corrida paso 1: 300 voltios (V) x 1 min 30 seg; paso 2: gradiente, 1000 V x 30 seg; paso 3: gradiente, 5000 V x 1 min 30 seg; paso 4: 5000 V x 30 seg; luego de transcurrido el tiempo programado se retiró la tira y se equilibró para la segunda dimensión en solución de buffer de equilibrio SDS (Tris-HCl 75 mM, pH 8,8; Urea 6M; Glicerol 29,3 % peso/volumen (P/V); SDS 2 %, Bromo fenol blue a 0,002 P/V); posteriormente la tira se rehidrató en 50 miligramos (mg) de DL-Ditiotreitol (DTT) y 125 mg de Iodoacetamina [36].

Segunda dimensión (SDS-PAGE)

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE, para lo cual se preparó un gel concentrador de acrilamida:bis-acrilamida al 5 % y un gel de resolución de acrilamida:bis-acrilamida al 15 %; se colocó la tira en el gel concentrador en sentido horizontal del cátodo (-) al ánodo (+) y se aplicó una corriente de 5 miliamperios (mA), por 30 min para el gel de concentración y 25 mA por 1,30 h para el gel de resolución, hasta que el frente de corrida haya llegado a la parte inferior [22].

Para la coloración de las proteínas se usó 100 mL de solución de colorante (250 mg de Coomassie brilliant blue G-250, 60 mL de metanol, 7,5 mL de ácido acético, se agitó uniformemente en el agitador magnético (PCE, PCE-MSR 150, Chile) evitando la formación de burbujas, se incubó [Memmert / IC050 / Schwabach / Alemania] el gel durante 45 min a 55°C, posteriormente se agitó y se realizó enjuague con agua destilada por 30 min a temperatura ambiente hasta observar

las proteínas separadas por su pI y pM, las bandas de proteína fueron analizadas por el programa Gel Analyzer 2010, analiza imágenes de gel de cualquier fuente, detección automática de carriles y bandas, permite medir y automatizar los procesos de medida en distintos tipos de geles, y así calcular su peso molecular [18].

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 8.1.2 [17] Free-Trial, Prism tiene un formato específico para los análisis que desea ejecutar, incluido el análisis de datos cuantitativos y categóricos. Esto facilita la introducción correcta de datos, la elección de análisis adecuados y la creación de gráficos sorprendentes [17], para pM y pI se realizó mediante prueba ANOVA, para ver si las muestras eran paramétricas se usó la prueba Kruskal-Wallis y las diferencias entre spots se usó la prueba "t de Student".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El parásito *F. hepatica* representa un riesgo evidente para la producción pecuaria y afecta a los seres humanos a nivel mundial; su condición de enfermedad emergente, sumada a su prevalencia en Latinoamérica, muestra un panorama que sugiere poner la mirada y todos los esfuerzos necesarios en la búsqueda de alternativas de manejo y control de este parásito [34]. La *F. hepatica* secreta Catepsina L que facilita la penetración del parásito a través de los tejidos del hospedador, participan en funciones como la alimentación y la evasión inmunológica y experimenta cambios en su migración a través del hospedador definitivo [13]. Las catepsinas están presentes en el comportamiento antigénico de los productos de E/S de *F. hepatica*. Se estima que la regurgitación regular del contenido intestinal del parásito inyecta moléculas en el torrente sanguíneo donde pueden ejercer una actividad inmunosupresora en el sistema inmunitario del hospedador [29]. Los productos de E/S producidos por *F. hepatica* son clave en la comprensión de la interacción hospedador-parásito, éstos productos ofrecen objetivos para la inmunoterapia [28]. Del mismo modo, otras moléculas se secretan desde el intestino, poros excretorios y tegumento de superficie del parásito hacia la bilis, para ejercer actividad inmunosupresora y pueden llegar al exterior a través del intestino del hospedador [13].

Las proteínas de E/S de *F. hepatica* interactúan entre el hospedador y el parásito, siendo necesarias para la infección, virulencia y supervivencia del parásito [11]. Estos productos de S/E contienen micromoléculas, nutritivas enzimas, proteínas, metabolitos finales los que se consideran como un cóctel de productos de E/S [8]. En otra investigación se identificó un perfil de antígenos de intestino del parásito dando lugar a la síntesis principalmente de la cisteína proteasas del parásito mediante vía clásica de retículo endoplásmico / aparato de Golgi mediante electroforesis 2D [38], con la finalidad de obtener una visión global de todas las proteínas presentes [3, 24, 29,37]. En la investigación se presenta la electroforesis en primera dimensión. Los pesos moleculares de las bandas fueron entre 12; 15; 17; 20; 27; 37 y 48 kDa (FIG. 2).

Con este contexto, las proteínas procedentes de muestras de intestino de formas adultas de *F. hepatica* se separaron a través de una tira de IPG de pH 3,0-10,0 mediante Isoelectroenfoque (IEF) y posteriormente mediante electroforesis SDS-PAGE al 15 %. El número de bandas de proteínas encontradas fueron 82 bandas (FIG. 3).

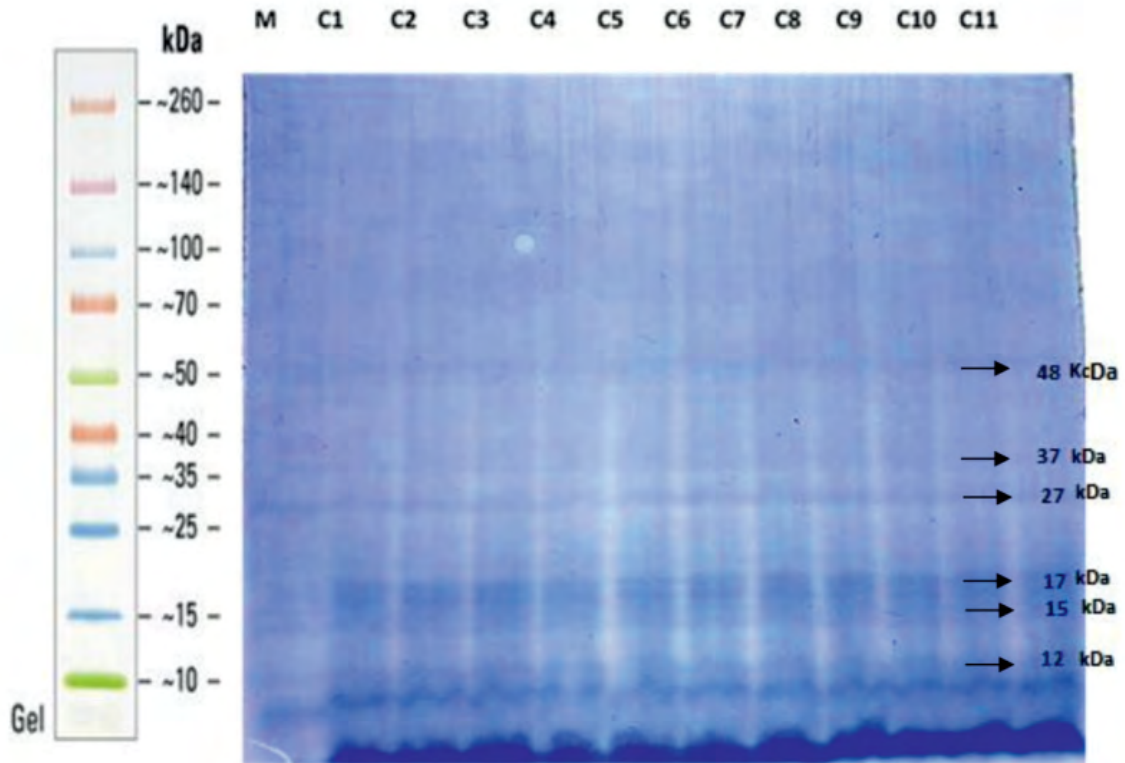


FIGURA 2. Resultado de electroforesis primera dimensión

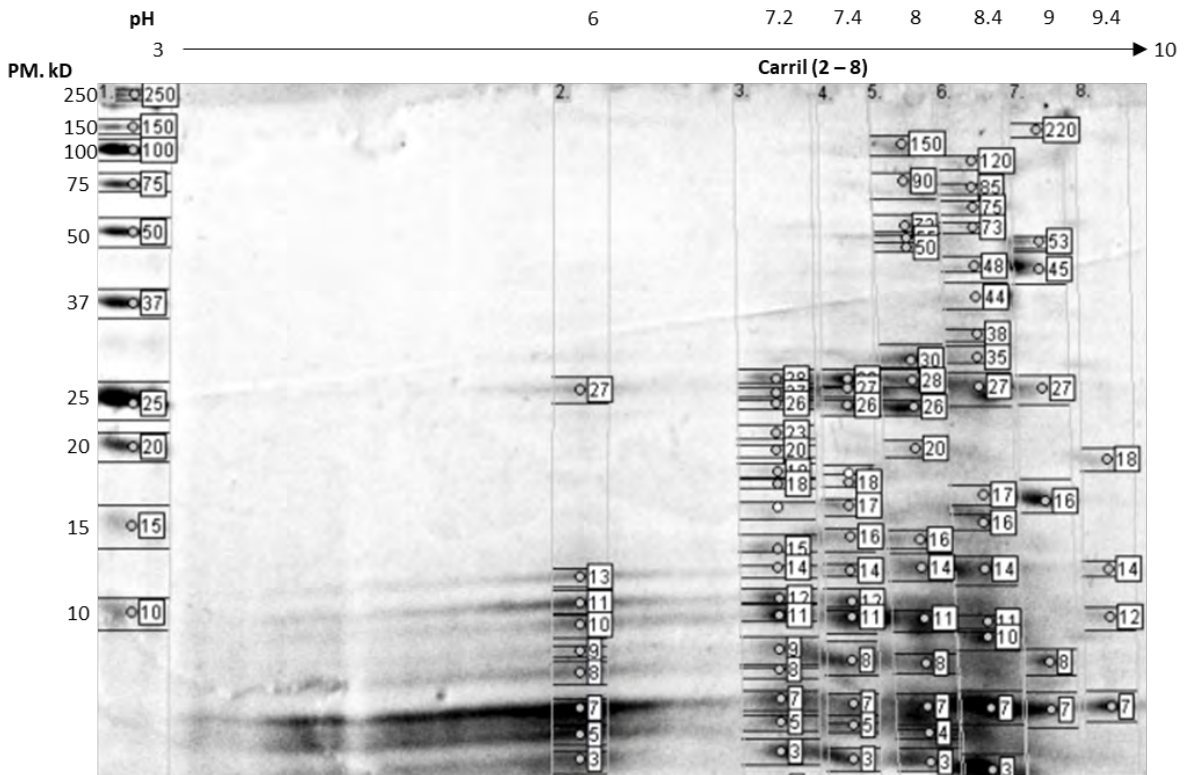


FIGURA 3. Patrón electroforético 2D de proteínas. Las bandas numeradas y en cuadrados corresponden a spots detectados mediante programa Gel Analyzer

En la TABLA I se muestran el PM y pl de las proteínas del intestino de *F. hepatica*, separadas en electroforesis 2D con un pH de 6,0, 7,2, 7,4, 8,0; 8,4; 9,0 y 9,4.

Asimismo, se encontró diferencia significativa en relación al PM en kDa y el pH de 8,4 (P<0,05) con respecto a los demás péptidos encontrados en el intestino de *F. hepatica* cómo se puede apreciar en la FIG. 4.

Estudios realizados por Issaq y col. [24] evidencian la importancia de los avances realizados en 2D-PAGE bidimensional durante los últimos 25 años que lo han convertido en una herramienta fundamental en la investigación. En otra investigación realizada en ovinos (*Ovis orientalis aries*) por inmunoproteómica 2D también guarda similitud a lo encontrado habiéndose revelado 410 bandas polipéptidas de productos de E/S de *F. hepatica* distribuidos entre 5 – 9,8 pl comprendidos entre 10-170 kDa, observándose 12 bandas menor a 5 pl. [3]. Asimismo Rasaouli y col. [37] manifiestan, en productos de E/S y extractos somáticos de *F. hepatica* y *F. gigantica* mediante electroforesis bidimensional se encontró que, al análisis cuantitativo se mostraron 28 y 40 bandas de proteína para productos de E/S de *F. gigantica* y *F. hepatica*, respectivamente. Para el extracto somático se

Electroforesis 2D-PAGE - Intestino *Fasciola hepatica*

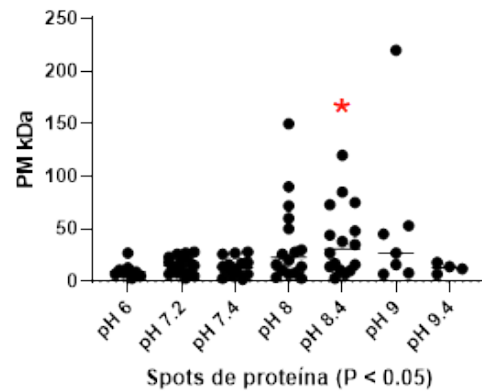


FIGURA 4. Análisis estadístico de proteínas antigénicas de intestino de *Fasciola hepatica*. El asterisco (*) indica diferencia significativa (P<0,05)

TABLA I
Masas moleculares y puntos isoeléctricos de las proteínas separadas con la electroforesis 2D según pH

Carril 2		Carril 3		Carril 4		Carril 5		Carril 6		Carril 7		Carril 8		
pH	Nº de spot	PM (KDa)	pH	Nº de spot	PM (KDa)	pH	Nº de spot	PM (KDa)	pH	Nº de spot	PM (KDa)	pH	Nº de spot	PM (KDa)
6	1	27	7,2	1	28	7,4	1	28	8,0	1	150	8,4	1	120
6	2	13	7,2	2	27	7,4	2	27	8,0	2	90	8,4	2	85
6	3	11	7,2	3	26	7,4	3	26	8,0	3	73	8,4	3	75
6	4	10	7,2	4	23	7,4	4	15	8,0	4	55	8,4	4	73
6	5	9	7,2	5	20	7,4	5	18	8,0	5	50	8,4	5	48
6	6	8	7,2	6	19	7,4	6	17	8,0	6	30	8,4	6	44
6	7	7	7,2	7	18	7,4	7	16	8,0	7	28	8,4	7	37
6	8	5	7,2	8	14	7,4	8	14	8,0	8	26	8,4	8	35
6	9	3	7,2	9	15	7,4	9	12	8,0	9	20	8,4	9	27
			7,2	10	14	7,4	10	11	8,0	10	16	8,4	10	17
			7,2	11	12	7,4	11	8	8,0	11	14	8,4	11	16
			7,2	12	11	7,4	12	7	8,0	12	11	8,4	12	14
			7,2	13	9	7,4	13	5	8,0	13	8	8,4	13	11
			7,2	14	8	7,4	14	3	8,0	14	7	8,4	14	10
			7,2	15	7				8,0	15	4	8,4	15	7
			7,2	16	5				8,0	16	3	8,4	16	3
			7,2	17	3									
			7,2	18	2									

pH: Potencial de hidrógeno, PM: Peso molecular

reconocieron 12 y 19 bandas de proteína para *F. gigantica* y *F. hepatica*, respectivamente, con polipéptidos con un intervalo de 68 a 186 a kDa y con pl de 4,6 a 9,39, resultados que guardan también cierta coherencia con el presente trabajo. Otros resultados obtenidos por Gourbal y col. [16] mediante electroforesis 2D detectaron resultados similares, donde se pudo identificar entre 29 a 60 bandas del producto de E/S de *F. hepatica* mediante electroforesis 2-D, incluidas proteasas Catepsina L, proteína antioxidante específica de tiol, superóxido dismutasa (SOD), tiorredoxina peroxidasa (TPx), glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a ácidos grasos (FABP), actina, enzima glucolítica enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; enzimas que pueden desempeñar un papel en la migración, desintoxicación, escape del sistema inmunológico y supervivencia de la *F. hepatica* en el cuerpo del hospedador.

CONCLUSIONES

En la presente investigación se concluye que mediante el análisis del gel 2D de proteínas de intestino de *F. hepatica*, se encontraron 82 spots de proteínas con distintos pesos moleculares, enfocadas en diferentes pl en un rango de 6,0 a 9,4.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no existe conflicto de intereses con la publicación de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADDY, F.; GYAN, K.; ARHIN, E.; WASSERMANN, M. Prevalence of bovine fasciolosis from the Bolgatanga abattoir. **Scientific African**. 8:e00469. 2020. <https://doi.org/htc6>.
- [2] ANIMAL PLANT HEALTH AGENCY. APHA Parasitology Group. Annual Review of Literature and Horizon Scanning Report 2017. 2018. <https://bit.ly/3wcUsY1>.
- [3] BECERRO-RECIO, D.; GONZÁLEZ-MIGUEL, J.; UCERO, A.; SOTILLO, J.; MARTÍNEZ-MORENO, Á.; PÉREZ-ARÉVALO, J.; CWIKLINSKI, K.; DALTON, J.P.; SILES-LUCAS, M. Recognition Pattern of the *Fasciola hepatica* Excretome/Secretome during the Course of an Experimental Infection in Sheep by 2D Immunoproteomics. **Pathog**. 10: 1-11. 2021. <https://doi.org/gkhgjq>.
- [4] BEESLEY, N.J.; ATTREE, E.; VÁZQUEZ-PRIETO, S.; VILAS, R.; PANIAGUA, E.; UBEIRA, F.M.; JENSEN, O.; PRUZZO, C.; ÁLVAREZ, J.D.; MALANDRINI, J.B.; SOLANA, H.; HODGKINSON, J.E. Evidence of population structuring following population genetic analyses of *Fasciola hepatica* from Argentina. **Internat. J. Parasitol**. 51(6): 471-480. 2020. <https://doi.org/htj6>.
- [5] BENNETT, A.P.; ROBINSON, M.W. Trematode Proteomics: Recent Advances and Future Directions. **Pathog**. 10: 348. 2021. <https://doi.org/htj7>.
- [6] BROCKWELL, Y.M.; ELLIOTT, T.P.; ANDERSON, G.R.; STANTON, R.; SPITHILL, T.W.; SANGSTER, N.C. Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. **Internat. J. Parasitol**. 4(1): 48-54. 2014. <https://doi.org/htj8>.
- [7] CALVANI, N.E.D.; ICHIKAWA-SEKI, M.; BUSH, R. D.; KHOUNSY, S.; ŚLAPETA, J. Which species is in the faeces at a time of global livestock movements: single nucleotide polymorphism genotyping assays for the differentiation of *Fasciola* spp. **Internat. J. Parasitol**. 50(2): 91-101. 2020. <https://doi.org/htj9>
- [8] CORRAL-RUIZ, G.M; SÁNCHEZ-TORRES, L.E. *Fasciola hepatica*-derived molecules as potential immunomodulators. **Acta Trop**. 210:e105548. 2020. <https://doi.org/htkb>.
- [9] CUELLO, M.; CABRERA, O.; RODRÍGUEZ, Y.; THURHEIM, G.; NORHEIM, G.; CABRERA, R.A.; ÁLVAREZ, M.; BLAIN, K.; NAESS, L.; ROSENQVIST, E.; GARCÍA, L. SDS-Page y análisis densitométrico para determinar la concentración de lipopolisacáridos de *Nesseria meningitidis* serogrupos A, W135 y X. **VacciMonitor**. 22(3): 36-42. 2013. <https://bit.ly/38lgn1F>.
- [10] CWIKLINSKI, K.; ALLEN, K.; LACOURSE, J.; WILLIAMS, D.J.; PATERSON, S.; HODGKINSON, J.E. Characterisation of a novel panel of polymorphic microsatellite loci for the liver fluke, *Fasciola hepatica*, using a next generation sequencing approach q. **Infection. Infect. Genet. Evol**. 32: 298-304. 2015. <https://doi.org/f7dtfb>.
- [11] CWIKLINSKI, K.; DALTON, J.P. Advances in *Fasciola hepatica* research using 'omics' technologies. **Internat. J. Parasitol**. 48(5): 321-331.2018. <https://doi.org/gdg2wg>.
- [12] DALTON, J.P.; HEFFERNAN, M. Thiol proteases released *in vitro* by *Fasciola hepatica*. **Molec. Biochem. Parasitol**. 35(2): 161-166. 1989. <https://doi.org/c39bj7>.
- [13] DALTON, J.P.; ROBINSON, M.W.; MULCAHY, G.; O'NEILL, S.M.; DONNELLY, S. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. **Vet. Parasitol**. 195: 272-285. 2013. <https://doi.org/hvxt>.
- [14] DORRI, Y. Two-Dimensional Gel Electrophoresis: Vertical Isoelectric Focusing. **Meth. Mol Biol**. 1855: 291-302. 2019. <https://doi.org/hvxw>.
- [15] ESCALANTE, H.; DAVELOIS, K.; ORTIZ, P.; RODRÍGUEZ, H.; DIAZ, E.; JARA, C. Estandarización de la técnica de Western Blot para el diagnóstico de la fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*. **Rev. Peru Med. Exp. Salud Publ**. 28: 454-461. 2011. <https://doi.org/fd42s3>.
- [16] GOURBAL, B.E.; GUILLOU, F.; MITTA, G.; SIBILLE, P.; THÈRON, A.; POINTIER, J.P.; COUSTAU, C. Excretory-secretory products of larval *Fasciola hepatica* investigated using a two-dimensional proteomic approach. **Molec. Biochem. Parasitol**. 161(1): 63-66. 2008. <https://doi.org/dkjh6g>.
- [17] GRAPHPAD. 2021. En línea. <https://bit.ly/3wzrFOJ>. 12-11-2021.
- [18] GELANALYZER 2010. Freeware 1D gel electrophoresis image analysis software. 2010. En línea. <https://bit.ly/3sK3laL>. 23-02-2022.
- [19] HAMILTON, C.M.; DOWLING, D.J.; LOSCHER, C.E.; MORPHEW, R.M.; BROPHY, P.M.; O'NEILL, S.M. The *Fasciola hepatica* Tegumental Antigen Suppresses Dendritic Cell Maturation and Function. **Infect. Immunity**. 77(6): 2488-2498. 2009. <https://doi.org/fs4fxf>.
- [20] HANNAN-KHAN, M.A.; ULLAH, R.; REHMAN, A.; REHMAN, L.; SHAREEF, A.; ABIDI, S. M. Immunolocalization and immunodetection of the excretory/secretory(ES) antigens of *Fasciola gigantica*. **PLoS ONE**. 12: 1-15. 2017. <https://doi.org/gbzmrx>.

- [21] ISAH, U.M. Studies on the prevalence of fascioliasis among ruminant animals in Northern Bauchi State, North-Eastern Nigeria. **Parasite. Epidemiol. Control.** 5: e00090. 2019. <https://doi.org/hvxx>.
- [22] ISSAQ, H.; VEENSTRA, T. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. **Biotech.** 44: 697-700. 2008. <https://doi.org/dwrfqc>.
- [23] JEFFERIES, J.R.; CAMPBELL, A.M.; ROSSUM, A.J.; BARRETT, J.; BROPHY, P.M. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. **Proteomics.** 1:1128-1132. 2001. <https://doi.org/b8bmrj>.
- [24] KHAN, Y.A.; KHAN, M.H.; ABIDI, S.M. 2D-PAGE analysis of the soluble proteins of the tropical liver fluke, *Fasciola gigantica* and *Biliary amphistome, Gigantocotyle explanatum*, concurrently infecting *Bubalus bubalis*. **J. Parasit. Dis.** 40(3): 910-913. 2016. <https://doi.org/hvzx>.
- [25] KOWALCZYK, S.J.; CZOPOWICZ, M.; WEBER, C.N.; MÜLLER, E.; KABA, J. Accuracy of a diagnostic model based on serum biochemical parameters in detecting cows at an increased risk of chronic fascioliasis. **Vet. Parasitol.** 254: 15-20. 2018. <https://doi.org/gdjnfq>.
- [26] LEE, C.G.; ZIMMERMAN, G.L.; WEE, S.H. *Fasciola hepatica*: comparison of flukes from Korea and the United States by isoelectric focusing banding patterns of whole-body protein. **Vet. Parasitol.** 42: 311-316. 1992. <https://doi.org/bt37rn>.
- [27] MAS-COMA, S.; BARGUES, M.D.; VALERO, M.A. Human fascioliasis infection sources, their diversity, incidence factors, analytical methods and prevention measures. **Parasitol.** 145(13): 1665-1699. 2018. <https://doi.org/gdtz6p>.
- [28] MIRANDA-MIRANDA, E.; COSSIO-BAYUGAR, R.; AGUILAR-DÍAZ, H.; NARVÁEZ-PADILLA, V.; SACHMAN-RUIZ, B.; REYNAUD, E. Transcriptome assembly dataset of anthelmintic response in *Fasciola hepatica*. **Data Brief.** 35: 106808. 2021. <https://doi.org/hvzb>.
- [29] MOLINA-HERNÁNDEZ, V.; MULCAHY, G.; PÉREZ, J.; MARTÍNEZ-MORENO, Á.; DONNELLY, S.; O'NEILL, S.M.; DALTON, J.P.; CWIKLINSKI, K. *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. **Vet. Parasitol.** 208(1-2): 101-111. 2015. <https://doi.org/f65jm6>.
- [30] MORENO, A.; OUTERELO, R.; RUIZ, E.; AGUIRRE, J.; ALMODÓVAR, A.; ALONSO, J.; BENITO, J.; ARILLO, A.; CANO, J. Prácticas de Zoología. Estudio y diversidad de los Platelminfos, Nematodos, Nematomorfos y Acanthocéfalos. **RE. Serie Zoología.** 4(2): 37-60. 2011. <https://bit.ly/3yNxjyf>.
- [31] MORPHEW, R.M.; WILKINSON, T.J.; MACKINTOSH, N.; JAHNDEL, V.; PATERSON, S.; MCVEIGH, P.; ABIDI, S.M.; SAIFULLAH, K.; RAMAN, M.; RAVIKUMAR, G.; LACOURSE, J.; MAULE, A.; BROPHY, P.M. Exploring and Expanding the Fatty-Acid-Binding Protein Superfamily in *Fasciola* Species. **Proteome Res.** 15: 3308-3321. 2016. <https://doi.org/hvzn>.
- [32] MORPHEW, R.M.; WRIGHT, H.A.; LACOURSE, E.J.; WOODS, D.J.; BROPHY, P.M. Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during in vitro culture ex host. **Molec. Cell. Proteomics.** 6(6): 963-972. 2007. <https://doi.org/d65cs9>.
- [33] MUÑOZ, M.E.; PLACENCIA, M.; DEL POZO, J.A.; SEVILLA, C.; HUIZA, A. Diagnóstico serológico de la infección por *Fasciola hepatica*: una revisión sistemática. **Rev. Gastroenterol. Perú.** 40(2): 155-161. 2020. <https://bit.ly/3G8rGwv>.
- [34] PEREA, M.; DÍAZ, A.; MEDELLÍN, M.; BULLA, D. Fasciolosis: una enfermedad emergente. **Pensamiento y Acción.** 24: 55-66. 2018. <https://bit.ly/38Fixio>.
- [35] PÉREZ-CABALLERO, R.; SILES-LUCAS, M.; GONZÁLEZ-MIGUEL, J.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; ESCAMILLA, A.; PÉREZ, J.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; BUFFONI, L. Pathological, immunological and parasitological study of sheep vaccinated with the recombinant protein 14-3-3z and experimentally infected with *Fasciola hepatica*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 202: 115-121. 2018. <https://doi.org/hvzs>.
- [36] PINILLA, J.C.; FLOREZ, A.A.; ORLANDONI, G.; TOBÓN, J.C.; ORTÍZ, D. Current status of prevalence and risk factors associated with liver fluke *Fasciola hepatica* in cattle raised in different altitudinal regions of Colombia. **Vet. Parasitol: Regional Studies and Reports.** 22: 1-6. 2020. <https://doi.org/hvzp>.
- [37] RASOULI, A.; FARAHNAK, A.; ZALI, H.; REZAEIAN, M.; GOLESTANI, A.; MOLAEI, M.B. Protein detection of excretory-secretory products and somatic extracts from *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* using two-dimensional electrophoresis. **Iranian J. Parasitol.** 14(3): 379-386. 2019. <https://doi.org/hvzr>.
- [38] ROBINSON, M.W.; MENON, R.; DONNELLY, S.M.; DALTON, J.P.; RANGANATHAN, S. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: Proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. **Molec. Cell. Proteomics** 8(8): 1891-1907. 2009. <https://doi.org/db7kvz>.
- [39] RYAN, S.; SHIELS, J.; TAGGART, C.C.; DALTON, J.P.; WELDON, S. *Fasciola hepatica*-Derived Molecules as Regulators of the Host Immune Response. **Frontiers Immunol.** 11: 2182. 2020. <https://doi.org/hvzv>.
- [40] SMITH, A.M.; DOWD, A.J.; HEFFERNAN, M.; ROBERTSON, C.D.; DALTON, J.P. *Fasciola hepatica*: A secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin. **Internat. J. Parasitol.** 23(8): 977-983. 1993. <https://doi.org/dzj8ff>.
- [41] THOMAS, A.P. Memoirs: The Life History of the Liver-Fluke (*Fasciola hepatica*). **J. Cell. Sci.** 23(89): 99-133. 1883. <https://doi.org/hvzw>.
- [42] XU, J.; WU, L.; SUN, Y.; WEI, Y.; ZHENG, L.; ZHANG, J.; PANG, Z.; YANG, Y.; LU, Y. Proteomics and bioinformatics analysis of *Fasciola hepatica* somatic proteome in different growth phases. **Parasitol. Res.** 119(9): 2837-2850. 2020. <https://doi.org/hvzx>.
- [43] YOUNG, N.D.; JEX, A.R.; CANTACESSI, C.; HALL, R.S.; CAMPBELL, B.E.; SPITHILL, T.W.; TANGKAWATTANA, S.; TANGKAWATTANA, P.; LAHA, T.; GASSER, R.B. A portrait of the transcriptome of the neglected trematode, *Fasciola gigantica*-biological and biotechnological implications. **Trop. Dis.** 5(2): e1004. 2011. <https://doi.org/dj4ff5>.