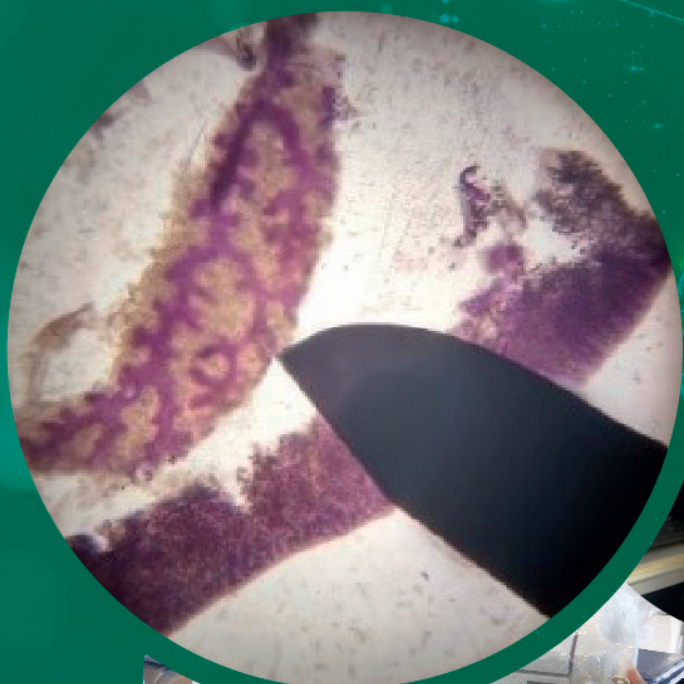


# Manual

Protocolos de laboratorio  
en la elaboración de vacunas  
para el control inmunológico  
de *Fasciola hepatica*  
en rumiantes



PERÚ

Ministerio  
de Agricultura y Riego

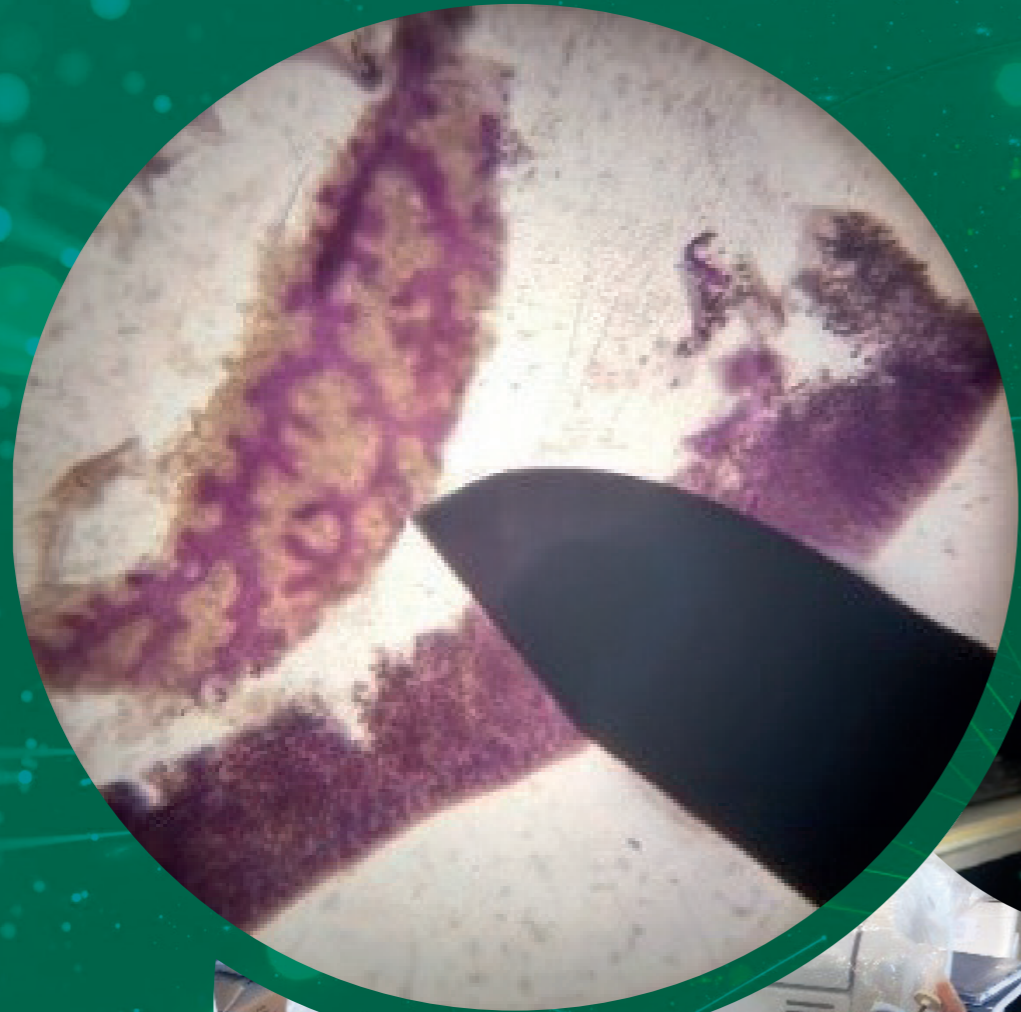


Instituto Nacional de Innovación Agraria

EL PERÚ PRIMERO



MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO  
INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA  
DIRECCIÓN DE DESARROLLO TECNOLÓGICO AGRARIO  
ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGRARIA BAÑOS DEL INCA



## Manual

Protocolos de laboratorio  
en la elaboración de vacunas  
para el control inmunológico  
de *Fasciola hepatica*  
en rumiantes

Proyecto PNIA 002\_PI

“Evaluación de antigenicidad de una nanoformulación con antígenos de secretoma de *Fasciola hepatica* frente a fasciolosis en la región de Cajamarca”

## Manual: Protocolos de laboratorio en la elaboración de vacunas para el control inmunológico de *Fasciola hepatica* en rumiantes

Ministerio de Agricultura y Riego

Ministro de Agricultura y Riego  
Ing. Jorge Luis Montenegro Chavesta

Viceministro de Desarrollo e Infraestructura Agraria y Riego  
Econ. Carlos Alberto Ynga La Plata

Viceministra de Políticas Agrarias  
Econ. Paula Rosa Carrión Tello

Jefe del INIA  
Jorge Luis Maicelo Quintana, Ph. D.

© Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA

### Elaboración de contenido:

MV. Marco Antonio Cabrera González, Dr.  
MV. Sámy Káterin Chávez Díaz  
MV. José Leonardo Ravines Chávez

### Editado por:

Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA  
Equipo Técnico de Edición y Publicaciones  
Av. La Molina 1981, Lima- Perú  
(51 1) 240-2100 / 240-2350  
www.inia.gob.pe

### Editor general:

Eliana Alviárez Gutierrez, M.Sc.

### Revisión de contenido:

Betty Flores Gonzales  
Heillen Calderón Castillo  
Gabriela Salazar Alvarez

### Diseño y diagramación:

Abner Fernando Mio Torrejón  
Luis Carlos Arévalo Mercado  
Jeams López Acaro

### Publicado:

Marzo del 2020

### Primera edición:

Marzo, 2020

### Tiraje:

1000 ejemplares

### Impreso en:

Nombre de la imprenta: Martínez Compañón Editores

RUC: 20495926479

Teléfono: (076) 361904

Dirección: Jr. Irene Silva de Santolalla 700 Urb. Horacio Zeballos,  
Cajamarca

E-mail: gerencia@mceditores.com

ISBN: 978-9972-44-050-2

# Tabla de CONTENIDO

1.	Introducción .....	5
2.	Clasificación taxonómica .....	5
3.	Morfología general .....	6
3.1.	Adulto .....	6
3.2.	Miracidium .....	6
3.3.	Esporocisto .....	7
3.4.	Redia .....	7
3.5.	Cercaria .....	8
3.6.	Metacercaria .....	8
4.	Ciclo biológico.....	9
5.	Hospedero intermediario .....	11
6.	Hospedero definitivo .....	11
7.	Problemática en rumiantes .....	12
8.	Problemática en humanos .....	12
9.	Alternativa de control inmunológico .....	13
10.	Protocolos de biología molecular .....	14
10.1.	Extracción de proteína de intestino de <i>Fasciola hepatica</i> .....	14
10.1.1	Cuantificación de proteína por espectrofotometría (método Bradford) .....	15
10.2.	Protocolos de electroforesis .....	17
10.2.1	Electroforesis SDS-page .....	17
10.2.2	Electroforesis 2D-bidimensional .....	21
10.3.	Extracción de ARN de <i>Fasciola hepatica</i> .....	25
10.4.	Producción de ADN complementario (ADNc) .....	27
10.5.	Amplificación de ADN (Catepsina CL1) .....	29
10.6.	Electroforesis en gel de agarosa .....	31
10.7.	Purificación de productos de PCR .....	33
10.8.	Clonación del producto de PCR (Catepsina CL1) .....	35
10.9.	Transformación de células competentes .....	37
10.10.	Multiplicación de células competentes transformadas .....	41
10.11.	Extracción de ADN plasmídico de bacterias transformadas .....	42
10.12.	Encapsulación de ADN plasmídico con polímero biodegradable – ácido poliláctico (PLA) .....	45
11.	Protocolo de evaluación preclínica de vacunación .....	47
11.1.	Diseño del protocolo experimental .....	47
11.2.	Desafío experimental .....	49
11.3.	Evaluación de los aspectos relacionados a inocuidad y toxicidad de vacuna .....	50
11.4.	Análisis de la función hepática y renal .....	50
11.5.	Evaluación de parámetros hematológicos .....	51
11.6.	Evaluación del perfil humoral .....	51
12.	Referencias .....	52

## 1. INTRODUCCIÓN

“La fasciolosis” es una zoonosis parasitaria causada por el tremátodo *Fasciola hepatica*, afecta al hígado del humano y animales herbívoros como vacunos, ovinos, caprinos y equinos, entre otros. En el Perú es considerado un problema de salud pública por la alta prevalencia de infecciones en humanos, especialmente en niños y un problema veterinario de importancia por las altas tasas de infección del ganado en varias regiones del país (Espinoza, Terashima, Herrera y Marcos, 2010). Frente a este problema nuestro grupo de investigación, en el marco del proyecto 002\_PI - PNIA “Evaluación de la antigenicidad de una nanoformulación con antígenos de secretoma de *Fasciola hepatica* frente a la fasciolosis en la region de Cajamarca”, planteó como objetivo desarrollar una vacuna de ADN recombinante a partir del gen de catepsina (CL1), como profilaxis para el control de este tremátodo en rumiantes.

El presente documento “Manual de protocolos de laboratorio en la elaboración de vacunas para el control inmunológico de *Fasciola hepatica* en rumiantes” tiene como objetivo difundir el uso de estos procedimiento entre el personal profesional y técnico relacionado al desarrollo de la ganadería. Este manual es la compilación de los protocolos de biología molecular empleados y estandarizados para la elaboración de vacunas genéticas de tercera generación para el control de *Fasciola hepatica*, el cual fue elaborado en el Laboratorio de Biotecnología – Sanidad animal de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).

## 2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Cordero et al. (1999) citado por Cabanillas (2018), clasifica taxonómicamente a *Fasciola hepatica* de la siguiente manera:

Phylum	Platyhelminthes
Sub phylum	Cercomeria
Súper clase	Cercomeridea
Clase	Trematoda
Sub clase	Digeneo
Orden	Fascioliformes
Súper familia	Fascioloidea
Familia	Fasciolidae
Sub familia	Fasciolinae
Género y Especie	<i>Fasciola hepatica</i> Linnaeus, 1758



### 3. MORFOLOGÍA DE *Fasciola hepatica*

#### 3.1. Adulto

Aplanado, en forma de hoja, mide 18 a 50 mm de largo por 4 a 13 mm de ancho; de color gris cuando el parásito es conservado en formol y pardo grisácea cuando se encuentra fresco (Figura 1). En su extremo anterior presenta el cono cefálico y se distinguen dos ventosas útiles, una oral que rodea la boca y la otra ventral (Cordero et al., 1999). El aparato digestivo es incompleto, formado por una cavidad bucal pequeña, una faringe musculosa y un esófago que se separa en dos ramas laterales que finalizan en ciegos intestinales. En relación al aparato reproductor, son hermafroditas, con el poro genital en posición anterior a la ventosa ventral y con genitales masculino y femenino ramificados; presenta saco del cirro entre la ventosa oral y ventral, un par de testículos, un corto útero lleno de huevos ubicado delante del ovario y glándulas vitelógenas distribuidas en los campos laterales del cuerpo. El sistema nervioso presenta un collar de tejido especializado, el cual rodea con largos cordones nerviosos, el extremo anterior del tubo alimenticio. Este parásito no posee ningún órgano sensorial (Huaccha, 2008).



Figura 1. Morfología del estadio adulto de *Fasciola hepatica*.

Fuente: Haro, s.f.

#### 3.2. Miracidium

Larva ciliada, mide aproximadamente 128  $\mu\text{m}$  por 25  $\mu\text{m}$  (Figura 2), presenta manchas oculares, una papila móvil y una glándula apical. El sistema excretor es rudimentario y posee un grupo de células germinativas, que son las progenitoras de la siguiente generación de estadios larvales. El miracidium surge de la eclosión del huevo del parásito y tiene como objetivo principal buscar al hospedero intermediario, un caracol del género *Lymnaea*. (Barriga, 2002; Drugueri, 2005; Romero, 2007; Urquhart, Armour, Duncan, Dunn y Jennigs, 2001).

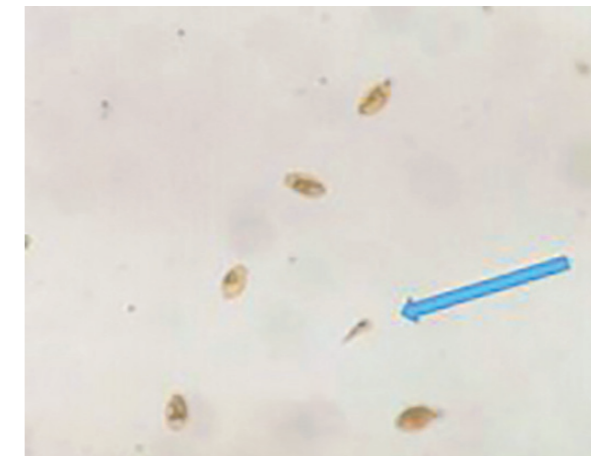


Figura 2. Estadio miracidium de *Fasciola hepatica*.

#### 3.3. Esporocisto

Larva en forma de saco, mide aproximadamente de 1 mm (Figura 3). Carece de aparato digestivo, nervioso y reproductor (Figura 3). Al no poseer boca, se piensa que los nutrientes los obtienen a través de la pared de su cuerpo (Romero, 2007).



Figura 3. Estadio esporocisto de *Fasciola hepatica*.

Fuente: Carrada-Bravo, 2007

#### 3.4. Redia

Larva en forma de saco alargado, mide entre 1 - 3 mm (Figura 4). En el extremo anterior, presenta una boca que se comunica con una faringe musculosa. Posee masas germinales y a diferencia del parásito adulto, tiene un sistema excretor con menor número de células flamígeras y dos poros excretorios (Romero, 2007; Rojas, 2004).



Figura 4. Estadio redia de *Fasciola hepatica*.

Fuente: Tello, 2012

### 3.5. Cercaria

Larva móvil, mide aproximadamente 260 - 320  $\mu\text{m}$  por 200 - 240  $\mu\text{m}$ , posee un flagelo terminal a manera de cola (Figura 5). Además, presentan ventosas, ciegos intestinales, aparato excretor, sistema nervioso, primordio genital y glándulas cistógenas oscuras y granulares (Barriga, 2002; Romero, 2007).

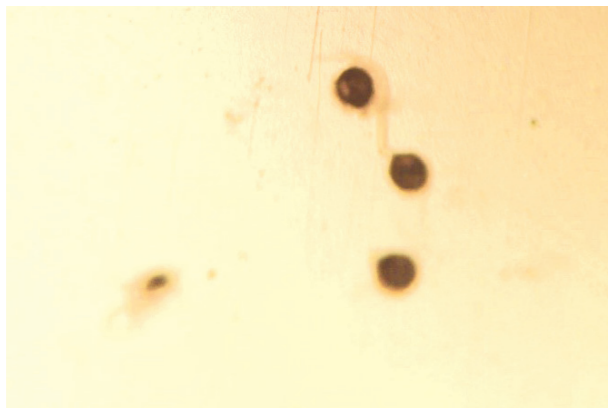


Figura 5. Estadio cercaria de *Fasciola hepatica*.

### 3.6. Metacercaria

Forma infectante para el hospedero definitivo, generalmente se encuentra en zonas con alta humedad, enquistada entre la vegetación que normalmente es consumida por los animales. Este estadio presenta forma esférica y a veces ovalada, mide aproximadamente 250 - 300  $\mu\text{m}$  por 200 - 250  $\mu\text{m}$ . Su composición se asemeja a la del parásito adulto, excepto por la presencia de gónadas no funcionales (Figura 6).

Pueden sobrevivir hasta 13 meses en este estado ya que presentan una pared conformada por 4 capas, lo que le confiere alta resistencia a bajas temperaturas; inclusive si las pasturas infectadas están cubiertas por nieve, sin embargo estos quistes son muy susceptibles a la desecación (Romero, 2007).

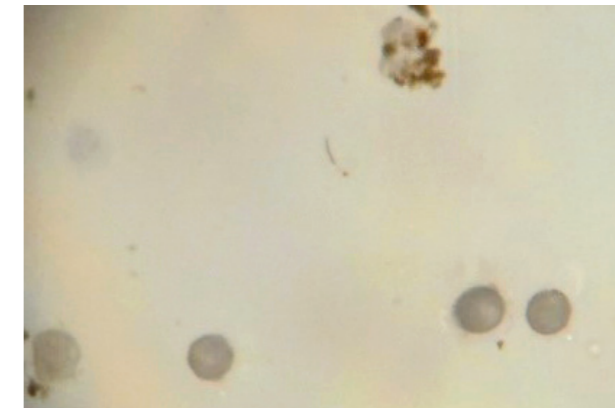


Figura 6. Estadio metacercaria de *Fasciola hepatica*.

## 4. CICLO BIOLÓGICO

Presenta un ciclo biológico de tipo indirecto, es decir requiere de la participación de un hospedero definitivo, donde se produce la reproducción sexual y un hospedero intermediario, donde se da la reproducción asexual (Figura 7) (Gallego, 2007; Gonzáles, 2001).

En el hospedero definitivo, los parásitos adultos se localizan en los conductos biliares; donde depositarán sus huevos, luego estos serán trasladados por la bilis al intestino delgado a través del conducto colédoco para finalmente ser arrastrados juntos con las heces hacia el exterior. La forma adulta de *Fasciola hepatica*, puede despositar en el hospedero, en promedio 20 000 huevos por día dependiendo de diversos factores, como el grado de parasitación, edad del hospedero y tiempo de infección (Carrada-Bravo, 2007; Gallego, 2007).

En el medio ambiente, los huevos necesitan de 9 a 15 días para su incubación y la eclosión se verá influenciada por factores ambientales como la temperatura, humedad, dióxido de carbono y oxígeno; siendo la temperatura, uno de los factores que afecta considerablemente el tiempo de eclosión. Para la eclosión, la temperatura puede variar entre 10 - 30  $^{\circ}\text{C}$ , sin embargo; a temperaturas inferiores a 10  $^{\circ}\text{C}$  el desarrollo se detiene (Mas-Coma, Estaban y Bargues, 1999; Browman, Linne y Eberhard, 2004; Romero, 2007).

Después de la eclosión emerge el miracidio, que nada libremente para encontrar al hospedero intermediario, el caracol del género *Lymnaea*. El miracidium tiene la urgencia de encontrar a su hospedero en menos de 24 horas, ya que sus reservas energéticas son limitadas, de lo contrario morirá. Mediante contracciones musculares y movimientos ciliares la larva ingresa al pie del caracol, luego migrará hacia la cámara pulmonar para dar origen al esporocisto, donde cada uno de ellos, aproximadamente en 15 días, dará lugar a la primera generación de redias (entre cinco y ocho redias) y si las condiciones medioambientales no resultan favorables para el caracol, se forma la segunda generación de redias, mediante multiplicación asexual; de ser lo contrario la siguiente generación es de cercarias. Se ha calculado que aproximadamente 250 cercarias se forman a partir de cada miracidium. En condiciones naturales, el desarrollo completo dentro del hospedador se da entre 7 a 10 semanas (Barriga, 2002; Romero, 2007; Rojas, 2004; Soulsby, 1987).

Las cercarias, al salir del hospedador intermediario, rápidamente se enquistan en las hojas de las plantas e inclusive en el agua, para luego perder la cola móvil. Mediante sus glándulas cistógenas las cercarias secretan una cubierta resistente que contribuye al proceso de enquistamiento que dará origen a las metacercarias. Las metacercarias resisten mejor las temperaturas bajas, pero son susceptibles a las temperaturas altas y algunas pueden enquistarse en el agua en donde permanecen en suspensión adheridas a las burbujas (Barriga, 2004; Romero, 2007; Gallego, 2007; Acha y Szyfres, 2003).

El hospedero definitivo se infecta después de ingerir alimento contaminado con metacercarias, las cuales se desenquistan en el intestino delgado y liberan la fasciola juvenil. Estas pasan la pared del duodeno y migran por el peritoneo, después de dos horas de ingestión; luego alrededor de 2 a 6 días migran por el parénquima hepático después de penetrar la cápsula de Glisson del hígado. Esta fasciola juvenil ubicada en los conductos biliares, alcanzan la madurez sexual al cabo de 8 a 10 semanas y ya son capaces de producir huevos. Entre 8 y 100 semanas post infección, estos huevos saldrán al medio ambiente junto con las heces (Olaechea, 2007; Gallego, 2007; Londoño, Chávez, Li, Suárez y Pezo, 2009; Leguía, 1991).

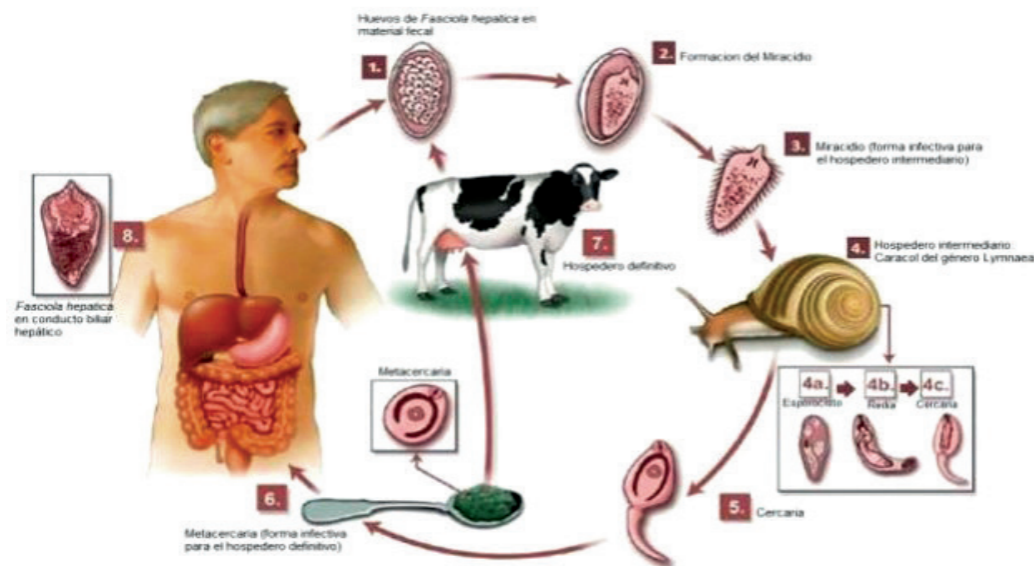


Figura 7. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*. Fuente: Cordero, 2016 modificado de Fiel, 2012

## 5. HOSPEDERO INTERMEDIO

Los caracoles clasificados dentro del género *Lymnaea* (*Galba*) actúan habitualmente como hospedador intermediario de *F. hepatica*. Su principal exponente, presente en todos los países europeos y con evidencias en Sudamérica y África, es *Galba truncatula* (Graczyk & Fried, 1999).

La concha es helicoidal, ovalada que se enrolla hacia la derecha en plano vertical, lo que le brinda la denominación de dextrógira; son de color pardo grisáceo, su el tamaño varía entre 1 mm a 10 mm (Figura 8). Además, presentan un peristoma simple y carecen de opérculo (Soulsby, 1987).

Se desarrollan en terrenos con humedad permanente como riachuelos, abrevaderos, charcos, praderas inundadas, entre otros, donde la corriente es lenta y de agua dulce. En condiciones climáticas adecuadas de temperatura y humedad, un solo caracol puede producir hasta 25 000 descendientes y pueden hibernar en el subsuelo húmedo logrando sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables hasta por un año (Soulsby, 1987).

Los caracoles adultos que llegan a sobrevivir al invierno, depositan sus huevos en la primavera y continúan haciéndolo durante el verano hasta que mueren; de esta manera, se observa una generación y media en un año (Boray, 1997; Malone et al, 1998).

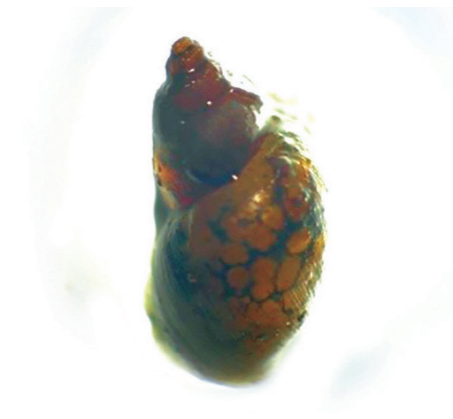


Figura 8. *Galba truncatula*, hospedero Intermedio de *F. hepatica*.

## 6. HOSPEDERO DEFINITIVO

*Fasciola hepatica*, posee una amplia variedad de hospederos definitivos, en los que se encuentran los mamíferos domésticos de importancia ganadera como bovinos, ovinos, camélidos, caballos, burros, cabras, cerdos, cuyes, conejos, y algunas especies silvestres; además del hombre (Torgerson, 1999).



## 7. PROBLEMÁTICA EN RUMIANTES

En el Perú, la fasciolosis es considerado un problema veterinario presente en las zonas de cría de vacunos, principalmente en regiones cercanas a la Cordillera de los Andes. Esta enfermedad fue considerada clásicamente como una parasitosis esporádica y accidental para el hombre; sin embargo, el incremento de casos en humanos, en los últimos años, ha determinado que esta parasitosis sea una enfermedad emergente y de importancia en salud pública (Marcos et al., 2007).

Cajamarca es una de las regiones andinas peruanas endémicas que posee alta prevalencias de fasciolosis, causando un notable impacto en la salud y economía regional. Estudios en animales indican tasas de infección de aproximadamente 75 % en ganado vacuno, 45 % en ovinos, 23 % en porcinos y 14 % en caprinos; encontrándose además, que las mayores tasas están en la provincia de Cajamarca (Huaccha, 2008).

En 1991, las pérdidas causadas por la fasciolosis se estimaron en 11 millones de dólares por año; recientemente, se ha calculado que las pérdidas anuales en producción láctea y carne son de 12 millones de dólares en la región de Cajamarca. Las pérdidas se estiman sobre la base que la región de Cajamarca tiene una población de 604 700 cabezas de ganado vacuno (Instituto Nacional de Estadística e Informática - INEI, 1998), además, se estimó una reducción en el rendimiento de leche entre 8 a 20 % dependiendo de la intensidad de la infección (INEI, 1998), así también se consideró la disminución de la ganancia de peso en hasta 8 % la eficacia de conversión de alimentos hasta 11 %. Adicionalmente, los costos por tratamiento con antihelmínticos frente a *Fasciola hepatica* es el mayor componente de pérdida económica, ya que los animales son tratados hasta más de tres veces por año (Claxton et al., 1998), con un costo de aproximado de 5.6 millones de dólares americanos por año lo que representa 46.6 % de la pérdida total.

El uso de las drogas antihelmínticas es una de las estrategias más utilizadas y efectivas para contrarrestar la fasciolosis hepática en distintas especies de animales a nivel mundial. Entre los diversos fármacos existentes, el triclabendazol es una de los más empleados, Fairweather y Boray (1999), reportan su uso en rumiantes a partir de los años 80. Sin embargo uno de los problemas más críticos sobre el uso de fármacos en el control de parásitos es la resistencia antihelmíntica.

La resistencia de *Fasciola hepatica* al triclabendazol fue reportada por primera vez en Cajamarca, en un estudio realizado a un grupo de bovinos del fundo El Cortijo - valle de Cajamarca, donde se encontró una eficacia del fármaco de 3.1 % (Rojas, 2007). En otro estudio realizado a un grupo de 15 bovinos, en el día 28 post dosificación de triclabendazol y closantel, se encontraron eficacias del 77 % y 25 % respectivamente en Santa Elvira - distrito San Juan, 6 % y 0 % en San Luis - distrito Gregorio Pita y de 81 % y 85 % en Quebrada Honda - distrito Tumbadén (Rojas, 2007).

Recientemente Ortiz (2013), reportó una falta de eficacia clínica de triclabendazol (TCBZ) después de tratar una población de ganado lechero en Cajamarca, encontrando una eficacia del antiparasitario del 25.2 %, lo que confirma la resistencia a TCBZ de *Fasciola hepatica*.

## 8. PROBLEMÁTICA EN HUMANOS

La fasciolosis humana, es una de las enfermedades parasitarias más importantes en el Perú, debido a las altas tasas de prevalencia registradas en los últimos años. En el estudio "Prevalencia de fasciolosis en humanos en la región Cajamarca – periodo 2010" realizado en niños en edad escolar de las provincias de San Marcos,

Cajabamba y Celendín, se reportó una frecuencia relativa de 10.9 %. En la investigación se recuperaron 248 fichas epidemiológicas, donde 27 niños resultaron positivos en la prueba de ELISA (Orfanos, Cabanillas y León, 2010).

Por otro lado, en un estudio realizado a un grupo de 476 niños, cuyas edades fluctuaban de 2 a 18 años de edad, en seis localidades rurales ubicadas entre 2 627 - 3 061 m.s.n.m. en la provincia de Cajamarca, se reportó una prevalencia de fasciolosis que variaba entre 6.7 y 47.7 % (media 24.4 %); siendo este resultado el valor más alto registrado hasta ahora en esa área, encontrando además una carga parasitaria entre 24 y 864 huevos por gramo y ninguna diferencia significativa entre sexo y edad (González, 2011).

## 9. ALTERNATIVA DE CONTROL INMUNOLÓGICO

Los fármacos empleados frente a *Fasciola hepatica* pueden proporcionar una cura para la infección; no obstante, debido al desarrollo continuo de parásitos resistentes a los fármacos y las altas tasas de reinfección en áreas endémicas, donde esta parasitosis es de ocurrencia regular, se requieren de nuevas estrategias de control contra este parásito. Varios estudios de vacunas en rumiantes que emplean diferentes antígenos candidatos, entre los que se encuentran la proteína de unión a los ácidos grasos, glutatión-S-transferasa, leucina aminopeptidasa y catepsina L1 y L2, han probado ser prometedores (Toet, Piedrafita y Spithill, 2014).

Las proteasas secretadas por los parásitos son importantes para el establecimiento exitoso de la interacción del parásito en el huésped, incluida la invasión, destrucción de los tejidos del huésped, penetración de los sistemas vasculares del huésped y la migración hacia su micro hábitat; siendo estas proteasas usadas como objetivo quimioterapéutico o de vacunas (Sajid y Mckerrow, 2002).

La localización de los sitios de liberación de antígeno en el parásito podría explotarse para diversas estrategias de control, ya que nos permite especular sobre la relación de su función probable y su fuente de liberación. La liberación de proteínas y enzimas en parásitos se ha observado en órganos altamente especializados como el intestino, gónadas y en el tegumento del parásito (Krailas et al., 1999; Abdel-Rahman, O'Reilly y Malone, 1999; Anuracpreeda, Wanichanon y Sobhon, 2009).

La proteasa catepsina L1 (CL1) se almacena en su forma inactiva en vesículas secretoras de las células epiteliales gastrodérmicas y luego se secretan en el lumen del intestino del parásito en grandes cantidades antes de ser liberadas en los tejidos del huésped (Dalton y Hefferman, Collins et al., 2004).

Frente a esta problemática de alta incidencia y prevalencia de fasciolosis en rumiantes y en niños, en especial en el área rural en la región de Cajamarca y teniendo en cuenta que el parásito expresa resistencia antihelmíntica a los principales fármacos utilizados en su control, se ha planteado el desarrollo del proyecto "Evaluación de una nanoformulación con antígenos de secretoma de *Fasciola hepatica* frente fasciolosis en la Región de Cajamarca", que tiene como objetivo reducir los índices de prevalencia e incidencia de esta parasitosis, para este fin se realizó actividades de laboratorio conducentes a la elaboración de un prototipo de vacuna a base de ADN recombinante de catepsina CL1 de *Fasciola hepatica*, cuyos protocolos se estandarizaron en el laboratorio de biotecnología de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca los cuales se describen a continuación.



## 10. PROTOCOLOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 10.1. Extracción de proteína de intestino de *Fasciola hepatica*

El protocolo tiene como objetivo cuantificar el contenido de proteína y caracterizar antígenos de *F. hepatica* mediante electroforesis SDS-PAGE y electroforesis 2D-bidimensional.

Reactivos	Materiales y equipos
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kit de extracción de proteína (BugBuster®)</li> <li>▪ Buffer fosfato salino (PBS)</li> <li>▪ Medio RPMI-1140</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tubos eppendorf de 1.5 ml</li> <li>▪ Nitrógeno líquido</li> <li>▪ Recipiente con hielo picado</li> <li>▪ Mortero porcelana</li> <li>▪ Gradilla para tubos eppendorf de 1.5 ml</li> <li>▪ Recipiente para descarte de líquidos</li> <li>▪ Recipiente para descarte de puntas</li> <li>▪ Baño maría</li> <li>▪ Vórtex</li> <li>▪ Estereomicroscopio</li> <li>▪ Centrifuga</li> <li>▪ Suero fisiológico 0.9 %</li> <li>▪ Pipetas automáticas</li> <li>▪ Puntas libres de ARNasa</li> <li>▪ Algodón</li> <li>▪ Papel toalla</li> <li>▪ Marcador para rotular</li> </ul>

#### Procedimiento

1. Extraer formas adultas de *Fasciola hepatica* de hígados infectados de ganado vacuno u ovino y colocarlos en tubos de 50 ml conteniendo suero fisiológico 0.9 %. Conservar a 37 °C.
2. Lavar los parásitos adultos varias veces con medio RPMI-1140 a una temperatura de 37 °C hasta la eliminación de contenido intestinal.
3. Colocar los parásitos en placas de petri, con la ayuda del estereomicroscopio diseccionar (Figura 9) y extraer los intestinos de 20 individuos. Colectar (Figura 10) y conservar en 100 µl de fosfato buffer salino en tubos de 1.5 ml y llevar a congelación a -20 °C hasta posterior uso (Figura 11).

4. Fragmentar y homogenizar los intestinos de *Fasciola hepatica* introduciendo los tubos, conteniendo 20 intestinos de *Fasciola hepatica*, en nitrógeno líquido por 20 segundos (repetir este paso 3 veces).
5. Colocar las muestras en el mortero y tritutar hasta que los intestinos tomen consistencia pastosa, colectar la pasta y colocar en nuevos tubos de 1.5 ml.
6. Agregar 1.5 ml de PBS al tubo que contiene la pasta de intestinos. Homogenizar en el vórtex hasta disgregar la muestra.
7. Centrifugar a 14 000 xg durante 10 minutos a 4 °C.
8. Decantar, procurando eliminar la mayor cantidad de líquido, y dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
9. Suspender el sedimento con el reactivo BugBuster® a temperatura ambiente y mezclar por pipeteo o agitación suave durante 20 minutos. Emplear 300 µl de BugBuster® para 500 µl de muestra.
10. Incubar la suspensión en una plataforma agitadora en ajuste lento durante 10 - 20 minutos a temperatura ambiente.
11. Eliminar los residuos celulares insolubles por centrifugación a 16 000 xg durante 20 minutos a 4 °C. Almacenar la proteína a -20 °C.

#### 10.1.1. Cuantificación de proteína por espectrofotometría (Método Bradford)

1. Añadir el reactivo de Bradford a la extracción de proteína de intestino de *Fasciola hepatica* y al patrón de referencia, mezclar.
2. Cuantificar las muestras en el espectrofotómetro. Levantar el brazo del equipo y colocar en el lector inferior del mismo 2 µl de muestra, bajar el brazo del equipo e iniciar la medición de la absorbancia a 595 nm de longitud de onda.

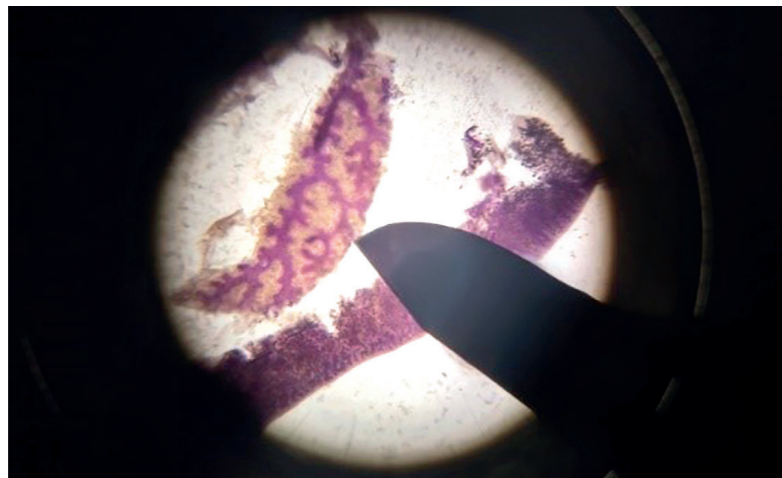


Figura 9. Disección de *Fasciola hepatica*.

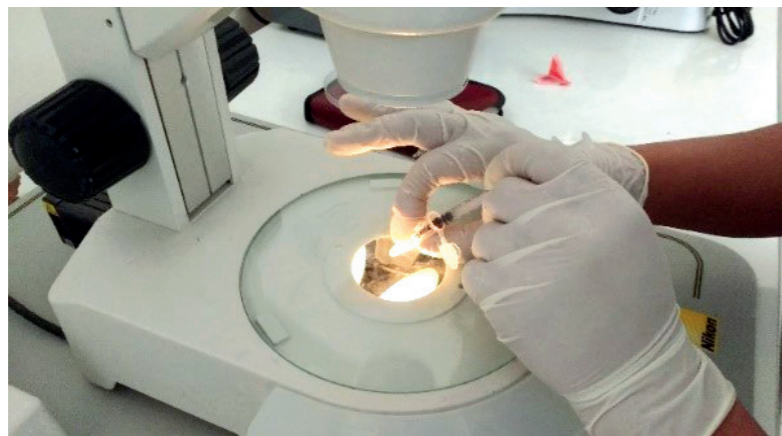


Figura 10. Colección de intestino de *Fasciola hepatica*.



Figura 11. Almacenamiento de intestino de *Fasciola hepatica* en PBS.

## 10.2. Protocolos de electroforesis

### 10.2.1. Electroforesis SDS-PAGE

Esta técnica permite la separación de moléculas de acuerdo a su movilidad a través de un campo eléctrico, donde las moléculas se separan en función de su carga eléctrica, desplazándose al electrodo de carga contraria. Para que esta dependencia sea correcta, es necesario romper los puentes disulfuro de la proteína, por lo que es usual añadir durante la preparación de muestra un agente reductor, generalmente 2-mercaptoetanol (Laemmli, 1970).

#### Reactivos

- Acrilamida
- Bis-acrilamida
- Sodio dodecil sulfato (SDS)
- Agua destilada
- Persulfato de amonio (APS)
- Ditioneitol (DTT)
- TEMED (N,N,N',N' tetrametiletilendiamina)
- 2-mercaptoetanol
- Azul de bromofenol
- Glicerol
- Tris base
- Glicina
- Metanol
- Ácido acético
- Marcador de peso molecular de proteína

#### Materiales y equipos

- Equipo de electroforesis vertical
- Cámara de electroforesis
- Peines y separadores
- Formador de geles
- Pipetas automáticas
- Gradilla para tubos eppendorf de 1.5 ml
- Recipiente para descarte de líquidos
- Recipiente para descarte de puntas
- Agitador magnético
- Guantes
- Papel toalla
- Marcador para rotular

#### Procedimiento

1. Preparar las soluciones stock como se indica a continuación:

- **Solución de acrilamida stock (30 %)**

Acrilamida	29.2 g
Bis-acrilamida	0.8 g
Agua destilada	100 ml

Disolver, filtrar y almacenar a 4 °C en oscuridad.

- **Buffer tris (1.5 M), pH 8.8**

Tris base	18.15 g
Agua destilada	50 ml

Disolver y ajustar el pH a 8.8 con HCl al 50 % (50 % agua destilada y 50 % HCl ). Llevar a 100 ml con agua destilada.

- **Buffer tris (0.5M), pH 6.8**

Tris base	3 g
Agua destilada	25 ml

Disolver, ajustar pH a 6.8 con HCl. Llevar a 50 ml con agua destilada.

- **SDS (10 %)**

SDS	2 g
Agua bidestilada	20 ml

Disolver con la ayuda de un agitador magnético.

- **Coctel de muestra (preparar antes del uso)**

Buffer tris (0.5M), pH 6.8	1.88 ml
SDS (10 % )	6 ml
Glicerol	3 ml
Agua bidestilada	2.2 ml

Mezclar.

- **Azul de bromofenol (0.1 %)**

Azul de bromofenol	10 mg
Agua destilada	10 ml

Mezclar, tomar 0.6 ml de la solución y diluir 130 mg de DTT. Alicuotar 100 µl en tubos eppendorf de 250 µl y almacenar a -20 °C.

- **Azul de coomassie R250 (tinción de proteínas)**

Azul brillante de coomassie	1 g
Metanol	450 ml
Agua destilada	450 ml
Ácido acético (concentrado)	100 ml

Mezclar y disolver.

- **Solución decolorante**

Metanol	200 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Agua bidestilada	700 ml

Mezclar.

- **APS (10%) (preparar al momento de uso)**

Persulfato de amonio	500 mg
Agua destilada	5 ml

Mezclar y guardar en tubos eppendorf a refrigeración.

- **DTT / azul de bromofenol**

DTT	1.39 g
Azul de bromofenol (0.1 %)	6 ml

Mezclar y disolver.

- **Buffer de corrida**

Tris base	3.03 g
Glicina	14.42 g
SDS	1 g
Agua destilada	1 l

Mezclar y disolver.

2. Limpiar y armar las placas del equipo de electroforesis vertical MiniProtean® System (Bio-rad).

3. Preparar los geles de poliacrilamida como se describe a continuación.

- **Gel de separación (12.5 %)**

Acrilamida stock	6.25 ml
Buffer tris pH 8.8	5.6 ml
Agua destilada	3.1 ml
SDS (10 %)	150 µl
APS (10 %)	200 µl
TEMED	40 µl

Esperar de 10 a 15 minutos para polimerizar.



• Gel de concentración (5 %)

Acrilamida stock	1.67ml
Buffer tris (0.5M), pH 6.8	1.25 ml
Agua destilada	7.03 ml
SDS (10 %)	100 µl
APS (10 %)	150 µl
TEMED	30 µl

Cargar las muestras en los carriles del gel de poliacrilamida, aplicar 150 voltios por 4 - 5 horas. Luego de la tinción se obtendrá un patrón de corrida (figura 12).

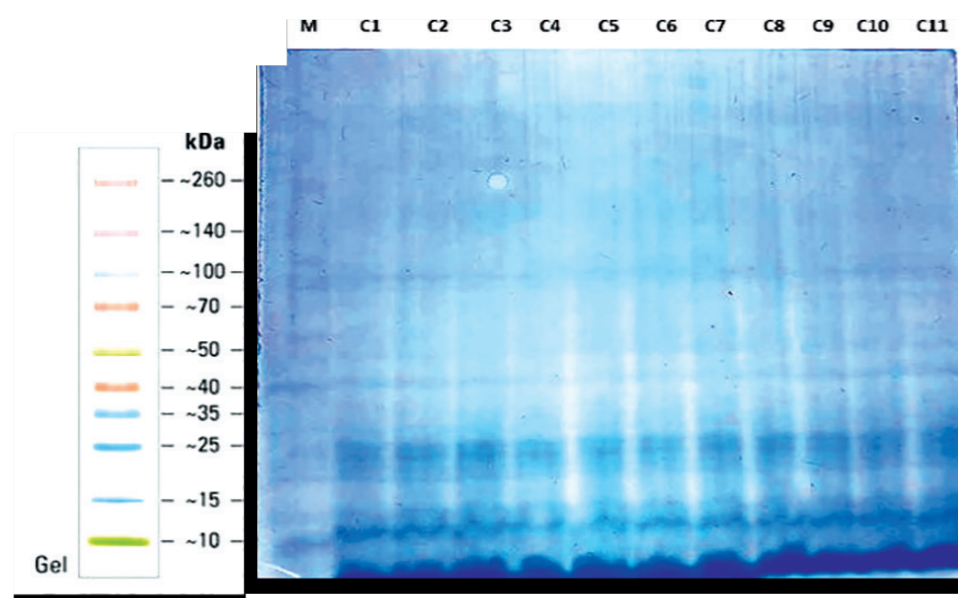


Figura 12. Patrón de antígenos somáticos de *Fasciola hepatica* en SDS-PAGE (tinción con azul brillante de coomassie).

10.2.2. Electroforesis 2D-Bidimensional

Es una técnica de alta resolución que permite la separación secuencial de proteínas mediante dos criterios físicos. En primer lugar, son separadas en un gel con gradiente de pH, en condiciones desnaturizantes de acuerdo con su punto isoeléctrico (isoelectroenfoque). Tras esta separación por carga, las proteínas son separadas de acuerdo a su masa molecular por electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

Reactivos

- Buffer fosfato salino (PBS)
- Nitrógeno líquido
- Kit de Extracción de proteínas (BugBuster®)
- Tiras de poliacrilamida immobiline™ DryStrip gel de 7cm, pH 3-10 NL.
- Buffer IPG pH 3-10 NL
- Solución de rehidratación DeStreak™.
- Aceite mineral Dry Strip Cover Fluid
- Sealing Solution
- Tris-HCl
- Tris base
- Sodium dodecil sulfate (SDS)
- Persulfato de amonio (APS)
- Glicina
- Glicerol
- Azul de bromofenol
- Dithiothreitol (DTT)
- Iodoacetamida
- 2-mercaptoethanol
- Sulfato de amonio
- Acrilamida
- Bis-acrilamida
- Urea
- TEMED (N,N,N',N' tetrametiletilenodiamina)
- Marcador de peso molecular de proteína
- Agua milli-Q
- Metanol
- Ácido acético
- Azul brillante de coomassie
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Etanol absoluto
- Agua destilada

Materiales y equipos

- Espectrofotómetro
- Centrífuga refrigerada
- Micropipetas automáticas
- Agitador magnético
- Equipo de isoelectroenfoque (IEF)
- Cámara para hidratación de tiras IPG
- Cámara de electroforesis vertical y accesorios
- Fuente de poder
- Baño maría
- Horno microondas
- Vórtex
- pH-metro
- Balanza analítica
- Incubadora
- Cabina de flujo laminar
- Refrigeradora
- Guantes
- Papel toalla
- Marcador para rotular

**Procedimiento**

1. Rehidratar las tiras Immobiline DryStrip. Añadir el buffer IPG pH 3-10 NL (Bio-rad) a la solución de rehidratación DeStreak™ (Bio-rad).
2. Resuspender la proteína de intestino de *Fasciola hepatica* con el buffer de rehidratación. Pipetear la solución de rehidratación en el carril de la cámara de rehidratación IPG Box™ (GE Healthcare). Distribuir la solución uniformemente.
3. Retirar con unas pinzas la cinta protectora de la tira de poliacrilamida Immobiline™ DryStrip gel (IPG Strip) de 7 cm, pH 3-10 NL (Bio-rad). Colocar en el carril con el gel hacia abajo en contacto con la solución de rehidratación. Evitar que queden atrapadas burbujas de aire debajo de la tira.
4. Sellar las tiras con 3 ml de aceite mineral DryStrip Cover Fluid (Bio- rad).
5. Rehidratar las tiras Immobiline DryStrip (7cm) como sigue a continuación.

	Volumen (µl)
Solución de rehidratación DeStreak™	103.75
Buffer IPG pH 3-10	1.25
Muestra de proteína	20
Volumen final por tira	125

Colocar las tiras en la cámara de rehidratación e incubar por 12 horas a temperatura ambiente.

6. En la primera dimensión, de isoelectroenfoque (IEF), colocar la tira Immobiline DryStrip rehidratada en la bandeja del equipo de isoelectroenfoque PROTEAM IEF CELL® (Bio-rad), en dirección del polo positivo al negativo.
7. Sellar la tira con 2 ml de aceite mineral Dry Strip Cover Fluid. Encender y programar el tiempo y los voltajes de corrida en el sistema de isoelectroenfoque (IEF). Transcurrido el tiempo de corrida de la primera dimensión retirar las tiras y equilibrarlas para la segunda dimensión.
8. Equilibrar las tiras Immobiline Dry Strip con el buffer de equilibrio (SDS). El volumen de buffer por tira es de 10 ml.
 

Buffer de equilibrio SDS	Concentración final
Buffer tris-HCl pH 8.8	75 mM
Urea	6 M
Glicerol	29.3 % (w/v)
SDS	2 %
Azul de bromofenol	0.002 % (w/v)
Agua milli-Q completar hasta	200 ml
9. Dividir el volumen del buffer de equilibrio en partes iguales (5 ml), en cada tubo de 15 ml. Agregar al primer tubo 50 mg de DTT por 5 ml de solución de equilibrio.

10. Agregar al segundo tubo 125 mg de iodoacetamida por 5 ml de solución de equilibrio.
11. Insertar la tira Immobiline Dry Strip en el primer tubo. Tapar y sellar con papel parafilm durante 15 minutos.
12. Luego insertar la tira Immobiline Dry Strip en el segundo tubo. Tapar y sellar durante 15 minutos. Conservar la tira en un tubo.
13. Para la segunda dimensión (SDS-PAGE), limpiar y armar las placas del equipo de electroforesis vertical MiniProtean® System (Bio-rad).
14. Preparar el gel de resolución a una concentración de 15 %, adicionar los componentes en orden y mezclar de manera uniforme. Pipetear el volumen de la solución de resolución entre las placas de vidrio de la cámara de electroforesis. Añadir 100 µl de butanol sobre la solución de resolución para evitar el ingreso de moléculas de oxígeno que retarden la polimerización. Dejar polimerizar a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos. Una vez formado el gel, eliminar la capa de butanol y lavar la parte superior del gel varias veces con agua destilada hasta eliminar completamente los restos de acrilamida no polimerizada y el butanol.

Componentes del gel de resolución (15 %)

Acrilamida/Bis-acrilamida (30 %)	2.5 ml
Buffer tris-HCl (1.5 M), pH 8.8	1.3 ml
Agua milli-Q	1.1 ml
SDS (10 %)	50 µl
APS (10 %)	50 µl
TEMED	2 µl
Volumen	5 µl

15. Luego preparar el gel stacking o gel de concentración, como se indica a continuación.

Componentes del gel de concentración (5 %)

Acrilamida/bis-acrilamida (30 %)	170 µl
Buffer Tris-HCl (1M), pH 6.8	130 µl
Agua milli-Q	680 µl
SDS (10 %)	10 µl
APS (10 %)	10 µl
TEMED	1 µl
Volumen total	1 ml

En la preparación, agitar uniformemente la mezcla para evitar la formación de burbujas. Asegurar que el TEMED y el APS se distribuyan en todo el volumen de la solución. Luego pipetear la solución de concentración entre las placas de la cámara de electroforesis, sobre el gel de resolución ya polimerizado. Colocar entre ambas placas un peine adecuado, para formar los pocillos donde ingresarán la tira Immobiline DryStrip y el marcador de peso molecular.

17. Dejar polimerizar la poliacrilamida del gel de concentración por 15 a 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez formado el gel, retirar el peine cuidadosamente y lavar los pocillos con agua destilada.
18. Colocar la tira Immobiline DryStrip equilibrada en el pocillo del gel, acoplar la tira al gel de concentración, evitar los espacios entre ambos geles. Colocar la tira en sentido horizontal, de cátodo a ánodo y aplicar el marcador de peso molecular en uno de los pocillos del gel de concentración.
19. Cubrir la tira y el marcador de peso molecular con agarosa (sealing solution), calentar previamente la solución en el microondas hasta que la agarosa este completamente disuelta. Tapar la cuba y asegurarse que los pocillos del gel se encuentren totalmente cubiertos por el buffer.
20. Conectar los electrodos uno positivo y otro negativo (rojo y negro) a la fuente de poder. Encender, programar el voltaje y amperaje a 5 mA por 30 minutos para el gel de concentración y a 25 mA por 1 hora y 30 minutos aproximadamente para el gel de resolución. Dejar correr hasta que el frente de corrida llegue a la parte inferior.
21. Desmontar el equipo al finalizar la electroforesis, remover el sistema que contiene el gel de poliacrilamida. Separar el gel de las placas de vidrio, hidratar con agua destilada. Conservar el gel en un recipiente con agua milli-Q.
22. Para la coloración y visualización de las proteínas, colocar 100 ml de solución colorante azul brillante de coomassie G-250 en un recipiente de plástico. Cerrar el contenedor herméticamente. Colocar 250 ml de solución decolorante en otro recipiente de plástico. Cierre el contenedor herméticamente. Precalear el contenido de ambos recipientes a 55 °C en el baño de agua caliente.
23. Agregar el gel (1.5 mm de espesor) a la solución de tinción e incubar durante 5 minutos. Enjuagar el gel con agua destilada. Transferir el gel teñido al recipiente que contiene la solución decolorante, incubar a 55 °C por 45 minutos.
24. Transferir el gel a un recipiente que contenga agua ultra pura y desteñir el gel de 10 - 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Conservar el gel en agua milli-Q.

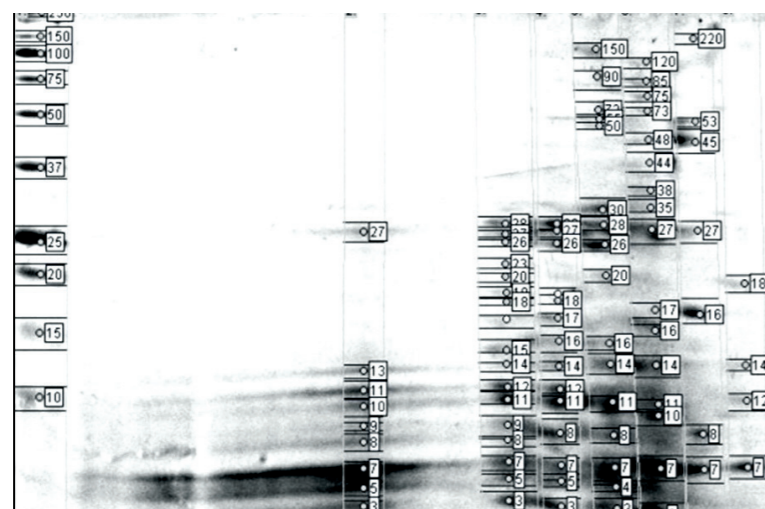


Figura 13. Electroforesis 2D, patrón somático de antígenos de *Fasciola hepatica*.

### 10.3. Extracción de ARN de *Fasciola hepatica*

El ARN se encarga de trasladar la información genética del ácido desoxirribonucleico (ADN) para la síntesis de las proteínas. Es decir, el ARN copia la información de cada gen del ADN y luego pasa al citoplasma, donde se une al ribosoma para dirigir la síntesis proteica. El ARN se encuentra presente en el citoplasma de las células eucariotas y procariotas; así mismo esta compuesto por nucleótidos unidos que forman cadenas. Cada nucleótido se encuentra constituido por: un azúcar (ribosa), un grupo fosfato y 4 bases nitrogenadas (adenina, guanina, uracilo y citosina). El aislamiento de ARN de muestras de intestino de formas adultas de *Fasciola hepatica* con un kit comercial tiene como objetivo obtener ARN purificado de alta calidad, el cual luego se empleará como molde en la reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR); donde este molde se transcribirá a ADN mediante una enzima de tipo transcriptasa inversa. Por cada molécula de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) se sintetiza una molécula de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) monocatenario que posteriormente se ha de convertir en bicatenario utilizando una ADN polimerasa.

#### Reactivos

- Kit Gene Jet RNA Purification  
Thermo Fisher Scientific

#### Componentes

- Proteínasa K
- Buffer de lisis
- Buffer de lavado 1
- Buffer de lavado 2
- Agua libre de nucleasas

#### Materiales y equipos

- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Tubos eppendorf de 250 µl
- Columnas Gene JET (purificación de ARN pre-ensamblados con tubo colector)
- Tubo colector de 2 ml
- Tubo colector de 1.5 ml
- Recipiente con hielo picado

#### Procedimiento

1. Pesar el tejido (utilizar hasta 30 mg de tejido fresco o congelado), triturar con un mortero y nitrógeno líquido. Transferir el tejido lisado a un tubo de microcentrífuga conteniendo 300 µl de buffer de lisis suplementado con β-mercaptoetanol o DTT. Mezclar en vórtex por 10 segundos y homogenizar el lisado con un rotor-estator.

En este paso tener en consideración:

- Dejar el tejido lisado sin el buffer de lisis puede resultar en ARN degradado.
  - Utilizar el tejido lisado directamente para la purificación de ARN y no almacenar.
  - Mezclar todo el material molido con el buffer de lisis, evitar que este se deseeque en las paredes del tubo (esto puede causar la degradación del ARN).
2. Añadir 600 µl de solución de proteínasa K (10 µl de la proteínasa K diluída en 590 µl de buffer TE). Homogenizar en vórtex e incubar a 15 °C - 25 °C por 10 minutos.



3. Centrifugar a 12000 ×g durante 5 minutos, si el lisado se prepara a partir de cantidades inferiores a 10 mg de material de partida; o centrifugar por 10 minutos, si el lisado se prepara a partir de cantidades superiores a 10 mg. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga libre de ARNasa.
4. Añadir 450 µl de etanol (96 -100 %) y mezclar por pipeteo.
5. Transferir hasta 700 µl de lisado a la columna de purificación de RNA Gene Jet insertada en un tubo colector. Centrifugar la columna por 1 minuto a ≥12000 ×g. Desechar el flujo continuo y colocar la columna de purificación en un nuevo tubo de colector. Repetir este paso hasta que todo el lisado sea transferido a la columna.
6. Añadir 700 µl de buffer de lavado 1 (complementado con etanol) a la columna de purificación y centrifugar durante 1 minuto a ≥12000 ×g. Descartar el líquido eluido y pasar la columna de purificación a un nuevo tubo colector.
7. Añadir 600 µl de buffer de lavado 2 (suplementado con etanol) a la columna de purificación y centrifugar durante 1 minuto a ≥12000 ×g. Desechar el flujo continuo y colocar la columna de purificación en un nuevo tubo colector.
8. Añadir 250 µl de buffer de lavado 2, a la columna de purificación de ARN y centrifugar durante 2 minutos a ≥12000 ×g.
9. Para eluir el ARN de la columna, añadir 100 µl de agua libre de nucleasas al centro de la membrana de la columna de purificación. Centrifugar por 1 minuto a ≥12000 ×g .
10. Desechar la columna de purificación. Utilizar el ARN purificado para aplicaciones posteriores. Conservar a -20 °C o -70 °C hasta su uso.
11. Para evaluar la concentración y calidad del ARN extraído, medir la concentración de la muestra al espectrofotómetro y realizar electroforesis en gel de agarosa respectivamente (Figura 14).

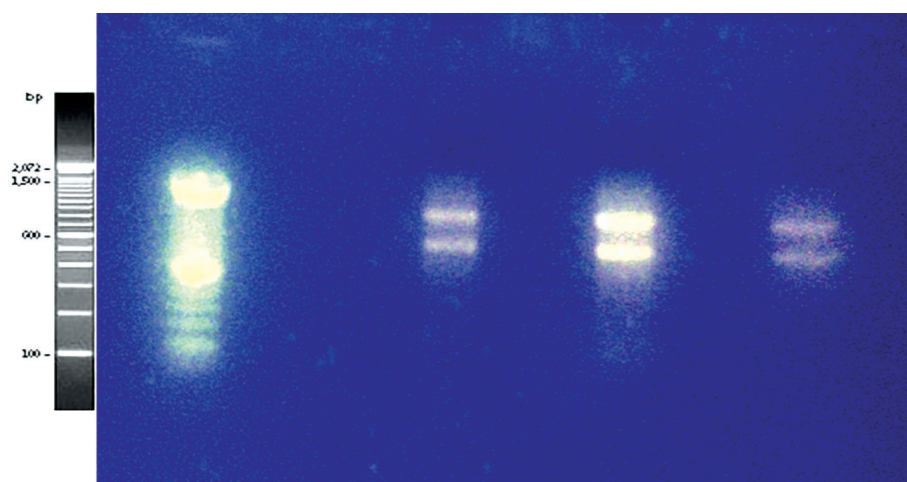


Figura 14. Evaluación de la calidad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa.

## 10.4. Producción de ADN complementario (ADNc)

La producción de ADNc a partir de ARN, es posible empleando la técnica de transcripción reversa. El protocolo descrito a continuación emplea un kit de transcripción diseñado para la conversión a ADNc monocatenario a partir de concentraciones bajas de ARN total (0.02 µg) de *Fasciola hepatica*.

### Reactivos

- Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Thermo Fisher Scientific

### Componentes

- 10 x RT buffer
- 25 x dNTP mix (100 mM)
- 10 X RT random primers
- Transcriptasa reversa MultiScribe
- Inhibidor de ARNasa
- Agua libre de nucleasas

### Materiales y equipos

- Tubo eppendorf de 1.5 ml
- Tubo eppendorf de 250 µl
- Recipiente con hielo picado
- Recipiente para descarte de líquidos
- Recipiente para descarte de puntas
- Vórtex
- Centrifuga refrigerada
- Termociclador
- Pipetas automáticas
- Puntas libres de ARNasa
- Algodón
- Guantes
- Papel toalla
- Marcador para rotular
- Cámara de flujo laminar

### Procedimiento

1. En una cabina de flujo laminar, preparar la mezcla que se indica a continuación:

	Volumen (µl)
10X RT Buffer	2
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8
10X RT random primers	2
Transcriptasa reversa MultiScribe	1
Inhibidor de ARNasa	1
Agua libre de nucleasas	3.2
Total	10

2. Agregar a la mezcla 10 µl de extracción de ARN y mezclar suavemente.
3. Sellar los tubos y centrifugar brevemente para eliminar burbujas.
4. Finalmente, colocar los tubos en el termociclador con el siguiente perfil térmico.

	PASO 1	PASO 2	PASO 3	PASO 4
TEMPERATURA	25 °C	37 °C	85°C	4°C
TIEMPO	10 minutos	120 minutos	5 minutos	indefinido

## 10.5. Amplificación de ADN (Catepsina CL1)

La técnica de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica que consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN específico. Para llevar a cabo la amplificación es necesario conocer, al menos parcialmente, la secuencia del fragmento a amplificar (gen).

### Reactivos

- Buffer de reacción 5 X
- dNTP mix
- Primer forward
- Primer reverse
- Agua ultra pura
- Enzima Taq polimerasa

### Materiales y equipos

- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Tubos eppendorf de 250 µl
- Recipiente para hielo
- Hielo picado
- Recipiente para descarte de líquidos
- Recipiente para descarte de puntas
- Vórtex
- Centrifuga refrigerada
- Termociclador
- Cabina de flujo laminar
- Pipetas automáticas
- Puntas libres de ARNasa
- Guantes
- Papel toalla
- Marcador para rotular
- Cabina de flujo laminar

### Procedimiento

1. En cabina de flujo laminar, preparar la mezcla como se indica a continuación:

Buffer 5 X	19.75 µl
dNTP mix	6 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
Agua ultra pura	1 µl
Taq enzima 10X RT Buffer	0.25 µl
Total por reacción	30 µl

Para la amplificación de la secuencias de catepsina CL1, emplear los primers descritos a continuación:

GAC TGG CGT GAA TCC GGT TA –Forward (491Fh-CL1)  
 TAA CCG ACA GCC AAC ACT CC – Reverse (491Fh-CL1)  
 Tamaño del amplicón: 491 pb

ACT CAT CGT CGG AGT GTT CG – Forward (333Fh-CL1)  
 TAA CCG GAT TCA CGC CAG TC – Reverse (333Fh-CL1)  
 Tamaño del amplicón: 333 pb

2. Adicionar a la mezcla 2 µl de ADNc y mezclar suavemente.
3. Sellar el tubo, centrifugar brevemente para eliminar burbujas.
4. Colocar el tubo en el termociclador con el siguiente perfil térmico.

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	95	10 minutos
	94	1 minuto
35	56	90 segundos
	72	10 segundos
1	72	10 minutos
1	4	Indefinido

## 10.6 Electroforesis en gel de agarosa

Es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN (u otras macromoléculas, como ARN ) por su tamaño y carga. La electroforesis consiste en aplicar una corriente a través de un gel que contiene las moléculas de interés. Con base en su tamaño y carga, las moléculas se desplazarán por el gel en diferentes direcciones o a distintas velocidades, con lo que se separan unas de otras.

### Reactivos

- Agarosa
- Buffer tris acetato EDTA 50X (TAE 50X)
- Agua milli-Q
- SYBR Green

### Materiales y equipos

- Cuba de electroforesis horizontal
- Soporte para preparar el gel
- Peine
- Erlenmeyer
- Horno microondas
- Fuente de poder
- Probeta
- Recipiente para descarte de puntas
- Pipetas automáticas
- Puntas libres de ARNasa
- Guantes
- Papel toalla
- Marcador para rotular
- Transiluminador

### Procedimiento

1. Pesar la cantidad de agarosa necesaria para un gel al 1 %. En un erlenmeyer agregar 1g de agarosa en 100 ml de buffer TAE 1X.
2. Colocar el erlenmeyer en el microondas hasta la disolución completa de la agarosa (solución transparente).
3. Esperar que el erlenmeyer se enfríe hasta 45 - 55 °C.
4. Añadir 7 µl de SYBR Green a una concentración de 10 000 X
5. Acondicionar el soporte con el peine para verter la solución de agarosa.
6. Después de solidificar, colocar el gel en la cuba de electroforesis horizontal, adicionar el buffer TAE 1X de modo que cubra el gel (1 cm).
7. Mezclar la muestra del PCR con el buffer de carga 6X (5 volúmenes de muestra + 1 volumen de buffer de carga).
8. Adicionar 6 µl de muestra, previamente preparada, por hoyo. Encender el equipo de electroforesis, programar la corrida a 100 voltios y dejar correr hasta que el colorante indicador se desplace 4 cm en el gel (Figura 16).
9. Retirar el gel de la cuba de electroforesis y visualizar las bandas en el transiluminador.



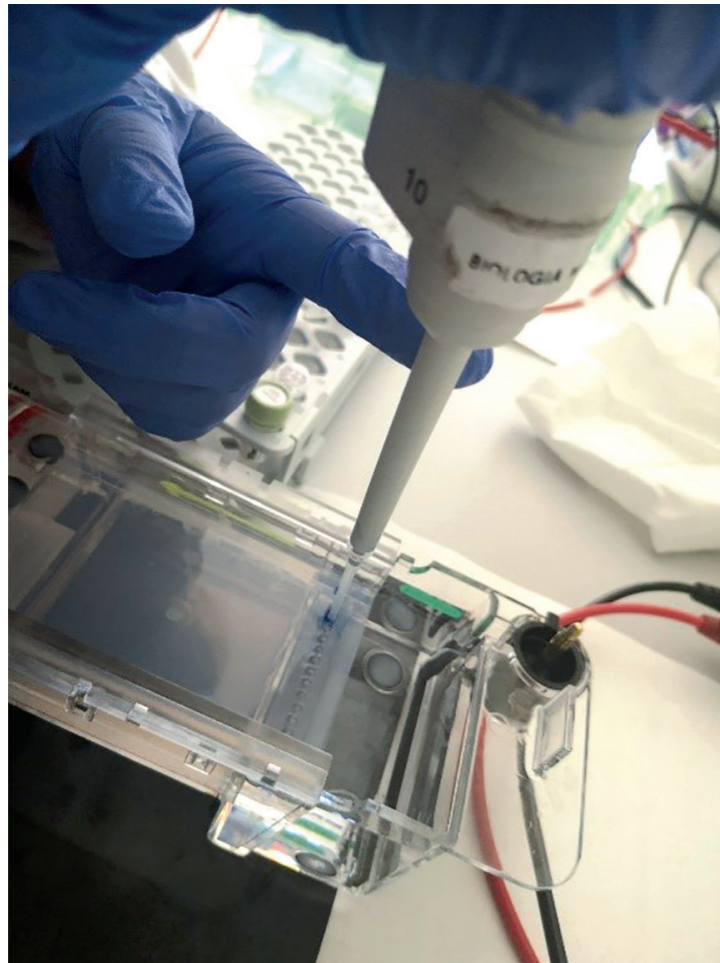


Figura 16. Aplicación de muestras en gel de agarosa 1 %.

## 10.7. Purificación de productos de PCR

Este protocolo nos permitirá obtener amplicones de PCR libre de contaminación de polimerasas, enzimas de restricción, dNTPs, cebadores, bufferes y sales que pueda influir negativamente con el proceso de clonación o reacciones posteriores.

### Reactivos

- Kit Pure Link<sup>®</sup> Quick PCR Purification Thermo Fisher Scientific

### Componentes

- Buffer de extracción
- Etanol
- Buffer de prelavado
- Buffer de lavado
- Buffer de elución

### Materiales y equipos

- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Tubos eppendorf de 250  $\mu$ l
- Recipiente con hielo picado
- Recipiente para descarte de líquidos
- Recipiente para descarte de puntas
- Centrifuga refrigerada
- Pipetas automáticas
- Puntas libres de ARNasa
- Guantes
- Papel toalla
- Marcador para rotular
- Transiluminador
- Bisturí

### Procedimiento

1. En el transiluminador, ubicar el fragmento de ADN a purificar, cortar una rodaja de gel de hasta 200 mg conteniendo el fragmento de interés y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml (Figura 17).
2. Añadir 200  $\mu$ l de buffer de extracción, mezclar mediante pipeteo. Incubar la mezcla a 50 - 58 °C por 10 minutos en baño maría, hasta que la porción de gel se disuelva en su totalidad.
3. Añadir 200  $\mu$ l de etanol y mezclar por pipeteo. Transferir la mezcla a la columna de purificación conectado a un tubo colector. Centrifugar la columna por 60 segundos a 14 000 xg, desechar el flujo eluido y colocar la columna de purificación en un nuevo tubo de colector.
4. Añadir 200  $\mu$ l de buffer de prelavado y centrifugar por 60 segundos a 14 000 xg. Desechar el flujo y colocar la columna de purificación en un nuevo tubo colector.
5. Para eliminar por completo el buffer de lavado residual, centrifugar la columna de purificación (vacía) por 1 minuto a 14 000 xg.
6. Para eluir el fragmento de interés, transferir la columna de purificación a un nuevo tubo de colecta. Añadir 10  $\mu$ l de buffer de elución a la columna y centrifugar por 1 minuto a 14 000 xg .
7. Almacenar el eluido a -20 °C hasta posterior uso.

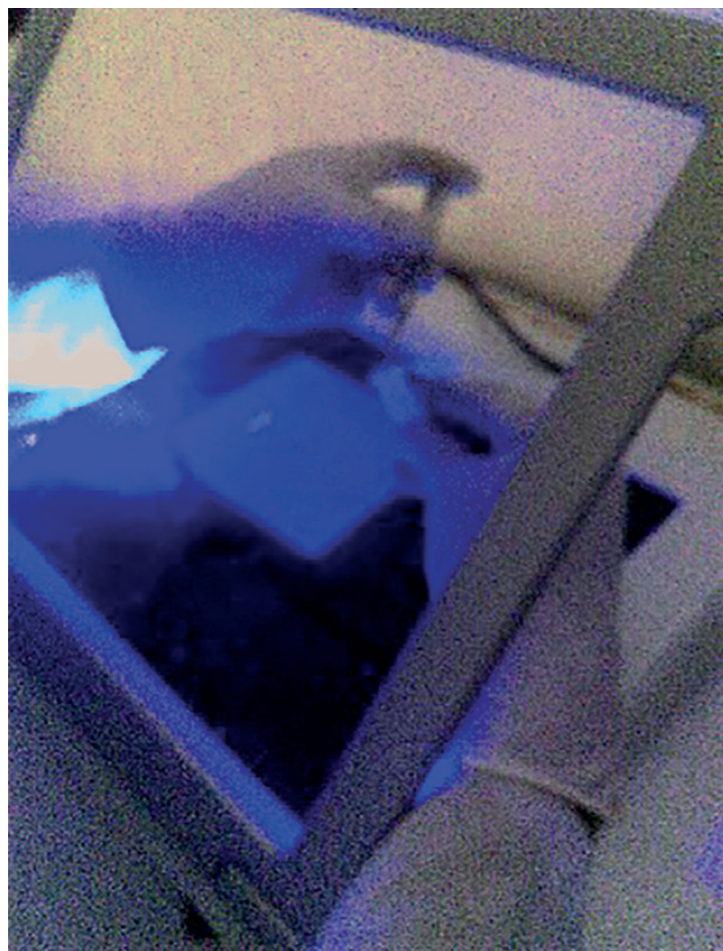


Figura 17. Aislamiento del amplicón de catepsina CL1.

### 10.8. Clonación del producto de PCR (Catepsina CL1) en Vector - pGEM®-T Easy

Los sistemas vectoriales pGEM®-T son sistemas convenientes para clonar productos de PCR generados por ciertas polimerasas termoestables. Estas polimerasas a menudo agregan una única desoxiadenosina, de forma independiente de la plantilla, a los extremos 3' de los fragmentos amplificados. El vector pre-linealizado pGEM®-T EASY (Figura 18) contiene salientes de 3'-T en el sitio de inserción para proporcionar un saliente compatible para los productos de PCR.

#### Reactivos

- Producto de PCR purificado (Catepsina CL1)
- Vector pGEM®-T Easy Promega
- T4 DNA ligasa
- Buffer de ligación Promega 2X

#### Materiales y equipos

- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Tubos eppendorf de 250 µl
- Recipiente con hielo picado
- Recipiente para descarte de líquidos
- Recipiente para descarte de puntas
- Pipetas automáticas
- Puntas libres de ARNasa
- Guantes
- Papel toalla
- Marcador para rotular
- Cabina de flujo laminar

#### Procedimiento

1. En cabina de flujo laminar realizar la mezcla de los componentes como se indica en la tabla 1 (Figura 19).

Tabla 1  
Componentes de la mezcla de ligación

Componentes	Cantidad final	Vol.1 reacción
Buffer de ligación (10X)	1X	2.0 µl
Producto de PCR	300 ng	
Vector	100 ng	
Enzima T4 ADN ligasa	1 U	1.0 µl
Agua ultra pura	-	
<b>Total</b>		<b>20.0 µl</b>

2. Incubar a 4°C durante toda la noche (18 horas).



Figura 18. Vector pGEM®-T Easy.

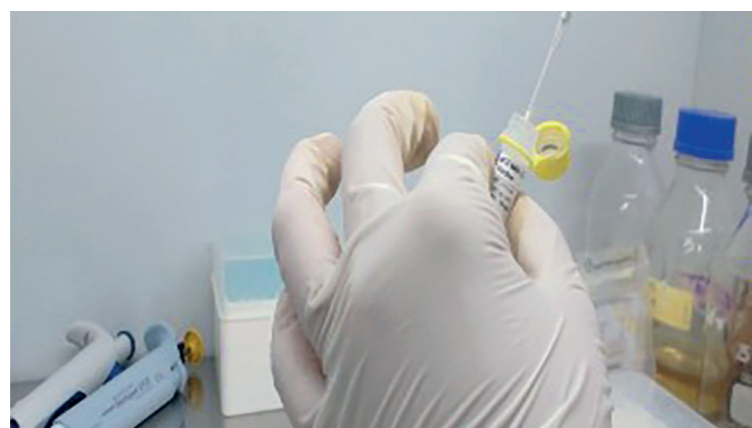


Figura 19. Clonamiento del gen catepsina CL1 en vector pGEM-T Easy.

## 10.9. Transformación de células competentes

La transformación genética es un proceso mediante el cual la célula capta moléculas de ADN libre y las mantiene en su interior en forma de un replicón extra cromosómico o las incorpora a su genoma por recombinación homóloga, donde las secuencias de nucleótidos se intercambian entre dos moléculas similares o idénticas de ADN (Sinha y Redfield, 2012). Para que la transformación tenga lugar, la célula receptora tiene que encontrarse en estado de competencia, que ocurre en determinadas condiciones fisiológicas; en este estado, la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celulares, que permiten la entrada de ácidos nucleicos en la célula.

### Reactivos

- Células competentes JM109
- Medio Luria Bertani líquido (LB)
- Medio LB sólido
- Medio de líquido 2xYT
- Solución stock de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), 100 mM
- Solución de stock de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal), 50 mg/ml
- Solución stock de ampicilina (100 mg/ml)
- Caldo super óptimo con represión por catabólito (SOC)
- Solución stock KCl (1M)
- Solución de glucosa (20 %)
- Solución de MgCl<sub>2</sub> (2M)

### Materiales y equipos

- Cabina de flujo laminar
- Incubador giratorio shaker
- Hielo picado
- Recipiente para desecho de puntas
- Equipo de baño maría a 42 °C

### Procedimiento

1. Preparar los medios de cultivo y soluciones stock.

- **Medio LB líquido (1L)**

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agua destilada	900 ml

Mezclar y ajustar a pH 7 con NaOH. Llevar a 1 litro con agua destilada. Autoclavar a 120 libras por 20 minutos.

- **Medio LB sólido**

Añadir al medio LB líquido 1.5 % de agar (v/v) y autoclavar.



• **Medio LB sólido + ampicilina + X-gal + IPTG**

Preparar 500 ml de medio LB sólido (para 20 placas de Petri). Luego del autoclavado, dejar enfriar y añadir 500 µl de ampicilina (100 mg/ml) (concentración final 100 µg/ml), 2.5 ml de IPTG (100 mM) (dilución final 0.5 mM) y 500 µl de X-gal (50mg/ml) (dilución final 50 µg / ml).

En cabina de flujo laminar, verter en placas de Petri estériles. Dejar secar y almacenar a 4 °C.

Alternativamente, añadir 100 µl de IPTG (100 mM) y 20 µl de X-gal ( 50 mg/ml) sobre las placas de LB-ampicilina, dejar que absorba durante 30 minutos a 37 °C antes de la siembra.

• **Solución de IPTG (100 mM)**

Para una solución de 10 ml, pesar 0.24 g de IPTG, disolver en 10 ml de agua bidestilada autoclavada y mezclar. Filtrar con membrana 0.22 µm de diámetro de poro.

Alicuotar 1 ml en tubos eppendorf de 1.5 ml y almacenar a -20 °C.

• **Solución de X-Gal (50 mg/ml)**

Pesar 0.5 g de X-Gal, disolver en 10 ml de dimetilformamida o agua destilada. No es necesario hacer la preparación cuando se adquiere la presentación en solución.

Envolver en papel aluminio y almacenar a -20 °C hasta su uso.

• **Solución de ampicilina (100 mg/ml)**

Pesar 1 g de ampicilina y mezclar en 10 ml de agua bidestilada autoclavada.

Filtrar la solución en filtro de 0.22 µm de diámetro de poro.

Dispensar 1 ml en tubos eppendorf de 1.5 ml y almacenar a -20 °C hasta posterior uso.

• **Preparación de caldo súper óptimo con represión catabólica (SOC)**

Realizar la preparación el mismo día de la transformación. Para 100 ml proceder como se describe a continuación.

Triptona	2 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl (1M)	1 ml
KCl (1M)	0.25 ml

Disolver, ajustar a pH 7 y autoclavar. Antes de usar el medio, añadir por cada 100 ml de medio, 1ml de glucosa (2M) y 1 ml de MgCl<sub>2</sub> (2M).

• **Medio líquido 2xYT (1L)**

Triptona	16g
Extracto de levadura	10g
NaCl	5g
Agua destilada	900 ml

Mezclar y ajustar a pH 7 con NaOH. Llevar a 1 litro con agua destilada. Autoclavar por 20 minutos.

• **Solución KCl (1M)**

Disolver 7.44 g de KCl en 100 ml de agua destilada, autoclavar.

• **Solución de glucosa (20 %)**

Disolver 100 g de glucosa en 400 ml de agua destilada.

Ajustar el volumen a 500 ml y filtrar la solución con filtro de 0.22 µm de diámetro de poro.

• **Solución MgCl<sub>2</sub> (2M)**

Disolver en 80 ml de agua bidestilada, 20.33 g de MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O y 24.65 g de MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O.

Autocompletar hasta 100 ml, filtrar la solución con filtro de 0.22 µm de diámetro de poro. Preparar el medio SOC el mismo día de la transformación.

- Acondicionar las células competente, emplear la cepa de *Escherichia coli* JM109 Promega (Figura 20), la cual se caracteriza por poseer la pared celular frágil que facilita la entrada de moléculas exógenas como ADN.



Figura 20. Células competentes *E. coli* JM109.

Descongelar el stock de células competentes sobre hielo. En cabina de flujo laminar, alicuotar 50 µl de células competentes en tubos e inmediatamente después retornar el stock de bacterias a congelación de -80 °C, para evitar que las bacterias sean afectadas.

- Para la transformación bacteriana, centrifugar rápidamente el tubo conteniendo el producto ligado vector- Catepsina a 3 000 rpm.
- Descongelar las células competentes y mantenerlas sobre hielo picado por 1 hora (Figura 21A).
- En un tubo eppendorf de 1.5 ml, adicionar 50 µl de células competentes y 3 µl del producto de la ligación (vector más el inserto) e incubar en hielo picado por 20 minutos (Figura 21B).
- Realizar la transfección de ADN a las células competentes mediante shock térmico. Colocar el tubo eppendorf por 45 segundos en baño maría a 42 °C (Figura 21C). Inmediatamente después incubar el tubo en hielo picado por 2 minutos

7. Agregar al tubo 950 µl de medio SOC e incubar a 37 °C con una agitación de 150 rpm en una incubadora-shaker (Figura 22).
8. Luego, añadir 100 µl de células transformadas en placas de LB conteniendo X-gal, IPTG y ampicilina, sembrar con asa de siembra e incubar a 37 °C por 18 horas.
9. Transcurido el tiempo, aislar las colonias transformadas conteniendo el plásmido mas inserto (de color crema, las colonias de color azul solo tiene el vector) (Figura 23). Luego sembrar en medio líquido 2XYT con ampicilina e incubar por 18 horas a 37 °C y 150 rpm de agitación (Figura 24).

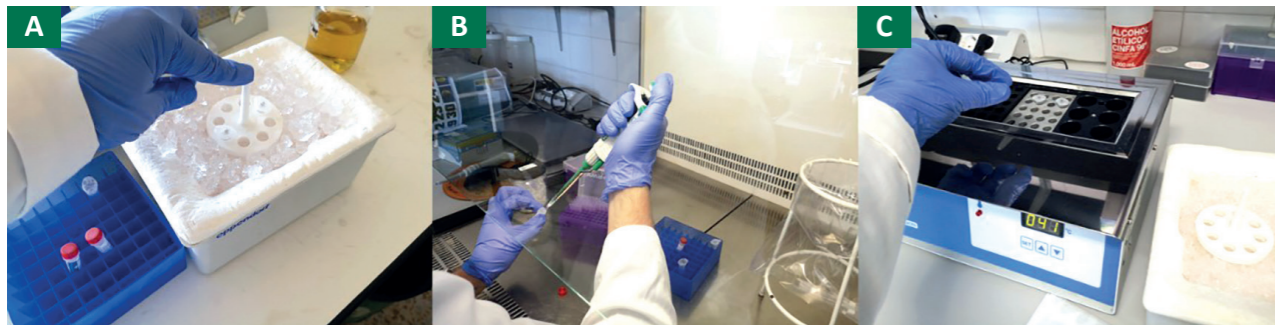


Figura 21. Transformación de células competentes. A) Mantener las células sobre hielo por una hora. B) Agregar el producto de la ligación. C) Aplicación de shock térmico en baño maría.

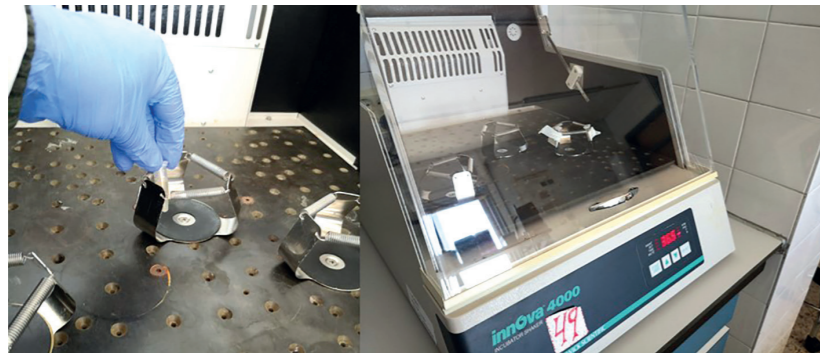


Figura 22. Multiplicación de las células transformadas.

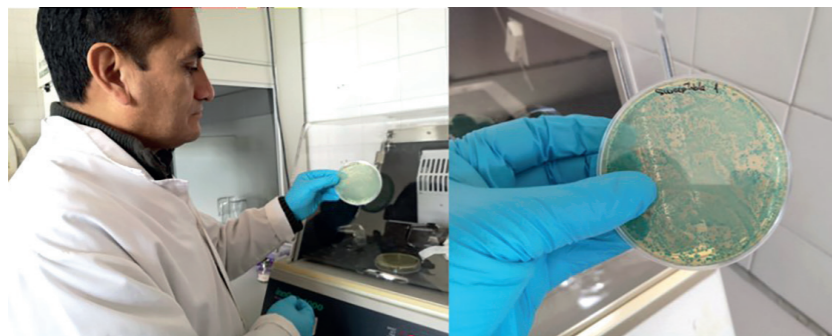


Figura 23. Evaluación de las células transformadas conteniendo el inserto CL1.

## 10.10. Multiplicación de células competentes transformadas

En la multiplicación de células transformadas de *Escherichia coli* JM109, emplear el medio líquido 2xYT que tiene una formulación optimizada para el crecimiento y mantenimiento de cepas recombinantes de *Escherichia coli*. El medio 2xYT suministra nutrientes como el extracto de levadura y triptona que proporcionan todos los aminoácidos requeridos, precursores de nucleótidos, vitaminas y otros metabolitos como el cloruro de sodio necesarios para el transporte de iones de sodio y equilibrio osmótico.

### Reactivos

- Medio 2xYT
- Agua destilada

### Materiales y equipos

- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Incubadora
- Autoclave
- Asa de siembra
- Mechero
- Placas bacteriológicas estériles
- Guantes
- Papel toalla
- Marcador para rotular
- Cámara de flujo laminar

### Procedimiento

1. En cabina de flujo laminar, a partir del cultivo previo, sembrar con asa de siembra en medio sólido 2xYT + ampicilina e incubar en estufa a 37 °C por 18 horas.
2. Sellar las placas petri con papel cera y conservar a 4 °C hasta posterior uso.
3. Para mantener viable las colonias transformadas realizar el repique a los 30 días post siembra en medio 2xYT + ampicilina en cabina de flujo laminar e incubar a 37°C por 18 horas.



### 10.11. Extracción de ADN plasmídico de bacterias transformadas

El objetivo del protocolo es obtener ADN plasmídico libre de impurezas a partir de un cultivo de bacterias transformadas. El plásmido obtenido es empleado como vector de expresión de catepsina CL1 de *Fasciola hepatica* y se inyecta directamente al tejido-diana donde se expresará generalmente sin integrarse en el genoma de las células huésped, quedando protegido en el interior de la célula por elementos que permiten su replicación en cada división celular como si fuese un mini cromosoma artificial.

#### Reactivos

- PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit  
Thermo Scientific Scientific

#### Componentes

- Buffer de resuspensión (R3)
- RNasa A (20 mg / ml)
- Buffer de lisis (L7)
- Buffer de precipitación (N4)
- Buffer de lavado (W9)
- Tubo de lavado (W10)
- Buffer TE (TE)
- Tubos de lavado y columnas de purificación

#### Materiales y equipos

- Tubos eppendorf 1.5 ml
- Tubos eppendorf de 250 µl
- Recipiente con hielo picado
- Recipiente para descarte de líquidos
- Recipiente para descarte de puntas
- Vórtex
- Centrifuga refrigerada
- Pipetas automáticas
- Puntas libres de RNasa
- Guantes
- Papel toalla
- Marcador para rotular
- Cabina de flujo laminar

#### Procedimiento

1. A partir de un cultivo bacteriano incubado toda la noche a 37 °C. Colectar células transformadas por centrifugación (Figura 24), a 12 000 rpm por 1 minuto. Descartar el sobrenadante.
2. Resuspender, mediante pipeteo, el pellet de células en 250 µl de buffer R3. Añadir 250 µl de buffer L7 y mezclar por inversión (se formará 2 fases). Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 350 µl de buffer N4, mezclar por inversión. En este paso se formará una solución lechosa debido a la precipitación de proteínas.
4. Centrifugar por 10 minutos a 12 000 rpm.
5. Luego, con la ayuda de una micropipeta, y evitando absorber el sedimento, coleccionar cuidadosamente el sobrenadante y transferir a una columna de purificación del kit adosado a un tubo de colecta. Centrifugar a 12 000 rpm por 1 minuto.
6. Adicionar 700 µl de buffer W9 a la columna y centrifugar a 12 000 rpm por 1 minuto.

7. Descartar el flujo eluido y centrifugar nuevamente la columna vacía a 12 000 rpm por 1 minuto.
8. Transferir la columna a un nuevo tubo de colecta, previamente numerado.
9. Luego añadir al filtro de la columna 35 µl de agua ultrapura.
10. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
11. Centrifugar a 12 000 rpm por 1 minuto.
12. Evaluar la concentración mediante espectrofotometría (Figura 25).

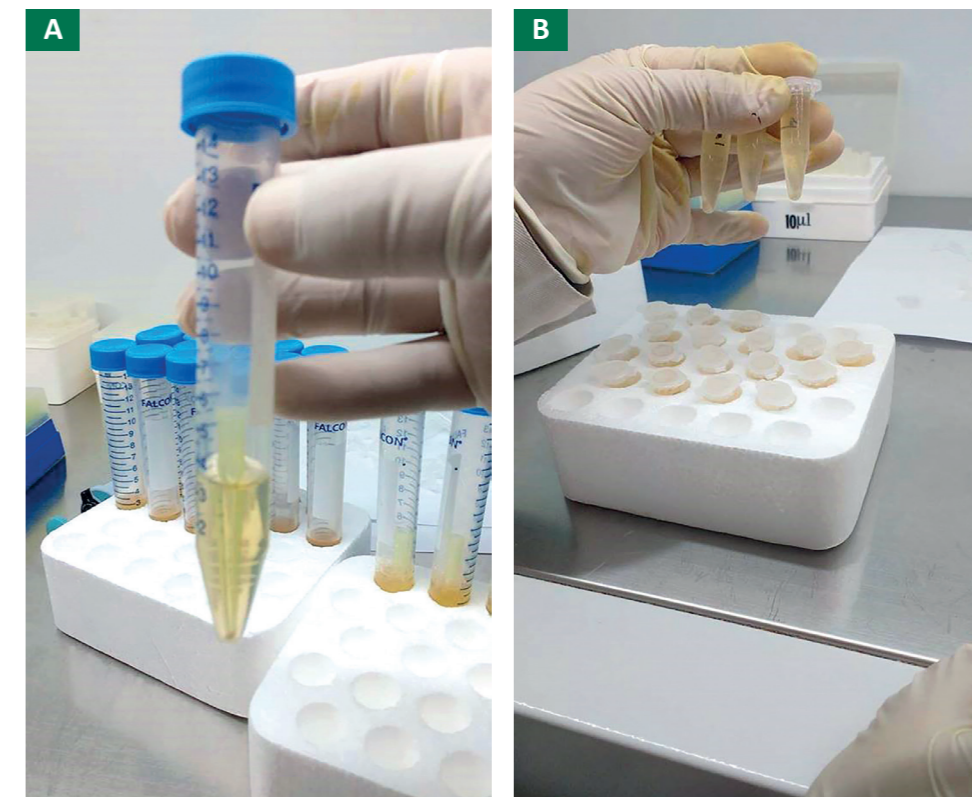


Figura 24. *E. coli* JM 109 transformadas. (A) Cultivo bacteriano incubado toda la noche a 37 °C. (B) Colecta de células bacterianas en tubo eppendorf para el proceso de extracción de ADN plasmídico.





Figura 25. Evaluación de la concentración ADN plasmídico en espectrofotómetro.

## 10.12. Encapsulación de ADN plasmídico con polímero biodegradable – Ácido poliláctico (PLA)

En el desarrollo de vacunas se ha incorporado recientemente la nanotecnología, proporcionando sistemas de administración de antígenos basados en nanotransportadores, que ofrecen la oportunidad de mejorar las respuestas inmunes celulares. La encapsulación de proteínas recombinantes en micro y nanopartículas biocompatibles y biodegradables como el ácido poliláctico (PLA) está emergiendo como una importante herramienta para aumentar la inmunidad. Así en los últimos años, en el campo de la investigación biomédica se ha observado un creciente interés en los materiales nanoestructurados para la mejor administración de vacunas.

Estos polímeros son biocompatibles, lo que ha permitido que los fármacos tengan una liberación controlada; así mismo, su baja toxicidad hacen de estos unos buenos adyuvantes para la administración de vacunas, mejorando la estabilidad de los antígenos.

### Reactivos

- ADN plasmídico
- Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)
- Polímero ácido poliláctico (PLA)
- Alcohol polivinílico (PVA)
- Buffer TRIS-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
- Cloroformo
- Agua estéril

### Materiales y equipos

- Tubo eppendorf de 1.5 ml
- Tubos falcon de 15ml y 50 ml
- Recipiente con hielo picado
- Recipiente para descarte de líquidos
- Recipiente para descarte de puntas
- Vórtex
- Filtros estériles
- Sonicador
- Agitador magnético
- Espectrofotómetro
- Pipetas automáticas
- Puntas libres de ARNasa
- Guantes
- Papel toalla
- Marcador para rotular

### Procedimiento

1. Preparar la solución de polímero en un tubo de 15 ml.  
Disolver 30 mg de PLGA en 1 ml de cloroformo. Agitar con vórtex de 30 a 60 minutos hasta su completa disolución.
2. Mezclar 1 mg de ADN plasmídico y 200 µl de buffer tris-EDTA.
3. Preparar la solución de PVA al 2 % (p / v) saturada.
  - Espolvorear lentamente 0.2 g de PVA en 10 ml de buffer tris-EDTA frío, mezclar con un agitador magnético aproximadamente por 30 minutos hasta su completa disolución.
  - Centrifugar la solución de PVA a 1 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

- Filtrar a través de un filtro estéril de 0.22 µm para eliminar cualquier partícula de PVA no disuelto en la solución. Luego agregar 10 µl de cloroformo para saturar la solución de PVA.
- 4. En la solución de PVA, agregar la mitad de solución de DNA plasmídico y agitar en vórtex durante 1 minuto, luego adicionar la otra mitad y una vez más agitar con vortex por 1 minuto. En este paso se formará una emulsión de agua en aceite.
- 5. Sonicar el tubo con la solución. Este proceso reduce el tamaño de gota de la emulsión (emulsión primaria) (Figura 26).
- 6. Dispensar 6 ml de solución de PVA a un tubo de centrifuga de 50 ml. Agregar la emulsión primaria, en dos partes, agitar en vórtex por 1 minuto después de cada adición. Esto forma una doble emulsión de agua en aceite en agua.
- 7. Sonicar la doble emulsión durante 5 minutos.
- 8. Agitar la emulsión resultante durante la noche (18 horas) en un beacker tapado con papel aluminio. Aplicar agitación magnética suave para permitir que el cloroformo se evapore. Evite la turbulencia excesiva. Recuperar por ultracentrifugación.
- 9. Resuspender el sedimento en 5 ml de buffer tris-EDTA, agregar sobre el sedimento el buffer tris-EDTA varias veces hasta que se suspenda por completo. Luego sonicar la suspensión durante 30 segundos
- 10. Repetir los pasos 7 y 8 para eliminar ADN no encapsulado y PVA. Determinar la concentración de ADN no atrapado empleando los sobrenadantes del paso 7 y 8. Cuantificar por espectrofotometría de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Emplear el sobrenadante y el eluido del lavado de las nanopartículas, pero sin ADN, para poner a cero el instrumento.
- 11. Resuspender el sedimento en 1-2 ml de agua estéril y someter a ultrasonido la suspensión durante 1 minuto.



Figura 26. Sonicación de antígeno para encapsulamiento.

## 11. PROTOCOLO DE EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE VACUNACIÓN (ADN recombinante de catepsina CL1 encapsulado de *Fasciola hepatica*)

Para la evaluación preclínica de la vacuna seguir el protocolo experimental descrito a continuación.

### 11.1. Diseño del protocolo experimental

Realizar las evaluaciones de inmunidad y de protección de la vacuna, en un modelo animal vacuno y ovino. Distribuir los dos modelos de animales en 1 grupo control y 2 grupos de tratamiento, con 3 animales cada uno.

En los individuos, durante el tiempo cero (T0), tiempo 1 (T1) y tiempo2 (T2), evaluar los parámetros de función renal y hepática, además de realizar pruebas de hematología, leucograma y perfil de anticuerpos (Figura 27).

Adicionalmente, determinar la carga parasitaria, desarrollo de formas adultas y viabilidad de huevos en el tiempo 2 (T2) post desafío experimental.

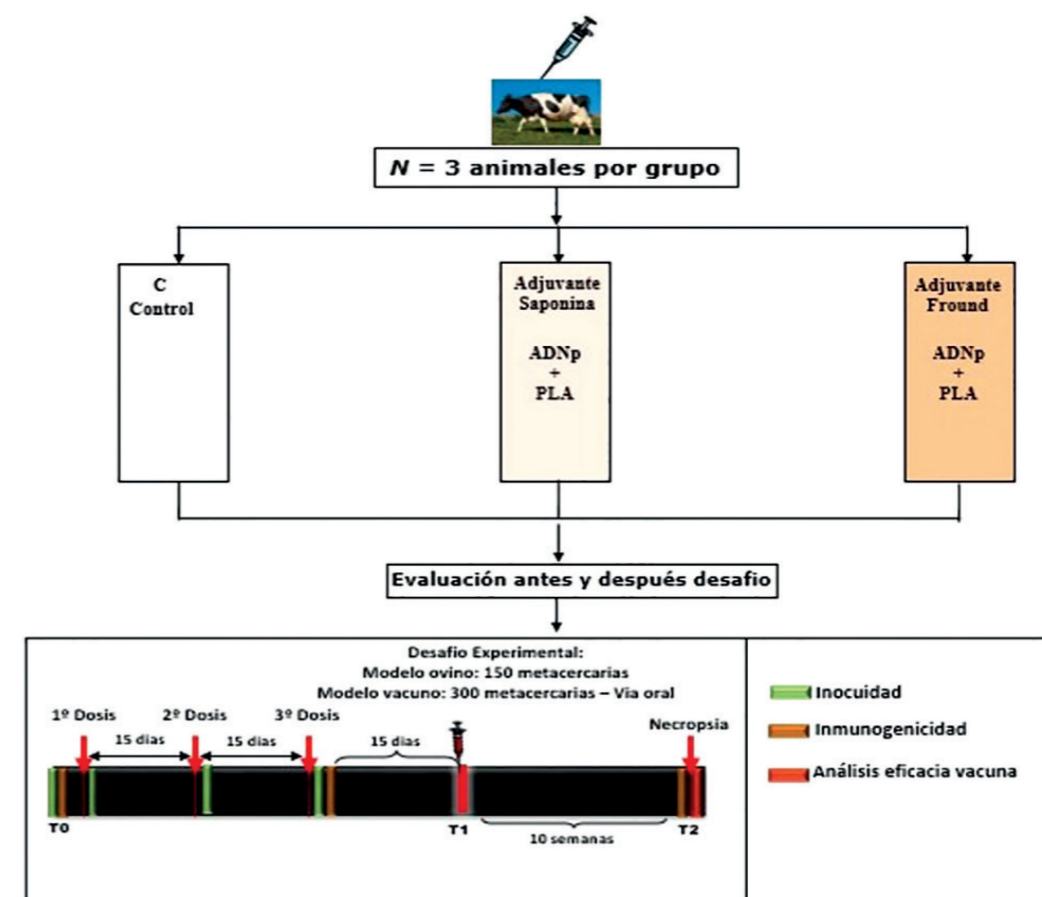


Figura 27. Esquema del diseño experimental empleado en evaluación de vacunos y ovinos sometidos a diferentes protocolos de vacunación.



### Modelo animal-ovino

- (i) Grupo control (C).  
Aplicar a los animales una dosis de 1 ml de solución salina estéril 0.9 %, vía intramuscular.
- (ii) Grupo ADN plasmídico (DNAp) encapsulado en PLA + saponina.  
Aplicar a los animales, por vía intramuscular, una dosis de 150 µg de ADN plasmídico encapsulado en ácido poliláctico (PLA) con 300 µl de saponina como adyuvante.
- (iii) Grupo DNAp encapsulado en ácido poliláctico (PLA) + adyuvante de Freund.  
Aplicar a los animales, por vía intramuscular, una dosis de 150 µg de DNA plasmidico encapsulado en ácido poliláctico (PLA) con 300 µl de adyuvante de Freund.

### Modelo animal-vacuno

- (i) Grupo Control (C).  
Aplicar a los animales una dosis de 1 ml de solución salina estéril 0.9 %, vía intramuscular.
- (ii) Grupo DNAp encapsulado en PLA + saponina .  
Aplicar a los animales una dosis de 300 µg de DNA plasmídico encapsulado en ácido poliláctico (PLA) con 300 µl de saponina como adyuvante, por vía intramuscular.
- (iii) Grupo DNAp encapsulado en PLA + adyuvante de Freund.  
Aplicar a los animales una dosis de 300 µg de DNA plasmidial encapsulado en ácido poliláctico (PLA) con 300 µl de adyuvante de Freund, por vía intramuscular.

Aplicar en ambos modelos de animal, tres dosis vía intramuscular utilizando una aguja hipodérmica N° 16 (16G / 1.5 “), con un intervalo de tiempo entre dosis de 15 días (Figura 28).



Figura 28. Inmunización de vacunos.

### 11.2. Desafío experimental

Realizar el desafío experimental con metacercarias de *Fasciola hepatica*, obtenidos de hospederos intermediarios (*Galba truncatula*) criados en el laboratorio e infectados con miracidium. Inocular la fase infectante del parásito vía oral utilizando cápsulas de gelatina (Figura 29).

Realizar el desafío experimental, 15 días después de la última dosis de la vacuna, con 150 metacercarias de *Fasciola hepatica* en el modelo ovino y 300 metacercarias en modelo vacuno.



Figura 29. Infección de carneros con metacercarias.

Colectar la sangre de los animales vía yugular en el tiempo T0 (inmediatamente antes da primera dosis), T1 (después de 15 días de la tercera dosis) y T2 (10 semanas después del desafío experimental e inmediatamente después de la eutanasia) (Figura 30). En las muestras colectadas realizar el análisis de función hepática y renal, hemograma y niveles de IgG.



Figura 30. Toma de muestra de sangre para análisis preclínico.



Luego del desafío experimental y después de la eutanasia de los animales, coleccionar los hígados para análisis del desarrollo de formas adultas y viabilidad de huevos de *Fasciola hepatica*. Realizar el análisis de carga parasitaria, 6 semanas después del desafío experimental por la técnica de sedimentación modificada de Denis (Figura 31)



Figura 31. Evaluación de desarrollo de formas adultas de *Fasciola hepatica* post desafío.

### 11.3. Evaluación de los aspectos relacionados a inocuidad y toxicidad de vacuna

Observar la zona de inóculo y el comportamiento de los animales durante el día de la inmunización y días subsiguientes. En la zona de inoculación observar macroscópicamente la formación de lesiones, presencia de nódulos, pápulas y lesiones ulcerativas. Es importante también observar el comportamiento de los animales ya que pueden presentar erizamiento de pelo, agresividad y apatía.

Realizar el monitoreo durante los 135 días que comprende el periodo, desde las inmunizaciones hasta la eutanasia (75 días después del desafío experimental).

### 11.4. Análisis de la función hepática y renal

Para el estudio de función hepática evaluar el dosaje de enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). Determinar los niveles de urea y creatinina para el análisis de la función renal. Evaluar las funciones tanto hepática como renal mediante el método UV enzimático.

### 11.5. Evaluación de parámetros hematológicos

Evaluar los parámetros hematológicos del modelo vacuno y ovino en los diferentes tiempos T0, T1 y T2. Colectar la sangre del modelo animal, por punción de la vena yugular, en un tubo de 10 ml conteniendo 10 µl del anticoagulante heparina (5 000 UI/ml).

En el hemograma determinar leucocitos totales, hematíes, plaquetas y concentración de hemoglobina.

### 11.6. Evaluación del perfil humoral

Para el análisis de los niveles de IgG total anti-catepsina, evaluar en los diferentes grupos experimentales, la presencia de anticuerpos contra catepsina de *Fasciola hepatica* a través del ensayo de ELISA indirecto en los tiempos T0 y T2 (Moreira et al., 2002)

Los resultados de los niveles de IgG están representadas por la media de los valores de densidad óptica (DO)  $\pm$  2 desviaciones estándar de las lecturas de las muestras de los sueros control no infectados.

## 12. REFERENCIAS

- Acha, P., y Szyfres B. (2003). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Washington, U.S.A.: OPS.
- Acha, P. (1986). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Washington, U.S.A.: OPS /OMS.
- Abdel-Rahman, S., Malone, J., & O'Reilly K.L. (1999). Biochemical characterization and localization of *Fasciola hepatica* 26–28 kDa diagnostic coproantigen. *Parasite immunology*, 21(6), 279-286.
- Anuracpreeda, P., Wanichanon C., & Sobhon P. (2009). *Fasciola gigantica*: immunolocalization of 28.5 kDa antigen in the tegument of metacercaria and juvenile fluke. *Experimental Parasitology*, 122(2), 75–83.
- Barriga, O. (2002). *Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina*. Santiago de Chile, Chile: Germinal.
- Bowman, D., Linn, R., y Eberhard, M. (2004). *Parasitología para veterinarios*. Madrid, España: Elsevier.
- Boray, J. (1997). *Chemotherapy of infections with fasciolidae. Immunology, pathobiology and control of Fasciolosis*. New Jersey: MSD AGVET Rahway, 83-97.
- Cabanillas, E. (2018). Relación de *Fasciola hepatica* adulta con huevos en bilis y heces de bovinos beneficiados en el camal municipal de Cajamarca-Perú (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú.
- Cordero del Campillo, M., Rojo-Vásquez, F.D., Martínez, A.R., Sánchez, M.C., Hernández, S., Navarrete, I., Diez P., Quiroz, H. y Carvalho, M. (1999). *Parasitología Veterinaria*. España: Mc-Graw Hill Interamericana.
- Cordero, K. (2016). *Prevalencia de Fasciola hepatica en bovinos beneficiados en el Centro de faenamiento FRILISA entre los años 2012-2015* (Tesis de pregrado). Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú
- Carrada-Bravo, T. (2007). *Fasciola hepatica*: Ciclo biológico y potencial biótico. *Rev Mex Patol Clin*, 54(1), 21-27.
- Claxton, J. R., Zambrano, H., Ortiz, P., Delgado, E., Ecurra, E., & Clarkson, M. J. (1998). Strategic control of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. *Veterinary record*, 143(2), 42-45.
- Cwiklinski, K., O'Neill, S. M., Donnelly, S., & Dalton, J. P. (2016). A prospective view of animal and human Fasciolosis. *Parasite immunology*, 38(9), 558-568.
- Collins, P. R., Stack, C. M., O'Neill, S. M., Doyle, S., Ryan, T., Brennan, G. P., ... & Donnelly, S. (2004). Cathepsin L1, the Major Protease Involved in Liver Fluke (*Fasciola hepatica*) virulence propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17038-17046.
- Drugueri, L. (2005). Distomatosis. Foro Zoe Tecnocampo. Recuperado de: <http://www.zoetecnocampo.com/forum/Forum2/HTML/000213.html>
- Dalton, J., & Heffernan, M. (1989). Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 35(2), 161-166.
- Espino, A., Borges, A., y Duménigo, B. (2000). Coproantígenos de *Fasciola hepatica* de posible utilidad en el diagnóstico de la fascioliasis. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 7, 225-231.
- Espinoza, J., Terashima, A., Herrera-Velít, P., y Marcos, L. (2010). Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 27 (4), 604-612.
- Fairweather, I., & Boray, J. (1999). Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *Vet J* 158: 81-112.
- [Fotografía de Irene de Haro Arteaga] (s.f.). Parasitología. Recuperado de: [http://microypara.facmed.unam.mx/?page\\_id=1935](http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=1935).
- Gállego, J. (2007). *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Barcelona, España: Ediciones. Universidad de Barcelona.
- González, G.M (2001). Incidencia de *Fasciola hepatica* en la cabaña ganadera austriana 2001; *Revista técnica Frisana*: 61-63.
- González, L. C., Esteban, J. G., Bargues, M. D., Valero, M. A., Ortiz, P., Náquira, C., & Mas-Coma, S. (2011). Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta tropica*, 120 (1-2), 119-129.
- Graczyk, T. & Fried, B. (1999). Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. En: Fasciolosis, Dalton J.P. (Ed.), CABI Publishing, pp.31-46.
- Huaccha E. *Control integrado de la distomatosis hepatica en la región: Cajamarca: Cajabamba, San Marcos, Celendín, San Pablo, San Miguel*. (2008). Cajamarca: Gobierno Regional de Cajamarca.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática - INEI. (1998). La actividad pecuaria regional y nacional, En: El productor agropecuario: condiciones de vida y pobreza. Lima, Perú.
- Krailas, D., Ardseungnoen, P., Sobhon, P., Upatham, E. S., & Keawjam, R. (1999). Identification of circulating antibodies in fasciolosis and localization of 66 kDa antigenic target using monoclonal antibodies. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*, 17(1), 53.
- Londoño, B., Chávez, V., Li, E., Suárez, A., & Pezo, C. (2009). Presencia de caracoles Lymnaeidae con formas larvianas de *Fasciola hepatica* en altitudes sobre los 4000 msnm en la sierra sur del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 20(1), 58-65.
- Leguía G. (1991). *Distomatosis hepática en el Perú: Epidemiología y Control*. (pp.41 p). Lima, Perú: Ciba Geigy Hoescht.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Mas-Coma, M., Esteban, J., & Bargues, M. (1999). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(4), 340.
- Malone, J. B., Gommers, R., Hansen, J., Yilma, J. M., Slingenber, J., Snijders, F., ... & Ataman, E. (1998). A geographic information system on the potential distribution and abundance of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in east Africa based on Food and Agriculture Organization databases. *Veterinary parasitology*, 78(2), 87-101.
- Marcos, L., Terashima, A., Leguía, G., Canales, M., Espinoza, J., & Gotuzzo, E. (2007). La infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una enfermedad emergente. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 27(4), 389-396.
- Marcos, L. A., Maco, V., Castillo, M., Terashima, A., Zerpa, R., & Gotuzzo, E. (2005). Report of cases of human fasciolosis in the Specialized Children's Health Institute, Lima, Peru (1988-2003). *Revista de gastroenterología del Perú*, 25(2), 198-205.
- Morphew, R. M., Wright, H. A., LaCourse, E. J., Porter, J., Barrett, J., Woods, D. J., & Brophy, P. M. (2011). Towards delineating functions within the *Fasciola* secreted cathepsin I protease family by integrating in vivo based sub-proteomics and phylogenetics. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(1), e937.

- Moreira, N., Vitoriano-Souza, J., Roatt, B., Vieira, P., Ker, H., de Oliveira Cardoso, J., Giunchetti, R., Carneiro, C., de Lana, M. & Reis, A. (2002). Parasite burden in hamsters infected with two different strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: “Leishman Donovan units” versus real-time PCR. *PloS one*, 7(10), e47907.
- Orfanos, N., Cabanillas, O. y León, D. (2015). Frecuencia relativa de fasciolosis en niños de edad escolar en las provincias de San Marcos, Cajabamba y Celendín, departamento de Cajamarca-año 2010. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 3(2), 78-84.
- Olaechea, F. (2007). *Fasciola hepatica*. En: V.H. Suárez, F.V. Olaechea, J.R. Romero, C.E. Rossanigo. Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. (pp 159-168). Argentina: INTA.
- Ortiz, P., Scarcella, S., Cerna, C., Rosales, C., Cabrera, M., Guzmán, M., ... & Solana, H. (2013). Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary parasitology*, 195(1-2), 118-121.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana*. México: Panamericana.
- Rojas, C. (2004). *Nosoparasitosis de los Rumiantes Domésticos Peruanos*. Lima, Perú: Maijosa.
- Rojas, J. (2007). Efectividad y resistencia antihelmíntica de *Fasciola hepatica* a triclabendazol en el fundo “El Cortijo”, distrito Baños del Inca, Cajamarca, Perú 2006. Recuperado de: <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/efectividad-resistencia-antihelmintica-fasciola-t27019.htm>
- Rojas, J., Palomino, G., Calderón, E., Terán, J. (2013). Diagnóstico de resistencia de *Fasciola hepatica* a los trematocidas de uso común en bovinos lecheros de cuatro distritos de Cajamarca Perú. Recuperado de: <http://www.perulactea.com/2013/05/04/diagnostico-de-resistencia-antihelmintica-de-fasciola-hepatica-a-los-antiparasitarios-de-uso-mas-comun-en-bovinos-de-cuatro-distritos-de-cajamarca-peru/>
- Soulsby, E. (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. México D. F., México: Editorial Interamericana.
- Shore, L. (2007). *Diagnostic Medical Parasitology*. Washington, U.S.A.: AMS Press.
- Sajid, M., & McKerrow, J. H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and biochemical parasitology*, 120(1), 1-21.
- Sinha, S., Redfield, R. J. (2012). Natural DNA Uptake by *Escherichia coli*. *PloS ONE*. 7:1- 6.
- Tello, R. (2012). Slideshare. Fasciolosis. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/josearancel/trematodos-13477159>
- Torgerson, P. Claxton, J. & Dalton, J.P. (1999). *Epidemiology and Control in Fasciolosis*. New York, U.S.A.: CABI Publishing.
- Toet, H., Piedrafita, D., & Spithill, T. (2014). Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *International journal for parasitology*, 44(12), 915-927.
- Urquhart, G., Armour, J., Duncan, J., Dunn, A., y Jennigs, F. (2001). *Parasitología Veterinaria*. Zaragoza, España: Acribia.
- Ullah, R., Rehman, A., Zafeer, M., Rehman, L., Khan, Y.A., & Khan, M. (2017). Anthelmintic Potential of Thymoquinone and Curcumin on *Fasciola gigantica*. *PLoS ONE* 12(2) e0171267.





*Instituto Nacional de Innovación Agraria*



*Instituto Nacional de Innovación Agraria*

Av. La Molina 1981, La Molina  
(511) 240-2100 / 240-2350  
[www.inia.gob.pe](http://www.inia.gob.pe)



ISBN: 978-9972-44-050-2



9 789972 440502