

## Caracterización molecular de la saposina SAP-1 de *Fasciola hepatica* en cepas resistentes al triclabendazol.

<sup>1</sup>Marco Antonio Rivera Jacinto, <sup>2</sup>Pedro Ortiz Oblitas

<sup>1</sup>Docente Asociado del Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca, Perú. mrivera@unc.edu.pe

<sup>2</sup>Docente Principal del Departamento de Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca, Perú. portiz@unc.edu.pe

**Palabras clave:** *Fasciola hepatica*, saposina, triclabendazol, reacción en cadena de la polimerasa.

**Resumen:** La fascioliasis causa pérdidas económicas millonarias en el mundo, lo cual se agrava con la resistencia del parásito al triclabendazol (TCBZ). A nivel molecular, diferentes proteínas de *Fasciola hepatica* se estudian en relación con la resistencia al TCBZ; entre estas proteínas están la saposina 1 (FhSAP1), cuya estructura molecular podría tener relación con la resistencia al TCBZ. El presente estudio tuvo por finalidad determinar la constitución nucleotídica de algunos segmentos de las secuencias de FhSAP1 en cepas resistentes de *F. hepatica* al TCBZ procedentes de dos áreas geográficas diferentes. Para ello, se obtuvo ADN complementario mediante la técnica RT-PCR a partir del ARN mensajero extraído de fasciolas adultas: seis especímenes resistentes al TCBZ procedentes de la Universidad La Trobe (Australia), y 15 parásitos resistentes al TCBZ procedentes de Cajamarca; luego, mediante PCR convencional y el uso de cebadores específicos se amplificaron fragmentos codificantes para saposinas en todas las cepas. Los resultados del análisis de electroforesis muestran bandas de 100 pares de bases que pertenecen a FhSAP1. Los cromatogramas y el análisis de secuencias con BLAST y Clustal-MFFT, revelaron alta homología entre las secuencias de nucleótidos de las cepas estudiadas y que no hubo diferencias significativas en la conformación de los aminoácidos al ser comparadas con las cepas reportadas en el Gen Bank. Se concluye que entre las cepas estudiadas no hay diferencias moleculares significativas en las secuencias de la FhSAP1.

**Abstract:** Fascioliasis cause economic losses in the world, it is compounded with triclabendazole resistance (TCBZ). in the parasite At the molecular level, different *Fasciola hepatica* proteins are studied in relation to TCBZ resistance; among these proteins are the sapsin 1 (FhSAP1), whose molecular structure may be related to TCBZ resistance. The present study aimed to determine the nucleotide constitution of some segments of the sequences FhSAP1 in resistant strains of *F. hepatica* to TCBZ from two different geographical areas. To do this, complementary DNA was obtained by RT-PCR technique from messenger RNA extracted from adult flukes: Six resistant specimens to TCBZ from La Trobe University (Australia), and 15 resistant parasites to TCBZ from Cajamarca; then, by conventional PCR and using specific primers fragments coding for saposins in all strains were amplified. The results of the electrophoresis analysis show bands of 100 base pairs belonging to FhSAP1. The chromatograms and sequence analysis with BLAST and Clustal-MFFT revealed high homology between the nucleotide sequences of the strains studied and no significant differences in conformation of amino acids when compared to the strains reported in the GenBank. It is concluded that among the studied strains no significant differences in molecular sequences FhSAP1.

**Keywords:** *Fasciola hepatica*, sapsin, triclabendazol, polymerase chain reaction.

## Introducción

La fascioliasis producida por *Fasciola* spp. es una enfermedad que afecta a muchos animales y al ser humano (Toledo et al. 2011). Las pérdidas económicas generadas por esta enfermedad al sector agropecuario mundial son millonarias (Nyindo y Lukumbagire 2015), y en el Perú, en un subestimado de las pérdidas reales, estaría en 50 millones de dólares/año (Espinoza et al. 2010), costos que se elevarían con la resistencia del parásito a los fasciolicidas, como es el caso de la resistencia al triclabendazol (TCBZ) en el ganado vacuno en Cajamarca (Ortiz et al. 2013).

En el Perú, la infección humana por *F. hepatica* ha sido diagnosticada en casi toda la región andina, que va desde los valles interandinos hasta el altiplano (Marcos et al. 2004), aún en áreas urbanas cerca a Lima y otros lugares de la costa (Marcos et al. 2007), representando un importante problema de salud en la población (Gonzales et al. 2011). Se ha reportado casos en 18 de las regiones del país, y se estima que existe una gran cantidad de casos subclínicos sin diagnosticar (Rinaldi et al. 2012; Mas-coma 2005). La infección humana sólo en la región andina de nuestro país, que incluye a Cajamarca, ha alcanzado prevalencias de hasta 68% (Marcos y Terashima 2007), con un panorama mundial que se agrava con el reporte de los primeros casos humanos de aparente resistencia al TCBZ (Winkelhagen et al. 2012; Gil et al. 2014).

Las estrategias para el control de la fascioliasis, tanto en el hombre como en los animales, están centradas en el desarrollo de vacunas como propósito fundamental y común, a partir de los productos de excreción - secreción (PES) del parásito, muchos de los cuales han probado ser capaces de estimular una respuesta inmunoprotectora en el hospedero definitivo (Jarayaj et al. 2010). Entre los antígenos con

este potencial están las proteínas saposina de *F. hepatica* (FhSAP), cuyas funciones importantes en el metabolismo del parásito, las hacen potencialmente útiles en inmunoprolifaxis y serodiagnóstico (Espino et al. 2005; Grams et al. 2006; Reed et al. 2000).

La existencia de variaciones genéticas poblacionales entre parásitos de diversas regiones ecogeográficas podría estar asociada con la evolución de la resistencia a antihelmínticos (Scarcella et al. 2015), y por tanto tendría importantes implicancias sobre la efectividad de los planes de prevención y control de la fascioliasis humana y/o animal; del mismo modo, frente al gran potencial que tienen los PES, algunos estudios han establecido que pequeñas variaciones genómicas o proteómicas en algunos de estos antígenos tendrían implicancias más que funcionales para el parásito (Smooker et al. 2000; Baspinar et al. 2011).

Existen reportes de variaciones regionales en proteínas tipo catepsinas, en trabajos en los que además se discute la posibilidad de que una única substitución en la cadena de aminoácidos, por ejemplo de la catepsina L (Cat-L), puede afectar la especificidad de la enzima por el sustrato (Smooker et al. 2000; Baspinar et al. 2011). También hay estudios en los que se ha establecido diferencias moleculares entre cepas sensibles y resistentes a TCBZ en cuanto a sus glicoproteínas (glicoproteína P, Gp-P) (Wilkinson et al. 2012) o en cuanto a sus isoenzimas Glutathion S-Transferasas (GST) (Fernández et al. 2015); sin embargo, no hay reportes acerca de variaciones genéticas en la FhSAP 1 en especímenes de áreas geográficas diferentes, ni de diferencias en relación a cepas de distinta sensibilidad al TCBZ.

Debido al vacío teórico existente y a la importancia que han adquirido las FhSAP, en

este estudio se pretendió determinar las variaciones genéticas que podría presentar la proteína FhSAP1 en cepas resistentes al TCBZ provenientes de dos áreas geográficas diferentes.

## Materiales y método

### Material biológico

Parásitos adultos de *F. hepática* resistentes al TCBZ y procedentes de dos áreas geográficas: quince especímenes de la cepa Cajamarca proporcionados por el Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Universidad Nacional de Cajamarca, y seis especímenes resistentes provenientes de Australia, proporcionadas por el Departamento de Ciencias Agrícolas de la Universidad La Trobe. Los parásitos adultos de la cepa Cajamarca se colectaron y mantuvieron a -70 °C en solución *RNAlater*<sup>®</sup> (Sigma). Las cepas de Australia fueron enviadas congeladas en viales con *RNAlater*, en hielo seco.

### Extracción del ARN parasitario

El ARN total de los parásitos fue extraído por el método con trizol, con 1 mL del reactivo por espécimen de *F. hepática*, siguiendo los protocolos establecidos en la literatura (Agrawal 2008; Farrel 2010).

- Cada espécimen fue congelado en nitrógeno líquido y luego descongelado a temperatura ambiente, proceso que se repitió por 3 veces. Luego el parásito fue machacado en un mortero hasta que este tomó consistencia pastosa.
- Se agregó 1 mL de trizol, se homogenizó y luego se recolectó el macerado en un tubo Eppendorf. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 30 °C en baño María. Se añadió 200 µL de cloroformo y se agitó durante 15 segundos y luego se volvió a

incubar por 3 minutos más.

- Se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos a 2 °C. La fase acuosa se colectó en un nuevo Eppendorf. Se agregó 500 µL de isopropanol y se incubó 10 min a temperatura ambiente.
- Se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm por 15 minutos a 2 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol absoluto 3 veces.
- Se centrifugó a 7 500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El pellet se secó a 36 °C sobre papel filtro y luego se re-suspendió con 50 µL de agua libre de ARNasas para disolverlo mediante vortex por 5 segundos.
- Se incubó a 56 °C por 10 minutos en baño María. Luego se evaluó la calidad y pureza de la molécula mediante espectrofotometría a 260 nm y 280 nm.

### Diseño de *primers* con secuencias completas del *GenBank*

Los *primers* para la amplificación correspondientes a las FhSAPs fueron diseñados a partir de las secuencias completas de nucleótidos disponibles en las bases de datos del *GenBank*. Para FhSAP1 el número de acceso en el *GenBank* es U58467 (*Fasciola hepatica amoebapore-like (FHAP) mRNA, 418 bp linear mRNA*) (Reed et al. 2000). Para el diseño se emplearon las herramientas bioinformáticas *Primer BLAST* (Ye et al. 2012), y *Primer 3* (Untergasser et al. 2012). Los *primers* empleados fueron: Forward: 5'-CGAACACCCATCCGCAAATC-3', Reverse: 5'-TGGTTC CTCT GATT CCA CGC-3'.

### Obtención del ADN complementario (ADNc) por RT-PCR

El ADNc fue sintetizado a partir de 5 µg de ARN de cada muestra con el *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen).

- Por muestra se mezclaron los siguientes componentes: 1 µL de oligo-dT 50 µM (500 µg/ml), 1 µL de mix dNTPs 10mM, el volumen requerido de ARN total para una concentración de 5 µg y el volumen necesario de agua libre de ARNasas para completar un volumen total de 10 µL.
- Las mezclas se incubaron en baño María a 65 °C por 5 min. La mix de síntesis contuvo: 2 µL de buffer RT 10X, 2 µL de DTT 0,1 M, 4 µL de Cl<sub>2</sub>Mg 25 mM, 1 µL de RNase OUT (40 U/µL) y 1 µL de enzima Superscript III RT (200 U/µL). El volumen total de reacción fue de 20 µL. Se colocó en termociclador a 50 - 55 °C por 55 minutos y luego a 80 °C por 15 min. El ADNc se preservó a -20 °C hasta su uso.

### Amplificación del ADNc por PCR

La amplificación de los fragmentos de ADNc se realizó a partir de 2 µL del producto de la RT-PCR. Para este proceso se empleó el *Novagen® KOD Hot Start DNA Polymerase* (Toyobo).

- La amplificación fue llevada a cabo con los siguientes componentes por muestra: 5 µL de *Buffer KOD Hot Start DNA Polymerase* 10X, 5µL de dNTPs 2 mM, 3 µL de Cl<sub>2</sub>Mg 25 mM, 1.5 µL de cada *primer* (10 µM), 2 µL de templado, 1 µL de *KOD Hot Start DNA Polymerase* (1 U/µL) y 31 µL de agua grado molecular a un volumen final de 50 µL.
- Las condiciones de PCR fueron: activación de la polimerasa a 95 °C por 2 minutos, con desnaturalización inicial por 20 segundos a 95 °C, seguido del *annealing* por 10

segundos y elongación por 10 segundos a 70 °C. El número de ciclos fue de 40. Finalmente las muestras amplificadas fueron conservadas a -20 °C hasta su secuenciamiento.

### Detección de fragmentos amplificados por electroforesis en gel (bandas)

El producto de la PCR fue analizado mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 % preparado con Tris Borato EDTA 0.5X (TBE), y teñido con *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen) (10 µL). Se hizo una corrida inicial por 30 minutos a 80 voltios y luego a 100 voltios por 45-50 minutos más. Finalizada la corrida, las bandas se observaron con transiluminación de luz UV con un *Visi-Blue Transilluminator™* (UVP).

### Secuenciamiento de los productos amplificados y análisis

Los productos de PCR fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa, purificados y enviados para su secuenciación a Macrogen (<http://www.macrogen.com>) en las siguientes condiciones: volumen de 100 µL de cada muestra, a concentración de 100 ng/µL, acompañados de los *primers* correspondientes a un volumen de 100 µL a concentración 10 µM. La secuenciación se realizó mediante secuenciador automático de ADN, empleando los mismos oligonucleótidos usados en el PCR convencional.

### Análisis de los fragmentos amplificados

Las bandas de los fragmentos amplificados fueron obtenidas con un equipo fotodocumentador *MicroDOC Basic System* (Cleaver Scientific Ltd.); luego fueron medidas por aproximación al marcador de peso molecular (MPM) mediante la utilización del software *GelAnalyzer 2010®*.

## Análisis de los amplicones

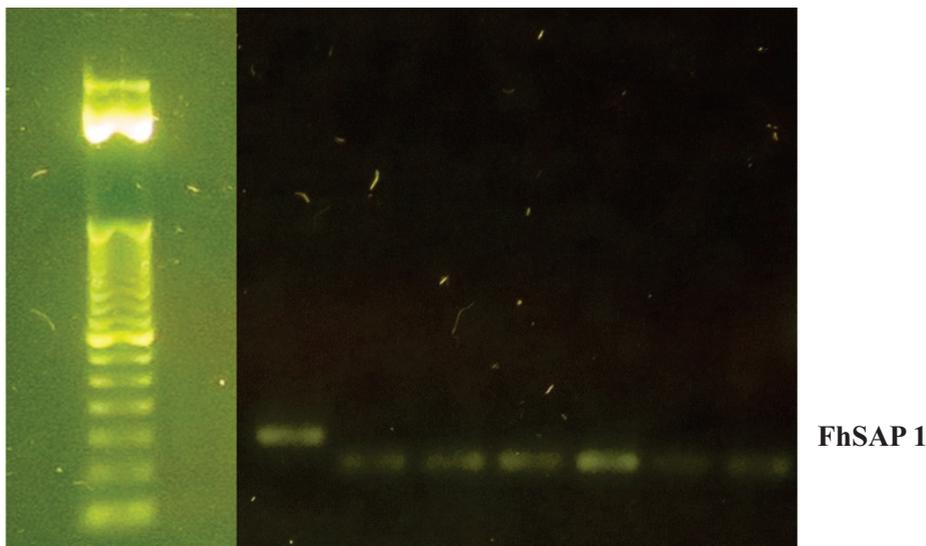
Las secuencias obtenidas en el cromatograma fueron editadas con el programa FynchTV 1.4.0 (Geospiza Inc., Washington, USA. La búsqueda de datos para la comparación de las secuencias de consenso se realizó con el programa FASTA en la base de datos del *GenBank*, luego fueron alineadas mediante el Software BLAST para nucleótidos, y finalmente analizadas y comparadas con el programa Clustal-MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*), mediante el cual se realizó un alineamiento múltiple.

## Resultados y discusión

Como producto de la amplificación se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 100 pb (pares de bases), pertenecientes a la secuencia FhSAP1. La secuencia de proteínas también es conocida como proteína tipo saposinas (*Sapoin-like protein*) o proteínas

tipo amoebaporas (*Amoebapore-like protein*).

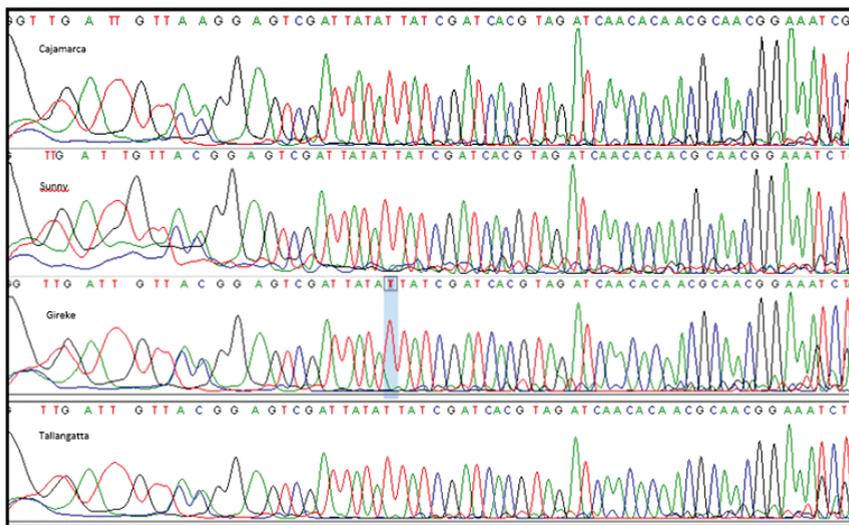
El inicio y final de los fragmentos estuvo ubicado entre las posiciones 154 y 293 de las secuencias completas de las saposinas, cuyo número de acceso en el GenBank para FhSAP1 es U58467 (*F. hepatica* amoebapore-like (FHAP) mRNA, 418 bp linear mRNA) (Reed et al. 2000). Mediante el análisis visual de los fragmentos, con el programa GelAnalyzer, pudimos confirmar que amplificamos las moléculas correspondientes a las saposinas del estudio, y no se evidenció diferencias ni en el peso molecular ni en el tamaño de las secuencias amplificadas, aun cuando los especímenes provenían de diferente origen geográfico (Figura 1). Es importante subrayar que, midiendo el peso molecular no es posible establecer la variación molecular de las proteínas estudiadas, por lo que fue necesario hacer el secuenciamiento de los fragmentos amplificadas y las comparaciones correspondientes.



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando las bandas de 100 pb correspondientes a la FhSAP1 en cepas de *F. hepatica* resistentes al TCBZ. MPM: marcador de peso molecular (50 bp DNA ladder), C1: control positivo de 150 bp (FhGADPH), Cax1: cepa de Cajamarca resistente al TCBZ, Cax2: cepa de Cajamarca de sensibilidad desconocida al TCBZ, Aust1, Aust2 y Aust3: cepas australianas resistentes al TCBZ, C2: control positivo de 100 bp.

Con los resultados del secuenciamiento, las secuencias de consenso de solo cuatro cepas (1 de Cajamarca y 3 de Australia) fueron sometidas al editor de secuencias FinchTV, de donde se obtuvieron cromatogramas para cada cepa (Figura 2). Al analizar los cromatogramas se observa una alta homología o identidad en la constitución de la secuencia de nucleótidos de las cepas comparadas. De manera preliminar, estos datos nos indican que no hay variabilidad molecular en la expresión de estas proteínas,

es decir, la expresión de las proteínas tipo FhSAP1 en *F. hepatica* podrían no estar relacionados con los fenómenos de resistencia al TCBZ. En cierta forma esta información es relevante debido a la utilidad que podría dársele a esta molécula como materia prima para la elaboración de vacunas o para el diseño de nuevos kits de diagnóstico, sobre todo en zonas endémicas para la enfermedad, como es el caso de Cajamarca.



**Figura 2.** Cromatogramas correspondientes a la FhSAP1 en 4 cepas de *F. hepatica* resistentes al TCBZ y de diferente origen geográfico.

Respecto a la secuencia específica de FhSAP1 de la cepa “Cajamarca” resistente al TCBZ, al ser sometida a alineamiento local en BLAST para nucleótidos, los resultados devueltos evidenciaron, como era esperado, alineamientos significativos con las bases de datos del *GenBank* para tres moléculas de tres trematodos distintos: *F. hepatica*, *Schistosoma mansoni* y *F. gigantica*, con homología de 100% con los dos primeros y de 93% con *F. gigantica*. La identidad con *S. mansoni* solo confirma lo que sugieren algunos estudios en cuanto a la existencia de genes ancestrales conservados en la filogenia de ambas especies (proteínas homólogas), lo cual explica además la existencia de epítomos en SAPs de reacción cruzada entre estos parásitos (Torres et al.

2006).

Adicionalmente, se evidenció que no hay diferencias en la conformación de los aminoácidos al compararse las FhSAP1 de las cepas evaluadas, con lo cual, más allá de que podemos remarcar que estas proteínas de *F. hepatica* no servirían como marcadores de resistencia al TCBZ, su potencial como antígeno para el desarrollo de kits diagnósticos y para ensayos vacunales se ve favorecido, ya que este tipo de proteínas no sólo están entre los antígenos más fácilmente detectados en sangre (Kueakhai et al. 2013), sino que además contiene una misma conformación de epítomos en diferentes regiones geográficas.

Durante los alineamientos por pares, de las secuencias de FhSAP1, enfrentando la cepa resistente "Cajamarca" con las demás del estudio, provenientes de Australia, se evidenció además diferencias nucleotídicas puntuales en un solo nucleótido, en este caso la cepa "Cajamarca" expresa una citosina (C), en lugar de las adeninas (A), que aparecen en todas las cepas de Australia, bajo un 97% de cobertura e identidad de 98%; sin embargo, en el alineamiento múltiple con una cobertura menor (de hasta 78,8%) la identidad de las secuencias llegó al 100%. Al parecer, estas pequeñas diferencias en la conformación de las secuencias no serían significativas para la expresión de la molécula en ninguno de los casos, ni por diferencias regionales ni por diferencias según la sensibilidad al TCBZ de los especímenes estudiados. De acuerdo con algunas investigaciones, se requieren diferencias significativas en la conformación de los aminoácidos para que estas tengan un impacto importante en la expresión de las enzimas del proteoma de *F. hepatica* (Smooker et al. 2000; Fernandez et al. 2015).

En general, ante la falta de variación genética importante en la secuencia de nucleótidos codificantes para estas proteínas FhSAP, podemos asumir que los avances en el desarrollo de técnicas diagnósticas y en los estudios de inmunización empleando éstas mismas moléculas podrían, en su momento, ser aplicadas en nuestra región. Por el contrario, en el caso de diferencias en las secuencias de aminoácidos, como las reportadas en la proteína Cat-L2 de cepas de *F. hepatica* también tomadas de áreas geográficas distintas (Smooker et al. 2000; Baspinar et al. 2011), necesariamente se tendría que evaluar en cada zona geográfica la utilidad de la proteína como herramienta diagnóstica, y se tendrían que implementar protocolos de prueba para ensayos vacunales obtenidas de cepas oriundas de cada región geográfica.

En los estudios mencionados antes, se discute

las implicancias que las diferencias nucleotídicas y su expresión de aminoácidos tienen sobre lo avanzado en inmunoprofilaxis y el diagnóstico, empleando antígenos como las Cat-L. En este sentido, los avances en el empleo de FhSAP y sus moléculas recombinantes, como alternativas para el diagnóstico masivo y control de la enfermedad en animales y su prevención en humanos se ven fortalecidos con nuestros hallazgos, ya que empleados como antígenos para producir kits diagnósticos pueden ser útiles en cualquier lugar del mundo. Debido a que la inmunogenicidad de estas proteínas ya ha sido demostrada en diversos estudios (Espino et al. 2005), su empleo como vacuna para el control de la enfermedad en el ganado, en diferentes regiones geográficas, también se vería respaldada por la no variación antigénica de las moléculas, hallada en este trabajo.

Es importante señalar que, en este estudio sólo se evaluó una fracción de la secuencia de la proteína FhSAP1, por lo que sería sustancial completar las secuencias de ambos extremos y alinearlas nuevamente para establecer la homología completa de ambas saposinas. De encontrarse, en un nuevo alineamiento, diferencias que no hemos hallado en esta investigación, estas tendrían que ser significativas en el número y en el tipo de nucleótidos y/o aminoácidos para afectar la inmunogenicidad del antígeno involucrado (Kuk et al. 2005).

Por ahora, la ausencia de variaciones genéticas en estas proteínas, en especímenes resistentes al TCBZ, ayuda poco a entender los mecanismos de este fenotipo y su relación con los PES o las rutas metabólicas involucradas, y más bien sirven sólo para reconocer que tales transiciones pueden deberse a la variación alélica normal en los genes que las codifican.

Frente a los hallazgos hasta ahora indicados, también se optó por alinear las secuencias en forma múltiple en el *Clustal-MAFFT*. Los resultados confirmaron el alto nivel de identidad entre las secuencias de las diferentes cepas estudiadas, con pequeñas diferencias al inicio de las secuencias comparadas; sin embargo, de acuerdo con los cálculos estadísticos de los programas empleados, valores  $e$  por debajo de  $10^{-6}$  son más que suficientes para afirmar que tales diferencias no son significativas, o para asegurar la alta homología entre las secuencias.

## Conclusiones

1. Este estudio concluye que, entre los fragmentos de ADN secuenciados, correspondientes a la saposina FhSAP1 provenientes de ARNm de las cepas resistentes de Cajamarca y de Australia, no hubo variación nucleotídica significativa.

2. Consecuentemente, también se concluye que no hay variabilidad significativa en la expresión de los aminoácidos, correspondientes a la misma fracción de proteínas en las cepas estudiadas.

## Referencias bibliográficas

Agrawal, S. 2008. Techniques in Molecular Biology. 1<sup>st</sup> ed. International Book Distributing. India, p 1-112.

Başpınar, S; Çelik, V; Balik, DT; Kaplan, M. 2011. Regional Differences in the Amino Acid Sequences of *Fasciola hepatica* Cathepsin L2 from a Turkish Isolate. *Balkan Med J* 28:269-273.

Brennan, GP; Fairweather I; Trudgett, A; Hoey, E; McCoy; McConville, M; et al. 2007. Understanding triclabendazole resistance. *Exp Mol Path* 82(2):104-109.

Espino, AM; Osuna, A; Gil, R; Hillyer, GV. 2005.

*Fasciola hepatica*: Humoral and cytokine responses to a member of the saposin-like protein family following delivery as a DNA vaccine in mice. *Exp Parasit* 110(4): 374-383.

Espinoza, JR; Terashima, A; Herrera-Velit, P; Marcos, LA. 2010. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 27(4):604-612.

Farrel, RE. 2010. RNA Methodologies Laboratory Guide for Isolation and Characterization. 4<sup>th</sup> ed. Academic Press Elsevier. USA, p 45-219.

Fernandez, V; Estein, S; Ortiz, P; Luchessi, P; Solana, MV; Solana, H. 2015. A single amino acid substitution in isozyme GST mu in Triclabendazole resistant *Fasciola hepatica* (Sligo strain) can substantially influence the manifestation of anthelmintic resistance. *Exp Parasit* 159:274-279.

Gil, L; Díaz, A; Rueda, C; Martínez, C; Castillo, D; Apt, W. 2014. Resistant human fasciolosis: report of four patients. *Rev méd Chile* 142(10):1330-1333.

González, LC; Esteban, JG; Bargues, MD; Valero, MA; Ortiz, P; Náquira, C; et al. 2011. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Trop* 120(1-2):119-129.

Grams, R; Adisakwattana, P; Ritthisunthorn, N; Eursitthichai, V; Vichasri-Grams, S; Viyanant, V. 2006. The saposin-like proteins 1, 2, and 3 of *Fasciola gigantica*. *Mol Biochem Parasitol* 148(2):133-143.

Jayaraj, R; Piedrafita, D; Dynon, K; Grams, R; Spithill, TW; Smooker, PM. 2010. Liver fluke vaccines: Vaccination Against Fasciolosis by a Multivalent Vaccine of Recombinant Stage-Specific Antigens. *Procedia Vaccin* 2(1):82-85.

- Kueakhai, P; Changklungmoa, N; Chaithirayanon, K; Songkoomkrong, S; Riengrojpitak, S; Sobhon, P. 2013. Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant saposin-like protein 2 of *Fasciola gigantica*. *Acta Trop* 125(2):157-162.
- Kuk, S; Kaplan, M; Ozdarendeli, A; Tonbak, S; Felek, S; Kalkan, A. 2005. *Fasciola hepatica* cathepsin L1 from a Turkish isolate is related to Asiatic isolates. *Acta Parasit* 50(3):244-248.
- Marcos, LA; Maco, V; Terashima, A; Samalvides, F; Miranda, E; Tantalean, M, et al. 2004. Hiperendemicidad de Fasciolosis humana en el Valle del Mantaro, Perú: Factores de riesgo de la Infección por *Fasciola hepatica*. *Rev Gastroenterol Perú* 24(2):158-164.
- Marcos, L; Romani, L; Florencio, L; Terashima, A; Canales, M; Nestares, J; et al. 2007. Zonas Hiperendémicas y Mesoendémicas de la Infección por *Fasciola hepatica* aledañas a la Ciudad de Lima: Una Enfermedad Emergente? *Rev Gastroenterol Perú* 27(1):31-36.
- Marcos, LA; Terashima, A. 2007. Update on human fascioliasis in Peru: diagnosis, treatment and clinical classification proposal. *Neotropical Helminth* 1(2):85-103.
- Mas-Coma, S. 2005. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminth* 79:207-216.
- Nyindo, M; Lukumbagire, A. 2015. Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. *BioMed Res Int* 2015.
- Ortiz, P; Scarcella, S; Cerna, C; Rosales, C; Cabrera, M; Guzmán, M; et al. 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Vet Parasitol* 195(1-2):118-121.
- Reed, MB; Strugnell, RA; Panaccio, M; Spithill, TW. 2000. A novel member of the NK-lysin protein family is developmentally regulated and secreted by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 105(2):297-303.
- Rinaldi, L; Gonzáles, S; Guerrero, J; Aguilera, LC; Musella, V; Genchi, C; et al. 2012. A One-Health integrated approach to control fascioliasis in the Cajamarca valley of Peru. *Geospatial Health* 6(3):S67-S73.
- Scarcella, S; Miranda-Miranda, E; Solana, MV; Solana, H. 2015. Approach to molecular characterization of different strains of *Fasciola hepatica* using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 114(4):1341-1345.
- Smooker, PM; Whisstock, JC; Irving, JA; Siyaguna, S; Spithill, T; Pike, RN. 2000. A single amino acid substitution affects substrate specificity in cysteine proteinases from *Fasciola hepatica*. *Protein Science* 9:2567-2572.
- Toledo, R; Bernal, M; Marcilla, A. 2011. Proteomics of foodborne trematodes. *J Prot* 74(9):1485-1503.
- Torres, D; Espino, AM. 2006. Mapping of B-cell epitopes on a novel 11.5-kilodalton *Fasciola hepatica*-*Schistosoma mansoni* cross-reactive antigen belonging to a member of the *F. hepatica* saposin-like protein family. *Infect Immun* 74(8):4932-4938.
- Untergasser, A; Cutcutache, I; Koressaar, T; Ye, J; Flaircloth, BC; Remm, M; et al. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40(15):115.
- Wilkinson, R; Law, CJ; Hoey, EM; Fairweather, I; Brennan, GP; Trudgett, A. 2012. An amino acid substitution in *Fasciola hepatica* P-glycoprotein from triclabendazole-resistant and triclabendazole-susceptible populations. *Mol Biochem Parasitol* 186(1):69-72.

Winkelhagen, A; Mank, T; de Vries, PJ; Soetekouw, R. 2012. Apparent triclabendazole-resistant human *Fasciola hepatica* infection, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 18(6):1028-9.

Ye, J; Coulouris, G; Zaretskaya, I; Cutcutache, I; Rozen, S; Madden, TL. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primer for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*13:134.