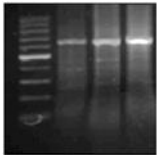


Análisis genético comparativo de la glutatión S-transferasa de *Fasciola hepatica* procedente de distintos huéspedes definitivos

Vanesa Fernández^{1,3}, Silvia M. Estein^{2,3}, Pedro Ortiz⁴, Hugo Solana^{1,5}



Resumen: La fasciolosis, parasitosis zoonótica de ubicación intrahepática, es ocasionada por *Fasciola hepatica*. La resistencia de *F. hepatica* a TCBZ está progresando mundialmente por lo cual es necesario ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de detoxificación que este helminto posee. Las glutatión S-transferasas (GSTs), enzimas multifuncionales implicadas en la detoxificación de compuestos endógenos y xenobióticos, podrían participar en la expresión de resistencia a TCBZ. En este trabajo se determinó el nivel de expresión del ARNm y se caracterizó el gen para GST (*genGST*) correspondiente a fasciolas provenientes de tres hospedadores diferentes infectados naturalmente. Las secuencias del *genGST* de las fasciolas analizadas se compararon con las secuencias de las cepas *Sligo* (triclabendazol resistente: TCBZ-R) y *Cullompton* (triclabendazol sensible: TCBZ-S) (GenBank ID: KF680281-KF680284, respectivamente) obtenidas en nuestro laboratorio. Las fasciolas de las tres especies hospedadoras expresaron diferencias significativas en el ARNm: cerdo 2 > bovino 1.7 > ovino 1 y un *genGST* idéntico al de la cepa TCBZ-S. La diferencia de expresión podría relacionarse con el nivel de resistencia de los diferentes huéspedes a *F. hepatica*. Estos resultados aportarían a la comprensión de los mecanismos generadores de resistencia a *F. hepatica* en los distintos huéspedes definitivos.

Palabras clave: Fasciola hepatica, glutatión S-transferasa, triclabendazole.

Comparative genetic analysis of glutathione S-transferase *Fasciola hepatica* from different definitive hosts

Abstract: Fasciolosis, a zoonotic intrahepatic parasitosis is caused by *Fasciola hepatica*. Resistance of *F. hepatica* to TCBZ is progressing globally so it is necessary to increase the knowledge of the mechanisms of detoxification that this helminth possesses. The multifunctional enzymes glutathione S-transferases (GSTs) are involved in the detoxification of endogenous and xenobiotic compounds and could be involved in the expression of resistance to TCBZ. In this work the level of mRNA expression was determined and the gene for GST (*genGST*) from flukes from three different naturally infected hosts was characterized. The sequence of the *genGST* was compared with the sequences of resistant (TCBZ-R) (*Sligo*) and sensible (TCBZ-S) (*Cullompton*) strains of *F. hepatica* (GenBank ID: KF680281 - KF680284, respectively) obtained in our laboratory. Flukes of three different hosts expressed significant differences in their mRNA: porcine 2 > bovine 1.7 > ovine 1 and the *genGST* sequence was identical to TCBZ-S strain of *F. hepatica*. The difference in expression of the *genGST* could be related to the level of resistance of the different hosts against *F. hepatica*. These results would contribute to the understanding of the mechanisms of resistance to *F. hepatica* in different definitive hosts.

Key words: *Fasciola hepatica*, glutathione S-transferase, triclabendazole.

Introducción

La fasciolosis es una zoonosis parasitaria producida por *Fasciola hepatica*, un trematodo que parasita el hígado de animales herbívoros y del hombre¹. La enfermedad constituye un grave problema para el hombre el cual se infesta a través de la ingestión de vegetales contaminados con metacercarias. En la actualidad hay 17 millones de personas afectadas en el mundo por lo cual se la considera una de las en-

fermedades de mayor impacto sanitario, principalmente en poblaciones rurales y de bajos recursos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que en Rusia, China, Georgia, Vietnam y Uganda la enfermedad se expande a gran velocidad, aspecto relacionado con el cambio climático y global². El triclabendazole (TCBZ) es un antiparasitario eficiente contra trematodos inmaduros y adultos¹. La resistencia a los benzimidazoles antihelmínticos detectadas

1. Laboratorio de Biología Celular y Molecular.

2. Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (FCV-UNCPBA).

3. CONICET.

4. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Perú.

5. Comisión Investigaciones Científicas (CICBA).

vanesaf@vet.unicen.edu.ar

Enviado: 10-05-14

Aprobado: 11-11-14

en nematodos se asocia con la pérdida de unión de alta afinidad y alteración del patrón de β -tubulina del parásito (receptor diana), sin embargo, en el fenotipo TCBZ resistente (TCBZ-R) de *F. hepatica* no se observan dichos cambios genéticos³. Esto sugiere que habría un mecanismo alternativo de resistencia a dicho fármaco. Las glutatión S-transferasas (GSTs) son enzimas multifuncionales que metabolizan xenobióticos en la fase II de detoxificación y también compuestos endógenos⁴. En *F. hepatica* son las principales enzimas de detoxificación en helmintos adultos⁵. Las medidas de control estratégicas contra la fasciolosis se basan principalmente en la utilización de drogas antiparasitarias⁶. Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que existe una mayor actividad metabólica de GST en cepas TCBZ resistentes que en cepas TCBZ sensibles (TCBZ-S), hallazgo que se correlaciona con una mayor expresión del ARNm en cepas resistentes⁷. El gen para GST (*genGST*) en ambas cepas, sensible y resistente al TCBZ (número de acceso obtenido NCBI GenBank (KF680281-KF680284, (Fernández V. *et al*, 2013)) posee un 99 % de homología de secuencia con las secuencias publicadas. Las fasciolas provenientes de las tres especies de hospedadores expresaron un *genGST* idéntico al TCBZ-S (cepa *Cullompton*) y no se detectaron modificaciones en los aminoácidos de la GST de las fasciolas de campo recuperadas de los distintos huéspedes respecto de la cepa TCBZ-S.

En la fasciolosis existe el fenómeno de infección cruzada mediante el cual la convivencia de bovinos, ovinos y cerdos favorece que el parásito repique entre especies. Estos pasajes entre diferentes especies de hospedadores determinan modificaciones de adaptación al nuevo entorno en donde podría favorecerse la expresión del fenómeno de resistencia⁸.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el nivel de expresión del ARNm de la GST de *F. hepatica* aislada de tres hospedadores diferentes: ovino, bovino y porcino y caracterizar el *genGST* a través de un análisis comparativo con las cepas TCBZ-R y TCBZ-S de referencia.

Materiales y Métodos

Obtención del material parasitario: Las fasciolas adultas de ovinos, bovinos y cerdos infectados naturalmente se capturaron en el frigorífico de Cajamarca (Perú). Las cepas *Cullompton* y *Sligo* (TCBZ-S y TCBZ-R, respectivamente) fueron gentilmente cedidas por el Dr. I. Fairweather (The Queens University of Belfast, Northern Ireland, UK).

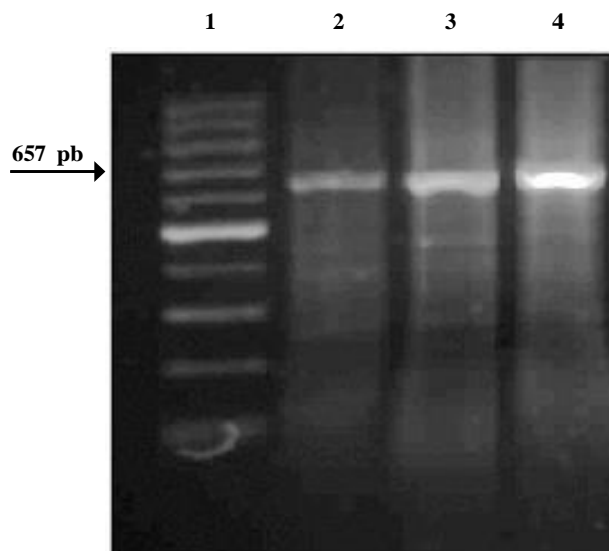
Estudios genéticos: La purificación del ARN total se llevó a cabo mediante la utilización de Trizol[®]. La RT-PCR se llevó a cabo utilizando el kit TRI REA-

GENT SIGMA[®] (T 9414). Para la PCR a partir del ADNc se diseñaron los siguientes "primers": FhGST-F (5' - ATG CCA CCG AAA CTC GGATAC - 3') y FhGST-R (5' - TCAAGC CGG TGC AGC GTC TC - 3') para regiones conservadas del *genGST* amplificando un fragmento de 657 pb. El análisis termodinámico de los oligonucleótidos fue realizado con el programa OligoTech con apoyo del software DNAsar. La reacción consistió en etapas de desnaturalización inicial (94°C, 5 min), hibridación (55°C, 45 seg) y extensión (72°C, 1 min) durante 30 ciclos, con una elongación final (72°C, 5 min). Dichos amplicones fueron recuperados, purificados y ligados al vector comercial TOPO TA cloning kit[®] (Invitrogen K457501) y secuenciados en un ABI PRISM utilizando oligonucleótidos que hibridan en el vector. El análisis de comparación de secuencias correspondiente al *genGST* de bovinos, ovinos y porcino se realizó utilizando el programa CLUSTAL 2.1 que permite el alineamiento del *genGST* de las distintas especies con el *genGST* de las cepas de referencia. Por último se utilizó la herramienta bioinformática Expansy-Translate para determinar modificaciones de aminoácidos en las proteínas GST respectivas.

Resultados

Se identificó un amplicón de 657 pb correspondiente al ARNm del *genGST* de *F. hepatica* en ovinos, bovinos y cerdos (Figura 1) que presentó diferencias

Figura 1. Amplificación por RT-PCR del *gen GST*. Se obtuvo una banda compatible con el tamaño esperado de 657 pb. Marcador de Peso Molecular (carril 1), *F. hepatica* aislada de ovino (carril 2), *F. hepatica* aislada de bovino (carril 3) y *F. hepatica* aislada de cerdo (carril 4)



significativas en la expresión entre especies (porcino 2 > bovino 1.7 > ovino 1). El control interno del ARNm de actina y la cuantificación de las bandas mediante el programa ImageJ® se observan en la (Figura 2). Las fasciolas provenientes de las tres especies de hospedadores expresaron un *genGST* idéntico al TCBZ-S (cepa *Cullompton*) (Figura 3). No se detectaron modificaciones en los aminoácidos de la enzima GST de las fasciolas de campo de los distintos huéspedes, y la cepa TCBZ-S, la cual presentó un cambio de aminoácido respecto de la cepa TCBZ-R (treonina por serina) (Figura 4).

Discusión

Ante una fasciolosis, existe el fenómeno de infección cruzada en donde la convivencia de bovinos, ovinos y porcinos permite que el parásito repique entre diferentes especies. Estos pasajes condicionan modificaciones de adaptación al nuevo entorno⁸. En

el presente trabajo se demuestra que en *F. hepatica* la expresión del ARNm correspondiente a la enzi-

Figura 2. Valores relativos correspondientes al ADNc de vermes adultos de *F. hepatica* recuperadas de ovino, bovino y cerdo (programa ImageJ®)

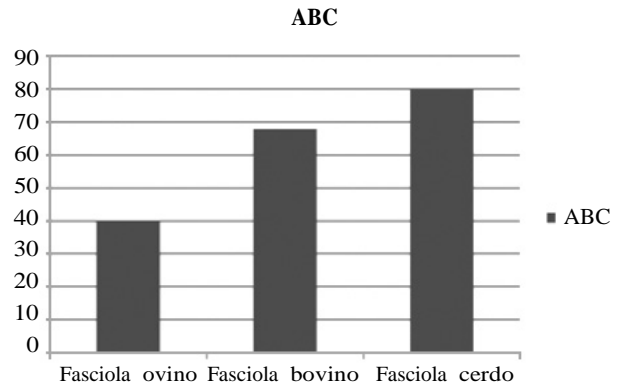


Figura 3. Secuencia de la alineación de GST de *F. hepatica* susceptibles a TCBZ (cepa *Cullompton*) y resistente a TCBZ (cepa *Sligo*) comparadas con *F. hepatica* de ovinos, bovinos y cerdos provenientes de las respectivas secuencias de cDNA. El sombreado claro indica las diferencias dentro de las secuencias en la enzima GST que muestra el cambio de dos nucleótidos en la enzima GST de la cepa TCBZ-resistente. (Para GenBank números de acceso de secuencias de cDNA ver en el texto)

GSTsensible	-----GGCTCCAACAACCCGTTCTGACTC 23
GSTresistente	-----GGGCTCCAACAACCCGTTCTGACTC 24
GSTovino	-----GGGCTCCAACAACCCGTTCTGACTC 24
GSTbovino	TNNTGCCNNAACCAACTCGGATACTGGAAAATAAGAGGGCTCCAACAACCCGTTCTGACTC 60
GSTcerdo	-NNNNNCANACCAACTCGGATACTGGAAAATAAGAGGGCTCCAACAACCCGTTCTGACTC 59

GSTsensible	TTGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTACGAAGAACATCTGTACGGTCGTGATGATAGGGAG 83
GSTresistente	TTGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTACGAAGAACATCTGTACGGTCGTGATGATAGGGAG 84
GSTovino	TTGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTACGAAGAACATCTGTACGGTCGTGATGATAGGGAG 84
GSTbovino	TTGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTACGAAGAACATCTGTACGGTCGTGATGATAGGGAG 118
GSTcerdo	TTGCTCGAATACCTGGGTGAAGAGTACGAAGAACATCTGTACGGTCGTGATGATAGGGAG 119

GSTsensible	AAATGGTTTGGCGATAAATTCAACATGGGATTGGATTGCCAAATTTACCATACTACATT 143
GSTresistente	AAATGGTTTGGCGATAAATTCAACATGGGATTGGATTGCCAAATTTACCATACTACATT 144
GSTovino	AAATGGTTTGGCGATAAATTCAACATGGGATTGGATTGCCAAATTTACCATACTACATT 144
GSTbovino	AAATGGTTTGGCGATAAATTCAACATGGGATTGGATTGCCAAATTTACCATACTACATT 178
GSTcerdo	AAATGGTTTGGCGATAAATTCAACATGGGATTGGATTGCCAAATTTACCATACTACATT 179

GSTsensible	GACGATAAGTGCAAACCTGACTCAGTCGGTGGCCATAATGCGGTACATTGCGGATAAGCAT 203
GSTresistente	GACGATAAGTGCAAACCTGACTCAGTCGGTGGCCATAATGCGGTACATTGCGGATAAGCAT 204
GSTovino	GACGATAAGTGCAAACCTGACTCAGTCGGTGGCCATAATGCGGTACATTGCGGATAAGCAT 204
GSTbovino	GACGATAAGTGCAAACCTGACTCAGTCGGTGGCCATAATGCGGTACATTGCGGATAAGCAT 238
GSTcerdo	GACGATAAGTGCAAACCTGACTCAGTCGGTGGCCATAATGCGGTACATTGCGGATAAGCAT 239

GSTsensible	GGAATGCTTGGTTCTACACCCGAGGAACGAGCTCGAATTTTCGATGATCGAAGGAGCTGCA 263
GSTresistente	GGAATGCTTGGTTCTACACCCGAGGAACGAGCTCGAATTTTCGATGATCGAAGGAGCTGCA 264
GSTovino	GGAATGCTTGGTTCTACACCCGAGGAACGAGCTCGAATTTTCGATGATCGAAGGAGCTGCA 264
GSTbovino	GGAATGCTTGGTTCTACACCCGAGGAACGAGCTCGAATTTTCGATGATCGAAGGAGCTGCA 298
GSTcerdo	GGAATGCTTGGTTCTACACCCGAGGAACGAGCTCGAATTTTCGATGATCGAAGGAGCTGCA 299

GSTsensible	ATGGATCTTCGGATGGGTTTTGTTTCGTGTTTGTACAACCCAAAATTTGAAGAAGTGAAA	323
GSTresistente	ATGGATCTTCGGATGGGTTTTGTTTCGTGTTTGTACAACCCAAAATTTGAAGAAGTGAAA	324
GSTovino	ATGGATCTTCGGATGGGTTTTGTTTCGTGTTTGTACAACCCAAAATTTGAAGAAGTGAAA	324
GSTbovino	ATGGATCTTCGGATGGGTTTTGTTTCGTGTTTGTACAACCCAAAATTTGAAGAAGTGAAA	358
GSTcerdo	ATGGATCTTCGGATGGGTTTTGTTTCGTGTTTGTACAACCCAAAATTTGAAGAAGTGAAA	359

GSTsensible	GGAGATTATCTGAAAGAAGCTGCCAACAAACGTTGAAGATGTGGTCCGATTTTCTTGAGAT	383
GSTresistente	GGAGATTATCTGAAAGAAGCTGCCAACAAACGTTGAAGATGTGGTCCGATTTTCTTGAGAT	384
GSTovino	GGAGATTATCTGAAAGAAGCTGCCAACAAACGTTGAAGATGTGGTCCGATTTTCTTGAGAT	384
GSTbovino	GGAGATTATCTGAAAGAAGCTGCCAACAAACGTTGAAGATGTGGTCCGATTTTCTTGAGAT	418
GSTcerdo	GGAGATTATCTGAAAGAAGCTGCCAACAAACGTTGAAGATGTGGTCCGATTTTCTTGAGAT	419

GSTsensible	CGTCACTATTTGACAGGTTCTACAGTTAGCCATGTGGACTTTATGGTTTACGAAGCATTG	443
GSTresistente	CGTCACTATTTGACAGGTTCTACAGTTAGCCATGTGGACTTTATGGTTTACGAAGCATTG	444
GSTovino	CGTCACTATTTGACAGGTTCTACAGTTAGCCATGTGGACTTTATGGTTTACGAAGCATTG	444
GSTbovino	CGTCACTATTTGACAGGTTCTACAGTTAGCCATGTGGACTTTATGGTTTACGAAGCATTG	478
GSTcerdo	CGTCACTATTTGACAGGTTCTACAGTTAGCCATGTGGACTTTATGGTTTACGAAGCATTG	479

GSTsensible	GACTGTATTTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACTTTCCCAAATTGAAGGAATTC	503
GSTresistente	GACTGTATTTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACTTTCCCAAATTGAAGGAATTC	511
GSTovino	GACTGTATTTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACTTTCCCAAATTGAAGGAATTC	504
GSTbovino	GACTGTATTTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACTTTCCCAAATTGAAGGAATTC	538
GSTcerdo	GACTGTATTTCGTTATTTGGCACCACAGTGTCTGGAGGACTTTCCCAAATTGAAGGAATTC	539

GSTsensible	AAGAGTCGATTGAAGATCTTCCAAAAATCAAGGCATACATGGAATCAGAGAAGTTCATC	563
GSTresistente	AAGAGTCGATTGAAGATCTTCCAAAAATCAAGGCATACATGGAATCAGAGAAGTTCATC	571
GSTovino	AAGAGTCGATTGAAGATCTTCCAAAAATCAAGGCATACATGGAATCAGAGAAGTTCATC	564
GSTbovino	AAGAGTCGATTGAAGATCTTCCAAAAATCAAGGCATACATGGAATCAGAGAAGTTCATC	598
GSTcerdo	AAGAGTCGATTGAAGATCTTCCAAAAATCAAGGCATACATGGAATCAGAGAAGTTCATC	599

GSTsensible	AAGTGGCCTTTGAACTCGTGGATTGCTTCTTTCGGTGGTGGAGACGCNNNNNNNNNNNN	623
GSTresistente	AAGTGGCCTTTGAACTCGTGGATTGCTTCTTTCGGTGGTGGAGACGCNNNNNNNNNNNN	631
GSTovino	AAGTGGCCTTTGAACTCGTGGATTGCTTCTTTCGGTGGTGGAGACGCNNNNNNNNNGCENN	624
GSTbovino	AAGTGGCCTTTNNNNNNNNNNNNNNNN-----	625
GSTcerdo	AAGTGGCCTTTGANNNNNNNNNNNNNN-----	624

GSTsensible	AAN-	626
GSTresistente	NAA-	634
GSTovino	GNN	628
GSTbovino	---	625
GSTcerdo	---	624

ma GST varía según el hospedador del cual deriva el verme adulto. Dicha expresión diferencial se puede correlacionar directamente con el grado de resistencia de los diferentes hospedadores frente a la parasitosis sin descartar su probable participación en la futura generación de mutantes resistentes a diferentes antihelmínticos incluido el TCBZ. La convivencia de bovinos, ovinos y porcinos con las consecuentes modificaciones de adaptación del parásito al nuevo entorno, podría ser un factor desencadenante de la resistencia antihelmíntica.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. Boray JC. Disease of domestic animals caused by flukes. FAO, ROMA. 1994. pp: 187- 218.
2. Mas-Coma S. Human fasciolosis: epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2004; 35(S1): 1-11.
3. Robinson MW, Trudgett A, Hoey EM, Fairweather 370. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: β -tubulin and response to in vitro treatment with triclabendazole. *Parasitology* 2002; 124: 325-38.
4. Brophy PM, Barret J. Glutathione transferase in helminths. *Parasitology* 1990; 100: 345- 49.
5. Brophy PM, Pichard DI. Parasitic helminth glutathione S-transferases: An update on their potential as targets for immunotherapy and chemotherapy. *Experimental Parasitology* 1994; 79: 89-96.

Figura 4. Alineaciones de aminoácidos de GST de *F. hepatica* susceptibles a TCBZ (cepa *Cullompton*) y resistentes al (cepa *Sligo*) TCBZ comparadas con *F. hepatica* de ovinos, bovinos y cerdos provenientes de las respectivas secuencias de cDNA. El sombreado claro indica las diferencias dentro de las secuencias en la enzima GST que muestra el cambio de un aminoácido en la isoenzima GST de la cepa TCBZ-resistente. Para GenBank números de acceso de secuencias de cDNA ver texto

```

>GST sensible
LGYWKIRGLQQPVRLLLEYLGE EYEEHLYGRDDREK WFGDKFNMGLDLPNLPYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMLGSTPEERARIS-
MIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKGDY LKELPTTLKMWSDFLGDRHYLTGSTVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLED FPKLKEFK-
SRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSWIASFGGGDA
>GST bovino
LGYWKIRGLQQPVRLLLEYLGE EYEEHLYGRDDREK WFGDKFNMGLDLPNLPYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMLGSTPEERARIS-
MIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKGDY LKELPTTLKMWSDFLGDRHYLTGSTVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLED FPKLKEFK-
SRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSWIASFGGGDA
>GST ovino
LGYWKIRGLQQPVRLLLEYLGE EYEEHLYGRDDREK WFGDKFNMGLDLPNLPYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMLGSTPEERARIS-
MIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKGDY LKELPTTLKMWSDFLGDRHYLTGSTVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLED FPKLKEFK-
SRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSWIASFGGGDA
>GST cerdo
LGYWKIRGLQQPVRLLLEYLGE EYEEHLYGRDDREK WFGDKFNMGLDLPNLPYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMLGSTPEERARIS-
MIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKGDY LKELPTTLKMWSDFLGDRHYLTGSTVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLED FPKLKEFK-
SRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSWIASFGGGDA
>GST resistente
CQPKLGYWKIRGLQQPVRLLLEYLGE EYEEHLYGRDDREK WFGDKFNMGLDLPNLPYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMLGST-
PEERARIS MIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKGDY LKELPTTLKMWSDFLGDRHYLTGSSVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLE-
DFPKLKEFKSRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSWIASFGGGDAD

GST sensible      ---LGYWKIRGLQQPVRLLLEYLGE EYEEHLYGRDDREK WFGDKFNMGLDLPNLPYYID 56
GST bovino        ---LGYWKIRGLQQPVRLLLEYLGE EYEEHLYGRDDREK WFGDKFNMGLDLPNLPYYID 56
GST ovino         ---LGYWKIRGLQQPVRLLLEYLGE EYEEHLYGRDDREK WFGDKFNMGLDLPNLPYYID 56
GST cerdo         ---LGYWKIRGLQQPVRLLLEYLGE EYEEHLYGRDDREK WFGDKFNMGLDLPNLPYYID 56
GSTresistente    CQPKLGYWKIRGLQQPVRLLLEYLGE EYEEHLYGRDDREK WFGDKFNMGLDLPNLPYYID 60
                  *****

GSTsensible      DKCKLTQSVAIMRYIADKHGMLGSTPEERARISMIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKG 116
GST bovino       DKCKLTQSVAIMRYIADKHGMLGSTPEERARISMIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKG 116
GST ovino        DKCKLTQSVAIMRYIADKHGMLGSTPEERARISMIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKG 116
GST cerdo        DKCKLTQSVAIMRYIADKHGMLGSTPEERARISMIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKG 116
GST resistente   DKCKLTQSVAIMRYIADKHGMLGSTPEERARISMIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKFEEVKG 120
                  *****

GSTsensible      DY LKELPTTLKMWSDFLGDRHYLTGSTVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLED FPKLKEFK 176
GST bovino       DY LKELPTTLKMWSDFLGDRHYLTGSTVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLED FPKLKEFK 176
GST ovino        DY LKELPTTLKMWSDFLGDRHYLTGSTVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLED FPKLKEFK 176
GST cerdo        DY LKELPTTLKMWSDFLGDRHYLTGSTVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLED FPKLKEFK 176
GSTresistente    DY LKELPTTLKMWSDFLGDRHYLTGSSVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLED FPKLKEFK 180
                  *****

GSTsensible      SRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSWIASFGGGDA- 211
GST bovino       SRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSWIASFGGGDA- 211
GST ovino        SRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSWIASFGGGDA- 211
GST cerdo        SRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSWIASFGGGDA- 211
GSTresistente    SRIEDLPKIKAYMESEKFIKWPLNSWIASFGGGDAD 216
                  *****
    
```

6. Knox DP. Parasite enzymes and the control of roundworm and fluke infestation in domestic animals. *British Veterinary Journal* 1994; 150: 319–37.

7. Scarcella S, Lamenza P, Virkel G, Solana H. Expression differential of microsomal and cytosolic glutathione-S-transferases in *Fasciola hepatica* resistant at triclabendazole. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2012; 181(1): 37–9.

8. Olaechea F. Red de helmintología de FAO para América Latina y el Caribe. Conferencia electrónica. 2004. En: www.pdfio.net/k-988641.html, consultado en mayo 2014.