



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

EFECTO DE LAS PARTÍCULAS TiO_2
CONJUGADAS CON EL NANOCUERPO
ANTI-Fas2 EN LA VIABILIDAD Y
PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DE
PARÁSITOS ADULTOS DE
Fasciola hepatica

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

MABEL PATRICIA PEREDA SALGUERO

LIMA – PERÚ

2025

ASESOR

DR. JOSE RONALD ESPINOZA BABILON

COASESORA

DRA. ROSA PATRICIA HERRERA VELIT

JURADO DE TESIS

PRESIDENTE:

DRA. MANUELA RENEE VERASTEGUI PIMENTEL

VOCAL:

DR. LUIS JULIO CESAR DE STEFANO BELTRAN

SECRETARIO:

DR. WILFREDO EVANGELISTA FALCON

DEDICATORIA

A mis padres, José Pereda y Elisa Salguero, por su amor y apoyo incondicional en cada paso. Este logro también es de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis asesores, Dr. José Espinoza y Dra. Patricia Herrera, por su guía científica y apoyo constante.

Al Dr. Marcos Milla y la Dra. María Goñi, por haberme brindado la beca para estudiar la maestría en una prestigiosa universidad como Cayetano Heredia; agradezco su generoso acto conmigo y con mis compañeros.

Al Dr. Hugo Alarcón, por su ayuda para utilizar los equipos de DLS y FTIR, fundamentales para la caracterización de mis partículas.

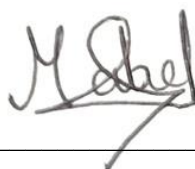
A Yerson Buiza, quien me enseñó la perseverancia, me orientó con paciencia y me brindó sus conocimientos. A Jenniffer Espinoza, por el asesoramiento y la ayuda brindada. A Águeda, por transmitirme sus conocimientos con paciencia y por su amistad. A Henry, con quien iba al camal y quien me enseñó a hacer mis primeros ELISAs.

A la Unidad de Biotecnología Molecular y Señalización Celular del LID-UPCH, por facilitar el desarrollo experimental. Siempre recordaré con cariño los años que pasé ahí aprendiendo e investigando.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por los doctores Marco Milla y María Goñi, fundadores de la Beca Milla-Goñi (2021).

DECLARACIÓN DEL AUTOR			
FECHA	12	DICIEMBRE	2025
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	MABEL PATRICIA PEREDA SALGUERO		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRIA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2021-I		
TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	EFECTO DE LAS PARTÍCULAS TiO_2 CONJUGADAS CON EL NANOCUERPO ANTI-Fas2 EN LA VIABILIDAD Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DE PARÁSITOS ADULTOS DE <i>Fasciola hepatica</i>		
MODALIDAD DEL TRABAJO DE GRADO	TESIS		
Declaración del autor La presente Tesis es un Trabajo de Investigación de Grado original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
TELÉFONO DE CONTACTO	936549354		
E-MAIL	mabel.pereda.s@upch.pe		



Firma del egresado

DNI 60736654

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. OBJETIVOS.....	19
III. MARCO TEÓRICO	20
3.1 Ciclo biológico de <i>F. hepatica</i>	20
3.2 Impacto de la fascioliasis en la industria ganadera	22
3.3 Impacto de la fascioliasis en la salud pública.....	23
3.4 Tratamiento de la fascioliasis	24
3.5 Resistencia de <i>F. hepatica</i> a TCBZ.....	26
3.6 Cisteína proteasas de <i>F. hepatica</i>	28
3.7 Nanocuerpos (VHHs).....	30
3.8 Obtención de VHHs recombinantes	33
3.9 Dióxido de titanio.....	34
3.10 Toxicidad del TiO ₂	37
3.11 Conjugación de partículas a proteínas/anticuerpos	38
3.12 Caracterización de partículas conjugadas a proteínas	39
IV. METODOLOGÍA.....	40
4.1 Tipo de estudio	40
4.2 Diseño del estudio	40
4.3 Materiales	41
4.3.1 Químicos.....	41
4.3.2 Biológicos	41
4.4 Procedimiento.....	42
4.4.1 Selección de los VHHs anti-Fas2	42
4.4.2 Producción de los VHHs anti-Fas2	46
4.4.3 Medición de la afinidad de los VHHs	49
4.4.4 Conjugación del VHH7 a las nanopartículas de TiO ₂	50
4.4.5 Caracterización del conjugado TiO ₂ -VHH7.....	53
4.4.6 Establecimiento de las condiciones para el ensayo in vitro en <i>F. hepatica</i>	55

4.4.7	Ensayo final en <i>F. hepatica</i>	59
4.5	Análisis estadístico	60
V.	RESULTADOS.....	61
5.1	Purificación de Fas2	61
5.2	Tamizaje de la librería de cDNA de VHHs de una alpaca inmunizada con E/S y análisis de secuencia	62
5.3	Clonación, expresión y purificación de los VHHs	67
5.4	Medición de la afinidad de los VHHs	72
5.5	Conjugación del VHH7 a las partículas de TiO ₂	75
5.6	Caracterización del conjugado TiO ₂ -VHH7.....	79
5.7	Efecto del conjugado en la viabilidad y generación de peroxidación lipídica en <i>F. hepatica</i>	83
5.7.1	Evaluación del tiempo del tiempo de incubación de <i>F. hepatica</i> con el conjugado	83
5.7.2	Evaluación de la concentración del conjugado en la viabilidad y peroxidación lipídica de <i>F. hepatica</i>	85
5.7.3	Prueba final.....	87
VI.	DISCUSIONES.....	90
VII.	CONCLUSIONES.....	102
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
IX.	ANEXOS.....	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios para la selección de las <i>F. hepatica</i> utilizadas en los ensayos. .41	41
Tabla 2. Reacción de actividad enzimática de las fracciones de la purificación. ...43	43
Tabla 3. Condiciones para la purificación de los VHHs recombinantes49	49
Tabla 4. Ratios de TiO ₂ -VHH7 utilizados en la conjugación.51	51
Tabla 5. Grupos para la evaluación del tiempo de incubación (2 y 6 horas) del conjugado antes de la exposición a luz UV56	56
Tabla 6. Preparación de la curva estándar de MDA57	57
Tabla 7. Grupos para evaluar el efecto de la concentración del conjugado sobre la motilidad y peroxidación lipídica58	58
Tabla 8. Grupos para evaluar el efecto del conjugado en la motilidad (n=12) y peroxidación lipídica (n=6) de las <i>F. hepatica</i>59	59
Tabla 9. Segundo Phage ELISA de las clonas positivas.....65	65
Tabla 10. Porcentaje de identidad y similitud entre las regiones CDRs y FRs del VHH3 y VHH7.....66	66
Tabla 11. Parámetros fisicoquímicos de los residuos de aminoácidos del CDR3 del VHH7 y VHH3.....66	66
Tabla 12. Rendimiento de producción de los VHHs.....72	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Fasciola spp</i>	21
Figura 2. Anticuerpos IgG convencionales, anticuerpos de cadena pesada y VHHs.....	31
Figura 3. Estructura de los VH/VHH.....	32
Figura 4. Proceso de producción de VHHs.....	33
Figura 5. Estructuras de las formas cristalinas del TiO ₂	35
Figura 6. Mecanismo de fotocatalisis del TiO ₂	36
Figura 7. Flujograma de trabajo	40
Figura 8. Purificación de Fas2 de <i>F. hepatica</i>	61
Figura 9. Screening de la librería de VHHs	64
Figura 10. Perfil de hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos	66
Figura 11. Representación en estado New Cartoon de la estructura tridimensional de los VHHs.	67
Figura 12. Electroforesis del producto de PCR de los VHHs.....	69
Figura 13. Electroforesis de la digestión enzimática del producto de PCR de los VHH.....	69
Figura 14. Electroforesis del producto de digestión del vector pET22b.....	70
Figura 15. Electroforesis de la PCR colony.	70
Figura 16. Expresión y purificación del VHH7.	71
Figura 17. Expresión y purificación del VHH3	71
Figura 18. Western Blot para evaluar el reconocimiento a Fas2	73
Figura 19. Plot de Scatchard del VHH7.....	74
Figura 20. Plot de Scatchard del VHH3.....	74
Figura 21. Eficiencia de conjugación del VHH7 a las nanopartículas de TiO ₂	77
Figura 22. Curva de saturación del VHH7 unido al TiO ₂	77
Figura 23. SDS-PAGE de la conjugación con diferentes ratios TiO ₂ :VHH7.....	78
Figura 24. Espectroscopia de adsorción del TiO ₂ sin conjugar y del conjugado TiO ₂ - VHH7.	78
Figura 25. Estabilidad del conjugado en medio de cultivo RPMI	81
Figura 26. Caracterización de la funcionalidad del conjugado TiO ₂ -VHH7 en el reconocimiento de Fas2.....	81
Figura 27. Concentración de TiO ₂ y producción de H ₂ O ₂	82
Figura 28. Tiempo de exposición a luz ultravioleta y producción de H ₂ O ₂	82
Figura 29. Efecto del tiempo de incubación de <i>F. hepatica</i> con el conjugado antes de la exposición a la luz UV.....	84
Figura 30. Ensayo in vitro con diferentes concentraciones de TiO ₂ . 86	
Figura 31. Efecto del conjugado TiO ₂ -VHH7 en el movimiento y la peroxidación lipídica de parásitos adultos de <i>F. hepatica</i>	89

RESUMEN

La fascioliasis es una zoonosis parasitaria que representa un problema de salud pública y de sanidad animal. A nivel mundial, se ha reportado la emergencia de cepas de *Fasciola hepatica* resistentes a antihelmínticos, lo que resalta la necesidad de desarrollar de nuevas alternativas terapéuticas. Las partículas de dióxido de titanio (TiO₂) generan especies reactivas de oxígeno bajo irradiación ultravioleta (UV), lo que ha motivado su estudio frente a bacterias, hongos, virus y parásitos. Fas2 es una cisteína proteinasa expresada por *F. hepatica*, esencial para su supervivencia en el hospedero definitivo. Se evaluó el efecto de las partículas de TiO₂ conjugadas con nanocuerpos anti-Fas2 en *F. hepatica in vitro*. El trabajo se desarrolló en tres etapas: (i) producción de un nanocuerpo (VHH) de alta afinidad por Fas2 en *Escherichia coli*, (ii) conjugación del VHH con nanopartículas de TiO₂ y (iii) evaluación de la motilidad y la peroxidación lipídica de *F. hepatica*. Se obtuvo el VHH7 con un rendimiento de 50 mg/L y una constante de disociación (K_d) de 5.09 nM. La conjugación del VHH7 con TiO₂ tuvo una eficiencia del 65.3 % y produjo un conjugado de 711.2 nm. Los especímenes de *F. hepatica* tratados con el conjugado TiO₂-VHH7 en combinación con luz UV presentaron mayor producción de MDA que los expuesto únicamente a luz UV, con un incremento del 27% a las 12 horas ($p < 0.001$) y del 9% a las 24 horas ($p < 0.05$). Asimismo, se observó una reducción significativa de la motilidad respecto a su control UV, con una disminución del 17% a las 12 horas ($p < 0.01$) y del 24% a las 24 horas ($p < 0.01$). En conclusión, el conjugado TiO₂-VHH7 mostró un efecto fotoletal sobre *F. hepatica* adulta, evidenciado por el aumento del estrés oxidativo y la reducción de la motilidad.

PALABRAS CLAVE: Fascioliasis, *Fasciola hepatica*, Triclabendazol, Nanocuerpo, VHH, Nanopartícula, Dióxido de titanio.

ABSTRACT

Fascioliasis is a parasitic zoonosis that represents a significant public and animal health problem. Worldwide, the emergence of *Fasciola hepatica* strains resistant to anthelmintics has been reported, highlighting the urgent need to develop new therapeutic alternatives. Titanium dioxide (TiO₂) particles generate reactive oxygen species under ultraviolet (UV) irradiation, which has prompted their study against bacteria, fungi, viruses, and parasites. Fas2 is a cysteine proteinase expressed by *F. hepatica* and is essential for parasite survival in the definitive host. This study evaluated the effect of TiO₂ nanoparticles conjugated with anti-Fas2 nanobodies on adult *F. hepatica* cultured *in vitro*. The work was conducted in three stages: (i) production of a high-affinity nanobody (VHH) against Fas2 in *Escherichia coli*, (ii) conjugation of the VHH with TiO₂ nanoparticles, and (iii) assessment of *F. hepatica* motility and lipid peroxidation. VHH7 was obtained with a yield of 50 mg/L and a dissociation constant (K_d) of 5.09 nM. Conjugation of VHH7 with TiO₂ showed an efficiency of 65.3% and produced a conjugate of 711.2 nm. *F. hepatica* specimens treated with the TiO₂-VHH7 conjugate under UV light exhibited higher MDA production compared to those exposed only to UV light, with increases of 27% at 12 h ($p < 0.001$) and 9% at 24 h ($p < 0.05$). Moreover, a significant reduction in motility was observed compared to the UV control, with decreases of 17% at 12 h ($p < 0.01$) and 24% at 24 h ($p < 0.01$). In conclusion, the TiO₂-VHH7 conjugate exerted a photolethal effect on adult *F. hepatica*, evidenced by increased oxidative stress and reduced motility.

KEYWORDS: Fascioliasis, *Fasciola hepatica*, Triclabendazole, Nanobody, VHH, Nanoparticle, Titanium dioxide.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La fascioliasis es una enfermedad parasitaria causada principalmente por dos especies de trematodos, *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*, conocidas como “gusanos del hígado” (1). El ciclo de vida de estos parásitos se desarrolla en los caracoles del género *Lymnaea* que actúa como hospedero intermediario, y en los animales de ganado y el hombre como hospederos definitivos, que se infectan al ingerir agua o plantas contaminadas con metacercarias, la forma infectiva del parásito (2).

F. hepatica presenta una distribución amplia a nivel mundial, excepto en la Antártida, mientras que *F. gigantica* se distribuye en África y Asia (3). La propagación de *F. hepatica* asociada a la colonización de nuevos nichos por el caracol hospedero intermediario está influenciada por cambios ambientales, prácticas agrícolas y factores socioeconómicos, especialmente donde se crían ovejas o ganado vacuno en zonas templadas y tropicales; se han reportado infecciones humanas en Europa, Oriente Medio, Latinoamérica, Asia, África y raramente en Australia (4-6). Las poblaciones rurales de los países en desarrollo son vulnerables debido al contacto con el ganado y la dependencia de fuentes de agua sin tratar (7).

En el caso de fascioliasis humana, se estima que hay entre 2.4 y 17 millones de personas infectadas con este parásito a nivel global, y 91.1 millones se encuentran en riesgo de adquirir la infección (1). En los países andinos como Perú, Ecuador, y Bolivia la fascioliasis humana se encuentran regiones andinas donde la infección es endémica. En el 2012, se encontró un 70 % de prevalencia de infección por *F. hepatica* en niños en la región de Paucartambo-Cusco (9). En el 2019, se encontró tasas de infección entre 0 y 20 % en las comunidades rurales de la provincia de Anta-Cusco (10). Un análisis geoespacial identificó áreas de mayor y menor prevalencia de fascioliasis en la provincia de Anta, asociando la contaminación ambiental con heces de ganado y la presencia de niños infectados en hogares rurales (11).

En la actividad ganadera, la fascioliasis provoca pérdidas económicas millonarias debido al decomiso de hígados, la disminución de la producción de leche, carne, y fertilidad del ganado, etc. (12-14). En una prospección de la prevalencia de la infección en camales el 2005, se encontró que *F. hepatica* está presente en 21 de los 24 departamentos del Perú, el número de hígados decomisados ese año representó el 18 % del total de animales sacrificados en mataderos que estaban bajo inspección del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA); La fascioliasis vacuna está presente en todos los departamentos andinos (8) y aquellos con mayor prevalencia de hígados decomisados fueron Apurímac con 80.1 % y Cajamarca con 67.9 % (8).

Las manifestaciones clínicas asociadas con la infección por *F. hepatica* en rumiantes varía según el hospedero y la fase de la enfermedad. Los animales infectados pueden presentar signos clínicos como anemia, distensión abdominal, hepatomegalia y pérdida de peso, los cuales variaban dependiendo de la carga parasitaria (15).

Desde su introducción en la década de 1980, el triclabendazol (TCBZ) ha sido el tratamiento de elección de la fascioliasis debido a su alta eficacia en la eliminación de *Fasciola spp.* en diversas especies ganaderas (16). Además, en el 2019 la FDA aprobó su uso en humanos ya que es efectivo contra los diferentes estadios del parásito (17). Sin embargo, en diferentes regiones del mundo se han encontrado casos de resistencia al triclabendazol y otros antihelmínticos usados en el tratamiento de la fascioliasis tanto en humanos como en animales (18,19). La resistencia a TCBZ es un problema creciente y multifactorial y está relacionado con el uso descontrolado de TCBZ, dosis excesivas o subdosificación y la falta de diagnóstico preciso (20).

El control de la fascioliasis es esencial para proteger la salud humana y mejorar la productividad animal. Se requieren estrategias integradas que combinen el uso racional de fármacos, el manejo ambiental y la investigación en nuevas alternativas terapéuticas para enfrentar la resistencia del parásito y reducir su impacto global.

1.2 Planteamiento del problema

La infección por *F. hepatica* tiene un alto impacto en la productividad y reproducción en la ganadería, ocasionando pérdidas económicas considerables (12, 13). El ganado infectado presenta una disminución en la ganancia de peso comprometiendo la producción de carne, pérdida de los hígados infectados, menor producción de leche y lana, y en casos severos, la muerte (14). No sólo se ve afectada la economía agrícola, sino también la seguridad alimentaria, especialmente en regiones donde la ganadería es una fuente primaria de sustento (21).

La fascioliasis es considerada por la Organización Mundial de la salud como una enfermedad desatendida porque es una enfermedad asociada a la pobreza y no recibe la atención debida por los sistemas de salud en los países con regiones de alta endemicidad de la infección y actualmente hay insuficientes datos de su prevalencia mundial (22). En el Perú, la fascioliasis es endémica en la costa, sierra y ocasionalmente en la Amazonía. La infección humana ha sido reportada en 18 regiones y la infección animal en 21 de las 24 regiones, indicando que la infección tiene una alta distribución en el país y un alto riesgo de transmisión a humanos (8).

F. hepatica ha desarrollado resistencia a TCBZ, que es la droga principal para el tratamiento de la fascioliasis animal y el único fármaco disponible para tratar la fascioliasis humana (18). La resistencia a TCBZ representa una amenaza seria a la salud pública y la sanidad animal, ya que ocasiona la persistencia de la infección de manera crónica y aumenta la capacidad de transmisión en humanos y animales,

perpetuando el ciclo de la enfermedad, principalmente en zonas endémicas (23). Esto resalta la necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

1.3 Justificación

La emergencia de resistencia a TCBZ en *F. hepatica*, que representa una amenaza a la sanidad animal y la salud pública, justifica la investigación dirigida a la búsqueda de tratamientos nuevos para la fascioliasis animal, ya que el ganado es el principal hospedero implicado en la transmisión y alta prevalencia de la infección en las zonas endémicas de fascioliasis animal y humana.

La funcionalización de partículas de compuestos metálicos de baja toxicidad con actividad catalítica tiene antecedentes en la formulación de agentes para el tratamiento de enfermedades. En el presente estudio se investiga las partículas de dióxido de titanio (TiO_2) que presentan propiedades fotocatalíticas de generación de especies reactivas de oxígeno bajo irradiación de luz ultravioleta (UV) (24). Las partículas de TiO_2 han mostrado actividad antimicrobiana contra diferentes agentes patógenos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, hongos patógenos como *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, virus como SARS-COV2 y H1N1, parásitos como *Plasmodium falciparum* y *Leishmania*, etc. (25-30).

Aunque no hay estudios sobre el efecto de las nanopartículas de TiO_2 en el parásito adulto *F. hepatica*, investigaciones con de óxido de zinc (ZnO) y óxido de cobre

(CuO) muestran que las nanopartículas inducen estrés oxidativo y daño al DNA, lo que afecta la movilidad y supervivencia de los parásitos *in vitro* (31).

El presente estudio propone la funcionalización de partículas de TiO₂ con fragmentos de anticuerpos de cadena única de alpacas (VHHs) que otorguen la capacidad de direccionar la partícula de TiO₂ al parásito para desplegar *in situ* su efecto de stress oxidativo causado por las especies reactivas que genera por irradiación UV.

Los VHHs (o nanocuerpos) son dominios de anticuerpos de camélidos que se producen de manera recombinante, tienen una alta afinidad y especificidad hacia sus antígenos diana (32). Fas2 es la catepsina L1 de *F. hepatica* altamente expresada por el parásito y es el antígeno inmunodominante por lo que es utilizada para diagnóstico (33). La catepsina L1 participa en la digestión de proteínas para la supervivencia y desarrollo del parásito en el hospedero definitivo (34). Al conjugar un VHH anti Fas2 con TiO₂, se podría generar un sistema terapéutico que combine la acción fotocatalítica del TiO₂ con la alta especificidad del VHH, proporcionando un tratamiento dirigido y altamente eficaz contra los parásitos.

1.4 Pregunta de investigación

¿Qué efectos tienen las partículas de TiO₂ conjugadas con un VHH anti-Fas2 sobre la viabilidad y el estrés oxidativo en *Fasciola hepatica*?

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Determinar el efecto de las partículas de TiO_2 conjugadas con un VHH anti- Fas2 sobre la viabilidad y el estrés oxidativo en *F. hepatica* adultas mantenidas en cultivos *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar VHHs anti-Fas2 mediante el screening de una biblioteca de VHHs anti- Fas2
- Producir los VHHs anti-Fas2 en *E. coli* BL21.
- Seleccionar el VHH anti-Fas2 con mayor afinidad.
- Conjugar el VHH anti-Fas2 a las partículas de TiO_2 .
- Caracterizar el conjugado TiO_2 -VHH
- Evaluar el efecto del fototratamiento con el conjugado TiO_2 -VHH sobre la viabilidad de *F. hepatica* adultas en cultivos *in vitro* y compararlo con su grupo control.
- Cuantificar los niveles de malondialdehído en *F. hepatica* adultas después del fototratamiento con el conjugado TiO_2 -VHH y compararlo con su grupo control.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Ciclo biológico de *F. hepatica*

El ciclo biológico de *F. hepatica* se desarrolla en un hospedero definitivo, generalmente un mamífero herbívoro y un hospedero intermediario, un caracol del género *Lymnaea* (2). Los parásitos adultos residen en los conductos biliares del hospedero definitivo, donde se reproducen mediante autofecundación o fecundación cruzada, produciendo huevos que son almacenados en la vesícula biliar y excretados al ambiente con las heces (35). En contacto con agua dulce, los huevos eclosionan y liberan el miracidio, una forma ciliada que nada activamente hasta encontrar un hospedero intermediario, el caracol (36).

Dentro del caracol, el miracidio se transforma en un esporocisto, en cuyo interior se desarrollan las redias (2). Estas, a su vez, producen células germinales que se diferencian en cercarias. Las cercarias emergen del caracol, nadan hasta adherirse a superficies vegetales acuáticas, pierden su cola y se enquistan, formando las metacercarias, que son la forma infectiva del parásito (37).

La infección del hospedero definitivo ocurre al ingerir vegetales acuáticos contaminados con metacercarias, como berros, lechuga, alfalfa, o al consumir agua contaminada con metacercarias (35). Tras la ingestión, las metacercarias se desenquistan en el duodeno bajo la acción de la bilis y el jugo digestivo. Posteriormente, las formas juveniles perforan la pared intestinal, migran a través de la cavidad peritoneal y el parénquima hepáticos hacia los conductos biliares (36).

El parásito penetra la cápsula de Glisson y migra a través del parénquima hepático, alimentándose del tejido hepático hasta alcanzar los conductos biliares, donde completa su desarrollo, alcanza la madurez sexual e inicia la producción de huevos que son liberados y excretados con las heces (37).

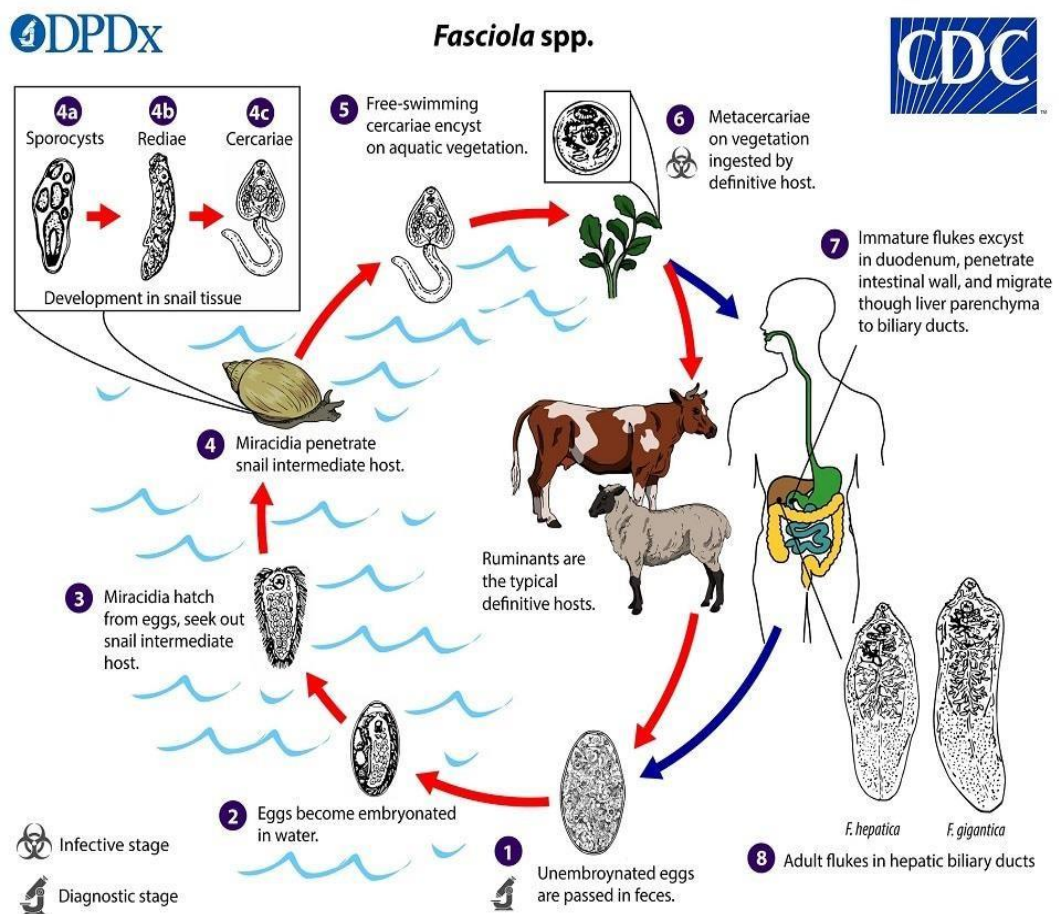


Figura 1. Ciclo biológico de *Fasciola* spp. Fuente: Centers for Disease Control and Prevention (37).

3.2 Impacto de la fascioliasis en la industria ganadera

La fascioliasis es una enfermedad parasitaria con un impacto significativo tanto en la industria ganadera como en la salud pública. En el ámbito ganadero, esta parasitosis causa pérdidas económicas por el decomiso de los hígados, reducción en la producción de carne, leche y lana, y los costos correspondientes a los tratamientos.

Los daños hepáticos causados por *Fasciola spp.*, particularmente en bovinos, ovinos y caprinos, pueden llevar al desecho de hígados en mataderos (38). A nivel mundial, las pérdidas anuales superan los 2,000 millones de dólares en el sector agrícola (38). En el Perú, se estima no menos de 50 millones de dólares de pérdidas anuales, solo considerando la prevalencia de la infección y los decomisos de hígados (8). La parasitosis reduce el peso de los animales, disminuyendo en un 10 % a 15 % el peso vivo de bovinos infectados, y puede bajar la producción de leche hasta en un 20 %, lo que tiene un impacto directo en la rentabilidad (39,40).

3.3 Impacto de la fascioliasis en la salud pública

En el ámbito de la salud pública, la fascioliasis afecta aproximadamente a 18 millones de personas en más de 70 países, con una población de riesgo de más de 180 millones, según la OMS (41,42). La enfermedad es endémica en regiones de América Latina, Asia y África, donde las condiciones de saneamiento, las prácticas agrícolas y la dependencia de fuentes de agua no tratada favorecen su transmisión (18).

En humanos, la fascioliasis puede provocar cuadros agudos y crónicos. La fase aguda está asociada con fiebre, dolor abdominal y hepatomegalia, mientras que la fase crónica puede desencadenar complicaciones graves como colangitis, fibrosis hepática e incluso insuficiencia hepática. Estas complicaciones generan costos adicionales para los sistemas de salud en zonas endémicas, debido a hospitalizaciones, diagnósticos especializados y tratamientos prolongados (8).

Por estas razones, la fascioliasis no sólo representa un desafío veterinario, sino también un problema de salud pública que requiere estrategias integrales para su control. Estas incluyen el desarrollo de programas de vigilancia epidemiológica, educación sanitaria en comunidades rurales y el uso de fármacos antiparasitarios eficaces.

3.4 Tratamiento de la fascioliasis

El tratamiento de la fascioliasis en animales se centra en el uso de fármacos antiparasitarios que actúan contra las formas juveniles y adultas del parásito. Entre los principios activos más utilizados en la ganadería se encuentran el triclabendazol, el clorsulón, y la rafoxanida, cada uno con características particulares en cuanto a eficacia y espectro de acción (23).

Triclabendazol (TCBZ)

Es un medicamento antihelmíntico desarrollado por Novartis y es derivado de la familia de los benzimidazole ya que se está compuesto por un anillo benceno y un anillo de imidazol. Es la droga más utilizada porque actúa sobre las formas juveniles y adultas de *F. hepatica* (43). Este medicamento actúa interfiriendo con el metabolismo del parásito, inhibiendo la polimerización de la tubulina y el transporte de glucosa, lo que lleva a la muerte del parásito (44). Es el único fármaco que muestra eficacia superior al 90 % frente a las formas juveniles y adultas (43). Sin embargo, se ha producido resistencia a nivel mundial, especialmente en regiones de uso intensivo, como Australia, Reino Unido y América Latina (23).

Clorsulón

Es un fármaco perteneciente al grupo de las sulfonamidas, es altamente eficaz contra las formas adultas de *F. hepatica* y tiene una actividad limitada contra la forma juvenil. El clorsulón inhibe las enzimas del metabolismo de la glucosa del

parásito, como la fosfoglicerato quinasa y la fosfoglicerato mutasa, bloqueando la producción de energía, comprometiendo las funciones vitales del parásito y conduciendo a su muerte (45).

Rafoxanida

Pertenece al grupo de las salicilanilidas que actúa como un desacoplador de la fosforilación oxidativa en los trematodos, interfiriendo en el metabolismo energético. Este fármaco tiene una alta eficacia contra las formas adultas de *Fasciola spp.* y una eficacia limitada contra sus formas juveniles. Se ha reportado resistencia a este fármaco (47,48).

3.5 Resistencia de *F. hepatica* a TCBZ

Se ha reportado resistencia de *F. hepatica* a los fármacos antihelmínticos a nivel mundial. Los reportes de casos de resistencia son mayores a TCBZ en comparación con otros fármacos antiparasitarios. Para el TCBZ, se considera resistencia cuando la eficacia del fármaco es menor al 90%. La eficacia se calcula mediante el conteo de huevos por gramo de heces del parásito (hpg) antes y veintiún días después del tratamiento (23).

En 2020, se reportó un caso de resistencia al TCBZ en Australia. Vacas de tres granjas infectadas con *Fasciola* fueron tratadas con 12 mg/kg de TCBZ. Al evaluar la eficacia del tratamiento 21 días después, se encontró que la eficacia fue de solo 2 % en una granja, 47 % en otra y 59 % en la tercera (49). De manera similar, en Inglaterra y Gales, se ha documentado resistencia al tratamiento con 10 mg/kg de TCBZ en 21 de 74 granjas de ovejas (50).

En Cajamarca, en el año 2013 se reportó resistencia a TCBZ, once vacas infectadas con metacercarias fueron tratadas con 12 mg/kg de TCBZ, se encontró una eficacia promedio de 31.05 % y 13.63 % al día catorce y treinta después del tratamiento, respectivamente. Asimismo, seis ovejas fueron infectadas experimentalmente con metacercarias y ciento seis días después se confirmó la infección. Las ovejas fueron tratadas con una dosis de 10 mg/kg de TCBZ y quince días después se sacrificaron y se examinaron los hígados. Se determinó que el tratamiento tuvo una eficacia de 25.2 % (51).

En 2019, se realizó una investigación en el fundo “La victoria-Universidad Nacional de Cajamarca”; 60 vacunos hembras que habían sido confirmados con fasciolosis se dividieron en 4 grupos y se trataron con nitroxinil 10 mg/kg, clorsulón 2 mg/kg, TCBZ 12 mg/kg y closantel 10 mg/kg. La eficacia en el día 30 fue 78 % con TCBZ y 100 % con nitroxinil, clorsulón y closantel (52).

También se ha reportado resistencia a otros fármacos; en 2014, se encontró una eficacia en la reducción de huevos de 68 % con el tratamiento de ABZ 7.5 mg/kg vía oral, 97.06 % con TCBZ 10 mg/kg vía oral, 44.91 % con clorsulón 2 mg/kg y 95 % con ABZ 3.75 mg/kg más clorsulón 1 mg/kg en ovejas de la provincia de León-España (53). En 2015, se administró ivermectina más closantel en tres granjas de ganado vacuno y se obtuvo una eficacia de 72%, 97% en dos granjas, mientras que en la tercera granja no se observó reducción en la cantidad de huevos después del tratamiento (54).

3.6 Cisteína proteasas de *F. hepatica*

Las cisteínas proteasas son enzimas hidrolíticas que desempeñan un papel esencial en la fisiología y la patogénesis de parásitos helmintos, incluidas las especies del género *Fasciola* (55). Estas enzimas catalizan la degradación de proteínas mediante la ruptura de enlaces peptídicos, utilizando un mecanismo dependiente de un residuo de cisteína en el sitio activo (55). Las cisteínas proteinasas de *F. hepatica* son enzimas claves para la supervivencia del parásito durante la infección, ya que participan en los procesos de evasión del sistema inmunológico, migración a través de los tejidos, nutrición del parásito en el hospedero (56).

Las cisteínas proteasas de *F. hepatica* se clasifican en la familia de las catepsinas, se dividen en diferentes tipos de acuerdo con su secuencia, filogenia, función y expresión durante las etapas del ciclo de vida del parásito (57). Las principales clases de cisteína proteasas en *F. hepatica* son la catepsina L y B, sus isoformas son expresadas y secretadas diferencialmente durante diferentes etapas del ciclo de vida del parásito (58).

Las catepsinas L son las cisteínas proteinasas más abundantes en *F. hepatica*; en el parásito juvenil se producen en las glándulas secretoras, situadas en la región anterior del cuerpo del parásito, cerca de la ventosa oral, desde donde son liberadas durante la migración del parásito juvenil. En los parásitos adultos se encuentran en el intestino ciego, donde degradan moléculas como hemoglobina y albúmina, esenciales para su nutrición (55).

Las cisteínas proteinasas de la clase catepsinas B son producidas por las formas juveniles y adultas de *F. hepatica*, las catepsinas B están en los lisosomas y se encargan en la degradación de proteínas, activación de zimógenos, etc. También están presentes en el tegumento, contribuyendo a su remodelación y adaptación al entorno del hospedero (59,60).

La proteína Fas2 es una cisteína proteinasa catepsina L de 25 kDa expresada en grandes cantidades en los productos de excreción/secreción de *F. hepatica* en estadio adulto (33). Fas2 es una proteína altamente inmunogénica por lo que es utilizada en el desarrollo de pruebas serológicas para el diagnóstico de fascioliasis humana y animal (61). Fas2 es una enzima clave en la supervivencia del parásito y ha sido propuesta como un blanco potencial para el desarrollo de terapias y vacunas contra *F. hepatica*.

3.7 Nanocuerpos (VHHs)

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas producidos por los linfocitos B que forman parte del sistema de inmune y que se producen frente a la infección por virus, bacterias, parásitos, y amenaza de células transformadas causantes de cáncer (62). En el organismo se producen diferentes tipos de anticuerpos como Inmunoglobulina G (IgG), IgM, IgA, IgE e IgD que cumplen diferentes roles de defensa en la respuesta inmunitaria. La inmunoglobulina G (IgG) es el anticuerpo más abundante en la sangre en los mamíferos, son proteínas de ~150 kDa y están conformadas por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas unidas mediante puentes disulfuro. Las cadenas pesadas tienen tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3) y un dominio variable (VH), en tanto, las cadenas ligeras presentan un dominio constante (CL) y otro variable (VL) (63).

A principios de 1990, se descubrió que las especies de la familia Camelidae producen además de las IgG, otros subtipos de anticuerpos IgG de cadena única pesada (subtipos IgG2 e IgG3); estos anticuerpos carecen de las cadenas ligeras y del dominio CH1 en las cadenas pesadas y tienen un peso molecular aproximado de 90 kDa (64). Además, estos anticuerpos solo tienen un dominio variable en cada brazo de la cadena pesada denominado nanocuerpo o VHH (variable domain of heavy chain antibodies) de 15 kDa (figura 2) (65).

Los VHHs poseen 4 regiones de andamio (framework; FR1, FR2, FR3 y FR4) que flanquean 3 regiones variables CDRs (complementary determining regions), las regiones CDRs son las regiones que al plegarse se unen a los epítopes de los antígenos con alta afinidad y especificidad (figura 3) (66).

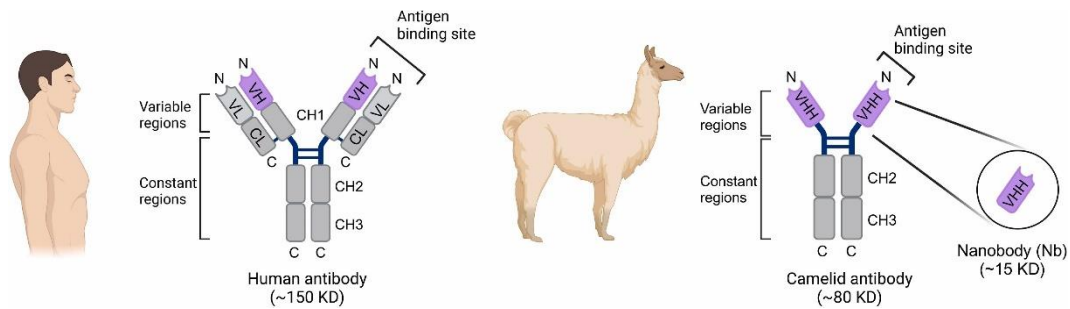


Figura 2. Anticuerpos IgG convencionales, anticuerpos de cadena pesada y VHH. Los anticuerpos IgG convencionales (~150 kDa) están constituidos por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. El fragmento responsable de reconocer al antígeno (Fab) está formado por la interacción de los dominios variables VH y VL. En contraste, las alpacas, además de poseer anticuerpos convencionales, también producen anticuerpos de cadena pesada (~80 kDa) que carecen de cadenas ligeras. En estos, el sitio de unión al antígeno está conformado únicamente por un dominio variable, denominado VHH (~15 kDa). Este VHH corresponde al dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada y puede clonarse para generar un anticuerpo funcional de dominio único. Fuente: Ali (67).

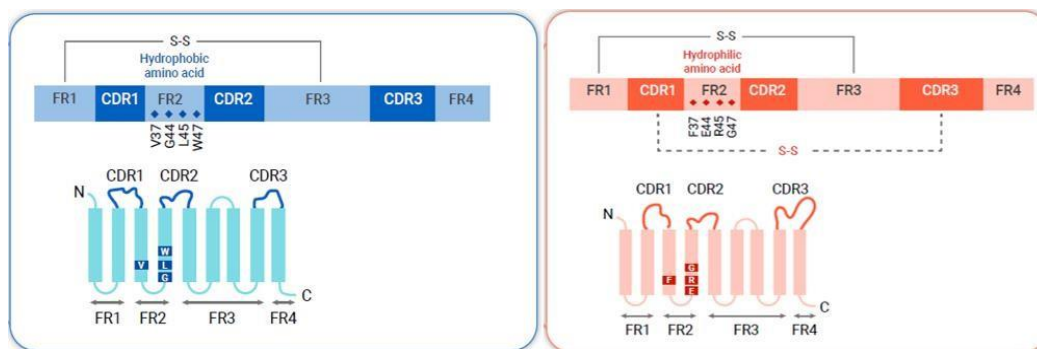


Figura 3. Estructura de los VH/VHH. Los dominios VH (izquierda) y VHH (derecha) tienen cuatro frameworks (FRs) y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Fuente: Assadi Y (68).

Los VHH son dominios estables que no requieren de la cadena ligera y el dominio CH1 para plegarse en una estructura terciaria que conserva la afinidad y especificidad de unión a su epítipo, a diferencia de los VH de las IgG convencionales que requieren estas estructuras ya que no pueden plegarse adecuadamente perdiendo la capacidad de reconocimiento del antígeno. Las sustituciones específicas en los VHHs en la región FR2 (V37F/V37Y, G44E, L45R y W47G) reducen la hidrofobicidad de la proteína, lo que disminuye la tendencia a la dimerización. En los VHHs, la sustitución L11S en la región FR1 mejora la solubilidad al eliminar interacciones con el dominio CH1. Las regiones CDR1 y CDR3 de los VHH son más largas que las correspondientes regiones en los VH de los IgG convencionales, lo que podría compensar la falta de las CDR del VL en los anticuerpos de cadena única pesada. Finalmente, en los VHH, las CDR1 y CDR3 suelen estar unidas por un enlace disulfuro, que estabiliza los lazos y reduce su flexibilidad, algo que no ocurre en los VH de las IgG convencionales. Estas características permiten a los VHHs unirse con alta afinidad y especificidad a sus correspondientes antígenos (67,68).

3.8 Obtención de VHHs recombinantes

El proceso para obtener VHHs comienza con la inmunización de un camélido con el antígeno de interés, lo que estimula su respuesta inmune. Se extraen los linfocitos B y se aísla el mRNA, que luego se convierte en cDNA. Los genes del VHH se amplifican por PCR y se clonan en fagémidos, que se transforman en *E. coli* (TG1). Estos se infectan con fagos auxiliares, permitiendo que los fagos produzcan partículas con el VHH en su superficie y la biblioteca se somete a biopanning, donde se seleccionan los fagos con alta afinidad al antígeno mediante phage ELISA. Después, las clonas se secuencian y los VHH seleccionados se subclonan en vectores de expresión para producirlos en *E. coli* BL21 (68,69) (Figura 4).

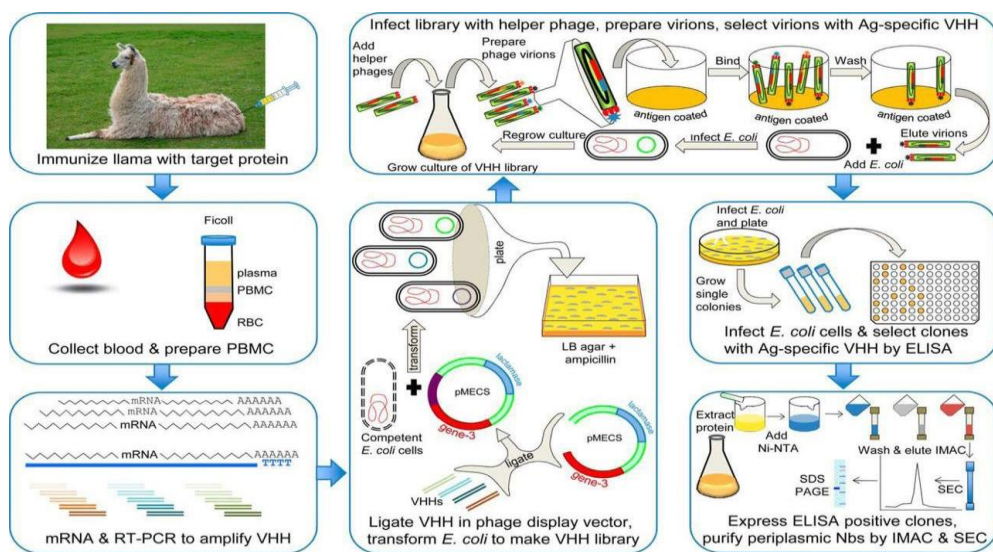


Figura 4. Proceso de producción de VHHs. Se inmuniza el camélido con el antígeno de interés, se extrae los PBMC, se extrae el mRNA y se convierte en cDNA, se amplifican los VHHs y se clona en un vector fagémido, se transforma en *E. coli*, se infectan las bacterias con fago helper, se enfrentan los fagos con el antígeno de interés inmovilizado en rondas de selección. Se subclonan en vectores de expresión. Fuente: Dmitriev O (69).

3.9 Dióxido de titanio

El dióxido de titanio es un óxido metálico utilizado en pinturas, plásticos, resinas, medicina y cosméticos. Se utiliza como protector solar ya que absorbe la luz UV, y como biomaterial para implantes ortopédicos para las articulaciones, implantes dentales como coronas, puentes y prótesis dentales (70). Además, se utiliza en la industria alimentaria como aditivo alimentario en productos como quesos, leche desnatada y en confitería (71).

El TiO_2 se presenta principalmente en tres formas cristalinas: rutilo, anatasa y brookita (figura 5). El rutilo es la forma más estable termodinámicamente, mientras que la anatasa y la brookita son menos estables y pueden transformarse en rutilo a altas temperaturas (450–1200 °C). El rutilo tiene una estructura tetragonal y una celda unitaria rectangular, mientras que la anatasa, también tetragonal, tiene una estructura más abierta y una mayor superficie específica, lo que la hace más reactiva. La brookita, de estructura ortorrómbica, tiene tres ejes de simetría y una celda unitaria rectangular (72).

El dióxido de titanio es un fotocatalizador que puede generar pares electrón-hueco cuando se expone a radiación ultravioleta, esto ocurre cuando el TiO_2 absorbe fotones de energía igual o superior a la banda prohibida, los electrones de la banda de valencia son promovidos a la banda de conducción, dejando huecos en la banda de valencia (Figura 6). Los electrones en la banda de conducción pueden reducir el oxígeno molecular, generando especies reactivas como los aniones superóxido

(O_2^-) mientras que los huecos en la banda de valencia pueden oxidar moléculas de agua o compuestos orgánicos, produciendo radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$) y otras especies altamente reactivas (73, 74). En su fase cristalina de anatasa, el TiO_2 posee un band gap de aproximadamente 3.2 eV, lo que significa que puede activarse con longitudes de onda menores a 387 nm. Por su parte, el rutilo presenta un band gap de 3.0 eV, activándose con longitudes de onda inferiores a 413 nm, mientras que la brookita, con un band gap de aproximadamente 3.3 eV, puede activarse con longitudes de onda menores a 376 nm (75). Estas longitudes de onda se calculan utilizando la ecuación $\lambda(\text{nm})=1240/E(\text{eV})$, la cual relaciona la energía del fotón con su longitud de onda, y se deriva de la ecuación de Planck combinada con la relación entre frecuencia y velocidad de la luz.

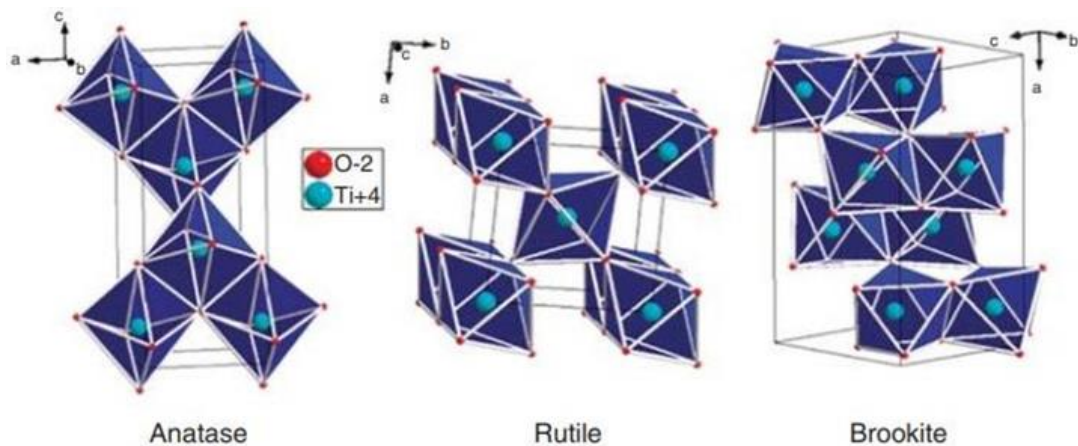


Figura 5. Estructuras de las formas cristalinas del TiO_2 . La anatasa y rutilo tienen una estructura tetragonal; mientras que la brookita tiene forma ortorrómbica. Fuente: Dsmboument (72).

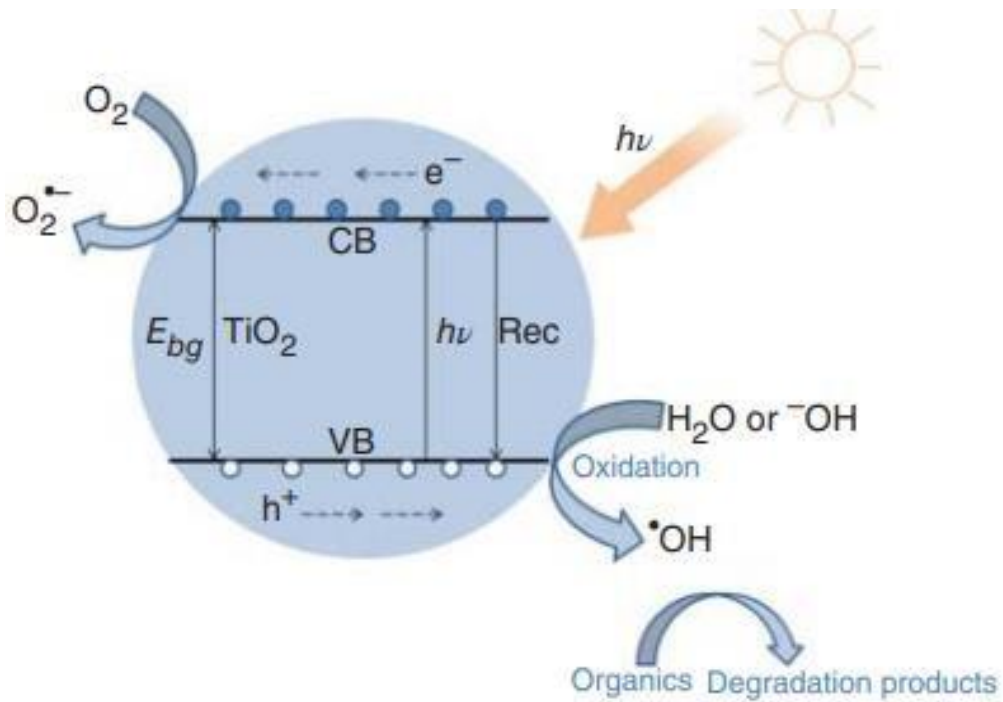


Figura 6. Mecanismo de fotocatalisis del TiO_2 . Cuando el TiO_2 es excitado con una energía igual o mayor a su energía de la banda prohibida (E_{bg}), los electrones de la banda de valencia (VB) pasan a la banda de conducción (CB). En la CB los electrones reducen el oxígeno. En la VB se da la oxidación del agua y de los radicales hidroxilos. Fuente: Yu (74).

3.10 Toxicidad del TiO₂

El TiO₂ es calificado como “generalmente reconocido como seguro”, según la directiva 21 CFR 73.575 del Agencia Federal de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norte América (Food and Drug Administration, FDA), se utiliza como aditivo alimentario de color y su límite máximo permisible es 1 % del peso del alimento (76). En el 2021, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en base a toda la evidencia disponible consideró que el TiO₂ no es seguro como aditivo alimentario (E171), ya que no se podía descartar la preocupación por su genotoxicidad (77).

Los efectos tóxicos del TiO₂ dependen de la dosis y de las propiedades fisicoquímicas de la partícula (tamaño, forma, estructura cristalina y el recubrimiento) (78). Las partículas de anatasa ultrafinas (~20 nm, 10 µg/ml) indujeron daño en el DNA en una línea de células epiteliales bronquiales humanas, mientras que el material de 200 nm no indujo daño (79). Un estudio encontró que la anatasa (62-250 mg/kg de peso) induce daño a la función hepática en ratas (80). La administración sistémica de nanopartículas de anatasa (~100 nm) aumentó la agregación plaquetaria murina, mientras que el rutilo del mismo tamaño no (81). El tamaño de las partículas influye en su distribución y por ende en su toxicidad. Un estudio encontró que después de la administración de una dosis de TiO₂ de 5 g/kg mediante una sonda oral en ratones no se observó toxicidad aguda evidente, sin embargo, las partículas mayores a 80 nm se acumularon principalmente en el hígado, mientras que las pequeñas (entre 25 y 80 nm) se acumularon principalmente en el bazo, y en menor cantidad en los riñones y pulmones (82).

3.11 Conjugación de partículas a proteínas/anticuerpos

La conjugación de proteínas a partículas de dióxido de titanio (TiO_2) es utilizado en aplicaciones biomédicas, biotecnológicas y ambientales. Este proceso permite combinar las propiedades fotocatalíticas y físicas de la partícula con la especificidad y funcionalidad de las proteínas, creando sistemas híbridos para diagnóstico, terapias dirigidas y biosensores (83). La funcionalización de las nanopartículas con los anticuerpos o sus fragmentos se da mediante métodos de adsorción, unión covalente y la unión con adaptadores. El anticuerpo debe estar en la cantidad y en la orientación deseada, además de que la unión sea estable y que el anticuerpo en el conjugado no pierda su función (84).

La conjugación por adsorción se basa en interacciones no covalentes, como puentes de hidrógeno, fuerzas de atracción electrostáticas, hidrofóbicas, de Van der Waals y las entre la superficie de la nanopartícula y uniones iónicas (85, 86). Las limitaciones de este método son la inestabilidad de la unión, ya que la unión puede verse afectada por el pH, fuerza iónica y la temperatura (87). Las uniones covalentes permiten una interacción de enlaces estable y dirigida, algunos ejemplos son la química de la carbodiimida ($-\text{COOH}$ con $-\text{NH}_2$), la química de la maleimida ($-\text{SH}$ con maleimida) y la química clic (reacciones bioortogonales como CuAAC o SPAAC) (87). Un enfoque de conjugación con adaptadores es el uso del sistema biotina-avidina. Dado que la avidina puede generar uniones no específicas por su alta carga positiva y glicosilación, se prefieren usar variantes como estreptavidina o neutravidina (87, 88).

3.12 Algunas técnicas físicas para la caracterización de partículas conjugadas a proteínas.

Las características de las partículas conjugadas a proteínas como tamaño, forma y distribución se estudian mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM), que miden el tamaño real del núcleo de la nanopartícula en estado sólido (89). La dispersión dinámica de la luz (DLS) estima el tamaño y distribución de las partículas por el movimiento Browniano en suspensión líquida, en esta técnica cuando la luz de un láser choca con las partículas en suspensión, se dispersa y un detector mide los cambios en la intensidad de la luz dispersada con el tiempo que se correlacionan con la velocidad de movimiento de las partículas y mediante la ecuación de Stokes-Einstein se calcula el tamaño de la partícula (90). Esta técnica además de medir el tamaño del núcleo considera las moléculas de agua u otras moléculas que estén unidas a las partículas y la agregación entre partículas (91).

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica que permite la caracterización de los grupos funcionales y los enlaces químicos de las partículas, así como las moléculas que podrían estar funcionalizadas a estas. La irradiación de la muestra con luz infrarroja (IR) ocasiona vibraciones de estiramientos y de rotación de los enlaces químicos, cada tipo de enlace absorbe a una frecuencia específica del IR (89, 93). El equipo envía un haz de luz IR que pasa un interferómetro que modula la luz de manera controlada generando un interferograma, la transformada de Fourier es una fórmula que separa las frecuencias del interferograma en un espectro IR.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de estudio

El presente trabajo corresponde a un estudio experimental.

4.2 Diseño del estudio

El estudio se dividió en tres etapas (figura 7):

1. Producción de los VHHs anti-Fas2.
2. Conjugación de los VHHs a las nanopartículas de TiO_2 y su caracterización.
3. Ensayos para evaluar el efecto del conjugado en *F. hepatica*.

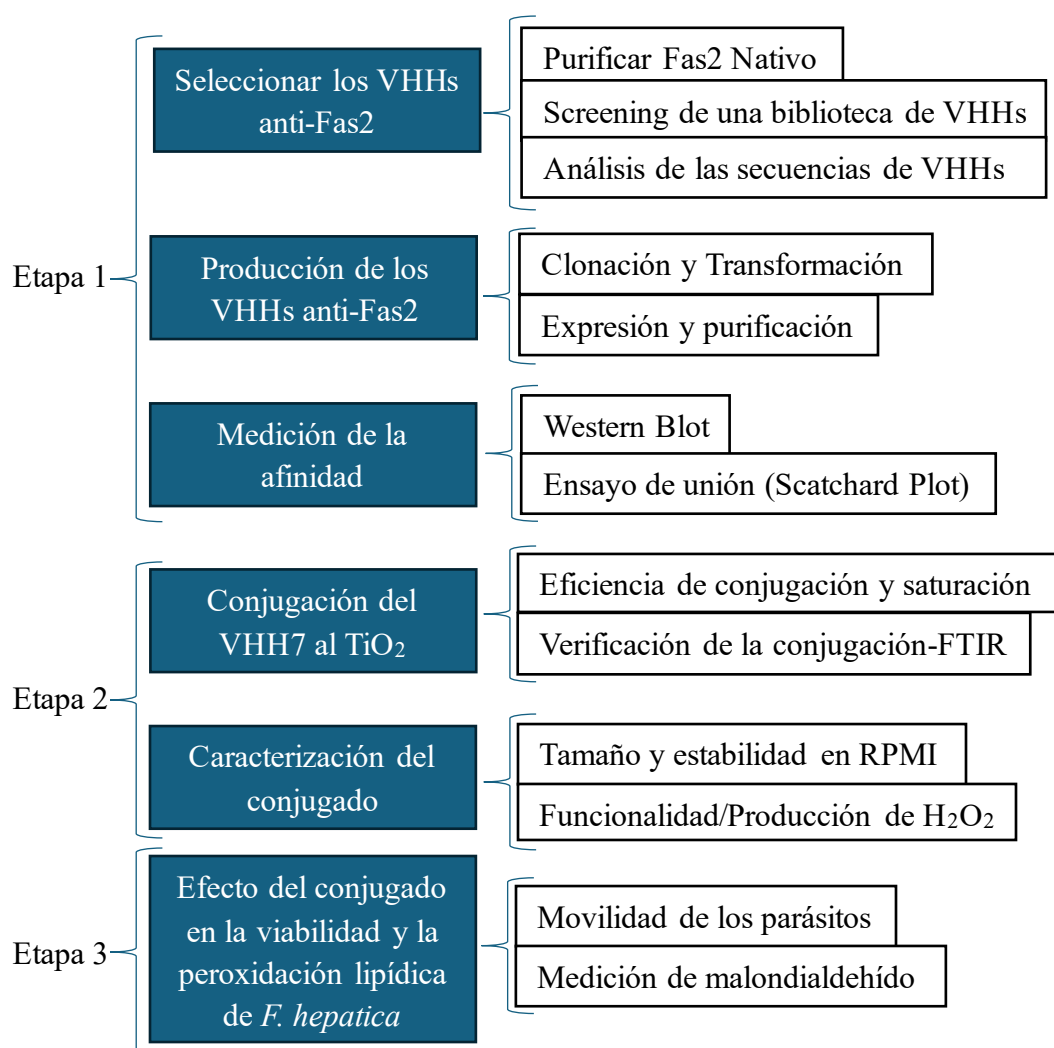


Figura 7. Flujograma de trabajo

4.3 Materiales

4.3.1 Químicos

Membrana de diálisis MWCO12400 (SIGMA), Sephadex CM-50 (SIGMA), Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BIORAD), M13KO7 Helper Phage (NEB), BSA (SIGMA), anti-M13-HRP (BIORAD), Sureblue TMB ELISA Substrate KPL (SERA CARE), DNA TaqPlatinum (Invitrogen), NotI (NEB), NcoI (NEB), DNA Ligasa T4 (NEB), IPTG (SIGMA), Ni-NTA (Qiagen), Anti-PentaHis-HRP (BIORAD), TMB (SIGMA), TiO₂ (US Research Nanomaterials), RPMI 1640 (SIGMA), HRP (SIGMA), Triverfén® 22.2 (AGROVET), MDA bis-dimetilacetal (SIGMA), ácido tiobarbitúrico (SIGMA), PES Syringe Filter (Membrane Solutions).

4.3.2 Biológicos

Se colectaron *F. hepatica* adultas con alto movimiento a partir de hígados desechados del Camal San Pedro (Lurín, Lima), se lavaron 3 veces con cloruro de sodio al 0.9 % a 37 °C y se mantuvieron en medio de cultivo (RPMI con estreptomicina 50 µg/ml y penicilina 50 U/ml) a 37 °C hasta llegar al laboratorio. En la tabla 1 se detallan los criterios de inclusión/exclusión para la selección de las *F. hepatica* utilizadas en las pruebas.

Tabla 1. Criterios para la selección de las *F. hepatica* utilizadas en los ensayos.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Movimiento evidente	<i>F. hepatica</i> con cortes o daños físicos
<i>F. hepatica</i> adultas: longitud 20-30 mm	<i>F. hepatica</i> con bajo o sin movimiento
Ausencia de daño físico	

4.4 Procedimiento

4.4.1 Selección de los VHHs anti-Fas2

4.4.1.1 Purificación de Fas2

Se purificó la proteína Fas2 de acuerdo con el protocolo de Córdova y col. (33). A partir de hígados desechados en un camal, se colectaron en tubos de 50 ml alrededor de 50 parásitos adultos de *F. hepatica* en 40 ml de ZnSO₄ 0.1 mM y se incubaron a 4 °C por dos horas. Se separaron los parásitos y el medio líquido (excretado/secretado “E/S”) se centrifugó a 7000 × g por diez minutos. El sobrenadante fue congelado a -80 °C y liofilizado.

Se resuspendió 0.25 gramos del producto liofilizado en 6 ml de buffer citrato de sodio 0.2 M a pH 5 con ZnSO₄ 0.1 mM, a 4 °C y se realizó la precipitación etanólica con 7.5 ml de etanol frío al 98 %. Se centrifugó a 10,000 rpm durante diez minutos a 4 °C y se dializó el sobrenadante a 4 °C durante 16 horas en una membrana de 12,400 daltons contra dos litros de buffer de citrato de sodio 10 mM a pH 5 con 0.1 mM de ZnSO₄.

El E/S dializado se pasó a través de una matriz de Sephadex CM-50 equilibrada con buffer citrato de sodio 10 mM a pH 5 y ZnSO₄ 0.1 mM. Se colectaron fracciones de 2 ml y se midió la densidad óptica a 280 nm (DO₂₈₀); cuando esta fue cercana a cero, se agregó una gradiente de NaCl de 0 a 2 M y se colectaron las fracciones con una DO₂₈₀ mayor a 0.1.

Se determinó la actividad enzimática de las fracciones según la reacción enzimática de la tabla 2, con una incubación de 3 horas a 37 °C (94). Para detener la reacción, se añadió 0.3 ml de ácido tricloroacético al 80 % con una incubación a 4 °C durante 10 minutos. Se centrifugó la reacción a 6,500 rpm y se midió la densidad óptica a 440 nm (DO₄₄₀).

Las fracciones con una DO₄₄₀ mayor a 0.05 fueron dializadas contra H₂O MilliQ por 16 horas a 4 °C. El dializado se liofilizó y el producto (Fas2 purificado) fue suspendido en agua para la cuantificación de proteínas mediante la técnica de Bradford. Para ello, se realizó una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA), de acuerdo con el anexo 1. Se mezclaron 150 µl de las muestras y los estándares con 150 µl reactivo de Bradford y se incubó por 5 minutos en oscuridad, luego se midió la densidad óptica a 595 nm (DO₅₉₅). Finalmente, se verificó la pureza de Fas2 purificado mediante una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 12 %.

Tabla 2. Reacción de actividad enzimática de las fracciones de la purificación.

	Muestra (µl)	Azocaseína 10 mg/ml (µl)	Citrato de sodio 0.5 M pH5 (µl)	DTT 10 mM (µl)	H ₂ O MilliQ (µl)
Blanco	0	175	450	75	50
Fracción	50	175	450	75	0

4.4.1.2 Screening de la librería de VHHs

Se realizó un screening de una biblioteca de VHHs anti-Fas2 en *E. coli* TG1 de acuerdo con el protocolo de Gushiken (95). La biblioteca se sembró en agar 2xYTAG (extracto de levadura 10 mg/ml, triptona 16 mg/ml, ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 2%) y se incubó a 37 °C por 16 horas. Se inocularon 248 colonias en placas de 96 pocillos con 200 µL 2xYTAG y se incubaron a 30 °C por 16 horas a 200 rpm. Se sembró 2 µl de cada clona en 200 µL de 2xYTAG y se incubaron a 37 °C por 2.5 horas. Se añadió 50 µl de fago helper M13 (6.3 x 10⁹ UFP/ml) y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Se centrifugó a 1000 × g por 10 minutos y el precipitado se resuspendió en 150 µL de 2xYTAK (extracto de levadura 10 mg/ml, triptona 16 mg/ml, ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 300 µg/ml) y se incubó a 30 °C por 16 horas.

Se fijaron 300 ng de Fas2 y 300 ng de BSA en pozos de ELISA y se incubaron durante 16 horas a 4°C. Se lavaron 5 veces con PBS-T (PBS 1X a pH 7.4-Tween 0.05%) y se incubaron a 37 °C por una hora con 50 µl del sobrenadante del cultivo anterior con 50 µl leche al 4%. Se repitió el lavado y se incubó por una hora con el anticuerpo anti M13-HRP a una dilución de 1:5000 en PBS-T y leche al 2%. Se incubaron los pozos con tetrametilbenzidina (TMB, contiene H₂O₂) por 10 minutos y se añadió 50 µL de ácido sulfúrico 2 N. Se midió a la absorbancia 450 nm (OD₄₅₀) y se seleccionaron las clonas con un ratio de la DO₄₅₀ de Fas2/BSA mayor a 6 para un segundo ELISA confirmatorio en el que se realizó el mismo procedimiento seleccionándose las clonas con un ratio de la DO₄₅₀ de Fas2/BSA mayor a 10.

4.4.1.3 Análisis de las secuencias de los VHHs y propiedades fisicoquímicas

Se sembraron las clonas anti-Fas2 en agar 2xYTAG y se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Después, se inoculó una colonia en 3 ml de medio 2xYTAG y se incubó a 37 °C durante 16 horas a 250 rpm. El cultivo se centrifugó a 12,000 rpm y se purificó el plásmido pHEN2-VHH con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System. Se cuantificaron los plásmidos purificados usando Nanodrop y se envió a secuenciar en MACROGEN.

Para evaluar el grado de similitud entre las secuencias, se realizó un alineamiento utilizando el servidor en línea ClustalW/EMBOSS Needle, lo que permitió determinar los porcentajes de identidad y similitud, así como analizar la homología entre ambas moléculas. La identificación de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y las regiones estructurales marco (FRs) se hizo en el servidor Immunogenetics domains (<https://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>).

Las propiedades fisicoquímicas de los VHHs como el punto isoeléctrico (pI), el peso molecular (Mw) y el perfil de hidrofobicidad se calcularon utilizando la herramienta pI/Mw y la herramienta ProtScale respectivamente, disponibles en el servidor ExPASy.

La predicción de las estructuras terciaria de los VHHs efectuó utilizando el servidor SWISS-MODEL, empleando como molde la estructura 9ena.1.B, seleccionada por presentar una identidad del 77.44% y un valor GMQE de 0.7 con respecto a las

secuencias analizadas. Las estructuras generadas fueron posteriormente visualizadas en el software VMD, donde además se realizó el alineamiento estructural y se calculó el valor de RMSD entre ambas estructuras para evaluar su homología estructural.

4.4.2 Producción de los VHHs anti-Fas2

4.4.2.1 Subclonación y transformación

Se realizó la subclonación de los VHHs anti-Fas2 de acuerdo con el protocolo de Quintana (96). Los VHHs se amplificaron a partir de 20 ng del plásmido pHEN2, para ello se realizó la reacción con MgCl₂ 2 mM, dNTPs 200 µM, buffer 1X, 0.2 unidades de DNA TaqPlatinum, y los primers VHHSfil y AHis 0.5 µM. Se corrió un gel de agarosa al 1.2 % y se purificaron los amplicones (VHHs) utilizando el QiaQuick Gel Extraction Kit (PROMEGA).

Se sembró *E. coli* Top10 que contiene el plásmido pET22b en medio Luria Bertani (LB) con ampicilina 100 µg/ml y se incubó a 37 °C por 16 horas. Después, se inoculó una colonia en 5 ml de medio LB con 150 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37 °C por 16 horas con agitación de 250 rpm. Se purificó el plásmido pET22b mediante miniprep y se cuantificó usando nanodrop.

Se digirieron 2 µg de producto de PCR de cada VHH y 3 µg de pET22b con 15 U de las enzimas *NotI* y *NcoI* en el buffer de r3.1 1X. La reacción se incubó a 37 °C durante 15 minutos y se inactivó a 80 °C durante 20 minutos para detener la

reacción. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % y se purificaron las bandas de los VHHs y del plásmido digerido.

Se realizó la ligación de las secuencias de VHHs en el vector pET22b empleando una proporción inserto:vector de 12:1 para cada VHH. Para ello, se incubaron a 16 °C durante 16 horas 200 ng del vector pET22b, 189 ng del inserto VHH7, 184 ng del inserto VHH3, 1 µL de DNA ligasa T4 y 2 µl de buffer de ligación 10X, en un volumen final de 20 µl. Luego, la enzima se inactivó a 65 °C durante 15 minutos.

Los productos de ligación se transformaron en células quimiocompetentes de *E. coli* BL21, incubando 10 µl del producto con 70 µl de células en hielo durante 30 minutos, seguido de un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos y posterior enfriamiento en hielo por 2 minutos. Luego, se añadió 1 ml de medio SOC (0.5% extracto de levadura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa) y se incubó a 37 °C durante una hora con agitación a 250 rpm. Las células se sembraron en placas de agar LB suplementadas con 0.1 mg/mL de ampicilina y se incubaron a 37 °C por 16 horas.

La transformación se confirmó por PCR colony, para ello se inoculó una colonia en 20 µl de H₂O PCR y se hirvió durante 10 minutos. Para la PCR se incubó 0.02 U de Taq Platinum Polymerase, dNTPs 0.2 mM, MgCl₂ 2mM, los primers T7F y T7R 0.5 µM, 1 µl del buffer de PCR y 1 µl de la muestra lisada por calor. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % para verificar las colonias que presentan el

inserto de los VHHs. Las colonias recombinantes positivas se incubaron en 3 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml a 37 °C durante 16 horas. Finalmente, los cultivos se criopreservaron con glicerol al 15 %.

4.4.2.2 Expresión y purificación de los VHHs anti-Fas2

Para la expresión y purificación de los VHHs, se adaptó el protocolo de Quintana (96). Se sembraron las clonas anti-Fas2 en placas de agar LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Se inoculó una colonia en 3 ml de medio LB con 150 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37 °C durante 16 horas a 250 rpm. Se transfirieron 0.5 ml del cultivo a 50 ml de medio LB con ampicilina 150 µg/ml y se incubó a 37 °C con 250 rpm de agitación hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0.5. Luego, se agregó IPTG 1 mM y se incubó a 37 °C durante 16 horas a 250 rpm. Se verificó la expresión por SDS-PAGE al 10 %.

Se centrifugaron los cultivos de 100 ml a 4 °C durante 30 minutos a 7650xg y se filtró el sobrenadante con filtros de 0.22 µm estériles. Después, se equilibró 50 ml del sobrenadante filtrado con 2 ml NaH₂PO₄ 0.5 M (pH 7.4), 1.29 ml de NaCl 5M y 0.5 ml de imidazol 1 M (pH 7.4). Luego, se pasó a través de una columna con 2 ml de matriz de agarosa Ni-NTA previamente equilibrada (tabla 3). Se pasó el buffer de lavado hasta que el eluido alcance una DO₂₈₀ cercana a cero. Se añadió el buffer de elución recuperándose las fracciones. Finalmente, se corrió un SDS-PAGE al 10% y se cuantificó el rendimiento por la técnica de Bradford.

Tabla 3. Condiciones para la purificación de los VHHs recombinantes

Componentes	Buffer de equilibrio	Buffer de lavado	Buffer de elución
NaH ₂ PO ₄ (pH 7.4)	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM
Imidazol (pH 7.4)	10 mM	15 mM	300 mM

4.4.3 Medición de la afinidad de los VHHs

4.4.3.1 Western Blot

Antes de medir la afinidad de los VHHs, se verificó el reconocimiento de los VHHs a Fas2 mediante Western Blot; para ello se realizó un SDS-PAGE de Fas2 purificado. Después, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa durante 3 horas. Se bloqueó la membrana con BSA al 3 % diluido en PBS-T a 4 °C durante 16 horas. Luego, se lavó 5 veces con PBS-T y se incubó con 1 ml del VHH 20 µg/ml en PBS-T con BSA al 3 % a 37 °C durante una hora. Se lavó y se incubó a 37 °C durante una hora con el conjugado anti-pentaHis-HRP (1:3000 en PBS-T con BSA al 3 %). Finalmente, se reveló con diaminobencidina (DAB) y H₂O₂.

4.4.3.2 Ensayo de unión de los VHHs a Fas2

Se midió la constante de disociación (K_D) de los VHHs usando la ecuación de Scatchard. Se fijó Fas2 (desde 0 hasta 272 ng) en 100 µl de buffer carbonato-bicarbonato a pH 9.6 durante 16 horas a 4 °C. Los pozos se lavaron 5 veces con PBS-T y se incubaron con BSA al 3 % diluido en PBS-T a 37 °C durante una hora. Se lavaron los pozos y se incubaron con 50 ng del VHH en 100 µl de PBS-T con BSA al 3 % durante una hora a 37 °C. Los pozos se incubaron con el conjugado

anti-PentaHis-HRP (1:2000 en BSA al 3 % con PBS- T) a 37 °C durante 1 hora. Luego, se lavó e incubó con 100 µl de TMB (contiene H₂O₂) durante 10 minutos. Se agregó 50 µl de ácido sulfúrico 2 N y se midió la DO₄₅₀.

4.4.4 Conjugación del VHH7 a las nanopartículas de TiO₂

4.4.4.1 Conjugación con diferentes ratios de TiO₂:VHH7 y medición de la eficiencia de conjugación

Se seleccionó el VHH con mayor afinidad al ligando Fas2 y se realizó la conjugación con diferentes ratios de TiO₂:VHH7 (tabla 4) de acuerdo con el protocolo modificado de Thiramanas (97). Se utilizó TiO₂ en polvo (80% anatasa/20% rutilo, 20 nm), donde el tamaño de las partículas fue determinado mediante microscopia electrónica de transmisión como lo menciona el proveedor en la hoja técnica del producto (US Research Nanomaterials). Se preparó una suspensión de TiO₂ 1 mg/ml en agua miliQ, que se sonicó a 4 °C durante una hora con 15 segundos de pulso y 15 segundos de descanso durante 10 minutos con 5 minutos de descanso entre cada pulso (Fisherbrand™ Model120 Sonic Dismembrator 120W 20 kHz); después se incubaron 100 µg de TiO₂ con diferentes cantidades del VHH7 (0, 100, 200, 300 y 400 µg) a 30 °C en 1 ml de PBS 1X a pH 7 durante tres horas a 200 rpm (tabla 4). Para remover el VHH no unido, las partículas se centrifugaron a 10,000xg a temperatura ambiente durante 5 minutos y el pellet que contiene las partículas unidas al VHH7 se lavó tres veces con 1 ml de PBS 1X a pH 7.

Tabla 4. Ratios de TiO₂-VHH7 utilizados en la conjugación. Las reacciones de conjugación se realizaron en un volumen final de 0.5 ml.

Ratio (TiO ₂ :VHH7)	Cantidad de TiO ₂ (µg)	Cantidad de VHH7 (µg)	Concentración* de TiO ₂ (µg/ml)	Concentración* del VHH7 (µg/ml)
1:0	100	0	200	0
1:0.5	100	50	200	100
1:1	100	100	200	200
1:2	100	200	200	400
1:3	100	300	200	600
1:4	100	400	200	800

Para determinar la cantidad de VHH adsorbido, se cuantificó la concentración del VHH presente en el sobrenadante antes de los lavados y mediante la siguiente formula se determinó la eficiencia de conjugación.

$$\text{Eficiencia de conjugación (\%)} = \frac{(\text{Proteína total} - \text{Proteína en el sobrenadante})}{\text{Proteína total}} \times 100$$

4.4.4.2 Curva de saturación de la conjugación con diferentes ratios

Se realizó una curva de saturación de las partículas de TiO_2 utilizando los ratios de la sección anterior (tabla 4). Los conjugados se bloquearon con 1 ml de BSA al 2 % en PBS 1X pH 7. Después, 5 μg de los conjugados se incubaron con 0.5 ml de Anti-PentaHis- HRP (1:2000 en PBS 1X con BSA al 2 %) a 37 °C durante una hora. Posteriormente, se centrifugaron a $10,000 \times g$ por 5 minutos y se lavaron tres veces con 1 ml de PBS 1X pH 7. Los conjugados se incubaron con 0.5 ml de TMB (contiene H_2O_2) durante 10 minutos. Se añadió 200 μl de ácido sulfúrico 2 N y se centrifugó a $10,000 \times g$ por 5 minutos. Se midió la DO_{450} del sobrenadante.

4.4.4.3 Verificación de la conjugación

Después de la conjugación, se corrió un SDS-PAGE para verificar la presencia de los VHHs en las partículas de TiO_2 , se utilizó 20 μg de partículas del conjugado preparado con diferentes ratios. Mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se determinó el espectro de adsorción del conjugado TiO_2 -VHH7 y de las partículas de TiO_2 sin conjugar en un rango de 600 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . Se preparó el conjugado utilizando el ratio TiO_2 :VHH7 1:0.5, se secaron las partículas y se realizó la medición del TiO_2 conjugado y sin conjugar.

4.4.5 Caracterización del conjugado TiO₂-VHH7

4.4.5.1 Caracterización del tamaño

Mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) se midió el tamaño hidrodinámico y el índice de polidispersidad de las partículas sin conjugar y del conjugado (ratio 1:0.5), evaluando los cambios después de la conjugación. El conjugado se diluyó a 50 µg/ml de TiO₂ para ser leídas en el DLS (Brookhaven 90Plus).

4.4.5.2 Estabilidad del conjugado en medio de cultivo

Se determinó la estabilidad del conjugado en medio de cultivo RPMI a las 0, 24, 48 y 72 horas. Para ello se preparó el conjugado TiO₂:VHH7 (ratio 1:0.5) y se incubó a una concentración de 0.5 mg/ml en RPMI durante 72 horas a 37 °C. Se tomó una alícuota de 100 µl (50 µg de partículas conjugadas) de medio a las 0, 24, 48 y 72 horas, se centrifugó a 10,000xg las muestras y se corrió un SDS-PAGE del pellet.

4.4.5.3 Caracterización de la funcionalidad del conjugado TiO₂-VHH7

Se evaluó la funcionalidad del conjugado en el reconocimiento de Fas2. Se incubó 10 µg del conjugado TiO₂-VHH7 (ratio 1:0.5) con 500 ng de Fas2 a 37 °C durante 1 hora en PBS-T. Se centrifugó la reacción, se lavó el pellet 3 veces con 1 ml de PBS 1X pH 7 y se incubó durante una hora a 37 °C con suero positivo y negativo humano a fascioliasis (1:5000 en PBS-T con BSA al 2 %). Se repitió el lavado y se incubó a 37 °C por una hora con 300 µl de anti-IgG humano-HRP (dilución de 1:40000 en PBS-T con BSA al 2 %). Las partículas se lavaron y se incubaron con 400 µl de TMB durante 10 minutos. Se añadió 200 µl de H₂SO₄ 2M y se centrifugó

a $10,000 \times g$. Se midió la DO_{450} del sobrenadante. Como control, el conjugado se enfrentó a 500 ng de BSA y se incluyó un grupo control de partículas sin conjugar.

4.4.5.4 Concentración de TiO_2 para la producción de H_2O_2

Se caracterizó las concentraciones de TiO_2 para la producción de H_2O_2 . Se preparó el conjugado utilizando el ratio TiO_2 :VHH7 1:0.5. A partir del TiO_2 conjugado y sin conjugar 10 mg/ml en PBS 1X pH 7.4, se realizaron diluciones seriadas del conjugado (5, 2.5, 1, 0.5 y 0 mg/ml de TiO_2). Las diferentes diluciones (50 μ l) se expusieron a luz UV durante 10 minutos, inmediatamente después se añadió 1 μ l de HRP 0.2 mg/ml y 50 μ l de TMB 0.1 mg/ml (no contiene H_2O_2) y se incubó durante 10 minutos. Luego, se añadió 50 μ l de H_2SO_4 2 M, se centrifugaron los tubos a $10,000 \times g$ durante 5 minutos y se midió la DO_{450} del sobrenadante. Las mediciones se realizaron por triplicado y como blanco se utilizó PBS 1X pH 7.4.

4.4.5.5 Caracterización del tiempo de UV para la producción de H_2O_2

Se caracterizó el tiempo de UV para la producción de H_2O_2 . Se preparó el conjugado de acuerdo con el protocolo mencionado utilizando el ratio TiO_2 :VHH7 1:0.5. Partículas conjugadas y sin conjugar a 1 mg/ml de TiO_2 en PBS 1X (pH 7.4) fueron expuestas a luz UV durante 60 minutos. Se tomó alícuotas de 50 μ l por triplicado a los 0, 5, 10, 15, 20 y 60 minutos y se incubaron con 1 μ l de HRP 0.2 mg/ml y 50 μ l de TMB 0.1 mg/ml (no contiene H_2O_2) durante 10 minutos. Después, se añadió 50 μ l de H_2SO_4 2M y se centrifugaron los tubos a $10,000 \times g$ durante 5 minutos. Se midió la DO_{450} del sobrenadante y como blanco del ensayo se utilizó PBS 1X.

4.4.6 Establecimiento de las condiciones para el ensayo *in vitro* en *F. hepatica*

4.4.6.1 Tiempo de incubación de *F. hepatica* con el conjugado TiO₂-VHH7

Se realizó una prueba para medir el tiempo de incubación de las *F. hepatica* con las nanopartículas conjugadas con el VHH7, antes de incidir la luz UV sobre los parásitos. Esto con el objetivo de permitir que el parásito absorba el conjugado. El efecto de las partículas se midió en función del movimiento de las *F. hepatica*, que es una medida de la viabilidad, y la concentración de malondialdehído (MDA).

El movimiento de los parásitos se cuantificó durante un periodo de 20 segundos mediante un sistema de puntuación del 0 al 20. En este sistema, un puntaje de 0 indica la ausencia total de movimiento durante el intervalo observado o la muerte del espécimen, mientras que un puntaje de 20 corresponde a movimiento continuo durante los 20 segundos. Los valores intermedios reflejan el tiempo en segundos en el que se registró movimiento, es decir, un puntaje de 1 indica movimiento durante un segundo, un puntaje de 2 indica movimiento durante dos segundos.

Se preparó el conjugado TiO₂-VHH7 de acuerdo con el protocolo establecido en la sección 4.4.4.1 (ratio 1:0.5) y se agregó en una concentración final de 0.5 mg/ml de TiO₂ al medio de cultivo (RPMI con estreptomicina 50 µg/ml y penicilina 50 U/ml) incubándose a 37 °C. Los parásitos adultos fueron colectados de hígados infectados que fueron decomisados en el matadero y se transportaron en el medio de cultivo a 37 °C. En el laboratorio, los parásitos se lavaron 4 veces con NaCl 0.9 % y se incubaron en el medio de cultivo a 37 °C con CO₂ al 5% durante 4 horas.

Después de las 4 horas de incubación, se seleccionaron *F. hepatica* con alto movimiento (17-20) y se dividieron aleatoriamente en 9 grupos; cada grupo estuvo conformado por 4 parásitos adultos colocados en un pozo de una placa de cultivo que contenía 3 ml de medio de cultivo con su respectivo tratamiento (tabla 5). Las *F. hepatica* se incubaron con su respectivo tratamiento durante 2 y 6 horas. Posteriormente, un subgrupo se expuso a luz UV, mientras que otro no. La exposición a luz UV se realizó en tres ocasiones de 20 minutos cada una, con intervalos de una hora entre cada aplicación. El aparato usado para emitir luz UV fue la cabina BAKER SterilGARD SC4TXSB Clase II tipo B2 que emite luz UV-C (254 nm).

Tabla 5. Grupos para la evaluación del tiempo de incubación (2 y 6 horas) del conjugado antes de la exposición a luz UV. (n=4)

Grupos
Control sin UV
Control más UV después de 2 horas
Control más UV después de 6 horas
TiO ₂ (0.5 mg/ml) sin UV
TiO ₂ (0.5 mg/ml) UV después de 2 horas de incubación
TiO ₂ (0.5 mg/ml) UV después de 6 horas de incubación
TiO ₂ (0.5 mg/ml)-VHH7 sin UV
TiO ₂ (0.5 mg/ml)-VHH7 más UV después de 2 horas de incubación
TiO ₂ (0.5 mg/ml)-VHH7 más UV después de 6 horas de incubación

Se cuantificó el MDA en las *F. hepatica* incubadas con los tratamientos anteriores en otra prueba con 12 *F. hepatica* por grupo. La medición del MDA se realizó en tres tiempos (antes del tratamiento 0 horas y a las 12 y 24 horas post-tratamiento). En cada tiempo se evaluó la concentración de MDA en 4 *F. hepatica* de cada grupo.

La medición de MDA se realizó de acuerdo con el protocolo de Aguilar (98). A partir de una solución stock de MDA bis-dimetilacetal (200 μM) se preparó la curva estándar utilizando diferentes concentraciones de MDA (desde 0 hasta 160 μM) (tabla 6). Cada *F. hepatica* se homogenizó manualmente en un mortero con 100 μl de PBS 1X pH 7.4 y se centrifugó a 6,000xg durante tres minutos.

Se mezclaron 12.5 μl del sobrenadante del tejido homogenizado con 25 μl de SDS al 8.1%, 187.5 μl de acetato de sodio 3.5 M (pH 4), 187.5 μl de ácido tiobarbitúrico al 0.8% (pH 4) y 87.5 μl de agua milli-Q; la reacción se incubó a 95 °C durante una hora. Los tubos se incubaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a 6,000xg durante 5 minutos a 4 °C. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm. El procedimiento también se realizó con el MDA para realizar la curva estándar.

Tabla 6. Preparación de la curva estándar de MDA

Tubo	200 μM de MDA bis-dimetilacetal (μl)	H ₂ O (μl)	Concentración final de MDA bis-dimetilacetal (μM)
1	0	1000	0
2	12.5	987.5	2.5
3	25	975	5
4	50	950	10
5	100	900	20
6	200	800	40
7	400	600	80
8	800	200	160

4.4.6.2 Efecto de la concentración del conjugado TiO₂-VHH7 en *F. hepatica*

Se colectaron parásitos adultos de *F. hepatica* y se preparó el conjugado TiO₂-VHH7 de acuerdo con los protocolos anteriormente mencionados. Se prepararon medios de cultivo con tres concentraciones de TiO₂-VHH7 (1 y 2.5 mg/ml de TiO₂), medios con partículas sin conjugar y medio más Triverfén® (triclabendazol 30 µg/ml, fenbendazol 25 µg/ml e ivermectina 0.5 µg/ml). Se tuvieron dos grupos por cada tratamiento, cada uno con 4 *F. hepatica* (tabla 7). Después de incubar las *F. hepatica* con su respectivo tratamiento por 6 horas, un grupo se expuso a luz UV y el otro se mantuvo en oscuridad. La exposición a luz UV se realizó 3 veces durante 20 minutos con intervalos de 1 hora entre cada aplicación. Se realizó el conteo del movimiento de las *F. hepatica* a las 0, 12, 24 y 48 horas.

Se realizó la misma prueba en grupos 12 *F. hepatica* para medir la peroxidación lipídica que se produce con los diferentes tratamientos, la medición se realizó en cuatro *F. hepatica* de cada grupo a las 0, 12 y 24 horas.

Tabla 7. Grupos para evaluar el efecto de la concentración del conjugado sobre la motilidad y peroxidación lipídica. (n=4)

Sin exposición a luz UV	Exposición a luz UV
Control	Control
TiO ₂ 1 mg/ml	TiO ₂ 1 mg/ml
TiO ₂ 2.5 mg/ml	TiO ₂ (2.5 mg/ml)
TiO ₂ 1 mg/ml – VHH7	TiO ₂ 1 mg/ml – VHH7
TiO ₂ 2.5 mg/ml – VHH7	TiO ₂ 2.5 mg/ml – VHH7
Triverfén®	

4.4.7 Ensayo del efecto de las partículas de TiO₂ conjugadas conjugadas con el VHH-anti-Fas2 irradiadas con luz UV sobre *F. hepatica* en cultivo

Se colectaron las *F. hepatica* y se preparó el conjugado de acuerdo con los protocolos anteriormente mencionados. Se preparó los medios de cultivo con el conjugado TiO₂ (1 mg/ml)-VHH7 (0.5 mg/ml), con las partículas sin conjugar TiO₂ (1 mg/ml), con el VHH7 (0.5 mg/ml) y con Triverfén®. Se incubó una *F. hepatica* por pozo con 3 ml de cada tratamiento durante 6 horas a 37 °C, con 5% de CO₂. Se tuvieron dos grupos de *F. hepatica* con cada tratamiento, un grupo (n=12) se expuso a luz UV, de acuerdo con el protocolo mencionado en el punto 4.4.6.2, y el otro grupo se mantuvo en oscuridad (tabla 8). Se midió el movimiento de las *F. hepatica* a las 0, 12, 24, 48 horas.

Además, se realizó la misma prueba en grupos de 18 *F. hepatica* para medir la peroxidación lipídica que se produce con los diferentes tratamientos, la medición se realizó en 6 *F. hepatica* que se sacrificaron a las 0, 12 y 24 horas (n=6).

Tabla 8. Grupos para evaluar el efecto del conjugado en la motilidad (n=12) y peroxidación lipídica (n=6) de las *F. hepatica*.

Grupos
Control
Control + UV
TiO ₂ (1 mg/ml)
TiO ₂ (1 mg/ml) + UV
VHH
VHH + UV
TiO ₂ (1 mg/ml) -VHH7
TiO ₂ (1 mg/ml) -VHH7 +UV
Triverfén®

4.5 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar las diferencias en el movimiento y la concentración de MDA entre cada tratamiento de prueba y su respectivo control. En la prueba final, se aplicó la prueba t de Student para determinar si existían diferencias significativas en el movimiento promedio de *F. hepatica* y la concentración promedio de MDA entre cada tratamiento y su control, debido a que el número de *F. hepatica* se incrementó en esta etapa.

Para la evaluación del movimiento de *F. hepatica*, el análisis estadístico se realizó a las 12, 24 y 48 horas postratamiento, mientras que, para la evaluación de la concentración de MDA, el análisis se efectuó a las 12 y 24 horas postratamiento. Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa R, versión 4.4.2, considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

V. RESULTADOS

5.1 Purificación de Fas2

La proteína Fas2 se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico. El cromatograma de purificación reveló dos picos principales de absorbancia a 280 nm, y Fas2 se recuperó tras la adición del gradiente de NaCl, aplicado después de la fracción 50. Las fracciones obtenidas mostraron actividad sobre el sustrato azocaseína (Figura 8a). Además, el análisis por electroforesis en gel reveló una banda principal correspondiente a Fas2, con un peso molecular aproximado de 25 kDa, junto con bandas de menor peso molecular, lo que sugiere que son péptidos producto de la degradación de Fas2 o impurezas (Figura 8b).

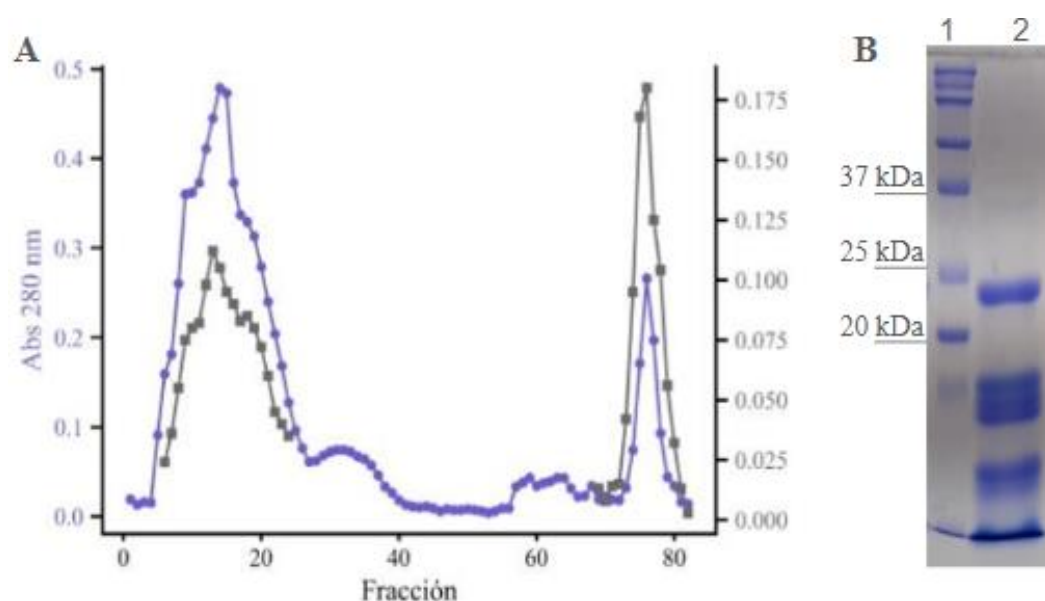


Figura 8. Purificación de Fas2 de *F. hepatica*. A, medición de la absorbancia a 280 nm de las fracciones purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico (línea azul), y medición de la absorbancia a 440 nm después del ensayo de actividad enzimática utilizando como sustrato azocaseína (línea negra). B, Gel de electroforesis en condiciones denaturantes de la proteína Fas2 purificada.

5.2 Tamizaje de la librería de cDNA de VHHs de una alpaca inmunizada con E/S y análisis de secuencia

En el tamizaje de la biblioteca de cDNAs de VHHs con Fas2 se seleccionó al azar 248 clones que se evaluaron mediante un ensayo de Phage-ELISA indirecto con 300 ng de Fas2 y 300 ng de BSA, utilizando fagos que expresan diferentes VHHs (Anexo 2). De estos clones, 34 presentaron un ratio de absorbancia OD₄₅₀ Fas2/BSA superior a 6 (Figura 9). Posteriormente, se realizó un nuevo análisis, en el cual se verificó que 7 clones tenían un ratio mayor a 10. Además, estos clones mostraron una absorbancia superior a 1 frente a Fas2 y una señal baja frente a BSA (Tabla 9).

Se secuenciaron las 7 clonas, las cuales fueron curadas y alineadas a nivel de nucleótidos. El análisis reveló la presencia de dos grupos de secuencias de VHHs distintas: las clones 30, 38, 143, 181, 198 y 213 compartían la misma secuencia, mientras que la clona 89 presentó una secuencia diferente. A estas dos variantes se les asignaron los nombres VHH7 y VHH3, respectivamente.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de VHH7 y VHH3 (resultado no mostrado) evidenció un porcentaje de similitud del 80% y una identidad del 75%. Asimismo, la caracterización de las regiones estructurales permitió identificar los aminoácidos correspondientes a cada región funcional. La longitud de la secuencia de aminoácidos de los VHHs es 131 para el VHH7 y 127 para el VHH3, encontrándose que dentro de la secuencia la región CDR3 del VHH7 tiene 24 aminoácidos, mientras que el CDR3 del VHH3 tiene 20 aminoácidos. Las regiones FRs de ambos VHHs son muy conservadas en los VHHs.

La secuencia hipervariable de los CDRs de los VHHs es producida mediante mecanismos de hipermutación somática en los centros germinales donde ocurre la maduración de los anticuerpos por mayor afinidad hacia el antígeno, por ello son regiones de alta variabilidad en los VHHs, como se observa en los CDR3 donde la identidad fue 25% y la similitud 35.7% (tabla 10).

Por otra parte, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de ambos nanocuerpos considerando la longitud completa. VHH3 presentó un punto isoelectrico (pI) de 6.36 y un peso molecular de 16 491.31 Da, mientras que VHH7 mostró un pI de 6.64 y un peso molecular de 16 917.87 Da. Con respecto a la hidrofobicidad, VHH3 registró un valor de 35.95%, en tanto que VHH7 alcanzó 34.90%. Además, se calculó el perfil de hidrofobicidad y la proporción del tipo de residuos en la región CDR3 del VHH3 y VHH7, encontrándose que la hidrofobicidad es similar entre ambos VHHs (45 y 45.83% respectivamente), similar porcentaje de aminoácidos ácidos, y diferentes proporciones de los residuos neutros y básicos (Tabla 11). El perfil de hidrofobicidad de la longitud completa por residuos se muestra en la figura 10, donde se resaltan las principales diferencias en la región CDR3.

El alineamiento estructural entre los modelos tridimensionales de VHH3 y VHH7 muestra que ambas proteínas presentan una trayectoria conformacional similar (figura 11); no obstante, se observa una diferencia marcada en la región CDR3, donde VHH7 exhibe un CDR3 más largo que el CDR3 del VHH7 (representado en color morado). El valor de RMSD obtenido (0.149) indica un alto grado de similitud estructural, lo que confirma la homología entre ambos nanocuerpos.

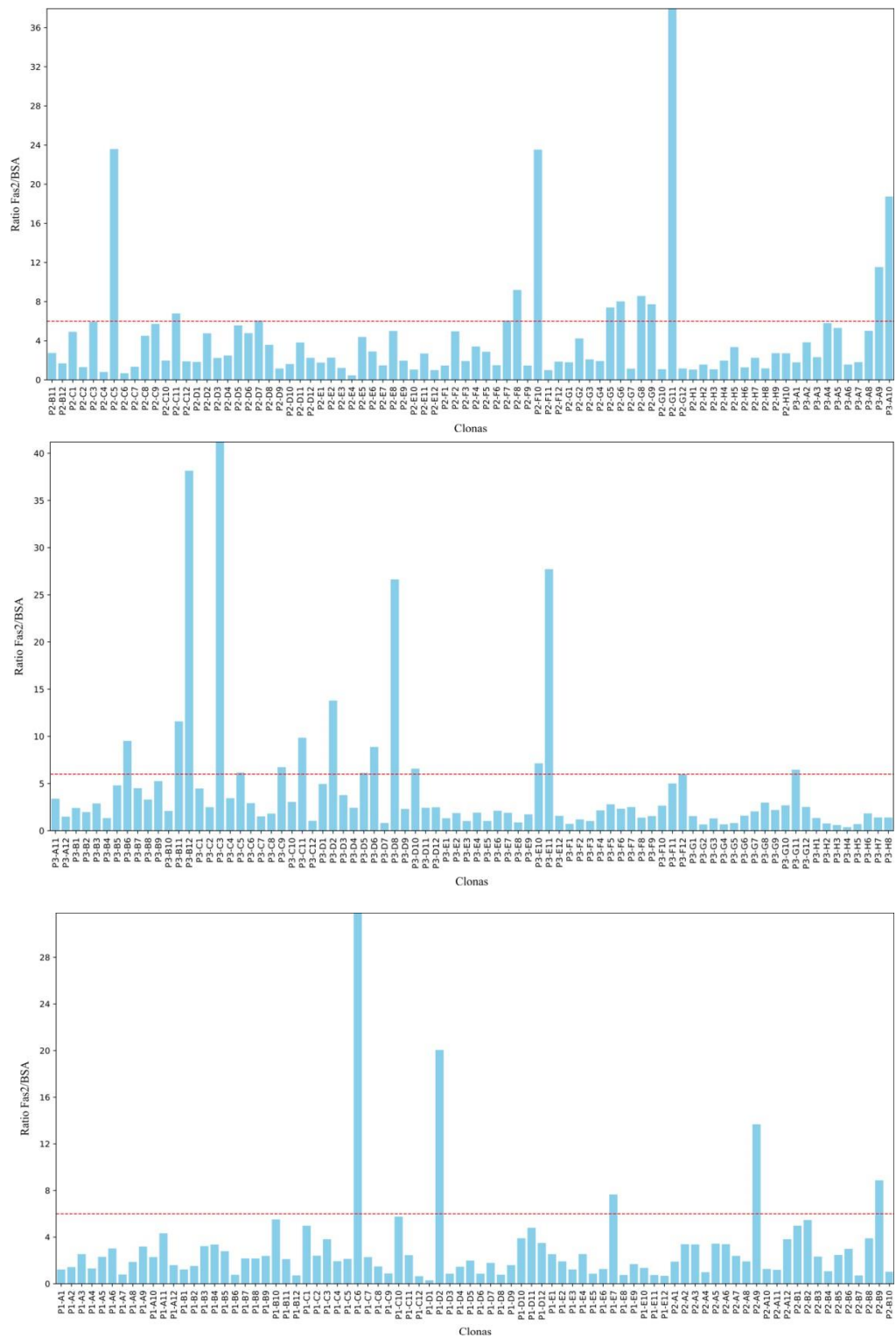


Figura 9. Screening de la librería de VHHs. 248 clonas se enfrentaron a Fas2 y BSA en un ensayo de ELISA, el punto de corte establecido del ratio Fas2/BSA fue 6.

Tabla 9. Segundo Phage ELISA de las clonas positivas. Siete clonas tienen un ratio de absorbancia Fas2/BSA mayor a 10

Código en pocillos	Número de clona	OD₄₅₀ Fas2	OD₄₅₀ BSA	Ratio Fas2/BSA
P1-C6	30	2.37	0.07	33.9
P1-D2	38	2.403	0.089	27.0
P1-E7	55	0.456	0.077	5.9
P2-A9	69	0.617	0.122	5.1
P2-B9	81	0.269	0.079	3.4
P2-C5	89	1.129	0.086	13.1
P2-C11	95	0.211	0.099	2.1
P2-D7	103	0.563	0.163	3.5
P2-F7	127	1.034	0.237	4.4
P2-F8	128	0.617	0.124	5.0
P2-F10	130	0.875	0.242	3.6
P2-G5	137	1.583	0.332	4.8
P2-G6	138	0.64	0.143	4.5
P2-G8	140	1.186	0.249	4.8
P2-G9	141	1.008	0.218	4.6
P2-G11	143	2.258	0.067	33.7
P3-A9	163	0.878	0.22	4.0
P3-A10	164	0.346	0.144	2.4
P3-B6	172	0.791	0.114	6.9
P3-B11	177	1.007	0.163	6.2
P3-B12	178	0.738	0.203	3.6
P3-C3	181	2.708	0.108	25.1
P3-C5	183	1.258	0.662	1.9
P3-C9	187	0.545	0.131	4.2
P3-C11	189	0.197	0.103	1.9
P3-D2	192	2.056	0.865	2.4
P3-D5	195	0.958	0.933	1.0
P3-D6	196	0.54	0.23	2.3
P3-D8	198	2.341	0.077	30.4
P3-D10	200	0.69	0.181	3.8
P3-E10	212	0.611	0.133	4.6
P3-E11	213	2.694	0.162	16.6
P3-F12	226	1.094	0.387	2.8
P3-G11	237	0.798	0.091	8.8

Tabla 10. Porcentaje de identidad y similitud entre las regiones CDRs y FRs del VHH3 y VHH7

	Identidad	Similaridad
FR1	92%	96%
CDR1	62.5%	62.5%
FR2	82.4%	82.4%
CDR2	50.0%	62.5%
FR3	84.2%	94.7%
CDR3	25.0%	35.7%
FR4	100%	100%

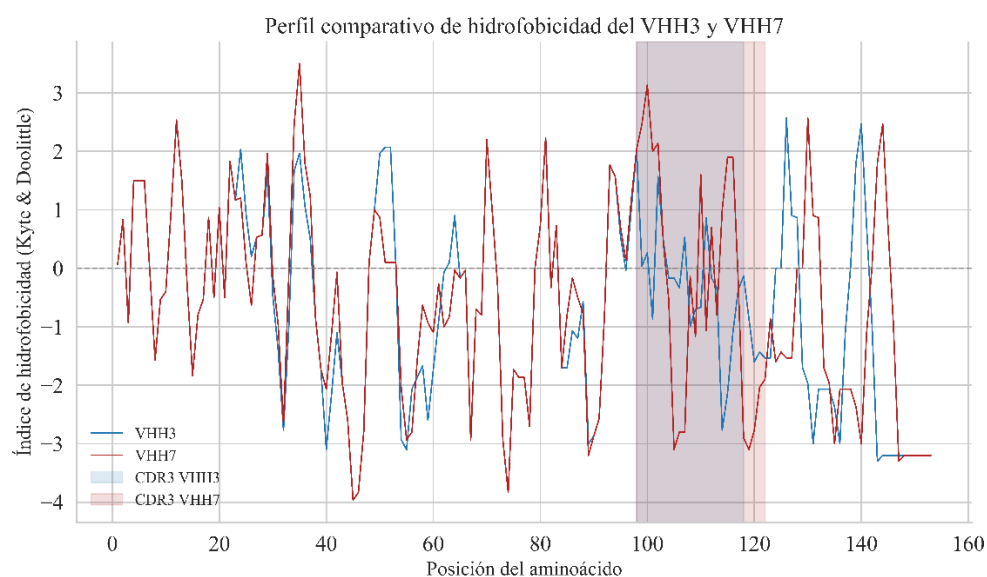


Figura 10. Perfil de hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos del VHH3 (línea azul) y VHH7 (línea roja). Barra azul (CDR3 de VHH3) y roja (CDR3 de VHH7).

Tabla 11. Parámetros fisicoquímicos de los residuos de aminoácidos del CDR3 del VHH7 y VHH3

PARÁMETROS	VHH3	VHH7
Hidrofobicidad	45%	45.83%
Ácido	15%	16.67%
Básico	0%	12.50%
Neutro	40%	25%

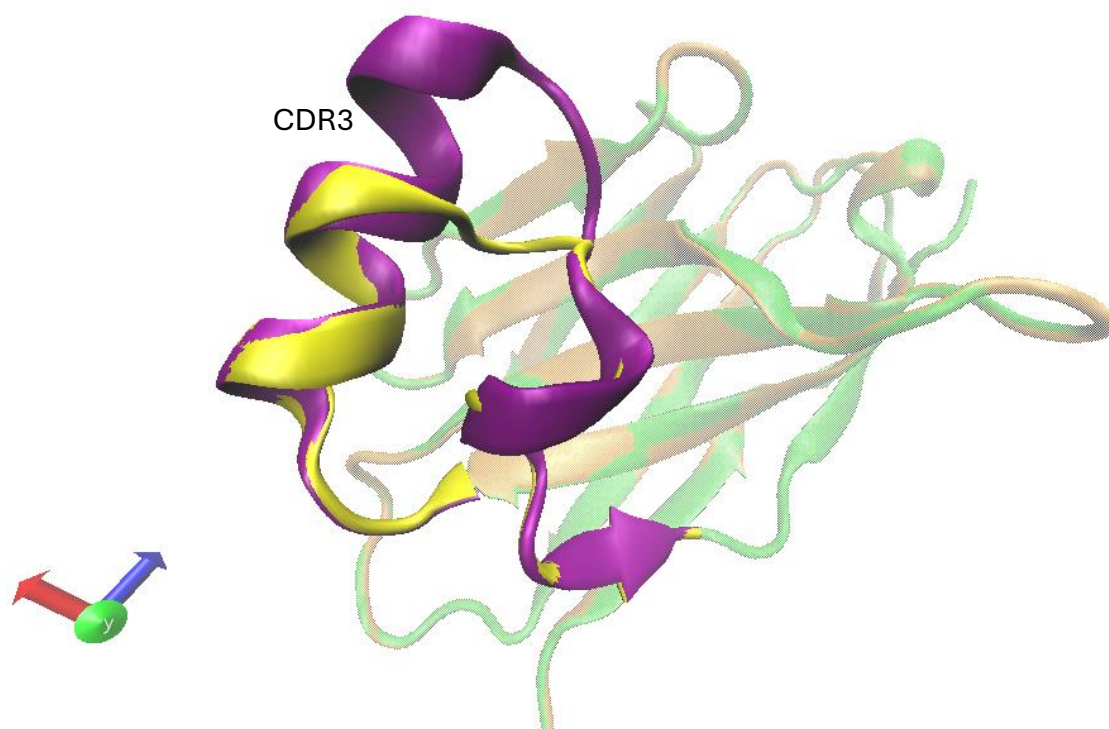


Figura 11. Representación en estado New Cartoon de la estructura tridimensional de VHH3 (Naranja) y VHH7 (Verde) y alineamiento estructural de las mismas. La región morada (VHH7) y amarilla (VHH3) representan el CDR3.

5.3 Clonación, expresión y purificación de los VHHs

Se amplificaron las secuencias de ambos VHH3 y VHH7 clonados en el vector pHEN2, obteniendo productos de PCR con los tamaños esperados de 523 pb y 535 pb para VHH3 y VHH7 respectivamente. (Figura 12). La digestión de los productos de PCR fue incompleta, ya que se detectaron dos bandas: una mayor a 500 pb y otra entre 500 pb y 400 pb (Figura 13). Para ambos VHHs, se purificó la banda de menor tamaño ya que corresponde al VHH digerido, las longitudes esperadas eran 417 pb para VHH3 y 429 pb para VHH7. Por otro lado, la digestión del plásmido pET22b mostró una banda entre 6557 pb y 4361 pb, la cual se purificó (Figura 14).

Los productos de amplificación de VHH3 y VHH7 digeridos fueron clonados en el vector pET22b y transformados en *E. coli* BL21 quimiocompetentes. El éxito de la clonación se verificó mediante PCR a partir de las colonias que crecieron en el agar LB con ampicilina. Las colonias analizadas contienen el inserto del VHH3, evidenciado por una banda entre 600 pb y 700 pb, correspondiente al tamaño esperado de 672 pb. Dos colonias presentaron el inserto del VHH7, se observó una banda 684 pb del producto de amplificación correspondiente a VHH7 (Figura 15).

Los VHHs fueron expresados en *E. coli* BL21 y purificados mediante cromatografía de afinidad usando resina con níquel. El gel de electroforesis del VHH7 purificada muestra una banda intensa entre 15-20 kDa, coincidiendo con el tamaño esperado de 16.8 kDa (Figura 16). El gel de la purificación del VHH3 muestra una banda tenue entre 15-20 kDa, correspondiente a su tamaño esperado 16.5 kDa (Figura 17).

Se cuantificó la concentración del VHH3 y VHH7 purificados a partir de la expresión de ambos VHHs en 100 ml de caldo LB con 0.15 mg/ml de ampicilina y 1 mM de IPTG, usado para la inducción de la expresión. Se encontró que el VHH7 tiene un rendimiento de producción por fermentación de 50 mg/L de cultivo, mientras que el VHH3 presentó una expresión significativamente menor, con solo 3 mg/L de cultivo (Anexo 3, Tabla 12).

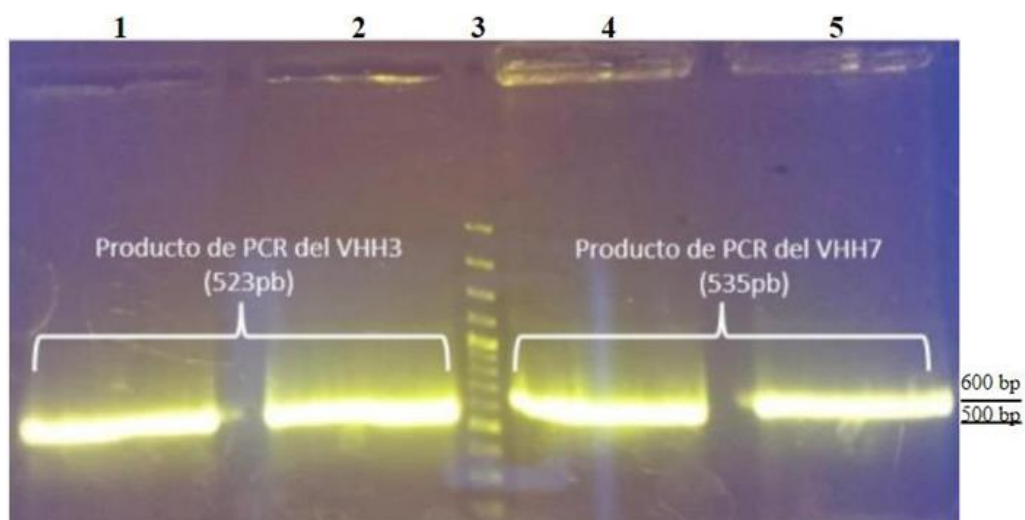


Figura 12. Electroforesis del producto de PCR de los VHHs. 1-2 (productos de PCR del VHH3), 3 (marcador de peso molecular 100 bp); y 4-5 (productos de PCR del VHH7).

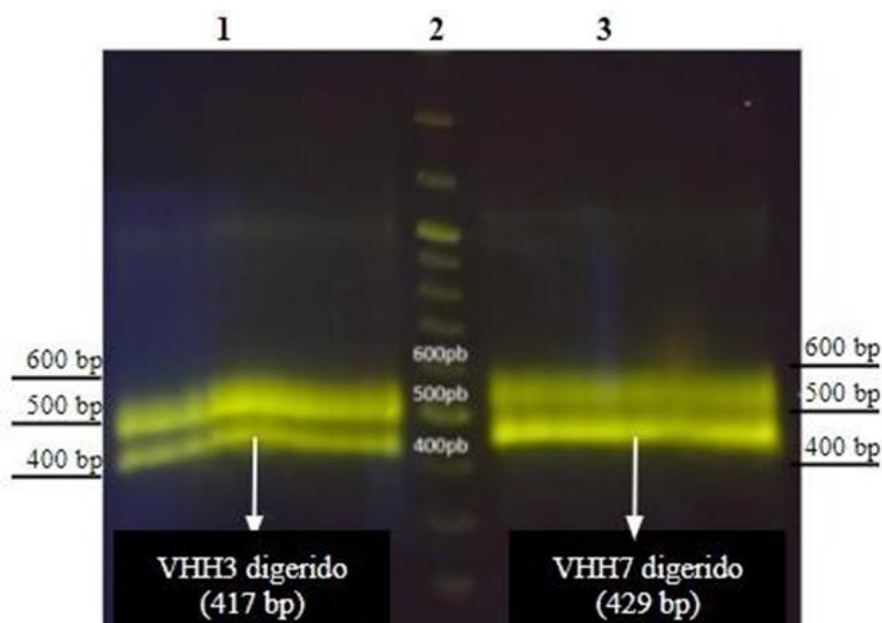


Figura 13. Electroforesis de la digestión enzimática del producto de PCR de los VHH. 1 (digestión del producto de PCR del VHH3), 2 (marcador de peso molecular 100 bp) y 3 (digestión del producto de PCR del VHH7).

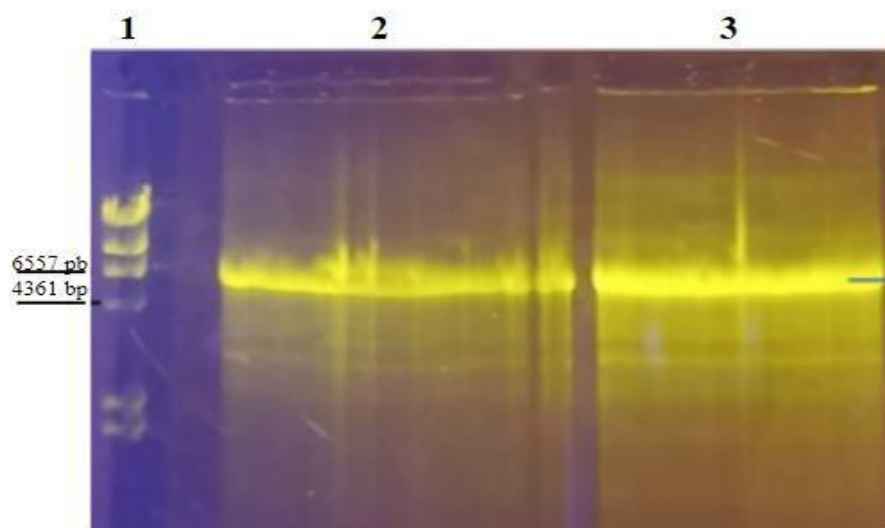


Figura 14. Electroforesis del producto de digestión del vector pET22b. 1 (marcador de peso molecular lambda/HindIII) y 2-3 (digestión del vector pET22b con las enzimas NotI y NcoI).

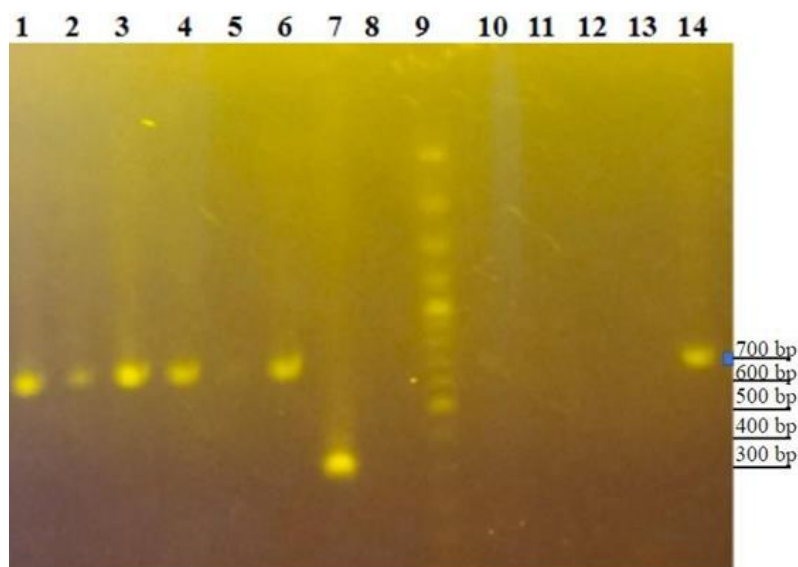


Figura 15. Electroforesis de la PCR colony. 1-6 (PCR de las colonias transformadas con el VHH3 ligado en el vector pET22b), 7 (PCR del vector pET22b), 8 (control negativo de PCR), 9 (marcador de peso molecular 100 bp) y 10-14 (PCR de las colonias transformadas con el VHH7 ligado al vector pET22b).

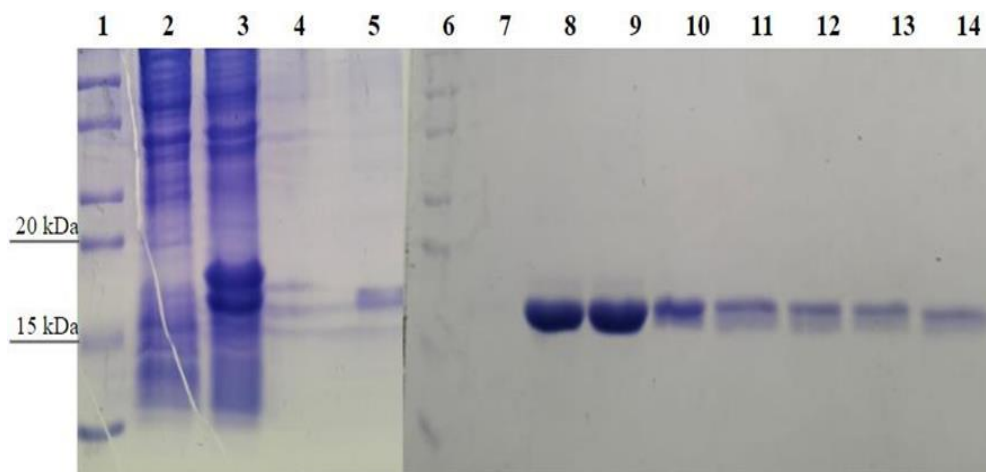


Figura 16. Expresión y purificación del VHH7. 1 y 6 (marcador de proteínas), 2 (pellet antes de la inducción con IPTG), 3 (pellet después de la inducción con IPTG), 4 (sobrenadante antes de la inducción con IPTG), 5 (sobrenadante después de la inducción con IPTG), 7 (eluido después del lavado) y 8-14 (fracciones de la purificación del VHH7).

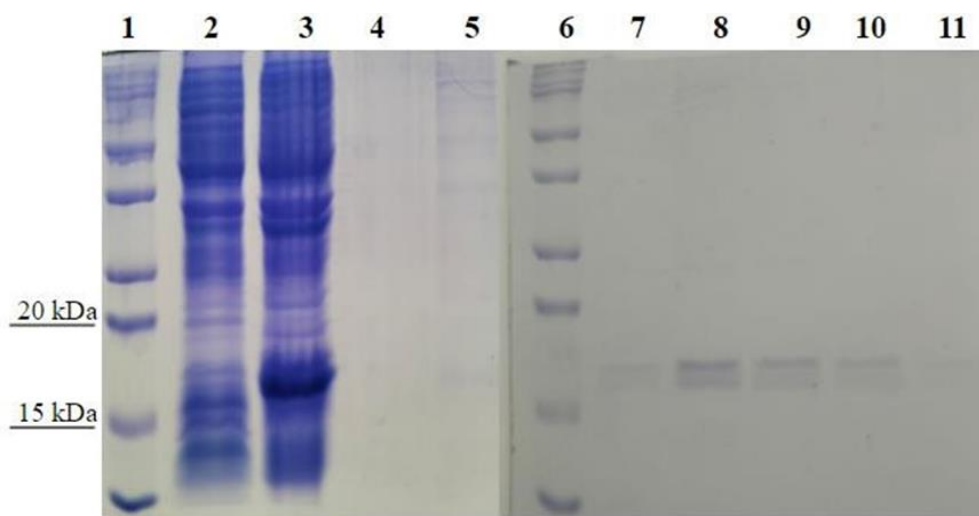


Figura 17. Expresión y purificación del VHH3. 1 y 6 (marcador de proteínas), 2 (pellet antes de la inducción con IPTG), 3 (pellet después de la inducción con IPTG), 4 (sobrenadante antes de la inducción con IPTG), 5 (sobrenadante después de la inducción con IPTG) y 7-11 (fracciones de la purificación del VHH3).

Tabla 12. Rendimiento de los VHHs. Los VHHs se cuantificaron mediante Bradford. La expresión se realizó en 100 ml de caldo LB con 0.15 mg/ml de ampicilina, y la purificación se realizó con 2 ml de resina de níquel-agarosa.

VHH	Volumen de expresión (ml)	Cantidad de proteína purificada (mg)	Rendimiento (mg/L)
VHH3	100	0.297	2.97
VHH7	100	4.979	49.79

5.4 Medición de la afinidad de los VHHs

Debido a que se encontraron otros péptidos en el gel de electroforesis de la proteína Fas2 purificada, mediante Western Blot se confirmó que VHH3 y VHH7 unen a la proteína Fas2. La reacción positiva se evidenció por la presencia de una banda a la altura de 25 kDa, que corresponde al tamaño de Fas2. La intensidad de la tira de nitrocelulosa transferida con Fas2 fue mayor cuando está se enfrentó al VHH3 en comparación que con el VHH7 (Figura 18), lo que sugiere una interacción más eficiente bajo estas condiciones experimentales. Además, ninguno de los VHHs reconoció las proteínas de bajo peso molecular que se co-purificaron con Fas2.

La afinidad de los VHHs hacia Fas2 se evaluó mediante ensayos de unión, revelando diferencias de la afinidad entre ambos VHHs (Anexo 4 y 5). El VHH7 alcanzó saturación a una menor concentración de Fas2 en comparación con el VHH3, lo que indica una mayor afinidad. Además, la absorbancia máxima fue superior para el VHH7 en comparación con el VHH3, reflejando una mayor capacidad de unión (Figuras 19 y 20). Los valores de K_D obtenidos a partir del

análisis de Scatchard confirmaron esta diferencia, con $K_D=5\times 10^{-9}$ M para el VHH7 y $K_D=2\times 10^{-8}$ M para el VHH3.

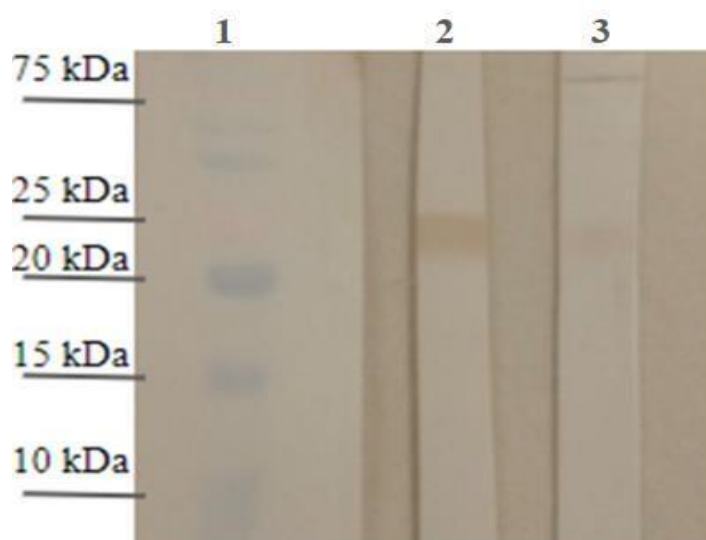


Figura 18. Western Blot para evaluar el reconocimiento a Fas2. 1 (marcador de proteínas Dual Color), 2 (Fas2 enfrentado al VHH3), 3 (Fas2 enfrentado al VHH7).

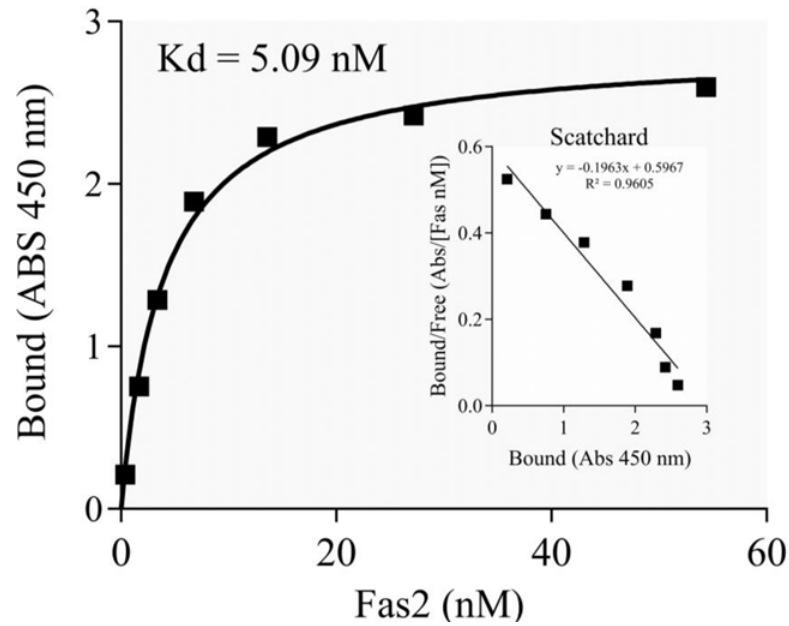


Figura 19. Plot de Scatchard del VHH7. Diferentes concentraciones de la proteína Fas2 se enfrentaron a una concentración del VHH7. La absorbancia (“bound”) es la cantidad de Fas2 unido al VHH, “free” representa la concentración de Fas2 y el cociente “Bound/Free” es el VHH unido para una cantidad dada de Fas2.

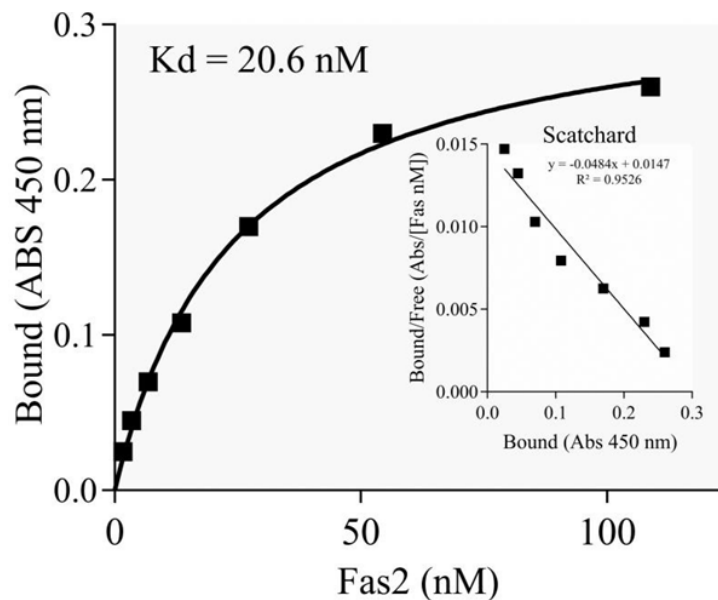


Figura 20. Plot de Scatchard del VHH3. Diferentes concentraciones de la proteína Fas2 se enfrentaron a una concentración del VHH7. La absorbancia (“bound”) es la cantidad de Fas2 unido al VHH, “free” representa la concentración de Fas2 y el cociente “Bound/Free” es el VHH unido para una cantidad dada de Fas2.

5.5 Conjugación del VHH7 a las partículas de TiO₂

Se seleccionó el VHH7 para la conjugación, debido a su mayor expresión y afinidad por Fas2. La conjugación de TiO₂ con VHH7 se llevó a cabo utilizando diferentes proporciones (TiO₂:VHH7), y la eficiencia del proceso se evaluó mediante la cuantificación del VHH7 libre en el sobrenadante (Anexo 6). Los resultados indicaron que a medida que se incrementa la proporción de VHH7, la eficiencia de conjugación disminuye progresivamente. Con un ratio de 1:0.5, se alcanzó una eficiencia del 65.3%, mientras que con un ratio de 1:1 esta se redujo al 55.5%. Al aumentar la proporción de VHH7 a 1:2, la eficiencia disminuyó a 46.4%, y continuó reduciéndose a 36.9% y 33.9% para los ratios de 1:3 y 1:4, respectivamente (Figura 21).

Se realizó una curva de saturación para evaluar la unión del VHH7 a las nanopartículas de TiO₂, utilizando el anticuerpo AntiPentaHis-HRP para detectar el VHH7 conjugado. La Figura 22 muestra que, con los ratios iniciales (1:0.5 y 1:1), la absorbancia aumentó de manera lineal, indicando un incremento proporcional en la cantidad de VHH7 unido al TiO₂. Sin embargo, al aumentar la proporción de VHH7 (ratios 1:2, 1:3 y 1:4), la tasa de incremento de la absorbancia se redujo, generando una curva con tendencia hiperbólica. Aunque no se alcanzó la saturación completa en los ratios evaluados, los resultados sugieren que la capacidad de unión del TiO₂ comienza a aproximarse a un límite.

Se realizó una electroforesis con 20 μg de partículas conjugadas al VHH7 para todos los ratios evaluados. En la figura 23 se observa la presencia del VHH7 en todos los carriles, lo que confirma su adsorción a las partículas de TiO_2 . Además, se evidencia un incremento en la cantidad de VHH7 unido a medida que aumenta la proporción en el proceso de conjugación.

Los resultados del análisis por FTIR mostraron que el TiO_2 sin conjugar presenta un pico grande y ancho alrededor de 667 cm^{-1} , un pico pequeño a 1649 cm^{-1} y otro pequeño y ancho alrededor de 3307 cm^{-1} . En contraste, el conjugado TiO_2 -VHH7 presentó un pico grande a 667 cm^{-1} , picos medianos a 1064 cm^{-1} y 2983 cm^{-1} , así como picos adicionales a 1247 cm^{-1} , 1388 cm^{-1} , 1523 cm^{-1} , 1629 cm^{-1} , 2893 cm^{-1} y 3660 cm^{-1} (Figura 24). Estos cambios en el espectro sugieren modificaciones en la superficie del TiO_2 tras la conjugación con el VHH7.

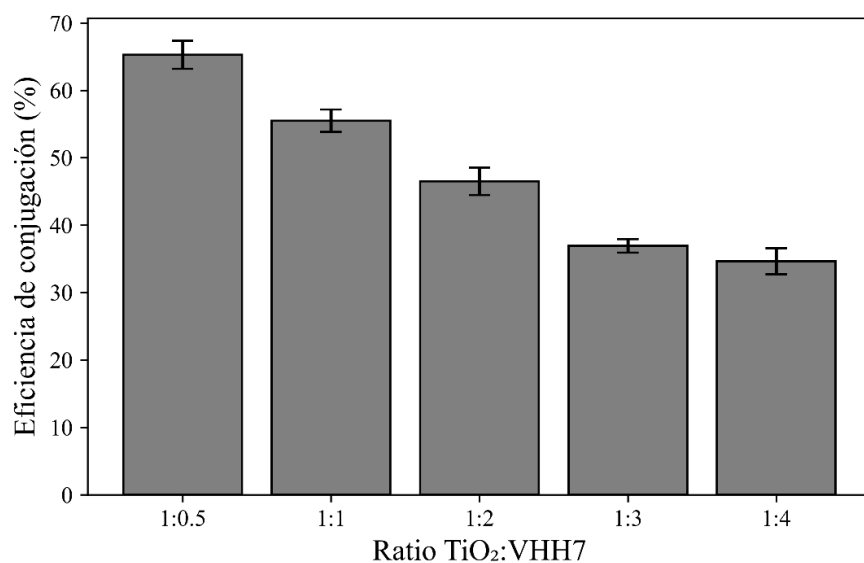


Figura 21. Eficiencia de conjugación del VHH7 a las nanopartículas de TiO₂. Se realizó la conjugación del TiO₂ con diferentes proporciones del VHH7 y se realizó la cuantificación del VHH7. La eficiencia de conjugación se determinó de acuerdo con la sección 4.4.4.1.

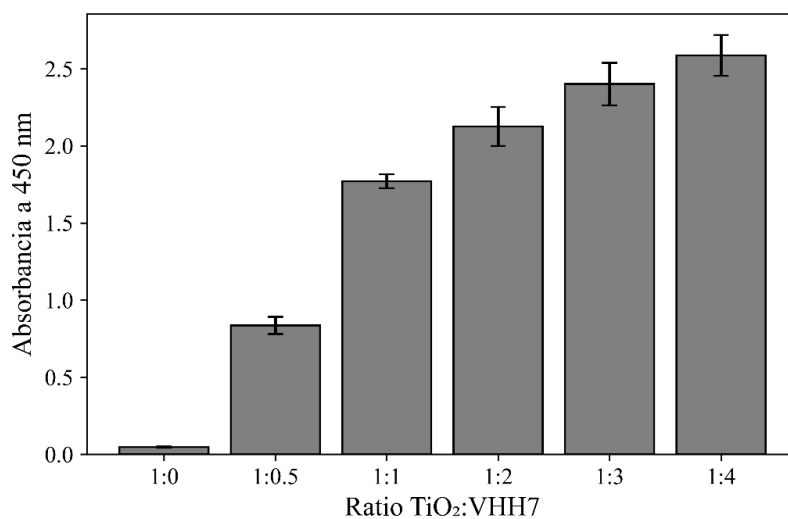


Figura 22. Curva de saturación del VHH7 unido al TiO₂. Se determinó la cantidad del VHH7 unido a las partículas de TiO₂ por el reconocimiento del anticuerpo AntiPentaHis- HRP al VHH7.

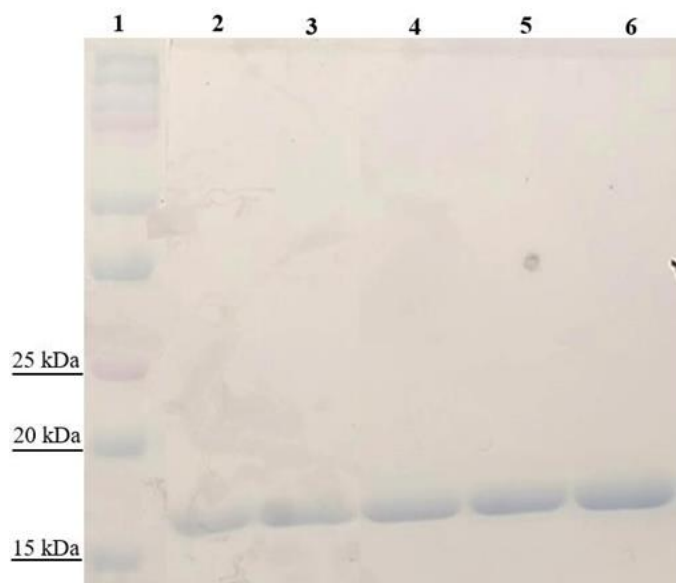


Figura 23. SDS-PAGE de la conjugación con diferentes ratios TiO_2 :VHH7. 1 (marcador Dual Color), 2 (20 μg de partículas del ratio 1:0.5), 3 (20 μg de partículas del ratio 1:1), 4 (20 μg de partículas del ratio 1:2), 5 (20 μg de partículas del ratio 1:3) y 6 (20 μg de partículas del ratio 1:4).

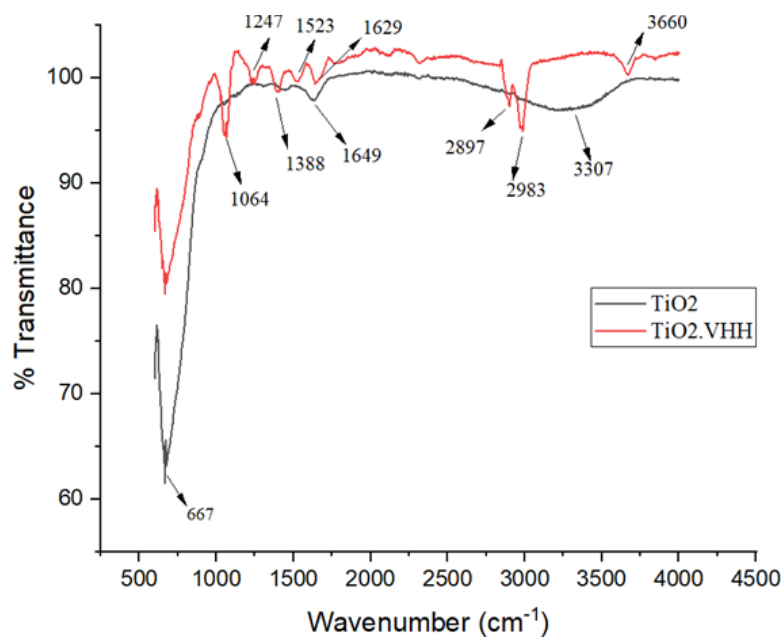


Figura 24. Espectroscopia de adsorción del TiO_2 sin conjugar y del conjugado TiO_2 - VHH7.

5.6 Caracterización del conjugado TiO₂-VHH7

Se evaluó el tamaño y la polidispersidad de las partículas de TiO₂ antes y después de la conjugación con VHH7 (Anexo 7). Las partículas de TiO₂ sin conjugar presentaron un tamaño hidrodinámico promedio de 569 nm y un índice de polidispersidad de 0.323, mientras que las partículas conjugadas con VHH7 mostraron un aumento en el tamaño promedio a 711.2 nm y una reducción en la polidispersidad a 0.233.

Para determinar la estabilidad del conjugado, se incubaron las partículas en medio de cultivo RPMI a 37 °C durante 72 horas y se analizaron mediante electroforesis en gel. No se observaron diferencias en la intensidad de la señal correspondiente al VHH7 unido a TiO₂ en comparación con el tiempo 0, ello indica que el conjugado se mantiene estable en estas condiciones (Figura 25).

Se evaluó la funcionalidad del conjugado TiO₂-VHH7 en el reconocimiento de Fas2 mediante ensayos de unión partícula conjugada y ligando. El conjugado fue incubado con Fas2 y luego con suero positivo y negativo para fascioliasis. Los resultados muestran que el conjugado TiO₂-VHH7 reconoce Fas2, evidenciado por una alta absorbancia cuando se incubó con el suero positivo y una baja absorbancia con el suero negativo (Figura 26). Asimismo, el conjugado TiO₂-VHH7 incubado con BSA mostró una señal positiva con el suero positivo, pero no con el suero negativo. En contraste, las partículas de TiO₂ bloqueadas sólo con BSA e incubadas con Fas2 no mostraron reacción con ninguno de los sueros, lo que confirma la especificidad a Fas2.

Se midió la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generada por el conjugado TiO_2 - VHH7 en función de la concentración de TiO_2 y del tiempo de exposición a luz UV. Al exponer diferentes concentraciones del conjugado TiO_2 -VHH (entre 0.5 y 10 mg/ml) a luz UV durante 10 minutos, se observó que la producción de H_2O_2 es dependiente de la concentración: a mayor concentración de TiO_2 , mayor generación de H_2O_2 (Figura 27). Asimismo, al exponer una concentración fija de 1 mg/ml del conjugado TiO_2 -VHH7 a luz UV en un rango de 0 a 60 minutos, se encontró que la producción de H_2O_2 aumenta progresivamente con el tiempo de exposición. Un comportamiento similar se observó en las partículas de TiO_2 sin conjugar, evidenciando que la capacidad de generar H_2O_2 se mantiene en ambas condiciones (Figura 28).

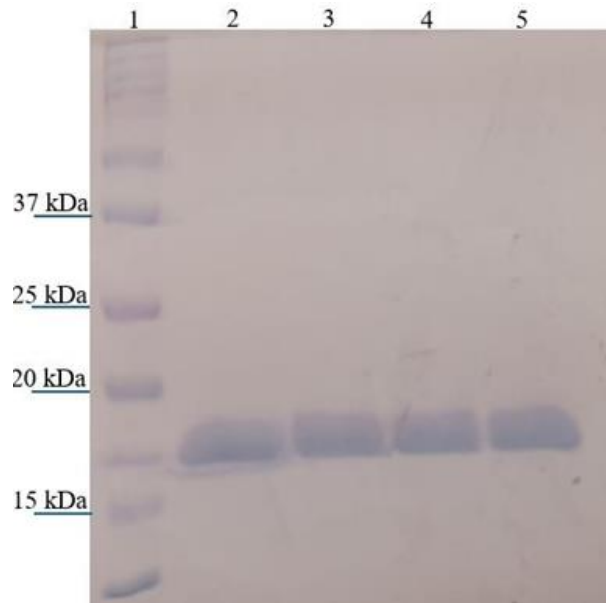


Figura 25. Estabilidad del conjugado en medio de cultivo RPMI. Se corrió 50 μ g del conjugado TiO_2 -VHH en todos los carriles. 1 (marcador de proteínas Dual Color), 2 (0 horas), 3 (24 horas de incubación en RPMI), 4 (48 horas de incubación en medio RPMI) y 5 (72 horas de incubación en medio RPMI).

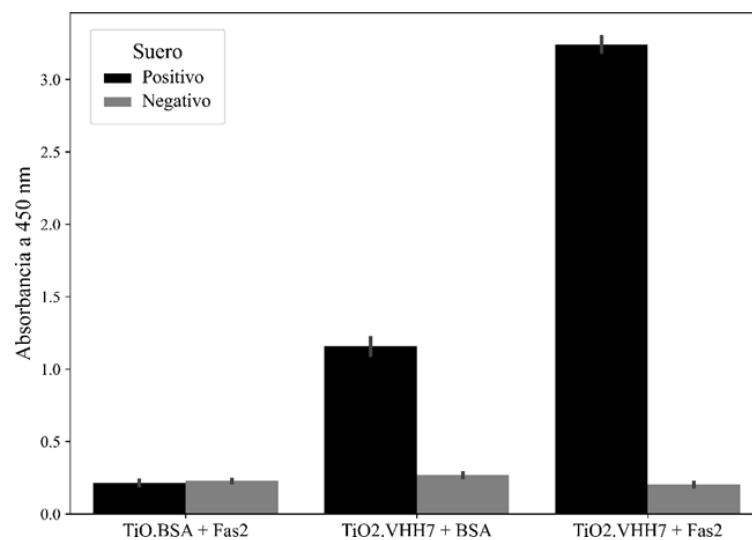


Figura 26. Caracterización de la funcionalidad del conjugado TiO_2 -VHH7 en el reconocimiento de Fas2. Las partículas de TiO_2 conjugadas con el VHH7 se enfrentaron a Fas2 y BSA, después a sueros positivos y negativos para fascioliasis humana.

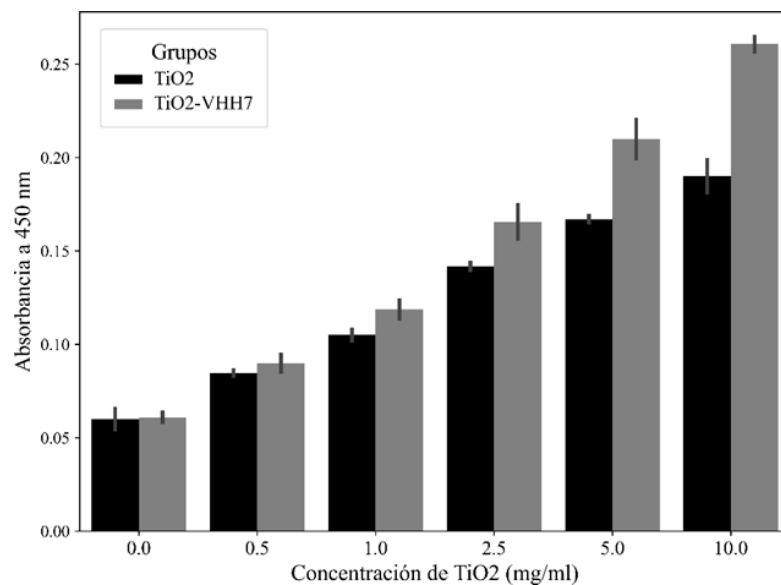


Figura 27. Concentración de TiO₂ y producción de H₂O₂. En este sistema la exposición del TiO₂ a luz UV produce H₂O₂ que en presencia de HRP llevan a la oxidación del TMB. La reacción se realizó en 50 µl de diferentes concentraciones de TiO₂.

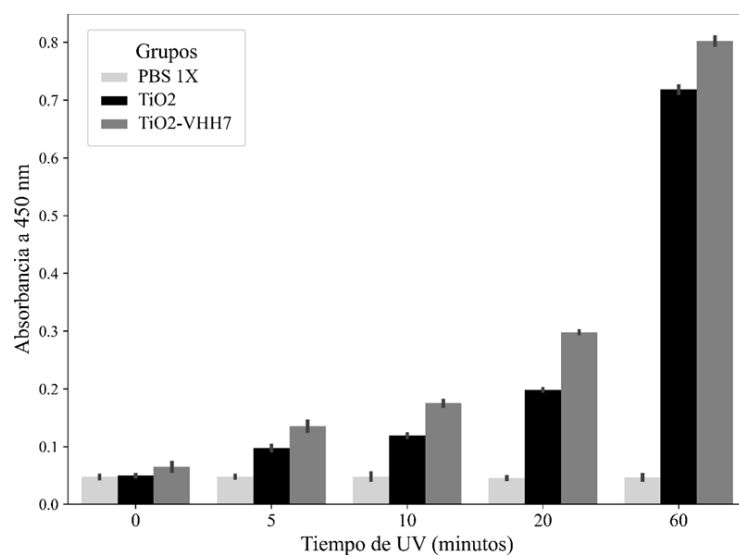


Figura 28. Tiempo de exposición a luz ultravioleta y producción de H₂O₂. La oxidación del TMB se produce por la presencia de H₂O₂ que es generado por las nanopartículas después de la exposición a luz UV. La reacción se realizó en 50 µl de TiO₂ (1 mg/ml).

5.7 Efecto del conjugado en la viabilidad y generación de peroxidación lipídica en *F. hepatica*

5.7.1 Evaluación del tiempo de incubación de *F. hepatica* con el conjugado

Se evaluó el efecto del tiempo de incubación de *F. hepatica* con el conjugado TiO₂ (0.5 mg/ml)-VHH7 previo a la exposición a luz UV, utilizando el movimiento de los parásitos como indicador de viabilidad y la cuantificación de MDA como marcador de peroxidación lipídica (Anexo 11).

Con respecto a la concentración de MDA, a las 12 horas se encontró que el grupo incubado durante 6 horas con el conjugado y posteriormente expuesto a UV tiene una concentración de MDA mayor ($p < 0.05$) en comparación al grupo de *F. hepatica* expuesto a luz UV y al grupo tratado con partículas no conjugadas expuesto a UV. Por otro lado, el grupo incubado durante 2 horas con el conjugado expuesto a UV no presentó diferencias significativas respecto al grupo de *F. hepatica* expuesto a luz UV. Además, no se encontró diferencias estadísticamente significativas del movimiento entre los grupos de experimentación en todos los tiempos (figura 29).

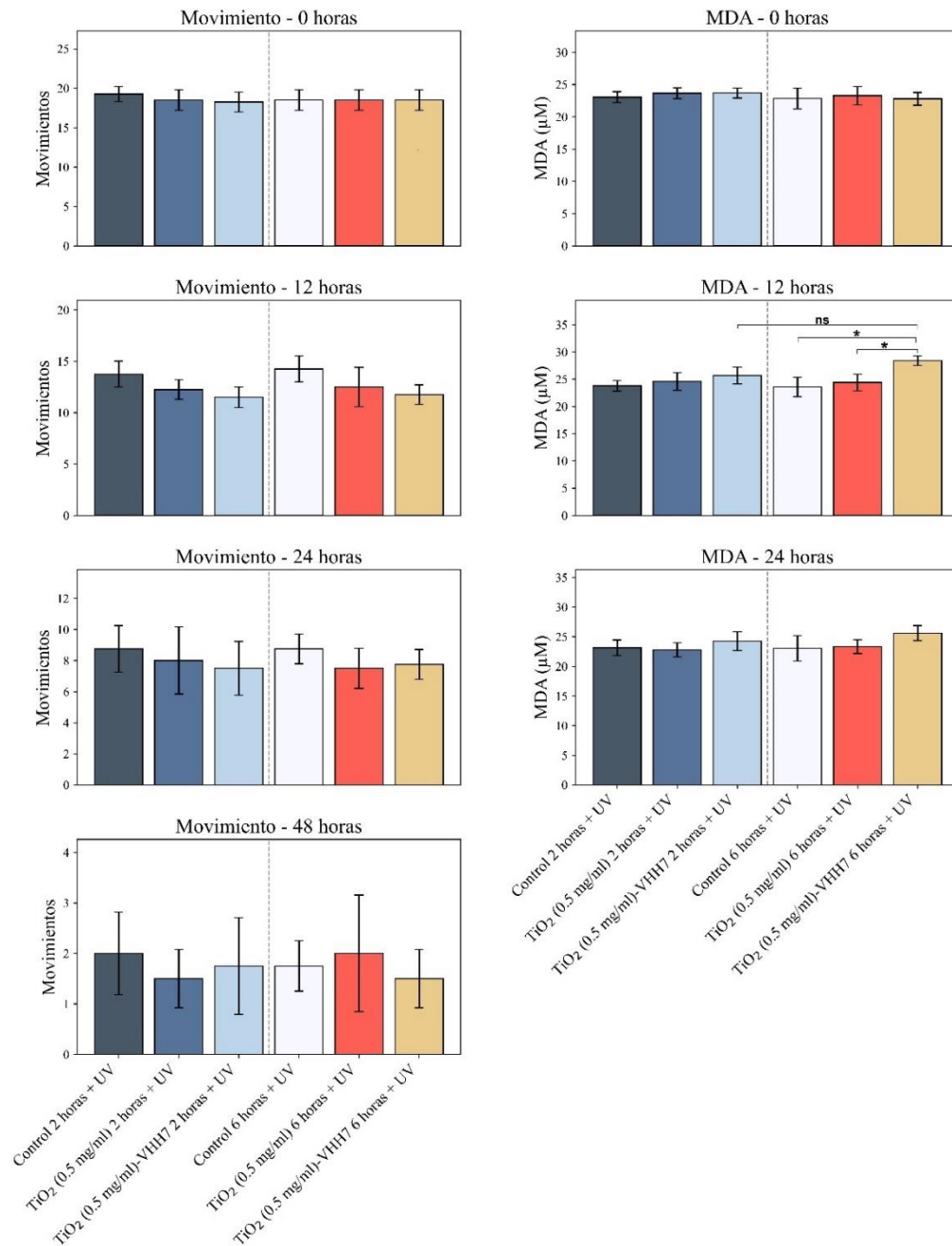


Figura 29. Efecto del tiempo de incubación de *F. hepatica* con el conjugado antes de la exposición a la luz UV. Se incubaron los parásitos adultos con 0.5 mg/ml de TiO₂ y con el conjugado TiO₂-VHH7 durante 2 y 6 horas, después de este tiempo los parásitos se expusieron a luz UV. ns (no significativo), * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001). Se midió el movimiento de los parásitos y la concentración de MDA según se describe en la metodología.

5.7.2 Evaluación de la concentración del conjugado en la viabilidad y peroxidación lipídica de *F. hepatica*

F. hepatica fue incubada con el conjugado TiO₂-VHH7 a diferentes concentraciones de partícula de TiO₂ (1 y 2.5 mg/ml) con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración sobre la viabilidad y la peroxidación lipídica (Anexo 12).

Con relación al movimiento, a las 12 horas de incubación, el grupo tratado con el conjugado TiO₂-VHH7 a una concentración de 2.5 mg/ml y expuesto a luz UV presentó un menor movimiento ($p < 0.05$) en comparación al grupo de *F. hepatica* expuesto a luz UV y al grupo tratado con TiO₂ sin conjuguar (2.5 mg/ml) expuesto a UV. En contraste, el grupo tratado con el conjugado TiO₂-VHH7 (1 mg/ml) expuesto a luz UV no mostró diferencias significativas con el grupo control de *F. hepatica* expuesto a luz UV, ni con el grupo incubado con TiO₂ sin conjuguar (1 mg/ml) expuesto a luz UV.

En cuanto a la peroxidación lipídica, a las 12 horas, los grupos tratados con el conjugado TiO₂-VHH7 a concentraciones de 1 y 2.5 mg/ml y expuestos a luz UV presentaron niveles de MDA significativamente mayores en comparación con el grupo bajo radiación UV sin tratamiento, así como con los grupos tratados con TiO₂ sin conjuguar a las mismas concentraciones bajo exposición a luz UV. Además, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de *F. hepatica* incubados con las diferentes concentraciones del conjugado expuestos a luz UV (figura 30).

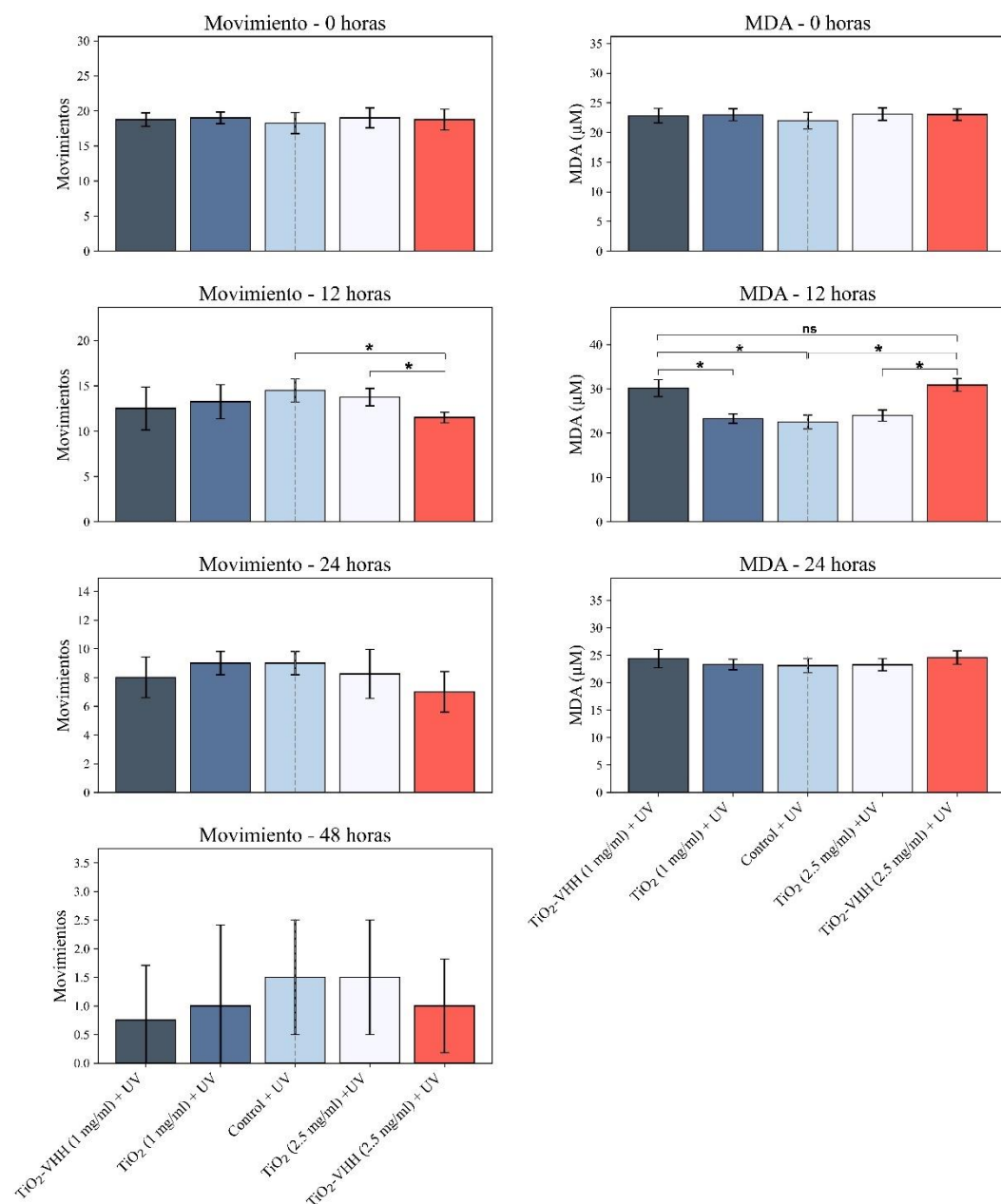


Figura 30. Ensayo *in vitro* con diferentes concentraciones de TiO₂. Se incubaron los parásitos adultos con 1 y 2.5 mg/ml de TiO₂ y con el conjugado TiO₂-VHH7 durante 6 horas, después de este tiempo los parásitos se expusieron a luz UV. ns (no significativo), * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001). Se midió el movimiento de los parásitos y la concentración de MDA según se describe en la metodología

5.7.3 Efecto de la partícula de TiO₂ conjugada con el VHH7 sobre *F. hepatica* en cultivo.

Fasciola hepatica fue incubada con el conjugado TiO₂-VHH7 a concentración de partícula de TiO₂ 1 mg/ml con el objetivo de evaluar el efecto del conjugado sobre la viabilidad y la peroxidación lipídica (Anexo 13 y 14). Se incluyó un grupo tratado con Triverfén® como control positivo.

Los resultados muestran que la luz UV por sí sola no influye en el movimiento ni en la peroxidación lipídica de *F. hepatica*. Además, las partículas de TiO₂ sin conjugar tampoco influyen en la viabilidad ni en la concentración de MDA. Por otro lado, el grupo de *F. hepatica* incubado con Triverfén® tuvo un menor movimiento y una mayor concentración de MDA en comparación con el control grupo de *F. hepatica* control en todos los tiempos de medición post-tratamiento ($p < 0.001$).

El grupo de *F. hepatica* incubado con TiO₂ sin conjugar y expuesto a luz UV tuvo menor movimiento en comparación al grupo control uveado a las 12 horas post-tratamiento ($p < 0.05$). El grupo de *F. hepatica* incubado con el conjugado y posteriormente expuesto a luz UV tuvo un menor movimiento promedio en comparación con el grupo control expuesto a luz UV tanto a las 12 horas y 24 horas post-tratamiento siendo el porcentaje de disminución del movimiento 17% ($p < 0.01$) y 24% ($p < 0.01$) respectivamente (Anexo 15). No se encontró diferencias significativas del movimiento de los parásitos entre los grupos de *F. hepatica*

incubados con TiO₂ conjugado y sin conjugar expuestos a luz UV en ningún tiempo de post-tratamiento (Anexo 15).

El grupo de *F. hepatica* tratado con el conjugado en combinación con la luz UV tuvo una concentración de MDA mayor ($30.25 \pm 0.99 \mu\text{M}$) al grupo control irradiado con UV ($23.81 \pm 1.16 \mu\text{M}$) a las 12 horas ($p < 0.001$) y a las 24 horas ($p < 0.05$). También, tuvo una mayor concentración de MDA en comparación al grupo de *F. hepatica* incubado con TiO₂ sin conjugar y expuesto a luz UV tanto a las 12 horas ($p < 0.001$) como las 24 horas ($p < 0.01$) (Anexo 16). El grupo incubado con TiO₂ sin conjugar y expuestas a luz UV no mostraron diferencias significativas en la concentración de MDA en comparación con el grupo de *F. hepatica* sometido a radiación UV (Figura 31).

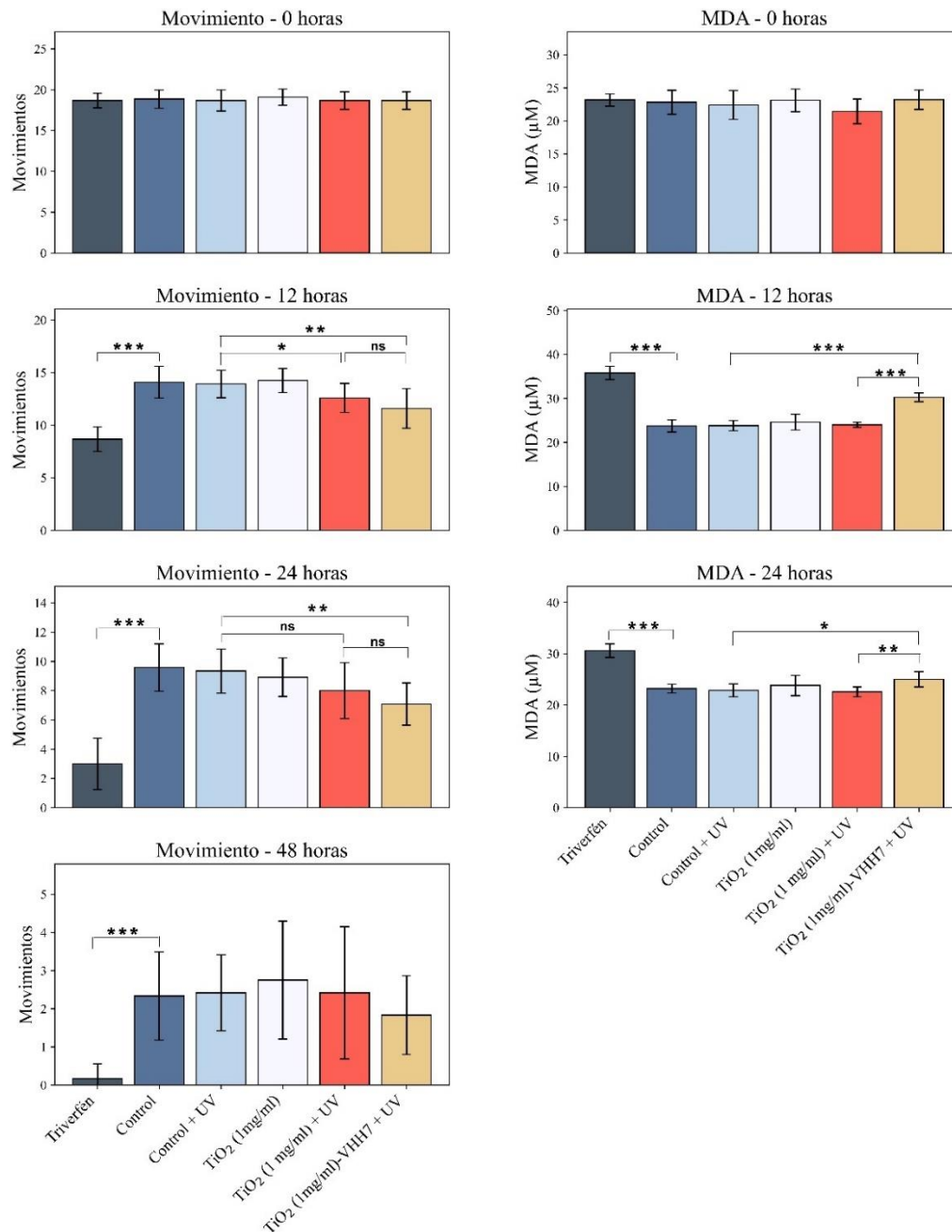


Figura 31. Efecto del conjugado TiO₂-VHH7 en el movimiento y la peroxidación lipídica de parásitos adultos de *F. hepatica*. Se incubaron los parásitos con el VHH7, 1 mg/ml de TiO₂ y con el conjugado TiO₂-VHH7 durante 6 horas, después de este tiempo las *F. hepatica* se expusieron a luz UV. ns (no significativo), * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001). Se midió el movimiento de los parásitos y la concentración de MDA según se describe en la metodología

VI. DISCUSIÓN

La investigación realizada se dirige a evaluar la capacidad de fotoletalidad de las partículas de TiO₂ conjugadas con el nanocuerpo (VHH7) anti-Fas2 irradiadas con luz UV (254 nm) sobre la viabilidad parásitos adultos de *F. hepatica* en ensayos *in vitro*. El nanocuerpo VHH7 fue clonado a partir de una biblioteca de cDNAs de VHH anti Fas2 producida a partir de los mRNA aislados de linfocitos de una alpaca inmunizada con E/S de *F. hepatica* previamente construida en la Unidad de Biotecnología Molecular (UBM) de UPCH. A partir de esta biblioteca, se analizaron 248 colonias y mediante la técnica de Phage-ELISA, se obtuvieron 7 colonias positivas que reconocen Fas2 y que no se unen de manera inespecífica a la proteína no relacionada (BSA), con un ratio de absorbancia a 450 nm Fas2/BSA mayor a 10 en Phage-ELISA. De las 7 colonias, 6 presentaban una secuencia idéntica de aminoácidos (VHH7) y la restante (VHH3) presentaba variaciones de aminoácidos en las regiones FRs y CDRs. La alta representatividad de VHH7 anti-Fas2 podría deberse a la alta inmunogenicidad del epítipo que reconoce en Fas2 en un proceso de inmunización con los antígenos de *F. hepatica*. Fas2 es utilizado como un marcador de inmunodiagnóstico de fascioliasis humana y animal debido a su alta inmunogenicidad.

Los valores de las constantes de afinidad de los VHHs por el antígeno Fas2 se encuentran dentro del rango de valores reportados para otros VHHs en la unión a sus respectivos antígenos reportados en la literatura (99,100). El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de VHH7 y VHH3 mostró un 75% de identidad y un 80% de similitud, particularmente en las regiones FR

(Framework regions) que son altamente conservados porque cumplen la función de plegarse de tal modo que posicionan las regiones hipervariables CDRs que se unen a epítopos específicos del antígeno Fas2. Los valores de homología entre ambos nanocuerpos corresponden a las características estructurales conservadas y en menor medida a las regiones hipervariables de unión de estos VHHs al antígeno Fas2. El análisis reveló que las regiones FRs están altamente conservadas entre ambos VHHs, mientras que las regiones CDRs presentan una baja homología como corresponde. Los resultados experimentales *in vitro* evidencian que VHH7 presenta una mayor afinidad hacia dicho antígeno. Esta diferencia funcional se debe a las diferencias estructurales y fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos en las tres regiones hipervariables CDRs, principalmente de la región CDR3.

En primer lugar, el alineamiento reveló que VHH7 posee cuatro aminoácidos adicionales en la región CDR3 que resulta en una mayor longitud de esta región. Un CDR3 más extendido podría facilitar un contacto más profundo con el epítipo del antígeno, especialmente si este se encuentra localizado en un surco o cavidad de la estructura terciaria de Fas2, permitiendo la formación de un mayor número de interacciones no covalentes entre CDR3 y el antígeno Fas2. Por el contrario, la menor longitud del CDR3 de VHH3 presentaría un número menor de interacciones entre su CDR3 y el epítipo en Fas2, lo cual podría resultar en una menor afinidad por el antígeno Fas2.

En segundo lugar, el análisis fisicoquímico de la región CDR3 evidenció diferencias en la composición de residuos neutros y básicos entre ambos nanocuerpos. Mientras que el CDR3 del VHH3 carece completamente de residuos básicos (0%), el de VHH7 presenta un 12.5%. Dado que los residuos básicos pueden participar en interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno con residuos cargados del antígeno, su ausencia en VHH3 podría reducir la capacidad de establecer interacciones de unión. Asimismo, el CDR3 del VHH3 presenta un porcentaje mayor de residuos neutros (40% frente a 25% en VHH7), lo que podría limitar aún más la diversidad de interacciones posibles durante el reconocimiento molecular. Sin embargo, para entender cabalmente las diferencias en la afinidad de estos VHHs por Fas2 se requiere identificar los epítopes en Fas2 a lo que se unen VHH3 y VHH7.

En conjunto, estas diferencias estructurales y fisicoquímicas sugieren que la menor afinidad observada en VHH3 podría estar relacionada con la menor longitud de su CDR3 y la limitada presencia de residuos capaces de participar en interacciones específicas con Fas2. Estos hallazgos refuerzan la importancia de las características del CDR3 en la determinación de la afinidad y especificidad de los nanocuerpos. Finalmente, para profundizar en la comprensión del modo de unión de ambos nanocuerpos al antígeno, se recomienda realizar estudios de docking molecular y, posteriormente, análisis de dinámica molecular que permitan modelar con mayor precisión las interacciones del CDR3 con los posibles epítomos de Fas2.

Los nanocuerpos VHH7 y VHH3 fueron clonados en el vector de expresión pET22b+, transformados en *E. coli* BL21 y producidos por fermentación con rendimientos de 50 mg/L y 3 mg/L de VHH7 y VHH3 respectivamente. Se han reportado variaciones en los rendimientos de producción de VHHs en *E. coli*. La producción de un VHH anti-UreC de la ureasa de *Helicobacter pylori*, producido en *E. coli*, tuvo un rendimiento de 2 mg/L (101). En la producción del VHH anti-GFP se obtuvieron rendimientos de 0.4 mg/L y 400 mg/L (bajo condiciones optimizadas), dependiendo del péptido señal y la cepa (102). El rendimiento de la producción de VHHs recombinantes depende de diversos factores, como la secuencia del nanocuerpo, el uso de codones y la formación de estructuras secundarias en la región 5', que pueden reducir la eficiencia de traducción. Además, las condiciones de fermentación, como la temperatura del cultivo y la concentración del inductor (IPTG), la agitación, formación de cuerpos de inclusión, y otros pueden influir en el rendimiento de los VHHs (103).

Se seleccionó el VHH7 para la conjugación con las nanopartículas de TiO₂ por su mayor afinidad por Fas2 y el alto rendimiento de producción de VHH7 recombinante por fermentación en *E. coli*. Se evaluó la eficiencia de conjugación con diferentes ratios de TiO₂:VHH7 y se encontró que a menor cantidad del VHH7 se obtiene una mayor eficiencia de conjugación, estos resultados indican que el incremento en la cantidad de VHH7 en la reacción genera un efecto de saturación en la superficie de TiO₂ donde posiblemente las moléculas de VHH7 unidos a la nanopartícula presentan una repulsión de

las proteínas no unidas debido que la saturación produce impedimento estérico generado por la nube electrónica de cada molécula de VHH7, estos resultados se confirmaron con el gel de electroforesis y con la curva de saturación, donde se observa que a medida que aumenta la concentración del VHH7 en la reacción, la cantidad del mismo unido a TiO_2 es menor.

El análisis por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) permitió confirmar la conjugación de VHH7 con nanopartículas de TiO_2 . En las partículas sin conjugar, se identificaron picos en 667 cm^{-1} (Ti–O–Ti), 1649 cm^{-1} (flexión H–O–H) y 3307 cm^{-1} (estiramiento O–H), indicando la presencia de agua adsorbida. En el conjugado con VHH7, aparecieron nuevos picos en 1064 cm^{-1} (C–N), 1247 cm^{-1} (P=O), 1388 cm^{-1} (CH_3/CH_2), 1523 cm^{-1} y 1629 cm^{-1} (Amida II y I), 2897 cm^{-1} (C–H) y 3360 cm^{-1} (N–H/O–H) (104, 105). La presencia del enlace P=O que el fosfato del PBS que se utilizó en la reacción de conjugación también se estaría adsorbiendo al TiO_2 indica Las interacciones C–N, amida I y amida II son característicos de las proteínas, por lo que estos resultados evidencian la adsorción efectiva del VHH7 al TiO_2 . Además, en la electroforesis de las partículas se observó la presencia del VHH7 según su peso molecular.

La conjugación se realizó con partículas de TiO_2 de 20 nm, según el tamaño de nanopartícula establecida por el proveedor por TEM. Las partículas de TiO_2 conjugadas presentaron un tamaño hidrodinámico promedio de 711 nm (DLS), mientras que las partículas sin conjugar, tratadas de la misma manera, tuvieron un tamaño de 569 nm (DLS). La microscopia electrónica de

transmisión mide el tamaño de las partículas individuales en estado seco, proporcionando su diámetro físico exacto, mientras que DLS mide el diámetro hidrodinámico, que incluye la partícula que puede estar agregada y su capa de solvatación. Los resultados sugieren la agregación entre las partículas.

El ensayo de funcionalidad del conjugado confirmó el reconocimiento del conjugado por Fas2, ya que cuando este fue incubado con Fas2 reaccionó con el suero positivo. Además, el conjugado también reaccionó directamente con el suero positivo. Estos resultados indican que la absorción del VHH7 a las partículas de TiO_2 no afectan la capacidad de unión del VHH7 a Fas2.

Se confirmó la producción de peróxido de hidrógeno del conjugado y del TiO_2 mediante la radiación UV (254 nm), similar a la producción de 200 nmol de H_2O_2 después de la irradiación con luz UV durante 2 horas en TiO_2 (anatasa) (106). Se observó que la producción de H_2O_2 depende del tiempo de exposición a la luz UV (254 nm), como se reporta que a mayor tiempo de irradiación de los electrodos de TiO_2 con luz UV, se genera una mayor cantidad de H_2O_2 (107). El mismo comportamiento se observó cuando se incrementó la concentración de TiO_2 . En ambos ensayos, se observó que la partícula de TiO_2 conjugada con el VHH7 genera más H_2O_2 que las partículas de TiO_2 sin conjugar, esto indica que la presencia del VHH7 podría mejorar la dispersión y de esta manera aumentar el área superficial de la partícula.

Una vez que se determinó la estabilidad del conjugado y la producción de

peróxido de hidrógeno, se evaluó el efecto del conjugado TiO₂-VHH7 sobre especímenes adultos de *F. hepatica* mantenidos en cultivo *in vitro*; se estimó la letalidad del efecto fotocatalítico de las partículas de TiO₂ conjugadas con el VHH7 en función de la pérdida motilidad del parásito en cultivo y la producción de MDA como un índice de la acción oxidativa de las especies reactivas de oxígeno generadas fotocatalíticamente por la irradiación UV.

Las partículas de TiO₂ por si solas no tuvieron efecto sobre la movilidad y la peroxidación lipídica de *F. hepatica*. Sin embargo, cuando estas se combinan con luz UV generan un menor movimiento en comparación con el grupo control. Esto podría indicar que las partículas de TiO₂ requieren activarse con luz UV para que pueda tener un efecto sobre el parásito.

La mayor concentración del MDA en el grupo de las *F. hepatica* tratado con el conjugado TiO₂-VHH7 en combinación con la luz UV en comparación al grupo de *F. hepatica* tratado con TiO₂ en combinación con la UV puede explicarse a que la presencia del VHH7 en el conjugado estaría dirigiendo de manera más efectiva al TiO₂ hacia estructuras celulares críticas del parásito. Además, se observó que, a las 12 horas, la concentración de MDA es mayor en las *F. hepática* tratadas tanto con Triverfen como con el conjugado en combinación con luz UV en comparación al control y a las 24 horas la concentración de estos grupos es menor. Estas observaciones podrían estar relacionadas con la activación de mecanismos antioxidantes del parásito.

No hay investigaciones acerca del efecto del TiO₂ sobre *F. hepatica* en la literatura; pero un estudio encontró que las nanopartículas de CuO y de ZnO (8, 12, 16 ppm) tuvieron un efecto fascioliscida *in vitro* contra la motilidad de los parásitos adultos y en la eclosión de los huevos a través de la producción de ROS (31). Otro estudio evaluó el efecto antihelmíntico *in vitro* de las nanopartículas de plata sobre *Gigantocotyle explanatum*, un trematodo más pequeño que *F. hepatica* y que causa infecciones hepáticas y biliares que afecta a los búfalos y ganado vacuno. Este estudio encontró que concentraciones de 50 µg/ml de partículas de plata (~8 nm, TEM) ocasionaron una disminución notable de la motilidad, un incremento en la producción de ROS, una mayor peroxidación lipídica, daños en el DNA y alteraron el tegumento del trematodo (108). Las combinaciones de TiO₂ (0.6 mg/ml), tanto de anatasa (32.5 nm) como de rutilo (50.9 nm), con la luz UV mostraron resultados significativos en la viabilidad de promastigotes de *Leishmania major* (30). Estos resultados resaltan el potencial de las partículas cuyo mecanismo es el daño oxidativo.

F. hepatica ha desarrollado mecanismos antioxidantes que le permiten contrarrestar el estrés oxidativo generado por el sistema inmunitario del hospedero y modular la respuesta inflamatoria, de esta forma el parásito garantiza su supervivencia. Las enzimas antioxidantes tioredoxina-1 (Trx1) y peroxirredoxina-1 (Prx1) secretadas por *F. hepatica* desempeñan un papel fundamental en la protección del parásito contra el estrés oxidativo inducido

por el sistema inmunológico del hospedero. Trx1 participa en la reducción de proteínas oxidadas, manteniendo el equilibrio redox dentro del parásito y en su entorno. Además, contribuye a la modulación del sistema inmune al afectar la activación de macrófagos y la producción de citoquinas proinflamatorias. Prx1 descompone peróxidos, evitando el daño oxidativo y regulando la respuesta inmune del hospedador (109).

La eficacia limitada del tratamiento del conjugado TiO₂-VHH7 en la mortalidad de *F. hepatica* puede atribuirse a la capacidad del parásito para neutralizar ROS mediante sus sistemas antioxidantes. Sin embargo, los hallazgos sugieren que futuras estrategias terapéuticas deben considerar enfoques que superen estos mecanismos de defensa para mejorar la eficacia.

Las especies reactivas de oxígeno tienen tiempos de vida cortos, el radical hidroxilo tiene una vida media de nanosegundos mientras que el peróxido de hidrógeno tiene una vida más prolongada y podría difundir a otras partes de las células (110). Además, la luz UV tiene una limitada penetración en tejidos, siendo esta dependiente de la longitud de onda (111). El tamaño de las nanopartículas es un factor crucial que influye en la internalización celular, un tamaño de nanopartículas de 50 nm es considerado óptimo para la captación celular según diferentes estudios (112). Estos factores indicarían que las ROS generadas por el TiO₂ podría tener una acción limitada a las proximidades de su generación, por ello deben ser considerados para optimizar el diseño y la aplicación de este tratamiento en la fascioliasis.

La aplicación de la fotocatalisis del TiO_2 en animales puede sonar peligroso por la dependencia de la luz UV, que puede causar daño en el ADN del animal. Sin embargo, en los últimos años se han realizado esfuerzos para mejorar la fotocatalisis del TiO_2 en la región de luz visible mediante el uso de fotosensibilizadores. El fotosensibilizador absorbe la luz visible, lo que excita sus electrones y los transfiere a la banda de conducción del TiO_2 , estos electrones y los “huecos” pueden participar en reacciones de redox que resulten en la formación de ROS (113).

Un estudio realizó la sensibilización del TiO_2 con curcumina, este acoplamiento generó una mayor actividad fotoquímica ($\bullet\text{OH}$ Y H_2O_2) y una mayor degradación de compuestos orgánicos bajo luz visible ($\lambda > 420 \text{ nm}$) en comparación de complejos de rutenio- TiO_2 , un sensibilizador común usado en celdas solares, y la eficiencia de conversión de energía. Esta investigación ofrece un método viable para la activación del TiO_2 bajo luz visible y su uso tanto para aplicaciones ambientales y médicos (114).

La luz UV y la luz visible tienen una baja penetración en tejidos profundos (menos de 5.5 mm), por lo que su aplicación en terapia se limita en lesiones superficiales (115). Aunque se modifique el TiO_2 para activarse con luz visible, el gran obstáculo para su aplicación en órganos internos, como el hígado de animales de ganado es la baja penetración o difusión de la luz (visible o UV) en los tejidos, lo que limita la generación de ROS en el sitio

de interés. Se requieren estrategias que activen el TiO₂ sin necesidad de luz.

La irradiación ultrasónica es una manera de activar el TiO₂ sin necesidad de iluminación con luz UV. Además, tiene una mayor penetración en tejidos (>15 cm) en comparación con la luz UV o visible, siendo esta dependiente de la frecuencia (116, 117). El ultrasonido genera la formación de burbujas de cavitación en el medio acuoso debido a la alternancia de presión generada por el ultrasonido. Estas burbujas crecen y colapsan violentamente, liberando energía que provoca la pirólisis del agua y la emisión de luz (sonoluminiscencia). Esta luz puede activar el TiO₂ generando especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen daño celular, permitiendo su uso terapéutico sin necesidad de luz externa (117).

En un estudio, se utilizaron nanopartículas de TiO₂ en fase anatasa (5 mg/kg, radio hidrodinámico 198.33 ± 2.6 nm) hidrofilizadas con carboximetil dextrano, en combinación con ultrasonido, como tratamiento para tumores hepáticos en ratones implantados con una línea celular murina de carcinoma escamoso (SCC7). Los resultados mostraron que el volumen tumoral promedio en el grupo tratado con TiO₂ más ultrasonido fue de 59.29 mm³, mientras que en los ratones tratados únicamente con TiO₂ (sin ultrasonido) el volumen fue de 1001.17 mm³, a los 10 días posteriores a la implantación tumoral (118).

La mayoría de los estudios en donde se ha aplicado la terapia de TiO₂ en combinación con ultrasonido se enfocan en su aplicación en el tratamiento de tumores cancerígenos (119). Sin embargo, no hay aplicaciones en terapias contra parásitos. En la presente tesis se evaluó el tratamiento de TiO₂ en combinación con luz UV contra parásitos adultos encontrando resultados que sugieren una acción en la viabilidad y peroxidación de los parásitos. En ese sentido, debido a la preocupación por la luz UV y la baja penetración de la luz en tejidos, el tratamiento propuesto podría ser reemplazado por el tratamiento de TiO₂ en combinación con ultrasonido que podría tener una aplicación en animales, sin dejar de mencionar que el uso de anticuerpos o nanocuerpos dirigidos contra antígenos del parásito tendrían un efecto en la direccionalidad del tratamiento.

Se requieren más estudios para averiguar qué efectos tendrían las partículas en los parásitos *in vivo*. Además, se requiere que se evalúe el efecto de diferentes tamaños de partículas de conjugados con el fin de evaluar una acción fasciolicida. Finalmente, estos estudios deben ir de la mano de la mano con estudios que permitan evaluar si las partículas conjugadas son tóxicas en líneas celulares, así como estudios en modelos animales.

VII. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar pruebas de citotoxicidad celular de las partículas de TiO₂ conjugadas con el VHH para determinar la acción específica de la fotoletalidad de las partículas conjugadas irradiadas con UV.
- No se utilizó una luz UV concentrada que se dirija directamente a las placas UV, además no se calculó la cantidad de radiación que reciben las placas.
- Se recomienda identificar los epítopes en Fas2 a los que se unen los VHH7 y VHH3 mediante mapeo epitópico. Con esta información modelar la interacción con docking molecular y dinámica molecular para entender con mayor precisión la interacción entre VHH3 y VHH7 y el antígeno Fas2.

VIII. CONCLUSIONES

- Se identificaron y clonaron dos VHHs (VHH3 y VHH7) que se unen al antígeno Fas2 de *F. hepatica* a partir del tamizaje de 248 clonas de una biblioteca de VHHs anti-Fas2.
- Los VHH3 y VHH7 se produjeron como proteínas recombinantes por fermentación en *E. coli* BL21 con rendimientos de 3 y 50 mg/L de cultivo respectivamente
- El VHH7 presentó una mayor afinidad por Fas2, con una constante de disociación K_d de 5×10^{-9} M, en comparación con el VHH3, cuyo K_d fue de 2×10^{-8} M.
- Se obtuvieron partículas conjugadas de TiO₂-VHH7 (ratio: 1:0.5) con diámetro promedio de 711 nm a pH 7 con una eficiencia de conjugación promedio de 65.3 %.
- *F. hepatica* tratadas con el conjugado TiO₂-VHH7 en combinación con luz UV (254 nm) presentaron una mayor producción de MDA en comparación con aquellas expuestas únicamente a luz UV, con un incremento del 27% a las 12 horas ($p < 0.001$) y del 9% a las 24 horas ($p < 0.05$) post-tratamiento.
- *F. hepatica* tratadas con el conjugado TiO₂-VHH7 en combinación con luz UV mostraron una reducción significativa de la motilidad respecto a su control UV, con una disminución del 17% a las 12 horas ($p < 0.01$) y del 24% a las 24 horas ($p < 0.01$) post-tratamiento.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tolan RW. Fascioliasis due to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* infection: an update on this 'neglected' neglected tropical disease. *Lab Med*. 2011;42(2):107- 16.
2. Iturbe PL, Muñiz Y. *Fasciola hepática*: aspectos relevantes en la salud animal. *Rev Investig Vet Perú*. 2013;24(2):127-136.
3. Ashrafi K, Valero M, Panova M, Periago M, Massoud J, Mas-Coma S. Phenotypic analysis of adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and intermediate forms from the endemic region of Gilan, Iran. *Exp Parasitol*. 2006 Dec;115(4):314-20.
4. Jiménez A, Arguello A, Romero J, Sequeira J, Dolz G, Montenegro V, et al. Environmental factors associated with *Dictyocaulus viviparus* and *Fasciola hepatica* prevalence in dairy herds from Costa Rica. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2017; 9:115-121.
5. Cabada M, Morales M, Webb C, Yang L, Bravenec C, Lopez M, et al. Socioeconomic factors associated with *Fasciola hepatica* infection among children from 26 communities of the Cusco region of Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;99(5):1180-1185.
6. Valderrama A, Serrano D, Trujillo J, Merino K, Serrano K, Gavidia C, et al. Crianza de animales domésticos como factor de riesgo de fascioliasis humana. *Rev Investig Vet Perú*. 2019;30(2):864-873.
7. Ayaqui R, Ruelas N, Ticona J, Zamata M, Condo R, Valdivia F. Prevalencia y factores de riesgo de la fasciolosis en ganado bovino de la región Arequipa, Perú, 2021. *Rev Argent Microbiol*. 2024;56(1):29-36.
8. Espinoza JR, Terashima A, Herrera P, Marcos LA. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010;27(4):604-12.
9. Lopez M, White C, Cabada M. Burden of *Fasciola hepatica* infection among children from Paucartambo in Cusco, Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Mar;86(3):481-5.
10. Caravedo M, Ramirez W, Morales M, Lopez M, Janes C, Bunag B, et al. *Fasciola hepatica* Infection Risk for Adult Household Members Living with Children

- with Fascioliasis in Cusco, Peru. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;104(6):2069–2073.
11. Tanabe M, Prochaska J, Morales M, Lopez M, Baca B, Arque E, et al. Geospatial analysis of the associations between environmental contamination with livestock feces and children with chronic fascioliasis in the Anta province of Cusco, Peru. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022;16(6):e0010499.
 12. Ramos EA, Alva RM, Leiva JC. Pérdidas económicas y factores asociados al decomiso de hígados con *Fasciola hepatica* en Chiclayo, Perú. *Peruvian Agric Res*. 2020;2(2):1-7.
 13. Gonzáles R, Pérez M, Brito S. Fascioliasis bovina: Evaluación de las principales pérdidas económicas en una empresa ganadera. *Rev Cubana Cienc Vet*. 2007;38(3):1-10.
 14. Palacio D, Bertot J, Beltrao M, Vázquez Á, Ortiz R, Fortune C. Pérdidas económicas y prevalencia de *Fasciola hepatica* en bovinos sacrificados en dos provincias cubanas. *Rev.MVZ Cordoba*. 2020;25(1): ISSN 1909-0544
 15. Coppo J, Mussart N, Zeinsteger P. Hematological indicators of liver damage during the subclinical phase of fasciolosis in steers from Northeastern Argentina. *Comp Clin Pathol*. 2011; 20:397–40
 16. De Moraes J, Geary T. FDA-Approved Antiparasitic Drugs in the 21st Century: A Success for Helminthiasis? *Trends in Parasitology*. 2020;36(7):573-575.
 17. Mullar, A. 2019 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;18:79-84.
 18. Caravedo MA, Cabada MM. Human Fascioliasis: Current Epidemiological Status and Strategies for Diagnosis, Treatment, and Control. *Res Rep Trop Med*. 2020; 11:149-158.
 19. Gandhi P, Schmitt E, Chen C, Samantray S, Venishetty V, Hughes D. Triclabendazole in the treatment of human fascioliasis: a review. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 2019; 113(12):797–804
 20. Winkelhagen A, Mank T, de Vries P, Soetekouw R. Triclabendazole-Resistant Human *Fasciola hepatica* Infection, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*. 2012;18(6):1028-1029.
 21. Mas-Coma S, Buchon P, Funatsu I, Angles R, Artigas P, Valero Adela, et al. Sheep and cattle reservoirs in the highest human fascioliasis hyperendemic area: Experimental transmission capacity, field epidemiology, and control within a

- One Health initiative in Bolivia. *Front Vet Sci.* 2020; 7:583204.
22. World Health Organization. Poner fin a la desatención para alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible: hoja de ruta sobre enfermedades tropicales desatendidas 2021-2030. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2020.
 23. Kelley J, Elliott T, Beddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill TW. Current threat of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol.* 2016;32(6):458-469.
 24. Thakur N, Thakur N, Kumar A, Thakur V, Susheel K, Vedpriya A, et al. A critical review on the recent trends of photocatalytic, antibacterial, antioxidant and nanohybrid applications of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles. *Sci Total Environ.* 2024; 914:169815.
 25. Chung CJ, Lin H, Chou CM, Hsieh P, Hsiao C, Shi Z, et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film. *Surf Coat Technol.* 2009;203(8):1081-1085.
 26. Ahmad N, Abdullah N, Yasin FM. Antifungal activity of titanium dioxide nanoparticles against *Candida albicans*. *BioRes.* 2019;14(4):8866-8878.
 27. Lu Y, Guan S, Hao L, Yoshida H, Nakada S, Takisawa T, et al. Inactivation of SARS-CoV-2 and photocatalytic degradation by TiO₂ photocatalyst coatings. *Sci Rep.* 2022; 12:16038.
 28. Ma Y, Xiao X, Wang Y, Sun J, Tang P, Li J, et al. Insight into antiviral activity of Ag/TiO₂ nanocomposites against influenza H1N1 virus and its antiviral mechanism. *Int J Nanomedicine.* 2024;19:11305-11320.
 29. Gandhi PR, Jayaseelan C, Kamaraj C, Rajasree S, Rathinasamy R. *In vitro* antimalarial activity of synthesized TiO₂ nanoparticles using *Momordica charantia* leaf extract against *Plasmodium falciparum*. *J Appl Biomed.* 2018;16(4):378-386.
 30. Dolat I, Soudmand S, Layegh P, Jaafari M, Sazgarnia S, Sazgarnia A. The effect of UV radiation in the presence of TiO₂-NPs on *Leishmania major* promastigotes. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2020;1864(6):129558.
 31. Ravvaz A, Malekifard F, Esmaeilnejad B. *In vitro* assessment of the anthelmintic activity of copper oxide and zinc oxide nanoparticles on egg and adult stages of

- Fasciola hepatica*: evidence on oxidative stress biomarkers, and DNA damage. *BMC Vet Res*. 2024;20(1):137.
32. Jin BK, Odongo S, Radwanska M, Magez S. NANOBODIES®: A Review of Diagnostic and Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6):5994.
 33. Córdova M, Herrera P, Nopo L, Bellatin J, Náquira C, Guerra H, et al. *Fasciola hepatica* cysteine proteinases: immunodominant antigens in human fascioliasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1997; 57(6):660-666
 34. Collins P, Stack C, O'Neill S, Doyle S, Ryan T, Brennan G, et al. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *Int J Parasitol*. 2004; 34(14):1537-46.
 35. Gayo V, Cancela M, Acosta D. Maintenance of Life Cycle Stages of *Fasciola hepatica* in the Laboratory. *Methods Mol Biol*. 2020;2137:1-14.
 36. Mas-Coma S, Valero M, Bargues M. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol*. 2009;69:41-146.
 37. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Fascioliasis* [Internet]. Atlanta: CDC; [cited 2025 Jan 01]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>
 38. Becerra W. Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepática* en Latinoamérica. *Rev Col Cienc Pec*. 2001;14:1.
 39. Charlier J, Hostens M, Jacobs J, Ranst V, Dorchateau L, Vercruysse J. Integrating Fasciolosis Control in the Dry Cow Management: The Effect of Closantel Treatment on Milk Production. *PLoS One*. 2012;7(8):e43216
 40. Khan M, Sajid M, Khan M, Iqbal Z, Iqbal M. Bovine fasciolosis: prevalence, effects of treatment on productivity and cost benefit analysis in five districts of Punjab, Pakistan. *Res Vet Sci*. 2009;87:70–75.
 41. Fürst T, Duthaler U, Sripa B, Utzinger J, Keiser J. Trematode infections. liver and lung flukes. *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):399–419.
 42. Rim H, Farag H, Sornmani S, Cross JH. Food-borne trematodes: ignored or emerging?. *Parasitol Today*. 1994;10(6):207–209.

43. Toner E, Brennan G, McConvery F, Meaney M, Fairweather I. A transmission electron microscope study on the route of entry of triclabendazole into the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 2010;137:855-870
44. Scarcella S, Ceriani M, Rodríguez J, Solana H. Caracterización de la proteína microtubular de diferentes helmintos parásitos: Sus implicancias en el modo de acción de los benzimidazoles antihelmínticos. *Red vet*. 2007;6:695-7504
45. Wolstenholme A, Fairweather I, Prichard R, von Samson G, Sangster N. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. 2004;20(10):469–476.
46. Alvarez L, Valladares M, Canton C, Lanusse C, Ceballos L. Testing Albendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Methods Mol Biol*. 2020;2137:213-220.
47. Kane H, Behm C, Bryant C. Metabolic Studies on the New Fasciolicidal Drug, Closantel. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1996;1(6):347-355.
48. Williamson R, Metcalf R. Salicylanilides: A New Group of Active Uncouplers of Oxidative Phosphorylation. *Science*. 1967;158:1694–1695.
49. Kelley J, Rathinasamy V, Elliott T, Rawlin G, Beddoe T, Stevenson M, et al. Determination of the prevalence and intensity of *Fasciola hepatica* infection in dairy cattle from six irrigation regions of Victoria, South-eastern Australia, further identifying significant triclabendazole resistance on three properties. *Veterinary Parasitology*. 2019;109019.
50. Kamaludeen J, Graham J, Stephens N, Miller J, Howell A, Beesley N, et al. Lack of efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* is present on sheep farms in three regions of England, and Wales. *Veterinary Record*. 2019;184(16),502– 502.
51. Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzman M, et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an-*in vivo* efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2013;195,118-121.
52. Moncada J, Gamarra J. Comparación de la eficacia clínica de cuatro principios activos en el control de *Fasciola hepatica* en vacunos del fundo La Victoria-UNC, Valle Cajamarca. *Caxamarca*. 2020;19:127-132.
53. Martínez M, Cordero C, Rojo F. Efficacy of an anthelmintic combination in

- sheep infected with *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and clorsulon. *Experimental Parasitology*. 2014; 136:59-62.24
54. Novobilský A, Höglund J. First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2015; 5:172-177.
 55. Dalton J, Neill S, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, et al. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first-generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol*. 2003;33(11):1173-81.
 56. Sanchez L, Tirloni L, Pinto A, Diedrich J, Yates J, Benavides U, et al. Across intra-mammalian stages of the liver fluke *Fasciola hepatica*: A Proteomic study. *Sci Rep*. 2016; 6:1–14.
 57. Yap HY. Function and molecular interactions of the *Fasciola hepatica* cathepsin L5 protease [Thesis for a PhD]. *Sch Sci*. 2018.
 58. Robinson M, Menon R, Donnelly M, Dalton J, Ranganathan S. An Integrated Transcriptomics and Proteomics Analysis of the Secretome of the Helminth Pathogen *Fasciola hepatica*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2009; 8(8), 1891–1907.
 59. Creaney J, Wilson L, Dosen M, Sandeman RM, Spithill TW, Parsons JC. *Fasciola hepatica*: Irradiation-induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol*. 1996;83(2):202-215.
 60. Law R, Smooker O, Irving J, Piedrafita D, Ponting R, Kennedy N. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infect Immun*. 2003;71(12):6921-6932.
 61. Maco V, Marcos L, Terashima A, Samalvides F, Miranda E, Espinoza J, et al. Fas2-ELISA y la técnica de sedimentación rápida modificada por lumbreras en el diagnóstico de la infección por *Fasciola hepática*. *Rev Med Hered*. 2002;13(2): 49-57
 62. Lu L, Suscovich T, Fortune S, Alter G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*. 2017;18(1),46–61.

63. Gong R, Chen W, Dimitrov D. Expression, Purification, and Characterization of Engineered Antibody CH2 and VH Domains. *Therapeutic Proteins*. 2012;85–102.
64. Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S. Comparison of llama V(H) sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol*. 1997;34(16–17):1121–31.
65. Hussack G, Hiramata T, Ding W, Mackenzie R, Tanha J. Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability. *Plos One*. 2011;6(11):e28218.
66. Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J*. 2000;19(5):921–30.
67. Ali Sm Suris A, Huang Y, Zhou Y. Modulating ion channels with nanobodies. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2025; 10(2): 593-599.
68. Asaadi Y, Jouneghani F, Janani, S, Rahbarizadeh F. A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments. *Biomark Res*. 2021; 9:87.
69. Dmitriev O, Lutsenko S, Muyldermans S. Nanobodies as Probes for Protein Dynamics *in Vitro* and in Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(8):3767-3775.
70. Baranowska E, Sz wajgier D, Oleszczuk P, Winiarska A. Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health - a Review. *Biol Trace Elem Res*. 2020; 193:118-129
71. Dudefoi W, Moniz K, Allen-Vercoe E, Ropers MH, Virginia K. Impact of food grade and nano-TiO₂ particles on a human intestinal community. *Food Chem Toxicol*. 2017; 106:242-249
72. Dambournet D, Belharouak I, Amine K. Tailored preparation methods of TiO₂ anatase, rutile, brookite: mechanism of formation and electrochemical properties. *Chemistry of Materials*. 2010; 22:1173–1179.
73. Nakata K, Fujishima A. TiO₂ photocatalysis: design and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2012; 13:169–189.
74. Yu X, Wang S, Zhang X, Qi A, Qiao X. *Nano Energy*. 2018; 46:29-38.

75. Reyes D, Rodríguez G, Espinosa M, Cab C, de Coss R, Oskam G. Phase-pure TiO₂ nanoparticles: anatase, brookite and rutile. *Nanotechnology*. 2008; 19:145-605
76. European Food Safety Authority ANS Panel. Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive. *EFS Journal*. 2021, 19:e06585
77. Food and Drug Administration. Titanium dioxide. Code of Federal Regulations, Title 21, Section 73.575. 2001.
78. Wang J, Fan Y. Lung injury induced by TiO₂ nanoparticles depends on their structural features: size, shape, crystal phases, and surface coating. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):22258-78.
79. Oesch F, Landsiedel R. Genotoxicity investigations on nanomaterials. *Archives of Toxicology*. 2012; 86(7):985–994.
80. Duan Y, Liu J, Ma L, Li N, Liu H, Wang J, et al. Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. *Biomater*. 2010; 31(5):894-899
81. Haberl N, Hirn S, Holzer M, Zuchtriegel G, Rehberg M, Krombach F. Effects of acute systemic administration of TiO₂, ZnO, SiO₂, and Ag nanoparticles on hemodynamics, hemostasis and leukocyte recruitment. *Nanotoxicology*. 2015; 9(8):963-971.
82. Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*. 2007; 168:176–185
83. Knopp D, Tang D, Niessner R. Review: bioanalytical applications of biomolecule- functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Anal. Chim. Acta*. 2019; 647(1):14-30
84. Cardoso M, Peca N, Roque A. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Curr. Med. Chem*. 2012, 19: 3103-3127
85. Tallawi M, Rosellini E, Barbani N, Cascone G, Rai R, Saint P, et al. Strategies for the Chemical and Biological Functionalization of Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering: A Review. *J. R. Soc. Interface*. 2015; 12(108): 20150254
86. Goossens J, Sein H, Lu S, Radwanska M, Muyldermans S, Sterckx Y, et al. Functionalization of Gold Nanoparticles with Nanobodies through Physical

- Adsorption. *Anal. Methods*. 2017, 9, 3430–3440.
87. Juan A, Cimas F, Bravo I, Pandiella A, Ocaña A, Moreno A. An Overview of Antibody Conjugated Polymeric Nanoparticles for Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutics*. 2020; 12(9):802.
 88. Jain A, Cheng K. The Principles and Applications of Avidin-Based Nanoparticles in Drug Delivery and Diagnosis. *J. Control. Release*. 2017, 245: 27–40.
 89. Joudeh N, Linke D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *J Nanobiotechnol*. 2022, 20:262
 90. Li Z, Wang Y, Shen J, Liu W, Sun X. The measurement system of nanoparticle size distribution from dynamic light scattering data. *Opt Lasers Eng*. 2014; 56:94–8.
 91. Filippov S, Khusnutdinov R, Murmiliuk A, Inam W, Zakharova L, Zhang H. Dynamic light scattering and transmission electron microscopy in drug delivery: a roadmap for correct characterization of nanoparticles and interpretation of results. *Mater. Horiz*. 2023; 10:5354-5370.
 92. Deepty M, Srinivas C, Kumar ER, Mohan NK, Prajapat CL, Rao TVC, et al. XRD, EDX, FTIR and ESR spectroscopic studies of co-precipitated Mn-substituted Zn–ferrite nanoparticles. *Ceram Int*. 2019;45(6):8037–44.
 93. Shahid A, Sher K, Latif U, Aliya F, Kalsoom A, Abdullah A. Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization. *Handbook of Materials Characterization*. Springer, Cham. 2018; 317–344
 94. Buiza Y. Expresión, caracterización bioquímica y determinación de la actividad fibrinolítica de la proteína recombinante FhT (rFhT) [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2023.
 95. Gushiken E. Generación de anticuerpos de dominio único específicos para CD105 Humano [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2016.
 96. Quintana M. Génération d'une plateforme protéomique de traitement haut débit pour l'identification et la caractérisation des VHH recombinants contre CD105

- [Thèse de doctorat]. Grenoble: Univesite Grenoble Alpes; 2022.
97. Thiramanas R, Wongngam Y, Supanakorn G, Polpanich D. BSA Adsorption on Titanium Dioxide Nanoparticle Surfaces for Controlling Their Cellular Uptake in Skin Cells. *ACS Appl Bio Mater.* 2024;7(3):1713-1722.
 98. Aguilar J, Borges C. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *J Vis Exp.* 2020; 12(159):10.3791/61122
 99. Liu Q, Cai C, Huang Y, Zhou L, Guan Y, Fu S. A broad neutralizing nanobody against SARS-CoV-2 engineered from an approved drug. *Cell Death & Disease.* 2024;15(6):458.
 100. Zhang Z, Wang Y, Ding Y, Hattori M. Structure-based engineering of anti-GFP nanobody tandems as ultra-high-affinity reagents for purification. *Sci Rep.* 2020; 10:6239.
 101. Ardekani L, Mousavi S, Rasooli I, Rajabi M, Mohammadi M, Ebrahimizadeh W, et al. A novel nanobody against urease activity of *Helicobacter pylori*. *International Journal of Infectious Diseases.* 2013;17(9):723-728.
 102. Chao S, Liu Y, Ding N, Lin Y, Wang Q, Tan U, et al. Highly Expressed Soluble Recombinant Anti-GFP VHHs in *Escherichia coli* via Optimized Signal Peptides, Strains, and Inducers. *Front Mol Biosci.* 2022; 9:848829.
 103. Hennigan J, Menacho R, Sarkar P, Golovsky M, Lynch M. Scalable, robust, high-throughput expression & purification of nanobodies enabled by 2- stage dynamic control. *Metabolic Engineering.* 2024; 85:116-130.
 104. Chen X, Mao SS. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. *Chem Rev.* 2007;107(7):2891-2959.
 105. Eleuterio T, Sérgio S, Teodoro O, Bundalesli N, Vasconcelos H. XPS and FTIR Studies of DC Reactive Magnetron Sputtered TiO₂ Thin Films on Natural Based-Cellulose Fibers. *Coatings.* 2020;10(3):287
 106. Subbotina R, Barsukov D. Direct evidence of the key role of UV-formed peroxide species in photocatalytic gas–solid oxidation in air on anatase TiO₂ particles. *Physical Chemistry Chemical Physics.* 2020;22(4):2200–2211.
 107. Peralta J. Construcción de un reactor fotoelectroquímico para la

- destrucción de contaminantes orgánicos en efluentes acuosos [Tesis de maestría]. México: Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica; 2003.
108. Rehman A, Ullah R, Uddin I, Zia I, Rehman L, Abidi S. *In vitro* anthelmintic effect of biologically synthesized silver nanoparticles on liver amphistome, *Gigantocotyle explanatum*. *Experimental Parasitology*. 2019;198:95-104
 109. Dorey A, Cwiklinki K, Rooney J, Verissimo C, López J, Jewhurst H, et al. Autonomous Non Antioxidant Roles for *Fasciola hepatica* Secreted Thioredoxin- 1 and Peroxiredoxin-1. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:667272.
 110. Peres C, Cerón J. Spectrophotometric assays for evaluation of Reactive Oxygen Species (ROS) in serum: general concepts and applications in dogs and humans
 111. Meinhardt M, Krebs R, Anders A, Heinrich U, Tronnier H. Wavelength-dependent penetration depths of ultraviolet radiation in human skin. *J Biomed Opt*. 2008;13(4): 044030.
 112. Foroozandeh P, Abdul A. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*. 2018; 13:339.
 113. Pawar M, Sendoğdular S, Gouma P. A brief overview of TiO₂ photocatalyst for organic dye remediation: case study of reaction mechanisms involved in Ce-TiO₂ photocatalysts system. *Nanomater*. 2018, 1–13.
 114. Lim J, Bokare A, Choi W. Visible light sensitization of TiO₂ nanoparticles by a dietary pigment, curcumin, for environmental photochemical transformations. *RSC Advances*. 2017; 52.
 115. Monteiro L, Newton P, Moraes M, Baptista M, Castrucci A. How does the skin sense sun light? An integrative view of light sensing molecules. *Jphotochemrev*. 2021; 47: 100403.
 116. Wang X, Wu M, Jiang J, Zhou S, Chen W, et al. Enhancing Penetration Ability of Semiconducting Polymer Nanoparticles for Sonodynamic Therapy of Large Solid Tumor. *Adv Sci*. 2022; 9(6): 2104125.
 117. Canavese G, Ancoma A, Racca L, Canta M, Dumontel B, Barbaresco F, et al.

- Nanoparticle-assisted ultrasound: A special focus on sonodynamic therapy against cancer. *Chem Eng J.* 2018; 340: 155-172.
118. You D, Deepagan V, Wooram U, Jeon S, Chang H, Yoon H, et al. ROS-generating TiO₂ nanoparticles for non-invasive sonodynamic therapy of cancer. 2016; 6: 23200.
119. Ninomiya K, Nosa K, Ogino C, Kuroda S, Shimizu N. Enhanced OH radical generation by dual-frequency ultrasound with TiO₂ nanoparticles: Its application to targeted sonodynamic therapy. *Ultrasonics Sonochemistry.* 2014; 21(1); 289-294.

X. ANEXOS

Anexo 1. Curva estándar de BSA

Nº de tubo	Concentración de BSA (µg/ml)	Stock de BSA 2 mg/ml	H2O MilliQ (µl)
1	25	5 µl	395
2	20	8 µl	792
3	25	3 µl	397
4	10	350 µl del tubo 2	350
5	5	350 µl del tubo 4	350
6	2.5	350 µl del tubo 5	350
7	1.25	350 µl del tubo 6	350
8	0	-	350

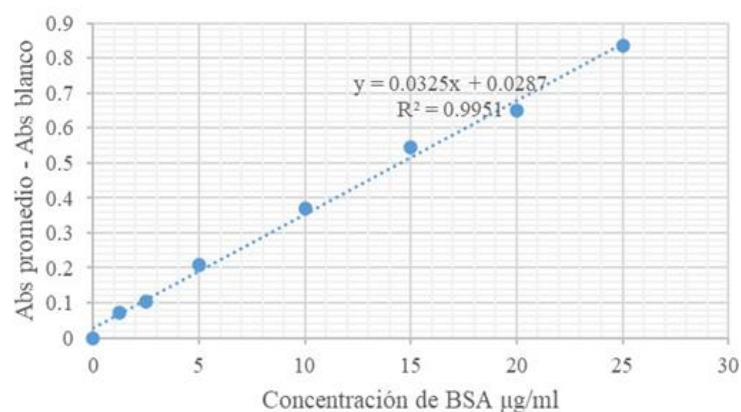
Anexo 2. Screening de 248 clonas a partir de la librería de VHHs

Nº	código	Fas2	BSA	Ratio Fas2/BSA	Nº	código	Fas2	BSA	Ratio Fas2/BSA	Nº	código	Fas2	BSA	Ratio Fas2/BSA	Nº	código	Fas2	BSA	Ratio Fas2/BSA
1	P1-A1	0.078	0.064	1.2	63	P2-A3	0.678	0.201	3.4	125	P2-F5	0.469	0.163	2.9	187	P3-C9	0.842	0.125	6.7
2	P1-A2	0.273	0.191	1.4	64	P2-A4	0.101	0.102	1.0	126	P2-F6	0.144	0.096	1.5	188	P3-C10	0.608	0.199	3.1
3	P1-A3	1.277	0.502	2.5	65	P2-A5	1.083	0.315	3.4	127	P2-F7	0.893	0.147	6.1	189	P3-C11	0.966	0.098	9.9
4	P1-A4	0.214	0.163	1.3	66	P2-A6	1.509	0.445	3.4	128	P2-F8	0.910	0.099	9.2	190	P3-C12	0.062	0.059	1.1
5	P1-A5	2.134	0.925	2.3	67	P2-A7	0.751	0.314	2.4	129	P2-F9	0.475	0.324	1.5	191	P3-D1	0.287	0.058	4.9
6	P1-A6	0.713	0.236	3.0	68	P2-A8	0.211	0.11	1.9	130	P2-F10	2.094	0.089	23.5	192	P3-D2	1.228	0.089	13.8
7	P1-A7	0.171	0.215	0.8	69	P2-A9	1.354	0.099	13.7	131	P2-F11	0.086	0.086	1.0	193	P3-D3	0.506	0.134	3.8
8	P1-A8	1.626	0.867	1.9	70	P2-A10	0.131	0.103	1.3	132	P2-F12	0.583	0.313	1.9	194	P3-D4	0.448	0.184	2.4
9	P1-A9	0.836	0.262	3.2	71	P2-A11	1.009	0.849	1.2	133	P2-G1	0.960	0.534	1.8	195	P3-D5	0.988	0.161	6.1
10	P1-A10	1.261	0.55	2.3	72	P2-A12	0.474	0.124	3.8	134	P2-G2	0.835	0.197	4.2	196	P3-D6	1.261	0.142	8.9
11	P1-A11	0.931	0.215	4.3	73	P2-B1	0.493	0.099	5.0	135	P2-G3	1.141	0.544	2.1	197	P3-D7	0.152	0.185	0.8
12	P1-A12	1.739	1.089	1.6	74	P2-B2	0.59	0.108	5.5	136	P2-G4	0.905	0.471	1.9	198	P3-D8	2.397	0.090	26.6
13	P1-B1	0.075	0.061	1.2	75	P2-B3	1.212	0.52	2.3	137	P2-G5	2.035	0.275	7.4	199	P3-D9	0.494	0.214	2.3
14	P1-B2	0.084	0.055	1.5	76	P2-B4	0.115	0.107	1.1	138	P2-G6	0.746	0.093	8.0	200	P3-D10	1.178	0.179	6.6
15	P1-B3	1.140	0.353	3.2	77	P2-B5	1.536	0.622	2.5	139	P2-G7	0.180	0.157	1.1	201	P3-D11	0.615	0.253	2.4
16	P1-B4	1.375	0.409	3.4	78	P2-B6	0.575	0.192	3.0	140	P2-G8	1.879	0.219	8.6	202	P3-D12	0.866	0.348	2.5
17	P1-B5	1.306	0.468	2.8	79	P2-B7	0.118	0.166	0.7	141	P2-G9	0.881	0.114	7.7	203	P3-E1	0.286	0.217	1.3
18	P1-B6	0.230	0.299	0.8	80	P2-B8	0.378	0.097	3.9	142	P2-G10	0.095	0.087	1.1	204	P3-E2	0.633	0.338	1.9
19	P1-B7	1.119	0.515	2.2	81	P2-B9	0.905	0.102	8.9	143	P2-G11	2.542	0.067	37.9	205	P3-E3	0.233	0.226	1.0
20	P1-B8	0.915	0.422	2.2	82	P2-B10	0.131	0.127	1.0	144	P2-G12	0.064	0.055	1.2	206	P3-E4	0.536	0.281	1.9
21	P1-B9	0.933	0.391	2.4	83	P2-B11	0.556	0.202	2.8	145	P2-H1	0.496	0.472	1.1	207	P3-E5	0.114	0.110	1.0
22	P1-B10	0.646	0.117	5.5	84	P2-B12	0.414	0.245	1.7	146	P2-H2	0.127	0.081	1.6	208	P3-E6	0.468	0.221	2.1
23	P1-B11	0.835	0.395	2.1	85	P2-C1	0.393	0.080	4.9	147	P2-H3	0.122	0.113	1.1	209	P3-E7	0.984	0.519	1.9
24	P1-B12	0.337	0.469	0.7	86	P2-C2	0.098	0.075	1.3	148	P2-H4	0.908	0.460	2.0	210	P3-E8	0.094	0.107	0.9
25	P1-C1	0.677	0.136	5.0	87	P2-C3	0.588	0.099	5.9	149	P2-H5	1.127	0.336	3.4	211	P3-E9	1.699	0.978	1.7
26	P1-C2	0.935	0.389	2.4	88	P2-C4	0.060	0.074	0.8	150	P2-H6	0.162	0.127	1.3	212	P3-E10	1.557	0.218	7.1
27	P1-C3	1.017	0.266	3.8	89	P2-C5	1.699	0.072	23.6	151	P2-H7	0.819	0.363	2.3	213	P3-E11	2.495	0.090	27.7
28	P1-C4	1.629	0.841	1.9	90	P2-C6	0.116	0.171	0.7	152	P2-H8	0.094	0.080	1.2	214	P3-E12	2.422	1.536	1.6
29	P1-C5	0.832	0.39	2.1	91	P2-C7	0.156	0.116	1.3	153	P2-H9	1.265	0.463	2.7	215	P3-F1	0.087	0.120	0.7
30	P1-C6	2.608	0.082	31.8	92	P2-C8	0.519	0.115	4.5	154	P2-H10	0.854	0.314	2.7	216	P3-F2	1.269	1.057	1.2
31	P1-C7	1.546	0.676	2.3	93	P2-C9	0.641	0.112	5.7	155	P3-A1	0.122	0.068	1.8	217	P3-F3	0.155	0.150	1.0
32	P1-C8	1.282	0.866	1.5	94	P2-C10	0.435	0.220	2.0	156	P3-A2	0.549	0.143	3.8	218	P3-F4	0.776	0.360	2.2
33	P1-C9	2.159	2.439	0.9	95	P2-C11	2.022	0.298	6.8	157	P3-A3	0.193	0.083	2.3	219	P3-F5	0.654	0.234	2.8
34	P1-C10	0.559	0.097	5.8	96	P2-C12	0.386	0.204	1.9	158	P3-A4	0.720	0.124	5.8	220	P3-F6	1.224	0.525	2.3
35	P1-C11	0.827	0.337	2.5	97	P2-D1	0.374	0.204	1.8	159	P3-A5	0.382	0.072	5.3	221	P3-F7	0.772	0.307	2.5
36	P1-C12	0.248	0.381	0.7	98	P2-D2	0.557	0.117	4.8	160	P3-A6	0.110	0.070	1.6	222	P3-F8	1.511	1.093	1.4
37	P1-D1	0.076	0.258	0.3	99	P2-D3	0.432	0.193	2.2	161	P3-A7	1.681	0.928	1.8	223	P3-F9	1.727	1.110	1.6
38	P1-D2	2.386	0.119	20.1	100	P2-D4	0.774	0.311	2.5	162	P3-A8	0.351	0.070	5.0	224	P3-F10	0.699	0.263	2.7
39	P1-D3	0.171	0.198	0.9	101	P2-D5	0.535	0.096	5.6	163	P3-A9	0.934	0.081	11.5	225	P3-F11	0.686	0.137	5.0
40	P1-D4	2.183	1.495	1.5	102	P2-D6	2.420	0.507	4.8	164	P3-A10	1.424	0.076	18.7	226	P3-F12	0.807	0.135	6.0
41	P1-D5	0.982	0.494	2.0	103	P2-D7	0.966	0.159	6.1	165	P3-A11	0.773	0.228	3.4	227	P3-G1	0.569	0.367	1.6
42	P1-D6	0.168	0.195	0.9	104	P2-D8	1.155	0.322	3.6	166	P3-A12	0.089	0.060	1.5	228	P3-G2	0.089	0.134	0.7
43	P1-D7	0.952	0.531	1.8	105	P2-D9	0.094	0.081	1.2	167	P3-B1	0.550	0.228	2.4	229	P3-G3	0.330	0.253	1.3
44	P1-D8	0.095	0.122	0.8	106	P2-D10	0.362	0.223	1.6	168	P3-B2	0.444	0.225	2.0	230	P3-G4	0.138	0.204	0.7
45	P1-D9	0.744	0.466	1.6	107	P2-D11	0.543	0.142	3.8	169	P3-B3	0.526	0.182	2.9	231	P3-G5	0.069	0.085	0.8
46	P1-D10	0.855	0.219	3.9	108	P2-D12	0.415	0.184	2.3	170	P3-B4	0.091	0.068	1.3	232	P3-G6	0.511	0.321	1.6
47	P1-D11	1.603	0.334	4.8	109	P2-E1	0.377	0.214	1.8	171	P3-B5	0.634	0.132	4.8	233	P3-G7	0.631	0.308	2.0
48	P1-D12	0.882	0.252	3.5	110	P2-E2	0.387	0.170	2.3	172	P3-B6	0.828	0.087	9.5	234	P3-G8	1.045	0.351	3.0
49	P1-E1	1.122	0.442	2.5	111	P2-E3	0.133	0.109	1.2	173	P3-B7	0.992	0.220	4.5	235	P3-G9	0.968	0.442	2.2
50	P1-E2	0.834	0.434	1.9	112	P2-E4	0.080	0.173	0.5	174	P3-B8	0.770	0.233	3.3	236	P3-G10	1.421	0.528	2.7
51	P1-E3	0.314	0.256	1.2	113	P2-E5	0.452	0.103	4.4	175	P3-B9	0.468	0.089	5.3	237	P3-G11	1.455	0.225	6.5
52	P1-E4	0.247	0.097	2.5	114	P2-E6	0.575	0.198	2.9	176	P3-B10	0.149	0.071	2.1	238	P3-G12	0.490	0.194	2.5
53	P1-E5	0.097	0.113	0.9	115	P2-E7	2.336	1.575	1.5	177	P3-B11	0.985	0.085	11.6	239	P3-H1	0.561	0.417	1.3
54	P1-E6	2.464	1.943	1.3	116	P2-E8	1.881	0.376	5.0	178	P3-B12	2.442	0.064	38.2	240	P3-H2	0.220	0.285	0.8
55	P1-E7	0.796	0.104	7.7	117	P2-E9	0.460	0.234	2.0	179	P3-C1	0.488	0.109	4.5	241	P3-H3	0.282	0.469	0.6
56	P1-E8	0.119	0.158	0.8	118	P2-E10	0.059	0.056	1.1	180	P3-C2	0.170	0.068	2.5	242	P3-H4	0.142	0.369	0.4
57	P1-E9	0.727	0.431	1.7	119	P2-E11	1.350	0.501	2.7	181	P3-C3	2.472	0.060	41.2	243	P3-H5	0.130	0.186	0.7
58	P1-E10	0.730	0.538	1.4	120	P2-E12	0.102	0.102	1.0	182	P3-C4	0.686	0.199	3.4	244	P3-H6	0.685	0.373	1.8
59	P1-E11	0.159	0.212	0.8	121	P2-F1	0.420	0.286	1.5	183	P3-C5	0.869	0.141	6.2	245	P3-H7	1.602	1.139	1.4
60	P1-E12	0.170	0.249	0.7	122	P2-F2	0.670	0.135	5.0	184	P3-C6	1.501	0.514	2.9	246	P3-H8	0.692	0.496	1.4
61	P2-A1	2.231	1.176	1.9	123	P2-F3	0.776	0.402	1.9	185	P3-C7	0.118	0.078	1.5	247	P3-H9	0.671	0.129	5.2
62	P2-A2	0.993	0.293	3.4	124	P2-F4	0.426	0.125	3.4	186	P3-C8	0.140	0.077	1.8	248	P3-H10	0.736	0.139	5.3

Anexo 3. Datos de la curva estándar de BSA y del rendimiento de expresión

Concentración de BSA $\mu\text{g/ml}$	Abs	Abs promedio	Abs promedio - Abs blanco
0	0.367	0.372	0
	0.377		
1.25	0.433	0.446	0.074
	0.458		
2.5	0.463	0.475	0.103
	0.487		
5	0.567	0.582	0.21
	0.597		
10	0.739	0.741	0.369
	0.742		
15	0.911	0.918	0.546
	0.925		
20	1.02	1.023	0.651
	1.025		
25	1.197	1.207	0.835
	1.217		

Curva estándar de BSA



	Abs	Abs prom	Abs prom - Abs Blanco	Concentración de la dilución ($\mu\text{g/ml}$)	FD	Concentración de la muestra ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen de elución (ml)	Cantidad de proteína (μg)
VHH7	1.045	1.048	0.676	19.91	50	995.5	5	4978
	1.051							
VHH3	0.789	0.787	0.415	11.88	5	59.4	5	297
	0.784							

Nota: Abs: absorbancia, FD: factor de dilución.

Anexo 4. Ensayo de unión a Fas2 para determinar la constante de disociación del VHH3

Fas2 (ng)	Fas2 nM (Free)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs promedio (Bound)	Bound/Free
4.25	1.7	0.024	0.025	0.027	0.025	0.015
8.5	3.4	0.044	0.046	0.044	0.045	0.013
17	6.8	0.065	0.071	0.074	0.070	0.010
34	13.6	0.115	0.103	0.105	0.108	0.008
68	27.2	0.170	0.171	0.170	0.170	0.006
136	54.4	0.225	0.230	0.236	0.230	0.004
272	108.8	0.266	0.256	0.258	0.260	0.002

Anexo 5. Ensayo de unión a Fas2 para determinar la constante de disociación del VHH7

Fas2 (ng)	Fas2, nM (Free)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs promedio (Bound)	Bound/Free
1	0.4	0.214	0.211	0.206	0.210	0.525
4.25	1.7	0.750	0.752	0.759	0.754	0.444
8.5	3.4	1.277	1.284	1.297	1.286	0.378
17	6.8	1.888	1.882	1.899	1.890	0.278
34	13.6	2.292	2.287	2.287	2.289	0.168
68	27.2	2.422	2.420	2.421	2.421	0.089
136	54.4	2.596	2.593	2.603	2.597	0.048

Anexo 6. Eficiencia de conjugación con diferentes ratios de TiO₂-VHH7. Las partículas de TiO₂ se conjugaron con diferentes cantidades del VHH7 y se midió la concentración del VHH7 no unido en el sobrenadante para determinar la eficiencia de conjugación.

Ratio TiO ₂ :VHH7	Cantidad de TiO ₂ utilizado en la conjugación (µg)	Cantidad de VHH utilizado en la conjugación (µg)	Cantidad de VHH en el sobrenadante post-conjugación (µg)	Eficiencia de conjugación (%)	Eficiencia de conjugación promedio (%)	Desviación estándar (%)
1:0.5	100	50	19.2	61.7	65.3	3.6
			17.3	65.4		
			15.6	68.9		
1:1		100	47.7	52.3	55.5	2.9
			43.7	56.3		
			42.1	57.9		
1:2		200	109.4	45.3	46.4	3.7
			99.0	50.5		
			113.2	43.4		
1:3		300	189.3	36.9	36.9	1.8
			194.4	35.2		
			183.9	38.7		
1:4		400	261.6	34.6	33.9	2.3
			256.8	35.8		
			274.8	31.3		

Anexo 7. Tamaño de las partículas de TiO₂ y del conjugado TiO₂-VHH7 obtenido mediante DLS. G(d) es la intensidad de dispersión para un tamaño determinado y C(d) es la concentración acumulada de las partículas en función del tamaño.

TiO ₂			TiO ₂ -VHH7		
d(nm)	G(d)	C(d)	d(nm)	G(d)	C(d)
180.7	0	0	207	0	0
192.2	0	0	219.5	0	0
204.6	0	0	232.9	3	0
217.7	24	4	247	22	5
231.6	62	14	262.1	50	14
246.4	100	30	278	64	26
262.2	80	43	294.9	46	35
279	42	50	312.8	15	38
296.8	2	50	331.8	0	38
315.8	0	50	352	0	38
336.1	0	50	373.5	0	38
357.6	0	50	396.1	0	38
380.5	0	50	420.2	0	38
404.8	0	50	445.7	0	38
430.7	0	50	472.8	0	38
458.3	0	50	501.6	0	38
487.7	0	50	532.1	0	38
518.9	0	50	564.4	0	38
552.1	0	50	598.7	0	38
587.4	0	50	635.2	0	38
625.1	0	50	673.8	0	38
707.7	0	50	714.7	0	38
753	15	52	758.2	0	38
801.2	44	60	804.3	0	38
852.5	82	73	853.2	22	42
907	89	87	905	73	56
965.1	58	97	960.1	100	75
1026.9	21	100	1018.4	86	91
1092.6	0	100	1080.4	38	98
1162.6	0	100	1146	10	100

Anexo 8. Funcionalidad del conjugado TiO₂-VHH7 en el reconocimiento de Fas2. El TiO₂ se conjugó con el VHH7 después se incubó tanto con Fas2 como con BSA. Luego, cada reacción se incubó con suero positivo y negativo humano a fascioliasis. Como control el TiO₂ también fue bloqueado con BSA e incubado con Fas2.

	Ligando	Sueros	Absorbancia a 450 nm
TiO₂-VHH7	Fas2	Positivo	3.301
			3.199
			3.227
		Negativo	0.215
			0.206
			0.188
	BSA	Positivo	1.225
			1.117
			1.130
		Negativo	0.250
			0.283
			0.271
TiO₂-BSA	Fas2	Positivo	0.214
			0.233
			0.199
		Negativo	0.217
			0.229
			0.237

Anexo 9. Caracterización del tiempo de UV del conjugado (TiO₂-VHH7) para la producción de H₂O₂. Una suspensión de 50 µl de TiO₂ conjugado y sin conjugar (1 mg/ml) se incubó de 0 a 60 minutos con luz UV para producir peróxido de hidrógeno. A la reacción se añadió peroxidasa y TMB.

Tiempo de UV (minutos)	Absorbancia TiO ₂	Absorbancia TiO ₂ -VHH7	Absorbancia PBS 1X
0	0.049	0.072	0.047
	0.052	0.065	0.050
	0.048	0.057	0.045
5	0.096	0.128	0.050
	0.103	0.133	0.048
	0.094	0.145	0.046
10	0.121	0.170	0.045
	0.115	0.176	0.044
	0.120	0.179	0.055
20	0.196	0.300	0.047
	0.198	0.298	0.046
	0.200	0.296	0.043
60	0.713	0.809	0.045
	0.725	0.795	0.043
	0.716	0.803	0.052

Anexo 10. Caracterización de la concentración del conjugado (TiO₂-VHH7) para la producción de H₂O₂. Suspensiones de 50 µl de diferentes concentraciones de TiO₂ conjugado y conjugado se irradiaron con luz UV durante 10 minutos para producir peróxido de hidrógeno. A la reacción se añadió peroxidasa y TMB.

TiO ₂ (mg/ml)	TiO ₂	TiO ₂ -VHH7
0	0.061	0.060
	0.065	0.059
	0.054	0.064
0.5	0.083	0.086
	0.085	0.095
	0.086	0.089
1	0.105	0.124
	0.102	0.118
	0.108	0.114
2.5	0.144	0.167
	0.140	0.174
	0.141	0.156
5	0.166	0.217
	0.166	0.215
	0.169	0.198
10	0.194	0.260
	0.196	0.257
	0.180	0.265

Anexo 11. Tiempo de incubación con las partículas antes de la exposición a luz UV. Se incubaron los parásitos con TiO₂ y con el conjugado (0.5 mg/ml) durante 2 y 6 horas, luego los parásitos se expusieron a luz UV durante 60 minutos. La prueba tenía grupos de *F. hepatica* solo en medio de cultivo con y sin exposición a luz UV. Se midió el movimiento y la concentración de MDA antes y después de la irradiación con luz UV.

Grupos	Movimiento*				MDA(μM)		
	0 horas	12 horas	24 horas	48 horas	0 horas	12 horas	24 horas
Control	20	13	8	2	24.74	24.62	24.10
	19	14	10	2	23.08	23.59	22.44
	20	17	9	1	24.36	24.23	23.46
	17	13	9	4	21.41	21.79	20.13
Control (2 horas) + UV	19	14	8	2	24.23	24.62	21.92
	20	15	10	1	22.56	22.44	23.72
	20	12	7	2	23.08	24.36	24.74
	18	14	10	3	22.31	23.72	22.18
Control (6 horas) + UV	17	14	9	1	23.72	24.23	22.82
	18	14	8	2	20.90	21.67	20.38
	20	13	10	2	22.18	22.69	23.33
	19	16	8	2	24.49	25.77	25.64
TiO ₂	19	14	10	2	21.41	27.82	20.64
	18	13	11	3	24.23	24.36	22.56
	19	15	9	1	25.64	23.72	24.36
	19	12	6	1	23.59	22.82	22.31
TiO ₂ (2 horas) + UV	18	13	5	1	23.21	24.49	22.18
	20	12	8	2	24.74	26.79	23.21
	17	13	10	2	23.85	24.10	24.23
	19	11	9	1	22.82	22.95	21.54
TiO ₂ (6 horas) + UV	18	13	8	1	25.13	26.41	25.00
	17	11	9	1	23.46	24.74	23.21
	19	15	6	3	21.79	23.33	22.69
	20	11	7	3	22.69	23.08	22.44
TiO ₂ -VHH7	19	12	8	3	22.82	23.46	22.82
	18	14	7	2	23.21	23.97	23.72
	20	14	9	2	24.74	25.38	24.49
	18	12	9	1	22.18	21.54	20.51
TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	20	11	6	1	24.23	26.28	23.72
	18	11	9	2	22.56	25.13	24.74
	18	13	9	3	23.72	23.85	22.44
	17	11	6	1	24.23	27.44	26.15
TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	20	11	7	1	23.08	29.36	27.31
	17	13	9	2	22.44	28.59	25.00
	19	12	7	2	21.67	28.33	25.77
	18	11	8	1	23.97	27.31	24.36

Anexo 12. Efecto de la concentración de TiO₂ del conjugado en la viabilidad y peroxidación lipídica de *F. hepatica* adultas. Los parásitos se incubaron con TiO₂ y con el conjugado (1 y 2.5 mg/ml) durante 6 horas, luego los parásitos se expusieron a luz UV durante 60 minutos. La prueba tenía grupos de *F. hepatica* solo en medio de cultivo con y sin exposición a luz UV. Se midió el movimiento y la concentración de MDA antes y después de la irradiación con luz UV.

Grupos	Movimiento				MDA (μM)		
	0 h	12 h	24 h	48 h	0 h	12 h	24 h
Control	19	14	8	0	22.84	23.11	22.32
	19	15	10	3	23.24	23.76	22.71
	18	14	10	2	22.84	21.26	23.11
	17	13	9	1	21.00	21.66	19.55
Control + UV	17	13	9	1	23.37	24.68	24.29
	19	16	8	3	21.92	22.58	23.50
	20	14	9	1	20.08	21.66	21.26
	17	15	10	1	22.58	21.13	23.37
TiO₂ (1 mg/ml)	19	13	8	2	22.58	22.84	23.89
	17	14	8	1	22.05	22.84	22.58
	20	12	9	3	24.68	23.63	23.50
	18	15	7	1	21.79	20.74	20.21
TiO₂ (2.5 mg/ml)	20	15	7	1	23.11	24.29	24.03
	19	15	9	0	21.26	21.66	19.55
	18	12	8	2	23.89	24.03	22.71
	17	14	10	2	21.53	22.71	24.16
TiO₂ (1 mg/ml) + UV	19	12	9	0	22.58	24.29	23.24
	20	16	10	3	24.29	23.50	24.55
	18	13	8	1	21.92	21.79	22.18
	19	12	9	0	23.11	23.50	23.24
TiO₂ (2.5 mg/ml) +UV	17	15	8	3	22.18	22.71	22.84
	20	14	6	1	24.42	25.74	23.50
	19	13	10	1	23.37	23.89	22.05
	20	13	9	1	22.32	23.50	24.68
TiO₂-VHH (1 mg/ml)	20	13	10	1	22.71	23.76	22.05
	17	12	8	3	23.50	24.82	24.16
	18	15	10	1	21.13	20.47	19.29
	18	16	11	0	22.05	22.71	23.63
TiO₂-VHH (2.5 mg/ml)	17	14	12	1	22.84	22.18	22.32
	20	13	8	1	23.11	24.68	23.11
	20	13	9	2	22.32	22.45	20.21
	19	16	9	1	23.50	24.03	23.37
TiO₂-VHH (1 mg/ml) + UV	18	15	8	2	23.50	32.58	23.24
	18	14	10	1	21.26	28.76	23.24
	20	11	7	0	24.03	30.74	24.29
	19	10	7	0	22.45	28.50	26.79
TiO₂-VHH (2.5 mg/ml) + UV	20	12	6	1	21.66	30.61	26.13
	20	11	7	2	23.76	29.42	24.82
	18	11	6	1	22.97	30.61	23.24
	17	12	9	0	23.63	32.84	24.16
Triverfén®	19	9	5	0	23.50	33.24	30.21
	17	7	3	0	24.16	36.66	32.45
	18	5	0	0	24.68	38.50	27.58
	19	8	2	0	22.71	34.55	30.61

Anexo 13. Efecto del conjugado en la viabilidad de las *F. hepatica* – prueba final. *F. hepatica* se incubaron con TiO₂ y TiO₂-VHH7 (1mg/ml) durante 6 horas y se expusieron a luz UV durante 60 minutos. Se midió el movimiento de los parásitos.

Movimiento					Movimiento				
Grupos	0 h	12 h	24 h	48 h	Grupos	0 h	12 h	24 h	48 h
Control	19	14	9	2	TiO₂ (UV)	17	12	8	1
	20	15	12	2		18	13	6	4
	19	13	8	4		18	12	7	3
	18	15	9	2		19	11	6	2
	20	14	9	3		20	13	10	6
	20	16	13	3		20	14	7	0
	18	12	9	2		19	15	12	2
	19	14	11	4		19	13	6	4
	17	12	8	2		18	10	8	2
	20	17	9	0		19	12	9	2
	19	14	8	1		20	12	7	0
	17	13	10	3		17	14	10	3
Control (UV)	20	14	9	2	TiO₂ - VHH7	18	12	10	4
	20	15	9	1		19	13	8	2
	19	12	10	3		20	15	9	3
	18	13	9	2		18	14	8	5
	17	13	8	4		18	14	12	3
	18	15	10	3		17	11	7	1
	20	14	11	1		17	11	10	4
	19	12	8	2		19	13	7	3
	16	13	7	2		19	12	7	0
	20	15	11	4		19	13	8	0
	18	15	8	3		20	11	8	2
	19	16	12	2		20	15	10	1
VHH7	20	14	9	2	TiO₂ - VHH7 (UV)	19	12	9	2
	18	15	9	1		20	10	6	2
	19	14	11	3		20	13	8	0
	20	16	12	3		19	11	7	3
	17	14	11	2		17	8	5	2
	20	16	9	2		18	10	6	0
	18	14	9	1		18	10	6	3
	19	15	10	4		19	14	8	2
	20	12	10	5		17	11	6	2
	20	14	9	3		18	13	9	3
	19	16	10	2		19	13	9	2
	20	15	8	4		20	14	6	1
VHH7 (UV)	19	14	8	0	Triverfén®	19	9	4	0
	18	13	11	3		18	8	3	0
	20	15	8	3		19	10	5	0
	20	14	9	4		20	9	3	0
	19	13	8	1		20	9	2	0
	20	17	11	3		19	7	0	0
	18	13	11	4		19	8	5	1
	20	12	10	2		18	11	2	0
	17	14	11	3		18	7	3	0
	20	14	8	0		17	8	0	0
	19	14	11	1		18	9	5	0
	20	16	10	4		19	9	4	1
TiO₂	20	15	11	5					
	20	14	9	1					
	18	16	8	2					
	19	15	8	4					
	19	16	10	4					
	17	13	7	3					
	19	13	8	4					
	20	14	10	3					
	19	15	10	4					
	20	13	7	0					
	18	14	9	1					
	20	13	10	2					

Anexo 14. Efecto del conjugado en la peroxidación lipídica de las *F. hepatica* en la prueba final. *F. hepatica* se incubaron con TiO₂ y TiO₂-VHH7 (1mg/ml) durante 6 horas, luego se expusieron a luz UV durante 60 minutos. Se midió la concentración de MDA en los parásitos antes y después de la irradiación UV.

Grupos	MDA (μM)		
	0 horas	12 horas	24 horas
Control	22.18	24.16	22.58
	24.16	25.21	23.89
	23.24	23.76	22.58
	24.68	23.11	23.63
	19.55	21.39	22.18
	22.97	24.82	24.29
Control + UV	21.66	23.11	22.45
	22.45	23.24	21.66
	25.74	25.34	24.03
	19.03	22.45	21.26
	23.24	25.08	24.16
	22.32	23.63	23.63
VHH7	23.24	24.82	22.45
	25.21	26.13	25.74
	22.05	23.76	21.66
	24.29	26.13	24.68
	23.50	25.61	24.16
	21.39	22.45	21.79
VHH7 + UV	22.58	24.03	23.11
	22.32	24.29	22.71
	24.16	26.13	23.89
	23.37	24.68	24.29
	25.47	25.47	25.21
	21.79	23.11	22.18
TiO ₂ (1mg/ml)	24.42	26.39	25.21
	20.74	21.39	20.87
	23.24	24.68	23.11
	24.68	26.13	26.26
	21.26	24.16	22.58
	24.29	24.82	24.82
TiO ₂ (1mg/ml) + UV	19.16	23.11	21.53
	21.66	24.03	22.58
	22.58	24.42	22.45
	23.24	24.55	23.76
	19.03	23.50	21.53
	22.84	24.42	23.50
TiO ₂ (1mg/ml)-VHH7	22.45	24.03	25.21
	24.16	25.47	26.26
	23.37	25.21	25.21
	22.05	24.95	23.63
	19.42	22.32	22.45
	20.74	24.82	23.24
TiO ₂ (1mg/ml)-VHH7 + UV	24.03	31.39	26.13
	24.29	30.21	23.89
	20.61	29.16	23.63
	23.37	29.68	25.21
	24.42	29.55	23.89
	22.45	31.53	27.32
Triverfén®	23.11	35.61	30.87
	24.42	37.18	31.00
	23.11	37.97	31.53
	21.66	35.21	28.37
	23.76	34.16	29.82
	22.84	34.55	32.05

Anexo 15. Movimiento promedio de los parásitos adultos en la prueba final (n=12). *F. hepatica* se incubaron con TiO₂ y TiO₂-VHH7 (1mg/ml) durante 6 horas, luego se expusieron a luz UV durante 60 minutos. El experimento tenía grupos de *F. hepatica* solo en medio de cultivo con y sin exposición a luz UV. Se midió el movimiento de los parásitos antes y después de la irradiación con luz UV.

Grupos	Movimiento (promedio ± sd)			
	0 horas	12 horas	24 horas	48 horas
Control	18.83 ± 1.11	14.08 ± 1.51	9.58 ± 1.62	2.33 ± 1.15
Control + UV	18.67 ± 1.30	13.92 ± 1.31	9.33 ± 1.50	2.42 ± 1.00
VHH7	19.17 ± 1.03	14.58 ± 1.16	9.75 ± 1.14	2.67 ± 1.23
VHH7 + UV	19.17 ± 1.03	14.08 ± 1.38	9.67 ± 1.37	2.33 ± 1.50
TiO ₂ (1mg/ml)	19.08 ± 1.00	14.25 ± 1.14	8.92 ± 1.31	2.75 ± 1.54
TiO ₂ (1mg/ml) + UV	18.67 ± 1.07	12.58 ± 1.38	8.00 ± 1.91	2.42 ± 1.73
TiO ₂ (1mg/ml)-VHH7	18.67 ± 1.07	12.83 ± 1.47	8.67 ± 1.56	2.33 ± 1.61
TiO ₂ (1mg/ml)-VHH7 + UV	18.67 ± 1.07	11.58 ± 1.88	7.08 ± 1.44	1.83 ± 1.03
Triverfén®	18.67 ± 0.89	8.67 ± 1.15	3.00 ± 1.76	0.17 ± 0.39

Anexo 16. Concentración promedio de MDA de los parásitos adultos en la prueba final (n=6). *F. hepatica* se incubaron con TiO₂ y TiO₂-VHH7 (1mg/ml) durante 6 horas, luego se expusieron a luz UV durante 60 minutos. El experimento tenía grupos de *F. hepatica* solo en medio de cultivo con y sin exposición a luz UV. Se midió el MDA antes y después de la irradiación con luz UV.

Grupos	MDA μM (promedio ± sd)		
	0 horas	12 horas	24 horas
Control	22.80 ± 1.82	23.74 ± 1.37	23.19 ± 0.86
Control + UV	22.40 ± 2.18	23.81 ± 1.16	22.86 ± 1.25
VHH7	23.28 ± 1.40	24.82 ± 1.47	23.41 ± 1.69
VHH7 + UV	23.28 ± 1.36	24.62 ± 1.07	23.57 ± 1.11
TiO ₂ (1 mg/ml)	23.11 ± 1.71	24.60 ± 1.79	23.81 ± 1.98
TiO ₂ (1 mg/ml) + UV	21.42 ± 1.87	24.00 ± 0.58	22.56 ± 0.95
TiO ₂ (1 mg/ml)-VHH7	22.03 ± 1.73	24.46 ± 1.16	24.33 ± 1.45
TiO ₂ -VHH7 (1 mg/ml) + UV	23.19 ± 1.46	30.25 ± 0.99	25.01 ± 1.48
Triverfén®	23.15 ± 0.93	35.78 ± 1.50	30.61 ± 1.33

Anexo 17. Estadística MDA-tiempo de incubación antes de la exposición a luz UV. *F. hepatica* se incubó con TiO₂ y con el conjugado (0.5 mg/ml) durante 2 y 6 horas, luego los parásitos se expusieron a luz UV durante 60 minutos. Se midió la concentración de MDA antes y después de la irradiación con luz UV.

	Tiempo	Grupo 1	Grupo 2	p-value	Tiempo	Grupo 1	Grupo 2	p-value	Tiempo	Grupo 1	Grupo 2	p-value
0 horas	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.200	12 horas	Control	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.029	24 horas	Control	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.029
0 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2 (2 horas) + UV	0.343	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.029	24 horas	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.029
0 horas	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.343	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.029	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.057
0 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.486	12 horas	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.029	24 horas	TiO2	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.057
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2 (2 horas) + UV	0.486	12 horas	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.029	24 horas	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.057
0 horas	TiO2	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.486	12 horas	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.029	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.114
0 horas	Control	Control (2 horas) + UV	Control (2 horas) + UV	0.686	12 horas	TiO2	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.057	24 horas	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.114
0 horas	Control	Control (6 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	0.686	12 horas	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.057	24 horas	TiO2	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.200
0 horas	Control	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.686	12 horas	Control	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.114	24 horas	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.200
0 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2	Control (2 horas) + UV	0.686	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.114	24 horas	Control	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.343
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2	Control (6 horas) + UV	0.686	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.200	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.343
0 horas	Control (6 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	0.686	12 horas	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.200	24 horas	TiO2	TiO2 (6 horas) + UV	0.343
0 horas	TiO2	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2 (6 horas) + UV	0.686	12 horas	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.343	24 horas	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.343
0 horas	TiO2	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	0.686	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2	0.486	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.486
0 horas	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2 (2 horas) + UV	0.686	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2 (2 horas) + UV	0.486	24 horas	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.486
0 horas	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	0.686	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2 (6 horas) + UV	0.486	24 horas	Control	TiO2-VHH7	0.686
0 horas	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.686	12 horas	TiO2	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.486	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2 (6 horas) + UV	0.686
0 horas	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.686	12 horas	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	0.486	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2	0.686
0 horas	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.686	12 horas	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.486	24 horas	TiO2	TiO2-VHH7	0.686
0 horas	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.686	12 horas	Control	TiO2	0.686	24 horas	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2 (6 horas) + UV	0.686
0 horas	Control	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.886	12 horas	Control	TiO2 (2 horas) + UV	0.686	24 horas	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	0.686
0 horas	Control (2 horas) + UV	Control (2 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	0.886	12 horas	Control	TiO2 (2 horas) + UV	0.686	24 horas	Control	Control (2 horas) + UV	0.886
0 horas	Control (2 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	0.886	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2 (2 horas) + UV	0.686	24 horas	Control (6 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	0.886
0 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	0.886	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2 (6 horas) + UV	0.686	24 horas	Control	Control (2 horas) + UV	0.886
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	0.886	12 horas	Control	Control (2 horas) + UV	0.886	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2 (2 horas) + UV	0.886
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	0.886	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	0.886	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2 (2 horas) + UV	0.886
0 horas	TiO2	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	0.886	12 horas	Control (2 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	0.886	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	0.886
0 horas	Control	TiO2	TiO2 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2	0.886	24 horas	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	Control (2 horas) + UV	Control (2 horas) + UV	1.000	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	0.886	24 horas	Control	TiO2	1.000
0 horas	Control	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	0.886	24 horas	Control	TiO2 (2 horas) + UV	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	TiO2	TiO2 (2 horas) + UV	0.886	24 horas	Control (2 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	0.886	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	TiO2	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	1.000	12 horas	TiO2	TiO2 (6 horas) + UV	1.000	24 horas	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2 (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control	TiO2 (2 horas) + UV	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	TiO2	TiO2 (2 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	TiO2	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	1.000	12 horas	TiO2	TiO2 (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control	TiO2 (2 horas) + UV	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	TiO2	TiO2 (2 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	TiO2 (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (2 horas) + UV	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	TiO2	TiO2 (2 horas) + UV	TiO2-VHH7 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2	TiO2 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control	TiO2 (2 horas) + UV	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	TiO2	TiO2 (2 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	TiO2	TiO2 (2 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	1.000	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO2-VHH7	1.000
0 horas	Control	TiO2-VHH7	TiO2-VHH7	1.000	12 horas	Control						

Anexo 18. Estadística movimiento-tiempo de incubación antes de la exposición a luz UV. *F. hepatica* se incubó con TiO₂ y con el conjugado (0.5 mg/ml) durante 2 y 6 horas, luego los parásitos se expusieron a luz UV durante 60 minutos. Se midió el movimiento de los parásitos antes y después de la irradiación con luz UV.

Tiempo	Grupo 1	Grupo 2	p-valor	Tiempo	Grupo 1	Grupo 2	p-valor	Tiempo	Grupo 1	Grupo 2	p-valor
0 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.343	12 horas	Control	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.057	24 horas	Control	TiO ₂ (2 horas) + UV	0.486
0 horas	Control (2 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	0.486	12 horas	Control	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.057	24 horas	Control	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.486
0 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂	0.486	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.057	24 horas	Control	TiO ₂ (2 horas) + UV	0.486
0 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ (2 horas) + UV	0.486	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.057	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.486
0 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ (6 horas) + UV	0.486	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.057	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.486
0 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.486	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.057	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.486
0 horas	TiO ₂	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.486	12 horas	Control	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.114	24 horas	Control	TiO ₂	0.686
0 horas	Control	Control (6 horas) + UV	0.686	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.114	24 horas	Control	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.686
0 horas	Control	TiO ₂	0.686	12 horas	TiO ₂	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.114	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ (2 horas) + UV	0.686
0 horas	Control	TiO ₂ (2 horas) + UV	0.686	12 horas	TiO ₂	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.114	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.686
0 horas	Control	TiO ₂ (6 horas) + UV	0.686	12 horas	TiO ₂ -VHH7	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.114	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ (6 horas) + UV	0.686
0 horas	Control	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.686	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ (2 horas) + UV	0.200	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.686
0 horas	Control	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.686	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.200	24 horas	Control	Control (6 horas) + UV	0.886
0 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.686	12 horas	Control	TiO ₂ -VHH7	0.343	24 horas	Control	TiO ₂ (6 horas) + UV	0.886
0 horas	TiO ₂ -VHH7	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.686	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ (6 horas) + UV	0.343	24 horas	Control (2 horas) + UV	Control (6 horas) + UV	0.886
0 horas	Control	TiO ₂ -VHH7	0.886	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.343	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂	0.886
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂	0.886	12 horas	TiO ₂	TiO ₂ (2 horas) + UV	0.343	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.886
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.886	12 horas	Control	TiO ₂ (2 horas) + UV	0.343	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ (6 horas) + UV	0.886
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.886	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.486	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.886
0 horas	TiO ₂	TiO ₂ (2 horas) + UV	0.886	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.486	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ (2 horas) + UV	0.886
0 horas	TiO ₂	TiO ₂ (6 horas) + UV	0.886	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.486	24 horas	TiO ₂	TiO ₂ -VHH7	0.886
0 horas	TiO ₂	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.886	12 horas	TiO ₂	TiO ₂ -VHH7	0.486	24 horas	TiO ₂	TiO ₂ -VHH7	0.886
0 horas	TiO ₂ (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.886	12 horas	TiO ₂ (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.486	24 horas	TiO ₂	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.886
0 horas	TiO ₂ (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.886	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.486	24 horas	TiO ₂ (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.886
0 horas	TiO ₂ (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.886	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.486	24 horas	TiO ₂ (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.886
0 horas	TiO ₂ (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.886	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.486	24 horas	TiO ₂ (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.886
0 horas	TiO ₂ (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.886	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.486	24 horas	TiO ₂ (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.886
0 horas	TiO ₂ -VHH7	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.886	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.486	24 horas	TiO ₂ -VHH7	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.886
0 horas	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.886	12 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	0.486	24 horas	Control (2 horas) + UV	Control (2 horas) + UV	1.000
0 horas	Control	Control (2 horas) + UV	1.000	12 horas	Control	Control (6 horas) + UV	0.886	24 horas	Control	TiO ₂ -VHH7	1.000
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ (2 horas) + UV	1.000	12 horas	Control	TiO ₂ (2 horas) + UV	0.886	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ (6 horas) + UV	1.000
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ (6 horas) + UV	1.000	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.886	24 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	1.000
0 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	1.000	12 horas	Control (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	0.886	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	1.000
0 horas	TiO ₂	TiO ₂ -VHH7	1.000	12 horas	Control	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.886	24 horas	Control (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	1.000
0 horas	TiO ₂ (2 horas) + UV	TiO ₂ (6 horas) + UV	1.000	12 horas	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	0.886	24 horas	TiO ₂	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	1.000
0 horas	TiO ₂ (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	Control	Control (2 horas) + UV	1.000	24 horas	TiO ₂ (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	1.000
0 horas	TiO ₂ (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	TiO ₂ (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	1.000	24 horas	TiO ₂ (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	1.000
0 horas	TiO ₂ (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (6 horas) + UV	1.000	12 horas	TiO ₂ (2 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7 (2 horas) + UV	1.000	24 horas	TiO ₂ (6 horas) + UV	TiO ₂ -VHH7	1.000

Anexo 19. Estadística MDA-concentración del conjugado. *F. hepatica* se incubaron con TiO₂ y con el conjugado (1 y 2.5 mg/ml) durante 6 horas, luego los parásitos se expusieron a luz UV durante 60 minutos. La prueba tenía grupos de *F. hepatica* solo en medio de cultivo con y sin exposición a luz UV. Se midió la concentración de MDA antes y después de la irradiación con luz UV.

[illegible]

Anexo 20. Estadística movimiento-Concentración del conjugado. *F. hepatica* se incubaron con TiO₂ y con el conjugado (1 y 2.5 mg/ml) durante 6 horas, luego los parásitos se expusieron a luz UV durante 60 minutos. La prueba tenía grupos de *F. hepatica* solo en medio de cultivo con y sin exposición a luz UV. Se midió el movimiento antes y después de la irradiación con luz UV.

[illegible]

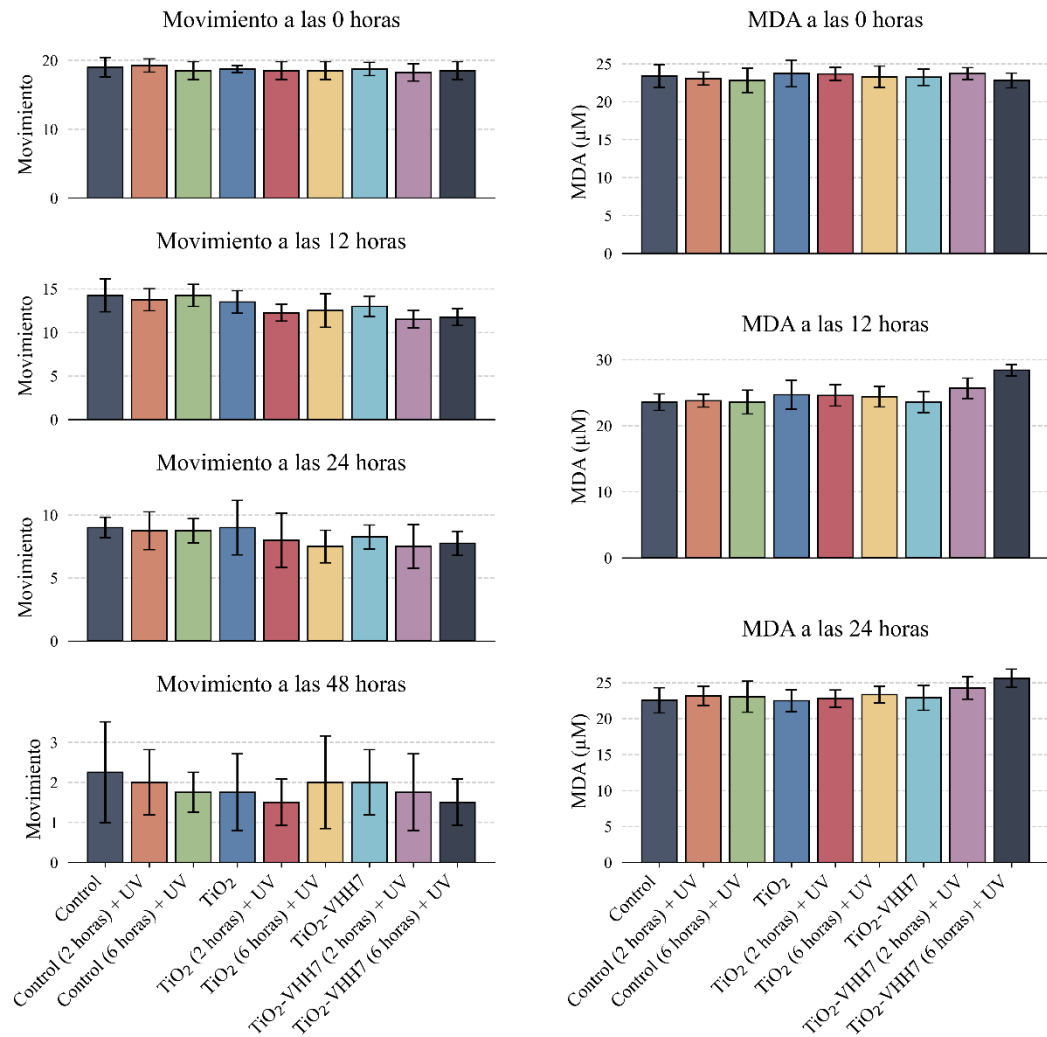
Anexo 21. Estadística prueba de MDA prueba final. *F. hepatica* se incubaron con TiO₂ y TiO₂-VHH7 (1mg/ml) durante 6 horas, luego se expusieron a luz UV durante 60 minutos. Se midió el nivel de MDA antes y después de la irradiación con luz UV.

Tiempo	Grupo 1	Grupo 2	t	p-valor	Tiempo	Grupo 1	Grupo 2	t	p-valor
0 horas	TiO2 (UV)	Triverfén	-2.0283099	0.0700020	24 horas	TiO2 (UV)	Triverfén	-12.098317	0.0000003
	VHH7 (UV)	TiO2 (UV)	1.9720569	0.0768812		Control	Triverfén	-11.504321	0.0000004
	VHH7	TiO2 (UV)	1.9495208	0.0798117		Control (UV)	Triverfén	-10.406688	0.0000011
	TiO2 (UV)	TiO2 - VHH7 (UV)	-1.8302573	0.0971349		VHH7 (UV)	Triverfén	-9.9604939	0.0000016
	TiO2	TiO2 (UV)	1.6294700	0.1342686		VHH7	Triverfén	-8.2123277	0.0000094
	TiO2 - VHH7	Triverfén	-1.3947760	0.1932895		TiO2 - VHH7	Triverfén	-7.8175932	0.0000144
	VHH7 (UV)	TiO2 - VHH7	1.3915690	0.1942303		TiO2	Triverfén	-6.9808489	0.0000380
	VHH7	TiO2 - VHH7	1.3739927	0.1994555		TiO2 - VHH7 (UV)	Triverfén	-6.8838512	0.0000428
	Control	TiO2 (UV)	1.2956821	0.2241932		TiO2 (UV)	TiO2 - VHH7 (UV)	-3.4188315	0.0065603
	TiO2 - VHH7	TiO2 - VHH7 (UV)	-1.2567148	0.2374185		Control (UV)	TiO2 - VHH7 (UV)	-2.7142753	0.0217732
	TiO2	TiO2 - VHH7	1.0814379	0.3048914		Control	TiO2 - VHH7 (UV)	-2.6036853	0.0263245
	Control (UV)	TiO2 (UV)	0.8406004	0.4202166		TiO2 (UV)	TiO2 - VHH7	-2.5124282	0.0307842
	Control (UV)	VHH7 (UV)	-0.8362420	0.4225509		VHH7 (UV)	TiO2 - VHH7 (UV)	-1.9119595	0.0849296
	Control (UV)	VHH7	-0.8284575	0.4267420		Control (UV)	TiO2 - VHH7	-1.8802134	0.0894923
	Control (UV)	Triverfén	-0.7705018	0.4588188		VHH7	TiO2 - VHH7 (UV)	-1.7459319	0.1114115
	Control	TiO2 - VHH7	0.7488966	0.4711678		VHH7 (UV)	TiO2 (UV)	1.6914508	0.1216264
	Control (UV)	TiO2 - VHH7 (UV)	-0.7365676	0.4783089		Control	TiO2 - VHH7	-1.6590488	0.1280954
	Control (UV)	TiO2	-0.6200805	0.5490733		TiO2	TiO2 (UV)	1.3935639	0.1936447
	TiO2 (UV)	TiO2 - VHH7	-0.5895586	0.5685667		Control	TiO2 (UV)	1.2209038	0.2501274
	Control	VHH7 (UV)	-0.5205151	0.6140333		TiO2	TiO2 - VHH7 (UV)	-1.1931175	0.2603621
	Control	VHH7	-0.5143333	0.6181934		VHH7	TiO2 (UV)	1.0832498	0.3041247
	Control	Triverfén	-0.4208196	0.6827876		VHH7 (UV)	TiO2 - VHH7	-1.0286113	0.3278995
	Control	TiO2 - VHH7 (UV)	-0.4143464	0.6873683		Control (UV)	VHH7 (UV)	-1.0274581	0.3284159
	Control	Control (UV)	0.3405087	0.7405185		VHH7	TiO2 - VHH7	-1.0143626	0.3343234
	Control (UV)	TiO2 - VHH7	0.3280289	0.7496547		Control (UV)	TiO2	-0.9856062	0.3475725
	Control	TiO2	-0.3011205	0.7694907		TiO2 - VHH7	TiO2 - VHH7 (UV)	-0.8027210	0.4407967
	VHH7 (UV)	TiO2	0.1966368	0.8480506		Control	TiO2	-0.6965260	0.5019683
	VHH7 (UV)	Triverfén	0.1957818	0.8487021		Control	VHH7 (UV)	-0.6506775	0.5299204
	VHH7	TiO2	0.1941199	0.8499687		Control (UV)	VHH7	-0.6398488	0.5366538
	VHH7	Triverfén	0.1914287	0.8520207		Control	Control (UV)	0.5321291	0.6062563
	VHH7 (UV)	TiO2 - VHH7 (UV)	0.1076452	0.9164063		TiO2	TiO2 - VHH7	-0.5248237	0.6111422
	VHH7	TiO2 - VHH7 (UV)	0.1059998	0.9176787		Control (UV)	TiO2 (UV)	0.4797447	0.6417289
	TiO2	TiO2 - VHH7 (UV)	-0.0954548	0.9258393		VHH7	TiO2	-0.3714698	0.7180372
	TiO2 - VHH7 (UV)	Triverfén	0.0620174	0.9517711		Control	VHH7	-0.2840726	0.7821498
	TiO2	Triverfén	-0.0551653	0.9570934		VHH7 (UV)	TiO2	-0.2598941	0.8002180
	VHH7	VHH7 (UV)	0.0000000	1.0000000		VHH7	VHH7 (UV)	-0.1861149	0.8560758
12 horas	TiO2 (UV)	Triverfén	-17.8980114	0.0000000		TiO2 (UV)	Triverfén	-17.8980114	0.0000000
	Control (UV)	Triverfén	-15.4804098	0.0000000		Control (UV)	Triverfén	-15.4804098	0.0000000
	VHH7 (UV)	Triverfén	-14.8062743	0.0000000		VHH7 (UV)	Triverfén	-14.8062743	0.0000000
	TiO2 - VHH7	Triverfén	-14.6016945	0.0000000		TiO2 - VHH7	Triverfén	-14.6016945	0.0000000
	Control	Triverfén	-14.5027129	0.0000000		Control	Triverfén	-14.5027129	0.0000000
	TiO2 (UV)	TiO2 - VHH7 (UV)	-13.2737733	0.0000001		TiO2 (UV)	TiO2 - VHH7 (UV)	-13.2737733	0.0000001
	VHH7	Triverfén	-12.7810792	0.0000002		VHH7	Triverfén	-12.7810792	0.0000002
	TiO2	Triverfén	-11.7100677	0.0000004		TiO2	Triverfén	-11.7100677	0.0000004
	Control (UV)	TiO2 - VHH7 (UV)	-10.3634259	0.0000011		Control (UV)	TiO2 - VHH7 (UV)	-10.3634259	0.0000011
	VHH7 (UV)	TiO2 - VHH7 (UV)	-9.4309545	0.0000027		VHH7 (UV)	TiO2 - VHH7 (UV)	-9.4309545	0.0000027
	Control	TiO2 - VHH7 (UV)	-9.4212158	0.0000027		Control	TiO2 - VHH7 (UV)	-9.4212158	0.0000027
	TiO2 - VHH7	TiO2 - VHH7 (UV)	-9.2783057	0.0000031		TiO2 - VHH7	TiO2 - VHH7 (UV)	-9.2783057	0.0000031
	TiO2 - VHH7 (UV)	Triverfén	-7.5165298	0.0000202		TiO2 - VHH7 (UV)	Triverfén	-7.5165298	0.0000202
	VHH7	TiO2 - VHH7 (UV)	-7.5075719	0.0000204		VHH7	TiO2 - VHH7 (UV)	-7.5075719	0.0000204
	TiO2	TiO2 - VHH7 (UV)	-6.7577252	0.0000499		TiO2	TiO2 - VHH7 (UV)	-6.7577252	0.0000499
	Control (UV)	VHH7	-1.3217518	0.2156892		Control (UV)	VHH7	-1.3217518	0.2156892
	Control	VHH7	-1.3094866	0.2196562		Control	VHH7	-1.3094866	0.2196562
	Control (UV)	VHH7 (UV)	-1.2597866	0.2363532		Control (UV)	VHH7 (UV)	-1.2597866	0.2363532
	VHH7	TiO2 (UV)	1.2562961	0.2375640		VHH7	TiO2 (UV)	1.2562961	0.2375640
	Control	VHH7 (UV)	-1.2334874	0.2456003		Control	VHH7 (UV)	-1.2334874	0.2456003
	VHH7 (UV)	TiO2 (UV)	1.2293005	0.2470992		VHH7 (UV)	TiO2 (UV)	1.2293005	0.2470992
	Control	TiO2 - VHH7	-0.9866805	0.3470707		Control	TiO2 - VHH7	-0.9866805	0.3470707
	Control (UV)	TiO2 - VHH7	-0.9839504	0.3483470		Control (UV)	TiO2 - VHH7	-0.9839504	0.3483470
	Control	TiO2	-0.9278879	0.3753190		Control	TiO2	-0.9278879	0.3753190
	Control (UV)	TiO2	-0.9063669	0.3860603		Control (UV)	TiO2	-0.9063669	0.3860603
	TiO2 (UV)	TiO2 - VHH7	-0.8676501	0.4059255		TiO2 (UV)	TiO2 - VHH7	-0.8676501	0.4059255
	TiO2	TiO2 (UV)	0.7686726	0.4598562		TiO2	TiO2 (UV)	0.7686726	0.4598562
	VHH7	TiO2 - VHH7	0.4588315	0.6561661		VHH7	TiO2 - VHH7	0.4588315	0.6561661
	Control	TiO2 (UV)	-0.4324500	0.6745915		Control	TiO2 (UV)	-0.4324500	0.6745915
	Control (UV)	TiO2 (UV)	-0.3733829	0.7166570		Control (UV)	TiO2 (UV)	-0.3733829	0.7166570
	VHH7	VHH7 (UV)	0.2655110	0.7960091		VHH7	VHH7 (UV)	0.2655110	0.7960091
	VHH7 (UV)	TiO2 - VHH7	0.2376776	0.8169300		VHH7 (UV)	TiO2 - VHH7	0.2376776	0.8169300
	VHH7	TiO2	0.2316205	0.8215035		VHH7	TiO2	0.2316205	0.8215035
	TiO2	TiO2 - VHH7	0.1508319	0.8831075		TiO2	TiO2 - VHH7	0.1508319	0.8831075
	Control	Control (UV)	-0.0898913	0.9301486		Control	Control (UV)	-0.0898913	0.9301486
	VHH7 (UV)	TiO2	0.0256884	0.9800113		VHH7 (UV)	TiO2	0.0256884	0.9800113

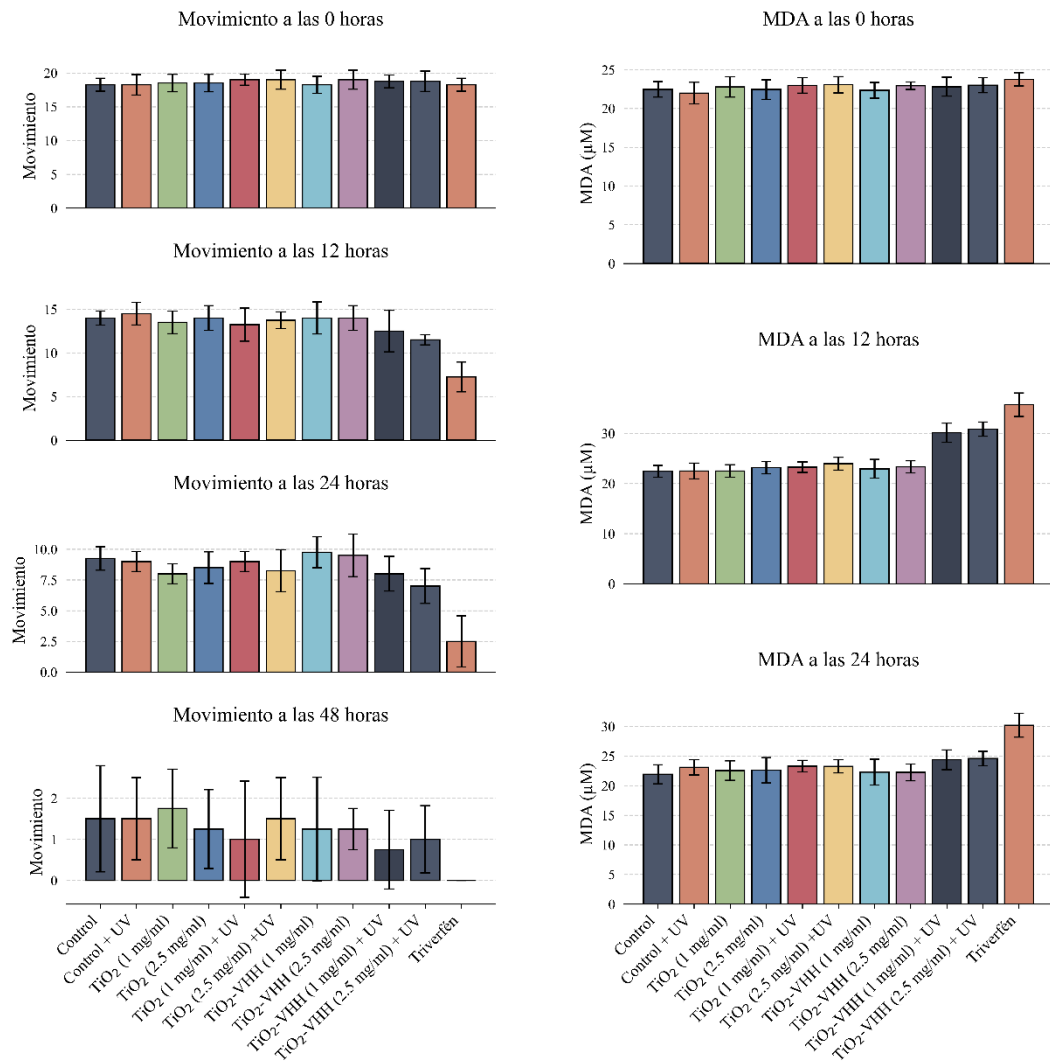
Anexo 22. Estadística movimiento-prueba final. *F. hepatica* se incubaron con TiO₂ y TiO₂-VHH7 (1mg/ml) durante 6 horas, luego se expusieron a luz UV durante 60 minutos. Se midió el movimiento antes y después de la irradiación con luz UV.

Tiempo	Grupo 1	Grupo 2	t	p-valor	Tiempo	Grupo 1	Grupo 2	t	p-valor
0 horas	VHH7	Triverfén	1.27395087	0.215975301	24 horas	VHH7	Triverfén	11.16457202	1.56881E-10
	VHH7 (UV)	Triverfén	1.27395087	0.215975301		VHH7 (UV)	Triverfén	10.35939541	6.32534E-10
	VHH7	TiO ₂ (UV)	1.164544711	0.256676596		Control	Triverfén	9.535642444	2.84693E-09
	VHH7	TiO ₂ - VHH7	1.164544711	0.256676596		Control (UV)	Triverfén	9.5	3.04404E-09
	VHH7	TiO ₂ - VHH7 (UV)	1.164544711	0.256676596		TiO ₂	Triverfén	9.344753044	4.08218E-09
	VHH7 (UV)	TiO ₂ (UV)	1.164544711	0.256676596		TiO ₂ - VHH7	Triverfén	8.358715922	2.82837E-08
	VHH7 (UV)	TiO ₂ - VHH7	1.164544711	0.256676596		TiO ₂ (UV)	Triverfén	6.677918433	1.03075E-06
	VHH7 (UV)	TiO ₂ - VHH7 (UV)	1.164544711	0.256676596		TiO ₂ - VHH7 (UV)	Triverfén	6.218448913	2.93639E-06
	TiO ₂	Triverfén	1.081763729	0.291073005		VHH7	TiO ₂ - VHH7 (UV)	5.025495536	4.95311E-05
	Control (UV)	VHH7	-1.043030243	0.308260937		VHH7 (UV)	TiO ₂ - VHH7 (UV)	4.495802164	0.000179704
	Control (UV)	VHH7 (UV)	-1.043030243	0.308260937		Control	TiO ₂ - VHH7 (UV)	3.989536153	0.000618724
	TiO ₂	TiO ₂ (UV)	0.985764398	0.334966774		Control (UV)	TiO ₂ - VHH7 (UV)	3.747503547	0.001114269
	TiO ₂	TiO ₂ - VHH7	0.985764398	0.334966774		TiO ₂	TiO ₂ - VHH7 (UV)	3.256620593	0.003615096
	TiO ₂	TiO ₂ - VHH7 (UV)	0.985764398	0.334966774		VHH7	TiO ₂ (UV)	2.729764258	0.012232089
	Control (UV)	TiO ₂	-0.880140834	0.388296573		TiO ₂ - VHH7	TiO ₂ - VHH7 (UV)	2.583398843	0.016957103
	Control	VHH7	-0.76088591	0.454803931		VHH7 (UV)	TiO ₂ (UV)	2.458445859	0.02229559
	Control	VHH7 (UV)	-0.76088591	0.454803931		Control	TiO ₂ (UV)	2.191276538	0.03931155
	Control	TiO ₂	-0.579304083	0.568269091		VHH7	TiO ₂ - VHH7	1.945803359	0.06456471
	Control	Triverfén	0.405190208	0.689250892		Control (UV)	TiO ₂ (UV)	1.904958262	0.06994083
	Control	TiO ₂ (UV)	0.373149442	0.712608521		VHH7 (UV)	TiO ₂ - VHH7	1.669949818	0.109097859
	Control	TiO ₂ - VHH7	0.373149442	0.712608521		VHH7	TiO ₂	1.662473788	0.110601447
	Control	TiO ₂ - VHH7 (UV)	0.373149442	0.712608521		Control	TiO ₂ - VHH7	1.412622472	0.171757909
	Control	Control (UV)	0.336752226	0.739494943		TiO ₂	TiO ₂ (UV)	1.372079643	0.183868533
	VHH7	TiO ₂	0.201470608	0.842181804		VHH7 (UV)	TiO ₂	1.369594638	0.184632313
	VHH7 (UV)	TiO ₂	0.201470608	0.842181804		TiO ₂ (UV)	TiO ₂ - VHH7 (UV)	1.327747682	0.197874406
	Control (UV)	TiO ₂ (UV)	0	1		Control	TiO ₂	1.107465953	0.280054538
	Control (UV)	TiO ₂ - VHH7	0	1		Control (UV)	TiO ₂ - VHH7	1.069044968	0.29663942
	Control (UV)	TiO ₂ - VHH7 (UV)	0	1		TiO ₂ (UV)	TiO ₂ - VHH7	-0.938083152	0.358387111
	Control (UV)	Triverfén	0	1		Control (UV)	VHH7	-0.76737546	0.451016063
	VHH7	VHH7 (UV)	0	1		Control (UV)	TiO ₂	0.725129381	0.476015463
	TiO ₂ (UV)	TiO ₂ - VHH7	0	1		Control (UV)	VHH7 (UV)	-0.568796459	0.57525551
	TiO ₂ (UV)	TiO ₂ - VHH7 (UV)	0	1		TiO ₂	TiO ₂ - VHH7	0.425425908	0.67465888
	TiO ₂ - VHH7	Triverfén	0	1		Control	Control (UV)	0.392384742	0.698549681
	TiO ₂ - VHH7	TiO ₂ - VHH7 (UV)	0	1		Control	VHH7	-0.291448254	0.773438808
	TiO ₂ - VHH7	Triverfén	0	1		VHH7	VHH7 (UV)	0.162027724	0.872762938
	TiO ₂ - VHH7 (UV)	Triverfén	0	1		Control	VHH7 (UV)	-0.13596836	0.89308279
12 horas	VHH7	Triverfén	12.49799984	1.81367E-11	48 horas	Control (UV)	Triverfén	7.287383636	2.6796E-07
	TiO ₂	Triverfén	11.92906508	4.45466E-11		VHH7	Triverfén	6.708203932	9.62907E-07
	VHH7 (UV)	Triverfén	10.432677	5.55466E-10		Control	Triverfén	6.159446039	3.36513E-06
	Control (UV)	Triverfén	10.40840947	5.79847E-10		TiO ₂	Triverfén	5.61740366	1.19845E-05
	Control	Triverfén	9.891516833	1.47163E-09		TiO ₂ - VHH7 (UV)	Triverfén	5.244044241	2.92357E-05
	TiO ₂ - VHH7	Triverfén	7.73192141	1.03461E-07		VHH7 (UV)	Triverfén	4.850942751	7.56321E-05
	TiO ₂ (UV)	Triverfén	7.543627986	1.54324E-07		TiO ₂ - VHH7	Triverfén	4.51979772	0.000169477
	VHH7	TiO ₂ - VHH7 (UV)	4.697670854	0.000109819		TiO ₂ (UV)	Triverfén	4.39578111	0.000229442
	TiO ₂ - VHH7 (UV)	Triverfén	4.577821984	0.000147095		VHH7	TiO ₂ - VHH7 (UV)	1.798692335	0.085802985
	TiO ₂	TiO ₂ - VHH7 (UV)	4.201805852	0.00036857		TiO ₂	TiO ₂ - VHH7 (UV)	1.710343452	0.101269828
	VHH7	TiO ₂ (UV)	3.838604398	0.000893309		Control (UV)	TiO ₂ - VHH7 (UV)	1.410294256	0.172435678
	VHH7 (UV)	TiO ₂ - VHH7 (UV)	3.713260136	0.001210605		Control	TiO ₂ - VHH7 (UV)	1.119448327	0.275002527
	Control	TiO ₂ - VHH7 (UV)	3.595035742	0.001610632		TiO ₂ (UV)	TiO ₂ - VHH7 (UV)	1.003731356	0.32642107
	Control (UV)	TiO ₂ - VHH7 (UV)	3.525125951	0.001905625		VHH7 (UV)	TiO ₂ - VHH7 (UV)	0.953025121	0.350931899
	VHH7	TiO ₂ - VHH7	3.236869138	0.003787876		TiO ₂ - VHH7	TiO ₂ - VHH7 (UV)	0.904534034	0.375511533
	TiO ₂	TiO ₂ (UV)	3.229015374	0.003858783		Control	TiO ₂	-0.748385907	0.462153801
	VHH7 (UV)	TiO ₂ (UV)	2.664507758	0.01416037		Control	VHH7	-0.684167455	0.501013468
	TiO ₂	TiO ₂ - VHH7	2.643258063	0.014847849		VHH7 (UV)	TiO ₂	-0.670881385	0.509278867
	Control	TiO ₂ (UV)	2.545584412	0.01843111		TiO ₂	TiO ₂ - VHH7	0.645986794	0.52496958
	Control (UV)	TiO ₂ (UV)	2.427182191	0.023856874		Control (UV)	TiO ₂	-0.628186942	0.536348934
	VHH7 (UV)	TiO ₂ - VHH7	2.150852906	0.042732773		VHH7	VHH7 (UV)	0.595683397	0.557465885
	Control	TiO ₂ - VHH7	2.060408459	0.051379416		VHH7	TiO ₂ - VHH7	0.568796459	0.57525551
	Control (UV)	TiO ₂ - VHH7	1.907344954	0.069616199		Control (UV)	VHH7	-0.546894556	0.589955994
	TiO ₂ - VHH7	TiO ₂ - VHH7 (UV)	1.815380362	0.083122364		TiO ₂	TiO ₂ (UV)	0.497882842	0.623507005
	TiO ₂ (UV)	TiO ₂ - VHH7 (UV)	1.485304054	0.151652729		VHH7	TiO ₂ (UV)	0.40790508	0.687285838
	Control (UV)	VHH7	-1.316810597	0.201455132		Control	Control (UV)	-0.189289775	0.851601186
	VHH7	VHH7 (UV)	0.959651099	0.347659773		Control (UV)	VHH7 (UV)	0.160502723	0.873949734
	Control	VHH7	-0.910193322	0.372585528		Control (UV)	TiO ₂ - VHH7	0.152177182	0.880434168
	VHH7	TiO ₂	0.709124208	0.485695122		VHH7	TiO ₂	-0.14614795	0.885135484
	Control (UV)	TiO ₂	-0.664989515	0.512968572		Control	TiO ₂ (UV)	-0.138796428	0.8908737
	TiO ₂ (UV)	TiO ₂ - VHH7	-0.430170581	0.671256071		VHH7 (UV)	TiO ₂ (UV)	-0.126170353	0.900743061
	VHH7 (UV)	TiO ₂	-0.322901537	0.749818738		TiO ₂ (UV)	TiO ₂ - VHH7	0.122004015	0.904003427
	Control	TiO ₂	-0.305968987	0.762504873		Control	VHH7 (UV)	0	1
	Control (UV)	VHH7 (UV)	-0.303397774	0.764437351		Control	TiO ₂ - VHH7	0	1
	Control	Control (UV)	0.289223426	0.775118397		Control (UV)	TiO ₂ (UV)	0	1
	Control	VHH7 (UV)	0	1		VHH7 (UV)	TiO ₂ - VHH7	0	1

Anexo 23. Gráfico del tiempo de incubación de las *F. hepatica* con el conjugado TiO₂ (0.5 mg/ml)-VHH7. Se incubaron los parásitos con TiO₂ y con el conjugado (0.5 mg/ml) durante 2 y 6 horas, luego los parásitos se expusieron a luz UV durante 60 minutos. El experimento tenía grupos control de *F. hepatica* solo en medio de cultivo con y sin exposición a luz UV. Se midió el movimiento y la concentración de MDA antes y después de la irradiación con luz UV.



Anexo 24. Gráfico de la incubación de las *F. hepatica* con diferentes concentraciones del conjugado TiO₂-VHH7. Se incubaron los parásitos con TiO₂ y con el conjugado (1 y 2.5 mg/ml) durante 6 horas, luego los parásitos se expusieron a luz UV durante 60 minutos. El experimento tenía grupos control de *F. hepatica* solo en medio de cultivo con y sin exposición a luz UV. Se midió el movimiento y la concentración de MDA antes y después de la irradiación con luz UV.



Anexo 25. Prueba final de *F. hepatica* incubada con TiO₂ (1 mg/ml)-VHH7. *F. hepatica* se incubaron con TiO₂ y TiO₂-VHH7 (1mg/ml) durante 6 horas, luego se expusieron a luz UV durante 60 minutos. El experimento tenía grupos control de *F. hepatica* solo en medio de cultivo con y sin exposición a luz UV. Se midió el movimiento y la concentración de MDA antes y después de la irradiación con luz UV.

