



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR | [fcienc.edu.uy](http://fcienc.edu.uy)

**Universidad de la República**  
**Facultad de Ciencias**  
**Maestría en Biología Molecular y Celular**  
**Tesis de maestría**

**Contribución a la  
dilucidación de los  
mecanismos  
proteolíticos que operan  
en la digestión intestinal  
del trematodo parásito  
*Fasciola hepatica***

**Tatiana Basika Cabrera**



**Orientador Dr. Carlos Carmona**  
**Co-orientador Dr. José F. Tort**  
**Montevideo, Uruguay**  
**Mayo, 2012**

---

Dedicada a mi madre, por  
transmitirme su amor por  
la ciencia.

## Agradecimientos

Quiero agradecer a Carlos, mi orientador, por abrirme las puertas en su laboratorio hace muchos años atrás, por su apoyo constante y guía, por la confianza a la hora del trabajo de mesada, y por las horas de discusión crítica sobre los resultados de este trabajo.

A mi co-orientador Pepe, por sumarse a este trabajo y comprometerse, por ayudarme a calmar los nervios, por el apoyo y enseñanzas de biología molecular.

A ANII y PEDECIBA Biología por la financiación de mi beca de maestría y en la instancia de investigación en UCSF.

Al Dr. James McKerrow y el Dr. Conor Caffrey, por permitirme realizar una instancia de investigación en el Sandler Center for Drug Discovery, UCSF. Asimismo, a todos los investigadores del centro, en especial a Alberto Rascón, por contribuir a la expresión de la legumina recombinante, y Anthony O'Donoghue por sus enseñanzas sobre las PS-SCL.

A Rosario Durán y Madelón Portela, de la UByPA, Instituto Pasteur, por las horas dedicadas a los espectros de masa.

Quiero agradecer a las integrantes del tribunal por aceptar participar de una de las instancias más importantes de mi carrera profesional.

A mis compañeros del departamento de Genética, en especial a Nico, mi “compañero de desenquiste” por las horas que pasamos cultivando JRDs, y a Ileana, por ayudarme a comprender un poquito más de su enzima, la FhCL3, y ser mi compañera de viaje en San Francisco.

A la gente de Inmuno, un grupo enorme de gente que me ha sabido apoyar y me ha dejado usar sus instalaciones sin problemas. Asimismo, quisiera agradecer al Departamento de Biotecnología por dejarme hacer uso de sus recursos.

A mis amigos de la UBP, a los que se fueron y a los que están: Martín, Maca, Rodolfo, Flaco, Uruguay, Sheila, Gabi, Patricia, Dinorah, Anabella, Fede, Nati,

Tini, Mono y Ceci. Gracias por aguantar mis neurosis, por los aplausos casi medicinales, y por tantas horas compartidas en las buenas y las malas.

Finalmente quiero agradecerle a mi familia: mamá y papá, por su apoyo incondicional, y por creer que puedo conseguir todo lo que quiero siempre que me lo proponga y trabaje de forma constante y responsable, soy lo que ellos me enseñaron. A mi hermana Jess, por estar ahí siempre. A Bruno y Paula, que sin ser parientes de sangre, son mi familia igual. En especial quiero agradecer a Andrés, que sin su apoyo, paciencia y afecto incondicional yo no hubiera llegado hasta acá.

## Resumen

La digestión de las proteínas de la sangre es un proceso esencial en los parásitos hematófagos. Ese el caso del trematodo *Fasciola hepatica*, donde constituye un proceso catabólico clave para el establecimiento y mantenimiento de la infección y la transmisión de la enfermedad. La Hb es la mayor fuente primaria de aminoácidos que el parásito utiliza en el anabolismo de proteínas, una gran tarea ya que se producen 30-50.000 huevos/día/parásito.

El objetivo de este trabajo es el de contribuir a la dilucidación de los mecanismos por los cuales se produce en el intestino de *F. hepatica* la digestión de las proteínas presentes en la sangre del huésped, a través del abordaje de diversos aspectos del proceso. Como primera parte de este abordaje, se realizó el estudio de las actividades proteolíticas presentes en los PES de gusanos adultos y juveniles por medio de una batería de sustratos fluorgénicos específicos para distintos grupos de proteasas. Esto nos permitió confirmar la existencia de patrones estadio específicos de proteasas digestivas: actividad Catepsina L predominante en el estadio adulto, y presencia de actividad DPP y legumaína en ambos estadios, esta última reportada por primera vez. En juveniles se detectó actividad Catepsina B y L, cuyas intensidades varían conforme pasan los días post-desenquiste.

Mediante el cultivo de JRDs en medio Basch, con el agregado de GRs humanos, pudimos determinar que los parásitos son capaces de producir una temprana lisis celular, y al menos producir la desnaturalización de la molécula de Hb. Asimismo, la presencia de GRs estimula el desarrollo intestinal, con respecto a los JRDs incubados sin GRs. Por otra parte, determinamos la capacidad de los JRDs de digerir otra proteína abundante en la sangre, Albúmina, cuya digestión resultó ser dependiente del análogo permeable del inhibidor de cisteína proteasas E64.

Estudiamos la acción de las distintas catepsinas L recombinantes (FhCL1, FhCL2, FhCL3) sobre la Hb bovina, observándose que las tres enzimas son capaces de degradarla, siendo FhCL1 la que posee mayor capacidad proteolítica. Sin embargo, las CatLs no son las únicas enzimas vinculadas a este proceso, ya que la participación de varios tipos de proteasas en esta digestión queda en evidencia al usar combinaciones de inhibidores de distintas clases de enzimas al estudiar el efecto de los PES de adultos.

Por medio de espectrometría de masa estudiamos a nivel molecular la degradación de Hb bovina por FhCL3, proteasa específica del estadio juvenil. La abundancia de sitios de corte determinados sobre dicho sustrato apoyan un rol central de FhCL3 en la nutrición temprana del estadio invasor.

Se realizó la caracterización y purificación de una actividad DPP presente en los PES de adulto que resultó inestable impidiendo su posterior caracterización molecular. En forma alternativa se realizó el clonado y expresión en *E. coli* de una probable FhDPP2 perteneciente a la familia de serina proteasas S28, miembro del clan SC hidrolasas. Finalmente, se realizó el clonado y expresión de una legumina expresada en el estadio juvenil, distinta de la identificada en el análisis de las ESTs del parásito adulto. Dicha proteína fue expresada en células *E. coli* y fue purificada a partir de los cuerpos de inclusión.

El estudio de los procesos vinculados a la digestión de las proteínas presentes en la sangre, así como la definición del rol de las enzimas proteolíticas contribuye a un mejor entendimiento de la función de una red compleja de proteasas, conservada a través de la evolución de invertebrados. Asimismo, permite profundizar en la búsqueda de nuevos blancos moleculares que puedan ser empleados a futuro en el control de la fasciolosis.

1. Introducción.....	1
1.1. Las proteasas en la biología de los parásitos.....	1
1.1.1. Rol de las proteasas parasitarias en la nutrición.....	1
1.1.1.1. Digestión de hemoglobina en protozoarios parásitos.....	3
1.1.1.2. Digestión de hemoglobina en helmintos parásitos.....	4
1.2. <i>Fasciola hepatica</i> .....	9
1.2.1. Ciclo biológico y fasciolosis. ....	9
1.2.2. Aparato digestivo de <i>F. hepatica</i> . ....	13
1.2.3. Las proteasas de <i>F. hepatica</i> . ....	15
1.2.3.1. Proteasas en el estadio adulto.....	16
1.2.3.2. Proteasas en el estadio juvenil.....	22
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivo general.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. Materiales y métodos.....	28
3.1. Actividades proteolíticas en secreciones de <i>F. hepatica</i> . ....	28
3.1.1. Producción de PES de adulto.....	28
3.1.2. Producción de PES de JRD.....	29
3.1.3. Ensayos enzimáticos. ....	29
3.2. Las proteasas en la alimentación de <i>F. hepatica</i> . ....	31
3.2.1. Alimentación de los parásitos juveniles con GRs.....	31
3.2.2. Cultivo de los parásitos juveniles con Alb-FITC. ....	32
3.2.3. Ensayos de digestión de Hb bovina. ....	33
3.2.4. Análisis de la degradación de Hb bovina por espectrometría de masa.....	34
3.2.4.1. Hidrólisis de Hb por CL3 recombinante. ....	34
3.2.4.2. Análisis de las digestiones por nano LC ESI-MSMS y Maldi-Tof/Tof. ....	34
3.2.4.3. Análisis bioinformático.....	35
3.3. La DPP en <i>F. hepatica</i> .....	35
3.3.1. Caracterización de la actividad DPP en los PES de adulto.....	35
3.3.1.1. Curva de perfil de pH.....	35
3.3.1.2. Perfil de preferencia de sustrato de los PES de estadio adulto mediante PS-SCL (Positional Scanning Libraries) P1-P2. ....	36
3.3.2. Purificación de la enzima nativa.....	36
3.3.3. Clonado de FhDPP2.....	37
3.3.3.1. Análisis de secuencia. ....	37
3.3.3.2. Extracción de ARN y síntesis de ADNc. ....	38
3.3.3.3. Diseño de cebadores.....	38
3.3.3.4. Amplificación del ADN copia que codifica para la DPP mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ....	39
3.3.3.5. Visualización y purificación de los productos obtenidos. ....	40
3.3.3.6. Clonado del ADNc codificante de la FhDPP2 en un vector de expresión procariota. ....	40
3.3.3.7. Pruebas de expresión de la FhDPP2 recombinante.....	41
3.3.3.8. Actividad enzimática. ....	41
3.4. Caracterización molecular de la legumaína secretada por los JRDs.....	42

3.4.1.	Análisis de la secuencia aminoacídica. ....	43
3.4.2.	Producción de la FhLeg3 recombinante. ....	43
3.4.2.1.	Verificación de la expresión en extracto celular total. ....	43
3.4.2.2.	Análisis de la cinética de la inducción en extracto celular total. ....	44
3.4.2.3.	Purificación de la proteína recombinante. ....	44
3.4.2.3.1.	Evaluación de los sistemas de cromatografía de afinidad. ....	44
3.4.2.3.2.	Purificación de la proteína de los cuerpos de inclusión. ....	45
3.4.2.4.	Actividad enzimática. ....	46
4.	Resultados. ....	47
4.1.	Actividades proteolíticas en secreciones de <i>F. hepatica</i> . ....	47
4.1.1.	Actividades proteolíticas en el estadio adulto. ....	47
4.1.2.	Actividades proteolíticas en el estadio juvenil. ....	48
4.2.	Las proteasas en la alimentación de los JRDs de <i>F. hepatica</i> . ....	49
4.2.1.	Observaciones sobre el cultivo de JRDs con GRs. ....	49
4.2.2.	Estudios de degradación de Albúmina-FITC. ....	51
4.2.3.	Digestión de Hb por los parásitos juveniles y adultos. ....	52
4.2.4.	Análisis de la digestión de Hb por FhCL3 empleando espectrometría de masa. ....	56
4.3.	La DPP en <i>F. hepatica</i> . ....	60
4.3.1.	Ensayos de actividad tipo dipeptidil peptidasa en los PES de adulto. ....	60
4.3.2.	Purificación de una DPP nativa. ....	61
4.3.3.	Clonado de FhDPP2. ....	63
4.3.3.1.	Análisis de secuencia y clonado. ....	63
4.3.3.2.	Aislamiento del ADNc codificante de la FhDPP2 y clonado en vector de expresión procariota. ....	64
4.3.3.3.	Expresión de FhDPP2. ....	66
4.4.	Clonado y expresión de una legumaína recombinante asociada al estadio juvenil de <i>F. hepatica</i> . ....	67
4.4.1.	Análisis de la secuencia aminoacídica. ....	67
4.4.2.	Expresión de la FhLeg3 recombinante. ....	68
4.4.3.	Purificación de la proteína recombinante. ....	71
4.4.3.1.	Purificación de la FhLeg3-GST a partir de los cuerpos de inclusión. ....	71
5.	Discusión. ....	75
5.1.	Actividades proteolíticas presentes en las secreciones de parásitos adultos y juveniles de <i>F. hepatica</i> . ....	76
5.2.	Capacidad citolítica de JRDs de <i>F. hepatica</i> en cultivo. ....	78
5.3.	Estudio de la degradación de Alb por los JRDs in vitro. ....	79
5.4.	Digestión de Hb. ....	80
5.5.	La DPP de <i>F. hepatica</i> . ....	82
5.6.	La legumaína de <i>F. hepatica</i> . ....	85
6.	Conclusiones y Perspectivas. ....	87
7.	Bibliografía. ....	92

## 1. Introducción.

### 1.1. Las proteasas en la biología de los parásitos.

Para completar su ciclo de vida, los organismos parásitos deben ganar acceso a su localización definitiva, obteniendo los recursos necesarios de su huésped, evitando al mismo tiempo los mecanismos de defensa dirigidos contra ellos. Diversas moléculas y caminos bioquímicos han evolucionado para efectuar algunos de esos procesos, con las enzimas proteolíticas como componentes principales del modo de vida parasitario. Existe evidencia acumulada en protozoarios y helmintos parásitos que demuestra la correlación que existe entre el extendido rol de las proteasas en los ciclos de vida parasitarios y el incremento en el número de genes de las proteasas, llevando a la presencia de familias multigénicas expandidas (Tort y cols., 1999, Klemba y Goldberg, 2002).

#### 1.1.1. Rol de las proteasas parasitarias en la nutrición.

La relación entre un parásito y su huésped es fundamentalmente nutricional. Por esta razón, no es sorprendente que procurar alimento haya sido una fuerza relevante de selección en la evolución de esta asociación. Un paso muy importante en este camino evolutivo ha sido la adaptación en los endoparásitos a nutrirse a partir de la sangre de sus hospederos. Con la excepción de vitaminas del grupo B, la sangre provee una fuente completa de nutrientes, consistente y renovable (Whitefield, 1979). La hematofagia sin embargo tiene sus desventajas, siendo las más relevantes, la necesaria eliminación del pigmento férrico resultante de la digestión de hemoglobina (Hb), la prevención de la coagulación y la inactivación de los sistemas de defensa, desventajas todas que los parásitos han conseguido superar (revisado por Dalton y cols., 2004).

Las proteínas son los nutrientes más abundantes de la sangre, y en consecuencia, las principales enzimas digestivas en helmintos parásitos e insectos son las proteasas (E.C. 3.4, Wasilewski y cols., 1996, Bogitsh y cols., 1992).

Las proteasas son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos (Barret y cols., 2004). Se pueden clasificar en endopeptidasas, enzimas que clivan enlaces peptídicos del interior de la cadena polipeptídica, y en exoproteasas, que clivan enlaces peptídicos del extremo de la cadena polipeptídica. Estas últimas se subclasifican en aminopeptidasas, que clivan enlaces peptídicos del extremo amino; carboxipeptidasas, que clivan del extremo carboxilo.

Las proteasas también son categorizadas de acuerdo a la naturaleza del residuo catalítico del sitio activo como metalo, serina, cisteína, aspártico, treonina y glutámico. Las proteasas han sido agrupadas en clanes en base a homología a nivel estructural y catalítico, y categorizadas en familias de acuerdo a la homología de secuencia (revisado por Tyndall y cols., 2005).

La clasificación en clanes o familias, etc., no tiene en cuenta que existen enzimas que poseen alta especificidad por un sustrato, mientras que otras poseen especificidades menos restringidas. Esta especificidad viene dada por los aminoácidos que se encuentran adyacentes al sitio del corte. La nomenclatura general de las posiciones de los sitios de clivaje en el sustrato fueron formuladas por Schechter y Berger (1967, Fig. 1). Ellos designaron al sitio de clivaje P1-P1', incrementando la numeración hacia el amino del EP clivable (P2, P3, P4, etc.). Hacia el extremo carboxilo se numeran (P2', P3', P4', etc.).

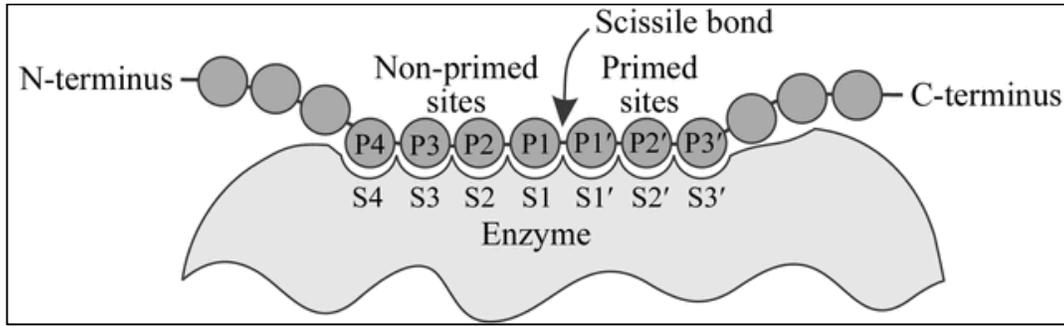
Las proteasas son enzimas ubicuas que operan virtualmente en todo fenómeno biológico. Ellas funcionan no sólo como enzimas individuales, sino a que menudo también lo hacen en cascadas o redes (Barret y cols., 2004). La digestión de proteínas en el intestino es un ejemplo destacable de la función de múltiples proteasas de clases diferentes como parte de un proceso fisiológico coordinado. En los vertebrados, la digestión de proteínas en los alimentos es llevada a cabo por serina proteasas derivadas del páncreas, miembros

principalmente de la familia de la tripsina (Clan PA, Merops). Este grupo de enzimas está altamente conservado entre los vertebrados. Sin embargo, del análisis de la digestión intestinal de invertebrados surge un panorama completamente distinto. En este caso cisteína proteasas del clan CA (también conocido como la familia de la papaína) y aspártico proteasas homólogas a la catepsina D (CatD, clan AA) han sido descritas en el intestino de organismos tan diversos entre sí, como platelmintos (Yamasaki y cols., 1992), nematodos (Williamson y cols., 2002), y artrópodos (Boldbaatar y cols., 2006). El cambio de cisteína y aspártico proteasas a serina proteasas parece haber ocurrido en artrópodos o moluscos.

Nuestro conocimiento de los mecanismos digestivos de las proteínas sanguíneas en general y de la Hb en particular, deriva del estudio de algunos modelos parasitarios de protozoarios (*Plasmodium*) y helmintos (*Schistosoma*, *Ancylostoma*, *Necator*).

#### 1.1.1.1. Digestión de hemoglobina en protozoarios parásitos.

El protozoario *Plasmodium falciparum*, agente etiológico de la malaria humana, degrada casi toda la Hb de la célula huésped durante su breve estadio intraeritrocitario. Esta proteína es degradada en un único organelo ácido, conocido como la vacuola digestiva. A medida que la Hb es procesada, su componente hemo es convertido en el pigmento hemozoina y las cadenas de globina hidrolizadas a sus aminoácidos constituyentes. La hidrólisis de Hb es necesaria para proveer aminoácidos para la síntesis de proteínas, mantener la estabilidad osmótica de los parásitos y proveer el espacio necesario para el crecimiento del estadio intraeritrocítico. Esta hidrólisis es resultado de un proceso cooperativo que involucra proteasas de múltiples clases catalíticas, incluyendo cisteína, aspártico y metalo proteasas (revisado por Rosenthal, 2011).



*Figura 1 – Nomenclatura y definición de los sitios de unión al sustrato de una enzima proteolítica (Schechter and Berger, 1967).*

El clivaje inicial ocurre en la región bisagra de la cadena  $\alpha$  globina y es mediado por aspártico proteasas (Fig. 2). Posteriormente, se alcanza más degradación de las cadenas de globina a través de la acción de estas aspártico proteasas (plasmepsinas I, II, IV) y tres cisteína proteasas (falcipainas-2, 2', 3). Una metaloproteasa (falcilisina) convierte polipéptidos cortos de globina en oligopéptidos de 5-10 residuos. Con respecto a las etapas finales ha sido descrita una DPAP1, ortóloga de catepsina C (CatC), que reside en la vacuola y posee actividad dipeptidil peptidasa (DPP). Su rol probable es la liberación de dipéptidos desde el N-terminal de los oligopéptidos (revisado por Klemba y cols., 2004). Para los dipéptidos se postula que serían clivados por varias aminopeptidasas en la vacuola alimenticia (Pfa-M1 y PfAPP, Dalal y Klemba, 2007) o que podrían ser exportados al citosol, donde serían clivados por una leucina aminopeptidasa (PfLAP) (Stack y cols., 2007). En consonancia con estos roles, inhibidores de aspártico y cisteína proteasas han demostrado ser capaces de bloquear la degradación de Hb y ocasionar la muerte del parásito (Rosenthal, 1995).

#### 1.1.1.2. Digestión de hemoglobina en helmintos parásitos.

Los helmintos hematófagos incluyen representantes de dos fila dentro de los metazoarios: nematodos y platelmintos. Sus ciclos de vida son complejos, y por lo tanto para asegurar la continuidad de la transmisión a través de condiciones ambientales poco favorables, los helmintos liberan grandes cantidades de huevos, cuya producción requiere una dieta rica en proteínas, como la sangre. A continuación se detallan los mecanismos digestivos así como las proteasas

involucradas en los procesos de catabolismo de las proteínas presentes en la sangre, con especial énfasis en la Hb, ya que ha sido la más estudiada.

A diferencia de los protozoarios como *Plasmodium* que se alojan en los glóbulos rojos (GRs), los helmintos necesitan realizar el paso previo de la lisis globular que les posibilita el acceso a la Hb. Este paso de lisis celular es realizado por la acción de hemolisinas dentro del esófago e intestino, proteínas que se postula forman poros en la membrana de los eritrocitos.

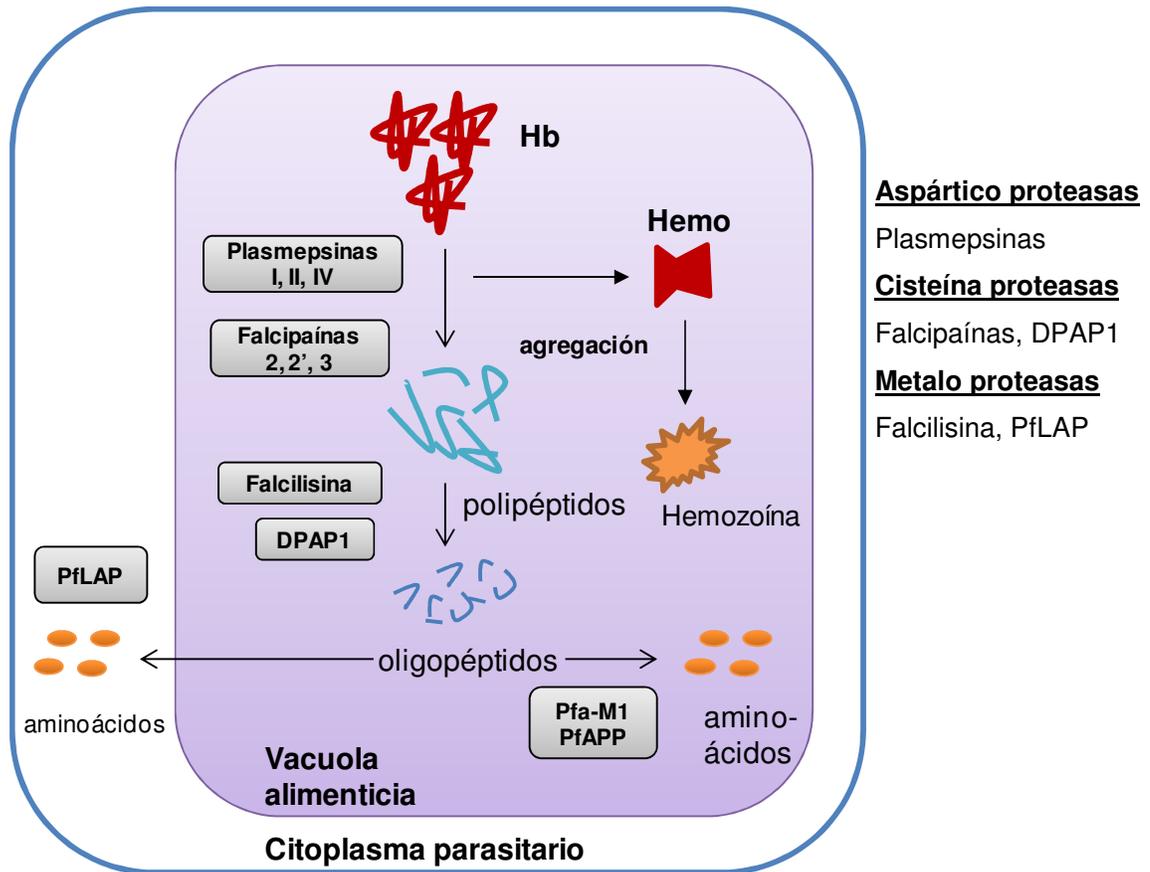


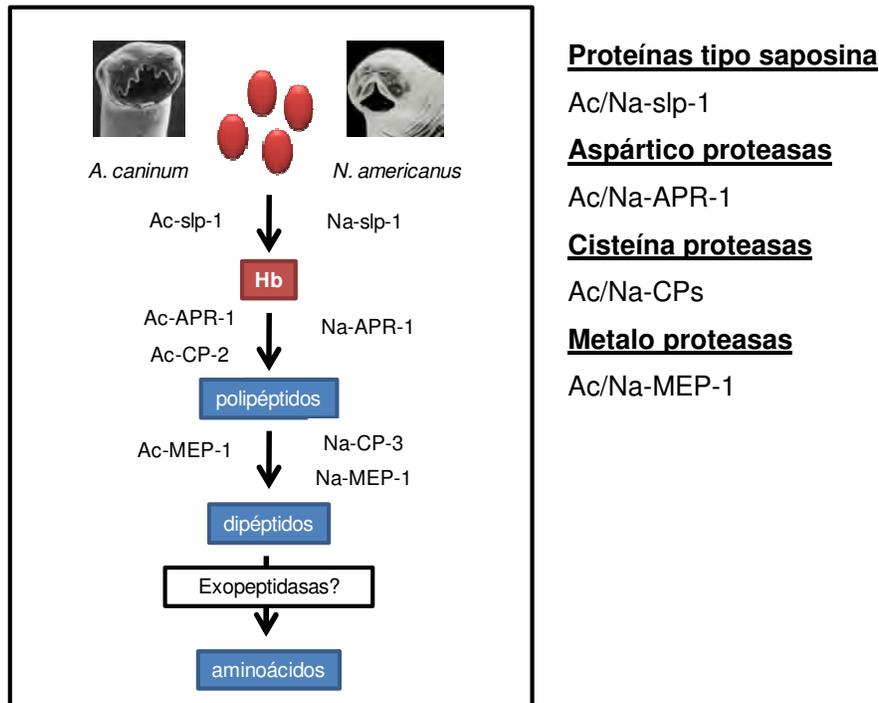
Figura 2 – Diagrama del camino de degradación de la Hb por *P. falciparum* – La Hb es degradada a oligopéptidos por las actividades endopeptidasas de las plasmepsinas (aspártico proteasas), falcipainas (cisteína proteasas) y la falcilisina (metaloproteasa). Luego los oligopéptidos son reducidos a dipéptidos y aminoácidos por una dipeptidil peptidasa (DPAP) y aminopeptidasas (Pfa-M1 y PfAPP en la vacuola alimenticia, y PfLAP en el citosol). (Modificado de Jortzik y cols., 2011)

En el caso del nematodo intestinal *Ancylostoma caninum* Don y cols. (2004) reportaron actividad hemolítica para los extractos de este parásito, y más tarde (Don y cols., 2007), clonaron y expresaron ARNm codificantes de 2 proteínas, Ac-slp-1 y Ac-slp-2. Estas proteínas poseen homología de secuencia con los amebaporos, péptidos que forman poros, del protozooario parásito intestinal *Entamoeba histolytica* (Leippe y cols., 1992), y pertenecen a la familia de las proteínas tipo saposina (SAPLIP). Dichas proteínas poseen 6 residuos de cisteína conservados, involucrados en la formación de tres puentes disulfuro que, en sus homólogos de mamíferos, se involucran en la interacción con lípidos. Pese a que no se observó actividad lítica para las SAPLIP de *A. caninum*, se determinó que se expresan en el intestino en las etapas de larva L3 y adulto, lo que sugiere un rol en la lisis de células del huésped durante la migración y/o alimentación. Más adelante, se resolvieron las estructuras tridimensionales de la Ac-slp-1 y de la Na-slp-1 de *Necator americanus*, otro nematodo intestinal, se demostraron sus propiedades de unión a membrana, y se propusieron modelos por los cuales ocurriría esta unión (Willis y cols., 2011).

En *A. caninum* las proteasas que participan en la digestión de Hb efectúan su función en un camino semi-ordenado de proteólisis donde las aspártico (APR-1) y cisteína proteasas (CP-2) digieren Hb nativa y desnaturalizada, mientras que una metaloproteasa (MEP-1) actúa luego de estas dos enzimas y digiere los péptidos de globina generados por proteólisis previa (Williamson y cols., 2004). Para otros nematodos, como *N. americanus*, se reafirma el concepto de una cascada de degradación. Se utilizaron formas recombinantes de una aspártico proteasa Na-APR-1, una cisteína proteasa Na-CP-3, y la metaloproteasa Na-MEP-1 para determinar sus funciones en la degradación de Hb por el parásito adulto. Se demostró que la Na-APR-1 recombinante clivaba Hb humana intacta. En contraste, Na-CP-3 y Na-MEP-1 no eran capaces de clivar Hb intacta, pero sí los fragmentos de globina liberados por la hidrólisis de Na-APR-1, lo que implica un proceso ordenado de hemoglobinolisis (Fig. 3). En estudios del transcriptoma de estos parásitos, se encontraron ESTs que codifican para aminopeptidasas y carboxipeptidasas, pero todavía no se han

estudiado sus roles en la digestión de Hb (Ranjit y cols., 2009). Un ejemplo de esto es un antígeno denominado contortina, presente en *Haemonchus contortus*, otro nematodo gastrointestinal, que mediante el análisis por espectrometría de masa (MS) resultó estar compuesto de dos proteínas, Hc-PCP1 y Hc-PCP2, con homología a prolil carboxipeptidasas de la familia S28 (Geldhof y Knox, 2008).

En los helmintos trematodos del género *Schistosoma*, agentes de la esquistosomiasis humana, la helmintiasis que causa mayor número de muertes a nivel mundial, la lisis de GRs ocurre en el esófago, aunque el mecanismo no



*Figura 3 – Diagrama de la vía de degradación de la Hb en dos nematodos hematófagos – La lisis de GRs estaría mediada por una SAPLIP. El ataque inicial a la molécula de Hb es mediado por una aspártico proteasa en el caso de *N. americanus* (Na-APR-1), y por una aspártico o una cisteína proteasa en el caso de *A. caninum* (Ac-APR-1 y Ac-CP-2). Los polipéptidos generados son degradados por la acción de cisteína y metalo proteasas (Na-CP-3 y Na-MEP-1, Ac-MEP-1). La subsecuente degradación a aminoácidos ocurriría por la acción de exopeptidasas, que han sido identificadas a nivel de ESTs con que tendrían homología a una prolil carboxipeptidasa.*

es del todo conocido. Se ha identificado en *S. mansoni* un ADNc codificante para una proteína perteneciente a la familia de las SAPLIPs, denominada Sm-

slp-1 (Don y cols., 2008), que se expresa en la gastrodermis del parásito adulto.

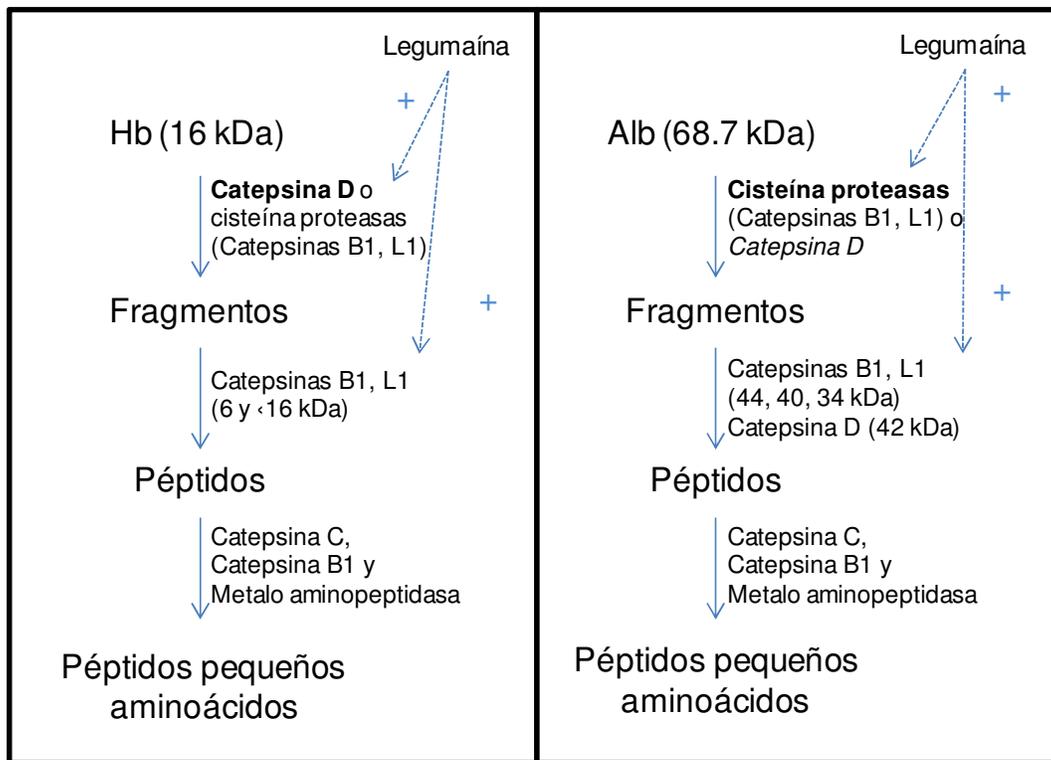
Una cascada o red proteolítica involucrando aspártico y cisteína proteasas ha sido propuesta como mecanismo de degradación catalítica de la Hb en helmintos hematófagos (Sajid, 2002, Williamson, 2003). Delcroix y cols. (2006) confirmaron por medio de marcaje con sondas fluorescentes acopladas a inhibidores de proteasas, la presencia de proteasas activas asociadas al intestino de *S. mansoni*. Estas incluyen una catepsina B1 (CB1), una catepsina L1 (CL1), una CatD, una CatC, una asparagina endopeptidasa (AE) o leguminaína, y una LAP. En el intestino de este parásito las proteasas funcionan en una red de degradación proteica cooperativa (Fig. 4). En la degradación de Hb, la CatD es la principal responsable del clivaje primario, aunque se observa cierta acción redundante por parte de las cisteína proteasas, ya que en ausencia de la CatD puede ocurrir algo de degradación. Este clivaje primario libera dos péptidos de 6 y 16 kDa, que son subsecuentemente degradados por las CatB y CatL, siendo la CatL, menos abundante, la que aporta cierta redundancia al clivaje realizado por la CatB. Los autores de este artículo también estudian el rol de estas proteasas en otra proteína componente mayoritario de la sangre, la albúmina (Alb). Para esta proteína, son las cisteína proteasas que realizan el clivaje inicial, y existe algo de redundancia en la actividad de CatB y CatL en el proceso. Las aspártico proteasas se encuentran poco involucradas en los clivajes iniciales, pero tiene un rol preponderante en los clivajes subsecuentes. Combinando inhibidores de cisteína y aspártico proteasas se obtuvo un resultado sinérgico, aboliendo en un 43% la degradación de la proteína. Sin embargo, para abolir completamente la degradación de la Alb, se requiere la acción adicional de inhibidores de leguminaínas.

La actividad exopeptidasa de la CatB y las exopeptidasas CatC y LAP (McCarthy y cols., 2004) degradarían los péptidos liberados por la acción de las endopeptidasas para ambas proteínas.

## 1.2. *Fasciola hepatica*.

### 1.2.1. Ciclo biológico y fasciolosis.

Los platelmintos trematodos pertenecientes a la subclase Digenea, como *F. hepatica*, se caracterizan por tener un ciclo de vida complejo (Fig. 5), donde están involucrados uno o más huéspedes: un molusco como huésped intermediario, donde ocurre la multiplicación larvaria y un vertebrado como huésped definitivo, donde ocurre la reproducción sexual de los adultos. Los



**Figura 4 – Dos caminos proteolíticos paralelos para la degradación de proteínas sanguíneas del huésped por *S. mansoni*** – Las endopeptidasas (catepsinas B1, L1 y D) son responsables por los clivajes primarios sobre ambos sustratos. Las exopeptidasas (catepsinas C y B1, metaloproteasas) actúan sobre los péptidos liberados por acción de las endopeptidasas. Si bien la CatD actúa en el clivaje inicial de la molécula de Hb, existe cierta redundancia en el clivaje realizado por las cisteína proteasas, a juzgar por estudios realizados con combinaciones de inhibidores específicos de cada clase. Las cisteínas proteasas son responsables del origen de dos especies con masa molecular de entre 16 y 6 kDa. Para la degradación de Alb, la CB1 parece estar involucrada en el clivaje inicial, pero nuevamente existe algo de redundancia en la acción de CL1 y CatD. La CatD tiene un importante rol en la degradación de productos de 42 kDa generados a partir del clivaje primario. Las cisteína proteasas juegan un rol importante en la degradación de productos de 34 a 44 kDa. (Modificado de Delcroix y cols., 2006)

miembros de la familia *Fasciolidae* son hermafroditas y en ellos puede ocurrir autofertilización, aunque es común que la reproducción sexual en el huésped definitivo ocurra por fertilización cruzada (revisado por Andrews, 1999).

Luego de la fecundación los adultos de *F. hepatica*, alojados en los conductos biliares, ponen huevos. Estos huevos salen del conducto biliar al duodeno y luego al intestino donde son eliminados con las heces. La eclosión ocurre luego de que quedan libres de materias fecales. La humedad, temperatura y tensión de oxígeno constituyen factores críticos para su supervivencia. La siguiente fase, el miracidio, es estimulado por la luz a secretar enzimas que digieren las sustancias que cierran el opérculo. El miracidio es periforme, ciliado, y mediante movimientos activos en el agua nada hacia el huésped intermediario. Este es un molusco gasterópodo anfibio del género *Limnea*. En Uruguay la única especie con relevancia epidemiológica conocida es *Limnea viatrix* (Acosta, 1994).

El miracidio se adhiere al caracol por acción de su papila anterior y penetra el tegumento por medio de enzimas histolíticas. Dentro del mismo se reproduce asexualmente: se convierte en un esporocisto joven de forma elíptica, en cuyo interior a su vez, se forman acúmulos de células germinales a partir de las cuales se producen las redias por un proceso de partenogénesis (de 5 a 8 por esporocisto). Luego éste se rompe y las redias migran hacia el hepatopáncreas del caracol.

En las redias aparecen nódulos de germinación que se transforman en cercarias. Estas son ovals y presentan una cola. Ya maduras, abandonan la redia por su poro de nacimiento, quedando a la espera de estímulos exteriores para abandonar el caracol, lo que hacen gracias a su gran movilidad que les permite desplazarse activamente por el agua, para luego adherirse sobre vegetales, cerca de la superficie. Entonces adquieren su forma quística, perdiendo la cola y rodeándose de una cubierta preformada que liberan al exterior. Así se transforman en metacercarias, que son aptas para infectar al huésped definitivo luego de 10 días de maduración.

Una vez ingerida, la metacercaria se desenquista en el intestino delgado, dando lugar a los juveniles recientemente desenquistados (JRD), que atraviesan la mucosa intestinal, y migran por la cavidad abdominal hacia el

hígado. Una vez que atraviesan la cápsula hepática, los juveniles migran por el parénquima, causando hemorragias y fibrosis. Durante este período los parásitos crecen significativamente y cuando alcanzan los conductos biliares maduran sexualmente a adultos y se establecen en forma definitiva. A la octava semana de infección se encuentran huevos en la bilis, y posteriormente en las heces, completando el ciclo.

La fasciolosis es una enfermedad que afecta ganado ovino, bovino y al hombre, y es causada por los trematodos *F. hepatica* y *F. gigantica*. *F. hepatica* se distribuye en climas templados de todos los continentes, mientras que *F. gigantica* tiene una distribución tropical limitada a regiones de Asia y África. Se ha estimado que 250 millones de ovinos y 350 millones de bovinos en el mundo están en riesgo de infección, con pérdidas económicas productivas calculadas en 3000 millones de dólares anuales (Spithill y cols., 1999, Mas-Coma y cols., 2005).

Los perjuicios generados por la presencia del parásito en el ganado bovino, son debidos primariamente a la reducción en la ganancia de peso y fertilidad así como a la disminución en la producción lechera y decomiso de órganos parasitados en los animales faenados. En ovinos, las consecuencias pueden ser más severas y tener expresión clínica, llevando en algunos casos a la muerte del animal infectado. En nuestro país la fasciolosis por *F. hepatica* es una de las helmintiasis con mayor prevalencia en los rumiantes. Se ha estimado que las pérdidas generadas por este motivo en Uruguay superan los 20 millones de dólares anuales (revisado por Acosta, 1994).

Una enfermedad infecciosa en animales puede ser transmitida al hombre, constituyéndose en una zoonosis. La fasciolosis humana es considerada una zoonosis emergente en particular en varias regiones de América del Sur y algunas regiones de África y Europa. En América del Sur, los mayores niveles de prevalencia se localizan en el noroeste del Altiplano boliviano y los valles de Cajamarca y Mantaro en Perú, con 72% y 24.4% en encuestas coprológicas respectivamente (González y cols., 2011). La Organización Mundial de la Salud ha incluido a la fasciolosis humana entre las enfermedades tropicales desatendidas (en inglés Neglected Tropical Diseases), dado que se calcula que

2.5 millones de personas se encuentran infectadas y unas 150 millones más en riesgo de infección (Mas-Coma y cols., 1999).

Como para la gran mayoría de las helmintiasis, donde no existen vacunas disponibles, la quimioterapia constituye la alternativa de control de la fasciolosis empleada con mayor frecuencia por los productores. Sin embargo, el tratamiento se realiza muchas veces cuando ya se ha producido el daño hepático, y por otro lado es costoso y no evita la reinfección de los animales. En nuestro país las altas cifras de prevalencia registradas en forma persistente delatan el fracaso de dicha estrategia. A escala internacional, el problema es similar, agravado por el alto costo de agentes fasciolocidas, como el triclabendazol, para pequeños productores de países subdesarrollados, donde la prevalencia llega en algunos casos al 90% (Spithill, 1999). Un elemento adicional relevante que compromete las estrategias farmacológicas es el surgimiento de parásitos resistentes a dicho fármaco, reportado inicialmente en Irlanda en 1993 y que en pocos años se ha confirmado en distintos países (Brennan, 2007). A esto se suma una preocupación creciente a nivel de los consumidores por la presencia de residuos químicos provenientes de fármacos en la carne. Basta agregar que en nuestro país el fasciolocida de uso más extendido entre los productores es el closantel debido a su bajo costo con relación al triclabendazol. El uso de closantel se encuentra prohibido en la Unión Europea (UE), y en el próximo año el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de nuestro país incluirá en el muestreo anual que realiza para la UE la determinación de los niveles de closantel en tejido. Debido a esto, en un futuro cercano se deberá evitar su uso en aquellos animales que se faenen para exportar con dicho destino, transformándose así el tratamiento de la fasciolosis en una significativa barrera para-arancelaria.

Tomados en su conjunto estos datos cuestionan la sustentabilidad del control farmacológico como estrategia central en el control de la fasciolosis. Esta falta de sustentabilidad resalta la importancia de estrategias alternativas de control, en particular las inmunoproliféricas.

### 1.2.2. Aparato digestivo de *F. hepatica*.

*F. hepatica* presenta en su estadio adulto un tubo digestivo incompleto dividido en boca, faringe, esófago, y ciegos intestinales birrámeos, con divertículos laterales altamente ramificados.

Las células de la gastrodermis del intestino de las etapas infectivas de *F. hepatica* en el hospedero definitivo está lleno de vesículas secretorias que se producen y almacenan en la metacercaria. Las células epiteliales de este estadio están especializadas en la secreción pero no en la absorción. Luego del desenquiste, la cantidad de vesículas secretorias disminuye drásticamente, lo que implica que son requeridas para el desenquiste y la penetración de la pared intestinal del huésped. Luego de penetrar el intestino, ya en el parénquima hepático, aparece un nuevo tipo de célula secretoria que posee morfología similar a la del adulto, aunque el verdadero fenotipo secretor/absortivo de las células gastrodérmicas del adulto no se alcanza hasta que el parásito llega al canalículo biliar (Bennet, 1975).

Dentro del intestino de *F. hepatica* la gastrodermis está formada por una única capa de células epiteliales, que sufren una serie de transformaciones cíclicas, involucrando una fase secretoria, donde hay un aparato de Golgi activo y numerosos cuerpos de secreción tipo zimógeno, seguidos de una fase de intensa absorción. Durante la fase de absorción, las lamelas superficiales son más numerosas, existen pocos cuerpos de secreción y los complejos del Golgi se encuentran inactivos. Sin embargo, existen numerosos cuerpos citoplasmáticos que indican una intensa actividad de endocitosis y autofagia (Robinson y Threadgold, 1975). Los eventos de una célula no se encuentran sincronizados con los de las adyacentes, por lo tanto la absorción y la secreción pueden ocurrir más o menos de forma simultánea a lo largo de la gastrodermis. Otro grupo de células, con una musculatura subepitelial más desarrollada, está asociado con el movimiento del material ingerido en la luz del intestino y la mezcla de los contenidos de las vesículas secretorias (Fairweather y cols., 1999).

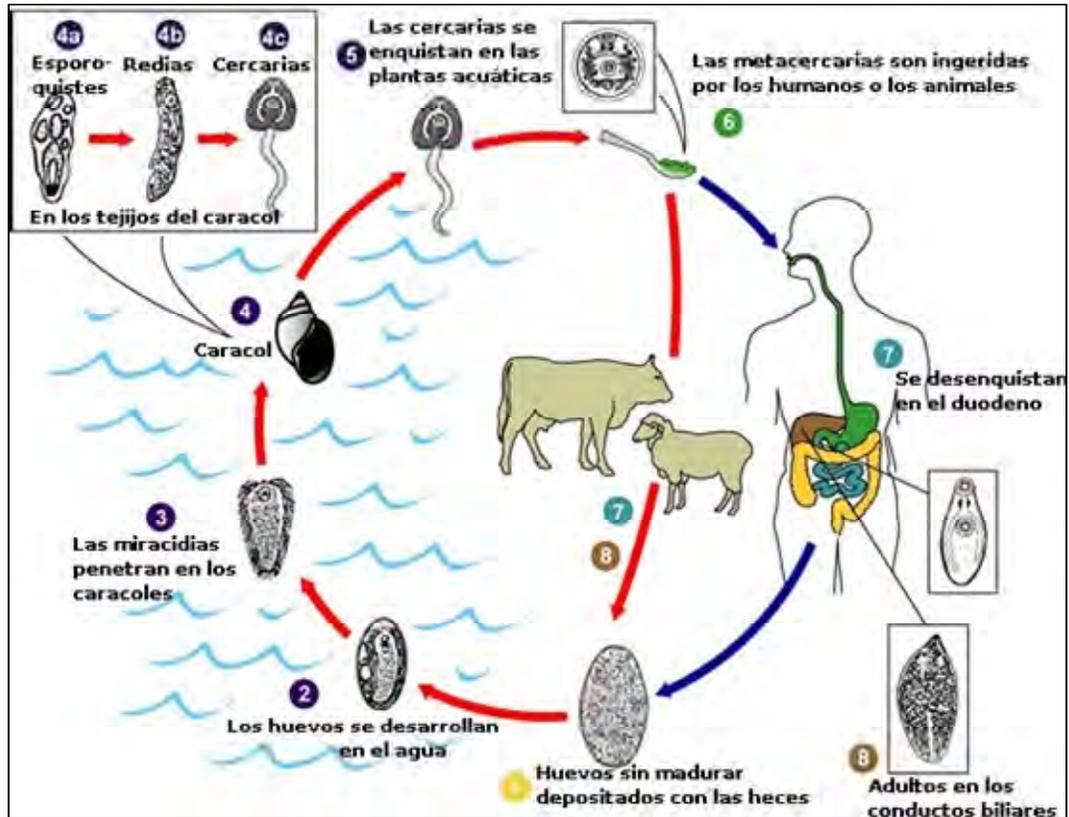


Figura 5 – Ciclo de vida de *F. hepatica* – Los huevos inmaduros (1) son liberados a los conductos biliares, de allí al intestino, y finalmente al exterior en las heces. Se convierten en embrionados (2) en el agua, y liberan miracidios (3), que invaden al huésped intermediario, un gasterópodo del género *Lymnae* (4). En el mismo los parásitos pasan por distintas etapas de desarrollo: esporocisto (4a), redia (4b) y cercaria (4c). Las cercarias son liberadas del caracol (5) y se enquistan como metacercarias (6) en plantas acuáticas u otras superficies. Los mamíferos se infectan al ingerir vegetales que contienen las metacercarias. Luego de la ingestión las metacercarias se desenquistan (7) en el duodeno y migran a través de la pared intestinal, la cavidad peritoneal, y el parénquima hepático hacia los conductos biliares, donde se desarrollan a adultos (8). En el hombre la maduración lleva entre 3 a 4 meses. Los adultos residen en los canalículos del huésped definitivo. *F. hepatica* infecta varias especies animales, en su mayoría herbívoros. (Tomado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

En los conductos biliares los adultos se alimentan principalmente de sangre (y posiblemente de células epiteliales del conducto), para lo cual deben perforar sus paredes para acceder a los nutrientes. Mediante la contracción coordinada de los músculos radiales, ecuatoriales y meridionales de las ventosas oral y ventral genera una poderosa fuerza de succión que lleva los nutrientes hacia la faringe. La succión continua y localizada de los músculos de la ventosa oral y

faringe, sumada a la acción pulsante de la musculatura del cuerpo del gusano es suficiente para romper vasos sanguíneos superficiales y crear una corriente de sangre que es impulsada a la parte posterior del tubo digestivo por la actividad peristáltica de la faringe y el esófago (Dalton y cols. 2004).

Una vez en el intestino, la sangre es rápidamente hemolisada en las condiciones ácidas del lumen y su presencia induce un flujo inmediato de secreciones digestivas de la gastrodermis. La lisis de los eritrocitos ocurre por acción de una proteína llamada Saposina, que se secreta en el esófago del parásito y cuya función sería la formación de poros por medio de la interacción con los lípidos de la membrana del GR (Espino y Hillyer, 2003), liberando su contenido, haciéndolo disponible para la digestión enzimática y la absorción de nutrientes a través de la pared del intestino del parásito. En efecto, los autores demostraron que la proteína tiene acción hemolítica sobre GRs humanos y células polimorfonucleares de sangre periférica. La digestión es predominantemente extracelular, y cualquier residuo, como el pigmento hemozoína, aparece en el lumen intestinal del huésped, por lo que su eliminación ocurre simplemente por regurgitación (Halton, 1967).

### 1.2.3. Las proteasas de *F. hepatica*.

El primer estudio sobre la presencia de actividades proteolíticas en extractos del parásito corresponde a Howell, quien en 1966 demostró que los juveniles de *F. hepatica* liberaban enzimas *in vitro* que eran capaces de clivar colágeno, y postuló que estas enzimas estaban involucradas en la penetración del tejido. Luego de casi dos décadas, Chapman y Mitchell (1982) describieron que los parásitos inmaduros de *F. hepatica* secretaban una enzima proteolítica tior dependiente tipo papaína, que clivaba inmunoglobulinas (Igs) de ratón, rata, conejo y oveja *in vitro*. En base a estudios con inhibidores, esta enzima fue reportada como una cisteína proteasa cuya actividad era óptima a pH 3.5-4.5, y se veía potenciada en presencia de 5mM de ditioneitol (DTT) o 100mM de cisteína. Fue el estudio de Dalton y Heffernan (1989) el que permitió avanzar

sustantivamente en la caracterización de las actividades proteolíticas secretadas/excretadas por el parásito adulto.

#### 1.2.3.1. Proteasas en el estadio adulto.

Dalton y Heffernan (1989) analizaron los productos de excreción - secreción (PES) liberados por los parásitos adultos inmaduros de 5 semanas y adultos *in vitro* empleando geles de poliacrilamida co-polimerizados con gelatina (GS-PAGE) y encontraron que *F. hepatica* liberaba 11 bandas de actividad proteolítica. Todas fueron clasificadas como cisteína proteasas ya que eran inactivadas por inhibidores específicos de esta clase de proteasas, como el trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-4-guanidino-butano (E64), y mostraban actividad potenciada en presencia de agentes reductores como la cisteína y el DTT. Se compararon las proteasas liberadas por las formas inmaduras y los adultos, los perfiles proteolíticos resultaron ser similares. Los autores postularon que estas proteasas participaban en la degradación extracorporeal de GRs y proteínas, así como en la penetración de los tejidos del huésped, en particular aquellas activas a pH fisiológico.

El mismo grupo luego demostró que estas actividades proteolíticas correspondían, en el adulto, únicamente a dos CatLs, un tipo de cisteína proteasa lisosomal, que en mamíferos junto con las catepsinas B, H y S pertenecen a la superfamilia de la papaína. Se trata de dos enzimas predominantes, llamadas catepsina L1 (FhCL1) y catepsina L2 (FhCL2) (Smith y cols., 1993a, Dowd y cols., 1994), que fueron aisladas en base a sus distintas especificidades contra substratos peptídicos fluorogénicos. La FhCL1 presenta un peso molecular aparente de 27 kDa, un amplio rango de pH óptimo entre 4.5-7.0 y posee alta afinidad por el péptido sintético fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC (Z-Phe-Arg 7-amido-4-metilcoumarina hidrocloreuro) (Smith y cols., 1993a). La FhCL2 tiene un peso molecular aparente de 29.5 kDa, actividad en el rango 4.5- 8.0 de pH y posee alta afinidad por Z-Phe-Arg-AMC y Tos-Gly-Pro-Arg-AMC (Dowd y cols., 1994). Estudios de inmunolocalización han demostrado que estas enzimas son sintetizadas y empaquetadas en vesículas

dentro de células gastrodérmicas (revisado por Dalton, 2004). Ambas catepsinas son producidas como zimógenos inactivos, que requieren el clivaje de los prosegmentos para convertirse en enzimas funcionalmente activas. Los prosegmentos funcionan como reguladores de la actividad enzimática uniéndose al sitio activo, y en humanos funcionan como chaperonas intermoleculares que son importantes para el correcto plegamiento de la proteína y para el tráfico intracelular al lisosoma (revisado por Stack y cols., 2011). Ambas catepsinas son secretadas por el parásito en el medio de cultivo y juntas representan el 80% del contenido proteico de los PES. Los estudios sobre sustratos biológicos demostraron que ambas son capaces de producir el corte de inmunoglobulinas, produciendo fragmentos Fab y Fc, indicando un papel activo en los mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica dirigida contra el parásito (Smith y cols., 1993b, Berasain y cols., 2000). Por otro lado, FhCL2 es capaz de degradar fibrinógeno generando un coágulo bioquímicamente diferente al producido por la trombina. Fue sugerido que el efecto pro coagulante de FhCL2 podría impedir un sangrado excesivo de las lesiones en la pared de los canalículos biliares, inducidas por el parásito al alimentarse (Dowd y cols., 1995). Ambas enzimas son capaces de degradar colágeno, fibronectina y laminina, lo cual sugiere su participación en los procesos de degradación tisular que tienen lugar durante la invasión y migración (Berasain y cols., 1997). Más recientemente, Stack y cols. (2008) demostraron que la configuración que adoptan los residuos 67, 157 y 158 del sitio activo de FhCL2, crea una topología que le permite a esta enzima poseer una inusual actividad colagenolítica. El surgimiento de una función colagenolítica especializada en *F. hepatica* contribuiría al éxito en la invasión del huésped por parte de este parásito. Lowther y cols. (2008) demostraron que la FhCL1 puede degradar eficientemente Hb humana en un medio ácido (pH 4.5). Utilizando espectrometría de masa fue posible identificar los sitios de clivaje dentro de las cadenas de globinas y determinar el tamaño de los péptidos generados por la digestión. La FhCL1 mostró digerir la cadena  $\alpha$ -globina en 83 sitios y la cadena de  $\beta$ -globina en 89 sitios, generando pequeños péptidos de 4 a 14 aminoácidos, incluso algunos tri-péptidos. Respecto a los residuos preferidos por la enzima dentro de la molécula, la mayoría resultaron

ser hidrofóbicos (Leu>Val>Ala>Phe). Más recientemente se describió otra catepsina de tipo L minoritaria en los PES de adultos, denominada FhCL5. Tiene un peso molecular aparente de 24.4 kDa, y preferencias de sustrato similares a las de FhCL1 (Smooker, 2000). Mediante el estudio proteómico de las CatLs presentes en los PES de adulto (Robinson, 2008), se identificaron las 3 CatLs con sus respectivas abundancias: FhCL1 (67.39%), FhCL2 (27.63%), FhCL5 (4.98%).

Las CatLs del gusano adulto de *F. hepatica* son secretadas en abundancia, estimándose su producción en alrededor de 0.5 a 1.0 µg/ hora/ parásito. Los altos niveles de secreción no sorprenden cuando se tiene en cuenta que el parásito instalado en el canalículo biliar debe ingerir altas cantidades de GRS que soportan la producción de una enorme progenie (30-50.000 huevos/ día/ parásito). La importancia en su función se ve también reflejada en la alta tasa de transcripción de sus genes, ya que aproximadamente el 10% de los ADNc en una librería de ESTs preparadas a partir de ARN de adulto codifican para estas enzimas (Dalton, 2006).

El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de CatL de *F. hepatica* muestra que esta familia de proteasas surge por medio de duplicaciones génicas y divergencia en 5 clados principales. Utilizando enzimas recombinantes representativas de los dos clados predominantes se determinaron las preferencias respecto al sitio activo: el clado 1 posee un sitio activo que se ha abierto para acomodar residuos de mayor tamaño, hidrofóbicos, mientras que el clado 2, favoreció cambios en el sitio activo que permitieron acomodar mejor residuos de Pro en el sitio S2, otorgándole la capacidad de clivar colágeno nativo, que contiene un motivo Gly-Pro-X. Esto le confiere un rol central en los mecanismos de invasión y migración. Si bien FhCL5 exhibe una homología del 80% con FhCL2, presenta un sitio S2 intermedio, y no acomoda sustratos con un residuo de Pro en P2. Esto demuestra que *F. hepatica* desarrolló una serie de proteasas secretadas con especificidades de sustrato solapantes, que constituyen un sistema más eficiente para actuar sobre diversos blancos moleculares presentes en el huésped definitivo (Robinson y cols., 2008).

La participación de FhCL1 y FhCL2 en procesos relevantes para la sobrevivencia del parásito dentro del hospedero ha sido confirmada por la protección inducida contra la infección por la inmunización con dichas enzimas. La vacunación con FhCL1 o FhCL2 nativas en ovejas Corriedale desarrollada por nuestro grupo generó niveles de protección contra el desafío con metacercarias de 33% y 34%, destacándose una reducción significativa en el número de huevos, tanto para FhCL1 (71%) como para FhCL2 (81%). La combinación de ambas CatLs produjo mayores niveles de protección (60%) que cuando se administran separadas (Piacenza y cols., 1999). En bovinos se alcanzaron niveles de protección de 53% para FhCL1, mientras que en combinación con otra molécula presente en los PES, identificada como Hb de *F. hepatica* (Dalton y cols., 1996), se alcanzaron niveles de protección de 52% y 72% para FhCL1 y FhCL2, respectivamente (Piacenza, 1999). Tanto para ovinos como bovinos, se ha demostrado que los anticuerpos inducidos en los animales inmunizados tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica, lo que sugiere que se trata de un mecanismo relevante en la capacidad protectora de éstos inmunógenos (Smith y cols., 1994, Piacenza y cols., 1999).

Las FhCL1 y FhCL2 nativas pueden ser purificadas a partir de los PES de gusanos adultos por medio de una combinación de cromatografías de gel filtración e intercambio iónico convencionales y recuperadas en suficiente cantidad como para permitir ensayos de vacunación en el ganado. De todas formas, frente a la perspectiva de realizar ensayos de vacunación a mayor escala, se requieren grandes cantidades incompatibles con la purificación de las enzimas nativas. La producción de CatLs recombinantes en su forma funcional requiere expresión de la forma pro-madura de la enzima, ya que la región del pro-péptido es necesaria para el correcto plegamiento de la misma. Los sistemas de expresión procariota (*Escherichia coli*) no son adecuados para la producción de las proteasas funcionalmente activas, aunque se han empleado para expresar proteínas no activas de *F. gigantica*, que fueron subsecuentemente re-plegadas a su forma activa. Sin embargo, las metodologías de re-plegamiento son complejas y caras, por lo que no resultan

prácticas en los esquemas de producción comercial (Smith y cols, 1993a, Dowd y cols., 1994, Yamasaki y cols., 2002).

Los sistemas de levaduras han probado ser más exitosos para la expresión funcional de varias proteasas de parásitos, incluyendo las CatLs de *F. hepatica*. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, transformada con los ADNc de longitud completa de FhCL1 y FhCL2, expresa y secreta las enzimas con baja productividad (100 µg/L), y por lo tanto no adecuada para la producción a gran escala. En función de estos magros resultados productivos se ha empleado la levadura *Pichia pastoris* usando vectores que incluyen el factor  $\alpha$  de levaduras pre-pro-señal, alcanzándose altos niveles de expresión para FhCL1 de 800 µg/L. Las propiedades físico-químicas (especificidad de sustrato, pH óptimo, estabilidad, etc.) y el peso molecular de las CatLs son similares a las de la enzima nativa, no ocurriendo glicosilación post-traducciona (revisado por Dalton y cols., 2003).

Si bien varios ADNc codificantes para cisteína proteasas del tipo CatB, han sido caracterizados en adultos, la actividad proteolítica correspondiente es baja en los tejidos del parásito y su presencia en los PES de adultos no ha sido aún demostrada (Robinson y cols., 2009).

Otras proteasas asociadas al tubo digestivo de los parásitos adultos, han sido identificadas, se trata de exopeptidasas que actúan sobre el extremo N-terminal de los polipéptidos: DPP (EC 3.4-3.12) y LAP (EC 3.4-11.1) (Carmona y cols., 1994, Acosta y cols., 1998).

La DPP de *F. hepatica* se encuentra formando parte de los PES del parásito, por lo que se presume que actúe sobre los polipéptidos generados luego del ataque inicial de las CatLs (Carmona y cols., 1994). Presenta actividad sobre los sustratos sintéticos fluorogénicos Gly-Pro-AMC y Lys-Ala-AMC por lo que se trata de un perfil de actividad que comparte características con las DPP II y IV de mamíferos, pero cuyos inhibidores específicos puromicina y bacitracina no la inhiben. La enzima purificada tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 200kDa y es inhibida por el PMSF, inhibidor de serina

proteasas en altas concentraciones por lo que se presume que se trata de una serina proteasa con características novedosas.

La LAP, es una metaloproteasa presente en el gastrodermis de gusanos adultos, de localización citosólica; puede ser purificada por afinidad con su inhibidor, la bestatina, a partir de una fracción soluble en el detergente deoxicolato de gusanos adultos. La enzima tiene una estructura hexamérica unida al  $Zn^{++}$  con unidades idénticas de peso molecular aparente de 57 kDa. Por medio de inmunohistoquímica e histoquímica se ha localizado predominantemente en el interior de las células que tapizan el tubo digestivo. Dado que la actividad LAP se encuentra a nivel de trazas en los PES de los distintos estadios invasores, se ha postulado que su participación en el proceso digestivo esté concentrada en la actuación sobre dipéptidos que ingresan a las células del intestino luego de la acción concertada de las endopeptidasas y la DPP (Acosta y cols., 1998). La enzima fue clonada y expresada en forma de hexámero activo en *E. coli*, exhibiendo una marcada preferencia por el sustrato Leu-AMC y también actividad contra Cys-AMC y Met-AMC. Estudios de localización por inmunomicroscopía electrónica asociaron esta enzima a la gastrodermis del parásito, además, sus propiedades físico-químicas y análisis por MALDI-TOF demostraron que la enzima recombinante era idéntica a la nativa (Acosta y cols., 2008). Recientemente Maggioli y cols. (2011), emplearon la forma recombinante de la enzima en un ensayo de vacunación en ovejas Corriedale, en combinación con distintos tipos de adyuvantes, obteniéndose disminuciones altamente significativas de las cargas parasitarias (hasta un 86,7% de reducción, utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante).

Mediante el análisis de la base de datos de ESTs de gusanos adultos disponible en el Sanger Institute ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)), se han encontrado otras nuevas proteasas, en particular una prolil carboxipeptidasa (perteneciente a la familia de serina peptidasas S28) y varias ESTs codificantes de legumaínas. Sin embargo el análisis proteómico no ha permitido confirmar su presencia en los PES del gusano adulto (Robinson, 2009).

### 1.2.3.2. Proteasas en el estadio juvenil.

Al igual que para los adultos, existe sustancial actividad proteolítica presente en los PES de JRDs y estadíos inmaduros de *F. hepatica*. Si bien el estudio pionero de Tkalcevic y cols. (1995) demostró la presencia de una secuencia N-terminal correspondiente a una catepsina L, a partir del análisis por SDS-PAGE de extractos totales de JRDs., posteriormente, mediante el análisis de los PES de JRDs en geles copolimerizados con gelatina y sustratos fluorogénicos específicos de cisteína proteasas, se caracterizó una actividad tipo CatB, que fue confirmada por secuenciación del N-terminal. (Wilson y cols., 1998). Más recientemente, Cancela y cols. (2008) identificaron las catepsinas B y L presentes en los juveniles, correlacionando las proteínas secretadas con las secuencias de ADNc y las actividades enzimáticas.

Estudios filogenéticos mostraron que los clones de ADNc generados a partir de transcritos de las larvas de *F. hepatica* codificaban una CatL específica de este estadio, la FhCL3. El ADNc codificante de esta proteasa, FhCL3\_n122, fue originalmente descrito por Harmsen y cols (2003). La pro-catepsina L3 fue expresada funcionalmente en *Hansenula polymorpha*, dando origen a una proteína madura de 28 kDa que exhibe características típicas de una cisteína proteasa de la familia C1A, se activa con agentes reductores y se inhibe con E64. Ensayos enzimáticos demostraron que FhCL3 prefiere Tos-Gly-Pro-Arg-AMC antes que Z-Val-Leu-Lys-AMC y Z-Phe-Arg-AMC. Concordante con esta preferencia por Pro en P2, FhCL3 demostró degradar colágeno tipo I en distintas condiciones de pH y temperatura, lo que sugiere su participación en la migración a través de la matriz extracelular en las primeras etapas del parásito juvenil (Corvo y cols., 2009).

Recientemente, Cancela y cols. (2010), confirmaron la expresión restringida de FhCL3 y otra proteasa, FhCL4, mediante el análisis de una librería de ADNc específica de JRDs y utilizando RT-PCR. Asimismo, Robinson y cols. (2009) analizando extractos somáticos de metacercarias y PES de JRDs mediante herramientas proteómicas identificaron varios péptidos correspondientes a FhCL3, incluyendo péptidos correspondientes al propéptido, por lo que postularon que las metacercarias expresan FhCL3, la cual es almacenada

como zimógeno inactivo, rápidamente secretada y activada luego de la salida de la metacercaria para convertirse en una larva infectante. Sin embargo, no se identificaron péptidos correspondientes a FhCL4, lo que sugeriría que esta enzima posee bajos niveles de expresión o que no forma parte de las proteasas secretadas por los PES de JRDs.

Law y cols. (2003) expresaron y caracterizaron una prepro-catepsinaB (FhCB1), la cual tenía una masa molecular de 38 kDa, que se auto-procesaba a pH ácido para generar una enzima madura (30 a 32 kDa). Dicha enzima posee propiedades bioquímicas distintas a las de las CatBs de mamíferos, con una preferencia atípica por residuos Ile sobre Leu o Arg en la posición P2 e incapacidad para actuar como exopeptidasa. Mediante estudios de localización y utilizando un inhibidor marcado fluorescentemente, se observó su expresión en el intestino del parásito, por lo que se postuló su rol como una enzima digestiva (Beckham, 2009).

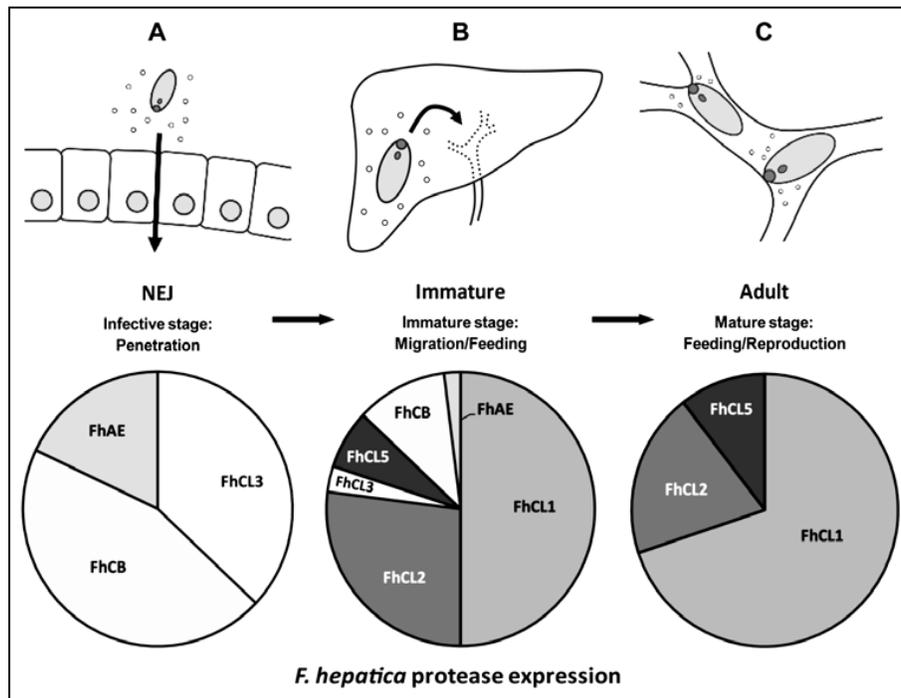
La Fig. 6 resume la expresión diferencial de catepsinas a lo largo del proceso invasor de *F. hepatica* en su hospedero definitivo.

Si bien gran parte de los experimentos que le asignan las distintas funciones a las catepsinas L y B de *F. hepatica* en el contexto de la infección han sido realizados *in vitro*, dos estudios realizados *in vivo* y *ex vivo* confirman esa participación. En un primer estudio se demostró como un derivado del E64 (denominado Ep-475) inhibe la actividad proteolítica de *F. hepatica* *in vivo* en un modelo de infección experimental en ratón (Alcalá- Canto y cols., 2006). En dicho trabajo, utilizaron una técnica denominada zimografía *in situ* en película (del inglés FIZ), donde se exponen secciones de tejido cortadas en frío sin fijar, a una lámina de sustrato preparada de forma homogénea con una técnica utilizada para la preparación de películas fotográficas. La inhibición máxima de la actividad proteolítica (87 %) fue alcanzada a una dosis de 50 mg/kg/día. Además, se observaron efectos anti-embrionarios y anti-fecundatorios, debido a una disminución en el número y viabilidad de los huevos, así como un aumento en la supervivencia de los animales tratados respecto a animales controles infectados sin dosificar. El segundo trabajo demuestra la relevancia

de estas enzimas en la penetración del intestino del huésped por los JRDs de *F. hepatica* mediante interferencia de ARN (RNAi) (McGonigle y cols., 2008). La interferencia fue inducida mediante soaking durante 4 h con ARN doble cadena de FhCL1 o FhCB. El silenciamiento de estas proteasas conllevó a la disminución de la penetración de los JRDs a través del intestino de rata.

Otra proteasa encontrada en los JRDs es una legumaína (EC 3.4.22.34), que fue primero identificada en el estudio de secuencias N-terminales previamente referido (Tkalcevic y cols., 1995) y por estudios de huella peptídica en PES de JRDs (Cancela, 2006). Pese a esto, la legumaína de juveniles no ha sido caracterizada aún a nivel molecular y bioquímico. Las legumaínas son cisteína proteasas pertenecientes al clan CD, familia C13, que se caracterizan por clivar en el sitio C-terminal de residuos de asparagina. Inicialmente fueron descritas en plantas, de allí su denominación como legumaínas (Hara-Nishimura y cols., 1991). Posteriormente se encontró el ADNc de una proteína homóloga en *S. mansoni*, que inicialmente se describió como una hemoglobinasa y que luego fue caracterizada como legumaína (Caffrey y cols., 2000). Estas enzimas contienen dos residuos de His y Cys conservados en el sitio activo, ambos esenciales para la actividad enzimática. Son sintetizadas como pro-enzimas y sufren auto-procesamiento a la forma madura mediante el clivaje de péptidos N- (Li y cols., 2003) o C-terminales. La función biológica de estas enzimas en plantas y animales es la conversión de pro-enzimas a su forma madura. Esto ha sido demostrado *in vitro* para cisteína proteasas vacuolares de alubias y para la CatB de trematodos, e *in vivo* para varias cisteína proteasas en ratones deficientes en legumaínas (revisado por Dalton y cols., 2009).

Si bien los roles putativos de las cisteínas proteasas del adulto de *F. hepatica* en los procesos de invasión, nutrición y evasión de la respuesta inmune del



*Figura 6 – Perfil de expresión de proteasas de F. hepatica a lo largo de los estadios invasivo, migratorio y adulto – Se muestran los niveles de expresión de las principales enzimas proteolíticas que F. hepatica utiliza durante su ciclo de vida intra-mamífero. Se expresa en gráficos globales los valores de emPAI obtenidos a partir de datos de MS/MS, empleados para estimar las abundancias de varias CatLs (FhCL), CatBs (FhCB) y una legumaina (FhAE) expresadas por los JRDs y secretadas por los parásitos inmaduros (que migran por el hígado) y adultos. (Tomado de Robinson y cols., 2009)*

huésped han sido bien fundamentados, resta avanzar en la dilucidación del rol de otras enzimas que han sido identificadas a nivel de estudios enzimológicos, proteómicos y transcriptómicos, como lo son las legumainas y la DPP.

Con respecto a las formas juveniles, donde los estudios han sido mucho más esporádicos, se desconoce la cinética de degradación de proteínas sanguíneas a lo largo del tiempo así como la contribución a la misma de las distintas proteasas distintivas del estadio.

En base a lo introducido en estos antecedentes, surgen algunas interrogantes que este trabajo plantea investigar:

- » En *S. mansoni* se han identificado proteasas como las CatC y CatD, surge entonces la interrogante de si en *F. hepatica* existen enzimas de este tipo.
- » Los JRDs en su migración hacia el sitio donde se aloja el adulto, se encuentra con la sangre como fuente de nutriente. No está definido partir de cuando son capaces de degradar proteínas de la sangre. Asimismo, surge la interrogante de cuales son los actores involucrados en dicho proceso.
- » Por último, es relevante profundizar los conocimientos acerca de otras enzimas que han sido asociadas a los PES tanto de juveniles como adultos. Tal es el caso de la Legumaína y la DPP.

De forma de abordar estas interrogantes, se plantea en la próxima sección, los objetivos de este trabajo.

## 2. Objetivos.

### 2.1. Objetivo general.

El objetivo general de este trabajo es contribuir a la dilucidación del rol de las proteasas secretadas por *F. hepatica* en la digestión de las proteínas presentes en la sangre del huésped, su principal fuente de nutrición.

### 2.2. Objetivos específicos.

Para cumplir con este propósito, los objetivos específicos planteados son:

- » Caracterizar las actividades proteolíticas presentes en los PES de parásitos adultos y JRDs.
- » Estudiar el papel de las proteasas de *F. hepatica* en la degradación de la albúmina y hemoglobina, principales proteínas presentes en la sangre del huésped.
- » Caracterizar y purificar la actividad DPP presente en las secreciones del adulto, y avanzar en su clonado y expresión funcional.
- » Clonar y expresar funcionalmente una legumaína recombinante presente en el estadio juvenil.

## 3. Materiales y métodos.

### 3.1. Actividades proteolíticas en secreciones de *F. hepatica*.

#### 3.1.1. Producción de PES de adulto.

Los adultos de *F. hepatica* fueron removidos de los conductos biliares de hígados vacunos de un frigorífico local, y transportados al laboratorio en bilis de un animal sano, a 39 °C. Los parásitos se lavaron 4 veces en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.3, y se mantuvieron 4 h en RPMI, pH 7.3, conteniendo 2 % de glucosa, 30 mM de HEPES y 25 mg/ml de gentamicina a 37 °C. La relación número de parásitos por cantidad de medio de cultivo, fue de 1 parásito por 2 ml de medio de cultivo. Luego del período de incubación, el medio de cultivo fue removido, centrifugado a 14,000 x g por 1 h y el sobrenadante filtrado y guardado a -20 °C hasta su posterior utilización (Dalton y Heffernan, 1989).

La calidad de los PES obtenidos fue evaluada por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Este se realizó de acuerdo a lo descrito por Laemmli (1970). En el sistema de electroforesis se emplearon geles concentradores al 3 % de acrilamida y geles separadores de 12.5 %. Las muestras se diluyeron en tampón de carga 4 x compuesto por Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, Glicerol 40 % (v/v), SDS 4 % (m/v), Azul de bromofenol 0.002 % (m/v), se redujeron en presencia de DTT a una concentración final de 2 mM y se hirvieron por 5 min. Los geles, de 1 mm de espesor, se corrieron en el sistema de electroforesis vertical Atto (Japón) a una intensidad de corriente constante de 30 mA en una solución tampón Tris-glicina (Tris al 0.3 % (m/v), Glicina al 1.44 % (m/v) y SDS al 0.1 % (m/v)). Luego de la corrida los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue (CBB R-250) al 0.1 % (m/v) en H<sub>2</sub>O 50 % (v/v), metanol 50 % (v/v) y acético 20 % (v/v) durante 12 h, y se destiñeron para visualizar las bandas proteicas con H<sub>2</sub>O 50 % (v/v), metanol 50 % (v/v) y acético 20 % (v/v).

### 3.1.2. Producción de PES de JRD.

Las metacercarias de *F. hepatica* fueron obtenidas de Baldwin Aquatics Inc. (Monmouth, Oregon). El desenquiste *in vitro* se efectuó de acuerdo a lo descrito en Carmona y cols. (1994) con ligeras modificaciones. Las metacercarias se colocaron en un filtro de 100  $\mu\text{m}$  y se incubaron 3 min a temperatura ambiente con hipoclorito de sodio al 1 % (v/v) para remover contaminantes. Luego de un exhaustivo lavado con agua destilada, las metacercarias se incubaron a 39 °C en medio de activación (25 mM HCl, 16.5 mM L-cisteína, 0.1 % taurocolato de sodio,  $\text{NaHCO}_3$  60 mM, NaCl 70 mM pH 8.0), y el proceso de desenquiste fue monitoreado bajo el microscopio. Luego de 90-180 min de incubación, los JRDs que comenzaron a emerger, fueron colectados, lavados varias veces con RPMI-1640, transferidos a placas de 12 pocillos (Nuclon Surface, Nunc, Dinamarca) y mantenidos a 37 °C con 5 % de  $\text{CO}_2$  en RPMI-1640 conteniendo 200 U/ml penicilina G sulfato, 500 ng/ml anfotericina B, 10 mM HEPES, con recambio de medio cada 24 h. Para la preparación de PES, los parásitos fueron lavados con RPMI-1640, e incubados por 48 hrs en RPMI-1640 conteniendo 200 U/ml penicilina G sulfato, 200 mg/ml sulfato, 500 ng/ml anfotericina B, 10 mM HEPES y 1 g/L glucosa. La relación número de parásitos por cantidad de medio de cultivo, fue aproximadamente 200 parásitos por ml de medio de cultivo. Para los cultivos a largo plazo se incubaron los JRDs en medio Basch modificado (Tabla 1; Basch, 1981), con recambios del medio de cultivo cada 48 h, monitorizando la viabilidad de los parásitos microscópicamente.

### 3.1.3. Ensayos enzimáticos.

La actividad proteolítica de los extractos de parásitos adultos y juveniles fue detectada utilizando un panel de sustratos fluorogénicos (Bachem, Alemania). Dichos sustratos se encuentran acoplados a AMC en el C-terminal. A nivel del N-terminal se encuentran bloqueados en el caso de los sustratos de endoproteasas, mientras que en el caso de las exoproteasas no presentan bloqueo en dicho sitio. Los ensayos se llevaron a cabo usando una

concentración final de 50  $\mu\text{M}$  de sustrato en distintos tampones de acuerdo al tipo de actividad que se deseaba caracterizar (Tabla 2) en un volumen de 200  $\mu\text{l}$ . Las mezclas fueron incubadas a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 60 min y la cantidad de AMC liberada fue monitoreada utilizando un espectrofluorímetro FLUOstar (BMG-lab-technologies, Alemania) adaptado a placas de 96 pocillos (96 Well Optical Bottom Plates, Nunc, Dinamarca) usando como longitud de onda ( $\lambda$ ) de de excitación 360 nm y como  $\lambda$  de emisión 430 nm. La actividad enzimática fue expresada como  $\mu\text{moles de AMC liberados min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ , y una unidad de actividad fue definida como aquella que libera un  $\mu\text{mol de AMC min}^{-1}\text{ml}^{-1}$  a 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Tabla 1 - *Componentes del medio completo (Basch)*

Reactivo	Concentración final
Medio basal Eagle	1 x
Lactoalbúmina	1 g/L
Glucosa	1 g/L
Hipoxantina	0.5 $\mu\text{M}$
Serotonina	1 $\mu\text{M}$
Insulina	8 mg/L
Hidro cortisona	1 $\mu\text{M}$
Triiodotironina	0.2 $\mu\text{M}$
Vitaminas MEM	5 x
Medio Schneider	1 x
Hepes	10 mM
Suero fetal bovino	10 %
Penicilina	4 U/ml
Estreptomycin	4 $\mu\text{g/ml}$
Anfotericina B	10 ng/ml

Las actividades de tipo catepsina presentes en los PES de adulto fueron detectadas utilizando Z-Phe-Arg-AMC. Con el objetivo de distinguir una posible actividad CatB en el contexto de una muy mayoritaria actividad correspondiente a CatL se utilizó CA-074, un inhibidor altamente específico de CatB. Pese a que Z-Arg-Arg-AMC es habitualmente citado como sustrato específico de

CatB, lo cierto es que este sustrato es también clivado por las CatLs y en particular por las de *F. hepatica* (Carmona y cols., 1993) por lo que evitamos su uso en el estudio de los PES de adultos. Para determinar actividad tipo catepsina D (aspártico proteasa) se utilizó un sustrato tipo FRET (sustrato fluorescente de transferencia de energía de resonancia): Abz-AlalleAlaPhePheSerArgGln-GluAspAsp-np. Este tipo de sustratos contienen un donador fluorescente y un aceptor aplacado (quenched en inglés) separados por un sitio de clivaje enzimático. Mientras el enlace permanece intacto, se da un fenómeno de resonancia intramolecular que suprime la fluorescencia intrínseca del donador, transfiriendo la energía al grupo aceptor. Cuando se rompe el sitio de clivaje enzimático se observa un aumento de la fluorescencia. Este aumento es directamente proporcional a la cantidad de sustrato clivado.

### **3.2. Las proteasas en la alimentación de *F. hepatica*.**

#### **3.2.1. Alimentación de los parásitos juveniles con GRs.**

De forma de definir el momento en que los juveniles de *F. hepatica* comienzan alimentarse de Hb, donde como consecuencia se da la formación de hemozoína, los JRDs (100 por pocillo) se cultivaron en medio Basch (Tabla 2, Basch, 1981) en presencia de GRs humanos lavados (aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/JRD). Los GRs fueron preparados a partir de sangre humana, la cual fue extraída en tubos heparinizados, y centrifugada a 1500 rpm durante 5 min para eliminar el suero. El pellet celular que se obtuvo fue lavado tres veces con RPMI estéril mediante centrifugaciones a 1500 rpm durante 5 min. Finalmente se resuspendió el pellet celular en 1,5 ml de RPMI estéril y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Se monitorearon los parásitos diariamente por medio de microscopía con un microscopio invertido Nikon Eclipse TS100, utilizando aumentos de 4, 10 y 20 x, y se documentan con una cámara digital CoolPix 5700 Nikon. Como control también se monitorearon diariamente parásitos incubados en ausencia de GRs.

### 3.2.2. Cultivo de los parásitos juveniles con Alb-FITC.

Con la finalidad de determinar la importancia de las cisteína proteasas en la degradación de las proteínas mayoritarias de la sangre del huésped los parásitos juveniles mantenidos en cultivo durante 22 días fueron lavados 3 veces con RPMI 1640 y fueron incubados durante una hora con 30  $\mu\text{g}$  de Alb-FITC (BSA-FITC, Sigma-Aldrich, Alemania) a 37 °C en 1 ml de medio Basch. Los parásitos se pre-incubaron durante 1 h en presencia de 10  $\mu\text{M}$  del inhibidor de cisteína proteasas E64 y su análogo permeable E64-D. Como control se utilizó RPMI. Luego de la incubación, los parásitos fueron lavados 5 veces con PBS 1 x, y se visualizó la fluorescencia mediante microscopía utilizando un

*Tabla 2. -Panel de sustratos fluorogénicos e inhibidores utilizados para determinar las actividades enzimáticas presentes en los extractos parasitarios*

<b>Peptidasa</b>	<b>Clase</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Inhibidor</b>
Catepsina D	Aspártico	Abz-AIAFFSRQ- EDDnp	Pepstatina A (PepA)
Catepsina L	Cisteína	Z-PheArg-AMC	E64
Catepsina B	Cisteína	Z-PheArg-AMC Z-ArgArg-AMC	CA-074
Catepsina C (DPPI)	Cisteína	H-GlyArg-AMC H-GlyPhe-AMC	
Legumaína	Cisteína	Z-AlaAlaAsn-AMC	MG-256
DPP II	Serina	H-GlyPro-AMC	PMSF
DPP IV	Serina	H-Lys-Ala-AMC	PMSF

microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 con una cámara digital CoolPix 5700 Nikon acoplada a  $\lambda$  de excitación y emisión del FITC (490 nm y 514 nm, respectivamente).

### 3.2.3. Ensayos de digestión de Hb bovina.

Veinte  $\mu\text{g}$  de Hb bovina (MP Biomedicals, Alemania) fueron incubados con los PES de adulto (0.6  $\mu\text{g}$ ), FhCL1r, FhCL2r o FhCL3r (0.6  $\mu\text{g}$ ) en acetato de sodio 100 mM, pH 5.5, en presencia de 2 mM DTT, en un volumen total de 35  $\mu\text{l}$ , por intervalos de tiempo de 1 h a 16 h a 37 °C. Las enzimas recombinantes funcionales utilizadas fueron amablemente cedidas por Dr. John Dalton (FhCL1r y FhCL2r) y la Lic. Ileana Corvo (FhCL3r). Para la degradación de Hb en presencia de inhibidores de proteasas, una alícuota del extracto fue pre-incubada (10 min a 37 °C) en un tampón pH 5.5 con los inhibidores: 20  $\mu\text{M}$  de E64 (Bachem, Alemania), 10  $\mu\text{M}$  de PepA (Sigma-Aldrich, Alemania) y 20  $\mu\text{M}$  MG-256 (cedido por el Dr. Connor Caffrey) y combinaciones de éstos.

Las digestiones de Hb fueron resueltas electroforéticamente en geles Tricina-SDS-PAGE. La electroforesis en geles de poliacrilamida empleando el sistema Tris-Tricina se utilizó con la finalidad de obtener una mejor resolución de proteínas de peso molecular aparente menor de 40 kDa. La electroforesis se realizó de acuerdo a Schägger y von Jagow (1987) con modificaciones (Schägger, 2006). En el sistema fueron utilizados un gel concentrador al 3 %, un gel espaciador al 10 % y un gel separador de 16 % conteniendo 6 M de urea. Los geles, de 1 mm de espesor, se corrieron en el sistema de electroforesis vertical Atto (Japón) a una intensidad de corriente constante de 35 mA en una solución tampón de ánodo Tris 0.1 M pH 8.9 una de cátodo Tris-HCl 0.1 M, Tricina 0.1 M y 0.1 % de SDS (m/v), pH 8.25. Las muestras, fueron diluidas en un tampón de muestra (previamente descrito en el ítem 4.1.1) y se prepararon igual que para el SDS-PAGE convencional.

Los geles fueron teñidos con nitrato de plata: brevemente, una vez finalizada la corrida electroforética los geles fueron lavados con  $\text{H}_2\text{O}$  y fijados en una solución de 10 % ácido acético (v/v) y 30 % de etanol (v/v). Luego fueron incubados con una solución de  $\text{AgNO}_3$  al 0.2 % (m/v) y revelados incubando con una solución de  $\text{NaCO}_3$  2,5 % (m/v) y formaldehído 37 % (v/v) en  $\text{H}_2\text{O}$  hasta la aparición de las bandas de proteína, entonces, se detuvo la reacción con una solución de ácido acético al 1 % (v/v, Merrill y cols., 1981).

La degradación fue monitorizada como disminución y/o desaparición del material de partida en el gel, es decir, la desaparición de las bandas correspondientes al tetrámero (64 kDa), dímero (32 kDa) y monómero (16 kDa) de la Hb bovina. El estudio cuantitativo de la degradación se realizó por medio del programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### 3.2.4. Análisis de la degradación de Hb bovina por espectrometría de masa.

#### 3.2.4.1. Hidrólisis de Hb por CL3 recombinante.

Para el análisis por espectrometría de masa, 1.8 nmoles de Hb fueron digeridos con 0.9 nmoles de FhCL3 recombinante en 0.1 M de acetato de sodio pH 5.5 conteniendo 1 mM de GSH y 1 mM de EDTA por 10 y 120 min a 37 °C. Las reacciones de digestión fueron detenidas con 1 mM de E-64 y liofilizadas en un liofilizador EYELA (Japón).

#### 3.2.4.2. Análisis de las digestiones por nano LC ESI-MSMS y Maldi-Tof/Tof.

Previo al análisis por LC ESI MSMS, las muestras fueron desaladas utilizando puntas de C18 (PerfectPure, Eppendorff). Las digestiones se analizaron por nanoLC-ESI-MS/MS utilizando un nanoHPLC Ultimate 3000 (Dionex, USA) acoplado a un espectrómetro de masa HCT Ultra ion-trap (Bruker Daltonics, Alemania) en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC, España). Las lista de picos de masa generadas por el software DataAnalysis (Bruker Daltonik) se exportaron a la base de datos de MASCOT local (Matrix Science) para realizar la búsqueda de masas contra una base de datos de secuencias de *Bos taurus*. La tolerancia en la masa de los péptidos fue marcada como 0.6 Da, la oxidación de Met fue considerada como una modificación proteica variable y se seleccionó la función “no enzima”.

Adicionalmente, se realizó un análisis por espectrometría de masa Maldi Tof/Tof para ambas muestras, sin fraccionamiento por LC, utilizando un espectrómetro de masa Maldi- Tof/Tof ABI 4800 (Applied Biosystems, USA) funcionando en el modo de ion reflector positivo. Los espectros obtenidos fueron analizados utilizando el software ABI 4000 Series Explorer Spot Set Manager. Los espectros fueron analizados manualmente utilizando el software ABI 4000 Series Explorer Spot Set Manager y externamente calibrados para obtener una precisión de masa por debajo de las 35 ppm.

#### 3.2.4.3. Análisis bioinformático.

Los péptidos identificados mediante ambas metodologías se mapearon en la secuencia de las cadenas de alfa y beta globina de la Hb bovina, para identificar los sitios de clivaje de FhCL3, utilizando la aplicación CLC Main Workbench (v 6.5, [www.clcbio.com](http://www.clcbio.com)).

Los sitios de corte identificados en la estructura tridimensional de la Hb bovina (nro. acceso pdb 1HDA) por la FhCL3 se compararon con los generados por la FhCL1 (Lowther y cols., 2008) sobre la estructura tridimensional de la Hb humana (nro de acceso pdb 1A3N), utilizando el programa DeepView/Swiss-PdbViewer (v 4.04, [www.expasy.org/spdbv](http://www.expasy.org/spdbv)).

### 3.3. La DPP en *F. hepatica*.

#### 3.3.1. Caracterización de la actividad DPP en los PES de adulto.

##### 3.3.1.1. Curva de perfil de pH.

Se determinó el pH óptimo de actividad DPP utilizando dos sustratos fluorogénicos Gly-Pro-AMC y Lys-Ala-AMC. Los ensayos enzimáticos fueron realizados con 5 µg de PES de adultos en un tampón Hepes 50 mM, con pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5, en un volumen final de 200 µl. El incremento de fluorescencia fue monitoreado de acuerdo a lo descrito en el

ítem 3.1.3. Los perfiles de pH para cada sustrato fueron expresados en unidades de fluorescencia por segundo (UF/seg).

### 3.3.1.2. Perfil de preferencia de sustrato de los PES de estadio adulto mediante PS-SCL (Positional Scanning Libraries) P1-P2.

Las librerías PS-SCL están compuestas de sublibrerías donde la posición de un péptido es fijada con un aminoácido, mientras que el resto de las posiciones contienen una mezcla equimolar de aminoácidos. El método de detección es mediante el uso de un fluoróforo derivado de AMC, denominado 7-amino-4-carbamoilmetilcumarina (ACC). En el caso de las librerías P1-P2, las actividades detectadas corresponden a DPP.

Los PES de adulto se ensayaron a 25 °C en un tampón Hepes 50 mM (pH 6.0) y 0.01 % PEG6000. Se añadieron a una placa de 96 pocillos (Co-star, Corning, USA) alícuotas de 1 µl (25 nmol) de cada una de las 20 sub-librerías de las bibliotecas P1-P2. Los ensayos de actividad fueron iniciados con la adición de la enzima pre-activada y fueron monitoreados fluorométricamente utilizando un fluorímetro Spectramax Gemini (Molecular devices, USA) con una  $\lambda$  de excitación de 380 nm y una  $\lambda$  de emisión de 460 nm, y un corte de 435 nm (Schneider y Craik, 2009).

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los resultados se expresaron en concentración picomolar de fluoróforo que se produjo por segundo respecto a cada aminoácido presente en la posición fija. Estos ensayos se realizaron en el Sandler Center for Drug Discovery, Laboratorio de Bioquímica y Parasitología Molecular, Universidad de San Francisco California, Estados Unidos.

### 3.3.2. Purificación de la enzima nativa.

La DPP nativa fue purificada a partir de PES de parásitos adultos. Dicha purificación (Carmona y cols., 1994) consiste de dos pasos: gel filtración e intercambio iónico. Para el primer paso de purificación se partió de 11.7 mg de

PES de adulto, utilizando una columna HiLoad 16/60 Superdex 75 (Äkta Purifier, GE, USA), con una velocidad de flujo de 0.7 ml/min, recolectando fracciones de 5 ml. Dichas fracciones fueron monitoreadas por un ensayo de actividad Gly-Pro-AMC. Las fracciones que poseían actividad DPP se juntaron, se concentraron y dializaron contra Hepes 50 mM, pH 6.8. Luego se aplicaron a una columna de intercambio iónico DEAE Sepharose A25 (Pharmacia, USA). Luego la elución fue realizada con un gradiente escalonado de NaCl de 0-400 mM, y la actividad DPP monitoreada usando Gly-Pro-AMC. La pureza de las fracciones obtenidas fue analizada por SDS-PAGE al 10 % mediante tinción con nitrato de plata.

Las fracciones conteniendo actividad DPP se juntaron, dializaron contra Hepes 50 mM, pH 6.8 y se guardaron a -80 °C para ensayos posteriores. Asimismo, una parte de la proteína purificada fue liofilizada utilizando un liofilizador EYELA (Japón), para su posterior análisis por espectrometría de masa en el servicio de MS de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo.

### 3.3.3. Clonado de FhDPP2.

Dado que la enzima nativa resulta ser muy inestable, impidiendo su purificación a homogeneidad, y por tanto su posterior estudio por espectrometría de masa o secuenciación N-terminal, se decidió clonar una DPP presente en la base de datos de ESTs de *F. hepatica* disponible en el Sanger Institute, esta secuencia mostró alta homología con la DPP II de mamífero (E.C. 3.4.14.2), por la cual la denominamos FhDPP2.

#### 3.3.3.1. Análisis de secuencia.

Las comparaciones entre FhDPP2 y otras DPPs fueron analizadas en base a secuencia aminoacídica. Las secuencias homólogas se obtuvieron de la base de datos del GenBank realizando un tBlastx, fueron alineadas con la secuencia de la FhDPP2 utilizando clustalW (Thompson y cols., 1994) y se visualizaron en el software GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>).

### 3.3.3.2. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.

ARN total de parásitos adultos se preparó utilizando el kit RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, USA). Para la síntesis de ADNc, 5 µg de ARN fue transcrito reversamente utilizando el First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### 3.3.3.3. Diseño de cebadores.

Para el diseño de los cebadores se realizó la búsqueda de secuencias de DPP tipo II y VII depositadas en bancos de datos disponibles (GenBank) además de la secuencia de una putativa DPP II de la base de datos de EST del Sanger Institute. Para el alineamiento de las secuencias de DPP se utilizó el programa ClustalW y las secuencias de *Schistosoma japonicum* (número de acceso FN315332), *Canis familiaris* (XM\_843610), *Bos taurus* (NM\_001105043), *Mus musculus* (AF285235 y NM\_031843), *Sus scrofa* (AK232507 y AK238553) y *Rattus norvegicus* (NM\_031973 y AB038232). Las secuencias de los cebadores diseñados se detallan en la tabla 3.

Tabla 3 – Cebadores diseñados para amplificar la FhDPP2

Cebador	Sentido	Secuencia
EcoFhDPP2F	Directo	5'-CGGAATTCATGAATGTGGTTGCCTTTAT- 3'
EcoFhDPP2R	Reverso	5'-CGGAATTCTCAGTTTGACGCTTTCCTTA- 3'
FhDPP2Fi2	Directo	5'-TTCGATATATCCACATCTGGTTGCT- 3'
FhDPP2Ri2	Reverso	5'-CCGGTCGCAAGAAACATTCA- 3'

### 3.3.3.4. Amplificación del ADN copia que codifica para la DPP mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la amplificación se utilizaron 2  $\mu$ l de ADNc de adulto, en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l. Las reacciones fueron realizadas usando distintas combinaciones de cebadores: EcoFhDPP2F y EcoFhDPP2R, que amplifican todo el ADNc (1656 pb), FhDPP2Fi2 y EcoFhDPP2R, que amplifican un segmento de 930 pb, y EcoFhDPP2F y FhDPP2Ri, que amplifican un segmento de 866 pb.

Las muestras se amplificaron utilizando un termociclador Tprofessional (Biometra, Alemania). La composición de la reacción de PCR, así como el programa utilizado se detallan en la Fig. 7.

Mediante el uso de las distintas combinaciones de cebadores arriba mencionadas, fue posible amplificar dos fragmentos parciales del ADNc del gen de la FhDPP2, no así el segmento completo. Ambos fragmentos (denominados FhDPP2\_Fi2yR FhDPP2\_FyRi2) fueron purificados del gel utilizando un kit de

Buffer 10 x-----2 $\mu$ l	<b>Programa 1 –</b>
MgCl <sub>2</sub> 25 mM-----1,2 $\mu$ l	Paso 1: (Desnaturalización) 94 °C por 3 min.
dNTPs 10 mM-----0,4 $\mu$ l	Paso 2, 30 ciclos de:
Cebador F 10 $\mu$ M -----1 $\mu$ l	(Desnaturalización) 94 °C por 30 seg.
Cebador R 10 $\mu$ M ----- 1 $\mu$ l	(Hibridización) 55 °C por 1min.
Polimerasa Taq 5 u/ $\mu$ ---- 0,2 $\mu$ l	(Extensión) 72 °C por 2 min.
Molde ADNc 10 ng/ $\mu$ l --- 0,5 $\mu$ l	Paso 3: (Extensión) 72 °C por 7 min.
H <sub>2</sub> O -----13,7 $\mu$ l	<b>Programa 2 –</b>
Volumen final ----- 20 $\mu$ l	Paso 1: (Desnaturalización) 94 °C por 3 min.
	Paso 2, 5 ciclos (sin cebadores) de:
	(Desnaturalización) 94 °C por 30 seg.
	(Hibridización) 55 °C por 1min.
	(Extensión) 72 °C por 2 min.
	Paso 3, 30 ciclos de:
	(Desnaturalización) 94 °C por 30 seg.
	(Hibridización) 55 °C por 1min.
	(Extensión) 72 °C por 2 min.
	Paso 4: (Extensión) 72 °C por 7 min.

*Figura 7 – Reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el ADNc de la FhDPP2 – condiciones del experimento y componentes de la mezcla de reacción.*

extracción (Qiagen), subclonados en pGEM-Teasy, y enviados para su secuenciación a Macrogen Inc. (República de Corea). Una vez confirmada la secuencia, estos fragmentos fueron utilizados como moldes en una segunda PCR, donde primero se dejaron alinear ambos moldes en ausencia de cebadores (ver programa 2), y luego se continuó con la reacción en presencia de los cebadores.

### 3.3.3.5. Visualización y purificación de los productos obtenidos.

Los productos de PCR obtenidos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Bird y Jackson, 1958) 0,8 % (m/v) en tampón Tris-acetato-EDTA (40 mM Tris, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA, TAE) 1 X con Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml), que fueron separados electroforéticamente a 100 mV en un sistema Enduro (Labnet International, USA) y una vez finalizada la corrida, se visualizaron en un transiluminador UV. El tamaño y concentración de los productos se estimó por comparación de las concentraciones conocidas de marcadores de peso molecular. Se recortó con bisturí la región de agarosa correspondiente a la banda de tamaño esperado y se purificó empleando el Gel Extraction Kit, (Qiagen, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### 3.3.3.6. Clonado del ADNc codificante de la FhDPP2 en un vector de expresión procariota.

El fragmento amplificado fue clonado en marco en el sitio EcoRI del vector de expresión pET-28a+ (Fig. 8, Novagen, USA) previamente desfosforilado. Células XL1 Blue (Stratagene, Agilent Technologies, USA) fueron transformadas con la construcción pET\_FhDPP2, para la amplificación del plásmido. Para confirmar que el inserto se encontraba en el sentido correcto, se realizaron digestiones de plásmido con BamHI. Una vez que se seleccionó el clon correcto, se transformaron células de *E. coli*.

### 3.3.3.7. Pruebas de expresión de la FhDPP2 recombinante.

Una vez seleccionada la colonia que poseía la construcción Pet\_FhDPP2 adecuada, se utilizó para transformar células BL21 (DE3). Luego, se realizaron las pruebas de expresión de la proteína recombinante partiendo de un cultivo 16 h, que fue inoculado a 100 ml de LB conteniendo 100 µg/ml de kanamicina, e incubado a 37 °C hasta una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.7. Para inducir la expresión de la proteína se agregaron dos concentraciones distintas de Isopropiltiol-d-galactósido (IPTG, 0.1 y 0.4 mM) y se tomaron alícuotas de 200 µl de cultivo a tiempo 0, 2, 4 y 16 h. El cultivo fue centrifugado para separar las células del medio de cultivo, resuspendido en Tris-HCl 0.1 M pH 7.0, y luego sonicado. El pellet insoluble fue separado de la fracción soluble centrifugando a 15.000 xg durante 10 min. Las fracciones solubles e insolubles, correspondientes a los distintos tiempos de cultivo, fueron analizadas por SDS-PAGE 10 % con tinción con CBB R-250, para determinar cuál de las condiciones de inducción resultaba más adecuada.

Para expresar la proteína recombinante las bacterias fueron crecidas a 37 °C en LB conteniendo 100 µg/ml de kanamicina hasta una densidad óptica a 600 nM (D.O.<sub>600nm</sub>) de 0.7, punto donde la temperatura se redujo a 30 °C y la expresión de la proteína se indujo agregando 0.4 mM de IPTG y agitación durante 16 h. Luego el pellet celular fue recolectado mediante centrifugación a 5000 rpm, durante 15 min a 4 °C.

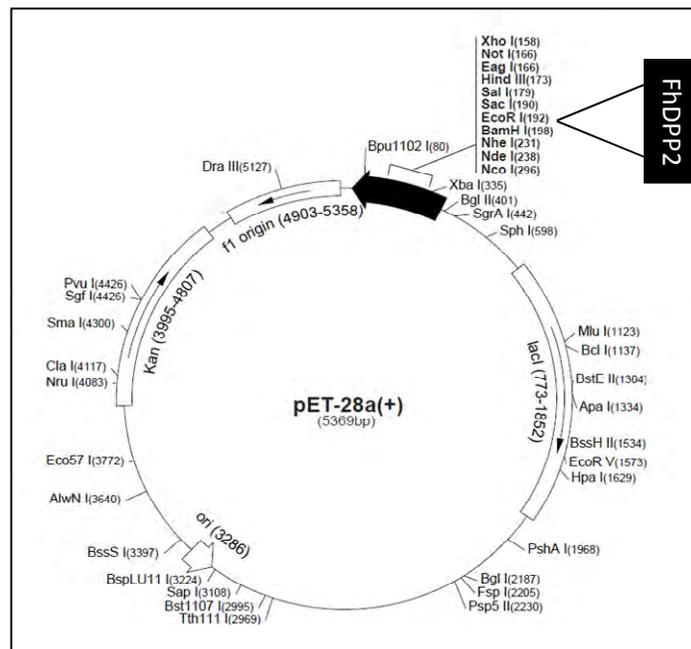
### 3.3.3.8. Actividad enzimática.

La actividad enzimática de la fracciones que contenían la proteína recombinante fue detectada utilizando los sustratos fluorogénicos Gly-Pro-AMC y Lys-Ala-AMC.

Los ensayos se llevaron a cabo usando una concentración final de 50 µM de sustrato en Hepes 50 mM pH 6.5, como se describió en el ítem 3.1.3.

### 3.4. Caracterización molecular de la legumaina secretada por los JRDs

A partir del análisis de EST de JRDs de *F. hepatica*, Cancela y cols. (2010) identificaron una nueva legumaina (EC 3.4.22.34) diferente a las expresadas en adultos, que fue denominada FhLeg3. El ADNc de dicha enzima (1221 pb) fue sintetizado sin el péptido señal por Genscript Corporation (USA) y clonado en el vector de expresión pGS21a (Fig. 9, Genscript).



**Figura 8– Clonado de la FhDPP2 recombinante en pET-28a+** – A partir de la búsqueda en bases de datos de EST de adulto de *F. hepatica* se identificó una DPP2, y se diseñaron cebadores para amplificar la secuencia codificante. El ADNc completo (1656pb) fue clonado en el sitio EcoRI del vector de expresión pET-28a+ (Novagen). El plásmido recombinante obtenido Pet\_FhDPP2 se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3).

### 3.4.1. Análisis de la secuencia aminoacídica.

El análisis de la secuencia aminoacídica de FhLeg3 fue efectuado mediante el alineamiento con otras legumaínas. Las secuencias homólogas se obtuvieron de la base de datos del GenBank realizando un tBlastx, fueron alineadas con la secuencia de la FhLeg3 utilizando clustalW y visualizadas en el software GeneDoc.

### 3.4.2. Producción de la FhLeg3 recombinante.

#### 3.4.2.1. Verificación de la expresión en extracto celular total.

El sistema de expresión pGS21 es inducible por IPTG, y el producto recombinante es expresado como proteína de fusión con la glutatión S transferasa (GST) de *E. coli* y purificado por cromatografía quelante haciendo uso de una región rica en histidinas presente en la fusión. Para testear la funcionalidad del sistema inicialmente se transfectaron células de *E. coli* cepa BL21 (DE3) pLys (Invitrogen, USA). El punto de partida fue una colonia recombinante crecida en 5 ml de LB Ampicilina a 37 °C con agitación a 200 rpm, y se monitoreó el crecimiento celular hasta una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6. Se tomaron 2.5 ml como control sin inducir (SI) y al resto se le agregó IPTG en una concentración final de 1 mM para inducir la expresión. Ambos cultivos se incubaron a 37 °C en agitación a 200 rpm durante 16 h. Los cultivos se centrifugaron, el sobrenadante fue descartado y al pellet celular se le agregó 250 µl de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, tampón de muestra de SDS-PAGE y DTT (10 mM). Los tubos se incubaron a 100 °C durante 5 min y se guardaron a -20 °C.

Las muestras se analizaron en un gel NuPAGE Bis-Tris al 10 % (Invitrogen, USA), y los geles fueron teñidos con SimplyBlue SafeStain (Invitrogen, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para confirmar la presencia de la

proteína en el extracto celular, se realizó un western blot con un anticuerpo anti-etiqueta His. Para ello, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Biorad, USA), bloqueadas 1 h a temperatura ambiente con PBS-BSA al 1 %, e incubadas con el anticuerpo A6 6-His MMS- 156P murino purificado (Covance, USA) en una dilución de 1/2500, 1 h a TA. La membrana fue lavada 5 veces con PBS-tween al 0.1 % e incubada con el conjugado anti-IgG total de ratón conjugado a HRP (hecho en oveja, Sigma-Aldrich). Luego de sucesivos lavados, se realizó el revelado incubando con el sustrato ELC Western blotting substrate (Pierce, USA). Estos ensayos se realizaron en el Sandler Center for Drug Discovery, Laboratorio de Bioquímica y Parasitología Molecular, Universidad de San Francisco California, Estados Unidos.

#### 3.4.2.2. Análisis de la cinética de la inducción en extracto celular total.

Se partió de una colonia recombinante crecida en 1 ml de medio LB Ampicilina durante 16 h a 37 °C. Se escaló a 10 ml y se controló por espectrofotometría el crecimiento celular, hasta una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6 a la cual se dividió el cultivo, induciendo la mitad con IPTG 1 mM y dejando la otra mitad como control sin inducir. Ambos tubos se volvieron a colocar a 37 °C con agitación a 200 rpm y se tomaron alícuotas de 1 ml a tiempo 0, 1, 2, 4 y 16 h. Los pellet celulares fueron procesados como fue descrito en la sección anterior y se analizaron por SDS-PAGE al 10 % con tinción con CBB R-250.

#### 3.4.2.3. Purificación de la proteína recombinante.

##### 3.4.2.3.1. Evaluación de los sistemas de cromatografía de afinidad.

Se evaluaron dos sistemas de cromatografía de afinidad para la purificación de la legumina recombinante soluble utilizando el mismo tampón de lisis y equilibración en ambos sistemas (Tris-HCL 0.1 M pH 7.2). Uno de ellos fue el

sistema de purificación utilizando una columna Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare). Brevemente esta contiene un medio para cromatografía de afinidad para la purificación mediante la unión de la proteína de fusión GST. En el otro sistema de afinidad evaluado, se utilizó una resina quelante (Ni Sepharose™ 6 Fast Flow, GE Healthcare), cargada con Ni<sup>+</sup> según las recomendaciones del fabricante. Los dos sistemas se utilizaron en régimen de flujo continuo. Luego de la purificación, se removió la proteína fusionada mediante la proteólisis con enteroquinasa (Sigma-Aldrich, USA).

### 3.4.2.3.2. Purificación de la proteína de los cuerpos de inclusión.

Un litro de células de *E. coli* fue crecido a 37 °C hasta una O.D.<sub>600</sub> de 0.4, luego la temperatura se redujo a 25 °C, se indujo con 0.1 mM de IPTG, y las células fueron colectadas 16 h más tarde por centrifugación durante 15 min a 5000 rpm

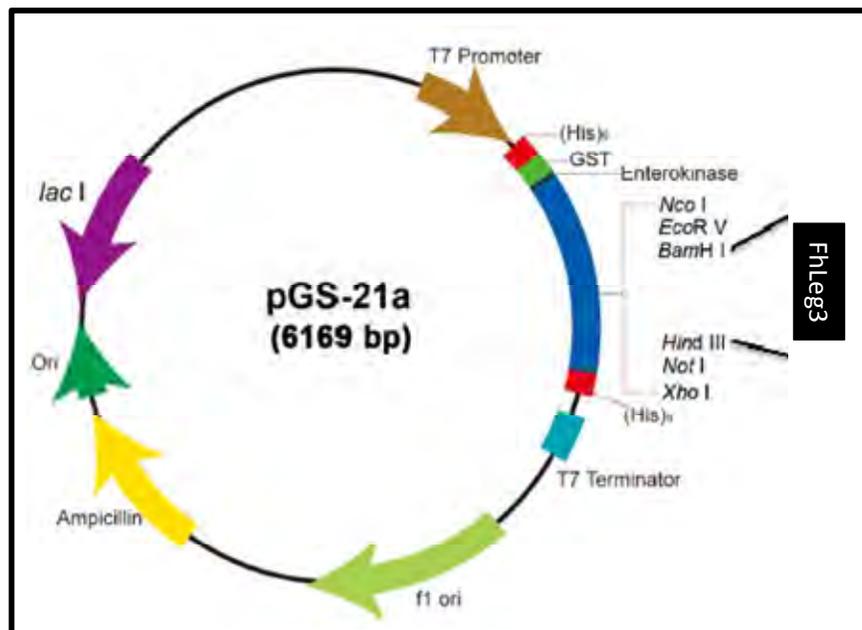


Figura 9 – Clonado de la Fhleg3 en el vector de expresión pGS21a – A partir del análisis de EST de JRD de *F. hepatica* se identificó una nueva legumina, diferente a las expresadas en adultos. El ADNc completo (1221pb) fue sintetizado por Genscript Corporation (Piscataway, NJ) y clonado en el vector de expresión pGS21a (Genscript). El plásmido recombinante obtenido pGS-Fhleg3 se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3).

a 4 °C. El pellet fue resuspendido en 40 ml de Tris-HCL 0.1 M pH 7.2 y 1 mg/ml de lisozima (Sigma), e incubado 30 min en hielo. Luego el mismo fue sonificado 8 pulsos de 30 seg, con pausas de 30 seg al 40% de potencia, el lisado fue centrifugado a 13000 rpm por 25 min a 4 °C. El pellet obtenido fue resuspendido en Tris-HCl con 1 % de Tritón X-100, se volvió a repetir el ciclo de sonicación/centrifugación, y el pellet obtenido fue lavado dos veces con Tris-HCl para remover el detergente.

El pellet obtenido fue resuspendido en Tris-HCl conteniendo 8 M de urea, sonificado e incubado 16 h a 4 °C. El sobrenadante que se obtuvo, que contenía la proteína recombinante, se incubó 16 h en presencia de L-arginina (100 g/L) para permitir el plegamiento de la proteína (Rudolph y Lilie, 1996), posteriormente se dializó para eliminar la urea, y se purificó por cromatografía de afinidad. La proteína recombinante fue eluída con un gradiente escalonado de 50, 200 y 400 mM de l-imidazol. La pureza de la proteína se evaluó en los distintos pasos de purificación por medio de SDS-PAGE al 10 % y tinción con CBB R-250. La concentración de proteína se determinó utilizando el kit BCA (Pierce, Thermo).

#### 3.4.2.4. Actividad enzimática.

La actividad enzimática de la proteína fue detectada utilizando el sustrato fluorogénico Ala-Ala-Asn-AMC.

Los ensayos se llevaron a cabo usando una concentración final de 100 µM de sustrato en Tris-HCl 0.1 M pH 6.0 en presencia de 2 mM DTT, como se describió en el ítem 3.1.3.

## 4. Resultados.

### 4.1. Actividades proteolíticas en secreciones de *F. hepatica*.

#### 4.1.1. Actividades proteolíticas en el estadio adulto.

Con la finalidad de caracterizar el perfil de actividades proteolíticas presentes en los PES de gusanos adultos, buscando en particular determinar actividades no atribuibles a las catepsinas L mayoritarias, se utilizó una batería de sustratos fluorogénicos.

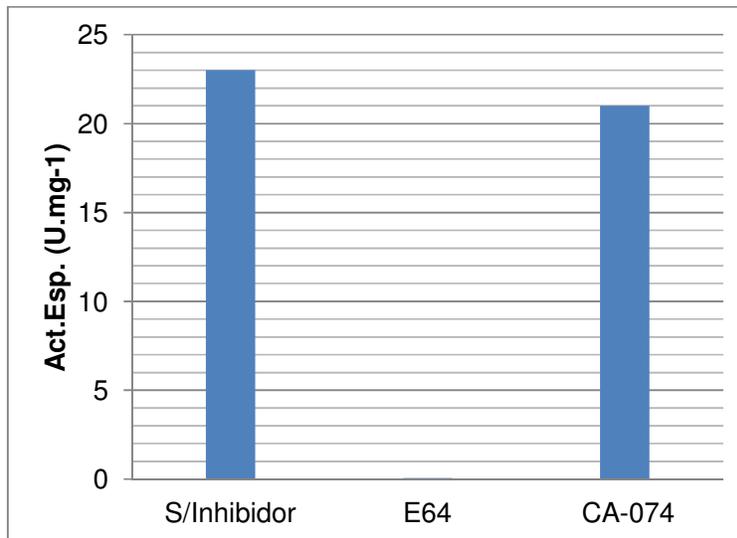
De forma previsible, a pH 5.5 se detectó una intensa actividad sobre Z-Phe-Arg-AMC atribuible a las catepsinas L (FhCL1 y FhCL2) que resultó completamente bloqueada por el inhibidor irreversible de cisteína proteasas E64. Sin embargo, una parte menor de esta actividad (9 %) fue bloqueada por CA-074, un inhibidor altamente específico de las catepsinas de tipo B, que previamente mostró ausencia de actividad inhibitoria sobre las CatLs (Beckham y cols., 2009). Esto sugiere la presencia de una actividad minoritaria de tipo CatB en los PES de adultos (ver Fig. 10).

Utilizando el sustrato Z-Ala-Ala-Asn-AMC se determinó la actividad leguminaína (5.5 U/mg) que resultó ser completamente abolida por el inhibidor específico MG-256 e insensible al E64.

Los PES de *F. hepatica* en el estadio adulto presentan actividad DPP tipo II y IV (como ha sido previamente reportado) que se ve reflejada en el clivaje de los sustratos H-Gly-Pro-AMC (0.9 U/mg) y H-Lys-Ala-AMC (2.9 U/mg), no así actividad tipo DPP I (CatC), determinada por la ausencia de clivaje sobre H-Gly-Phe-AMC y H-Gly-Arg-AMC.

Adicionalmente, se estudió la presencia de actividad catepsina D, a pH 4.0 y pH 6.0 utilizando el sustrato AbzFFSRQ-EDDnp, no detectándose actividad sobre el mismo.

La Tabla 4 resume en forma semicuantitativa los niveles de actividades atribuibles a las distintas proteasas presentes en los PES de gusanos adultos.



*Figura 10 – Actividad Z-Phe-Arg-AMC de los PES de adulto – Se midió la actividad Z-Phe-Arg-AMC de los PES de adulto en presencia de inhibidores específicos de CatL y CatB. El ensayo se efectuó de acuerdo a lo descrito en 3.1.3., a pH 5.5. Se preincubó cada muestra con 10  $\mu$ M de E64 y CA-074 por separado. Se muestra el valor promedio de tres experimentos independientes.*

#### 4.1.2. Actividades proteolíticas en el estadio juvenil.

Empleando similar metodología pero incorporando el factor tiempo, analizamos la presencia de actividades proteolíticas en los PES provenientes de JRDs en parásitos cultivados durante 24 h, 48 h y 12 días post-desenquiste (Fig. 11).

A lo largo del tiempo se observa una escasa variabilidad de la actividad proteolítica sobre Phe-Arg-AMC, mientras que el clivaje del sustrato Arg-Arg-AMC, muestra un significativo incremento con el tiempo de cultivo sugiriendo una correlación con el desarrollo del aparato digestivo en el parásito juvenil. Los niveles de actividad DPP registrados fueron menores a 0.3 U/mg a lo largo del experimento coincidiendo con registros previos (Carmona, 1994). El clivaje del sustrato de legumina fue detectado a niveles iguales o mayores a 1 U/mg en los tres tiempos estudiados, con una reducción a las 48 h de cultivo para

retomar niveles de actividades específicas comparables a las catepsinas a los 12 días de cultivo.

Tabla 4 – Actividades enzimáticas presentes en los PES de adulto y de juveniles.

	CatL	CatB	Leg	DPPI	DPPII y IV	CatD
PES adultos	+++	+	++	-	++	-
PES JRDs	++	++	++	-	+	ND

(ND: no determinado)

## 4.2. Las proteasas en la alimentación de los JRDs de *F. hepatica*.

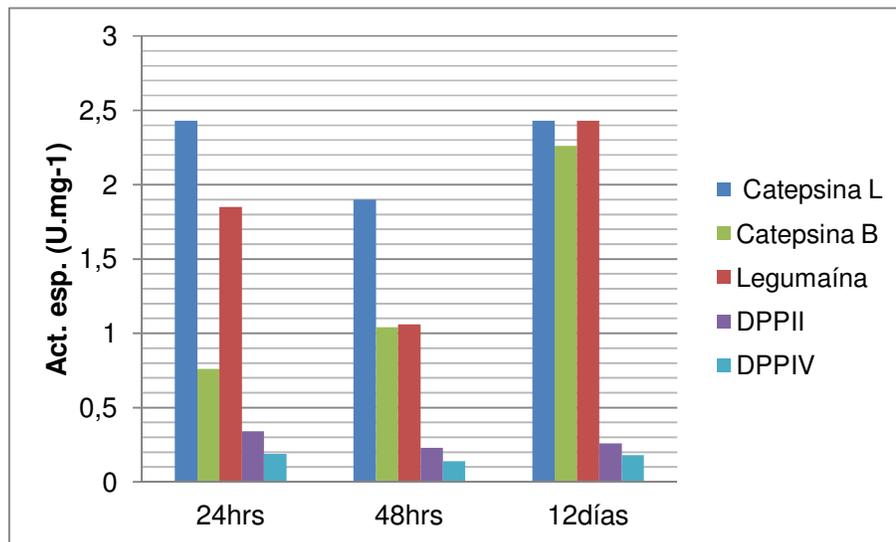
### 4.2.1. Observaciones sobre el cultivo de JRDs con GRs.

El cultivo en medio de Basch permitió el mantenimiento de las formas juveniles durante un período máximo de 4 semanas, a partir del cual se observó una reducción significativa de la vitalidad de los parásitos. Asimismo, el desarrollo de los juveniles fue asincrónico, observable por diferencias de tamaño entre individuos dentro de un mismo pocillo y entre pocillos, sin razones evidentes, más allá del demostrado efecto inhibitorio asociado al aumento de la relación entre la biomasa parasitaria y volumen del medio de cultivo (Basch, 1981).

Con la finalidad de estudiar la capacidad del tubo digestivo de los JRDs en cultivo para lisar los GRs y degradar la Hb contenida en su interior con fines nutricionales, se agregaron GRs humanos en el medio Basch 24 h después del desenquiste y se realizaron observaciones diarias utilizando un microscopio óptico (Fig. 12). Ya en las primeras horas de cultivo se observó la presencia de GRs a nivel del intestino bifurcado en el 100% de los parásitos. La lisis de los GRs, no se detectó durante las primeras 24 h, ya que no se apreciaron cambios en la morfología de los mismos dentro del tubo digestivo del parásito.

A las 48 h de incubación se observó material de color rojo oscuro uniforme y pérdida de los contornos celulares, cambios compatibles con la lisis de los GRs. A las 72 h de cultivo, se apreció además la presencia de gránulos de color rojo intenso, que presumiblemente corresponden a la hemozoína. De forma periódica, este material fue regurgitado al medio de cultivo durante el resto del experimento.

La presencia del material intra-intestinal oscuro permitió distinguir nítidamente la morfología del intestino, observándose el proceso de ramificación de los ciegos intestinales que acompaña el desarrollo del parásito conforme transcurrían los días de cultivo (Fig. 12, 5 al 8). Además, la presencia de GRs induce este proceso de ramificación incipiente, como puede observarse al



*Figura 11 – Actividad enzimática de los PES de JRDs – Se midió la actividad catepsina B de los PES utilizando el sustrato Z-Arg-Arg-AMC, la actividad CatL utilizando Z-Phe-Arg-AMC, la actividad legumaína utilizando Z-Ala-Ala-Asn-AMC, y la actividad DPP utilizando H-Lys-Ala-AMC y H-Gly-Pro-AMC. Se utilizó una concentración 50  $\mu$ M de sustrato, en un volumen de 200  $\mu$ l. Los ensayos se efectuaron utilizando PES de parásitos 24 h, 48 h y 12 días post-desenquiste. Se incubaron las muestras a 37  $^{\circ}$ C por 60 min y la fluorescencia fue medida utilizando un espectro fluorímetro Fluostar, de acuerdo a lo descrito en 3.1.3. Las actividades sobre Z-Phe-Arg-AMC y Z-Arg-Arg-AMC fueron determinadas a pH 5.5., la actividad sobre Z-Ala-Ala-Asn-AMC a pH 6.0, y las actividades sobre H-Lys-Ala-AMC y H-Gly-Pro-AMC a pH 6.8. Las barras del gráfico representan la media de tres experimentos diferentes.*

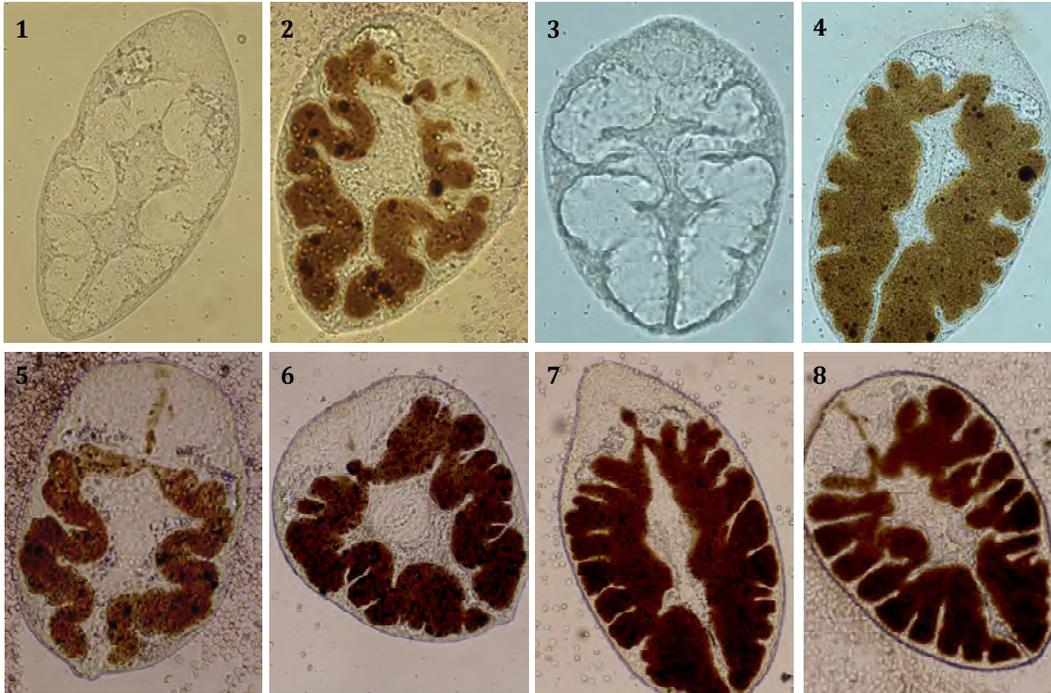
compararlo con parásitos incubados en medio sin GRs (Fig. 12, 3 y 4).

#### 4.2.2. Estudios de degradación de Albúmina-FITC.

Con el objetivo de estudiar el rol de las catepsinas en la degradación de otra proteína abundante en la sangre, incubamos JRDs de 3 semanas de cultivo con BSA-FITC, que habían sido previamente pre-incubados con 10  $\mu$ M de E64 inhibidor selectivo de cisteína proteasas, y E64-D, su análogo permeable.

Las moléculas de FITC se encuentran acopladas a los residuos de Lys de la BSA, lo que en la estructura globular nativa de la proteína causa que la fluorescencia se ve disminuída de forma importante. Cuando la BSA es clivada las moléculas de FITC se ven expuestas, por lo tanto, esperamos observar un incremento importante de la fluorescencia.

Luego de la incubación se realizaron lavados con PBS, y los parásitos fueron observados al microscopio de fluorescencia, con las longitudes de onda correspondiente al fluoroforo. Observamos fluorescencia en todo el intestino bifurcado (Fig. 13A), señal de que efectivamente la proteína es clivada. La señal de fluorescencia se mantuvo sin cambios al incubar los JRDs con el inhibidor de cisteína proteasas E64, no permeable a las células (Fig. 13B). Sin embargo, en presencia de su análogo permeable, E64-D, no se observa una intensidad de fluorescencia significativa (Fig. 13C), indicando que éste, al contrario del E64, afectó a las proteasas blanco.

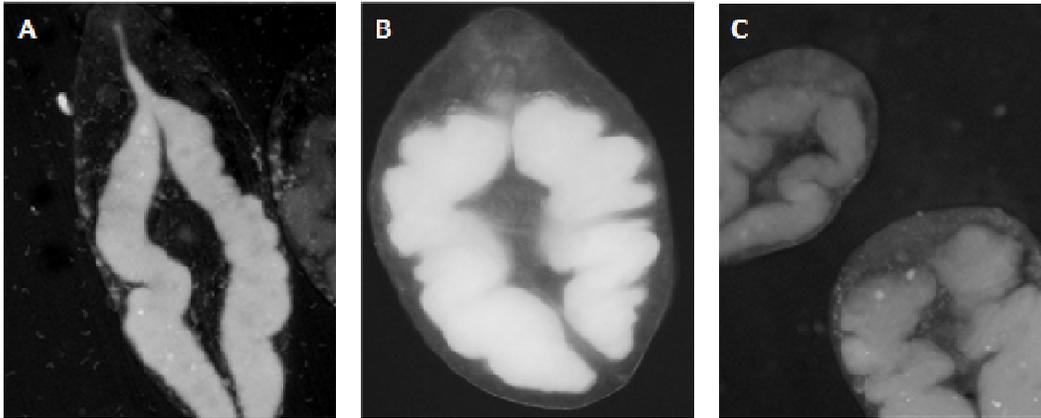


*Figura 12 – Cultivo de JDRs , co-cultivo con GRs: Los parásitos fueron mantenidos en cultivo durante 2 semanas en medio completo. Al medio de cultivo se agregaron 20  $\mu$ l de GRs de sangre humana y se tomaron registros diarios por microscopía óptica. 1: JRD en medio de cultivo solo, 4 días, 2: JRD con GRs, 4 días, 3: JRD en medio de cultivo solo, 15 días, 4: JRD con GRs, 15 días. Del 5 al 8: JRDs incubados en presencia de GRs 48 h, 6 días, 10 días y 15 días de cultivo, respectivamente. Las imágenes fueron registradas en el aumento 20x.*

No se observaron alteraciones en la morfología de los parásitos o efectos en la movilidad intestinal como consecuencia de la incubación con ambos inhibidores en los tiempos del estudio.

#### 4.2.3. Digestión de Hb por los parásitos juveniles y adultos.

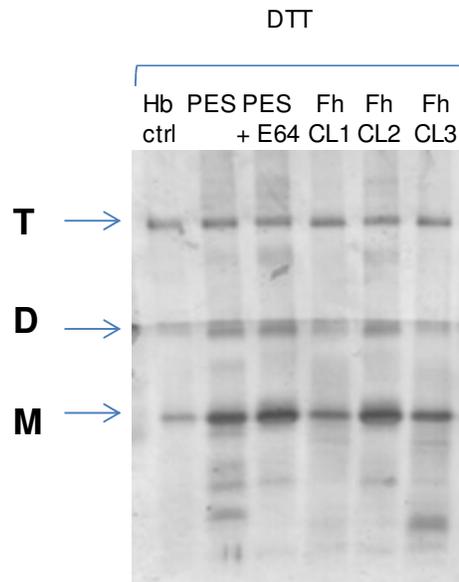
Con el objetivo de examinar la actividad de las CLs de *F. hepatica* sobre Hb nativa se efectuaron ensayos de degradación de Hb bovina con las enzimas recombinantes o con los PES de adulto, utilizando como agente reductor DTT, a pH 5.5.



*Figura 13 – Degradación de BSA-FITC in vivo, por juveniles de 3 semanas: Luego de la incubación con RPMI solo (A), 10  $\mu$ M de E64 (B) o 10  $\mu$ M de E64-D (C) por 1 h, los parásitos fueron alimentados con BSA-FITC (30  $\mu$ g/ml) y lavados con PBS 1 x. La fluorescencia fue visualizada utilizando un microscopio de fluorescencia. La señal de fluorescencia denota el intestino bifurcado de *F. hepatica*. La pérdida de fluorescencia ocurre solo con E64-D, la forma permeable del inhibidor de cisteína proteasas E64. Las imágenes fueron registradas en el aumento 20x, ganancia 1.70x y tiempo de exposición 400ms.*

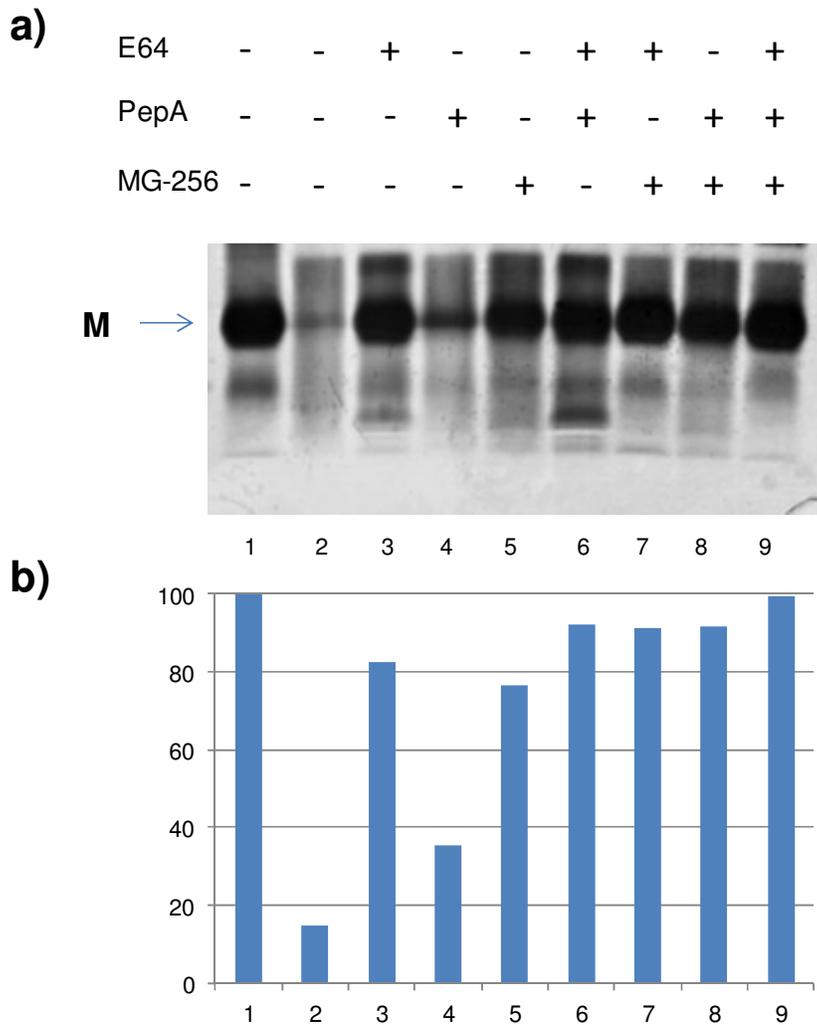
Los productos de degradación fueron separados en geles desnaturalizantes, que luego fueron teñidos con nitrato de plata. En los geles de poliacrilamida la Hb se observa en sus tres formas: tetrámerica, dimérica y monomérica que migran aproximadamente a la altura de los 64, 32 y 16 kDa respectivamente. En la Fig. 14 se observa que tanto FhCL1, FhCL2 y FhCL3 como los PES tienen efecto degradativo sobre la Hb bovina objetivable por la aparición de varias bandas de peso molecular inferior al monómero y la reducción de la intensidad de la banda de 16 kDa, apreciable en comparación al control. Sin embargo, en este experimento la intensidad de banda del control es pobre, como puede apreciarse (Fig. 14). El efecto degradativo es mayor para FhCL1, donde se observa una mayor dismunción de la intensidad de banda del monómero, y para los PES, donde se observa un incremento del número de bandas por debajo de los 16kDa. El E64 no fue capaz de inhibir completamente el efecto proteolítico de los PES lo que indica la presencia de otras proteasas con capacidad de ataque sobre la Hb (Fig. 14).

En los siguientes ensayos realizados se evaluó la actividad de los PES sobre la Hb, en presencia de inhibidores selectivos de proteasas (Fig. 15a). Se utilizó DTT como reductor, se corrieron los productos de la hidrólisis en geles de Tris-Tricina al 16 % y urea 6 M. Además se realizó el estudio cuantitativo de la degradación por medio del programa ImageJ, que permitió cuantificar la degradación del monómero en cada condición respecto al control (Fig. 15, 1).



*Figura 13 – Digestión de hemoglobina por actividad proteolítica de catepsinas L recombinantes y de los PES– La Hb bovina (20 µg) fue incubada con 0.6 µg de FhCL1r, FhCL2r, FhCL3r o los PES de adulto en acetato de sodio 0.1 M, pH 5.5, en presencia de 2.5 mM de DTT o GSH. La reacción fue llevada a cabo durante 1 h a 37 °C, luego se frenó la reacción con 10 µM de E64. Las muestras se sembraron en un gel Tris-Tricina 6 M UREA al 16 %. El gel fue teñido con plata.*

Se observa una notoria degradación del monómero de Hb incubado en presencia de los PES que es inhibida casi en su totalidad en presencia de E64 (Fig. 15, 3), lo que muestra la gran contribución de las CLs a la digestión de Hb. La actividad hemoglobinolítica de los PES se ve muy poco alterada en presencia de Pep A, inhibidor selectivo de aspártico proteasas (Fig. 15, 4). Al incubar los PES con MG-256 (Fig.15, 5), inhibidor selectivo de legumina, se observa una marcada inhibición de la degradación. La inhibición de la degradación es total en presencia de los 3 inhibidores (Fig. 15, 9).



**Figura 15 – Digestión de hemoglobina por los PES de gusanos adultos en presencia de distintas combinaciones de inhibidores – a) La Hb bovina (20  $\mu$ g) fue incubada con 0.6  $\mu$ g de PES de adulto en acetato de sodio 0.1 M, pH 5.5, en presencia de 2.5 mM de DTT y distintas combinaciones de inhibidores. La reacción fue llevada a cabo durante 16 h a 37 °C. Las muestras se sembraron en un gel Tris-Tricina 6 M UREA al 16 %. El gel fue teñido con nitrato de plata. b) Se realizó el estudio cuantitativo de la degradación del monómero utilizando el programa ImageJ y se graficó en función de cada condición: 1. Control Hb, 2. Hb + PES, 3. Hb + PES + E64, 4. Hb + PES + PepA, 5. Hb + PES + MG-256, 6. Hb + PES + E64 + PepA, 7. Hb + PES + E64 + MG-256, 8. Hb + PES + PepA + MG256, 9. Hb + PES + E64 + PepA + MG-256.**

#### 4.2.4. Análisis de la digestión de Hb por FhCL3 empleando espectrometría de masa.

Dadas las dificultades en la obtención de PES de JRDs en cantidades suficientes para realizar ensayos de digestión de Hb en geles, decidimos examinar a nivel molecular la degradación de la Hb bovina por FhCL3, la proteasa tipo Cat L predominante en los PES de JRDs. A tales efectos la Hb bovina fue mezclada con la enzima recombinante funcional producida en *H. polymorpha*, a pH 5.0 a 37 °C. Las reacciones fueron frenadas a tiempo 10 y 120 min mediante la adición de E-64 en exceso y se tomaron alícuotas que fueron analizadas por medio de LC ESI MS/MS y Maldi-Tof/Tof. Los péptidos identificados fueron mapeados en la secuencia aminoacídica primaria de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  globina bovinas para identificar los sitios de corte generados por la enzima (Fig. 16). A los 10 min del ensayo, la FhCL3 cliva la  $\alpha$  globina en 37 sitios y la  $\beta$  globina en 29 sitios, mientras que a los 120 min se suman clivajes adicionales, totalizando 48 y 43 sitios de corte en cada cadena respectivamente. El análisis del mapa de clivaje que se muestra en la Fig. 16 permite visualizar que FhCL3 genera péptidos pequeños de 3 a 11 aminoácidos.

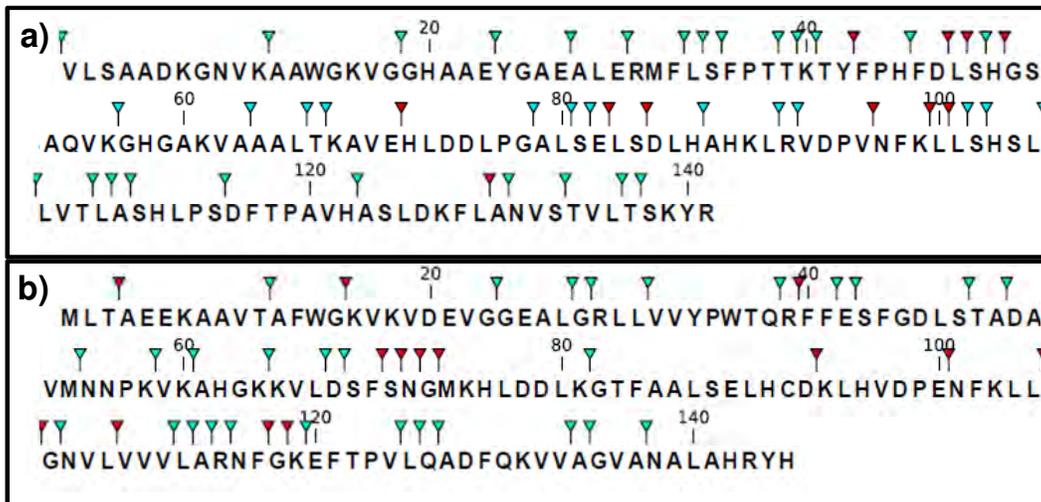
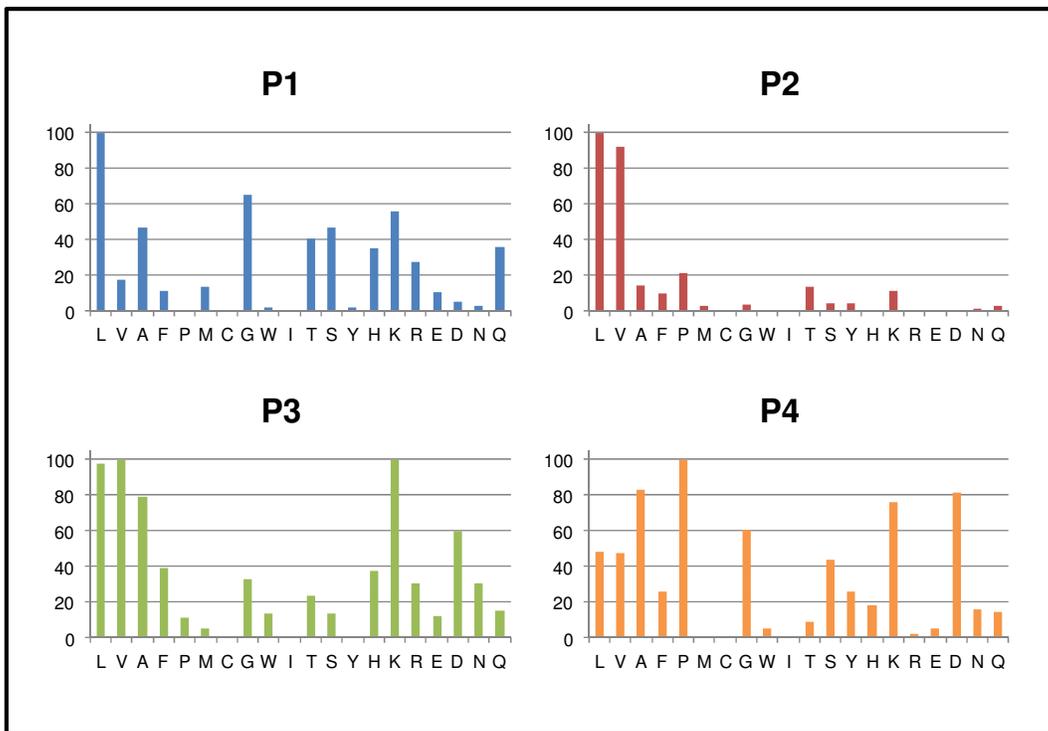


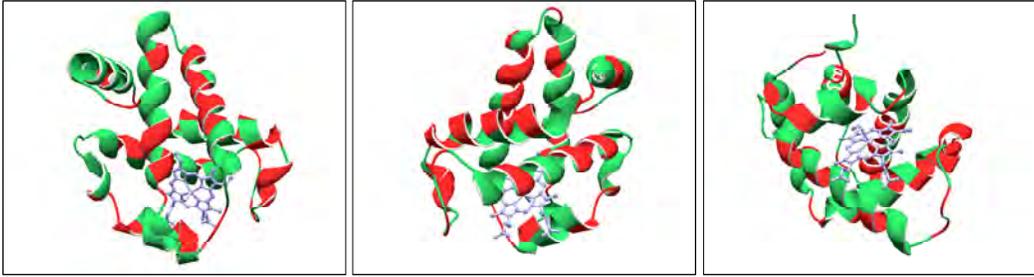
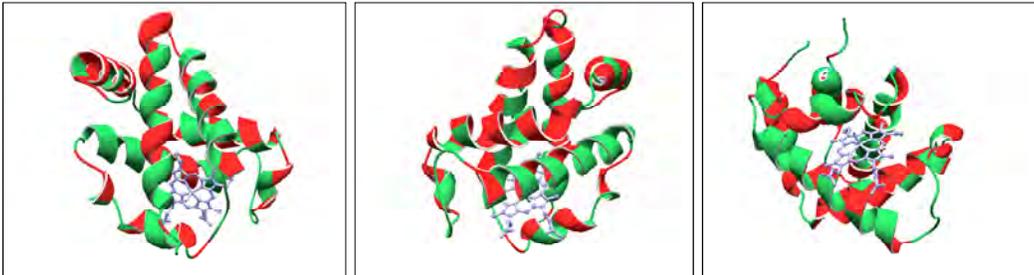
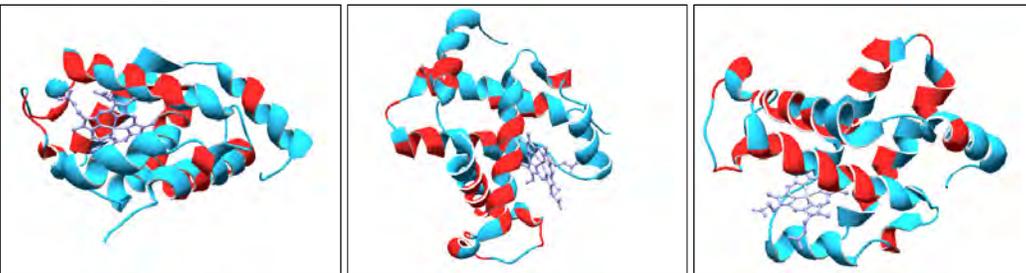
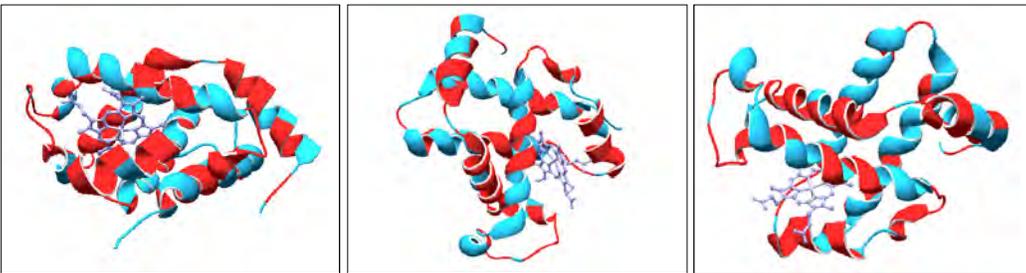
Figura 16 – Caracterización de la actividad hidrolítica de FhCL3 sobre Hb – Mapa de los clivajes hidrolíticos sobre las cadenas  $\alpha$  (a) y  $\beta$  (b) globina, en celeste los clivajes producidos a los 10 min de digestión, y en rojo los producidos adicionalmente a los 120 min, determinados por nano LC-ESI MS/MS, de acuerdo con el procedimiento descrito en 3.2.4.2.

En el sustrato, los residuos presentes en la posición P2 del enlace a ser clivado interactúan con el subsitio S2 en el sitio activo de las cisteína proteasas tipo papaína y determinan la eficiencia con la que se cliva el enlace peptídico (Schechter y cols., 1968). Por lo tanto, examinamos la frecuencia de cada aminoácido en la posición P2 del sitio de clivaje proteolítico en las digestiones de 120 min (Fig. 17). Se observó una preferencia de FhCL3 por residuos hidrofóbicos en la posición P2 (Leu > Val), que coincide con las preferencias de FhCL1 para este sustrato (Lowther y cols., 2008). Sin embargo, este patrón se aparta de las preferencias para el clivaje de colágeno fibrilar tipo I por la FhCL3, donde prefiere Gly en la posición P2 (Robinson y cols., 2011). Para el resto de las posiciones las preferencias se correlacionan con la abundancia de aminoácidos de la Hb, en su mayoría residuos hidrofóbicos, siendo los residuos más frecuentes: Leu, Ala, Val y Lys.



*Figura 17 – Frecuencia de preferencias de residuos en las posiciones P1-P4 de los sitios de corte de FhCL3 sobre la Hb bovina– El eje de las Y” representa la frecuencia de ocurrencia de cada aminoácido en las posiciones P1-P4 relativa al residuo más frecuente, mientras que el eje de las X representa los aminoácidos mediante el código de una sola letra (n= norleucina).*

Para finalizar el análisis, realizamos la comparación entre los sitios de corte sobre la Hb por FhCL1 y FhCL3, mapeando los clivajes en las estructuras tridimensionales de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  globina utilizando el programa Spdb viewer (Fig. 18). Mientras que los estudios de clivaje de FhCL3 se realizaron sobre Hb bovina, los datos de degradación por la FhCL1 se obtuvieron sobre la molécula de Hb humana. Dado que ambas proteínas tienen alta homología se alinearon los modelos tridimensionales y se realizó la comparación de los patrones proteolíticos sobre ellos. De los 91 sitios de corte obtenidos con FhCL3, 47 coinciden con los sitios de corte de FhCL1, resultando evidente que ambas proteasas actúan preferentemente sobre enlaces peptídicos accesibles en la superficie de la molécula blanco.

CL3 sobre  $\alpha$ -globina bovinaCL1 sobre  $\alpha$ -globina humanaCL3 sobre  $\beta$ -globina bovinaCL1 sobre  $\beta$ -globina humana

*Figura 18 – Sitios de corte proteolítico de la FhCL1 y la FhCL3 sobre la molécula de hemoglobina – Diagrama tridimensional de las cadenas de  $\alpha$  globina (en verde) y  $\beta$  globina (en celeste), en los cuales se muestran los sitios de corte de la FhCL1 y la FhCL3 en la molécula (en rojo).*

### 4.3. La DPP en *F. hepatica*.

#### 4.3.1. Ensayos de actividad tipo dipeptidil peptidasa en los PES de adulto.

Como fue mencionado en el ítem 4.1., los PES de adulto presentaron actividad de tipo DPP, evidenciada como clivaje sobre los sustratos Gly-Pro-AMC y Lys-Ala-AMC, específicos para DPPs de los tipos II y IV. A los efectos de continuar la caracterización de dichas actividades con vistas a la purificación de las mismas, se determinaron los valores de pH óptimo para estos sustratos a través de un amplio rango de valores. Como se muestra en la Fig. 19, los perfiles de pH para Gly-Pro-AMC y Lys-Ala-AMC resultaron ser similares, mostrando un pico de actividad entre 5.5 y 6.0. Las actividades se reducen significativamente por debajo de los 4.5 y por encima de 7.5.

Para determinar las afinidades de sustrato de la DPP presente en los PES de adultos se utilizó una librería combinatoria de dipéptidos fluorogénicos. En la posición P1, Pro y nLeu son los aminoácidos preferidos, seguidos por Leu y



P  
a  
e  
e  
n

Met, y en mucha menor medida Ala (Fig. 20), mientras que en P2, se observó

preferencia por nLeu y Met, con menor actividad sobre Leu y nula afinidad por residuos aromáticos o negativamente cargados. Cabe destacar que no se observó actividad sobre Gly o Lys en P2, como corresponde para los sustratos utilizados en su identificación. De acuerdo a los resultados obtenidos, los dipéptidos con mayor especificidad serían nLeu-Pro, nLeu-nLeu, nLeu-Leu, Met-Pro, Met-nLeu, Met-Leu.

#### 4.3.2. Purificación de una DPP nativa

La purificación de la actividad DPP se llevó a cabo a partir de los PES de parásitos adultos utilizando una combinación de cromatografía de gel filtración e intercambio iónico. En la Fig. 21 se observa el perfil de elución de las proteínas del PES en la columna HiLoad 16/60 Superdex 75 de gel filtración. El primer pico proteico que eluyó con el volumen muerto de la columna, contenía las fracciones con actividad DPP medida sobre H-Gly-Pro-AMC y H-Lys-Ala (Fig. 21). Que ambas actividades, ya caracterizadas en los PES de adulto, coincidan en el volumen muerto sugiere que se podría tratar de una misma enzima.

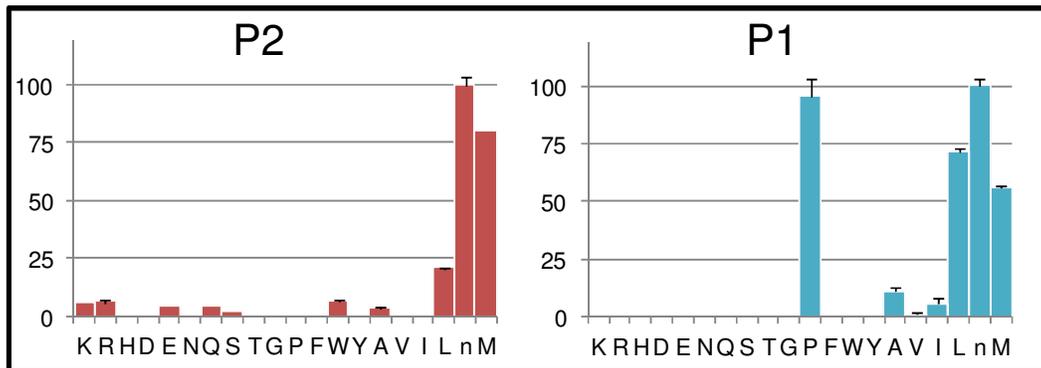


Figura 20 – Perfil de especificidades de sustrato en las posiciones P1-P2 de los PES de adulto de *F. hepatica* utilizando una librería PS-SCL– El eje de las “y” representa la actividad contra los sustratos relativa a la más alta actividad de la biblioteca, mientras que el eje de las “x” representa los aminoácidos mediante el código de una sola letra (n= norleucina).

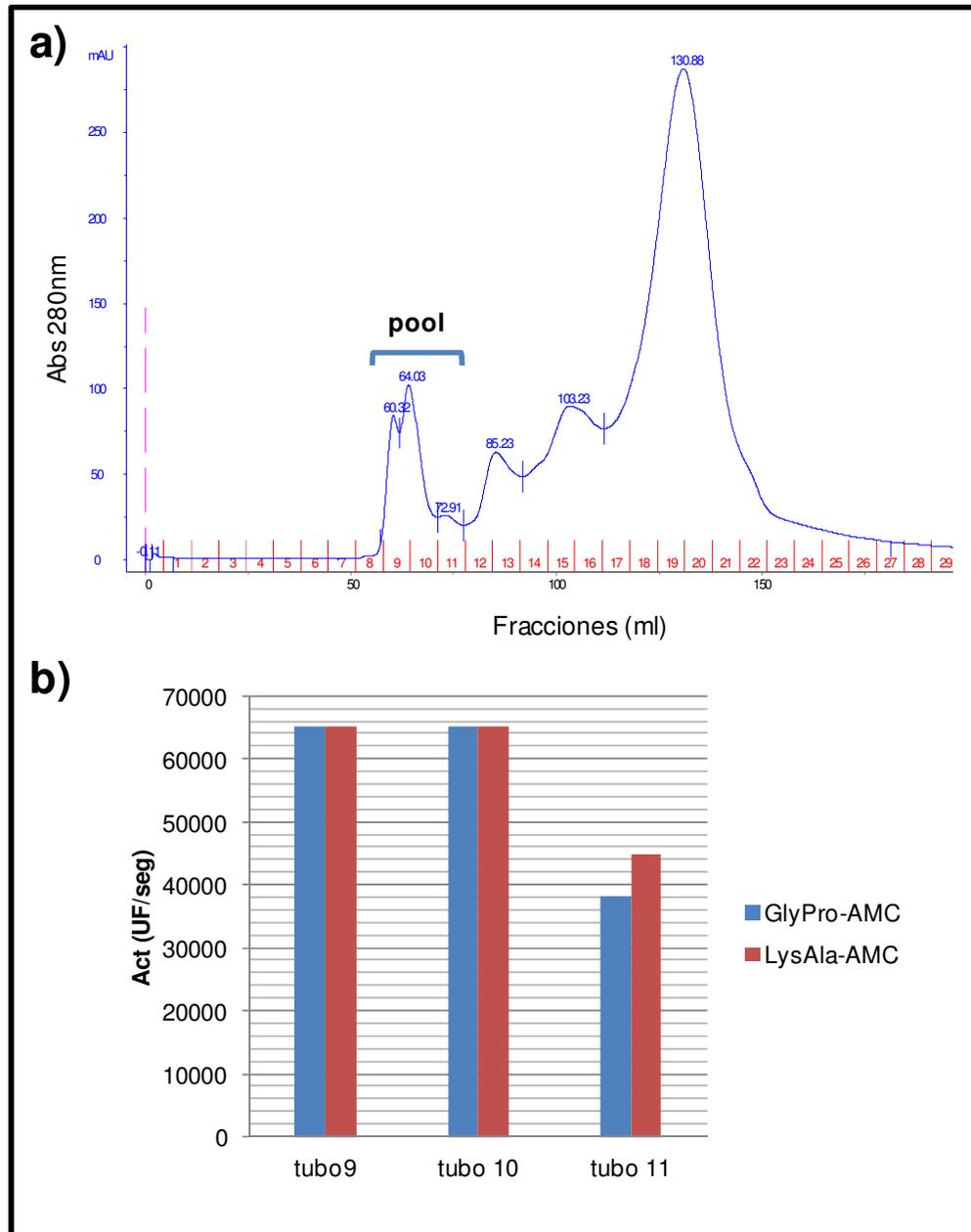


Figura 21 – Cromatografía en gel filtración de los PES de adultos de *F. hepatica* en HiLoad 16/60 Superdex 75 – Los PES se concentraron a un volumen final de 4 ml (11.7 mg) y se aplicaron a una columna de gel filtración equilibrada en buffer Tris-HCl 0.05 M NaCl 0.15 M, pH 7.0, conectada al Äkta Purifier (GE, Healthcare). La elución de las proteínas se siguió mediante la absorbancia a 280 nm (a) y la actividad DPP de los diferentes picos se monitoreó utilizando los péptidos fluorogénicos H-Gly-Pro-AMC, H-Lys-Ala-AMC (b). Los picos conteniendo actividad DPP (barra de color azul) se concentraron y se aplicaron a una columna de intercambio iónico.

Las fracciones conteniendo las actividades enzimáticas de interés se aplicaron a una columna de intercambio iónico y se eluyeron con un gradiente de NaCl de 100-300 mM. En la Fig. 22 se muestra el análisis por SDS-PAGE 10% de las fracciones obtenidas en los distintos pasos de purificación. La banda correspondiente a una DPP nativa migra a una altura alrededor de los 200 kDa, tal como fue reportado previamente. Las fracciones conteniendo actividad H-Gly-Pro-AMC y H-Lys-Ala-AMC se juntaron, dializaron contra Hepes 50 mM, pH 6.0 y parte fue almacenada a -80 °C, siendo la otra parte liofilizada. En ambos casos se perdió completamente la actividad enzimática de la proteína. Asimismo, al analizar la banda proteica por espectrometría de masa no se lograron visualizar péptidos compatibles con la enzima.

### 4.3.3. Clonado de FhDPP2.

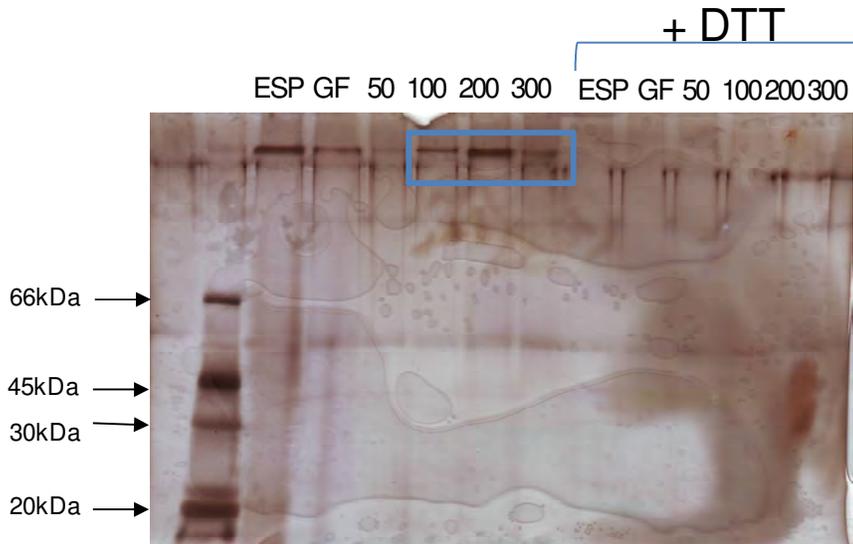
#### 4.3.3.1. Análisis de secuencia y clonado.

Debido a la inestabilidad de la enzima nativa, se encaró el clonado de una probable DPP, que llamamos FhDPP2 por su similitud con las DPP tipo II presentes en mamíferos, a partir de una secuencia de ESTs de adultos de *F. hepatica* presente en la base de datos del Sanger Institute.

Utilizando cebadores sintetizados en base a esta secuencia se logró aislar un ADNc codificante de dicha proteína. Este ADNc codifica para una secuencia de 470 aminoácidos, con una masa molecular calculada de 53 kDa y un punto isoeléctrico de 5,36. Una búsqueda en la base de datos Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) reveló que la enzima pertenece a la familia de serina proteasas S28, miembro del clan SC hidrolasas (Fig. 23).

La secuencia de la FhDPP2 fue alineada con sus homólogos, mostrando poseer los residuos conservados de la tríada catalítica para las serina proteasas: Ser153, Asp412, His437, incluyendo la secuencia consenso para el sitio activo Gly-X-Ser-X-Gly. Sin embargo, FhDPP2 no posee el motivo cremallera de leucina reportado para las DPPII de mamífero, involucrado en la dimerización. Utilizando el software Signal Peptide 4.0, se determinó que la enzima es sintetizada con un péptido señal clivable entre los aminoácidos 19 y

20. Además, presenta 5 sitios potenciales de N-glicosilación en las posiciones 31, 78, 244, 283 y 308.

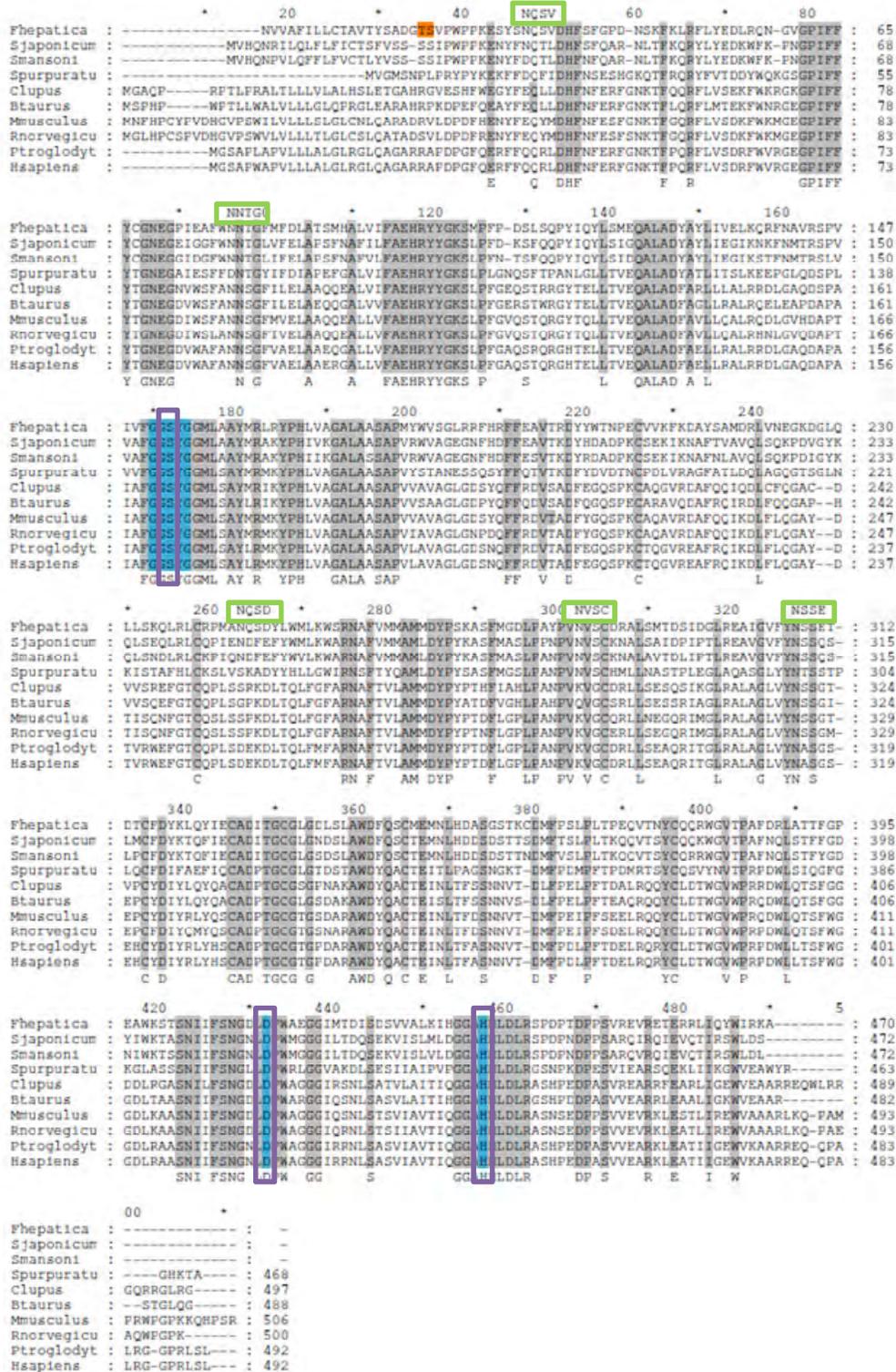


*Figura 22 – Análisis de la purificación de la actividad DPP por SDS-PAGE – Las fracciones con actividad DPP de la columna de gel filtración se aplicaron a una columna de intercambio iónico equilibrada en tampón Hepes 50 mM, pH 6.8. Las proteínas se eluyeron con el mismo tampón y un gradiente escalonado de NaCl (50 a 400 mM). La actividad DPP en las diferentes fracciones se monitorizó utilizando los péptidos fluorogénicos H-Gly-Pro-AMC y H-Lys-Ala-AMC. Las fracciones con actividad DPP fueron juntadas y analizadas en un SDS-PAGE 10 % en presencia y ausencia del reductor DTT. (ESP: material de partida, GF: fracción obtenida de la gel filtración, 50, 100, 200 y 300: pool de los distintos escalones de elución del intercambio iónico).*

#### 4.3.3.2. Aislamiento del ADNc codificante de la FhDPP2 y clonado en vector de expresión procariota.

Para amplificar el ADNc codificante de la FhDPP2 se diseñaron dos juegos de cebadores, que se utilizaron en distintas combinaciones en una reacción de PCR tal como se detalla en el ítem 3.3.3.4. En una primera instancia sólo fue posible amplificar dos fragmentos solapantes de 930 y 866 pb (Fig. 24), que fueron secuenciados para confirmar su identidad. Una vez confirmada la secuencia, fueron utilizados para una segunda PCR, donde se utilizaron como

molde los cebadores que amplifican el ADNc de FhDPP2, como se observa en la Fig. 24.



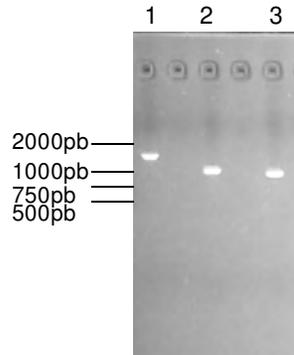
*Figura 23 – Alineamiento de FhDPP2 con otros miembros de la familia S28 de peptidasas, clan SC – Se realizó un Blastx (GenBank) para la búsqueda de secuencias. Los residuos idénticos se muestran en gris. En celeste se muestran los residuos que forman la tríada catalítica: Ser (con la secuencia consenso de las serina proteasas Gly-X-Ser-X-Gly), Asp, His. En naranja se muestra el sitio de corte de péptido señal, y en verdes 5 sitios potenciales de N- glicosilación. Sjaaponicum CAX71063.1 (Schistosoma japonicum), Smansoni CDD82778.1 (Schistosoma mansoni), Spurpuratu XP\_797434.2 (Strongylocentrotus purpuratus), Clupus XP\_848703.1 (Canis lupus familiaris), Btaurus AAI49046.1 (Bos Taurus), Mmusculus Q9ET22.2 (Mus musculus), Rnovergicu Q9EPB1.1 (Ratus novergicus), Ptroglodyt XP\_528471.2 (Pan troglodytes), Hsapiens AAH16961.1 (Homo sapiens).*

La región codificante correspondiente a FhDPP2 fue clonada en marco en el sitio EcoRI del vector de expresión pET-28a+ previamente desfosforilado. Con esta construcción se transformaron células de *E. coli* XL1 Blue, para amplificar el plásmido, y debido a que solamente utilizamos un sitio de clonado, se seleccionaron los clones que contenían la región codificante en el sentido correcto. Esta selección se realizó digiriendo plásmidos purificados de varias colonias seleccionadas al azar con la enzima BamHI. La digestión produce dos fragmentos de 6683 y 342 pb si el inserto se encuentra en el sentido correcto, y dos fragmentos de 5691 y 1334 pb en el caso contrario. Una vez seleccionada la colonia que poseían la construcción Pet\_FhDPP2 adecuada, se utilizó para transformar células BL21 (DE3).

#### 4.3.3.3. Expresión de FhDPP2.

Para determinar cuáles eran las condiciones de expresión de la proteína recombinante, se realizaron pruebas de expresión partiendo de un cultivo 16 h, que fue inoculado a 100 ml de LB conteniendo 100 µg/ml de kanamicina, e incubado a 37 °C hasta una O.D.<sub>600nm</sub> de 0.7. Para inducir la expresión de la proteína se agregaron 2 concentraciones de IPTG (0.1 y 0.4 mM) y se tomaron alícuotas de 200 µl de cultivo a tiempo 0, 2, 4 y 16 h. El cultivo fue centrifugado para separar las células del medio de cultivo, resuspendido en Tris-HCl 0.1 M pH 7.0, y luego sonicado. El pellet insoluble fue separado de la fracción soluble centrifugando a 15.000 xg durante 10 min. Las fracciones solubles e insolubles,

correspondientes a los distintos tiempos de cultivo, fueron analizadas por SDS-PAGE 10 %, para determinar cuál de las condiciones de inducción resultaba más adecuada. Como se observa en la Fig. 25, se detectó la aparición de una



*Figura 24 – Amplificación de ADNc codificante de la FhDPP2 – Mediante PCR utilizando combinaciones de cebadores diseñados a partir la secuencia de una EST de F. hepatica de una DPP: EcoFhDPP2F y EcoFhDPP2R, que amplifican todo el ADNc de 1656 pb (1), FhDPP2Fi2 y EcoFhDPP2R, que amplifican un segmento de 930 pb (2), y EcoFhDPP2F y FhDPP2Ri, que amplifican un segmento de 866 pb (3). Los productos de PCR fueron separados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, con tinción con bromuro de etidio.*

banda proteica de aproximadamente 50 kDa, correspondiente a la FhDPP2r, en los cultivos de 4 y 16 h, en presencia de 0.4 mM de IPTG. No se detectó actividad enzimática en dichos extractos sobre los sustratos H-Gly-Pro-AMC y H-Lys-Ala-AMC.

#### **4.4. Clonado y expresión de una legumaína recombinante asociada al estadio juvenil de *F. hepatica*.**

##### **4.4.1. Análisis de la secuencia aminoacídica.**

Mediante el análisis de una biblioteca de ESTs de JRDs de *F. hepatica*, Cancela y cols. (2010) identificaron una nueva legumaína, estadio específica, denominada legumaína 3 (FhLeg3). El ADNc de esta enzima fue sintetizado por Genscript (Piscataway, NJ) y clonado en el vector de expresión pGS21a. Dicho ADNc codifica para un polipéptido de 362 aminoácidos, con una masa molecular calculada de 41,8 kDa, y un pI de 5,5.

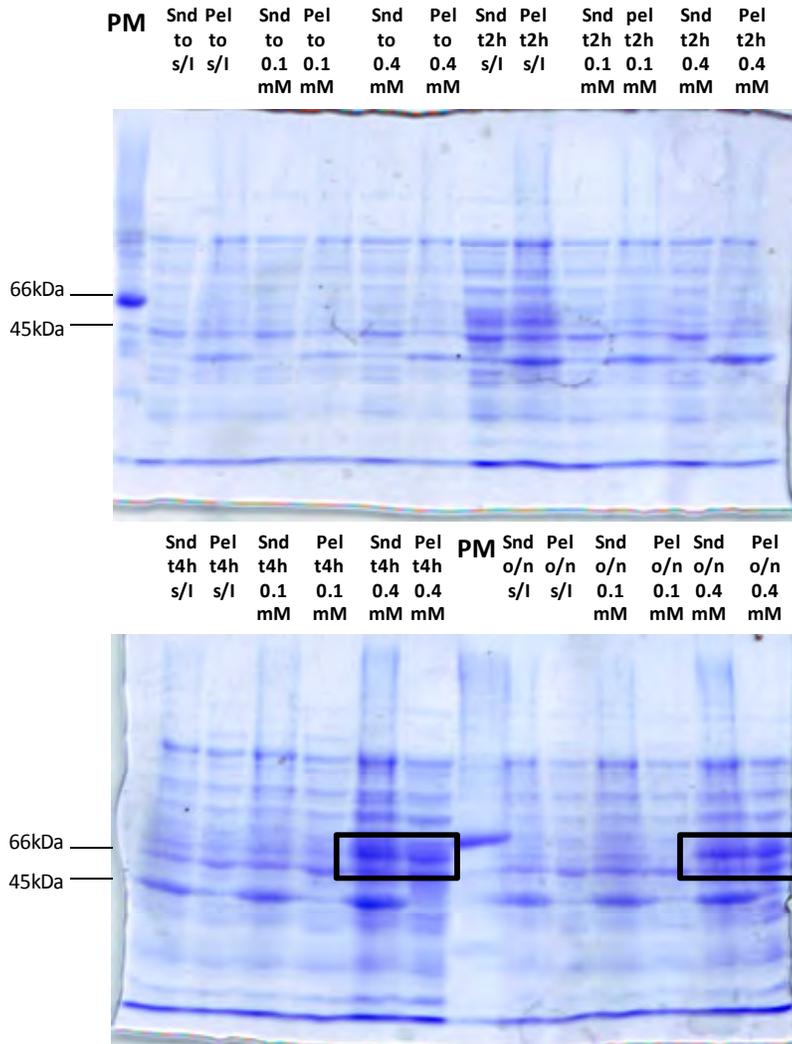
Mediante una búsqueda en las bases de datos de secuencias proteicas no redundantes del NCBI, utilizando Blastx, se determinó que la proteína es una legumaina y pertenece a la familia de peptidasas C13, clan CD. La mayor similitud/identidad de secuencia se observa para proteínas homólogas presentes en otros trematodos: *F. gigantica*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* y especies del género *Schistosoma*.

Un alineamiento de la FhLeg3 con múltiples secuencias aminoacídicas de legumainas pertenecientes a organismos metazoarios, demuestra la presencia de varios motivos altamente conservados (Fig. 26). Las legumainas se caracterizan por tener una díada catalítica conformada por los aminoácidos His/Cys, de posición variable según la especie. Si bien FhLeg3 posee la His en la posición 123 conservada, sufre una sustitución del aminoácido Cys por una Ser en la posición 165 (Fig 26, resaltados en azul). Dicha sustitución podría originar una enzima que posea cambios en la preferencia de sustrato o bien una enzima inactiva. Por otra parte, en concordancia con el resto de las secuencias, FhLeg3 contiene el motivo hidrofóbico FVYF presente delante de la His catalítica, y el motivo N-terminal WAVLAV, también hidrofóbico, que en la legumaina de *H. sapiens* han demostrado estar involucrados en el bloqueo del sitio activo hasta que el péptido N-terminal es removido por autoproteólisis (Chen y cols., 2000).

#### 4.4.2. Expresión de la FhLeg3 recombinante.

Para expresar la proteína recombinante, se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) pLys con la construcción pGS-FhLeg3. La inducción de la proteína recombinante fue realizada con 0.1 mM de IPTG, durante 16 h, a 25 °C, utilizando como control un cultivo sin inducir. El cultivo bacteriano fue centrifugado, el pellet resuspendido y luego sonificado. El lisado bacteriano fue analizado mediante SDS-PAGE en geles NuPAGE Bis-Tris al 10 %. En la Fig. 27 se observa la banda correspondiente al producto FhLeg3-GST que migra a la altura de los 73 kDa y que no se observa en el control sin inducir. Asimismo, se observa una banda que migra a la altura de los 28 kDa, correspondiente a la

GST. Para corroborar que la banda de 73 kDa corresponde a la proteína de fusión se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo anti-etiqueta de His y se observó que la proteína se encontraba presente en la fracción inducida con IPTG, no así en la fracción sin inducir (Fig. 27 a).



*Figura 25 – Análisis por SDS-PAGE de la expresión de FhDPP2r en E. coli BL21 (DE3) – La inducción de la expresión recombinante fue realizada con dos concentraciones de 0.1 y 0.4 mM de IPTG, y se tomaron alícuotas a distintos tiempos de cultivo, tomando como tiempo 0 el agregado de IPTG. El cultivo bacteriano fue centrifugado a 15.000 xg 10 min, el pellet bacteriano resuspendido en 0.1 M de Tris-HCl pH 7.2, y luego sonificado. El lisado bacteriano fue centrifugado a 13.000 xg 10 min. El recuadro indica la banda proteica expresada de peso molecular esperado para la proteína. (PM: peso molecular, Snd: fracción soluble, P, fracción insoluble).*

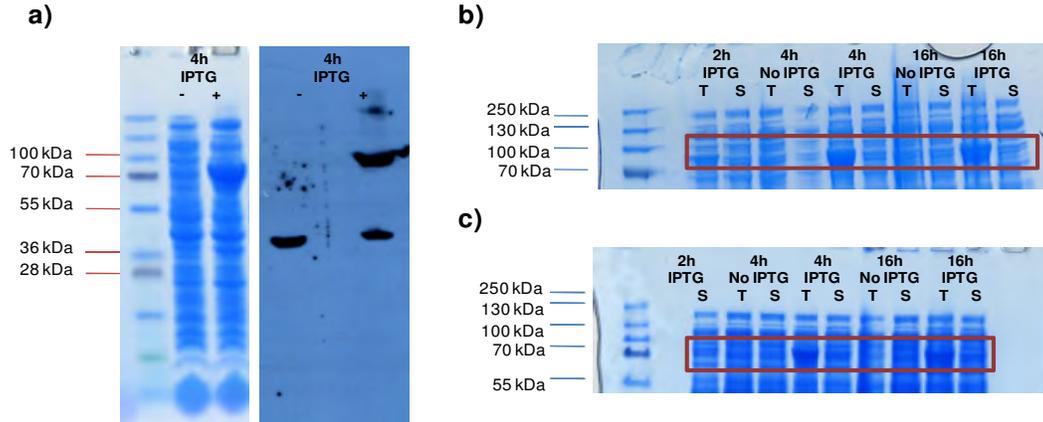


Figura 26 – Alineamiento de FhLeg3 con otros miembros de la familia C13 de peptidasas, clan CD. Se realizó un Blastx (GenBank) para la búsqueda de secuencias. Los residuos idénticos se muestran en gris. En celeste se muestran los residuos que forman la díada catalítica: Cys e His. En rojo se muestran los motivos hidrofóbicos involucrados en el bloqueo al sitio activo. Fgigantica1 ABQ02437S, 2 ABQ02438 (*Fasciola gigantica*), Csinensis GAA42795.2 (*Clonorchis sinensis*), Oviverrini ABD64147 (*Opisthorchis viverrini*), Sjaponicum CAX72774.1 (*Schistosoma japonicum*), Smansoni AAA29895 (*Schistosoma mansoni*), Iricinus AAS942311 (*Ixodes ricinus*), Drerio CAX13485 (*Dario rerio*), Mmusculus NP\_035305 (*Mus musculus*), Rnovergicu AAH877081 (*Rattus norvegicus*), Btaurus AAI11118.1 (*Bos Taurus*), Clupus XP\_537355.2 (*Canis lupus familiaris*), Ptroglydyt XP\_001147732.1 (*Pan troglodytes*), Hsapiens BAA09530.1 (*Homo sapiens*).

#### 4.4.3. Purificación de la proteína recombinante.

##### 4.4.3.1. Purificación de la FhLeg3-GST a partir de los cuerpos de inclusión.

A los efectos de purificarla proteína a partir de los cuerpos de inclusión, se realizó la inducción de la expresión de un cultivo de BL21 (DE3) transformadas con la construcción pGS-FhLeg3 con 0.1 mM de IPTG, durante 16 h a 25 °C. Luego se recolectó el pellet bacteriano por medio de centrifugación a 5000 rpm, 15 min. El pellet fue resuspendido en Tris-HCl 0.1 M conteniendo 1 mg/ml de lisozima y sonicado. Luego la fracción insoluble (P) fue separada de la fracción soluble (S), y se tomaron muestras para analizar por SDS-PAGE al 10 %. Tal como se observa en la Fig. 28 a, la proteína recombinante se encuentra en la fracción insoluble, por lo cual se procedió a la re-solubilización del material realizando una serie de lavados con tampón Tris, seguidos de ciclos de sonicado y centrifugación. El pellet final fue solubilizado con un tampón conteniendo 8 M de urea, mediante agitación a 4 °C, durante 16 h. Luego realizó el re-plegamiento de la proteína en una solución conteniendo 0.1 mg/ml de L-arginina, mediante agitación a 4 °C durante 16 h. Posteriormente se eliminó la L-arginina mediante una extensa diálisis con tampón Tris, con cambios de tampón cada 12 h, y se guardó a 4 °C la fracción conteniendo la proteína recombinante, hasta su posterior uso.

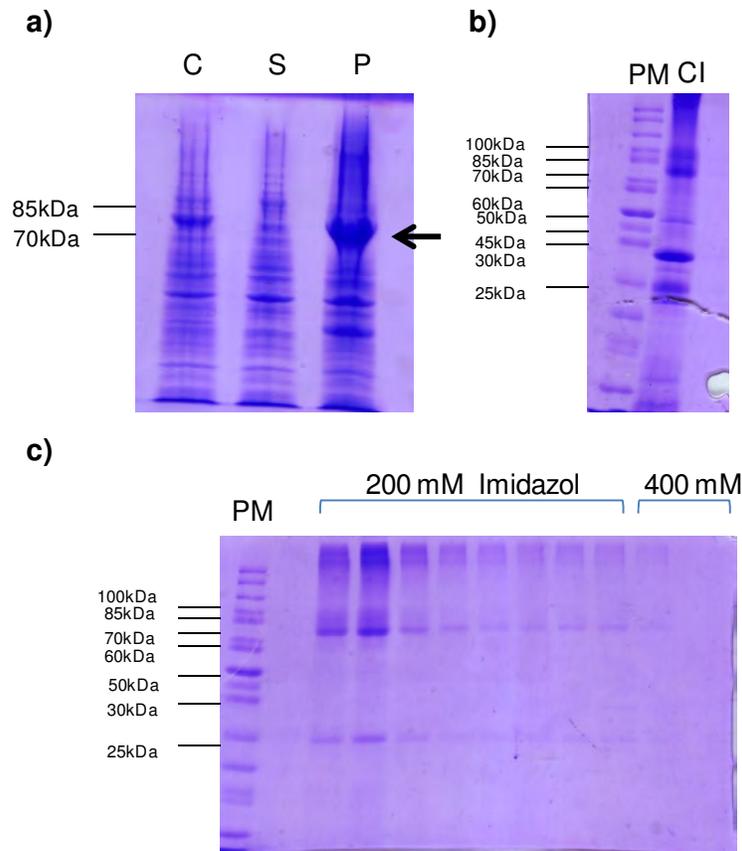


**Figura 27 – Expresión de la FhLeg3-GST – a) Verificación de la expresión:** Extractos celulares totales (T) y fracción soluble libre de células (S) de cultivos inducidos y sin inducir de células BL21 (DE3) pLys transformadas con la construcción FhLeg3-GST. Se tomaron alícuotas de 1 ml a las 4 h de cultivo, se analizaron por SDS-PAGE y western blot utilizando un anticuerpo anti-Histidina monoclonal A6 6-His (Covance). **Cinética de expresión:** Para el análisis de la cinética de expresión, los cultivos se realizaron a 37 °C (b) y 25 °C (c). Se tomaron alícuotas de 1 ml a distintos tiempos, el cultivo bacteriano fue centrifugado, el pellet resuspendido en 0.1 M de Tris-HCl pH 7.2 y luego sonicado. El lisado bacteriano fue centrifugado a 14.000 xg durante 5 min y resuspendido en Tris-HCl. Las muestras fueron analizadas en geles NuPAGE Bis-Tris al 10 %, y los geles teñidos con SimplyBlue SafeStain.

Con la finalidad de obtener la proteína de forma pura, se procedió a su purificación mediante técnicas cromatográficas. Primero se utilizó una columna de Glutación - Sefarosa, que permite purificar la proteína mediante afinidad de la GST por el glutatión. La FhLeg3 se recupera mediante clivaje proteolítico de un sitio para enteroquinasa que posee la construcción. Esta estrategia no resultó adecuada, ya que se obtuvieron bajos niveles de pegado de la proteína a la matriz. A continuación, se decidió purificarla a partir de la etiqueta de histidinas por medio de cromatografía de Ni-agarosa. A estos efectos, se aplicó la muestra (Fig. 28 b) a la columna de Ni-agarosa previamente tratada con cloruro de níquel, y equilibrada en tampón Tris 0.1 M, y luego de extensivos lavados se procedió a la elución de la proteína mediante un gradiente escalonado de imidazol de 50, 200 y 400 mM. Como se observa en la Fig. 28c, la proteína recombinante eluye en el escalón de 200 mM, y las primeras

fracciones del escalón de 400 mM. Luego de la purificación, la proteína fue dializada en tampón Tris 0.1 M para eliminar el imidazol, y concentrada 10 veces el volumen original. Para eliminar la proteína fusionada se procedió a realizar una digestión con enteroquinasa, incubando a 4 °C en agitación, durante 16 h. El rendimiento de la purificación de la proteína resultó ser muy bajo, de aproximadamente 0,9 mg/L de cultivo, con una actividad enzimática específica de 0.1 U/mg, empleando el sustrato fluorogénico Ala-Ala-Asn-AMC.

Variaciones en el protocolo de purificación de los cuerpos de inclusión, ya sea incrementando los tiempos de sonicado, o induciendo el replegamiento luego del pasaje por la columna de Ni-agarosa, si bien llevaron a un aumento en la cantidad de proteína obtenida, lo hicieron a expensas de la actividad enzimática, abolida en todos estos casos.



**Figura 28 – Análisis por SDS-PAGE 10% de la purificación de la FhLeg3-GST por afinidad** – a) La inducción de la expresión de la proteína recombinante fue realizada con 0.1 mM de IPTG, durante 16 h a 25 °C. El cultivo bacteriano fue centrifugado, el pellet resuspendido en 0.1 M de Tris-HCl pH 7.2 y 1 mg/ml de lisozima, y luego sonificado. El lisado bacteriano fue centrifugado a 20.000 xg 30 min. La flecha indica una banda de proteína sobre-expresada de peso molecular esperado para la proteína de fusión FhLeg3-GST. (C: cultivo bacteriano, S: fracción soluble libre de células, P: fracción insoluble). b) La fracción insoluble obtenida (P) fue solubilizada con 8 M de urea. El plegamiento de la proteína se realizó utilizando L-arginina 0.1 g/ml, CI: Pellet solubilizado (cuerpos de inclusión). c) La fracción CI fue aplicada a una columna Ni-NTA. Fracciones eluidas con 200 mM y 400 mM de imidazol. PM: peso molecular (PageRuler, Fermentas)

## 5. Discusión

La degradación de proteínas de la sangre por los estadios juvenil y adulto de *F. hepatica* es un proceso catabólico clave para el establecimiento y mantenimiento de la infección y la transmisión de la enfermedad. La Hb es la mayor fuente primaria de aminoácidos que el parásito utiliza en el anabolismo de proteínas, una gran tarea ya que se producen 30-50.000 huevos/día/parásito (Whitfield, 1979). Si bien se desconoce el mecanismo exacto por el cual ocurre la lisis de eritrocitos, para otros parásitos hematófagos como *A. caninum* (Don y cols., 2007), *N. americanus* (Willis y cols., 2011) y *S. mansoni* (Don y cols., 2008) se han identificado proteínas del tipo amebaporo que se expresan a nivel de la gastrodermis, postulándose su participación en este proceso. En *F. hepatica* se ha identificado una proteína de este tipo, la cual posee actividad citolítica sobre GRs *in vitro* (Espino y cols., 2003). Asimismo, es factible que tal actividad se vea optimizada por la combinación de un ambiente ácido en la luz del intestino, y rápidos movimientos peristálticos de las capas musculares asociadas,

Con el objetivo de contribuir a la dilucidación del rol de las proteasas secretadas por *F. hepatica* en la digestión de las proteínas presentes en la sangre del huésped, se utilizaron una serie de herramientas parasitológicas, bioquímicas y moleculares, definiendo las actividades proteolíticas presentes en los PES de juveniles y adultos, así como el rol de las distintas actividades en la degradación de las principales proteínas presentes en la sangre. Finalmente, se clonaron y expresaron dos nuevas proteasas presentes en *F. hepatica*.

### 5.1. Actividades proteolíticas presentes en las secreciones de parásitos adultos y juveniles de *F. hepatica*.

Tal como ha sido demostrado para el platelminto *S. mansoni*, existe en *F. hepatica* una expresión específica diferencial de proteasas secretadas a nivel digestivo entre el estadio invasor y el gusano adulto (Curwen y cols., 2004, Liu y cols., 2006).

Mediante ensayos de actividad enzimática utilizando una batería de sustratos fluorogénicos, buscamos profundizar en el conocimiento de los perfiles de actividades proteolíticas presentes en las secreciones de gusanos adultos y JRDs. Los PES de ejemplares adultos de *F. hepatica* poseen actividad mayoritaria CatL, como ya ha sido descrito por varios autores (Chapman y Mitchel, 1982, Dalton y Heffernan, 1989, Smith y cols., 1993a, Dowd y cols., 1994). Por medio del uso del inhibidor altamente específico de Catepsina B CA-074 fue posible por primera vez, responsabilizar a esta enzima de una parte menor de la actividad sobre el sustrato Z-Phe-Arg-AMC. Pese a no identificarse una CatB en los estudios de proteómica de PES de adulto (Jefferies y cols., 2001, Robinson y cols., 2008), se han identificado varias ESTs codificantes para proteínas de este tipo mediante la predicción de proteínas secretadas a partir de la base de datos de ESTs de *F. hepatica* adulto disponibles en el Sanger Institute (Robinson y cols., 2009). En este contexto resulta muy interesante el hallazgo de la liberación activa de microvesículas por *F. hepatica* identificadas y purificadas a partir de los PES de adultos (Marcilla y cols., datos no publicados). Dichas microvesículas exhiben las características morfológicas y bioquímicas de los exosomas típicos (Simons y Raposo, 2009). Este hallazgo constituye el primer reporte de la existencia de exosomas funcionales en helmintos parásitos. La mayoría de las proteínas identificadas dentro de los exosomas corresponden a proteasas, dentro de las cuales se encuentra una CatB, varias CatLs, una legumina, y la LAP, entre otras. Si bien los exosomas fueron caracterizados a nivel de tegumento, no podemos descartar que el mismo fenómeno se desarrolle a nivel de la gastrodermis. Es posible que los bajos niveles de actividad enzimática de tipo CatB detectados, tengan su origen en estas microvesículas.

Asimismo en los PES de adultos confirmamos la presencia de actividad DPP sobre los sustratos de DPP tipo II y IV, pero no actividad tipo CatC (DPPI). En varios helmintos hematófagos, una aspártico proteasa, la CatD, juega un rol central en la degradación de proteínas sanguíneas. Pese a esto, no detectamos actividad CatD en los PES de *F. hepatica* empleando un sustrato altamente específico. Sin embargo, existe una amplia gama de sustratos de CatD, de estructura compleja, como los de fluorescencia aplacada de longitud de aminoácidos variable, que han sido empleados por diversos autores en modelos diversos (Wittlin y cols., 1999, Morales y cols., 2008, Suttiyapra y cols., 2009). Es por lo tanto posible que la enzima presente en los PES de adulto no sea detectada por el sustrato utilizado en este trabajo. De todas formas, nuestros resultados coinciden con recientes estudios proteómicos y transcriptómicos en *F. hepatica* que tampoco han identificado una CatD (Robinson y cols., 2009, Young y cols., 2010).

Otra actividad presente en los PES de adulto resultó ser la actividad legumaína, identificada por primera vez desde el punto de vista enzimático. Se ha postulado que esta enzima, que cliva aminoácidos en el C-terminal de un residuo de Asn, tiene rol en la degradación de proteínas sanguíneas dentro del tubo digestivo de *S. mansoni* (Delcroix y cols., 2006). Además, cumpliría un rol en los procesos de activación en *trans* de otras proteasas, como CatB, CatD, CatL y CatF, dado que estas enzimas poseen un residuo de asparagina en la unión entre el pro-segmento y el domino activo (revisado por Dalton y Brindley, 1996). Si bien esta endopeptidasa tampoco ha sido detectada en los estudios de proteómica de PES de adulto, se han identificado transcritos que corresponden a legumaína(s) en el estudio referido más arriba (Robinson y cols., 2009) así como dentro de los exosomas ya mencionados.

En los PES de JRDs se identificaron actividades CatL, CatB, legumaína y DPP tipo II y IV. La actividad CatL se debe por lo menos mayoritariamente a la FhCL3, la única CatL identificada por espectrometría de masa ya que la FhCL4 sólo ha sido identificada a nivel de ARN. A medida que transcurre el tiempo de cultivo se observó un incremento de la actividad Z-Arg-Arg-AMC, no así de la actividad Z-Phe-Arg-AMC, lo que es consistente con el perfil de secreción de estas catepsinas, donde FhCL3 se encuentra mayormente presente en las

primeras etapas del desenquiste de la metacercaria y en JRDs, y se verifica un aumento de la secreción de CatB conforme transcurren los días de desarrollo (Cancela, 2006). La actividad legumaína detectada correspondería a la llamada FhLeg3 detectada por medio de huella peptídica en los PES de JRDs (Cancela, 2006) diferente a la presente en el análisis de ESTs del Sanger Institute de adultos.

En suma, a través del uso de una batería de sustratos sintéticos confirmamos la existencia de diferentes patrones de proteasas presentes en los PES de adultos y JRDs. La principal modificación temporal consiste en un incremento de la actividad CatB con los días de cultivo de los JRDs para luego disminuir significativamente pero al parecer no completamente en los adultos. En este contexto, detectamos por primera vez actividad correspondiente a legumaína y confirmamos actividad DPP con características de DPP II y IV de mamífero ambas presentes en adultos y juveniles. Asimismo nuestro análisis no detectó la presencia de actividades de tipo CatC y CatD.

## **5.2. Capacidad citolítica de JRDs de *F. hepatica* en cultivo.**

Con el objetivo de estudiar la degradación de proteínas presentes en la sangre del huésped por el estadio invasor, realizamos cultivos de JRDs en medio Basch, con el agregado de GRs humanos. Se pudo observar como el agregado de GRs al medio de cultivo aumenta la sobrevivencia del parásito respecto a los parásitos control cultivados sólo en medio Basch. Esto nos permitió alargar el tiempo de viabilidad de los JRDs a 4 semanas. Al mismo tiempo, observamos un aumento significativo en las ramificaciones de los ciegos intestinales conforme pasaban los días de cultivo.

La sobrevivencia y desarrollo somático (pero no reproductor) similar al de los parásitos recuperados en hígado de ratones infectados, al cultivar los JRDs en presencia de GR y 50% de suero de caballo, fue reportada hace más de tres décadas (Davies y Smith, 1978, Smith y Clegg, 1981). En nuestras manos, los intentos de cultivar los JRDs en medio con mayores porcentajes de suero

fallaron debido a que tales concentraciones de suero facilitaron la proliferación bacteriana a partir de las metacercarias desenquistadas en un proceso que no es aséptico.

De acuerdo a nuestros resultados, los JRDs adquieren tempranamente la capacidad de lisar los GRs, proceso que se detectó a partir de las 48 h de incubación, por medio de la aparición de material de color rojo oscuro uniforme con desaparición de la morfología celular dentro del tubo digestivo. Consecuentemente, y a partir de las 72 h de cultivo, se observó además la presencia de gránulos de color rojo intenso, que presumiblemente corresponden a la hemozoína. Esto significa que al 3er día de cultivo el parásito juvenil ha sido capaz de actuar sobre la molécula de Hb, induciendo al menos la desnaturalización de la proteína, que separa el hemo de moléculas de globina (Ponka, 1999). De forma periódica, este material es regurgitado al medio de cultivo evitando su acumulación intraluminal. La eliminación del residuo hemo en forma de hemozoína es un mecanismo exclusivo de los parásitos hematófagos. En metazoarios hematófagos *Schistosoma* (Oliveira y cols., 2000a), y el insecto *Rhodnius prolixus* (Oliveira y cols., 2000b) la acumulación de dicho pigmento se visualiza de forma de acúmulos similares a los observados en este trabajo.

### 5.3. Estudio de la degradación de Alb por los JRDs in vitro

Como forma de determinar el rol de las catepsinas en la degradación de otra proteína abundante en la sangre, incubamos juveniles de 22 días de cultivo con BSA-FITC, previamente incubados con E64, su análogo permeable E64-D, y medio de cultivo como control. Luego de la incubación de 1 h se observó la fluorescencia en todo el intestino bifurcado, la que disminuyó de forma apreciable en presencia del E64-D, no así en presencia de E64. Este llamativo resultado no tiene aún explicación definitiva. A manera de hipótesis es posible postular que existe una interacción facilitada entre el inhibidor permeable y las cisteína proteasas secretadas por los JRDs. Dicha interacción facilitada podría estar vinculada a la presencia de microambientes hidrolíticos en la luz

intestinal. Mediante microscopía electrónica se describió en *S. mansoni* la presencia de microambientes formados por la fusión de proyecciones de las lamelas de las células de la gastrodermis. Aunque son lumbinales, estas áreas poseen un microambiente de pH cercano a 4.0, como lo demostró la producción de sustrato electro-denso con la reacción de la fosfatasa ácida. Los autores han postulado que la mayor parte del proceso digestivo ocurriría en estos microambientes más ácidos donde aspártico o cisteína proteasas podrían localizarse (Delcroix y cols., 2006).

Para *F. hepatica*, estos compartimientos no han sido descritos pero dado que las células de la gastrodermis en los JRDs también presentan gran cantidad de lamelas (Bennet, 1974), se podría suponer la existencia de estos compartimientos donde ocurre la digestión de las proteínas que son ingeridas por el parásito, y donde el inhibidor permeable sería capaz de alcanzar las proteasas blanco. Sin embargo, cabe resaltar que la gastrodermis de *Schistoma* es de naturaleza sincitial, y estudios ultraestructurales han demostrado que funciona primariamente como superficie absorbiva, por lo que la dinámica de los fenotipos secretor y absorbivo es regional, a diferencia de la gastrodermis de *F. hepatica*, donde la naturaleza celular de la misma le permite variaciones en su estructura fina, a tal punto que dos células adyacentes pueden encontrarse en estados fenotípicos diferentes (Halton, 1967).

#### 5.4. Digestión de Hb.

El adulto de *F. hepatica* vacía su contenido intestinal cada 3 horas. Teniendo en cuenta dicha ventana temporal, estudiamos el efecto de la incubación de las CatLs recombinantes mayoritarias en adultos (FhCL1 y FhCL2) y juveniles (FhCL3) sobre la Hb bovina durante 1 h. Las tres endoproteasas son capaces de degradarla en las condiciones del ensayo, siendo FhCL1 la que posee mayor capacidad proteolítica. La observación de un efecto degradativo más intenso inducido por la incubación con los PES de adulto, sumada a la falta de inhibición total producida por la incubación junto con E-64 indican la presencia

de otra actividad hemoglobínica adicional. La participación de varios tipos de proteasas en esta digestión queda en evidencia al usar combinaciones de inhibidores de distintas clases de enzimas. El uso combinado de MG-256, PepA y E-64 induce un bloqueo de la digestión apreciablemente mayor que cuando se emplea el E-64. Llama la atención la marcada disminución de la degradación al incubar los PES con MG-256, lo que pone en duda la selectividad del inhibidor. En efecto, la actividad enzimática de los PES de adulto sobre el sustrato Phe-Arg-AMC se ve inhibida en un 60% (datos no mostrados) en presencia de MG-256.

Dadas las dificultades en la obtención de PES de JRDs en cantidades suficientes para realizar ensayos de digestión en geles, decidimos examinar a nivel molecular la degradación de Hb bovina por FhCL3, proteasa específica de este estadio. Las digestiones fueron analizadas por espectrometría de masa, para identificar los sitios de clivaje sobre la estructura primaria de la molécula de  $\alpha$  y  $\beta$  globina. Dentro de los primeros 10min de reacción, la FhCL3 cliva en 37 sitios de la cadena de  $\alpha$  globina y en 29 sitios de la cadena  $\beta$  globina. Dadas las condiciones del análisis por Maldi-Tof-Tof, donde se obtuvieron espectros de masa de los péptidos generados por encima de los 600 Da, éstos tienen una longitud de 6 a 26 aminoácidos, con un promedio de 10 aminoácidos. Pese a esto, el mapa proteolítico nos sugeriría la generación de péptidos pequeños de hasta 3 aminoácidos.

En cuanto a las preferencias de cada aminoácido en las posiciones P1-P4 del enlace peptídico, observamos que en general la frecuencia de aminoácidos que acomoda en esos sitios corresponden a la abundancia de aminoácidos en la Hb, la cual es rica en aminoácidos hidrofóbicos: Leu, Ala, Val, Lys y Phe. Dichas preferencias coinciden con el perfil de clivaje de FhCL1, y no se asemejan al perfil que tiene la propia enzima sobre otros sustratos como el colágeno (Robinson y cols., 2011).

Comparando los sitios de corte de la FhCL1 y la FhCL3 sobre el modelo tridimensional de la molécula de Hb, observamos que ambas enzimas atacan sitios accesibles en la superficie de la molécula, y existe cierta redundancia en los sitios de corte. Tomados en conjunto, estos datos confirman que la afinidad

de las catepsinas sobre los distintos enlaces peptídicos de una proteína están fuertemente influenciados por la estructura terciaria de la misma.

La degradación *in vitro* de la Hb por FhCL3, presente en los PES de JRDs desde el desenquiste mismo, es consistente con la hemólisis y la generación de hemozoína demostradas en los primeros días de cultivo, En conjunto estos datos apoyan un rol central de FhCL3 en la nutrición temprana del estadio invasor.

En función de nuestros resultados y los de Lowther y cols. (2008), podemos asumir que por sí solas las CatL serían capaces de generar péptidos tan pequeños como tripéptidos. Este conjunto de péptidos pequeños necesita ser subsecuentemente atacado por exopeptidasas como las DPP y aminopeptidasas, de forma de generar aminoácidos libres que puedan ser transportados por la membrana de la gastrodermis. En este contexto, cabe destacar la llamativa ausencia en el transcriptoma de *F. hepatica* y en el genoma de *Schistosoma* del grupo de transportadores universales de dipéptidos, tripéptidos y tetrapéptidos (Daniel y cols., 2006).

### **5.5. La DPP de *F. hepatica*.**

Para caracterizar las actividades DPP presentes en los PES de *F. hepatica* adulto, se realizó una curva de perfil de pH utilizando los sustratos Gly-Pro-AMC y Lys-Ala-AMC, encontrándose el pH óptimo para ambos sustratos entre 5.5. y 6.0. Esto es consistente con lo previamente reportado por Carmona y cols. (1994).

Mediante el uso de una librería combinatoria de dipéptidos fluorogénicos, se determinaron las afinidades de sustrato de los PES de adultos, asumiendo que las actividades detectadas corresponden exclusivamente a DPP, dada la ausencia de actividad exopeptidasa demostrada para las CatL, CatB y legumina. Los aminoácidos preferidos en la posición P1 resultaron ser Pro, nLeu, Met y Leu, y en mucha menor medida Ala, mientras que para la posición P2, resultaron ser nLeu y Met, y en menor medida Leu. De acuerdo con esto,

los dipéptidos con mayor especificidad resultaron ser nLeu-Pro, Met-Pro, nLeu-Leu, Met-Leu, nLeu-nLeu, Met-nLeu. Leiting y cols. (2003), examinaron la especificidad de sustrato de la DPP II y DPP IV humanas utilizando la misma aproximación y sus hallazgos coinciden en cierta medida con el perfil de preferencia de aminoácidos observados por nosotros. En el caso de la DPPII se observa alta afinidad por nLeu y Pro en P1, y nLeu, Lys, Met, Ala en P2, siendo el dipéptido nLeu-nLeu-rhodamine un sustrato altamente selectivo para esta exopeptidasa. La DPPIV posee una preferencia estricta por Pro en la posición P1, y muy baja selectividad en el subsitio P2, aceptando casi todos los residuos.

Con el objetivo de obtener información sobre la secuencia aminoacídica de las actividades DPPs identificadas, se procedió a la purificación cromatográfica de la enzima nativa, partiendo de PES de *F. hepatica* de adulto por medio de un primer paso de gel filtración, y un segundo paso de intercambio iónico. Durante la purificación las fracciones fueron monitoreadas utilizando los sustratos Gly-Pro-AMC y Lys-Ala-AMC, y la pureza de las fracciones analizadas por SDS-PAGE. La fracción obtenida resultó ser inestable, y pese al almacenaje a -80°C, perdió por completo su actividad enzimática luego del segundo paso de purificación. Asimismo, en el análisis por MS de la banda proteica obtenida en la purificación no fueron identificados péptidos correspondientes a una DPP.

Debido a la inestabilidad de la fracción purificada, se decidió abordar el clonado de una probable DPP, la cual denominamos FhDPP2 por la similitud con las DPP tipo II de mamífero, a partir de una secuencia de ESTs adultos de *F. hepatica* accesible en la base de datos del Sanger Institute.

Una vez aislado y secuenciado el ADNc que codifica para esta proteína, se determinó que codifica para una secuencia de 470 aminoácidos, con una masa molecular calculada de 53 kDa y un pI de 5.36, y pertenece a la familia de serina proteasas S28, miembro del clan SC.

La familia S28 de proteasas está conformada por dos miembros: i) una prolil carboxipeptidasa (PRCP), que cliva residuos hidrofóbicos del extremo carboxilo de las proteínas que terminan con un motivo Pro-X (donde X es el aac hidrofóbico), y ii) la dipeptidil peptidasa humana (DPPII, también conocida

como DPP7 y QPP), una exopeptidasa que cliva dipéptidos X-Pro del amino terminal.

La FhDPP2 posee el arreglo de la triada catalítica de aminoácidos en el sitio activo (Ser153, Asp412, His437) clásico de esta familia y otras serina  $\alpha/\beta$  hidrolasas. El arreglo espacial de estos tres aminoácidos en el sitio activo les permite formar puentes de hidrógeno entre ellos y el sustrato, cooperando con la catálisis covalente de la Ser. La enzima es sintetizada con un péptido señal clivable entre los aminoácidos 19 y 20, y posee 5 sitios potenciales de N-glicosilación.

Si bien se han identificado secuencias codificantes para DPP tipo II en otros parásitos hematófagos, este es el primer intento de clonado y expresión de una enzima de este tipo. En *H. contortus* se ha aislado e identificado mediante huella peptídica y LC/MS-MS un antígeno denominado contortina, que posee homología con prolil-carboxipeptidasas pertenecientes a esta familia, y los autores postulan que estaría involucrado en la prevención de la coagulación de la sangre (Geldhof y Knox, 2008). Para *Schistosoma* si bien se han caracterizado y aislado actividades tipo DPP I y DPP III, no se han detectado actividades de tipo DPP II ni IV (Holla-Jamriska y cols., 1999, Holla-Jamriska y cols., 2000). En el análisis de ESTs del Sanger Institute se ha identificado también una prolilcarboxipeptidasa perteneciente a la familia de las S28.

Dado que la FhDPP2 recombinante no pudo ser expresada hasta el momento en forma activa desconocemos su perfil proteolítico. En función del peso molecular de la enzima purificada, que coincide con el previamente reportado, es factible que la actividad Gly-Pro/Lys-Ala presente en los PES no corresponda a la proteína clonada. Sin embargo, está reportado que estas proteínas se ensamblan en dímero o trímeros (Maes y cols., 2007), lo que podría explicar la falta de actividad de la proteína recombinante, que claramente no es capaz de oligomerizarse en las condiciones de expresión..

## 5.6. La legumaína de *F. hepatica*.

Mediante el análisis de una biblioteca de ESTs de JRDs, Cancela y cols. (2010) identificaron una legumaína, cuyo patrón de expresión se restringe a parásitos juveniles de *F. hepatica*. El ADNc de esta proteína, fue sintetizado y clonado en el vector de expresión pGS21a. Dicho ADNc codifica para una enzima de 362 aminoácidos, con una masa molecular calculada de 41,8 kDa, y un pI de 5,5. La proteína fue expresada en células *E. coli* BL21(DE3) y fue purificada a partir de los cuerpos de inclusión. Dicha estrategia resultó en magras cantidades de proteína activa sobre el sustrato peptídico específico.

Las legumaínas son cisteína proteasas del clan CD, familia C13, que hidrolizan péptidos y proteínas del extremo carboxilo de residuos de asparagina. A menudo se localizan en los lisosomas de diversos tipos celulares y se involucran en una variedad de funciones de procesamiento, incluyendo el procesamiento en trans de otras proteínas (Chen y cols., 2000).

El análisis de un alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de esta proteína con otras legumaínas de organismos metazoarios, demostró la presencia de varios motivos altamente conservados, con la excepción de uno de los aminoácidos de la díada catalítica, que sufre en FhLeg3 una sustitución de Cys por una Ser en la posición 165. Dicha sustitución podría originar una enzima no funcional o con especificidad de sustrato modificada respecto al resto de los miembros de su familia. También se observaron motivos hidrofóbicos involucrados en una estructura que bloquea el sitio activo y que son removidos durante el autoprocesamiento. En *S. mansoni* existe una legumaína descrita, denominada *SmAE*, inicialmente fue descrita como una hemoglobinasas, para luego demostrarse que no poseía actividad hemoglobinolítica, y que era en realidad un miembro de la familia de las legumaínas, proponiéndose su participación en la trans-activación de otras proteasas en el intestino. Subsecuentemente, Sajid y cols. (2003), demostraron que *SmAE* era responsable del procesamiento de la CatB llamada SmCB1, en el intestino del parásito. Utilizando inhibidores de diferentes clases de proteasas e interferencia de ARN, se encontró que si bien la SmAE no tiene efectos sobre la degradación de Hb, muestra cierto papel en la digestión de

albúmina. Los autores sugieren que su contribución podría ser en el procesamiento en trans de las hemoglobinasas, o la generación de clivajes raros (en residuos Asn) dentro de la albúmina, por lo tanto facilitando la subsecuente digestión por otras proteasas. Recientemente se ha demostrado que cuando se realiza ARNi de SmAE se detecta SmCB1 activa y soluble en los extractos de parásito, por lo que se ha postulado que SmAE no sería esencial para la activación de la SmCB1 in vivo (Krautz-Peterson y Skelly, 2008).

Dos legumaínas fueron reportadas en *F. gigantica*, y como el ortólogo en *S. mansoni*, ambas se expresan en el epitelio intestinal, pero no han sido detectadas en los PES de los parásitos adultos. Mediante la comparación de sitios de clivajes conocidos para otras legumaínas, los autores determinaron que la región C-terminal un péptido con al menos 4 residuos de Cys conservados debe ser removido para que la enzima se vuelva activa. En el caso de FhLeg3, la capacidad de remover esta región C terminal que estaría truncada por la sustitución que se da en la díada catalítica, llevaría a la generación de una proteína sin actividad enzimática.

Sin embargo, en este trabajo se demuestra que la enzima posee, aunque en bajos niveles, actividad proteolítica detectable contra el péptido Z-Ala-Ala-Asn-AMC. De forma de determinar si la enzima posee una actividad enzimática diferente a la descrita para otras proteínas de la misma familia, y a la presente en los PES de juveniles, sería necesario el clonado de la enzima en un sistema de expresión que genere mejores rendimientos de expresión y purificación, tal como los sistemas de expresión en levaduras (*P. pastoris*, *H. polymorpha*) que han permitido la exitosa producción de las catepsinas L recombinantes de *F. hepatica* en forma funcional.

## 6. Conclusiones y Perspectivas.

Nuestro plan experimental centrado en las proteasas digestivas de *F. hepatica* empleó diversas herramientas con la finalidad de contribuir a dilucidar diferentes aspectos de su actuación sobre proteínas del hospedero mamífero, en particular las sanguíneas.

Con respecto al catálogo de las actividades proteolíticas participantes en los PES, nuestros resultados confirman la presencia predominante de las cisteína proteasas en los mismos. En los adultos detectamos altos niveles de actividad CatL, y posiblemente bajos niveles de CatB, y en los juveniles una combinación de ambas actividades. Por otro lado resultó demostrada por primera vez la presencia, en ambos estadios, de actividad legumina, otra cisteína proteasa pero de perfil hidrolítico más restringido. Respecto a actividades producidas por exopeptidasas confirmamos la existencia de actividad sobre dos substratos de DPP que corresponden a una misma peptidasa presente en ambos estadios. Asimismo, como contribución al tema, descartamos la existencia de una exopeptidasa (CatC) y una endopeptidasa (CatD),

Asumiendo el origen digestivo de estas actividades, surge en *F. hepatica* un patrón que muestra similitudes y diferencias respecto al descrito para *S. mansoni*, el modelo evolutivamente más cercano estudiado hasta el momento. Las principales diferencias corresponden a la ausencia de una aspártico proteasa de tipo CatD y una cisteína proteasa de tipo CatC. Es postulable que estas diferencias estén relacionadas con los diferentes ciclos biológicos involucrados. Si bien ambos parásitos son hematófagos, tanto el tejido blanco de la invasión como el periplo migratorio y la localización final del gusano adulto son completamente diferentes. En este sentido, la localización intravascular de los Esquistosomas desde las primeras horas de la invasión, los coloca en un microambiente completamente diferente al del resto de los trematodos de la clase Digenea. Disponemos de información fragmentaria

sobre especies cercanas a *F. hepatica* como *F. gigantica*, *C. sinensis*, y *O. viverrini*, insuficiente para poder confirmar que se trata de patrones asociados a caminos evolutivos diferentes. Si bien es posible que contemos en el corto plazo con transcriptomas de estos gusanos disponibles para su estudio, es necesario que este análisis se complete con el abordaje proteómico y enzimológico para poder dilucidar el panorama de la proteólisis digestiva en este grupo de trematodos.

Mediante el cultivo a largo plazo de JRDs en presencia de GRs determinamos efectos en ambos miembros del par GR-parásito. Sobre los GRs observamos la adquisición temprana de la capacidad citolítica, y de desnaturalización de la Hb con liberación del grupo hemo, el cual cristaliza a una forma no tóxica, denominada hemozoína. Sobre el parásito, la presencia de los GRs en el cultivo, induce el proceso de ramificación de los ciegos intestinales asociado con la maduración del mismo, así como el aumento de la sobrevida. En conjunto, estos resultados demuestran que las formas juveniles tempranas que se encuentran migrando en el peritoneo e iniciando su travesía intrahepática son capaces de procesar la Hb y posiblemente otras proteínas sanguíneas en forma nutricionalmente efectiva, lo que explicaría el efecto sobre la sobrevida y la maduración intestinal observada. Sin embargo, la Hb no sería fuente relevante de aminoácidos en los primeros momentos post desenquiste cuando ese lugar lo ocuparían proteínas de la matriz extracelular como colágeno y fibronectina. Es factible entonces que la presencia de patrones estadio específico sea una consecuencia de una adaptación evolutiva a los diferentes conjuntos de proteínas del hospedero disponibles durante la migración y maduración del parásito. A los efectos de avanzar en el estudio del ataque a los GRs se impone demostrar la presencia de la Saposina en las secreciones digestivas de los JRDs, determinar su cinética de secreción, y estudiar el efecto de su silenciamiento sobre este proceso. Para comenzar a transitar este estudio contamos con anticuerpos policlonales anti-Saposina de *F. hepatica* gentilmente cedidos por la Dra. Ana Espino lo que permitirá realizar estudios de inmunolocalización en cortes de juveniles de distintos tiempos de cultivo así como estudios de inmunomarcaje en los PES de JRDs.

Adicionalmente estudiamos en los JRDs el rol de las cisteína proteasas en la degradación intestinal de la Alb marcada con FITC, que resultó inesperadamente bloqueada únicamente por el análogo permeable del inhibidor específico irreversible de estas proteasas., Si bien no podemos explicar satisfactoriamente este resultado, hemos sugerido la posible existencia de compartimientos digestivos intraluminales como los descritos para *S. mansoni* (Delcroix y cols., 2006). De forma de avanzar en la confirmación de esta hipótesis, nos proponemos realizar estudios de microscopía electrónica en conjunto con el tratamiento con fosfatasa ácida, que produce un sustrato electro denso en ambiente de pH ácido, permitiendo así evidenciar la existencia de microregiones con pH diferencial al resto de lumen intestinal. Asimismo sería importante emplear albúmina acoplada a otros fluorocromos como rodamida o DQ-red (de fluorescencia aplacada), para descartar un efecto dependiente del FITC.

Las CatLs secretadas a lo largo del ciclo de vida de *F. hepatica* en el huésped definitivo, tienen el potencial de degradar la Hb bovina. En particular este ataque se visualiza electroforéticamente a nivel del monómero. En el caso del adulto, la degradación de la Hb por los PES no resultó totalmente abolida en presencia de E64, lo que sugiere que existe una actividad hemoglobinolítica adicional, lo que corroboramos utilizando combinaciones de inhibidores de distintas clases de proteasas: E64, PepA, MG-256. Puesto que éste último parece tener un efecto inhibitorio sobre las CatL, nos proponemos utilizar otro análogo más específico, como el Aza-N-11-a (Ekici y cols., 2004), en pos de determinar la real contribución de la legumina en el proceso.

Para determinar la contribución a la degradación de Hb por la proteasa tipo CatL mayoritaria en los PES de JRDs, realizamos el análisis por LC ESI MS/MS y Maldi-Tof/Tof de la digestión de esta proteína por la FhCL3 recombinante. La frecuencia de aminoácidos que la enzima acomoda en las posiciones P1-P4, correspondieron en general a la abundancia de aminoácidos en la molécula de Hb, rica en residuos hidrofóbicos como Leu, Ala, Val y Lys. El patrón proteolítico coincide con el de la FhCL1 sobre la Hb humana (Lowther y

cols., 2008), sugiriendo que la afinidad de las CatLs sobre los distintos enlaces proteolíticos se encuentra fuertemente influenciada por la estructura de la proteína. Asimismo, a partir del mapa de clivajes proteolíticos podemos asumir que las CatL generan péptidos pequeños como tripéptidos. A pesar de esto, dado que en el análisis realizado se obtuvieron espectros de masa generados por encima de los 600 Da, restaría realizar el experimento en la franja de 100 a 600 Da del espectro, de forma de corroborar la generación de pequeños péptidos y aminoácidos libres.

Con el objetivo de caracterizar las actividades de tipo DPPs presentes en los PES de adulto, se determinaron los perfiles de preferencia de sustrato utilizando una librería de dipéptidos combinatorios. Dichas preferencias coinciden con las de la DPP II y en menor grado con las de DPP IV de humano, con alta afinidad por nLeu y Pro en la posición P1, y nLeu y Met en la posición P2. A partir de estos resultados sería posible diseñar péptidos fluorogénicos para confirmar dichas preferencias.

Si bien se aisló y purificó la proteína responsable de las actividades DPP II y IV identificadas en los PES de adulto, la misma resultó ser inestable, lo que no permitió su identificación por espectrometría de masa. Como alternativa, a partir de una base de datos de transcritos del adulto de *F. hepatica*, se aisló y clonó el ADNc codificante de una DPP2, que fue expresada en *E. coli*, no resultando activa. De forma de completar la caracterización de la proteína recombinante nos proponemos realizar el clonado y expresión en levaduras. Esto permitirá estudiar en detalle su perfil enzimológico así como determinar si se trata de la misma enzima cuya actividad se detecta en los PES de juveniles y adultos. En tal caso resultará de particular interés estudiar el efecto de un panel de inhibidores específicos de clase y grupo ya que hasta el momento no se ha encontrado ninguno capaz de inhibir el efecto sobre los sustratos sintéticos en más de 63% (Carmona y cols., 1994). La identificación de inhibidores específicos no citotóxicos permitiría abordar la contribución de la DPP en el proceso degradativo.

Finalmente, se expresó en *E. coli* y purificó una legumaina presente en los PES de juveniles, que posee una sustitución uno de los aminoácidos de la díada

catalítica, y presenta muy bajos niveles de actividad con el sustrato estándar empleado. Será necesario clonar la peptidasa en un sistema como el de levaduras que ofrezca la posibilidad de obtener mejores rendimientos. .

Asimismo, contamos con una biblioteca de inhibidores de legumainas, cedido por el Dr. Conor Caffrey, que permitiría determinar el perfil de inhibición de la FhLeg3, y compararlo con los perfiles de enzimas caracterizadas, como las legumainas de *S. mansoni* e *I. ricinus* (Ovat y cols., 2009). Adicionalmente, el contar con mayores cantidades de enzima nos permitirá generar anticuerpos policlonales para realizar estudios de inmunolocalización, así como definir mejor su contribución a la activación de proteasas tipo catepsina y la digestión de proteínas sanguíneas.

## 7. Bibliografía.

- » Acosta, D. 1994. *Epidemiología y control de Fasciola hepatica en el Uruguay*. En: enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Nari, A. y C. Fiel, 233-256. (Ed) Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay,
- » Acosta, D., Goñi, F., Carmona, C. 1998. *Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from Fasciola hepatica*. Journal of Parasitology, 84:1-7.
- » Acosta, D., Cancela, M., Piacenza, L., Roche, L., Carmona, C., Tort J.F. 2008. *Fasciola hepatica leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis*. Molecular Biochemical Parasitology, 158: 52-64.
- » Alcalá-Canto, Y., Ibarra-Velarde, F., Sumano-Lopez, H., Gracia-Mora, J., Alberti-Navarro, A. 2006. *Dose-response inhibition of proteolytic activity by a cysteine protease inhibitor in a murine model of fasciolosis*. Parasitology Research, 98: 438–442.
- » Andrews, S. 1999. *The life cycle of Fasciola hepatica*. En: Fasciolosis. J.P.Dalton, 1-20. Ed CAB International, Wallingford, UK.
- » Barrett, A., Rawlings, N., Woessner, J. 2004. *Handbook of proteolytic enzymes*, 2nd Ed., Academic Press, London.
- » Basch, P. 1981. *Cultivation of Schistosoma in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing*. Journal of Parasitology, 67: 179-185.
- » Beckham, S., Piedrafita, D., Phillips, C., Samarawickremaa, N., Law, R., Smooker, P., Quinsey, N., Irving, J., Greenwood, D., Verhelst, S., Bogyo, M., Turk, B., Coetzer, T., Wijeyewickrema, L., Spithill, T., Pikea, R. 2009. *A major cathepsin B protease from the liver fluke Fasciola*

- hepatica* has atypical active site features and a potential role in the digestive tract of newly excysted juvenile parasites. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41: 1601-1612.
- » Bennett, C.E. 1974. *Fasciola hepatica: development of the caecal epithelium during migration in the mouse*. *Experimental Parasitology*, 37: 426–441.
  - » Berasain, P., Goni, F., McGonigle, S., Dowd, A., Dalton, J., Frangione, B., Carmona, C. 1997. *Proteinases secreted by Fasciola hepatica degrade extracellular matrix and basement membrane components*. *Journal of Parasitology*, 83:1-5.
  - » Berasain, P., Carmona, C., McGonigle, S., Dowd, A., Frangione, B., Dalton, J., Goñi, F. 2000. *Interaction of Fasciola hepatica proteases with human IgG subclasses. Basis of parasite subversion of the humoral immune response*. *Experimental Parasitology*, 94: 99-110.
  - » Bird, R., Jackson, D. 1959. *A technique for electrophoresis in agar gel*. *Journal of Clinical Pathology*, 12: 373-374.
  - » Bogitsh, B.J., Kirschner, K.F., y Rotmans J. P. 1992. *Schistosoma japonicum: immunoinhibitory studies on hemoglobin digestion using heterologous antiserum to bovine cathepsin D*. *Journal of Parasitology*, 78: 454–459.
  - » Boldbaatar D, Sikalizyo Sikasunge C, Battsetseg B, Xuan X, Fujisaki K. 2006. *Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochemical Molecular Biology*, 36: 25-36.
  - » Brennan, G., Fairweather, I., Trudgett, A., Hoey, E., McCoy, McConville, M., Meaney, M., Robinson, M., McFerran, N., Ryan, L., Lanusse, C, Mottier, L., Alvarez, L., Solana, H., Virkel, G., Brophy, P. 2007. *Understanding triclabendazole resistance*. *Experimental Molecular Pathology*, 82: 104-109.
  - » Caffrey, C., Mathieu, M., Gaffney, AM, Salter JP, Sajid M, Lucas KD, Franklin C, Bogyo M, McKerrow JH. 2000. *Identification of a cDNA encoding an active asparaginyl endopeptidase of Schistosoma mansoni and its expression in Pichia pastoris*. *FEBS Letters*, 466: 244–248.

- » Cancela, M. 2006. *Análisis de la expresión diferencial de cisteína proteasas entre formas juveniles y adultas de Fasciola hepatica*. Tesis de Maestría, Pedeciba Biología, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- » Cancela, M., Acosta, D., Rinaldi, G., Silva, E., Durán, R., Roche, L., Zaha, A., Carmona, C., Tort, J. 2008. *A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive Fasciola hepatica*. *Biochimie*, 90: 1461-1475.
- » Cancela, M., Ruétalo, N., Dell'Oca, N., da Silva, E., Smircich, P., Rinaldi, G., Roche, L., Carmona, C., Alvarez-Valín, F., Zaha, A., Tort, J. 2010. *Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the trematode Fasciola hepatica*. *BMC genomics*, 11: 227-241.
- » Carmona, C., Dowd, A., Smith, A., Dalton, J. 1993. *Cathepsin L proteinase secreted by Fasciola hepatica in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 62: 9-17.
- » Carmona C., McGonigle S., Dowd A. J., Smith A. M., Coughlan S., McGowran E., Dalton J. P. 1994. *A novel dipeptidylpeptidase secreted by Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 109: 113-118.
- » Chapman, C., Mitchell, C. 1982. *Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 11: 165-178.
- » Chen, J., Fortunato, M., Barrett A. 2000. *Activation of human prolegumain by cleavage at a C-terminal asparagine residue*. *Biochemical Journal*, 352: 327-334
- » Choe, Y., Leonetti, F., Greenbaum, D., Lecaille, F., Bogyo, M., Brömme, D., Ellman, J., Craik, C. 2006. *Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities*. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 12824-12832.
- » Corvo, I., Cancela, M., Cappetta, M., Pi-Denis, N., Tort, J., Roche, L. 2009. *The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile Fasciola hepatica prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167: 41-47.

- » Curwen, R., Ashton, P., Johnston, D., Wilson, R. 2004. *The Schistosoma mansoni soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages*. Molecular and Biochemical Parasitology, 138: 57-66.
- » Dalal, S., Klemba, M. 2007. *Roles for two aminopeptidases in vacuolar hemoglobin catabolism in Plasmodium falciparum*. Journal of Biological Chemistry, 282: 35978–35987.
- » Dalton, J., Heffernan, M. 1989. *Thiol proteases released in vitro by Fasciola hepatica*. Molecular and Biochemical Parasitology, 35: 61-166.
- » Dalton, J., Dowd, A., Carmona, C. 1994. *The Cathepsin L Proteinases Secreted by the Parasite Trematode Fasciola hepatica*. En: Biology of Parasitism, Erlich, R, y Nieto A., 1-15. Ed Trilce, Montevideo, Uruguay.
- » Dalton, J., McGonigle, S., Rolph, T. P., Andrews, S. 1996. *Induction of protective immunity in cattle against infection with Fasciola hepatica by vaccination with cathepsin L Proteinases and with hemoglobin*. Infection and Immunity, 64: 5066-5074.
- » Dalton, J., Neill, S. O., Stack, C., Collins, P., Walshe, A., Sekiya, M., Doyle, S., Mulcahy, G., Hoyle, D., Khaznadji, E., Moiré, N., Brennan, G., Mousley, A., Kreshchenko, N., Maule, A. G., Donnelly, S. M. 2003. *Fasciola hepatica cathepsin L –like proteases: biology, function, and potential in the development of the first generation liver fluke vaccines*. International Journal of Parasitology, 33: 1173-1181.
- » Dalton J.P., Skelly, P., Halton, D. W. 2004. *Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths*. Canadian Journal of Zoology, 82: 211-232.
- » Dalton, J., Caffrey, C.R., Sajid, M., Stack C., Donnelly, S., Loukas, A., Don, T., McKerrow, J., Halton, D.W., Brindley, P.J. 2006. *Proteases in trematode biology*. Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology. Ed. Maule, A.G., Marks, N.J., CABI, UK, 18: 348-368.
- » Dalton, J., Brindley, P., Donnelly, S., Robinson, M. 2009. *The enigmatic asparaginyl endopeptidase of helminth parasites*. Trends in Parasitology, 25: 59-61.

- » Daniel, H., Spanier, B., Kottra, G., Weitz, D. 2006. *From Bacteria to Man: Archaic Proton-Dependent Peptide Transporters at Work*. *Physiology*, 21:93-102
- » Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C., Lim, K., Dvořák, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C., McKerrow, J. 2006. *A Multienzyme Network Functions in Intestinal Protein Digestion by a Platyhelminth Parasite*. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 39316-39329.
- » Don, T., Jones, M., Smyth, D., O'Donoghue A., Hotez, P. 2004. *A pore-forming haemolysin from the hookworm, Ancylostoma caninum*. *International Journal of Parasitology*, 34: 1029-1035.
- » Don, T. A., Oksov, Y., Lustingman, S., Loukas, A. 2007. *Saposin-like proteins from the intestine of the blood feeding hookworm, Ancylostoma caninum*. *Parasitology*, 134: 427-436.
- » Don, T., Bethony, J., Loukas A. 2008. *Saposin-like proteins are expressed in the gastrodermis of Schistosoma mansoni and are immunogenic in natural infections*. *International Journal of Infectious Diseases*, 12: 39-47.
- » Dowd A. J., Smith A. M., McGonigle, S., Dalton, J. 1994. *Purification and characterization of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode Fasciola hepatica*. *FEBS*, 223: 91-98.
- » Dowd, A., McGonigle, S., Dalton, J. 1995. *Fasciola hepatica cathepsin L proteinase cleaves fibrinogen and produces a novel type of fibrin clot*. *European Journal of Biochemistry*, 232: 241-246.
- » Ekici, O., Gotz, M., James, K., Li, Z., Rukamp, B., Asgian, J., Caffrey, C., Hansell, E., Dvorak, J., McKerrow, J., Potempa, J., Travis, J., Mikolajczyk, J., Salvesen, G., Powers J. 2004. *Aza-peptide Michael acceptors: a new class of inhibitors specific for caspases and other clan CD cysteine proteases*. *Journal of Medical Chemistry*, 47: 1889–1892.
- » Espino, A.M., Hillyer G.V. 2003. *Molecular cloning of a member of the Fasciola hepatica saposin-like protein family*. *Journal of Parasitology*, 89: 545-552.

- » Fairweather, I., Threadgold, L., Hanna, R. 1999. *Development of Fasciola hepatica in the mammalian host*. En: Fasciolosis, Dalton, J., 47-111. Ed. CAB International, Wallingford, UK.
- » Geldhof, P., Knox, D. 2008. *The intestinal contortin structure in Haemonchus contortus: an immobilized anticoagulant?*. International Journal of Parasitology, 38: 1579-1588.
- » González, L., Esteban, J., Bargues, M., Valero, M., Ortiz, P., Náquira, C., Mas-Coma, S. 2011. *Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: an altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru*. Acta Tropical, 120: 119-129.
- » Halton, D. 1967. *Observations on the nutrition of digenetic trematodes*. Parasitology, 57: 639-660.
- » Hara-Nishimura, I., Inoue, K., Nishimura, M. 1991. *A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature forms*. FEBS Letters, 294: 89-93.
- » Harmsen, M., Cornelissen, J., Buijs, H., Boersma, W., Jeurissen, S., van Milligen, F. 2004. *Identification of a novel Fasciola hepatica cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide*. International Journal of Parasitology, 34: 675-682.
- » Heussler, V. T., y Dobbelaere, D. A. E. 1994. *Cloning of a protease gene family of Fasciola hepatica by the polymerase chain reaction*. Molecular and Biochemical Parasitology, 64:11-23.
- » Hola-Jamriska, L., Dalton, J., Aaskov, J., Brindley P. 1999. *Dipeptidyl peptidase I and III activities of adult schistosomes*. Parasitology, 118: 275-282.
- » Hola-Jamriska, L., King, L., Dalton J., Mann, V., Aaskov, J., Brindley, P. 2000. *Functional expression of dipeptidyl peptidase I (Cathepsin C) of the oriental blood fluke Schistosoma japonicum in Trichoplusia ni insect cells*. Protein Expression and Purification, 19: 384-392.
- » Howell, M. 1966. *Collagenase activity of immature Fasciola hepatica*. Nature, 209: 713-174.

- » Irving, J., Spithill, T., Pike, R., Whisstock, J., Smooker, P. 2003. *The evolution of enzyme specificity in Fasciola spp.* Journal of Molecular Evolution 57: 1–15.
- » Klemba, M., Goldberg, D. 2002. *Biological roles of proteases in parasitic protozoa.* Annual Reviews in Biochemistry, 71: 275-305.
- » Klemba, M., Gluzman, I., Goldberg, D. 2004. *A Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase I participates in vacuolar hemoglobin degradation.* Journal of Biological Chemistry, 279: 43000-43007.
- » Koxarich, J. 2010. *S28 peptidases: lessons from a seemingly 'dysfunctional' family of two.* BMC Biology, 8: 87-90.
- » Krautz-Peterson, G., Skelly, P. 2008. *Schistosome asparaginyl endopeptidase (legumain) is not essential for cathepsin B1 activation in vivo.* Molecular and Biochemical Parasitology, 159: 54-58.
- » Laemmli, U. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 227: 680-685.
- » Law, R., Smooker, P., Irving, J., Piedrafita, D., Ponting, R., Kennedy, N., Whisstock, J., Pike, R., Spithill, T. 2003. *Cloning and Expression of the Major Secreted Cathepsin B-like Protein from Juvenile Fasciola hepatica and Analysis of Immunogenicity following Liver Fluke Infection.* Infection and Immunity, 71: 6921-6932.
- » Leippe, M., Tannich, E., Nickel, R., Van der Goot, G., Pattus, F., Horstmann, RD., Müller-Eberhard, H. 1992. *Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic Entamoeba histolytica.* EMBO Journals, 11: 3501-3506.
- » Leiting, B., Pryor, K., Wu, J., Marsilio, F., Patel, R., Craik, C., Ellman, J., Cummings, R., Thornberry, N. 2003. *Catalytic properties and inhibition of proline-specific dipeptidyl peptidases II, IV and VII.* Biochemical Journal, 371: 525-532.
- » Li, D., Matthews, S., Antoniou, A., Mazzeo, D., Watts, C. 2003. *Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo.* Journal of Biological Chemistry, 278: 38980–38990.
- » Liu, F., Lu, J., Hu, W., Wang, S., Cui, S., Chi, M., Yan, Q., Wang, X., Song, H., Xu, X., Wang, J., Zhang, X., Zhang, X., Wang, Z., Xue,

- C., Brindley, P., McManus, D., Yang, P., Feng, Z., Chen, Z., Han, Z. 2006. *New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of Schistosoma japonicum*. Plos Pathogens, 2: e29.
- » Lowther, J., Robinson, M., Donnelly, S., Xu, W., Stack, C., Matthews, J., Dalton, J. 2008. *The importance of pH in regulating the function of the Fasciola hepatica cathepsin L1 cysteine protease*. Plos Neglected Tropical Diseases, 3: 369-380.
- » Maes, M., Scharpé, S., De Meester, I. 2007. *Dipeptidyl peptidase II (DPPII), a review*. Clinica Chimica Acta, 380: 31-49.
- » Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basika, T., Gayo, V., Rosadilla, D., Roche, L., Tort, J., Carmona C. 2011. *The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against Fasciola hepatica infection in sheep*. Vaccine, 29: 9057-9063.
- » Mas-Coma, S., Esteban, J., Bargues, M. 1999. *Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification*. Bulletin of the World Health Organization, 77: 340- 346.
- » Mas-Coma, S., Bargues, M., Valero, M. 2005. *Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses*. International Journal of Parasitology, 35: 1255-1278.
- » McCarthy, E., Stack, C., Donnelly, S. M., Doyle, S., Mann, V. H., Brindley, P. J., Stewart, M., Day, T. A., Maule, A. G., and Dalton, J. (2004) *Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, Schistosoma mansoni and Schistosoma japonicum*. International Journal of Parasitology, 34: 703-714.
- » McGonigle, L., Mousley, A., Marks, N., Brennan, G., Dalton, J., Spithill, T., Day, T., Maule, A. 2008. *The silencing of cysteine proteases in Fasciola hepatica newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration*. International Journal of Parasitology, 38: 149-55.

- » Merrill, C., Dunau, M., Goldman, D. 1981. *A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels*. Analytical Biochemistry, 110: 201-207.
- » Mitchell, G., Maris, L., Bonniwell, M. 1998. *Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep*. The Veterinary Records, 143: 399.
- » Morales, M., Rinaldi, G., Gobert, G., Kines, K., Tort, J., Brindley, P. 2008. *RNA interference of Schistosoma cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade*. Molecular and Biochemical Parasitology, 157: 160-168.
- » Murata, M., Miyashita, S., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., Hatayama, K., Towatari, T., Nikawa, T., Katunuma, N. 1991. *Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, in vitro*. FEBS Letters, 25: 307–310.
- » Oliveira, M., d'Avila, J., Torres, C., Oliveira, P., Tempone, A., Rumjanek, F., Braga, C., Silva, J., Petretski, M., Oliveira, M., Souza, W., Ferreira, S. 2000a. *Haemozoin in Schistosoma mansoni*. Molecular and Biochemical Parasitology, 111: 217–221.
- » Oliveira, M., Silva, J., Dansa-Petretski, M., de Souza, W., Braga, C., Masuda, H., Oliveira, P. 2000. *Haemozoin formation in the midgut of the blood sucking insect Rhodnius prolixus*. FEBS Letters, 477: 95–98.
- » Ovat, A., Muindi, F., Fagan C., Brouner, M., Hansell, E., Dvorák, J., Sojka, D., Kopáček, P., McKerrow, J., Caffrey C., Powers J. 2009. *Aza-peptidyl Michael acceptor and epoxide inhibitors - potent and selective inhibitors of Schistosoma mansoni and Ixodes ricinus legumains (asparaginy l endopeptidases)*. Journal of Medical Chemistry, 52:7192-71210.
- » Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjlan, I., Dalton. J. P., Carmona, C. 1999. *Vaccination with Cathepsin L Proteinases and with Leucine Aminopeptidase Induces High Levels of Protection against Fascioliasis in Sheep*. Infection and Immunity, 67: 1954-1961.
- » Ponka, P. 1999. *Cell Biology of Heme*. American Journal of Medicine Sciences, 318: 241-256.

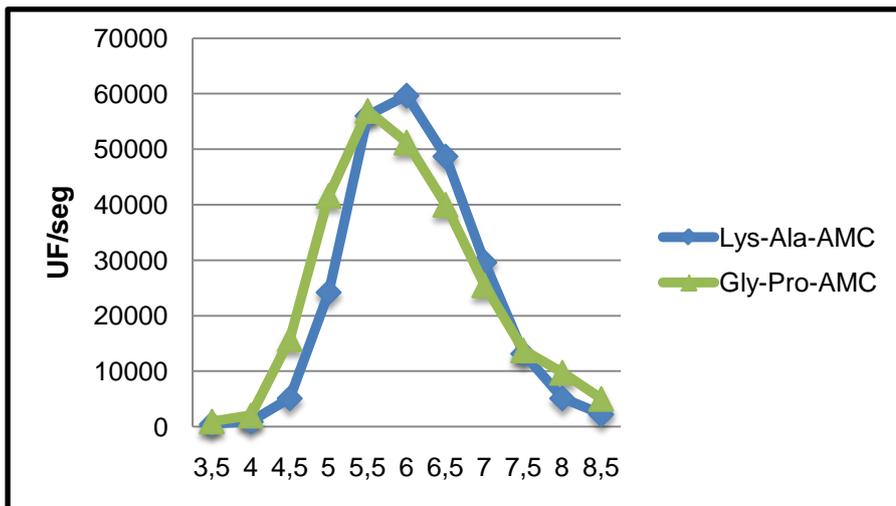
- » Ranjit, N., Zhan, B., Hamilton, B., Stenzel, D., Lowther, J., Pearson, M., Gorman, J., Hotez, P., Loukas, A. 2009. *Proteolytic Degradation of Hemoglobin in the Intestine of the Human Hookworm Necator americanus*. *Journal of Infectious Diseases*, 199: 904-912.
- » Robinson, G., Threadgold, L. 1975. *Electron microscope studies of Fasciola hepatica: The fine structure of the gastrodermis*. *Experimental Parasitology*, 37: 20–36.
- » Robinson, M., Tort, J., Lowther, J., Donnelly, S., Wong, E., Xu, W., Stack, C., Padula, M., Herbert, B., Dalton, J. 2008. *Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen Fasciola hepatica: expansion of a repertoire of virulence-associated factors*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 7: 1111-1123.
- » Robinson, M., Menon, R., Donnelly, M., Dalton, J., Ranganathan, S. 2009. *An Integrated Transcriptomics and Proteomics Analysis of the Secretome of the Helminth Pathogen Fasciola hepatica*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 8: 1891-1907.
- » Robinson, M., Corvo, I., Jones, P., George, A., Padula, M., To, J., Cancela, M., Rinaldi, G., Tort, J., Roche, L., Dalton, J. 2011. *Collagenolytic Activities of the Major Secreted Cathepsin L Peptidases Involved in the Virulence of the Helminth Pathogen, Fasciola hepatica*. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 5: 1012-1025.
- » Rosenthal, P. 1995. *Plasmodium falciparum: effects of proteinase inhibitors on globin hydrolysis by cultured malaria parasites*. *Experimental Parasitology*, 80: 272-281.
- » Rosenthal, P. 2011. *Falcipains and Other Cysteine Proteases of Malaria Parasites*. En: *Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer US, 712:30-48.
- » Rudolph, R., Lilie, H. 1996. *In vitro folding of inclusion bodies*. *FASEB Journal*, 10: 49-56.
- » Sajid, M., and McKerrow, J. 2002. *Cysteine proteases of parasitic organisms*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120: 1–21.
- » Sajid, M., McKerrow, J., Hansell, E., Mathieu, M., Lucas, K., Hsieh, I., Greenbaum, D., Bogyo, M., Salter, J., Lim, K., Franklin, C., Kim, J.,

- Caffrey, C. 2003. *Functional expression and characterization of Schistosoma mansoni cathepsin B and its trans-activation by and endogenous asparaginyl endopeptidase*. Molecular and Biochemical Parasitology, 131: 65-75.
- » Schägger, H., von Jagow, G. 1987. *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Analytical Biochemistry, 166: 368-379.
  - » Schägger, H. 2006. *Tricine-SDS-PAGE*. Nature Protocols, 1: 16-22.
  - » Schechter, I., Berger, A. 1968. *On the active site of proteases. III. Mapping the active site of papain, specific peptide inhibitors of papain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 32: 898-902.
  - » Simons, M., Raposo, G. 2009. *Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication*. Current Opinions in Cell Biology, 21: 575-581.
  - » Smith A.M., Dowd A.J., McGonigle S., Keegan P.S., Brenan G., Trudgett A., Dalton J.P. 1993a. *Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult Fasciola hepatica*. Molecular and Biochemical Parasitology, 62: 1-8.
  - » Smith, A.M., A. Dowd, M. Heffernan, C.D. Robertson, J.P. Dalton. 1993b. *Fasciola hepatica: a secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin*. International Journal of Parasitology, 23: 977-983.
  - » Smith, A.M., Carmona C., Dowd A.J., McGonigle, S., Acosta, D., Dalton, J. 1994. *Neutralization of the activity of a Fasciola hepatica cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies*. Parasite Immunology, 6: 325-328.
  - » Smooker, P., Whisstock, J., Irving, J., Siyaguna., Spithill, T., Pike, R. 2000. *A single amino acid substitution affects substrate specificity in cysteine proteinases from Fasciola hepatica*. Protein Science, 9: 2567-2572.
  - » Spithill, T.W., Smooker, P.M., Copeman, D.B., 1999. *Fasciola gigantica: epidemiology, control, immunology and molecular biology*. En: Fasciolosis, Dalton, J., 465-525. Ed. CAB International, Oxford, UK.

- » Stack, C., Lowther, J., Cunningham, E., Donnelly, S., Gardiner, D., Trenholme, K., Skinner-Adams, T., Teuscher, F., Grembecka, J., Mucha, A., Kafarski, P., Lua, L., Bell, A., Dalton, J. 2007. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 2069-2080.
- » Stack, C. M., Caffrey, C.R., Donnelly, S.M., Seshadri, A., Lowther, J., Tort, J.F., Collins, P.R., Robinson, M.W., Xu, W., McKerrow, J., Craik, C.S., Geiger, S., Marion, R., Brinen, L.S., Dalton, J. 2008. *Structural and functional relationships in the virulence-associated cathepsin L proteases of the parasitic liver fluke, Fasciola hepatica*. *Journal Biological Chemistry*, 283: 9896-9908.
- » Stack, C., Dalton, J., Robinson, M. 2011. *The phylogeny, structure and function of trematode cysteine proteases, with particular emphasis on the Fasciola hepatica cathepsin L family*. *Advances in Experimental Medicine Biology*, 712: 116-135.
- » Suttiprapa, S., Mulvenna, J, Huong, N., Pearson, M., Brindley, P., Laha, T., Wongkham, S., Kaewkes, S., Sripa, B., Loukas, A. 2009. *Ov-APR-1, an aspartic protease from the carcinogenic liver fluke, Opisthorchis viverrini: Functional expression, immunolocalization and subsite specificity*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41: 1148-1156.
- » Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T. 1994. *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- » Tkalcevic, J., Ashman, K., Meeusen, E. 1995. *Fasciola hepatica: rapid identification of newly excysted juvenile proteins*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 213: 169-174.
- » Tort, J., Brindley, P., Knox, D., Wolfe, K., Dalton, J. 1999. *Proteinases and associated genes of parasitic helminths*. *Advances in Parasitology*, 43: 161-266.
- » Turk D., Guncar, G. 2003. *Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets*. *Acta Crystallographica*, 59: 203-213.

- » Wasilewski, M.M. et al. (1996) *Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease wormburden and egg production in vivo*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 81: 179–189.
- » Whittefield, P.J. 1979. *The biology of parasitism: an introduction to the study of associating organisms*. University Park Press, Baltimore.
- » Williamson, A. L., Brindley, P. J., Abbenante, G., Prociv, P., Berry, C., Girdwood, K., Pritchard, D. I., Fairlie, D. P., Hotez, P. J., Dalton, J., and Loukas, A. 2002. *Compatibility between hookworm proteases and host haemoglobins is a determinant of host range*. *Faseb Journal*, 16: 1458–1460.
- » Williamson A.L., Brindley P.J., Knox D.P., Hotez P.J., Loukas A. 2003. *Digestive proteases of blood-feeding nematodes*. *Trends in Parasitology*, 19: 417-23.
- » Williamson A. L., P. Lecchi, B.E. Turk, Y. Choe, P.J. Hotez, J. H. McKerrow, L.C. Cantley, M. Sajid, C. S. Craik, and A. Loukas. 2004. *A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms*. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 35950-35957.
- » Willis, C., Wang, C., Osman, A., Simon, A., Pickering, D., Mulvenna, J., Riboldi-Tunicliffe, A., Jones, M., Loukas, A., Hofmann, A. 2011. *Insights into the Membrane Interactions of the Saposin-Like Proteins Na-SLP-1 and Ac-SLP-1 from Human and Dog Hookworm*. *Plos One*, 6: 25369-25379.
- » Wilson, L., Good, R., Panaccio, M., Wijffels, G., Sandeman, R., Spithill, T. 1998. *Fasciola hepatica: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke*. *Experimental Parasitology*, 88: 85-94.
- » Wittlin, S., Rösel, J., Hofmann, F., Stover, D. 1999. *Mechanisms and kinetics of procathepsin D activation*. *FEBS*, 265: 384-393.
- » Yamasaki, H., Kominami, E., and Aoki, T. 1992. *Immunocytochemical localization of a cysteine protease in adult worms of the liver fluke Fasciola sp.* *Parasitology Research*, 78: 574–580.

- » Yamasaki, H., Mineki, R., Murayama, K., Ito, A., Aoki, T. 2002. *Characterization and expression of the Fasciola gigantica cathepsin L gene*. International Journal of Parasitology, 32: 1032-1042.
- » Young, N., Hall, R., Jex, A., Cantacessi, C., Gasser, R. 2010. *Elucidating the transcriptome of Fasciola hepatica – A key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite*. Biotechnology Advances, 28: 222-231.



*Figura 19 – Curva de perfil de pH de las actividades DPP presentes en los PES de adulto– El eje de las Y representa la actividad contra los sustratos definida como unidades de fluorescencia liberadas por segundo, mientras que el eje de las X representa los valores de pH en que se evaluaron dichas actividades.*