



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
Montevideo - Uruguay



Tesis de grado de la Licenciatura en Bioquímica.

Federico Edgardo Fossa Baraldi

***ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE PROTEÍNAS DE
UNIÓN A HEPARINA PRESENTES EN EXTRACTOS
PARASITARIOS***

Tutora: Dra. en Quim. Patricia Berasain.

Unidad de Biología Parasitaria, Departamento de Biología Celular y Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias.

Montevideo, 10 de octubre de 2012

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, que me brindó su apoyo en todo momento.

Quiero agradecer a la Dra. Patricia Berasain por ser mi tutora, por su paciencia y por transmitirme sus conocimientos y experiencias que me hicieron crecer tanto a nivel personal como profesional.

Agradecerle al Dr. Carlos Carmona, director del Laboratorio de Biología Parasitaria, por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

Agradecerle también a la Dra. Verónica Fernández por su ayuda y orientación en temas que son de su especialidad.

Mi eterno agradecimiento los compañeros de laboratorio: Gabriela, Tatiana, Dinorah, Anabella, Cecilia, Natalia y Gualberto, que con sus consejos e intercambios de ideas me ayudaron solventar cualquier inconveniente, pero también por los mates, charlas y risas que hicieron este trabajo aún más ameno y divertido.

Por último agradecer a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por su apoyo a través de la Beca de Iniciación en la investigación. BE_INI_2010_2080.

Índice de abreviaturas.

Ac	Anticuerpo.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia.
Ag	Antígeno.
AMC	7-amido-4-methyl-coumarin.
CaBP	Proteína de unión a calcio.
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno.
CL1, CL2, CB, CX	Catepsina L1, L2, B, X.
DNPG	S-2,4-dinitrofenil-glutati6n.
DTT	Ditiotreitol.
E-64	Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido (4-guanidinio)-butano.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ESTs	Marcadores de secuencias expresados.
FABP	Proteínas de unión a ácidos grasos.
GAG	Glucosaminoglucano.
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa.
GLDH	Glutamato deshidrogenasa.
GSTsi	Glutati6n S-transferasa clase sigma.
Hb	Hemoglobina.
HBGFs	Factores de crecimiento con uni6n a heparina.
HDM-1	Molécula-1 de defensa de helmintos.
IL	Interleuquina.
KTMI	Inhibidor monomérico tipo kunitz.
NEJ	Forma juvenil del parásito.
LAP	Leucinaminopeptidasa.
LPS	Lipopolisacárido.
NR	No retenida.
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos.
PBS	Buffer fosfato salino.
PBS-T	Buffer fosfato salino con tween.
PES	Productos de excreci6n/secreci6n.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliácridamida con dodecilsulfato sódico.
TNF	Tumor necrosis factor.

Índice

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	6
2.1. Ciclo biológico de <i>F. hepatica</i>	6
2.2. La fasciolosis.....	8
2.3. Control y prevención de la fasciolosis.....	8
2.4. Ensayos inmunogénicos con proteínas de <i>F. hepatica</i>	9
2.5. Metodologías para evaluar interacciones moleculares.....	11
2.6. La Heparina.....	13
2.7. Estudios de proteómica en Helmintos.....	15
3. Objetivos.....	17
4. Materiales y métodos.....	18
4.1. Obtención de parásitos adultos y tratamiento de limpieza.....	18
4.2. Obtención de los Extractos de trabajo.....	18
4.2.1. Extracto somático.....	18
4.2.2. Extracto producto excreción/secreción (PES).....	18
4.3. Histología.....	19
4.3.1. Preparados histológicos.....	19
4.3.2. Tinción con hematoxilina-eosina.....	19
4.3.3. Microscopia de fluorescencia.....	19
4.4. Cromatografía de afinidad.....	19
4.5. Patrón proteico por electroforesis.....	21
4.6. Western blot.....	22
4.7. Determinación de la concentración de proteínas.....	22
4.8. Análisis enzimático de actividad proteolítica.....	23
4.8.1. Actividad cathepsina.....	23
4.8.2. Actividad LAP.....	24
4.8.3. Actividad legumaina.....	24
4.9. Análisis enzimático de actividad GST.....	25
4.10. Espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	25
5. Resultados.....	27
5.1. Estudio de interacción de heparina-fluoresceína con tejidos de <i>F. hepatica</i>	27
5.2. Aislamiento de proteínas de <i>F. hepatica</i> que interaccionan con una matriz de heparina.....	28
5.3. Patrón electroforético de proteínas de <i>F. hepatica</i> con interacción a heparina.....	30
5.4. Análisis por Western Blot de proteínas de <i>F. hepatica</i> con interacción a heparina.....	31
5.5. Análisis enzimático de actividad proteolítica en extractos y eluidos de <i>F. hepatica</i>	33
5.6. Espectrometría de masas de proteínas de <i>F. hepatica</i> que interaccionan con heparina.....	33
5.7. Análisis enzimático de actividad GST de <i>F. hepatica</i> en extractos y eluidos.....	35
6. Discusión.....	37
7. Conclusiones.....	47
8. Bibliografía.....	48
9. Anexos.....	55

1. Resumen.

La fasciolosis, causada por los parásitos trematodos *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*, es una enfermedad que afecta a diversos mamíferos incluyendo al hombre. En nuestro país sólo existe la primera especie. Dicha afección en animales ganaderos conlleva a alteraciones en su normal desarrollo repercutiendo negativamente en la producción de carne, leche, lana y otros, acarreando así importantes pérdidas a nivel económico. Existen tratamientos con antihelmínticos, sin embargo estos son costosos, existe el riesgo de reinfección y de generar resistencia al mismo. Por lo tanto el control inmunoproláctico sería más efectivo y de menor costo. Al día de hoy se han estudiado diversas proteínas del parásito como blanco de vacuna pero ninguno ha mostrado una eficacia absoluta. Por ende este trabajo tiene como finalidad la búsqueda de posibles nuevos blancos moleculares que posean interacción con la heparina, ya que este glucosaminoglucano altamente sulfatado, presente en el plasma y en varios tejidos, y con un rol modulador, podría ser capaz de interaccionar con proteínas del parásito cuyo resultado sería beneficioso para la sobrevivencia del mismo. A partir de la microscopia de fluorescencia en tejidos de *F. hepatica*, con heparina conjugada a fluoresceína, se observó reactividad en células del parénquima, en las espinas del tegumento y en algunas células que componen las glándulas vitelinas.

La cromatografía de afinidad, de los extractos de trabajo, con una matriz de heparina-sefarosa mostró proteínas con diversa afinidad, las cuales eluyeron a concentraciones 0.1, 0.2, 0.3, y 0.8 M de NaCl para el extracto somático, y 0.1, 0.5 y 0.8 M de NaCl para los productos de excreción/secreción. Por espectrometría de masas se identificaron algunos compuestos de estos eluidos. En el extracto somático se identificó la glutamato deshidrogenasa, la gliceraldehído deshidrogenasa y glutatión S-transferasa clase sigma. En cuanto que para los eluidos del extracto productos de excreción/secreción se identificó la glutatión S-transferasa clase sigma, una proteína de unión a calcio, un inhibidor de proteasas monomérico tipo Kunitz y una molécula vinculada a la defensa en helmintos. En el marco de este proyecto se plantea como objetivo a futuro el completar la caracterización del contenido proteico de los eluidos y seleccionar las proteínas adecuadas con las cuales, a partir de ensayos de inmunoprotección, poder desarrollar vacunas más eficientes que las actuales.

Palabras claves: *Fasciola hepatica*, heparina-sefarosa, microscopia de fluorescencia, cromatografía de afinidad, proteínas de unión a heparina.

2. Introducción.

La *Fasciola hepatica* es el agente etiológico de la fasciolosis, una enfermedad infecciosa de importancia mundial. Afecta diversos mamíferos y es considerada una zoonosis parasitaria en algunas regiones. A nivel animal, esta parasitosis afecta rumiantes de importancia económica, como lo son el ganado ovino y bovino, afectando el desarrollo normal del animal lo cual repercute negativamente en la producción de carne, leche y lana, además de incidir en su fertilidad, acarreando así importantes pérdidas a nivel económico (Mas-Coma *et al*, 2005).

Hasta el momento, el tratamiento con antihelmínticos constituye la alternativa para controlar la fasciolosis. Sin embargo este tratamiento se realizan muchas veces cuando ya se ha producido la infección, es costoso, existe el riesgo de la reinfección y de la generación de resistencia a los mismos (Overend *et al*, 1995). Por lo tanto existe la necesidad de desarrollar estrategias alternativas de control, más efectivas y de menor costo, como lo son las inmunoprofilácticas.

2.1. Ciclo biológico de *F. hepatica*.

La *F. hepatica* es un platelminto trematodo de la subclase Digenea, que posee un ciclo biológico heteroxeno ya que necesita un hospedador intermedio: un molusco gasterópodo anfibio del género *Lymnaea*, donde ocurre la multiplicación larvaria, y un huésped definitivo: un mamífero (oveja, vaca, humano, etc), donde ocurre la reproducción de los parásitos adultos de manera sexuada o la autofecundación ya que son hermafroditas.

Los parásitos adultos se encuentran en las vías biliares proximales (preferentemente en la luz de los canalículos biliares) y la vesícula biliar del mamífero infectado, nutriéndose de la bilis y de los tejidos parietales (Berenguer, 2006). En dicho lugar el adulto libera huevos ya fecundados, los cuales son arrastrados por el líquido biliar hacia el duodeno y al intestino delgado y siendo finalmente expulsados al medio exterior con las heces. Dichos huevos deben encontrarse en presencia de un acumulo de agua fresca para conformar el medio adecuado en cuanto a la temperatura, humedad, dióxido de carbono y oxígeno que asegure su supervivencia, dando paso a la maduración (ente 10 y 15 días a 15-25°C) y la eclosión del huevo liberando un embrión ciliado, el miracidio. Éste nada hasta encontrar el huésped intermedio, un caracol pulmonado de la familia Lymnaeidae. En Uruguay la única especie con relevancia epidemiológica es *Lymnaea viatrix* (Nari *et al*, 1983). El miracidio penetra por la piel del caracol y migra hacia la cámara pulmonar mientras pierde sus cilias. Allí se

transforma en un esporocisto, dentro del cual se forman varios embriones de manera asexual (fenómeno de poliembrionía) dando origen a las redias madres, las que migran al hepatopáncreas del molusco y desarrollan masas germinales transformándose en redias hijas. Estas tienen un movimiento activo y se localizan en la parte distal del caracol, en la glándula digestiva y la cavidad corporal. Las redias se transforman en cercarias, las cuales abandonan los tejidos del caracol al captar los estímulos exteriores adecuados. Esta etapa en el huésped intermedio dura de 5 a 7 semanas. Una vez que las cercarias están libres en el agua nadan ayudadas por su cola, hasta adherirse a plantas acuáticas, pastos, etc, donde se enquistan transformándose en metacercarias (estadio infeccioso). Poseen forma

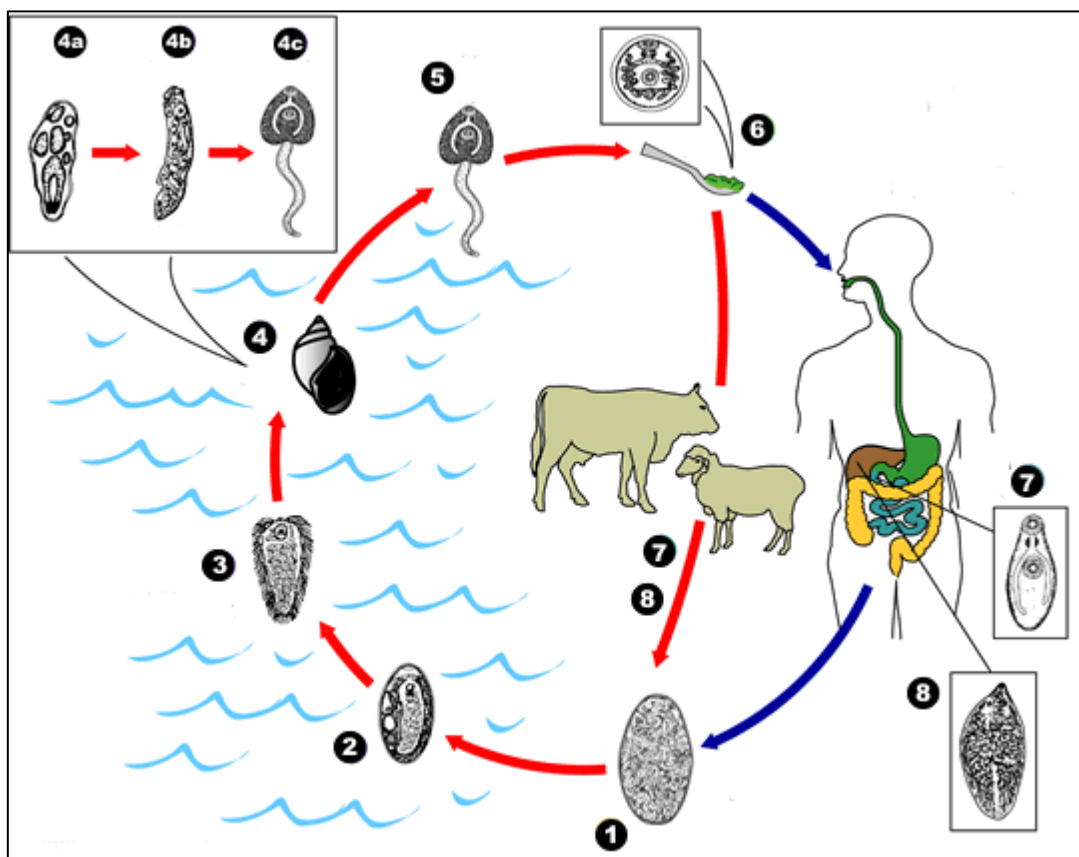


Figura 1. Ciclo biológico de *F. hepatica*. Los huevos inmaduros abandonan el huésped definitivo con las heces (1). En presencia de agua los huevos maduran (2) y eclosionan liberando el miracidio (3), que invade al huésped intermediario, un gasterópodo del género *Lymnaea* (4), donde las larvas del miracidio se transforman en esporocitos (4a), redias (4b) y finalmente en cercarias (4c). Las cercarias abandonan el caracol (5) y tras un período de vida libre en el agua se enquistan sobre plantas acuáticas como metacercarias (6). El huésped definitivo se infecta al ingerir estas plantas acuáticas con las metacercarias, las cuales se desenquistan en el duodeno (7) y luego de migrar a través de la pared intestinal, la cavidad peritoneal, y el parénquima hepático llegan a los conductos biliares (8) en donde crecen hasta ser adultos y producir huevos. (Tomado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Fascioliasis.htm>)

redondeada (perdiendo la cola) y forman una cubierta con material adherente secretado por sus células. La metacercaria en este estado enquistado tiene la capacidad sobrevivir expuesta al medio de 6 a 10 meses dependiendo de la humedad, hasta que sea ingerida por

el huésped definitivo. A partir de la ingesta, la metacercaria alcanza el tubo digestivo y en el duodeno, en presencia de los jugos gástricos y enzimas, se produce el desenquiste liberándose la forma juvenil del parásito (NEJ). Éstos atraviesan la pared intestinal de lado a lado por medio de la liberación y acción de varias proteasas, llegando a la cavidad peritoneal, donde se orientan hacia la localización del hígado. Al llegar a la cápsula de Glisson la perforan, atraviesan el parénquima hepático y ganan acceso a los conductos biliares donde producirán huevos una vez que se vuelvan parásitos adultos, en un periodo de entre 3 y 4 meses a partir de la infección inicial (Saba, 2005; Romero, 2007; Berenguer, 2006; Llop, 2001).

2.2. La fasciolosis.

La fasciolosis es una importante enfermedad causada por *F. hepatica* y *Fasciola gigantica*. *F. hepatica* se distribuye en zonas templadas de todos los continentes, mientras que en zonas tropicales de África y Asia se puede encontrar también *F. gigantica*. Si bien recientemente el número de humanos afectados por fasciolosis se ha incrementado y algunas zonas geográficas han sido consideradas endémicas para dicha enfermedad, es igualmente preocupante como ésta afecta rumiantes de interés económico como el ganado ovino y bovino, pudiendo también afectar a suinos, caprinos, equinos y otros, generando pérdidas económicas de 3.2 billones de dólares anuales (Mas-Coma *et al*, 2005; Saba, 2005; Mas-Coma *et al*, 1999; Spithill *et al*, 1998; Nari, 1991).

Los perjuicios generados por el parásito se observan, tanto para el ganado ovino como bovino, en la merma de producción de carne, leche y lana, la reducción de la fertilidad, el decomiso de los órganos infectados faenados y posibles infecciones bacteriales secundarias. En ovinos la enfermedad puede presentarse en forma aguda y en algunos casos ser letal (Hatschbach *et al*, 1995).

2.3. Control y prevención de la fasciolosis.

El control y tratamiento de la infección en rumiantes se basa en el uso de antihelmínticos, como el triclabendazol, aunque estos poseen varias desventajas como lo son el alto costo del producto, la ausencia de protección post tratamiento lo cual posibilita una reinfección, y la generación de resistencia a dichos productos, por parte del parásito, debido a largos períodos de empleo (Overend *et al*, 1995; Mas-Coma *et al*, 2005).

Una forma racional de encarar el control de la fasciolosis es a través del desarrollo de vacunas, las cuales permitan ser eficaces en cuanto a la eliminación del parásito y generar inmunidad ante futuras infecciones, además de disminuir costos económicos. Dichas vacunas tienen como fin identificar blancos moleculares en el parásito cuya inactivación comprometa la viabilidad del mismo. Dentro de los procesos fisiológicos vitales para el parásito se identifican como posibles vías de intervención las enzimas proteolíticas destinadas a la nutrición, el sistema muscular implicado en la movilidad y locomoción, el aparato reproductor encargado de la formación y diseminación de huevos, moléculas vinculadas a sistemas de comunicación e interacción entre el huésped y el parásito, sistemas de detoxificación y de evasión de la respuesta inmunológica, entre otros.

También se ha estudiado la posibilidad de utilizar técnicas nucleares para desarrollar vacunas radioatenuadas, que consisten en la exposición del estadio infeccioso del parásito, la metacercaria, a radiación ionizante la cual tiene el efecto de hacer no patogénico al parásito, por lo cual son incapaces de desarrollarse, y aún así conservar la propiedad de estimular el sistema inmunológico del huésped. Se utiliza contra la estrongilosis pulmonar del ganado lanar y otras enfermedades, pero existen dificultades para crear una vacuna contra la fasciolosis debido en parte a las variaciones antigénicas del parásito (Vercoe, 1974). Se ha ensayado, en ovejas, el potencial de una vacuna con metacercarias de *F. hepatica* irradiadas con radiación gama, en el cual no se observó disminución en el número de huevos ni de parásitos con que se desafió, pero sí se apreció un efecto sobre el desarrollo de la población de dichos parásitos ya que se causó un daño hepático menor avalado por los bajos niveles en sangre de la glutamato deshidrogenasa del huésped (Creaney *et al*, 1995a).

2.4. Ensayos inmunogénicos con proteínas de *F. hepatica*.

Hasta el momento se han caracterizado diversas moléculas biológicas de *F. hepatica* y se ha evaluado su capacidad inmunogénica por medio de ensayos de vacunación.

Se evaluó la capacidad inmunogénica de las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) a partir de un ensayo de vacunación en bovinos utilizando el complejo FhSmIII(M) de *F. hepática* (la cual es reconocida por anticuerpos del trematodo *Schistosoma mansoni* y se observó una reducción del 55% en la carga parasitaria. Dicho complejo posee mayoritariamente FABP, y fue a partir del mismo que se identificó la proteína Fh12, un FABP que está vinculado al transporte de los ácidos grasos de cadena larga y sus ésteres de acetil.CoA (Hillyer *et al*, 1987).

En cuanto a las proteasas parasitarias, las catepsinas L1 y L2 (CL1 y CL2) son las principales endopetidases secretadas en el intestino de la *F. hepatica* y presentes los productos de excreción/secreción (PES), a las cuales se les atribuye un rol preponderante vinculado a facilitar la migración del parásito a través de los tejidos del huésped al digerir las proteínas de la matriz extracelular (Howell *et al*, 1966; Berasain *et al*, 1997), a la adquisición de nutrientes (Halton *et al*, 1967)) y a la inactivación de la respuesta inmune directa del huésped (Carmona *et al*, 1983; Berasain *et al*, 2000). La leucinaminopeptidasa (LAP) es una exopeptidasa también secretada en el intestino y de importancia para la nutrición del parásito (Acosta *et al*, 1998). Ensayos de vacunación en ovinos mostraron que CL1 y CL2 generan niveles de protección contra la infección de 33% y 34% respectivamente, además de mostrar una importante reducción en el número de huevos, del 71% para CL1 y 81% para CL2. La combinación de ambas catepsinas contribuye con un nivel de protección del 60%, por encima de los niveles observados cuando las mismas se administran separadas. Al acoplar LAP a las catepsinas antes mencionadas se obtuvo un nivel de protección del 78%, un valor levemente inferior respecto al 89% de protección obtenido al inmunizar únicamente con LAP (Piacenza *et al*, 1999). La alta protección observada al inmunizar solo con LAP se corrobora al inmunizar conejos y posteriormente desafiarlos con metacercarias, obteniendo un alto título de anticuerpos IgG al poco tiempo de la primer inmunización y una reducción de la carga parasitaria del 78% respecto al grupo control (Acosta *et al*, 2008).

Otras enzimas evaluadas fueron las GSTs de *F. hepatica* la cuales comprenden una familia de isoenzimas cuyas funciones incluyen los pasos iniciales de la detoxificación de xenobióticos y compuestos endógenos. Dicha familia proteica fue considerada como candidato de vacunación a partir de la homología que presenta con las GST de *S. mansoni* y *Schistosoma japonicum*, las cuales demostraron conferir resistencia contra estos parásitos (Brophy *et al*, 1994). Se han realizado ensayos de vacunación en bovinos con GSTs de *F. hepatica* que mostraron una protección entre el 49-69% (Morrison *et al*, 1996).

La hemoglobina (Hb) de *F. hepatica* es otro compuesto secretado de suma importancia ya que el ambiente anaeróbico al cual los parásitos se encuentran expuestos indica la extrema necesidad de un transportador de oxígeno activo para su sobrevivencia (McGonigle *et al*, 1995). Ensayos de vacunación en bovinos mostraron un 44% de protección contra el parásito. También se ensayó con Hb acoplada independientemente a CL1 y CL2, mostrando una reducción en el número de huevos del 55% y 72% respectivamente (Dalton *et al*, 1996).

De los resultados obtenidos se demostró que las proteínas ensayadas como inmuoprotectores tienen procesos relevantes para la sobrevivencia del parásito en el huésped,

con lo cual se concluyó que es de sumo interés el poder desarrollar una vacuna multivalente, que cubra varios antígenos simultáneamente. Es por lo cual este trabajo se orienta hacia la investigación y caracterización de proteínas que sean posibles nuevos candidatos a inmunógenos, especialmente en algunas vías fisiológicas aún no exploradas para este trematodo.

2.5. Metodologías para evaluar interacciones moleculares.

Para llevar a cabo la búsqueda antes mencionada existen diversas técnicas a partir de las cuales se pueden evaluar interacciones moleculares, obteniendo diversa información e incluso aislando sus componentes.

El estudio de interacciones moleculares toma vital importancia ya que para muchos procesos biológicos la interacción proteica es fundamental. Para lograr su análisis en profundidad se emplean diversas técnicas y metodologías prácticas, cada una con ventajas y desventajas, además de utilizar programas bioinformáticos que, a partir de base de datos y diversos parámetros, permite predecir interacciones y crear modelados tridimensionales entre tantas otras alternativas. El poder integrar la información, proveniente de distintos ángulos, ayuda a comprender en profundidad las interacciones moleculares.

A continuación se describen algunas técnicas y metodologías comúnmente utilizadas.

Una manera de evaluar las interacciones moleculares es la coimmunoprecipitación. Es una técnica que involucra el uso de un anticuerpo (Ac) para reconocer un antígeno (Ag) que puede ser una proteína o biomolécula específica, y con el uso de agentes unidos a una matriz sólida con afinidad por dicho anticuerpo se logra la precipitación del complejo Ac-Ag. Si dicho antígeno (proteína/biomolécula) estaba interaccionando con alguna proteína, ésta también precipitará (Lee, 2007; Weinkauf *et al*, 2009). La posterior purificación de dichos inmunocomplejos puede ser analizada por electroforesis en gel, por estudios enzimáticos o por inmunoblot.

La complementación bimolecular fluorescente (BiFC) es una técnica que permite investigar y visualizar directamente la interacción entre dos proteínas en células vivas. Se basa en la formación de un complejo fluorescente a partir de la asociación de dos fragmentos de una proteína fluorescente, que se asocian cuando las respectivas proteínas de interés, a las cuales dichos fragmentos están unidos, se encuentran interactuando (Shyu *et al*, 2007; Hiatt *et al*, 2008).

Otra posibilidad es la aplicación de la técnica enzimoimmunoensayo conocido como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), aunque esta técnica acotaría la búsqueda solo a las proteínas para las cuales se posee el Ac específico.

La calorimetría isotérmica de titulación (ITC) se la considera una técnica cuantitativa para la medición de las propiedades termodinámicas relevantes como lo son la entalpía, entropía y constantes cinéticas, que tienen lugar durante la interacción de biomoléculas, además de ser una herramienta importante al momento de dilucidar la compleja estructura resultante de esa interacción (Choma *et al*, 2000; Liu *et al*, 2009). Esta técnica se basa en la medición de las variaciones de calor que ocurren durante la interacción entre las biomoléculas en solución, evitando la necesidad de un marcado o inmovilización. Si bien es una técnica de gran utilidad no podría ser utilizada en una identificación primaria de interacción ya que la misma se emplea para evaluar la interacción únicamente entre dos biomoléculas en solución.

La técnica de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) es otra opción al momento de analizar interacciones biomoleculares. La misma se basa en la interacción existente entre dos cromóforos situados a muy corta distancia (1-10nm) en la cual la longitud de onda de emisión de uno de ellos se solapa con la longitud de onda de excitación del otro (Truong *et al*, 2001; Topolska *et al*, 2004). Se utiliza la fluorescencia propia de algún aminoácido presente o haciendo uso de marcadores específicos como la proteína verde fluorescente u otros.

Otra técnica utilizada para el análisis de interacciones moleculares es la resonancia de plasmones de superficie (SPR) la cual está basada en un fenómeno óptico. De la misma se obtiene el registro de interacciones en tiempo real entre macromoléculas fijadas a la superficie del biosensor y las moléculas que fluyen sobre el mismo. Este método permite aplicar distintas técnicas químicas sobre la macromolécula a ser adherida al biosensor lo cual altera la capacidad de unión y afinidad de la misma por los distintos ligandos. De esta manera se permite determinar las constantes de afinidad y cinética existente entre las biomoléculas analizadas, e incluso se puede conocer la concentración de las mismas en la muestra (Osmond *et al*, 2002; Van Remoortere *et al*, 2001).

Varias de las técnicas tratadas previamente otorgan información variada sobre procesos de interacciones puntuales y/o específicos. Este trabajo, por ser una línea de investigación ejecutada por primera vez, se orientó con el fin de realizar una amplia búsqueda subproteómica en referencia a la interacción entre las diversas proteínas presentes en los extractos de trabajo y una biomolécula de interés utilizada como ligando. Por lo antes

mencionado se procedió a ejecutar una cromatografía de afinidad que, además de ser una técnica de bajos costos y de accesible disponibilidad, posibilita aislar las proteínas interactuantes.

En cuanto a la matriz de la columna cromatográfica, se optó por la heparina ya que está relacionada a numerosos procesos fisiológicos y presenta afinidad por una amplia gama de moléculas biológicamente activas. De esta manera se busca identificar el subproteoma de *F. hepatica* con afinidad por heparina.

2.6. La Heparina.

La heparina es un glucosaminoglucano (GAG) altamente sulfatado, emparentado en cuanto a su estructura con los heparan sulfatos (HS). Se compone a partir de la repetición de un disacárido, formado por N-acetil-D-glucosamina unida por un enlace α -glucosídico (α 1 $\rightarrow$ 4) a un ácido hexurónico, el cual puede ser ácido D-glucorónico o ácido L-idurónico. Los residuos de D-glucosamina en su mayoría están N-sulfatados (enlaces sulfamida) y solo unos pocos están N-acetilados. Si bien es variable el número de sulfatos que posee, tiene un promedio de 2.5 residuos sulfatados por unidad de disacárido, lo que la convierte así en el polímero más cargado en tejidos de mamíferos. La heparina se expresa exclusivamente en los mastocitos y es almacenado en los gránulos secretores como complejos con histamina y varias proteasas. Los mastocitos están presentes en la mucosa y el tejido conectivo a través de todo el cuerpo, incluyendo el tracto gastrointestinal. (Varki, 1999; Voet, 2007)

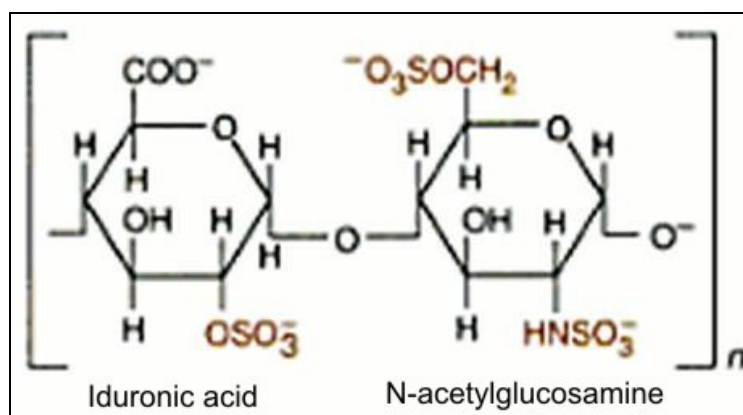


Figura 2. Unidad repetitiva de la heparina. El número de repeticiones del disacárido (n) varía de 12 a 50. En rojo se indican los grupos aniónicos. Se observan los sustituyentes cargados negativamente. (Tomado de Devlin. Bioquímica, 4ª ed, Pág.685)

También se ha descrito la existencia de heparina en el plasma humano el cual interacciona fuertemente con componentes proteicos allí presentes. (Volpi *et al*, 1995; Cavari *et al*, 1996). Las principales funciones de la heparina están vinculadas con el control de la actividad de las proteasas de mastocitos y con la integridad secretoria de los gránulos. Además de su bien conocida actividad anticoagulante (Sobel *et al*, 1992), posee alta afinidad por distintas moléculas de interés biotecnológico como las lipoproteínas de baja densidad (Olsson *et al*, 2001), lipoproteinlipasa (Schönherr *et al*, 2000), serinoproteasas circulantes e inhibidores de proteasas, así como a las proteínas asociadas a los vasos sanguíneos como la fibronectina (Kang W *et al*, 2008) y la laminina. También se ha descrito su unión al receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (ins 1,4,5-3P) inhibiendo las cascadas biológicas en eventos mediados por el mismo. (Favre *et al*, 1994).

Se conoce que diversos GAGs, entre ellos la heparina, son capaces de interactuar y modular proteínas afectando de esta manera su función biológica, siendo de importancia la localización del motivo de reconocimiento para que la relación estructura-función sea estable (Raman *et al*, 2005)

Al llevar adelante este trabajo se pensó en las moléculas para las cuales hay evidencia tanto de su interacción con heparina como de su existencia en parásitos. La heparina modula la estructura y función de varias proteínas (Sung *et al*, 2007). A partir de su capacidad de interacción posibilita la caracterización de enzimas proteolíticas (Nascimento *et al*, 2005), inhibidores de proteasas (Patston *et al*, 2004), mucinas (Cordfield *et al*, 2001) y enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (Antonyuk *et al*, 2009; Piacenza *et al*, 1998).

Los factores de crecimiento con unión a heparina (HBGFs) son de importancia debido a su acción proliferativa y mitogénica sobre otras células (Sung *et al*, 2007). La existencia de estos factores en los parásitos parece estar relacionada a la patogenia e incluso a la modulación de la respuesta inmunológica. Se ha descubierto la presencia, en el PES del trematodo *Opisthorchis viverrini*, de un factor de crecimiento, el cual es secretado por el parásito en los canalículos biliares y se demostró que induce tumorigénesis en las células del conducto, asociándose así inequívocamente la parasitosis con el colangiocarcinoma (Mout *et al*, 2009). La patogenia de *F. hepatica* esta caracterizada por la extensa fibrosis generada en el tejido hepático durante su proceso migratorio hacia los canalículos biliares. Este daño hepático, compromete parte del metabolismo del hospedero, y es el principal responsable del deterioro generalizado que ocurre en los animales infectados. Sería factible caracterizar factores de crecimiento de fibroblastos en los extractos de trabajo a los cuales

atribuirle la fibrosis producida durante la migración, siendo esta una interesante alternativa para bloquear la migración o al menos reducir el daño hepático.

La existencia de proteínas relacionadas con la espermatogénesis en el ciclo del parásito puede convertirse en un blanco de ataque. Se han descrito fosfoproteínas de membrana que generan un movimiento ameboide en las células de espermatozoides en *Ascaris* (LeClaire *et al*, 2003) y fosfoproteínas de la membrana del espermatozoide de mamíferos que posee afinidad por la heparina, cuya activación son cruciales para el correcto desempeño de los espermatozoides en el proceso reproductivo (Mor *et al*, 2007). El bloqueo de estas proteínas en *F. hepatica* mediante la generación de anticuerpos específicos podría interferir seriamente con la producción de huevos, con la consecuente interrupción de su ciclo de vida.

Por último podrán ser considerados nuevos factores de interferencia con la cascada de coagulación; la heparina no sólo se une a la trombina, sino también a la antitrombina III (Machovich *et al*, 1975) ejerciendo, según las condiciones, acción anti-coagulante o procoagulante de la sangre. Se describió que el factor de von Willebrand posee un dominio que se une a heparina (Sobel *et al*, 1992). El trematodo en estudio posee cierta acción procoagulante atribuida a la CL2 presente en el PES de los gusanos adultos, sin embargo se desconoce hasta el momento la relación de las nuevas proteasas descritas o de la existencia de otros factores del parásito que interfieran inhibiendo los eventos de la coagulación.

Con lo antes mencionado, y en base a la información acerca del rol modulador de la heparina, se hipotetizó sobre la importancia y rol de las proteínas que conformarían este subproteoma. La interacción *in vivo* proteína-heparina podría generar una modulación positiva y beneficiosa para la sobrevivencia del parásito, tanto para su nutrición como para evadir la respuesta inmunológica. Esto magnifica el interés por caracterizar dicho subproteoma, ya que de verificarse lo antes mencionado podría llegar a proveer efectivos blancos de vacuna contra este parásito.

2.7. Estudios de proteómica en Helmintos.

El paso final de la metodología de trabajo utilizada en este estudio involucra la identificación de proteínas por medio de espectrometría de masas, con la cual se busca comparar el espectro de masas de fragmentos peptídicos desconocidos contra una base de datos de secuencias conocidas conformada por estudios de proteómica previos y que es de acceso público. A pesar de tratarse de un parásito que causa un impacto socio-económico y que

afecta significativamente la salud del huésped, los estudios de investigación molecular en dicho parásito no se encuentran tan avanzados como en otros tremátodos. En la base de datos del GenBankTM hasta el momento (Julio del 2012) se cuenta con 1331 secuencias nucleotídicas, 1011 secuencias aminoácidas y 3055 ESTs. En la base de datos del Wellcome Trust Sanger Institute se hace referencia a 14031 ESTs (febrero del 2011) los cuales no poseen anotación alguna. La única secuencia nucleotídica completa de *F. hepatica* corresponde a la de su ADN mitocondrial (Le *et al*, 2001).

La caracterización de muchas ESTs se logró en base a búsquedas de homología con parásitos sanguíneos de humanos como *S. mansoni* y *S. japonicum*, para los cuales los estudios en proteómica están sumamente avanzados y cuyos genomas ya han sido dilucidados y publicados. Recientemente se han realizado ensayos para dilucidar la composición proteica del PES, lo cual se denomina secretoma (Robinson *et al*, 2009), ensayos para conocer la composición del tegumento, el tegumentoma (Wilson *et al*, 2011) y ensayos con el fin de identificar proteínas comunes entre *F. hepatica* y *S. mansoni* (Boukli *et al*, 2011).

3. Objetivos

Objetivo general:

- Caracterizar proteínas y estructuras celulares de *F. hepatica* con afinidad a heparina.

Objetivos específicos:

- Observar por microscopia de fluorescencia los tejidos reactivos a la heparina.
- Determinar la existencia de proteínas en el extracto somático y el extracto PES que interaccionen con la matriz de heparina-sefarosa.
- Caracterizar los compuestos cuya interacción con heparina sea positiva.

4. Materiales y métodos.

4.1. Obtención de parásitos adultos y tratamiento de limpieza.

Los parásitos adultos de *F. hepatica* fueron extraídos de los conductos biliares de vacunos infectados, obtenidos en frigoríficos nacionales. Se mantuvieron en bilis termostatzada a 37°C y una vez en el laboratorio se les realizaron sucesivos lavados con buffer fosfato salino (PBS) (NaCl 136 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 8.1 mM, NaH₂PO₄ anhídrido 1.7 mM) 10 mM pH 7.3 a 37°C con agitación constante para eliminar los componentes el hospedero (sangre, bilis, etc) del tubo digestivo y del tegumento. Los parásitos que mostraron movilidad e integridad estructural se utilizaron para la producción de los distintos extractos de trabajo y para los ensayos de histología.

4.2. Obtención de los Extractos de trabajo.

4.2.1. Extracto somático.

Se pesaron 4 gramos de parásitos húmedos y se homogeneizaron durante 5 minutos en frío con homogeneizador eléctrico, utilizando un volumen de 20 ml de buffer fosfato (Na₂HPO₄·7H₂O 8.1 mM, NaH₂PO₄ anhídrido 1.7 mM) 10 mM pH 7.3, el cual incluyó un cóctel de inhibidores de proteasas BS387 (Bio Basic Inc.) y EDTA (acorde a una concentración final de 1 µM de E-64 y de 5 mM respectivamente). El homogeneizado se sonicó durante 4 minutos, al 20% de potencia (amplitud de 60) aplicando pulsos de 1 minuto con pausas de 30 segundos. Posteriormente se centrifugó a 15000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se alicuotó y almacenó a -20°C.

4.2.2. Extracto producto excreción/secreción (PES).

Se utilizó un medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma) con L-glutamina pH 7.3, 2% de glucosa, 25 mg/ml de gentamicina y 30 mM Hepes el cual se filtró por membrana de 0.22 µm (Milipore) y se alicuotó en falcons estériles de 50 ml en cámara de flujo laminar. Posteriormente se utilizó dicho medio para incubar los parásitos, en condiciones de viabilidad, durante 16 horas a 37°C. Se consideró una relación de un parásito por mililitro de medio de cultivo. Finalizada la incubación, el medio de cultivo se filtró a través de una membrana de 0,45 µm (Milipore) y se centrifugó a 15000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se dializó contra buffer fosfato 10 mM pH 7.3, durante 48 horas y concentró 10 veces mediante ultrafiltración Amicon 8400 (MA) usando una membrana YM3 de 3 kDa de punto de corte (Amicon, MA). Se alicuotó y almacenó a -20°C.

4.3 Histología.

4.3.1. Preparados histológicos.

Los parásitos limpios y en condiciones de viabilidad, se fijaron en paraformaldehído al 4.5% en PBS 10 mM pH 7.3 durante varios días. Posteriormente se procedió a la inclusión del tejido en parafina para lo cual se comenzó con la deshidratación con sucesivos pasajes en EtOH 70%, 80%, 85%, 90%, 95% y 100%; se extrajo el alcohol mediante sucesivos pasajes por xilol I, II, III, y finalmente se incluyó en parafina I, II, III. Se concluyó con la preparación del bloque de corte. Por medio de un micrótopo manual horizontal (Yamato-Japan) se realizaron sucesivos cortes de 5 a 10 micras de grosor, se extendieron sobre agua tibia, se adhirieron a portaobjetos previamente silanizados (Organosilano 2% en Acetona) y se dejaron 16 horas sobre una plancha caliente a 37°C para su secado.

4.3.2. Tinción con hematoxilina-eosina.

Los cortes histológicos se desparafinaron (Xilol I, II, EtOH 100%, 95%, 90% y lavados con agua) y se sumergieron en hematoxilina durante 15 minutos, posteriormente se dejaron inmersos en agua durante 20 minutos para luego sumergirlos en eosina durante 5 minutos. Finalmente una serie de 5 lavados con agua antecedieron a los pasos de deshidratación (EtOH 100% y xilol I y II). Se concluyó con el montaje del cubreobjeto utilizando una gota del aceite “bálsamo de Canadá”. Las imágenes se registraron en el microscopio (Eclipse 80i, Nikon), usando el Software Nis-Elements BR 3.0 para las tomas de imágenes.

4.3.3. Microscopia de fluorescencia.

Los cortes histológicos se desparafinaron (Xilol I, II, EtOH 100%, 95%, 90% y lavados con agua) y se incubaron con heparina conjugada a fluoresceína (Hp-FITC) (Invitrogen) 20 µg/ml, en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.0, en cámara húmeda a oscuras por 18 horas a 37°C. El control negativo consistió en un corte de tejido incubado con buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.0, en cámara húmeda a oscuras por 18 horas a 37°C. Las imágenes se registraron en el microscopio de fluorescencia (Eclipse 80i, Nikon) a $\lambda_{ex}=493$ nm y $\lambda_{em}=514$ nm, correspondiente a la detección de FITC, usando el Software Nis-Elements BR 3.0 para las tomas de imágenes.

4.4. Cromatografía de afinidad.

Para este ensayo se utilizó el equipo de cromatografía AKTA (AKTA purifier UPC 100, GE) por lo cual todos los buffers y las soluciones empleadas se prepararon 24 horas previas al

ensayo con H₂O miliq, se filtraron por vacío con membrana de 0.22 µm (MF-Millipore) y se desgasearon durante 30 minutos.

Se crearon las directivas metodológicas para que el equipo de cromatografía AKTA realizara una ejecución automática, los parámetros básicos se describen a continuación (ver Anexo 1 para mayor información).

Se estableció una velocidad de flujo de 0.7 ml/min la cual se mantuvo durante todas las etapas de técnica. Se procedió a equilibrar una columna de Heparina-Sefarosa de 1 ml (Hitrap heparin HP, GE) con 10 volúmenes de columna (VC) de buffer de equilibración (Buffer Fosfato 10 mM, pH 7.0).

Posteriormente se inyectaron 300 µl del extracto de trabajo a analizar, previamente centrifugado a 15000 rpm durante 5 minutos, a lo cual siguió el pasaje de 6 a 8 VC de buffer de equilibración para remover la fracción de proteínas no retenidas (NR) a la matriz de heparina.

La elución de las proteínas que interaccionaron con la matriz se realizó por medio de un gradiente escalonado con el buffer de elución (Buffer Fosfato 10 mM pH 7.0, con NaCl 0.1 M a 2.0 M) pasando 4 VC por cada escalón de concentración de NaCl. Para la cromatografía del extracto somático los valores de elución utilizados fueron 0.1, 0.2, 0.3, 0.8, 2.0 M de NaCl en buffer de elución. Para la cromatografía del extracto PES los valores de elución utilizados fueron 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0 M de NaCl en buffer de elución.

Los valores antes mencionados y que componen el gradiente escalonado de elución en los cromatogramas, fueron elegidos a partir de una corrida cromatográfica previa, para cada extracto, con incrementos del buffer de elución de a 0.1 M de NaCl, en un rango desde 0.1 M a 2.0 M, y un posterior SDS-PAGE para observar el patrón proteico de dichos eluidos. Los eluidos cuyos patrones proteicos presentaban similitud fueron unificados.

El perfil cromatográfico de los eluidos se monitoreó por absorbancia a 280 nm y dichos eluidos fueron colectados automáticamente por el equipo de cromatografía una vez que el pico de absorbancia superó el umbral establecido de 25 AU (unidades de absorbancia) para el extracto somático y de 15 AU para el extracto PES.

Para ambos extractos de trabajo se realizaron varias cromatografías en las condiciones antes descritas a modo de obtener cantidades significativas de los picos eluidos, conformando así los distintos lotes que posteriormente fueron dializados contra buffer fosfato

10 mM pH 7.3, durante 48 horas, con una membrana de 3.5 kDa (Spectra/Por, Spectrum Medical Industries). A causa de la baja concentración proteica del extracto PES, sus eluídos fueron concentrados por liofilización 20 veces para facilitar los ensayos posteriores. Todos los eluídos obtenidos se almacenaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

4.5. Patrón proteico por electroforesis.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de Sodio Dodecil Sulfato (SDS-PAGE) se realizó por el método previamente descrito por Laemmli, U. K. (Laemmli, 1970), en una cuba de electroforesis vertical a temperatura ambiente. Se ensayaron geles chicos (8.0 cm por 9.0 cm) con concentraciones de poliacrilamida al 12.5% y al 15%. Las muestras se incubaron durante 3 minutos a 95°C en presencia de buffer de muestra 4x (Tris-HCl 1.0 M pH 6.8, SDS 20%, Azul de Bromofenol 0.2% y glicerol) y DTT 10 mM.

Se evaluó el patrón proteico de cada extracto de trabajo y sus respectivos eluídos. En análisis del extracto somático se sembró por pocillo: 1 µl del extracto somático, 10 µl de NR y 15 µl de cada eluido (A-H). Para el análisis del extracto PES se sembró por pocillo: 5 µl del extracto somático, 15 µl de NR y 20 µl de cada eluido (A-C). Las corridas electroforéticas se realizaron en buffer de electroforesis (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 1%, pH 8.3) a un amperaje de 30 mA por gel y las mismas se llevaron a cabo hasta que el frente de corrida estuvo a 0.5 cm del borde inferior del gel. El revelado de los geles se realizó considerando la concentración proteica de las muestras ensayadas, siendo la tinción de plata (tinción neutra: AgNO₃ 0.1%, posterior revelado con Carbonato de Sodio 2.5% y Formaldehído 0.02%) adecuada para una concentración de 1-10 ng de proteína por banda o la tinción con Azul de Coomassie (0.05% Coomassie Brilliant Blue R-250, Metanol 45%, Ácido Acético 5%) para revelar una concentración de 0.1-0.5 µg por banda (Harlow, 1988). Los pesos moleculares aparentes de las proteínas se calcularon por comparación de las movilidades relativas de cada proteína (avance de la banda/avance del frente de corrida) con respecto a la de un mezcla estándar de peso molecular conocidos (M3913, Sigma) compuesta por: Suero albúmina bovina (66 kDa); ovalbúmina de huevo de gallina (45 kDa); gliceroaldehído-3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa); anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa); tripsinógeno de páncreas bovino (24 kDa); inhibidor de tripsina de soja (20 kDa); α-lactoalbúmina de leche bovina (14,2 kDa) y aprotinina de pulmón bovino (6,5 kDa)

4.6. Western blot.

Se realizó un SDS-PAGE, al 12,5% y 15%, en condiciones reductoras, para los extractos de trabajo y sus respectivos eluidos, sembrando por pocillo 10 µl de cada extracto de trabajo y 25 µl de cada eluido. Posteriormente, se realizó una transferencia semiseca a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm (NM, Bio Rad) usando buffer de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%v/v pH 8.3), durante 90 minutos a 1,2 mA/cm² (Kyhse-Andersen *et al*, 1984). Se tiñó la membrana con colorante Fast Green a modo de verificar la transferencia. Se destiño el colorante con agua y se bloquearon los sitios inespecíficos de la membrana con la solución de bloqueo (PBS 10 mM pH 7.3, Tween-20 1%) durante 18 horas a 4°C. La membrana se lavó 3 veces durante 5 minutos con solución de lavado PBS-T (PBS 10 mM pH 7.3, Tween-20 0.1%) y se incubó con los anticuerpos específicos diluidos en PBS-T (tabla 1) durante 1 hora a 25°C. Se utilizó suero de conejo hiperinmune anti-catepsina de *F. hepática* y suero de oveja inmunizada con LAP nativa de *F. hepática* (FhLAPn). Se prosiguió con otra serie de 3 lavados durante 5 minutos con PBS-T y a continuación se incubó con el respectivo conjugado diluido en PBS-T (Tabla 1) durante 1 hora a 25°C. Una última serie de 3 lavados durante 5 minutos con PBS-T dio paso a la incubación con la solución de revelado compuesta por 10ml de Buffer Trietanolamina 10 mM pH 7.5 (NaCl 128 mM, HCl 17 mM, Trietanol 21 mM), 2 ml de 4-cloro-1-naftol en metanol 2.8 mM y 5 µl de peróxido de hidrógeno 30%).

Tabla 1. Esquema de anticuerpos y conjugados utilizados en el western blot.

Especificidad	Anticuerpo	Conjugado
Catepsina	1/500 Suero de conejo α-Catepsina L1	1/1000 Anti Rabbit IgG
LAP	1/300 Suero de oveja inmunizada con FhLAPn *	1/3000 Anti Sheep IgG

* Correspondiente al ensayo 98-99 LAP 2, lote 336, semana 7.

4.7. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración proteica de los extractos de trabajos y sus respectivos eluidos cromatográficos se determinó con el kit de ácido bicinconínico (BCA Pierce, Thermo Scientific), en microplacas de 96 pocillos (MaxiSorp, NUNC). A partir de una solución 1 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA), usando buffer fosfato 10 mM pH 7.3 como diluyente, se prepararon los estándares de calibración para el método normal (50-1000 µg/ml) y el método potenciado (5-250 µg/ml). Para el método normal se sembró por pocillo 25 µl de estándar o de muestra, y 200 µl de la mezcla del reactivo de trabajo (50 partes del reactivo A y 1 parte del reactivo B). La incubación de la placa tapada fue de 30 minutos a 37°C en total oscuridad. Para el método potenciado se sembró por pocillo 10 µl de estándar o de muestra,

y 200 μ l de la mezcla del reactivo de trabajo antes descrita. Cada muestra se analizó por duplicado. La incubación de la placa tapada fue de 30 minutos a 60°C en total oscuridad. Para el ensayo del blanco se suplantó la muestra por el diluyente y dependiendo del tipo de método se siguieron las condiciones antes mencionadas. La placa se leyó a 560 nm en un lector de placas (MCC/340, MultiSkan)

4.8. Análisis enzimático de actividad proteolítica.

Para los distintos extractos y sus respectivos elúidos cromatográficos se evaluó la actividad proteolítica de catepsina (cisteína proteasa), legumaína (asparaginil endopeptidasa) y LAP (aminopeptidasa), en microplaca de fluorescencia de 96 pocillos (Nuclon, NUNC) digiriendo sustratos sintéticos acoplados a 7-amido-4-methyl-coumarin (AMC) y cuantificando la cantidad liberada de dicho fluoróforo. Para cada ensayo de actividad se realizó un estándar de calibración de AMC (concentraciones 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 μ M) a partir de una solución stock (10 mM) usando como diluyente el buffer ensayado para cada análisis. La cantidad de AMC liberado se midió con un fluorímetro lector de microplacas (Fluostar Galaxy) a λ_{ex} = 360nm y λ_{em} = 430nm, y dichos valores fueron interpolados, previa corrección por el blanco, en la recta obtenida a partir del estándar de calibración

Se definió una unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de AMC por minuto a 37°C.

4.8.1. Actividad catepsina.

Cada muestra se analizó por duplicado y se consideró un volumen total de reacción por pocillo de 200 μ l, en el cual 176 μ l buffer acetato de sodio 100 mM pH 5.0, más 4 μ l de DTT 100 mM (concentración final 2 mM) y 10 μ l de cada muestra (somático 1/1000, NR 1/500, elúidos somáticos sin diluir; PES 1/3000, NR 1/100, elúidos PES 1/250) se preincubaron a placa tapada durante 10 minutos a 37°C en oscuridad.

Posteriormente se adicionó el sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC, del cual se partió de una solución stock de 100 mM, se diluyó 1/100 y se agregó en la mezcla de reacción 10 μ l para obtener una concentración final de 50 μ M. La incubación se prolongó durante 60 minutos en las condiciones antes mencionadas. La lectura de la placa se realizó inmediatamente al concluir la incubación sin detener la reacción.

El ensayo de inhibición específica se realizó en 174 μ l del buffer acetato de sodio 100 mM pH 5.0 en presencia de 1 μ l de E-64 2.7 mM (concentración final 10 μ M), 4 μ l de DTT 100 mM (concentración final 2 mM) y 10 μ l de cada muestra (en las mismas diluciones utilizadas

para el ensayo convencional). El preincubado, el añadido del sustrato fluorogénico, la incubación y el registro de la placa se realizó como fue antes descrito.

4.8.2. Actividad LAP.

Cada muestra se analizó por duplicado y se consideró un volumen total de reacción por pocillo de 200 μ l, en el cual 178 μ l buffer glicina 100 mM pH 8.5, más 2 μ l de MnCl_2 100 mM (concentración final 1 mM) y 10 μ l de cada muestra (somático 1/100, NR 1/25, eluidos somáticos sin diluir; PES sin diluir, NR sin diluir, eluidos PES sin diluir) se preincubaron a placa tapada durante 10 minutos a 37°C en oscuridad.

Posteriormente se adicionó el sustrato fluorogénico L-Leu-AMC, del cual se partió de una solución stock de 10 mM, se diluyó 1/10 y se agregaron en la mezcla de reacción 10 μ l para obtener una concentración final de 50 μ M. La incubación se prolongó durante 60 minutos en las condiciones antes mencionadas. La lectura de la placa se realizó inmediatamente al concluir la incubación sin detener la reacción.

El ensayo de inhibición específica se realizó en 176 μ l del buffer glicina 100 mM pH 8.5 en presencia de 2 μ l de Bestatina 1 mM (concentración final 10 μ M), 2 μ l de MnCl_2 100 mM (concentración final 1 mM) y 10 μ l de cada muestra (en las mismas diluciones utilizadas para el ensayo convencional). El preincubado, el añadido del sustrato fluorogénico, la incubación y el registro de la placa se realizó como fue antes descrito

4.8.3. Actividad legumaina.

Cada muestra se analizó por duplicado y se consideró un volumen total de reacción por pocillo de 200 μ l, en el cual 175 μ l buffer fosfato citrato 100 mM pH 6.0, más 4 μ l de DTT 100 mM (concentración final 2 mM), 1 μ l de E-64 2.7 mM (concentración final 10 μ M) y 10 μ l de cada muestra (somático 1/20, NR 1/2, eluidos somáticos sin diluir; PES 1/500, NR 1/50, eluidos PES sin diluir) se preincubaron a placa tapada durante 10 minutos a 37°C en oscuridad. Este ensayo se realizó con la presencia de E-64 10 μ M, que inhibe la posible digestión del sustrato por parte de las catepsinas (L y B) lo cual evita interferencia en la medida de actividad fluorogénica (Delcroix *et al*, 2006)

Posteriormente se adicionó el sustrato fluorogénico Z-Ala-Ala-Asn-AMC, del cual se partió de una solución stock de 45 mM, se diluyó 1/45 y se agregó en la mezcla de reacción 10 μ l para obtener una concentración final de 50 μ M. La incubación se prolongó durante 60 minutos en las condiciones antes mencionadas. La lectura de la placa se realizó inmediatamente al concluir la incubación sin detener la reacción.

El ensayo de inhibición específica se realizó en 155 μ l del buffer fosfato citrato 100 mM pH 6.0 en presencia de 20 μ l de Iodoacetamida 100 μ M (concentración final 10 μ M), 4 μ l de DTT 100 mM (concentración final 2 mM), 1 μ l de E-64 2.7 mM (concentración final 10 μ M) y 10 μ l

de cada muestra (en las mismas diluciones utilizadas para el ensayo convencional). El preincubado, el añadido del sustrato fluorogénico, la incubación y el registro de la placa se realizó como fue antes descrito.

4.9. Análisis enzimático de actividad GST.

Se evaluó la actividad enzimática GST, según el método de Habig y colaboradores (Habig *et al*, 1974), en los extractos de trabajo, en las fracciones NR y en los algunos eluídos. El fundamento de esta técnica se basa en medir, por absorbancia a 340 nm, la formación de S-2,4-dinitrofenil-glutatión (DNPG) a partir de la reacción de conjugación entre el glutatión reducido (GSH) y el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) gracias a la acción de la GST. El ensayo se llevó a cabo en una cubeta de cuarzo de 1 ml (Sigma-Aldrich), en la cual se preparó la mezcla de reacción conteniendo 1 ml de buffer fosfato de potasio 100 mM pH 6.5, 10 μ l de muestra, 10 μ l GSH 100 mM (concentración final 1 mM) y 10 μ l CDBN 100 mM (concentración final 1 mM). El ensayo del blanco se realizó en ausencia de la muestra. Se cuantificó la absorbancia de dicha mezcla en el espectrofotómetro (Ultraspec 1000, Pharmacia Biotech) a intervalos de 1 segundo durante 1 minuto a una longitud de onda de 340 nm.

Se definió una unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mmol de DNPG por minuto a 25°C.

4.10. Espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Se repitieron las electroforesis SDS-PAGE antes descritas y se utilizó tinción con Coomassie Blue para los eluídos provenientes del extracto somático, y tinción de plata para los eluídos provenientes del extracto PES. Se consideraron todos los cuidados necesarios, durante el preparado de todas las soluciones y la manipulación de la técnica, para evitar contaminantes como queratina u otros que puedan interferir en el análisis. El ensayo de espectrometría de masas se llevó a cabo por la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (Instituto Pasteur, Uruguay), donde el patrón de masas peptídicas de las proteínas seleccionadas se realizó en un gel con tratamiento de tripsina (Sequencing-grade Promega) durante 18 horas a 37°C. Los péptidos fueron extraídos del gel usando 60% acetonitrilo en 0.2% TFA, se concentró por desecación al vacío y se removieron las sales usando una micro-columna de fase reversa C18 (OMIX Pippete tips, Varian). La elución de los péptidos desde la micro-columna se realizó directamente en el plato de muestras del espectrómetro de masa con 3 μ l de la solución matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 60% de acetonitrilo acuoso

conteniendo 0.2% TFA). El espectro de masa de la mezcla de digestión se adquirió con el instrumento 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) en modo reflector y se calibró externamente usando un mix de péptidos estándar (Applied Biosystems). Sobre los péptidos seleccionados se realizó el experimento de disociación inducida por colisiones MS/MS. Las proteínas se identificaron en la base de datos NCBI nr buscando péptidos respecto a valores m/z usando el programa MASCOT y usando los siguientes parámetros de búsqueda: tolerancia de masa monoisotópica, 0.05 Da; tolerancia de masa para fragmentos, 0.2 Da; oxidación de metioninas, se permitieron las máximas modificaciones posibles y la pérdida de un clivaje triptico. Posteriormente se realizaron búsquedas en las bases de datos NCBI nr y en la base de datos EST-invertebrados.

5. Resultados.

5.1. Estudio de interacción de heparina-fluoresceína con tejidos de *F. hepatica*.

A partir de la microscopia de fluorescencia se observó notoria reactividad en varias células parenquimáticas circundantes al intestino (Figura 3b, 3d y 3e), apreciándose por la gran intensidad de fluorescencia la cual contrastó notablemente con respecto al control negativo (Figura 3c). Se registró una fluorescencia considerable en las espinas del tegumento (Figura 3f y 3g) no así para el ensayo de control negativo (Figura 3c). Con una intensidad de fluorescencia menor se identificaron algunas células que componen las glándulas vitelinas (Figura 3h). A modo de corroborar la identidad de dichas glándulas vitelinas las mismas fueron visualizadas a $\lambda_{ex} = 340-380$ nm y $\lambda_{em} = 435-485$ nm, con lo cual se obtiene la auto fluorescencia de las mismas (Figura 3i). Se añadió una tinción con hematoxilina-eosina (Figura 3a) a modo de tener una clara referencia sobre la organización interna del parásito.

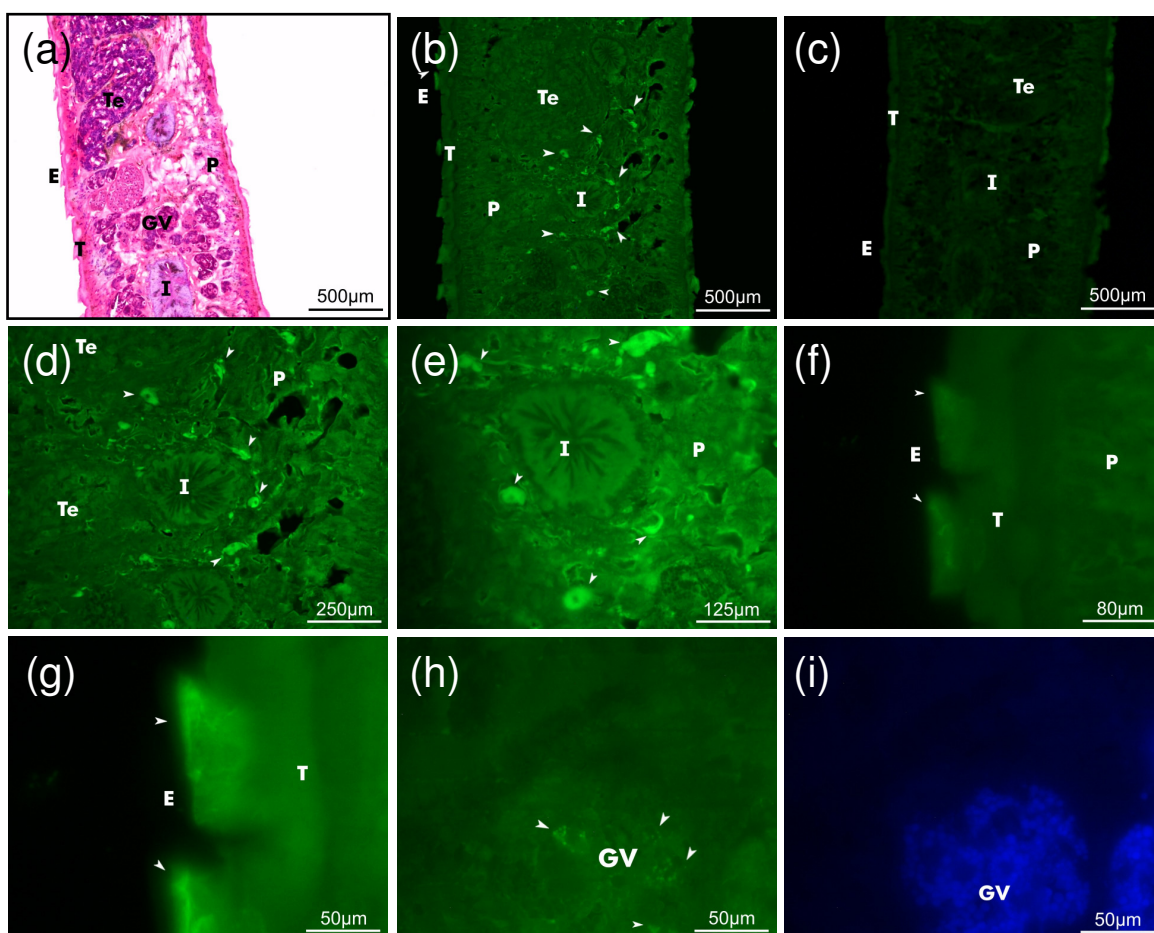


Figura 3. Microscopia de fluorescencia con Hp-FITC. Tejidos de *F. hepatica* adulta ensayada con 10 µg/ml de Hp-FITC en buffer tris-HCl 50 mM pH 8.0, incubada 18 hs a 37°C en total oscuridad. (a) Tinción con hematoxilina-eosina; (b) Tejido reactivo a Hp-FITC; (c) Control negativo sin Hp-FITC; (d)(e) Células del parénquima conjugadas; (f)(g) Espinas del tegumento reactivas; (h) Glándulas vitelinas reactivas; (i) Glándulas vitelinas autofluorescentes. E: espina; I: intestino; GV: glándula vitelina; P: parénquima; T: tegumento; Te: testes. Las flechas blancas indican la reactividad.

5.2. Aislamiento de proteínas de *F. hepatica* que interaccionan con una matriz de heparina.

A partir de los cromatogramas obtenidos para la cromatografía del extracto somático (Figura 4a) y del extracto PES (Figura 4b) se visualizaron las diferentes fracciones eluidas las cuales fueron colectadas.

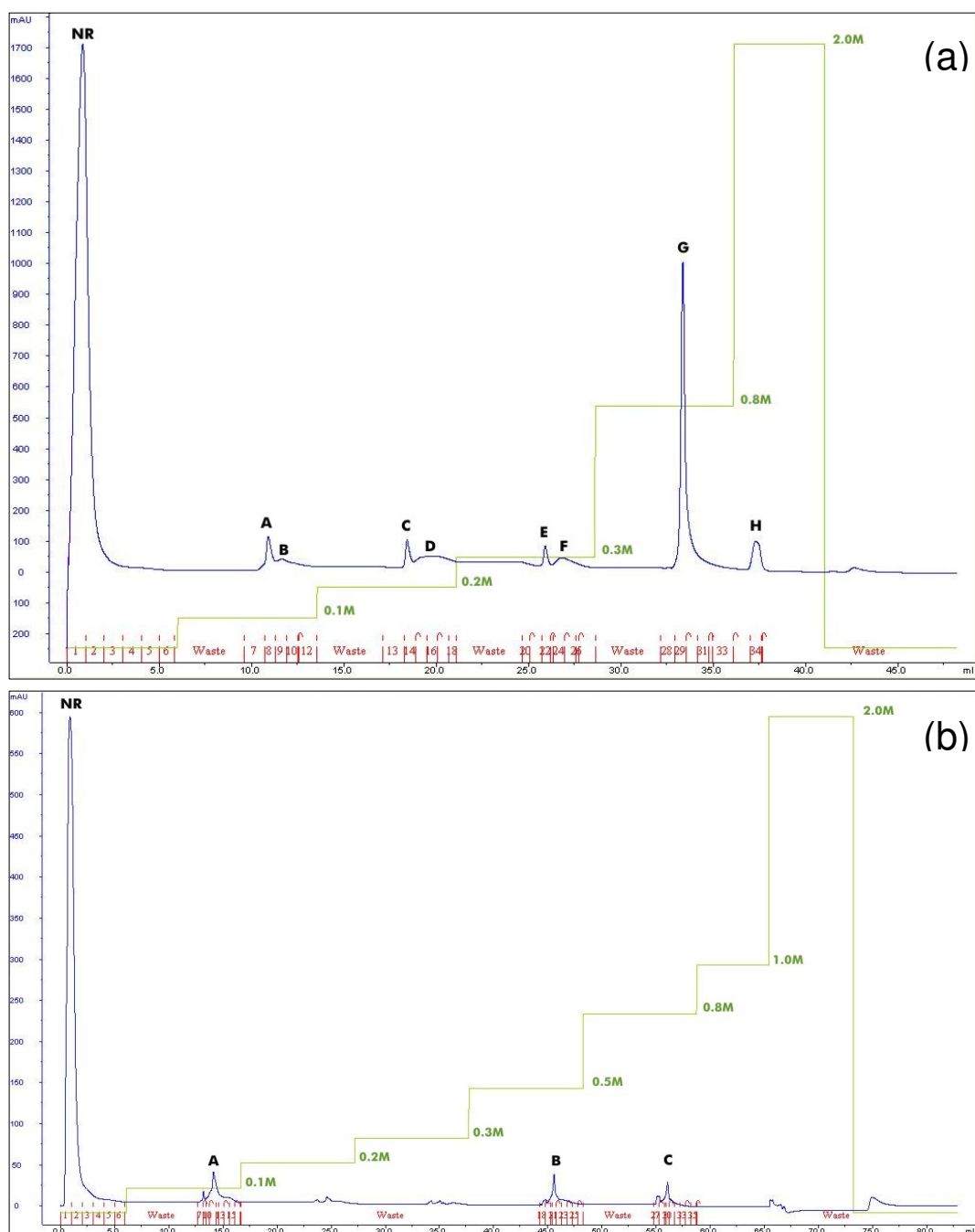


Figura 4. Cromatografías de afinidad a Heparina-Sefarosa. (a) Cromatograma correspondiente al análisis de 300 μ l del extracto somático de *F. hepatica* adulta. (b) Cromatograma correspondiente al análisis de 300 μ l del extracto PES de *F. hepatica* adulta. Los extractos parasitarios se aplicaron a la columna equilibrada con buffer fosfato 10 mM pH 7.0, conectada al equipo AKTA (GE). Se eluyó con buffer fosfato 10 mM pH 7.0, 0.1-2.0 M NaCl en gradiente escalonado (—) y se evaluó la presencia proteica mediante el monitoreo de la absorbancia a 280 nm (—). NR: fracción no retenida; A-H: fracciones eluidas.

El pico al comienzo del cromatograma corresponde a la fracción de proteínas no retenidas (NR) por la columna. Con los posteriores pasajes del buffer de elución con un gradiente escalonado de NaCl se obtuvieron las fracciones cuyos picos de absorbancia fueron colectados al sobrepasar el umbral de absorbancia previamente establecido. Dichas fracciones colectadas fueron identificadas con letras según se iban obteniendo. Para los eluidos del extracto somático (Figura 4a), se colectaron 8 fracciones eluidas, obteniéndose 2 fracciones para el gradiente escalonado de NaCl 0.1, 0.2 y 0.3 M, observándose un primer pico bien definido seguido de otro no tan definido. En cuanto a los eluidos del extracto PES (Figura 4b) solo se colectaron 3 fracciones eluidas, correspondientes a la concentración de 0.1, 0.5 y 0.8 M de NaCl del gradiente escalonado.

5.3. Patrón electroforético de proteínas de *F. hepatica* con interacción a heparina.

A las fracciones colectadas previamente se realizó una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) para visualizar el patrón proteico en cada eluido. Se realizaron tinciones con AgNO_3 y con Coomassie Blue, el primero para revelar la totalidad de proteínas existente y el segundo a modo de visualizar de manera cuantitativa las concentraciones de dichas proteínas. Se sembró el extracto de partida, la fracción no retenida y los distintos eluidos.

El patrón proteico de la cromatografía del extracto crudo (Figura 5a y 5b) se visualizó por medio de las 2 tinciones antes mencionadas, en cambio el patrón proteico de la cromatografía del extracto PES (Figura 5c) solo se visualizó por medio de una tinción con plata debido a la baja concentración proteica en los eluidos.

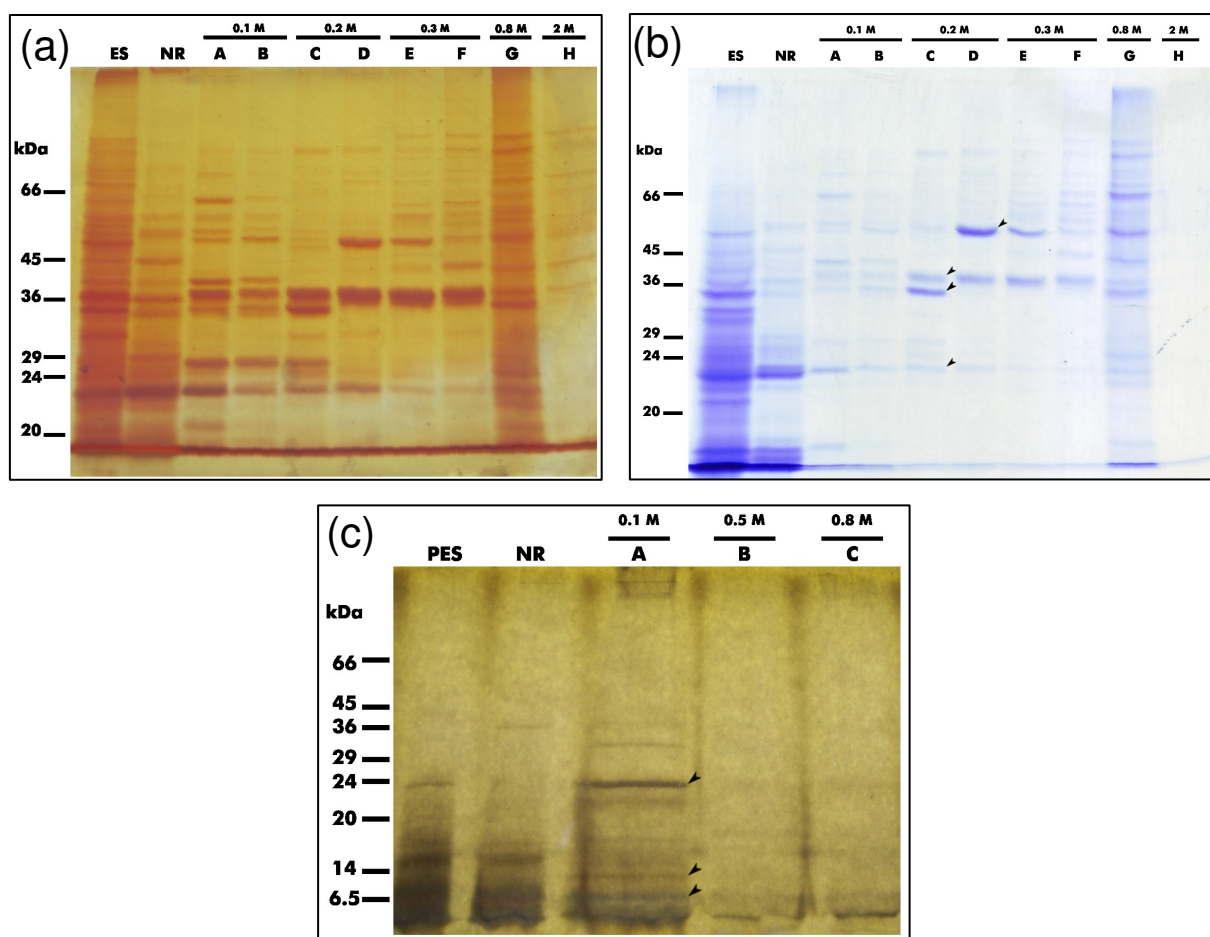


Figura 5. Análisis de las cromatografías por SDS-PAGE. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizante/reductoras. (a) Análisis del extracto somático en gel al 12.5% teñido con AgNO_3 . Volúmenes sembrados: 1 μl del extracto somático, 10 μl de NR y 15 μl de cada eluido (A-H) (b) Análisis del extracto somático en gel 12.5% teñido con Coomassie Brilliant Blue. . Volúmenes sembrados: 1 μl del extracto somático, 10 μl de NR y 15 μl de cada eluido (A-H) (c) Análisis del extracto PES en gel al 15% teñido con AgNO_3 . Volúmenes sembrados: 5 μl del extracto somático, 15 μl de NR y 20 μl de cada eluido (A-C) ES: extracto somático; PES: producto excreción/secreción; NR: fracción no retenida; A–H: fracciones eluidas. Las flechas negras indican las bandas analizadas por mapeo peptídico - Maldi-Tof. Se usó un marcador molecular de bajo rango (M3913, Sigma).

5.4. Análisis por Western Blot de proteínas de *F. hepatica* con interacción a heparina.

El análisis por western blot, usando suero α -CL1 y α -LAP, evaluó la existencia de dichas enzimas en los extractos de trabajo y en sus fracciones eluídas (Figura 6). El control negativo (no mostrado) no presentó reactividad y los controles positivos (C+) se comportaron como era de esperar, visualizándose reactividad cercana a los 24 kDa para CL1 recombinante de *F. hepatica* (FhCL1r) (Figura 6a y 6b), y cercana a los 67 kDa para LAP recombinante de *F. hepatica* (FhLAPr), compuesta por 55 kDa de la enzima más 12 kDa de la cola de tiorredoxina necesaria para su purificación (Acosta *et al*, 2008) (Figura 6b y 6d).

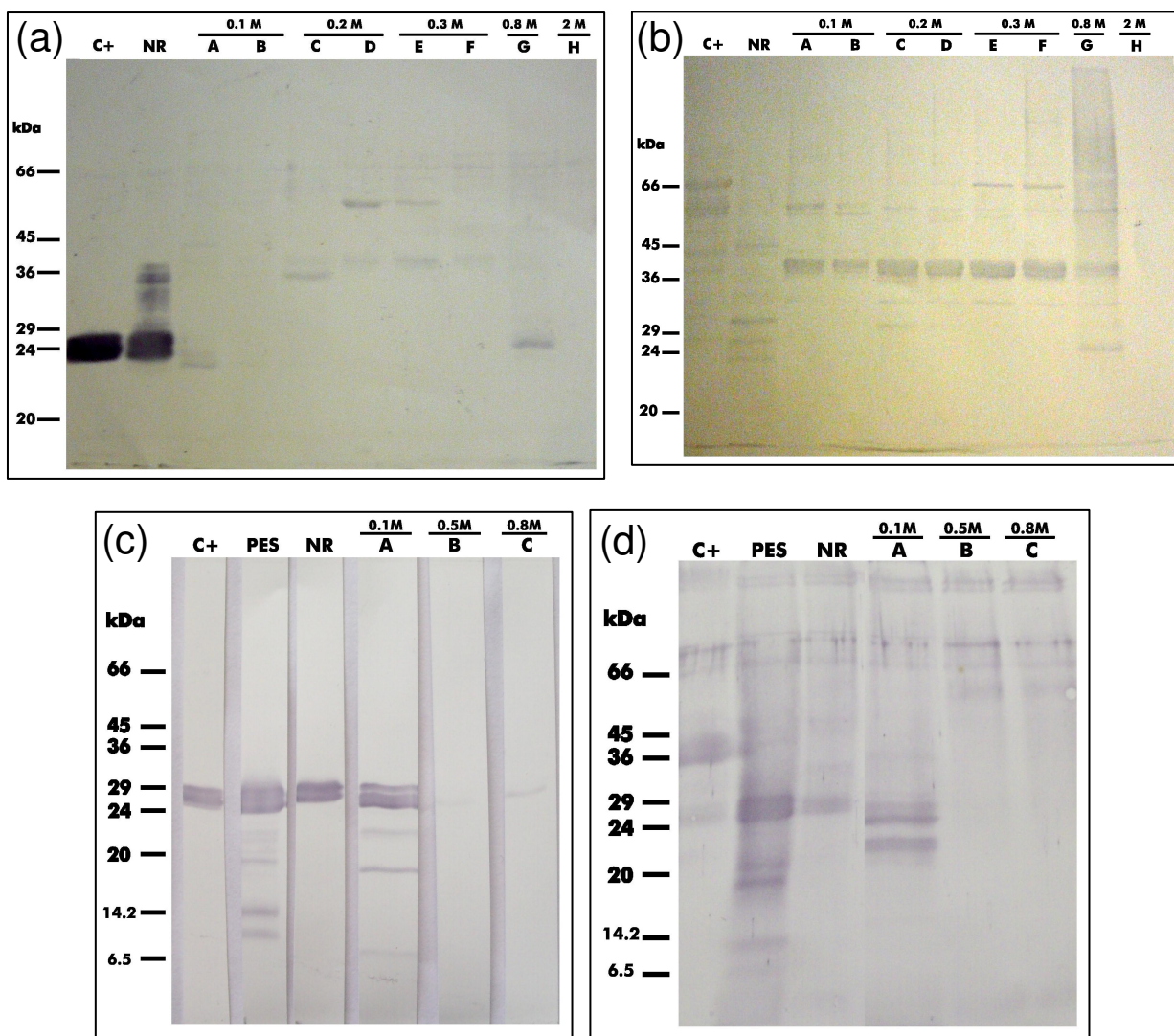


Figura 6. Análisis de las cromatografías por Western Blot. Se realizó un SDS-PAGE y la posteriormente transferencia a una membrana de nitrocelulosa 0.2 μ m. (a) Western blot al 12.5% α -catepsinas (dilución 1/500) sobre extracto somático y eluídos. C+: FhCL1r (b) Western blot al 12.5% α -LAP (dilución 1/300) sobre extracto somático y eluídos. C+: FhLAPr (c) Western blot al 15% α -catepsinas (dilución 1/500) sobre extracto PES y eluídos. C+: FhCL1r (d) Western blot al 15% α -LAP (dilución 1/300) sobre extracto PES y eluídos. C+: C+: FhLAPr. Se sembró 10 μ l de cada extracto de trabajo y 25 μ l de cada eluído. NR: fracción no retenida; A-H: fracciones eluídas. Se utilizó un marcador molecular de bajo rango (M3913, Sigma).

Tabla 2. Análisis enzimático del extracto somático y sus fracciones eluidas.

Muestra	Proteínas		Actividad Catepsina			Actividad LAP			Actividad Legumaina		
	mg/ml	mg totales	Actividad (U/ml)	A. total (U)	A.específica (U/mg)	Actividad (U/ml)	A. total (U)	A.específica (U/mg)	Actividad (U/ml)	A. total (U)	A.específica (U/mg)
Somático	14,021	4,206	2,430	0,729	0,173	0,186	0,056	0,013	0,0425	0,0127	0,0030
NR	0,926	0,926	0,194	0,194	0,210	0,006	0,006	0,006	0,0075	0,0075	0,0081
A	0,096	0,058	0,004	0,002	0,039	-	-	-	0,0007	0,0004	0,0068
B	0,057	0,034	0,001	0,001	0,016	-	-	-	0,0005	0,0003	0,0081
C	0,091	0,055	0,002	0,001	0,025	-	-	-	-	-	-
D	0,099	0,059	0,002	0,001	0,021	-	-	-	-	-	-
E	0,062	0,037	0,002	0,001	0,038	-	-	-	0,0003	0,0002	0,0047
F	0,056	0,034	0,002	0,001	0,028	-	-	-	-	-	-
G	0,209	0,126	0,012	0,007	0,058	-	-	-	0,0017	0,0010	0,0079
H	0,109	0,066	0,003	0,002	0,029	-	-	-	-	-	-

U: unidad de actividad enzimática = μmol de AMC/min a 37°C**Tabla 3.** Análisis enzimático del extracto PES y sus fracciones eluidas.

Muestra	Proteínas		Actividad Catepsina			Actividad LAP			Actividad Legumaina		
	mg/ml	mg totales	Actividad (U/ml)	A. total (U)	A.específica (U/mg)	Actividad (U/ml)	A. total (U)	A.específica (U/mg)	Actividad (U/ml)	A. total (U)	A.específica (U/mg)
PES	2,765	0,830	6,067	1,820	2,194	1,80E-04	5,40E-05	6,51E-05	0,264	0,079	0,095
NR	0,185	0,185	1,470	1,470	7,960	-	-	-	0,063	0,063	0,344
A	0,016	0,010	0,454	0,272	28,182	-	-	-	0,002	0,001	0,116
B	0,007	0,004	-	-	-	-	-	-	0,0003	0,0002	0,042
C	0,002	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-

U: unidad de actividad enzimática = μmol de AMC/min a 37°C

5.5. Análisis enzimático de actividad proteolítica en extractos y eluidos de *F. hepatica*.

Las actividades enzimáticas proteolíticas (catepsinas, LAP y legumina) se cuantificaron en el extracto somático (Tabla 2) y en el extracto PES (Tabla 3). Ambos extractos de trabajo presentaron las 3 actividades ensayadas en mayor o menor medida. En las fracciones no retenidas (NR) también se observó la actividad de las 3 enzimas evaluadas. En los eluidos cromatográficos, dependiendo del tipo de extracto de trabajo y del tipo de ensayo enzimático, se obtuvieron diferentes resultados. Se destacan la ausencia de actividad LAP para los eluidos de ambos extractos de trabajo, solo trazas de actividad legumina para los eluidos de ambos extractos de trabajo, y una alta actividad catepsina para el eluido a 0.1 M de NaCl del extracto PES. Los correspondientes ensayos de inhibición específica (ver anexo 2) corroboraron que se tratase efectivamente de las actividades analizadas, ya que se obtuvieron valores no interpolables, cercanos al blanco, e incluso valores que no fueron detectables.

5.6. Espectrometría de masas de proteínas de *F. hepatica* que interaccionan con heparina.

A partir del análisis del patrón proteico de los distintos eluidos se procedió a seleccionar algunas bandas que fueron analizadas por espectrometría de masa. El criterio utilizado para la selección de dichas bandas se conformó teniendo en cuenta la concentración proteica, la pureza de la banda (evitando otras bandas cercanas) y en base a referencias bibliográficas con la cual se pudiese inferir la identidad de alguna banda proteica.

A partir de los eluidos del extracto somático fueron analizadas 4 bandas pertenecientes a la fracción obtenida con una concentración NaCl 0.2 M (Figura 7a), las cuales fueron identificadas como la glutamato deshidrogenasa (GLDH) (54 kDa), la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de *F. hepatica* (39 y 36 kDa) y la glutatión S-transferasa clase sigma (GSTsi) de *F. hepatica* (23 kDa).

En cuanto para los eluidos del extracto PES fueron seleccionadas 3 bandas pertenecientes a la fracción obtenida con una concentración NaCl 0.1 M (Figura 7b). En este caso se identificaron 4 proteínas: la GSTsi de *F. hepatica* (24 kDa), una proteína de unión a calcio (CaBP) de *F. hepatica* (14 kDa), un inhibidor monomérico tipo Kunitz (KTMI) de *F. hepatica* y una molécula-1 de defensa de helmintos (HDM-1) de *F. hepatica* (ambas a 7 kDa).

Los pesos moleculares informados corresponden al peso molecular aparente calculado en referencia a la movilidad de cada proteína.

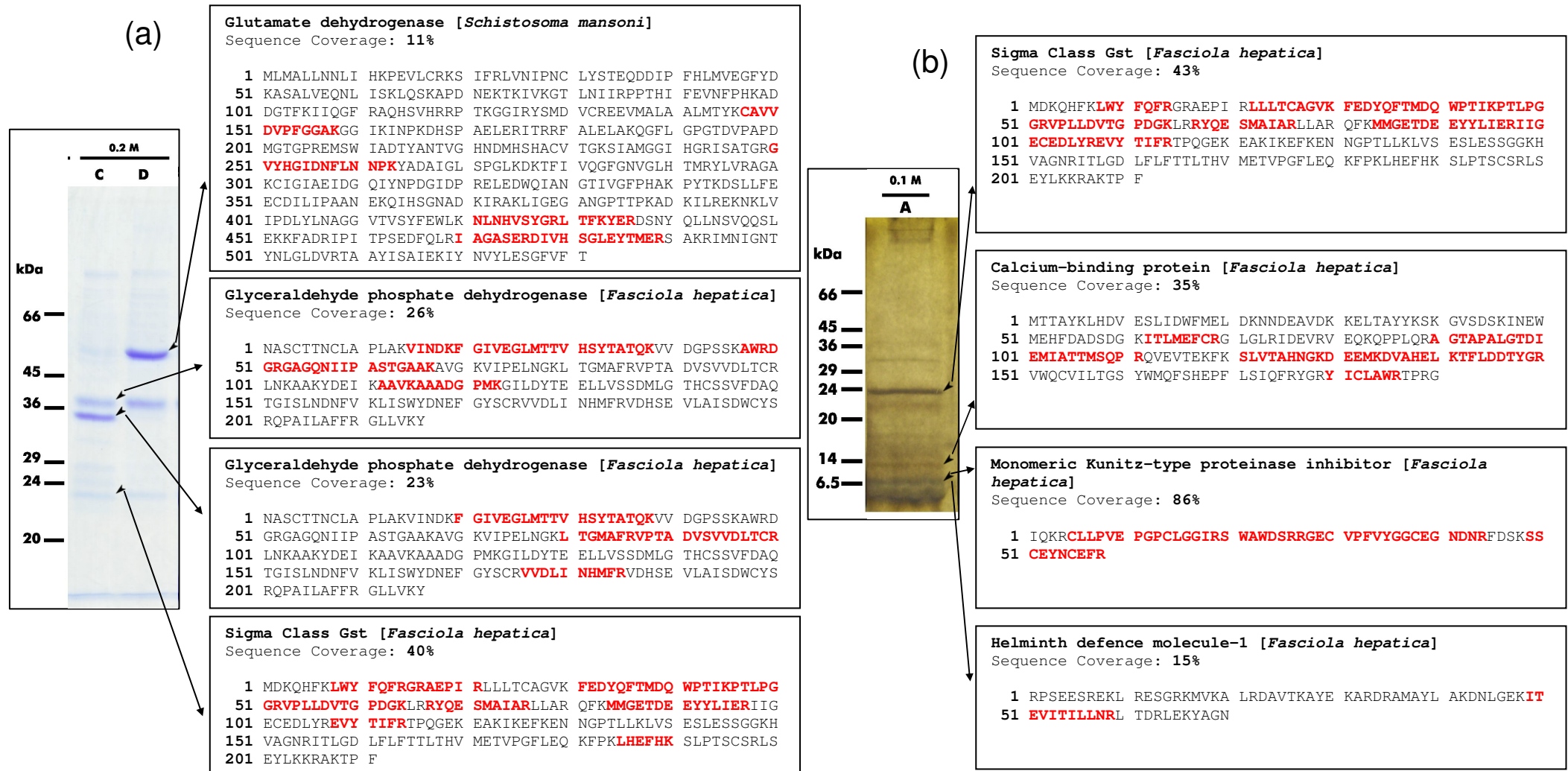


Figura 7. Resultados de la identificación proteica a partir del análisis por Maldi-ToF. (a) Resultados correspondientes a los eluidos del extracto somático. (b) Resultados correspondientes a los eluidos del extracto PES. Se identificaron los péptidos en la base de datos MASCOT. En rojo se señalan los péptidos que coincidieron con la secuencia de la base de datos.

5.7. Análisis enzimático de actividad GST de *F. hepatica* en extractos y eluidos.

A partir de la identificación de GST por medio de la espectrometría de masa se realizó un ensayo de actividad enzimática GST en los extractos de trabajo, en los eluidos NR y en las respectivas fracciones donde se identificó dicha enzima, a modo de comprobar el estado de la misma.

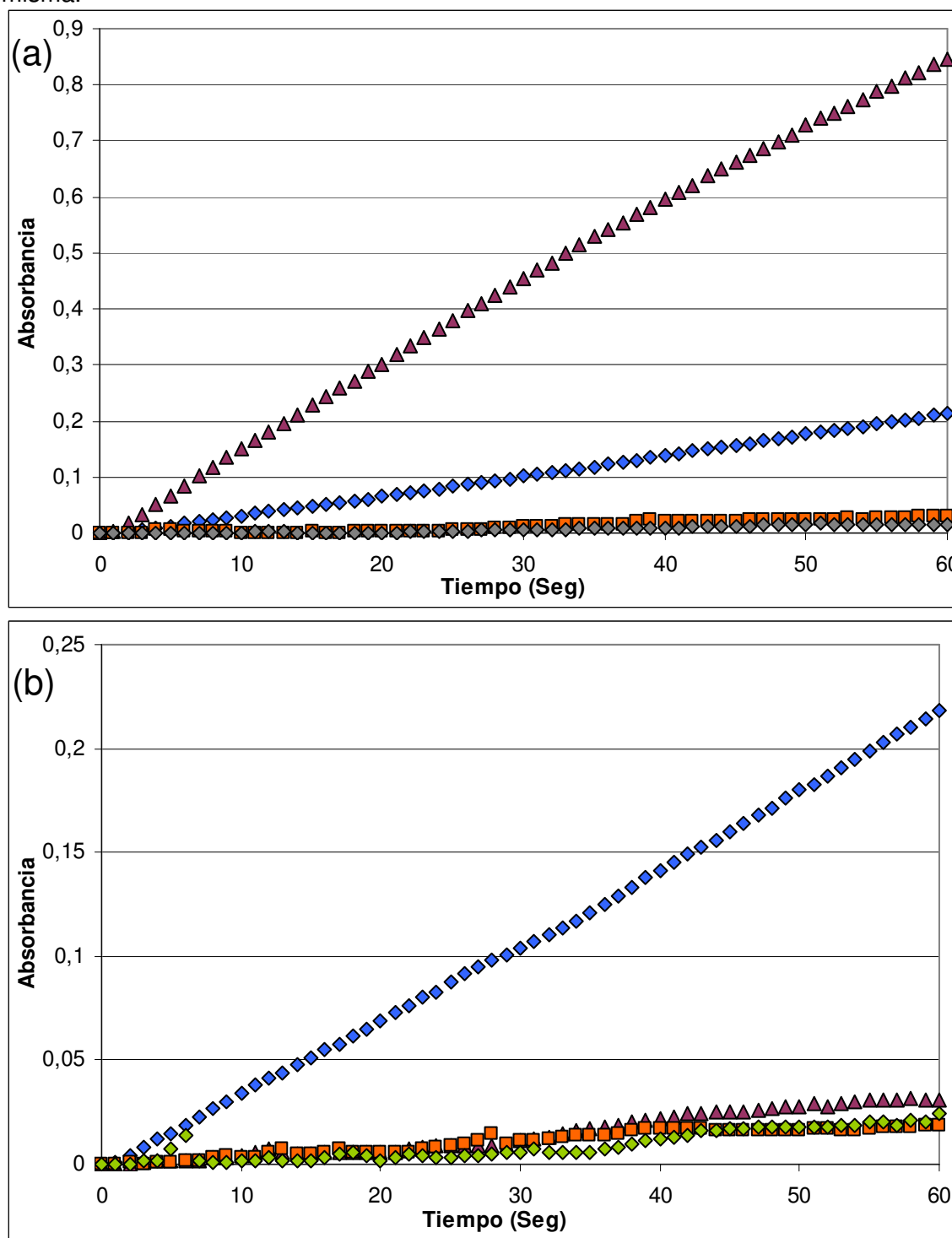


Figura 8. Curvas de absorbancia en función de tiempo correspondientes al ensayo de actividad GST. (a) Gráfico del extracto somático y sus eluidos. (b) Gráfico del extracto PES y sus eluidos.

(▲) Extracto de trabajo. (◆) *Fh*GST control 0.8 mg/ml. (■) Fracción NR (◊) Eluido C del extracto somático. (◊) Eluido A del extracto PES.

A partir de los gráficos correspondientes de absorbancia en función del tiempo (Figura 8) se calcularon las pendientes, y con el coeficiente de extinción molar del CDNB ($9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) se conformó el cuadro de datos (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis enzimático GST de los extractos de trabajo, en las fracciones NR y en los respectivos eluidos donde se identificó la GST.

Muestra	Pendiente	Proteínas		Actividad GST		
		mg/ml	mg totales	Act. (U/ml)	Act. total (U)	Act. específica (U/mg)
Somático	1,40E-02	14,02	4,21	489,00E-05	146,70E-05	34,88E-05
NR	5,50E-04	0,93	0,93	5,04E-05	5,04E-05	5,44E-05
C	3,20E-04	0,09	0,05	4,34E-05	2,60E-05	47,65E-05
PES	5,90E-04	2,77	0,83	17,94E-05	5,38E-05	6,49E-05
NR	3,30E-04	0,18	0,18	3,29E-05	3,30E-05	17,87E-05
A	3,60E-04	0,02	0,01	6,94E-05	4,17E-05	431,15E-05

U: unidad de actividad enzimática = mmol de DNPG/min a 25°C

6. Discusión.

La afección causada por *F. hepatica* conlleva pérdidas económicas importantes en el sector ganadero, siendo de sumo interés desarrollar un control inmunoproláctico para combatir este parásito. La línea de investigación de este trabajo se orientó a dar los primeros pasos en la identificación de estructuras celulares y proteínas del parásito con afinidad por heparina, aspirando a que estas últimas puedan llegar a ser evaluadas como nuevos blancos de acción para lograr vacunas eficaces.

A partir de la microscopia de fluorescencia con Hp-FITC en los cortes histológicos se observó la existencia de reactividad específica, la cual se visualizó con una fuerte intensidad de fluorescencia por parte de algunas células asociadas al parénquima (Figura 3d y 3e), especialmente en sus compuestos citosólicos. Fue por lo tanto presumible que las proteínas con afinidad por heparina encontradas a partir del ensayo cromatográfico del extracto somático se encuentren en la fase soluble de las células del parásito. En referencia a las proteínas con unión a heparina encontradas a partir de la cromatografía del extracto PES, sería esperable registrar fluorescencia en los epitelios que componen el intestino, lo cual no fue así, pero ya que la reactividad observada se corresponde con células circundantes al intestino estas posiblemente sean las principales responsables de producir la proteína de interés y secretarla hacia la luz intestinal.

Se observó fluorescencia asociada a las espinas del tegumento (Figura 3f y 3g), por lo cual se deberá profundizar en dicha área a fin de poder identificar los componentes involucrados en la interacción con heparina.

En cuanto a la fluorescencia visualizada en las células de las glándulas vitelinas (Figura 3h), se planteó la existencia de algún compuesto con afinidad a heparina. Estas glándulas contribuyen a la producción e incorporación del material (vitelo) que contienen los huevos y a la formación de la cubierta de los mismos (Cruz-Reyes, 2001). Lo antes mencionado no pudo ser confirmado ya que no se contó con cortes histológicos donde se apreciara la presencia de huevos.

Estos resultados fueron los más esclarecedores ya que fueron obtenidos al incubar los cortes con el conjugado fluorescente a 37°C. Se ensayó incubar a 4°C y 20°C pero los resultados mostraron fluorescencia nula o apenas apreciable en los preparados histológicos.

La microscopia de fluorescencia sirvió para evaluar, en una primera instancia, la existencia de proteínas de *F. hepatica* con afinidad por la heparina. Por lo tanto al ejecutar la cromatografía de afinidad, para los extractos de trabajo, era de esperar resultados positivos, lo cual se confirmó a partir de los cromatogramas del extracto somático (Figura 4a) y del

extracto PES (Figura 4b). El posterior análisis de los distintos picos obtenidos por medio de SDS-PAGE mostró un variado patrón proteico para el extracto somático (Figura 5a y 5b) y se infirió en cuanto a las concentraciones de dichas bandas por medio de la tinción cuantitativa con Coomassie-Blue. La electroforesis de los eluidos correspondientes al extracto PES (Figura 5c) solo se visualizó por medio de la tinción con AgNO_3 , en la cual casi la totalidad de las proteínas que interaccionaron con la matriz de heparina se obtuvieron en el eluido a 0.1 M.

Los ensayos de actividad proteolítica en los distintos eluidos, utilizando sustratos fluorogénicos, se ejecutaron con el fin de esclarecer en una primera instancia la existencia de afinidad por heparina de dichas enzimas, que han sido objeto de investigación e interés por parte de la Unidad de Biología Parasitaria (UBP, UdelAR). Como ensayo complementario se realizaron ensayos western blot para caracterizar catepsinas y LAP, para los cuales se utilizaron anticuerpos obtenidos de ensayos de inmunización realizados por la UBP en investigaciones pasadas.

A partir de los ensayos de actividad proteolítica, evaluando las actividades catepsinas, LAP y legumaina, por medio de sustratos fluorogénicos (Tabla 2 y 3) se obtuvieron diversas conclusiones.

Para el ensayo de la actividad de las catepsinas se confirmó la existencia de dichas enzimas en los extractos de trabajo al igual que ha sido descrito previamente (Berasain *et al*, 1997). Es de recordar que el preparado del extracto somático se realizó con inhibidores de entre los cuales se utilizó el inhibidor específico de catepsinas E-64 para evitar la que estas potentes proteasas accionaran sobre otras proteínas interfiriendo en su posterior identificación. Por lo cual a partir de este ensayo de actividad, para este extracto y sus diversos eluidos cromatográficos, no se puede inferir sobre la verdadera capacidad de interacción entre las catepsinas y la heparina.

En cuanto al extracto PES, se observó actividad enzimática en el extracto de trabajo, en la fracción NR y una elevada actividad específica en el eluido a 0.1 M de NaCl. Revisando bibliografía se encontró que las catepsinas X y B (humanas) poseen interacción con la heparina en las cuales se observó una modificación estructural y la estabilización de la enzima lo cual, en el caso de la CX le permite una mayor afinidad por el sustrato (nacimento *et al*, 2005), y a la CB la mantiene activa a pH alcalino (Almeida *et al*, 2001).

Para el ensayo de la actividad de LAP se observó que dicha enzima posee una actividad muy baja en especial para el extracto PES, por lo cual se consideró que la misma no se

encontró en un estado activo o sufrió degradación al momento de realizar los ensayos ya que en investigaciones previas se ha indicado la existencia de trazas de actividad LAP en el PES (Acosta *et al*, 1998). Por otro lado se esperó encontrar actividad LAP en el extracto somático ya que, si bien esta enzima se localiza en el tegumento y su extracción se ha descrito por medio del uso de detergentes (Acosta *et al*, 1998), la fricción mecánica al momento de preparar este extracto pudo liberar LAP del tegumento. Por lo tanto la baja actividad evaluada en este caso se atribuyó a la inhibición por Leupeptina, Apoprotinina, E-64, PMSF y EDTA, presentes en el cóctel de inhibidores que se utilizó al momento de preparar el extracto somático, de los cuales se evaluó que inhiben la actividad de LAP recombinante entre un 40-80% (Acosta *et al*, 1998 y 2008). Para ambos extractos de trabajo no se visualizó actividad enzimática en los eluidos cromatográficos por ende se presume la ausencia de afinidad por heparina.

Finalmente el ensayo de actividad de la legumaina mostró bajos niveles de actividad en ambos extractos de trabajo y aún inferiores en los diversos eluidos obtenidos, no obstante los mismos fueron cuantificables en su gran mayoría. Por ello se atribuyó una baja afinidad por heparina por parte de esta enzima.

El ensayo de western blot para revelar catepsina y LAP ofreció información complementaria para evaluar la capacidad de unión a heparina de las proteínas antes mencionadas.

Para el extracto somático se observó la existencia de catepsinas (Figura 6a) en la fracción NR al observarse una banda revelada cercana a los 24 kDa. En los eluidos posteriores solo se visualizó una banda tenue en el entorno de los 24 kDa correspondiéndose en el eluido con 0.8 M de NaCl, por lo cual se concluye que la catepsina no posee una gran afinidad por la matriz de heparina. Posiblemente el haber utilizado el inhibidor E-64 al momento de preparar el extracto de trabajo no solo interfirió en los ensayos de actividad sino que pudo interferir en el posible sitio de interacción de la proteína para con la heparina. Se observaron otras bandas tenues a diversos pesos moleculares, por lo cual se puede concluir la existencia de reactividad cruzada con otros compuestos del extracto somático. Se podría atribuir que la banda de aproximadamente 36 kDa en la fracción NR se corresponde con la procatepsina L1 ya que el peso de la misma es de 37 kDa (Stack *et al*, 2008).

En cuanto al ensayo realizado sobre el extracto PES se pudo comprobar que las catepsinas (Figura 6c) se revelaron en el extracto de partida, en la fracción NR y en el eluido a 0.1 M de NaCl, por lo cual se puede atribuir la existencia de cierta afinidad por la heparina. La conclusión que se obtuvo de éste ensayo se contrapone con el del extracto somático donde se utilizó el inhibidor E-64, siendo por lo tanto éste último un posible factor que pudo alterar la afinidad por la heparina. También se observaron bandas de menor intensidad entre los

6.5-20 kDa tanto en el extracto PES como en el eluido a 0.1 M de NaCl lo cual podría atribuirse a posible reactividad inespecífica o residuos peptídicos de catepsinas degradadas.

El análisis del extracto somático, en referencia a la LAP (Figura 6b), era de esperar observar reactividad cercana a los 55 kDa correspondiente a la proteína nativa, la cual se visualiza claramente en el eluido a 0.1 M de NaCl y muy tenuamente para el resto de los eluidos. Por otro lado se observó intensa reactividad, entre los 36-45 kDa, en todos los eluidos del gradiente escalonado con NaCl y en otras bandas de diverso peso molecular, lo cual se atribuye a reactividad cruzada. Por último, el análisis de LAP en el extracto PES (Figura 6d) mostró gran intensidad en el extracto de partida, entre los 24-29 kDa, lo cual no concordó con el peso esperado para la LAP de 55 kDa. En los eluidos se observó reactividad inespecífica o cruzada con otros compuestos cuyo peso molecular difiere de la enzima nativa de 55 kDa. Posteriormente se investigó sobre la procedencia de dicho suero, el cual provino de un ensayo de vacunación en el cual también se inmunizó con catepsinas, siendo esto una causante de la reactividad inespecífica que se visualiza. Por lo antes mencionado no se puede afirmar si las bandas de aproximadamente 55 kDa en los eluidos corresponden a LAP.

Profundizando en los resultados obtenidos a partir de la espectrometría de masa se observó que las proteínas que fueron identificadas en este trabajo ya habían sido descritas con anterioridad en diversos ensayos de proteómica y de caracterización. Solo una proteína fue identificada por homología con *S. mansoni*, la GLDH. La investigación en el trematodo *S. mansoni*, a diferencia de *F. hepatica*, se encuentra avanzada en cuanto a estudios de proteómica, y su genoma ha sido secuenciado y publicado.

La GST (EC 2.5.1.18) comprende a una superfamilia de proteínas multifuncionales ampliamente distribuidas en plantas y animales, y cuyo principal rol es la detoxificación celular. Esta superfamilia esta dividida en cuanto a su localización: familia citoplasmática, familia mitocondrial, familia microsomal y familia fosfomicina/glioxalasa (presente en antibioticos bacterianos). Las GSTs citoplasmáticas (a las cuales nos referiremos de ahora en más) conforman el grupo más grande y diverso, por lo cual se clasifican en clases: Alpha, Mu, Pi, Sigma, Phi, Zeta y Omega. Todas tienen en común ser proteínas diméricas solubles cuyas subunidades pueden ser idénticas o distintas. Entre los parásitos helmintos las distintas clases de GSTs difieren en cuanto al sustrato específico, la actividad catalítica y su inmunogenecidad, pero mantiene en común su principal rol: la actividad detoxificante de compuestos electrofílicos reactivos al catalizar su conjugación con glutatión, para compuestos endógenos (metabolitos del parásito) y exógenos (producidos por el sistema

inmune del huésped). Las GSTs de adultos de *F. hepatica* poseen un tamaño entre 23-26.5 kDa y se las pudo catalogar en 3 clases siendo éstas: 4 isoenzimas de GST clase mu (Robinson *et al*, 2009; Salvatore *et al*, 1995), una GST clase omega (Chemale *et al*, 2006) y una GST clase sigma (GSTsi) (LaCourse *et al*, 2012). En particular, para esta última se atribuyó otro rol de suma importancia como lo es la modulación a la respuesta inmune del huésped. Está demostrado que el PES posee componentes que actúan de manera inmunosupresora sobre la respuesta inmune del huésped (Cervi *et al*, 1996). Se describió la existencia de GSTsi en el PES (Cervi *et al*, 1999; Chemale *et al*, 2006), la cual ensayada *in vivo* demostró alterar la función de células dendríticas (Dowling *et al*, 2010), es por lo tanto que la existencia de dicha enzima en el PES, tanto en el estadio adulto como larvario, podría favorecer la sobrevivencia del parásito en el huésped. Por otro lado, las prostaglandinas pueden causar un estado de inmunosupresión (Goodwin *et al*, 1983), siendo éstas los mayores mediadores lipídicos detectados en helmintos y teniendo a la GSTsi como la principal enzima vinculada a la producción de las mismas (Cubata *et al*, 2000), por lo cual esto avala aún más la capacidad inmunomoduladora de la GSTsi (Arbildi *et al*, 2011).

La localización de la GSTsi en adultos de *F. hepatica*, por medio de inmunohistoquímica, está descrita en glándulas vitelinas, en huevos en desarrollo, en el parénquima y en el tegumento (LaCourse *et al*, 2012). En este trabajo, a partir de la microscopia de fluorescencia con HP-FITC se visualizó reactividad en los sitios antes mencionados excepto en huevos ya que no se contó con un corte histológico en presencia de los mismos. En referencia a las otras GSTs, estudios de inmunofluorescencia de las diversas isoenzimas de GST clase mu mostraron una distribución en el parénquima, en el tegumento y sobre la superficie lamelar de las células del intestino (Creaney *et al*, 1995b).

En cuanto a su uso como inmunógeno, recientemente se ha ensayado una vacuna con GSTsi recombinante de *F. hepatica*, y aunque no se observaron variaciones en cuanto a la cantidad y morfología de los parásitos, con respecto al grupo control, si se observó una reducción de los daños hepáticos durante las fases tempranas de la infección, lo cual pone a consideración esta enzima para ser incluida dentro de una posible vacuna multivalente (LaCourse *et al*, 2012).

A modo complementario, con el ensayo de actividad GST (Tabla 4) se corroboró la presencia de GSTs en los extractos parasitarios. Este ensayo no permite discriminar la clase de GST ya que todas conjugan GSH a CDNB, tratándose así de un ensayo genérico. Se observó actividad en ambos extractos de trabajo, en las fracciones NR y en los eluidos donde se identificó la GSTsi, siendo en éstos últimos donde se encontró la mayor actividad

específica. No se puede afirmar que dicha actividad sea producto exclusivamente de la GSTsi ya que: se utiliza un sustrato genérico para GSTs y cabe la posibilidad de que las isoenzimas de GSTmu posean afinidad por heparina, ya que a partir de los eluidos cromatográficos del extracto somático (Figura 5a) se observa una banda entre 24-29 kDa que podría corresponderse con la GSTmu de *F. hepatica* de 26 kDa. Por el momento solo se puede afirmar que las GSTs presentes en los extractos se encontraban activas antes y después de realizada la cromatografía.

La enzima GLDH (E.C. 1.4.1.2) se localiza en la mitocondria de los eucariotas. En mamíferos esta vinculada al ciclo de excreción de la urea, siendo esta una reacción que ocurre en la matriz mitocondrial de los hepatocitos donde el aminoácido L-glutamato es desaminado para dar alfa-cetoglutarato y amonio, y este último es conjugado a otros compuestos para finalmente convertirse en urea, facilitando así la eliminación de la misma (Lehninger, 2001). La GLDH tiene tanto la capacidad de desaminar como transaminar; en mamíferos ocurre principalmente la desaminación oxidativa pero en plantas puede trabajar en ambos sentidos dependiendo del ambiente y del estrés a la que esté sometido. En cuanto a la GLDH de *F. hepatica* se puede llegar a proponer que posee un rol bidireccional; por un lado favoreciendo la eliminación de los grupos amino pertenecientes a los aminoácidos degradados de forma intracelular o minimizando una posible afectación local ante la presencia de NH_4^+ en sangre producida por el huésped (Herrerías, 1996). La localización de GLDH se ha descrito en adultos de *F. hepatica* por ensayos de histoquímica enzimática, obteniendo actividad muy fuerte en la zona circundante a los testes, fuerte actividad en células del parénquima y del epitelio intestinal. En dicho ensayo el sustrato de la enzima fue ácido alfa-ketoglutarico, el cual es un intermediario en el ciclo del Krebs (David *et al*, 1968), con lo cual se le podría asignar un rol en el metabolismo energético del parásito.

En este ensayo la GLDH se identificó por homología con la GLDH de *S. mansoni* de 58.8 kDa. El análisis de masa de este trabajo también evidenció un alto porcentaje de homología con una proteína de 180 aminoácidos (aa) y 21 kDa perteneciente a la base de datos ESTs de *F. gigantica*, por lo cual no se posee más información para corroborar la identidad de nuestra proteína investigada.

La enzima GAPDH (E.C. 1.2.1.12) en células eucariotas esta vinculada al metabolismo energético ya que forma parte en la glucólisis, catalizando la síntesis del 1,3-bisfosfoglicerato a partir del gliceraldehído 3-fosfato (Lehninger, 2001). Su localización es citoplasmática a raíz de que todos los pasos de la glucólisis ocurren allí.

Esta enzima se identificó, por espectrometría de masa, a partir de 2 bandas proteicas cuyos pesos moleculares fueron cercanos a los 36 kDa (Figura 7a), lo cual difirió del peso molecular de 23.3 kDa (216 aa) informado en la base de datos NCBI (GenBank: AAG23287.1). La razón de tal diferencia es que la secuencia de GAPDH de *F. hepatica* se encuentra incompleta y el peso molecular informado corresponde al fragmento hasta ahora descrito. En *S. mansoni* se describió una GAPDH (GenBank: P20287.1) de 37 kDa (338 aa) (Goudot-Crozel *et al*, 1989). A partir de un alineamiento local entre la misma y el fragmento de *F. hepatica* (GenBank: AAG23287.1) se obtuvo un 57% de cobertura para la cual el primer aminoácido del fragmento de secuencia de GAPDH de *F. hepatica* se alineó con el aminoácido 150 de la secuencia de GAPDH de *S. mansoni*, dando un 84% de identidad. La diferencia en el peso molecular de las dos bandas, de las cuales se procedió con la identificación, podría deberse a la existencia de sitios glicosilados de la proteína.

En *F. hepatica* a esta enzima se la localizó en el tegumento y superficie (Boukli *et al*, 2011), atribuyéndose de esta manera un posible rol en defensa y evasión a la respuesta inmune del huésped en conjunto con la hipótesis del recambio tegumentario en parásitos adultos (Morphew *et al*, 2007). También se la puede asociar con la producción de energía necesaria para la contracción muscular involucrada en el transporte y movilidad del parásito.

Recientemente se han realizado ensayos de inmunización, en ratas, con la fosfoglicerato quinasa de *F. hepatica* (Jaros *et al*, 2010), la cual es una enzima involucrada en la glucólisis, y su rol en dicha vía se encuentra a continuación del de la GAPDH. En dicho trabajo, si bien los resultados fueron diversos a causa de factores como la composición del antígeno (ADN o proteína), la dosis, las vías y el número de inmunizaciones, se logró un nivel de protección máxima del 69%. A partir de este resultado se puede comenzar a pensar que enzimas involucradas en el metabolismo energético del parásito pueden ser posibles blancos de vacuna.

En cuanto a la CaBP se ha descrito en todos los organismos eucariotas. En *F. hepatica* se ha clonado y expresado una CaBP de 22 kDa, la cual se encuentra en el PES de parásitos adultos (Ruiz de Eguino *et al*, 1999). Por otro lado se ha descrito la presencia de CaBP en el tegumento en un estrecho vínculo con la cadena liviana de la miosina en el rol de la contracción muscular (Russell *et al*, 2007), con lo cual esta proteína gana atención como un posible blanco de vacuna.

Estudios realizados en *F. gigantica* evidenciaron la existencia una CaBP, con un 96,3% de homología con la CaBP de *F. hepatica* de 22 kDa, y se la localizó como el mayor componente del tegumento en parásitos adultos (Vichasri-Gramsa *et al*, 2005).

No se conoce exactamente la función biológica de dicha proteína pero se asume que ejerce un rol importante en las células del parásito en cuanto a la señalización de vías, en la

transducción de señales y en cuanto a su afinidad por otras proteínas en base a la unión o no del calcio.

El KTMI es un polipéptido de 6.75 kDa que fue identificado por su similitud con inhibidores tipo kunitz en plantas. En *F. hepatica* se lo ha localizado en el PES y se atribuye, que junto a la CL1, es de las proteínas más abundantes en este extracto (Wilson *et al*, 2011). Se ha sugerido la expresión de varios tipos de KTMI a partir de la identificación de varios polimorfismos. La localización de este polipéptido en adultos de *F. hepatica*, por estudios de inmunofluorescencia indirecta e inmunomarcación, se observó en el intestino, el parénquima y en el tegumento (Bozas *et al*, 1995).

En cuanto a su función si bien se describió la unión a catepsinas propias del parásito (Muiño *et al*, 2011), también cumple el rol de inhibir serina, cisteína y aspartil proteasas (Rawlings *et al*, 2004), asumiendo que en este último caso se trata de un rol defensivo ante proteasas del huésped de las cuales algunas pueden estar involucradas con etapas de la respuesta inmune, por ende se les podría asignar un rol inmunomodulador.

Recientemente se describió una proteína en *F. hepatica*, la HDM-1, que posee una notable similitud en cuanto a su estructura y función respecto a CAP18, el cual es un péptido de defensa de la familia de las catelicidinas del sistema inmune innato humano. Por medio de escisión proteolítica sobre el extremo carbonilo terminal de CAP-18, se libera el péptido LL-37 que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y cuyo rol involucra acciones efectoras, como la rotura de membranas bacterianas (Auvynet *et al*, 2009), y la modulación de la respuesta inmune, evitando la activación de macrófagos por los receptores tipo tolls (TLR) a partir de inhibir los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos con lo que disminuye la liberación de citoquinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF (Mookherjee *et al*, 2006). En la HDM-1 también ocurre escisión proteolítica del extremo carbonilo terminal, por acción de la CL1, liberando un péptido de 34 aa (Robinson *et al*, 2011). La HDM-1 tiene un peso de 8 kDa y posee 90 aa en comparación con los 170 aa de CAP18, pero a pesar de dicha diferencia existen regiones conservadas entre ambas, en especial en los extremos carbonilo terminal con una conformación anfipática. Tanto la HDM-1 como su fragmento extremo carbonilo terminal se encuentran en el PES por lo cual se asume que no todo el clivaje ocurre en el intestino del parásito y se asume un posible clivaje por medio de proteasas propias del huésped (Robinson *et al*, 2011).

Se ha propuesto que la secreción de HDM-1 tiene como fin evitar altas concentraciones de LPS bacterianos, que puede ocurrir debido a traslocaciones de *Escherichia coli* y enterococos, de la flora bacteriana del huésped, por la rotura de las uniones entre los hepatocitos a causa del aumento de presión dentro de los canalículos biliares por su

obstrucción con *F. hepatica*, como por la ocurrencia de coinfecciones bacterianas de otra índole, y que puedan dar lugar a una excesiva respuesta inmune la cual derive en un shock séptico y la muerte (Ogunrinade *et al*, 1982; Valero *et al*, 2006; Giuliani *et al*, 2010). Por lo tanto la acción de HDM-1 controlaría la activación de macrófagos mediada por LPS, al neutralizar su potencial biológico, evitando una respuesta inflamatoria excesiva con lo que se prolonga así la vida del huésped y por ende la del parásito (Robinson *et al*, 2011).

Si bien diversos estudios consideran este péptido como una posible vía para el desarrollo de terapias anti-inflamatorias, desde el punto de vista en que se enfoca este trabajo tal vez no sea ventajoso su utilización como blanco de vacuna ante el riesgo de una posible reacción cruzada con los péptidos de defensa propios del huésped, lo cual comprometería la salud y viabilidad del mismo ante una infección bacteriana.

Para concluir en cuanto a la ejecución de este plan de trabajo, cabe destacar el cuidado en la preparación y manipulación de los buffers, muestras y técnicas realizadas que posibilitaron una exitosa identificación proteica por espectroscopia de masa y sin las habituales interferencias producidas por la queratina u otros contaminantes.

A modo de resumen se esquematizan todas las proteínas identificadas en este trabajo y sus datos más relevantes (Tabla 5).

Tabla 5. Cuadro esquemático referente a las proteínas identificadas en los eluidos de trabajo.

Proteína	Extracto / eluido	Peso molecular	Localización	Función
Glutación S-transferasa clase sigma (GSTsi)	Somático / Eluido C (0,3M)	24.5 kDa	Glándulas vitelinas, huevos, parénquima y tegumento. (1)	Actividad detoxificante / Modulación a la respuesta inmune del huésped.
	PES / Eluido A (0,1M)			
Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	Somático / Eluido C (0,3M)	37 kDa (Posible homología con <i>S.mansoni</i>)	Tegumento y superficie. (2)	Desaminación y transaminación / Posible rol en metabolismo energético.
Glutamato deshidrogenasa (GLDH)	Somático / Eluido D (0,3M)	58,8 kDa (por homología con <i>S. mansoni</i>)	Testes, parénquima y epitelio intestinal. (3)	Rol energético / Posible rol de defensa y evasión de la respuesta inmune del huésped.
Proteína de unión a calcio (CaBP)	PES / Eluido A (0,1M)	22 kDa	Tegumento. (4)	Posible rol de señalización de vías y transducción de señales.
Inhibidor monomérico tipo Kunitz (KTMI)	PES / Eluido A (0,1M)	6,75 kDa	Epitelio intestinal, parénquima y tegumento. (5)	Posible rol inmunomodulador a partir de inhibir diversas proteasas.
Molécula-1 de defensa de helmintos (HDM-1)	PES / Eluido A (0,1M)	8 kDa	Sin determinar. Se asume: Epitelio intestinal y/o tegumento.	Modulación de la respuesta inmune del huésped evitando su activación por LPS.

1 - LaCourse *et al*, 20122 - Boukli *et al*, 20113 - David *et al*, 19684 - Russell *et al*, 20075 - Bozas *et al*, 1995

7. Conclusiones.

Se pudo aseverar la existencia de proteínas de adultos de *F. hepatica* (antígenos expuestos y ocultos) que poseen afinidad por heparina, identificándose la glutamato deshidrogenasa, la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, una proteína de unión a calcio, un inhibidor monomérico tipo Kunitz, una molécula-1 de defensa de helmintos y la glutatión S-transferasa clase sigma, de cuales solo esta última ha sido ensayada como inmunógeno hasta el momento.

A partir de la microscopía de fluorescencia se concluyó que los sitios con reactividad a heparina son concordantes con los sitios de localización de las proteínas que se identificaron por espectrometría de masa.

Hasta el momento las GSTs se purifican por cromatografía en una columna de glutatión-agarosa (Chemale *et al*, 2006). A partir de este trabajo se podría evaluar una manera alternativa de obtener una fracción enriquecida en GSTsi nativa ya que se ha descrito que la misma posee poca afinidad por el glutatión (Brophy *et al*, 1990).

En base a todo lo expresado en este trabajo, se tienen como futuros objetivos el continuar identificando y evaluando todas las proteínas presentes en los eluidos, profundizar en la interacción y el rol que las mismas tienen con la heparina, y eventualmente dar lugar a los correspondientes ensayos de inmunoprotección en animales experimentales con el fin de evaluar su potencial protector contra la fasciolosis.

8. Bibliografía.

- 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 and Biochemical Parasitology*, 158(1), 52–64.
- Acosta, D., Goni, F., Carmona, C. (1998). Characterization and partial purification of a leucineaminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*, 84(1), 1–7.
- Almeida, P. C, Nantes, I. L., Chagas, J. R., Rizzi, C., Faljoni-Alario, A., Carmona, E., Juliano, L., Nader, A. K., Tersariol, I. (2001). Cathepsin B Activity Regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 944-951
- Antonyuk, S. V., Strange, R. W., Marklund, S. L., Hasnain, S. S. (2009). The Structure of Human Extracellular Cooper-Zinc Superoxide Dismutase at 1,7 Å Resolution: Insights into Heparin and Collagen Binding. *Journal of Molecular Biology*, 388(2), 310-326
- Arbidi, P., La-Rocca, S., Fernández, V. (2010). Glutathione transferases in helminth parasites. *Reserch in Helminths*, Chapter 4.
- Auvynet, C., Rosenstein, Y. (2009). Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *The FEBS journal*, 276(22), 6497-6508.
- Berasain, P., Goñi, F., McGonigle, S., Dowd, A. J., Dalton, J. P, et al. (1997). Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *The Journal of Parasitology*, 83(1), 1–5.
- Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Dalton, J. P., Goñi, F. (2000). *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Experimental Parasitology*, 94(2), 99-110
- Berenguer, J. G. (2006). *Manual de Parasitología*. Ediciones de la Universidad de Barcelona, 236-238
- Boukli, N. M., Delgado, B., Ricaurte, M., Espino, A. M. (2011). *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*: identification of common proteins by comparative proteomic análisis. *The Journal of Parasitology*, 97(5), 852–861.
- Bozas, S. E., Panaccio, M., Creaney, J., Dosen, M., Parson, J. C., et al. (1995). Characterisation of a novel Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 74(1), 19–29.
- Brophy, P. M., Crowley, P., & Barrett, J. (1990). Detoxification reactions of *Fasciola hepatica* cytosolic glutathione transferases. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 39(2), 155-161.
- Brophy, P. M., Pritchard, D. I. (1994). Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. *Expermental Parasitology*, 79(1), 89–96
- Carmona, C., Dowd, A. J., Smith, A. M., Dalton, J. P. (1993). Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62(1), 9-17

- Cavari, S., Vannucchi, S. (1996). Detection of heparin-like glycosaminoglycans in normal human plasma by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Clinica chimica acta*, 252(2), 159-170.
- Cervi, L., Rossi, G., Masih, D. T. (1999). Potential role for excretory-secretory forms of glutathione-S-transferase (GST) in *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 199, 627-633
- Cervi, L., Rubinstein, H., Masih, D. T. (1996). Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing suppression of the cellular immune responses. *Veterinarian Parasitology*, 61(1-2), 97-111.
- Chemale, G., Morphew, R., Moxon, J. V., Morassuti, A. L., Lacourse, E. J., et al. (2006). Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite, *Fasciola hepatica*. *Proteomics*, 6(23), 6263-6273.
- Choma, C. T., Castle, N. (2000). *Characterizing Binding Interactions by ITC*. Life Sciences,
- Cordfield, A. P., Carroll, D., Myerscough, N., Probert, C. S. (2001). Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Frontiers in Bioscience*, 6(1), 1321-1357.
- Creaney, J., Spithill, T. W., Thompson, C. M., Wilson, L. R., Sanderman, R. M., et al. (1995a). Attempted immunisation of sheep against *Fasciola hepatica* using gamma-irradiated metacercariae. *International Journal for Parasitology*, 25(7), 853-856.
- Creaney, J., Wijffels, G. L., Sexton, J. L., Sanderman, R. M., Spithill, T. W., et al. (1995b). *Fasciola hepatica*: localisation of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. *Experimental Parasitology*, 81(1), 106-116.
- Cruz-Reyes, A., Camargo-Camargo, B. (2001). *Glosario de términos en parasitología y ciencias afines*. 1ª ed. Ed Plaza y Valdés S.A. de C.V, 112.
- Dalton, J. P., McGonigle, S., Rolph, T. P., Andrews, S. J. (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(12), 5066-5074
- David, H., Mawdesley-Thomas, B., Mawdesley-Thomas, L. (1968). Enzyme histochemistry of the adult liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology*, 23(3), 355-360.
- Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C. R., Lim, K., Dvorák, J., et al. (2006). A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(51), 39316-39329.
- Dowling, D. J., Hamilton, C. M., Donnelly, S., La Course, J., Brophy, P. M., et al. (2010). Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. *Infection and Immunity*, 78(2), 793-801.
- Favre, C. J., Lew, D. P., Krause, K. H. (1994). Rapid heparin-sensitive Ca²⁺ release following Ca(2+)-ATPase inhibition in intact HL-60 granulocytes. Evidence for Ins(1,2,5)P₃-dependent Ca²⁺ cycling across the membrane of Ca²⁺ stores. *The Biochemical Journal*, 302(1), 155-162
- Giuliani, A., Pirri, G., & Rinaldi, A. C. (2010). Antimicrobial peptides: the LPS connection. *Methods In Molecular Biology*, 618(1), 137-154.
- Goodwin, J. S., Ceuppens, J. (1983). Regulation of the immune response by prostaglandins. *Journal of clinical immunology*, 3(4), 295-315.

- Goudot-Crozel, V., Caillol, D., Djabali, M., Dessein, A. J. (1989). The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37-kD glyceraldehyde-3P-dehydrogenase. *The Journal of Experimental Medicine*, 170(6), 2065-2080.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Halton, D. W. (1967). Observations on the nutrition of digenetic trematodes. *Parasitology*, 57(4), 639–660
- Harlow, E., Lane, D. (1988). *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Usa. 649-653.
- Hatschbach, P. J. (1995). A *Fasciola hepatica* a sua historia. *A Hora Veterinaria*, 15(1), 10-11.
- Herrerías, M., Díaz, A., Jiménez, M. (1996). *Tratado de hepatología*. Universidad de sevilla. Tomo 1, Cap 9, pp 116.
- Hiatt, S. M., Shyu, Y. J., Duren, H. M., Hu, C.-D. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis of protein interactions in *Caenorhabditis elegans*. *Methods San Diego Calif*, 45(3), 185-191.
- Hillyer, G. V., Haroun, E. T., Hernandez, A., de Galanes, M. S. (1987). Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(2), 363–369
- Howell, R. M. (1966). Collagenase activity of immature *Fasciola hepatica*. *Nature*, 209(5024), 713–714
- Jaros, S., Jaros, D., Wesolwska, A., Wojciech, Z., Wedrychowicz, H. (2010). Blocking *Fasciola hepatica*'s energy metabolism – a pilot study of vaccine potential of a novel gene – phosphoglycerate kinase. *Veterinary parasitology*, 172(3-4), 229-237.
- Kang, W., Park, S., Jang, J. H. (2008). Kinetic and functional analysis of the heparin-binding domain of fibronectin. *Biotechnology Letters*, 30(1), 55-59.
- Kubata, B. K., Duszenko, M., Martin, K. S., Urade, Y. (2007). Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. *Trends in parasitology*, 23(7), 325-331.
- Kyhse-Anderson, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 10(3-4), 203-209
- LaCourse, E.J., Perally, S., Morphew, R.M., Moxon, J.V., Prescott, M., et al. (2012). The Sigma Class Glutathione Transferase from the Liver Fluke *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis* 6(5): e1666.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Le, T.H., Blair, D., McManus, D. P. (2001). Complete DNA sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the liverfluke, *Fasciola hepatica* (Platyhelminthes; Trematoda). *Parasitology*, 123(Pt 6), 609–621.

- LeClaire, L. L., Stewart, M., Roberts, T. M. (2003). A 46 kDa integral membrane phosphoprotein orchestrates the cytoskeletal dynamics that generate amoeboid cell motility in *Ascaris* sperm. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 13), 2655-2663.
- Lee, C. (2007). Coimmunoprecipitation assay. *Methods in Molecular Biology Circadian Rhythms Methods and Protocols*, 362, 401-406.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2001). *Principios de Bioquímica*, 3er edición. Ed Omega.
- Liu, W., Zhao, R., McFarland, C., Kieft, J., Niedzwiecka, A., et al. (2009). Structural insights into parasite eIF4E binding specificity for m7G and m2,2,7G mRNA caps. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 31336-31349.
- Llop, A., Valdés-Dapena, M. M., Zuazo, J. L., (2001). *Microbiología y Parasitología Médica*. Editorial de Ciencias Médicas, tomo 3, 381-388
- Machovich, R., Blaskó, G., Pálos, L. A. (1975). Action of heparin on thrombin-antithrombin reaction. *Biochimical et Biophys Acta.*, 379(1),193-200.
- Mas-Coma, M. S., Bargues, M. D., Valero, M. A., (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35(11-12), 1255-1278.
- Mas-Coma, M. S., Esteban, J. G., Bargues, M. D., (1999). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(4), 340- 346.
- McGonigle, S., Dalton, J. P. (1995). Isolation of *Fasciola hepatica* haemoglobin. *Parasitology*, 111(2), 209–215
- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A., Ebert, M. H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, 211(4489), 1437-1438.
- Mookherjee, N., Brown, K.L., Bowdish, D.M.E., Doria, S., Falsafi, R., et al. (2006). Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *The Journal of Immunology*, 176(4), 2455-2464.
- Mor, V., Das, T., Bhattacharjee, M., Chatterjee, T. (2007). Protein tyrosine phosphorylation of a heparin-binding sperm membrane mitogen (HBSM) is associated with capacitation and acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 352, 404-409.
- Morphew, R. M., Wright, H. A., LaCourse, E. J., Woods, D. J., Brophy , P. M. (2007). Comparative proteomics of excretory–secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during in vitro culture ex host. *Molecular Cellular Proteomics*, 6(6), 963–972.
- Morrison, C. A., Colin, T., Sexton, J. L., Bowen, F., Wicker, J., et al. (1996). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine*, 14(17-18), 1603–1612
- Mout, M. J., Laha, T., Mulvenna, J., Tripa, B., Suttiprapa, S., et al. (2009). A Granulin-Like Growth Factor Secreted by the Carcinogenic Liver Fluke, *Opisthorchis viverrini*, Promotes Proliferation of Host Cells. *PLoS Pathogens*, 5(10), 1-16.

- Muiño, L., Perteguer, M. J., Gárate, T., Martínez-Sernández, V., Beltrán, A., et al. (2011). Molecular and immunological characterization of *Fasciola* antigens recognized by the MM3 monoclonal antibody. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 179(2), 80-90.
- Nari, A. (1991). Current status of the epidemiology, diagnosis and control of helminth infection in livestock in Latin-America. Roma FAO, 29.
- Nari, A., Cardozo, H., Acosta, D., Solari, M., Petraccia, C. (1983). Efecto de la temperatura en el desarrollo de *Fasciola hepatica* en su huésped intermediario *Lymnaea viatrix*. *Veterinaria*, 19(84), 36-39.
- Nascimento, F. D., Rizzi, C. C. A., Nantes, I. L., Stefe, I., Turk, B., et al. (2005). Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 436(2), 323-332.
- Olsson, U., Ostergren-Lundén, G., Moses, J. (2001). Glycosaminoglycan-lipoprotein interaction. *Glycoconjugate Journal*, 18(10), 789-797
- Ogunrinade, A., Adegoke, G. O. (1982). Bovine fascioliasis in Nigeria - intercurrent parasitic and bacterial infections. *Tropical Animal Health and Production*, 14(2), 121-125.
- Osmond, R. I. W., Kett, W. C., Skett, S. E., Coombe, D. R. (2002). Protein-heparin interactions measured by BIAcore 2000 are affected by the method of heparin immobilization. *Analytical Biochemistry*, 310(2), 199-207.
- Overend, D. J., Bowen, F. L. (1995). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian Veterinary Journal*, 72(7), 275-276.
- Patston, P. A., Church, F. C., Olson, S. T. (2004). Serpin-ligand interactions. *Methods*, 32(2), 93-109.
- Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, 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(4), 1954-1961.
- Piacenza, L., Radi, R., Goñi, F., Carmona, C. (1998). CuZn superoxide dismutase activities from *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 117 (6), 555-562.
- Piñeyro, M. D., Parodi-Talice, A., Portela, M., Arias, D. G., Guerrero, S. A., et al. (2011). Molecular characterization and interactome análisis of *Trypanosoma cruzi* Typanedoxin 1J. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1683-1692.
- Raman, R., Sasisekharan, V., Sasisekharan, R. (2005). Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chemistry & Biology*, 12, 267-277.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., Barrett, A. J. (2004). MEROPS: Thepeptidase database. *Nucleic Acids Research*, 32, 160–164.
- Robinson, M. W., Donnelly, S., Hutchinson, A. T., To, J., Taylor, N. L., et al. (2011). A Family of Helminth Molecules that Modulate Innate Cell Responses via Molecular Mimicry of Host Antimicrobial Peptides. *PLoS Pathog.*, 7(5), 1-15.
- Robinson, M. W., Menon, R., Donnelly, S. M., Dalton, J. P., Ranganathan, S. (2009). An Integrated Transcriptomics and Proteomics Analysis of the Secretome of the Helminth Pathogen *Fasciola hepatica*. *Molecular Cellular Proteomics*, 8(8), 1891-1907.

Romero, C. R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Editorial panamericana, 3ª ed , 1509-1514.

Ruiz de Eguino, A.D., Machin, A., Casais, R., Castro, A. M., Boga, J. A., et al. (1999). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Fasciola hepatica* gene encoding a calcium binding protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 101(1-2),13–21.

Russell, S. L., McFerran, N. V., Hoey, E. M., Trudgett, A., Timson, D. J. (2007). Characterisation of two calmodulin-like proteins from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Biological Chemistry*, 388(6), 593–599.

Saba, R. (2005). Human Fascioliasis. *Clinical Microbiology Newsletter*, 27(4) 27-34.

Salvatore, L., Wijffels, G., Sexton, J. L., Panaccio, M., Mailer, S., et al. (1995). Biochemical analysis of recombinant glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 69(2), 281-288.

Schönherr, E., Zhao, B., Hausser, H., Müller, M., Langer, C., et al. (2000). Lipoprotein lipase-mediated interactions of small proteoglycans and low-density lipoproteins. *European Journal of Cell Biology*, 79(10), 689-696.

Shyu, Y., Suarez, C., Liu, H., Deng, X., & Hu, C.-D. (2007). Bimolecular Fluorescence complementation (BiFC) and beyond. *Microscopy and Microanalysis*, 13(S02), 2006-2007.

Sobel, M., Soler, D. F., Kemode, J. C., Harris, R. B. (1992). Localization and characterization of heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(13), 8857-8862

Spithill, T. W., Dalton, J. P. (1998). Progress in Development of Liver Fluke Vaccines. *Parasitology Today*, 14(6), 224-228.

Stack, C. M., Caffrey, C. R., Donnelly, S. M., Seshadri, A., Lowther, J., et al. (2008). Structural and Functional Relationships in the Virulence-associated Cathepsin L Proteases of the Parasitic Liver Fluke, *Fasciola hepatica*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9896–9908.

Sung, H. K., Kristi, L. K. (2007). Heparin-mimetic sulfated peptides with modulated affinities for heparin-binding peptides and growth factors. *Peptides*, 28(11), 2125–2136.

Topolska, A. E., Lidgett, A., Truman, D., Fujioka, H., Coppel, R. L. (2004). Characterization of a membrane-associated rhoptry protein of *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4648-56

Truong, K., & Ikura, M. (2001). The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(5), 573-578

Van Remoortere, A., Van Dam, G. J., Hokke, C. H., Van Den Eijnden, D. H., Van Die, I., et al. (2001). Profiles of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against defined carbohydrate epitopes in sera of *Schistosoma*-infected individuals determined by surface plasmon resonance. (W. A. Petri, Ed.) *Infection and Immunity*, 69(4), 2396-2401.

Valero, M. A., Navarro, M., Garcia-Bodelon, M. A., Marcilla, A., Morales, M., et al. (2006). High risk of bacterobilia in advanced experimental chronic fasciolosis. *Acta Tropica*, 100(1-2), 17-23.

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (1999). Essentials of glycobiology. CSHL Press, 153-156.

Vercoe, J. E. (1974). Empleo de técnicas nucleares en zootecnia y veterinaria. OIEA boletín, 16(5), 50-52.

Vichasri-Gramsa, S., Subpipattanaa, P., Sobhonb, P., Viyanantc, V., Grams, R. (2005). An analysis of the calcium-binding protein 1 of *Fasciola gigantica* with a comparison to its homologs in the phylum Platyhelminthes. Molecular and Biochemical Parasitology, 146(1), 10-23.

Voet, D. (2007). Fundamental of biochemistry. 2^a ed. Ed Panamericana, 220-221.

Volpi, N., Cusmano, M., Venturelli, I. (1995). Qualitative and quantitative studies of heparin and chondroitin sulfates in normal human plasma.. Biochimica et Biophysica Acta, 1243(1), 49-58.

Weinkauf, C., & PereiraPerrin, M. (2009). Trypanosoma cruzi promotes neuronal and glial cell survival through the neurotrophic receptor TrkC. Infection and Immunity, 77(4), 1368-1375.

Wilson, R. A., Wright J. M., de Castro-Borges, W., Parker-Manuel, S. J., Dowle, A. A., et al. (2011). Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. International Journal for Parasitology, 41(13-14), 1347–1359.

Wong, K. A., O'Bryan, J. P. (2011). Bimolecular fluorescence complementation. Journal of visualized experiments , 50(50), e2643.

9. Anexos.

Anexo 1.

Descripción detallada de los parámetros utilizados para llevar a cabo las cromatografías de afinidad con el equipo AKTA purifier UPC 100 para ambos extractos de trabajo.

Tabla 6. Método utilizado en la cromatografía de afinidad el extracto somático

Block	Variable	Value	Range
Main	Column	HiTrap_Heparin_HP_1_ml	
Start_with_PumpWash_Basic	Wash_Inlet_A	Off	
	Wash_Inlet_B	Off	
Flow_Rate	Flow_Rate {ml/min}	0.700	0.000 - 10.000
Column_Pressure_Limit	Column_PressureLimit {MPa}	0.50	0.00 - 25.00
Start_Instructions	Averaging_Time_UV	5.10	
Start_Conc_B	Start_ConcB {%B}	0.0	0.0 - 100.0
Column_Equilibration	Equilibrate_with {CV}	0.00	0.00 - 999999.00
Aut_PressureFlow_Regulation	System_Pump	Normal	
	System_PressLevel {MPa}	0.00	0.00 - 25.00
	System_MinFlow {ml/min}	0.000	0.000 - 10.000
Flowthrough_Fractionation	Flowthrough_FracSize {ml}	1.000	0.000 - 50.000
Sample_Injection	Empty_loop_with {ml}	0.10	0.00 - 999999.00
Wash_Out_Unbound_Sample	Wash_column_with {CV}	8.00	0.00 - 999999.00
PeakFrac_Parameters_UV	UV_Mode	Level	
	MinPeakWidth {min}	0.375	0.010 - 1500.000
	Level {mAU}	25.000	-6000.000 - 6000.000
	Peak_Start_Slope {mAU/min}	0.010	0.010 - 10000.000
	Peak_End_Slope {mAU/min}	0.010	0.010 - 10000.000
Wash_Basic_1	1_Wash_Inlet_A	OFF	
	1_Wash_Inlet_B	OFF	
Flow_Direction_1	1_Flow_Direction	DownFlow	
ConcB_Step_1	1_ConcB_Step {%B}	5.0	0.0 - 100.0
Flush_Segment_1	1_Flush_Volume {ml}	6.00	0.00 - 999999.00
Fractionation_Segment_1	1_Fraction_Size {ml}	2.000	0.000 - 50.000
	1_PeakFraction_Size {ml}	0.600	0.000 - 50.000
Step_1	1_Length_of_Step {CV}	4.00	0.00 - 999999.00
Wash_Basic_2	2_Wash_Inlet_A	OFF	
	2_Wash_Inlet_B	OFF	
Flow_Direction_2	2_Flow_Direction	DownFlow	
ConcB_Step_2	2_ConcB_Step {%B}	10.0	0.0 - 100.0
Flush_Segment_2	2_Flush_Volume {ml}	6.00	0.00 - 999999.00
Fractionation_Segment_2	2_Fraction_Size {ml}	2.000	0.000 - 50.000
	2_PeakFraction_Size {ml}	0.600	0.000 - 50.000
Step_2	2_Length_of_Step {CV}	4.00	0.00 - 999999.00
Wash_Basic_3	3_Wash_Inlet_A	OFF	
	3_Wash_Inlet_B	OFF	
Flow_Direction_3	3_Flow_Direction	DownFlow	
ConcB_Step_3	3_ConcB_Step {%B}	15.0	0.0 - 100.0
Flush_Segment_3	3_Flush_Volume {ml}	6.00	0.00 - 999999.00
Fractionation_Segment_3	3_Fraction_Size {ml}	2.000	0.000 - 50.000
	3_PeakFraction_Size {ml}	0.600	0.000 - 50.000
Step_3	3_Length_of_Step {CV}	4.00	0.00 - 999999.00

Wash_Basic_4	4_Wash_Inlet_A	OFF	
	4_Wash_Inlet_B	OFF	
Flow_Direction_4	4_Flow_Direction	DownFlow	
ConcB_Step_4	4_ConcB_Step {%B}	40.0	0.0 - 100.0
Flush_Segment_4	4_Flush_Volume {ml}	6.00	0.00 - 999999.00
Fractionation_Segment_4	4_Fraction_Size {ml}	2.000	0.000 - 50.000
	4_PeakFraction_Size {ml}	0.600	0.000 - 50.000
Step_4	4_Length_of_Step {CV}	4.00	0.00 - 999999.00
Wash_Basic_5	5_Wash_Inlet_A	OFF	
	5_Wash_Inlet_B	OFF	
Flow_Direction_5	5_Flow_Direction	DownFlow	
ConcB_Step_5	5_ConcB_Step {%B}	100.0	0.0 - 100.0
Flush_Segment_5	5_Flush_Volume {ml}	6.00	0.00 - 999999.00
Fractionation_Segment_5	5_Fraction_Size {ml}	0.000	0.000 - 50.000
	5_PeakFraction_Size {ml}	0.600	0.000 - 50.000
Step_5	5_Length_of_Step {CV}	5.00	0.00 - 999999.00
Gradient_Delay	Gradient_Delay {ml}	3.00	0.00 - 999999.00
Length_of_Reequilibration	Reequilibrate_with {CV}	10.00	0.00 - 999999.00

Tabla 7. Método utilizado en la cromatografía de afinidad el extracto PES

Block	Variable	Value	Range
Main	Column	HiTrap_Heparin_HP_1_ml	
Start_with_PumpWash_Basic	Wash_Inlet_A	Off	
	Wash_Inlet_B	Off	
Flow_Rate	Flow_Rate {ml/min}	0.700	0.000 - 10.000
Column_Pressure_Limit	Column_PressureLimit {MPa}	0.50	0.00 - 25.00
Start_Instructions	Averaging_Time_UV	5.10	
Start_Conc_B	Start_ConcB {%B}	0.0	0.0 - 100.0
Column_Equilibration	Equilibrate_with {CV}	0.00	0.00 - 999999.00
Aut_PressureFlow_Regulation	System_Pump	Normal	
	System_PressLevel {MPa}	0.00	0.00 - 25.00
	System_MinFlow {ml/min}	0.000	0.000 - 10.000
Flowthrough_Fractionation	Flowthrough_FracSize {ml}	1.000	0.000 - 50.000
Sample_Injection	Empty_loop_with {ml}	0.10	0.00 - 999999.00
Wash_Out_Unbound_Sample	Wash_column_with {CV}	6.00	0.00 - 999999.00
PeakFrac_Parameters_UV	UV_Mode	Level	
	MinPeakWidth {min}	0.375	0.010 - 1500.000
	Level {mAU}	15.000	-6000.000 - 6000.000
	Peak_Start_Slope {mAU/min}	0.010	0.010 - 10000.000
	Peak_End_Slope {mAU/min}	0.010	0.010 - 10000.000
Wash_Basic_1	1_Wash_Inlet_A	OFF	
	1_Wash_Inlet_B	OFF	
Flow_Direction_1	1_Flow_Direction	DownFlow	
ConcB_Step_1	1_ConcB_Step {%B}	5.0	0.0 - 100.0
Flush_Segment_1	1_Flush_Volume {ml}	6.00	0.00 - 999999.00
Fractionation_Segment_1	1_Fraction_Size {ml}	2.000	0.000 - 50.000
	1_PeakFraction_Size {ml}	0.600	0.000 - 50.000
Step_1	1_Length_of_Step {CV}	4.00	0.00 - 999999.00
Wash_Basic_2	2_Wash_Inlet_A	OFF	
	2_Wash_Inlet_B	OFF	
Flow_Direction_2	2_Flow_Direction	DownFlow	
ConcB_Step_2	2_ConcB_Step {%B}	10.0	0.0 - 100.0
Flush_Segment_2	2_Flush_Volume {ml}	6.00	0.00 - 999999.00
Fractionation_Segment_2	2_Fraction_Size {ml}	0.000	0.000 - 50.000
	2_PeakFraction_Size {ml}	0.600	0.000 - 50.000
Step_2	2_Length_of_Step {CV}	4.00	0.00 - 999999.00

Wash_Basic_3	3_Wash_Inlet_A	OFF	
	3_Wash_Inlet_B	OFF	
Flow_Direction_3	3_Flow_Direction	DownFlow	
ConcB_Step_3	3_ConcB_Step { %B}	15.0	0.0 - 100.0
Flush_Segment_3	3_Flush_Volume {ml}	6.00	0.00 - 999999.00
Fractionation_Segment_3	3_Fraction_Size {ml}	0.000	0.000 - 50.000
	3_PeakFraction_Size {ml}	0.600	0.000 - 50.000
Step_3	3_Length_of_Step {CV}	4.00	0.00 - 999999.00
Wash_Basic_4	4_Wash_Inlet_A	OFF	
	4_Wash_Inlet_B	OFF	
Flow_Direction_4	4_Flow_Direction	DownFlow	
ConcB_Step_4	4_ConcB_Step { %B}	25.0	0.0 - 100.0
Flush_Segment_4	4_Flush_Volume {ml}	6.00	0.00 - 999999.00
Fractionation_Segment_4	4_Fraction_Size {ml}	2.000	0.000 - 50.000
	4_PeakFraction_Size {ml}	0.600	0.000 - 50.000
Step_4	4_Length_of_Step {CV}	4.00	0.00 - 999999.00
Wash_Basic_5	5_Wash_Inlet_A	OFF	
	5_Wash_Inlet_B	OFF	
Flow_Direction_5	5_Flow_Direction	DownFlow	
ConcB_Step_5	5_ConcB_Step { %B}	40.0	0.0 - 100.0
Flush_Segment_5	5_Flush_Volume {ml}	6.00	0.00 - 999999.00
Fractionation_Segment_5	5_Fraction_Size {ml}	2.000	0.000 - 50.000
	5_PeakFraction_Size {ml}	0.600	0.000 - 50.000
Step_5	5_Length_of_Step {CV}	4.00	0.00 - 999999.00
Wash_Basic_6	6_Wash_Inlet_A	OFF	
	6_Wash_Inlet_B	OFF	
Flow_Direction_6	6_Flow_Direction	DownFlow	
ConcB_Step_6	6_ConcB_Step { %B}	50.0	0.0 - 100.0
Flush_Segment_6	6_Flush_Volume {ml}	6.00	0.00 - 999999.00
Fractionation_Segment_6	6_Fraction_Size {ml}	0.000	0.000 - 50.000
	6_PeakFraction_Size {ml}	0.600	0.000 - 50.000
Step_6	6_Length_of_Step {CV}	3.00	0.00 - 999999.00
Wash_Basic_7	7_Wash_Inlet_A	OFF	
	7_Wash_Inlet_B	OFF	
Flow_Direction_7	7_Flow_Direction	DownFlow	
ConcB_Step_7	7_ConcB_Step { %B}	100.0	0.0 - 100.0
Fractionation_Segment_7	7_Fraction_Size {ml}	0.000	0.000 - 50.000
	7_PeakFraction_Size {ml}	0.600	0.000 - 50.000
Step_7	7_Length_of_Step {CV}	5.00	0.00 - 999999.00
Gradient_Delay	Gradient_Delay {ml}	3.00	0.00 - 999999.00
Length_of_Reequilibration	Reequilibrate_with {CV}	10.00	0.00 - 999999.00

Anexo 2.

Se muestran los resultados de inhibición específica realizados en el análisis enzimático de actividad proteolítica. Los mismos se presentan en unidades de fluorescencia (UF). El guión (-) indica valores que no sobrepasaron el valor del blanco.

Tabla 8. Análisis de inhibición enzimática del extracto somático y sus fracciones eluídas.					
	Proteínas		Catepsina	LAP	Legumaína
Muestra	mg/ml	mg totales	UF	UF	UF
Somático	14,021	4,206	1164,5	984,0	730,0
NR	0,926	0,926	584,5	621,0	934,0
A	0,096	0,058	241,5	-	-
B	0,057	0,034	-	-	273,5
C	0,091	0,055	-	-	-
D	0,099	0,059	-	-	-
E	0,062	0,037	-	-	63,0
F	0,056	0,034	-	-	-
G	0,209	0,126	85,0	-	-
H	0,109	0,066	-	-	-

Tabla 9. Análisis de inhibición enzimática del extracto PES y sus fracciones eluídas.					
	Proteínas		Catepsina	LAP	Legumaína
Muestra	mg/ml	mg totales	UF	UF	UF
PES	2,765	0,830	1506,0	1232,0	750,0
NR	0,185	0,185	1116,0	84,0	1090,0
A	0,016	0,010	-	-	81,0
B	0,007	0,004	-	-	-
C	0,002	0,001	-	-	-