

Licenciatura en Bioquímica

**” Caracterización e Identificación de Actividad
Proteolítica en Extractos de la Garrapata
Rhipicephalus (boophilus) microplus”**

Dinorah Gambetta Sessa

Tutor: Dra. en Química Patricia Berasain

UNIDAD DE BIOLOGÍA PARASITARIA

Departamento de Biología Celular y Molecular

Instituto de Biología



Junio 2014

Índice de abreviaturas

AMC	7-amino-4-metil-coumarina
DTT	Ditiotreitol.
E-64	Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido (4-guanidinio)-butano
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Hb	Hemoglobina
LAP	Leucinaminopeptidasa
PBS	Buffer fosfato salino
PBS-T	Buffer fosfato salino con tween
PES	Productos de excreción/secreción
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Eelectroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
BSA	Albúmina de suero bovino
CBB	Coomassie Brilliant Blue
UF	Unidades de fluorescencia

Índice de Figuras

Figura 1: Distribución geográfica de la garrapata *R. microplus*.

Figura 2: Distribución taxonómica de familias y subfamilias de garrapatas.

Figura 3: Vista dorsal y ventral de *R. microplus*.

Figura 4: Segmentos que componen las extremidades.

Figura 5: Taxonomía de *R. microplus*.

Figura 6: Esquema simplificado del ciclo biológico de la garrapata *R. microplus*.

Figura 7: Fase parasitaria del ciclo biológico de *R. microplus*.

Figura 8: Larvas de la garrapata *R. microplus* formando conglomerados en las pasturas.

Figura 9: Esquema representativo del sistema de nomenclatura de Schechter y Berger para los subsitios del sitio activo de una péptidas.

Figura 10: Clasificación de peptidasas de acuerdo al tipo de reacción que catalizan.

Figura 11: Modelo de degradación de la Hemoglobina por enzimas proteolíticas de la garrapata *I. ricinus*.

Figura 12: Aspecto de las hembras adultas inmediatamente después de caídas del bovino.

Figura 13: Vista de los órganos internos de garrapata.

Figura 14: Patrón electroforético de los extractos de garrapata.

Figura 15: Zimogramas.

Figura 16: Variación de la actividad tipo catepsina L en extractos de garrapata *R. microplus* para los diferentes pHs.

Figura 17: Inhibición de la actividad tipo catepsina L para el extracto de intestino.

Figura 18: Inhibición de la actividad tipo catepsina L para el extracto de ovarios.

Figura 19: Inhibición de la actividad tipo catepsina L para el extracto de huevos.

Figura 20: Inhibición de la actividad tipo catepsina L para el extracto de tubos de Malpighi.

Figura 21: Inhibición de la actividad tipo LAP para el extracto de intestino.

Figura 22: Inhibición de la actividad tipo LAP para el extracto de ovarios.

Figura 23: Inhibición de la actividad tipo LAP para el extracto de huevos.

Figura 24: Análisis de reactividad de extractos de *R. microplus* por Western Blot

Figura 25: Cromatografía de afinidad LAP- bestatina.

Figura 26: Análisis de la cromatografía por SDS-PAGE.

Índice de Tablas

Tabla 1: Resumen de las principales características de las fases de vida parasitaria de *R. microplus*.

Tabla 2: Soluciones utilizadas para la preparación de los geles de gelatina y Hemoglobina (Hb).

Tabla 3: Concentración de sustratos peptídicos stock (mM) para las peptidasas estudiadas.

Tabla 4: Preparación del estándar AMC a partir de una solución stock de AMC 10 μ M.

Tabla 5: Inhibidores utilizados específicos para distintas peptidasas.

Tabla 6: Cuantificación de proteínas.

Tabla 7: Pesos moleculares aparentes de cada proteína

Tabla 8: Resultados de actividad tipo catepsina L en extractos de de tubos de Malpighi y huevos de *R. microplus*.

Tabla 9: Actividad proteolítica tipo catepsina L en muestras de sangre bovina, extracto de intestino y ovarios.

Tabla 10: Resultados de pH óptimo de la actividad tipo catepsina L.

Tabla 11: Resumen de actividad tipo catepsina L en extractos de *R. microplus*.

Tabla 12: Ensayos de inhibición de actividad tipo catepsina L en extractos de *R. microplus*.

Tabla 13: Resultados de actividad tipo LAP para las muestras de sangre bovina y el extracto de intestino.

Tabla 14: Resultados de actividad tipo LAP para el extracto de tubos de Malpighi

Tabla 15: Resultados de actividad tipo LAP para el extracto de ovarios.

Tabla 16: Resultados de actividad tipo LAP para el extracto de huevos.

Tabla 17: Ensayos de inhibición de actividad tipo LAP en extractos de *R. microplus*.

Tabla 18: Extracto de huevos en presencia y ausencia de AMC.

Tabla 19: Resultados de actividad tipo legumaína para las muestras de sangre bovina y extracto de intestino.

Tabla 20: Actividad tipo legumaína para el extracto de intestino en μ moles y μ moles/minutos (U).

Tabla 21: Resultados de actividad tipo legumaína para los extractos: tubos de Malpighi, ovarios y huevos.

Tabla 22: Resultados de actividad tipo LAP para los picos obtenidos en la purificación.

Tabla 23: Resultados de actividad tipo LAP para los picos obtenidos en la purificación.

Tabla 24: Resultados de actividad tipo LAP para los picos concentrados obtenidos en la purificación.

Tabla 25: Resultados de actividad tipo LAP total para los picos concentrados obtenidos en la purificación.

Tabla 26: Concentración de proteínas para los tubos donde fue máxima la absorbancia.

Tabla 27: Resultados de actividad tipo legumaína para los picos concentrados obtenidos en la purificación.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Distribución geográfica de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	3
2.2. Impacto negativo a la ganadería.....	4
2.3. Control Químico.....	5
2.4. Control biológico.....	6
2.5. Generalidades de las garrapatas.....	7
2.5.1. Definición.....	7
2.5.2. Taxonomía.....	7
2.5.3. Morfología.....	8
2.5.4. Estructura y función de los órganos analizados.....	11
2.5.4.1. Aparato digestivo.....	11
2.5.4.2. Aparato reproductor.....	12
2.5.5. Ciclo biológico.....	12
2.5.5.1. Fase parasitaria.....	13
2.5.5.2. Fase de vida libre.....	14
2.5.6. Longevidad larval.....	18
2.5.7. Tasa de encuentro.....	18
2.6. Proteasas.....	19
2.6.1. Nomenclatura de Schercher y Berger.....	20
2.6.2. Clasificación.....	20
2.6.2.1. Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB).....	20
2.6.2.1.1. Clasificación según la ubicación de los enlaces hidrolizados.....	21
2.6.2.1.1.1. Exopeptidasas.....	21

2.6.2.1.1.2. Endopeptidasas.....	21
2.6.2.1.2. Clasificación según sus respectivos mecanismos catalíticos.....	22
2.6.2.2. Sistema MEROPS.....	23
2.7. Digestión de proteínas en garrapatas.....	24
3. Objetivos.....	29
4. Materiales y métodos.....	30
4.1. Obtención de extractos de garrapata.....	30
4.1.1. Disección de garrapatas.....	30
4.1.1.1. Materiales.....	30
4.1.1.2. Procedimiento.....	30
4.1.2. Oviposición.....	31
4.1.3. Preparación de extractos.....	32
4.1.3.1. Para la caracterización primaria de actividad.....	32
4.1.3.2. Para la purificación.....	32
4.2. Análisis del patrón electroforético por SDS-PAGE.....	32
4.3. Cuantificación de proteínas.....	34
4.4. Determinación de actividad proteolítica.....	35
4.4.1. Zimogramas en gel.....	35
4.4.2. Ensayos con péptidos sintéticos por análisis fluorimétrico.....	36
4.4.2.1. Preparación de controles para actividades en intestino.....	37
4.4.2.2. Actividades proteolíticas investigadas.....	38
4.4.2.2.1. Actividad tipo aminopeptidasa.....	38
4.4.2.2.2. Actividad tipo legumaína.....	38
4.4.2.2.3. Actividad tipo catepsina L.....	38
4.4.2.2.3. Ensayos de inhibición.....	39
4.5. Inmunoblot.....	39
4.6. Purificación de actividad tipo LAP.....	40

4.6.1. Cromatografía de afinidad bestatina-sefarosa.....	40
4.6.2. Análisis de las fracciones obtenidas en la purificación.....	42
4.6.2.1. Monitoreo de actividad proteolítica tipo LAP.....	42
4.6.2.2. Perfil de proteínas por SDS-PAGE.....	42
4.6.2.3. Cuantificación de proteínas.....	42
4.6.2.4 Criterio de formación de pools.....	42
4.6.2.5. Monitoreo de actividad tipo legumaína.....	43
4.7. Procesamiento de imágenes.....	43
5. Resultados.....	44
5.1. Caracterización primaria.....	44
5.1.1. Disección de garrapatas, extracción de órganos y preparación de extractos.....	44
5.1.2. Cuantificación de proteínas.....	45
5.1.3. Análisis del patrón electroforético de los extractos de garrapata <i>R. microplus</i> por SDS- PAGE.....	46
5.2. Detección de actividad proteolítica.....	48
5.2.1. Zimogramas.....	48
5.2.2. Ensayo de actividad proteolítica con péptidos sintéticos por análisis fluorimétrico.....	49
5.2.2.1. Ensayos de actividad tipo catepsina L en extractos de la garrapata <i>R. microplus</i>	49
5.2.2.2. Determinación del pH óptimo de la actividad tipo catepsina L para los extractos de garrapata.....	51
5.2.2.3. Ensayos de inhibición de la actividad tipo catepsina L para los extractos de <i>R. microplus</i>	55
5.2.2.4. Ensayos de actividad tipo leucinaminopeptidasa en extractos de la garrapata <i>R. microplus</i>	58
5.2.2.5. Ensayos de inhibición de la actividad tipo leucinaminopeptidasa (LAP).....	61
5.2.2.6. Actividad tipo legumaína en extractos de la garrapata <i>R. microplus</i>	65
5.3. Análisis por Western blot de extractos de garrapata <i>R. microplus</i>	69

5.4. Purificación de actividad tipo LAP.....	71
5.4.1. Monitoreo de actividad tipo LAP.....	72
5.4.2. Cuantificación de proteínas.....	75
5.4.3. Perfil de proteínas por SDS-PAGE.....	75
5.4.4. Monitoreo de actividad tipo legumaina.....	77
6. Discusión	78
7. Conclusiones	88
8. Bibliografía	89
9. Anexo	98

1. RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es uno de los principales ectoparásitos que afecta a la ganadería a nivel mundial, debido a las cuantiosas pérdidas económicas que produce. El método de control más utilizado para combatir estos parásitos son los acaricidas, sin embargo debido a la resistencia de las garrapatas a muchos de estos, la contaminación ambiental que provocan y la posible presencia de residuos químicos en la leche y carne de los bovinos, se están buscando nuevos métodos de control. Debido a lo anterior, es muy importante entender la fisiología y los procesos esenciales, como son la digestión de las proteínas presentes en la sangre del hospedero. Actualmente existen fuertes evidencias que indican que las enzimas proteolíticas presentes en el intestino de las garrapatas llevan a cabo la degradación de la hemoglobina, principal componente de la sangre del hospedero. Este trabajo tiene como finalidad caracterizar e identificar actividad proteolítica en extractos de garrapatas hembras engordadas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, cepa Mozo.

Se caracterizó por primera vez actividad proteolítica en extractos de intestino, ovarios, huevos y tubos de Malpighi de garrapatas *R. microplus* de la cepa Mozo. Los zimogramas con gelatina y hemoglobina muestran la presencia de varias endopeptidasas activas en el extracto intestinal. Ensayos fluorimétricos utilizando el sustrato Z-Phe-Arg-AMC revelan la presencia de actividad cisteína peptidasa, tipo catepsina L en los extractos de intestino (1.8 U), ovarios (0.41 U) y huevos (3.51 U), dicha actividad fue confirmada mediante ensayos de inhibición con el inhibidor específico para cisteína peptidasas E-64; para el extracto de tubos de Malpighi se detectó actividad sobre el sustrato Z-Phe-Arg-AMC, sin embargo no fue posible confirmar dicha actividad mediante ensayos de inhibición. A partir de curvas de pH se determinaron los pHs óptimos de la actividad tipo catepsina L: pH 5 para el extracto de intestino, pH 5.6 para el extracto de tubos de Malpighi y pH 4 para los extractos de ovarios y huevos.

Los extractos de intestino y ovarios hidrolizaron Leu-AMC rápidamente; esta actividad fue inhibida por bestatina y EDTA en ambos extractos, indicando la presencia de una aminopeptidasa tipo LAP. Para el extracto de tubos de Malpighi se encontraron trazas de actividad tipo LAP, dicha actividad no fue confirmada mediante ensayos de inhibición. En el extracto de huevos se detectó actividad sobre el sustrato Leu-AMC, sin embargo no fue posible inhibir dicha actividad debido a que existen en el extracto componentes con fluorescencia intrínseca.

Los resultados obtenidos a partir de ensayos fluorimétricos utilizando el sustrato Z-Ala-Ala-Asn-AMC muestran que el extracto de intestino presenta actividad tipo legumaina, mientras que los extractos de ovarios, huevos y tubos de Malpighi presentan trazas de actividad. En presencia del detergente Chaps aumenta la actividad tipo legumaina detectada en el extracto de intestino.

El inmunoblot muestra un reconocimiento específico en los extractos de intestino y huevos.

Por último mediante una cromatografía de afinidad por bestatina se logró recuperar 18 % de la actividad tipo LAP presente en el extracto de partida.

Palabras Clave: *Rhipicephalus microplus*, peptidasas, leucinaminopeptidasa (LAP), catepsina L, legumaina.

2. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas y enfermedades que transmiten son uno de los grandes problemas de salud pública y veterinaria en el mundo; la severidad depende de la región, especies involucradas, agente transmisor, población de hospederos, situación socioeconómica y las medidas de control utilizadas.

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (*R. microplus*) es considerada como uno de los principales ectoparásitos que afecta a los bovinos a nivel mundial. El impacto negativo de *R. microplus* a la ganadería se debe a las cuantiosas pérdidas económicas que produce. Las garrapatas *Ixodes ricinus* presente en Europa e *Ixodes scapularis* en América del Norte, son vectores importantes de las enfermedades de Lyme (borreliosis) y Encefalitis. *Haemaphysalis longicornis* presente en el este de Asia y en Australia transmite muchas enfermedades al ganado bovino y a humanos, en particular theileriosis, babesiosis y fiebre Q.

2.1. Distribución geográfica de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

La garrapata del ganado *R. microplus* se encuentra en casi todas las regiones ganaderas del mundo ubicadas en zonas templadas, subtropicales y tropicales (Figura 1).

Esta garrapata es originaria del sur de Asia (Pal y Wharton, 1974) y se ha extendido a las principales zonas de cría de ganado, como América del Sur y Australia a través del comercio de ganado.

En África se cree que fue introducida en Madagascar con la importación de ganado y posteriormente al sur y sur este del continente (Sudáfrica, Zambia, Malawi, Tanzania, y Kenia). (Walker y col. 2003).

En el continente americano esta garrapata está presente en el norte de Uruguay y Argentina, parte de Brasil y Colombia y en algunos países de América Central.

Actualmente este parásito ha podido ser erradicado en el sur de Argentina y Uruguay y en el estado de Texas en Estados Unidos (ICTTD 2004 b).

Mientras que en Oceanía está distribuida en el norte y este de Australia.

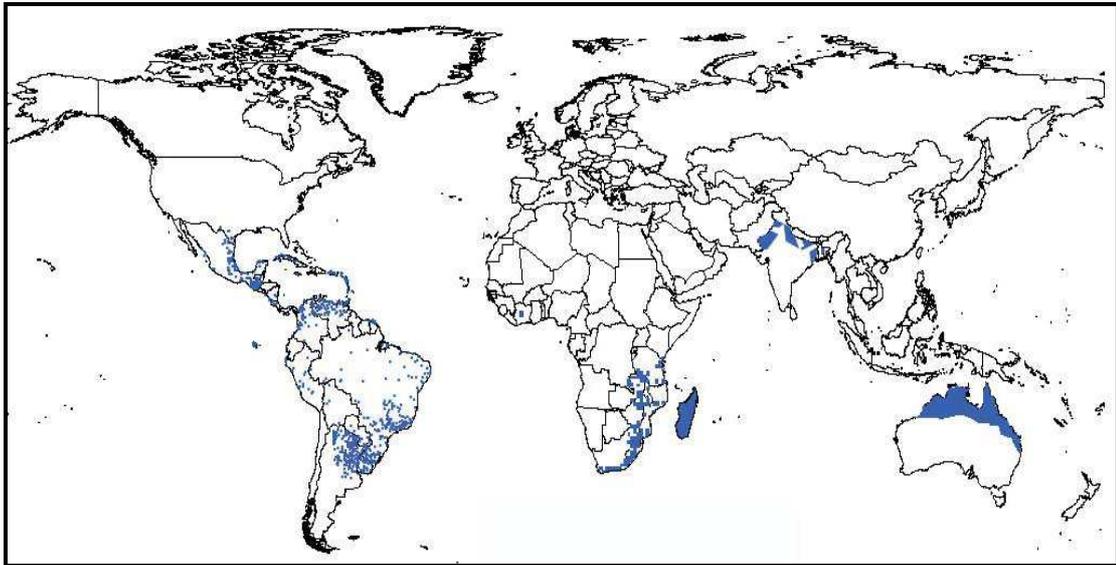


Figura 1: Distribución geográfica de la garrapata *R. microplus*. La figura está basada en los Mapas e información disponible en (ICCTD 2004 a, 2004 b). Cutullé y col., 2009, Madder y col., 2007, y Kumar y col., 2011.

2.2. Impacto negativo a la ganadería.

El impacto negativo de *R. microplus* a la ganadería se debe a las cuantiosas pérdidas económicas que produce.

Estas pérdidas son ocasionadas por diversos factores: daño a las pieles por acción de las picaduras, anemia, transmisión de patógenos, tratamientos costosos con garrapaticidas y mano de obra para su aplicación (Solari y col., 1992). En Uruguay se estima que las pérdidas económicas ocasionadas por *R. microplus* asciende a U\$S 45 millones de dólares anuales (Errico, y col., 2006).

Durante los últimos años las garrapatas y las enfermedades transmitidas por ellas, son consideradas como uno de los mayores problemas sanitarios para el desarrollo de la producción ganadera en regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo.

Las garrapatas *R. microplus*, se constituyen en las principales transmisoras de agentes patógenos tales como *Babesia* y *Anaplasma*. La babesiosis es causada en nuestra región por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, dos protozoarios de la Clase Sporozoa. La anaplasmosis es producida por *Anaplasma marginale*, una bacteria del Orden Rickettsiales. El principal vector de ambas enfermedades en nuestro medio es la garrapata de un solo hospedador *R. microplus*. La transmisión de *Babesia* se produce exclusivamente mediante la garrapata de un solo hospedador, *R. microplus*, mientras que en la transmisión de *Anaplasma marginale* también

intervienen otros vectores como por ejemplo las moscas hematófagas (Solari y col., 1992; Solari, 2006).

La babesiosis bovina es una enfermedad febril que generalmente se caracteriza por una lisis eritrocítica extensiva que lleva a la anemia, ictericia, hemoglobinuria y muerte.

El *Anaplasma marginale* invade los glóbulos rojos sin destruirlos, pero causándoles modificaciones suficientes para que el mismo organismo los identifique como extraños y los destruya. Los signos más comunes son anemia severa, ictericia, debilidad, inapetencia, fiebre, cese de la rumia y pérdida de peso (López y col., 1980).

Por otra parte, las heridas causadas por las picaduras de garrapatas son problemáticas, cuando están abiertas las larvas de la mosca *Cochliomyia hominivorax* (insecto díptero verde azulado), infestan e invaden las heridas.

La miasis cutánea ("bichera") es una enfermedad parasitaria causada por la mosca *Cochliomyia hominivorax*, este insecto se nutre fundamentalmente de tejidos lesionados y hemorrágicos ("heridas sangrantes"). Si los animales infectados no son tratados a corto plazo, la continua destrucción tisular causa pérdida de peso, y a veces postración del animal y muerte.

Además las garrapatas extraen sangre del bovino provocando una disminución del peso del animal; la permanente exposición a picaduras de garrapata causa por tanto, debilitamiento, propensión a contraer enfermedades, irritación de la piel, y merma en la producción de leche y carne.

2.3. Control Químico.

La estrategia más utilizada para el control de garrapatas consiste en la aplicación de ixodicidas sobre el cuerpo de los animales infestados a intervalos específicos determinados por la región ecológica, especies a las que se va a combatir y eficacia residual del garrapaticida.

Los garrapaticidas han sido utilizados con éxito en el control de las garrapatas; sin embargo, su uso irracional ha ocasionado la generación de cepas de garrapatas resistentes a la acción de estos productos químicos, a su vez estos productos son tóxicos para el hombre y producen un importante daño al medio ambiente.

Los gastos ocasionados en nuestro país por las garrapatas de los bovinos y las enfermedades que contraen debido a estas son muy elevados. Aquí deben incluirse costos de prevención, tratamiento, mano de obra para su aplicación, pérdidas por muertes, abortos y disminución de la producción de leche y carne, entre otros. (Solari y col., 1992; Solari, 2006).

Debido a lo anterior los productores tienen problemas a la hora de comercializar sus productos, teniendo restricciones comerciales por mayores exigencias sanitarias, medioambientales y

contaminación de los productos debido a la utilización de sustancias químicas (acaricidas) sobre el hospedero.

2.4. Control biológico.

Las restricciones comerciales así como la emergencia de cepas resistentes a los acaricidas han llevado al desarrollo de métodos alternativos de control (desarrollo de vacunas); por lo que la inmunización protectora de hospederos con antígenos de tejidos de garrapatas y otros artrópodos hematófagos está ganando cada vez más atención; actualmente existen dos vacunas (una de origen Australiano Tick gard, y la otra de origen Cubano GAVAC)(Odongo, 2007; Valle, 2004) de mediana eficacia desarrollada contra *R. microplus*; ambas basadas en un antígeno “oculto” (Nuttall y col., 2006) presente en el epitelio intestinal de la garrapata, denominado Bm86 (Rodríguez y col, 1995; Willadsen y col., 1995,1989). En Uruguay, se hicieron ensayos de vacunación con éstas dos vacunas comerciales, no mostrando niveles aceptables de protección, probablemente debido a la existencia de isoformas para esta proteína (Sossai, 2005) por tanto estas vacunas no son efectivas contra las garrapatas de nuestra región (Sur de Brasil, Argentina y Uruguay) por lo cual no contamos con vacunas aplicables al control de *R.microplus*.

Es necesario realizar estudios que permitan identificar otros antígenos parasitarios los que podrían ser usados como blancos alternativos.

Teniendo en cuenta que la garrapata es un ectoparásito hematófago, las proteínas contenidas en la sangre del huésped se constituyen en la principal fuente de nutrientes; la digestión de dichas proteínas es una etapa crucial para el desarrollo biológico del parásito, con consecuencias directas para la nutrición, embriogénesis y puesta de huevos.

La digestión de hemoglobina es un proceso esencial para parásitos que se alimentan de sangre. La degradación de esta proteína se da por enzimas proteolíticas algunas de las cuales han sido encontradas en el Intestino de *R. microplus*. Por lo tanto, las enzimas proteolíticas ya utilizadas en otros modelos parasitarios, pueden ser estudiadas para el desarrollo de una vacuna efectiva contra nuestras garrapatas.

2.5. Generalidades de las garrapatas.

2.5.1. Definición

Las garrapatas son ácaros cosmopolitas, ectoparásitos (parásitos externos), temporales obligados que se alimentan de sangre (hematófagos) y otros fluidos, debido a su gran tamaño en estado adulto se observan a simple vista.

2.5.2. Taxonomía

Para agrupar taxonómicamente a las garrapatas, se han reconocido tres familias: Ixodidae, Argasidae y Nuttallidae.

Las garrapatas pertenecientes a la familia Ixodidae se conocen como garrapatas duras o garrapatas verdaderas debido a la presencia de un escudo rígido de quitina, localizado en la superficie dorsal del macho y sobre la parte anterior en las hembras (ICTTD 2004 a). Las garrapatas pertenecientes a la familia Argasidae se denominan garrapatas blandas o garrapatas falsas y se caracterizan por la ausencia de escudo dorsal. La tercer familia incluye a especies con características entre Ixodidae y Argasidae (ICTTD 2004 b).

Las herramientas moleculares actuales han permitido grandes avances en el entendimiento de las relaciones filogenéticas de las garrapatas.

Recientemente entre las nuevas relaciones filogenéticas establecidas, se destaca la del género *Boophilus*, el cual se ha convertido en subgénero del género *Rhipicephalus*, por ser este último parafilético con respecto al primero; por lo tanto las especies de garrapatas que pertenecían al género *Boophilus* han sido reclasificadas recientemente como un subgénero del género *Rhipicephalus* a partir de evidencias moleculares, citogenéticas, morfológicas, biogeográficas y de interacción con los huéspedes (Hall, 1993; Lindsay, 2010).

Tomando en cuenta lo anterior se reconocen alrededor de 907 nombres científicos válidos de géneros y especies de garrapatas distribuidas en todo el mundo, especialmente concentrados en regiones tropicales y subtropicales (Caissie, 2008).

Un diagrama con la distribución taxonómica reconocida de las familias y subfamilias de las garrapatas se muestra en la (Figura 2).

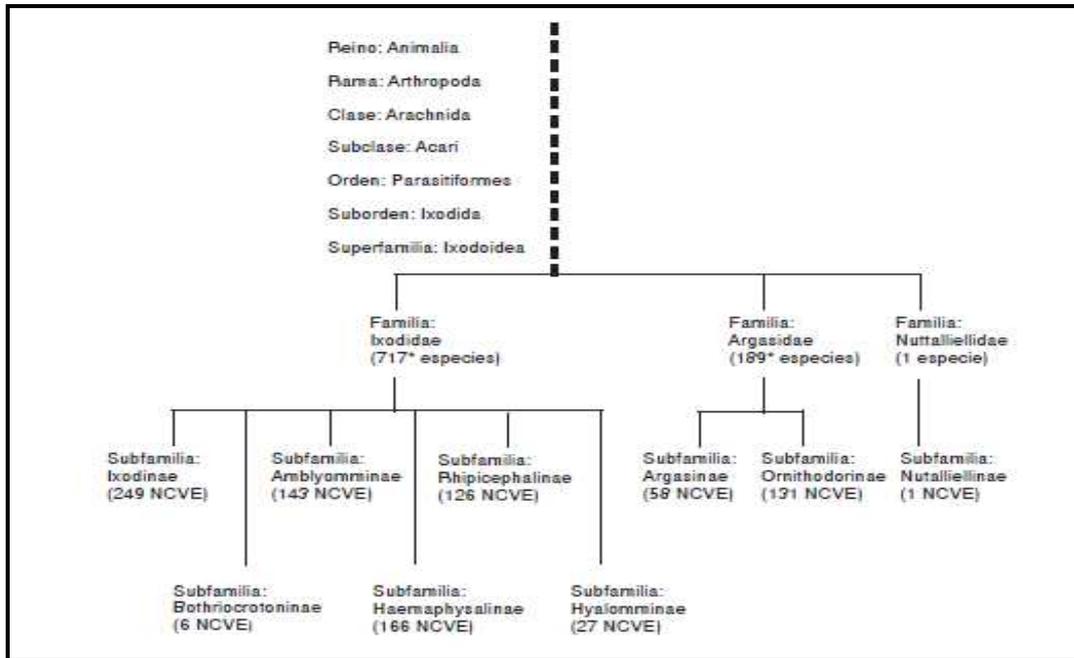


Figura 2: Distribución taxonómica de familias y subfamilias de garrapatas. Incluyen los números de especies válidas que contienen. (NCVE) nombres científicos válidos de especies. Tomado de Barker y Murrel, 2008; Dantas y Torres, 2008.

2.5.3. Morfología

Las garrapatas *R. microplus* se caracterizan por tener el abdomen y el cefalotórax fusionados, por lo tanto las regiones corporales están compuestas por el prosoma que es el aparato bucal y el idiosoma formado por el cuerpo y los cuatro pares de patas.

El prosoma junto con el cuello forma el capítulo, localizado en la parte terminal anterior del cuerpo, se caracteriza por ser corto y ancho, con márgenes laterales redondeados (Hagen y Kopp, 1999).

Las hembras tienen grupos de poros en pares denominadas áreas porosas, localizadas en la porción dorsal de la base del capítulo; estas áreas producen y liberan antioxidantes que inhiben la degradación de los compuestos en las secreciones de órgano del Gené (Bautista, 2006).

La cabeza de la garrapata o capítulo tiene una sustancia quitinosa que le permite proteger su sistema nervioso, a su vez está compuesta por dos órganos llamados quelíceros, localizados en el dorso del capítulo. Cada quelíceros tiene dos artejos, el medial que es el más largo, puede moverse en forma lateral, mientras que en el externo que es más pequeño, reside en una cavidad del dígito medial y se mueve con éste. Ambos tienen dentículos afilados, los cuales rasgan la piel del hospedero e introducen un órgano de succión llamado hipostoma, estructura

prominente localizada en la parte ventral del capítulo, la cual contiene filas de dientes curvos (Hagen y Kopp, 1999).

Además al lado del hipostoma se sitúan dos apéndices o palpos que actúan como soporte para adherirse al hospedero. Estos están conformados por varios segmentos; en el último se encuentra el órgano palpal, por medio del cual la garrapata detecta las zonas más delgadas de la piel y donde existe mayor irrigación sanguínea (Parra, 1999). El hipostoma y los palpos son cortos, mostrando estos últimos pliegues transversales prominentes (Figura 3).

Los cuatro pares de patas se articulan con el cuerpo mediante una estructura muy resistente denominada coxa. Cada pata está dividida en seis segmentos, coxa, trocánter, fémur, tibia, tarso y metatarso. La coxa está insertada de forma vertical al cuerpo y permite una rotación limitada; los otros segmentos se flexionan de tal manera que cada pata puede ser doblada contra la superficie ventral o extendida para caminar.

La garrapata en su estado de larva posee tres pares de patas, mientras que en estado de ninfa y adulto posee cuatro pares de patas. Un par de garras y una almohadilla está presente en cada tarso. Un elemento sensorial conocido como “Órgano de Haller” se encuentra en la superficie dorsal del tarso del primer par de patas del ectoparásito (Hagen y col., 1999; Bautista, 2006). Este órgano recibe estímulos de tipo vibratorio (vibraciones que reciben del ganado cuando se mueve) (Figura 4).

El cuerpo de la garrapata varía de forma y tamaño en machos y hembras.

El dorso de los machos está recubierto totalmente por un escudo formado por quitina. El dorso de las hembras, larvas y ninfas están solo recubiertas por un escudo de quitina en la parte anterior, lo que les permite crecer y agrandarse lo suficiente para contener hasta dos centímetros cúbicos de sangre (López, 1980). En la región dorsal se localizan un par de ojos, uno a cada lado del escudo, los cuales son imperfectos y se cree que solo perciben luz y movimiento (Parra, 1999). Estas garrapatas carecen de festones y ornamentación.

Las hembras de este género carecen de orificio anal y el macho lo presenta muy tenue. El orificio genital se sitúa en la línea media del cuerpo, es el que da la diferenciación sexual (Figura 5). El dimorfismo sexual es muy pronunciado, la hembra es de mayor tamaño que el macho.

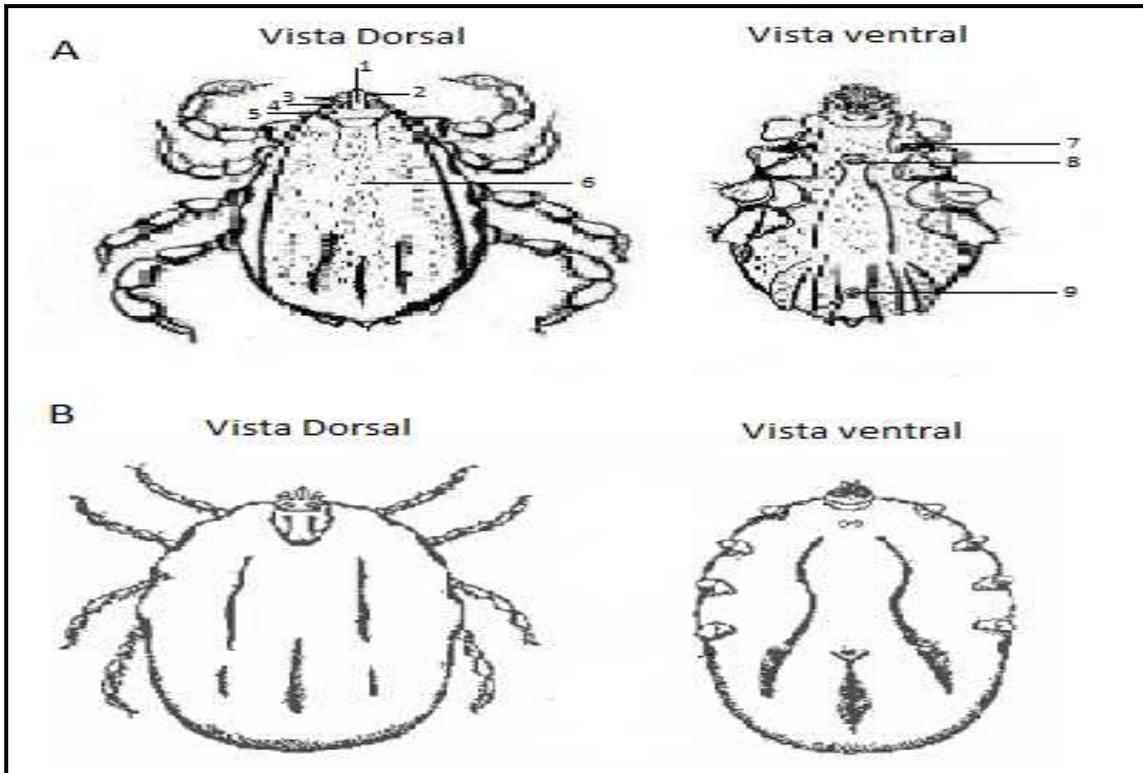


Figura 3: Vista dorsal y ventral de *R. microplus*. A. *R. microplus* macho 1. queliceros, 2. Hiptosoma 3. dientes, 4. pedipalpos, 5. prosoma, 6. escudo, 7. Coxas, 8. orificio genital, 9. orificio anal; B. *R. microplus* hembra. Tomado de "Epidemiología y campaña sanitaria Garrapata *Boophilus microplus*" MGAP.

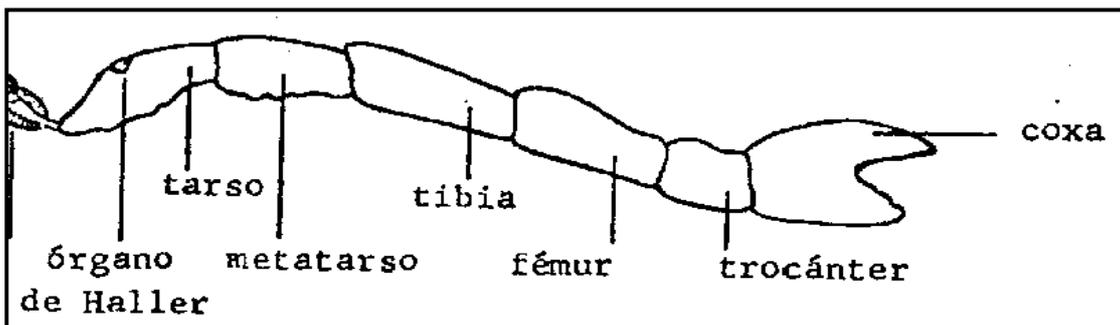


Figura 4: Segmentos que componen las extremidades. Diagrama realizado por Ronald Smith.

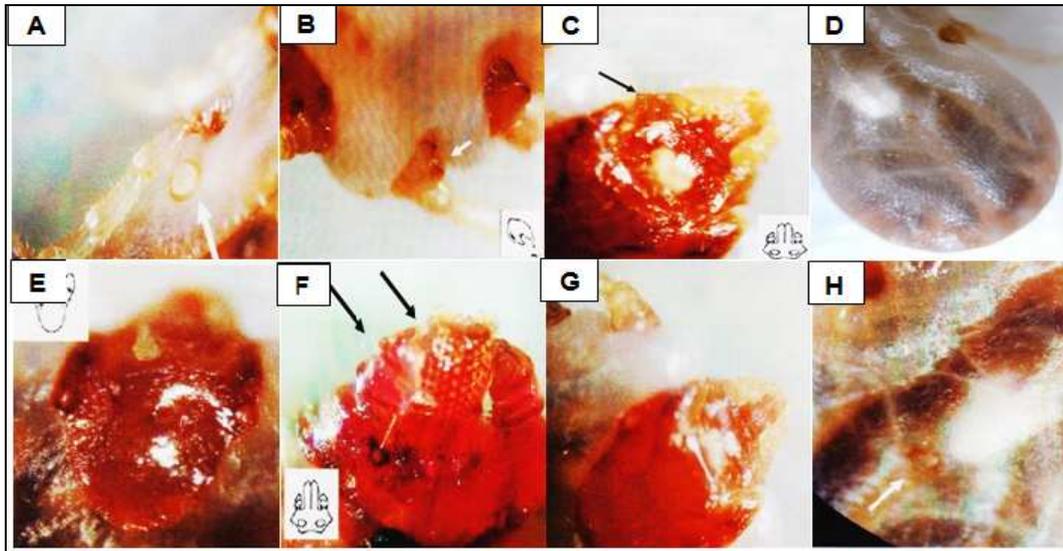


Figura 5: Taxonomía de *R. microplus*. Las flechas indican, A. espiráculos, B. coxa, C. base del capítulo, D. festones, E. ojo, F. palpos, G. rostro, H. surco anal.

2.5.4. Estructura y función de los órganos analizados.

A continuación se describen aquellos órganos sobre los que se prepararon extractos proteicos para ser analizados.

2.5.4.1. Aparato digestivo

Las garrapatas contienen una faringe en cuyo extremo se sitúa el esófago. Un intestino medio o estómago que ocupa la zona media y que se prolonga en varios ciegos alargados los cuales cumplen la función de ampliar la capacidad del intestino medio. También se encuentran unos canales o glándulas salivares que desembocan en la parte ventral de la faringe (Parra, 1999).

La abertura bucal se encuentra ubicada por encima del hipostoma y está determinada hacia el dorso por las vainas externas de los quelíceros, a este nivel desemboca el conducto excretor de las glándulas salivares, luego se continúa en una amplia faringe, la cual se transforma en un esófago poco desarrollado. El esófago desemboca en el estómago, que se presenta muy dilatado, de este parten los ciegos intestinales (Núñez, 1987).

Externamente los ciegos intestinales poseen en sus paredes, fibras musculares dispuestas en forma longitudinal y transversal, que son responsables de los movimientos ameboides que presentan estos elementos durante el período de alimentación de la garrapata, permitiendo así la distribución de la sangre en el tracto digestivo y poniéndola en contacto con las peptidasas que facilitarán su digestión. Debido a los movimientos intestinales, el contenido se transforma

en una masa semi sólida como consecuencia de la pérdida de agua que se produce esencialmente a través de la cutícula y secundariamente por los tubos de Malpighi. Estos últimos captan al mismo tiempo los metabolitos que por ósmosis han pasado a la cavidad del cuerpo y que se incorporan a la hemolinfa, haciéndolos progresar hacia la vesícula excretora antes de abrirse en la abertura anal.

2.5.4.2. Aparato Reproductor

En el macho está conformado por dos testículos y un conducto deferente que se une con una vesícula seminal cuya función es formar el espermatozoides, lugar donde se encuentran los espermatozoides, el cual está formado por un conjunto de espermátides rodeado por una cápsula que transfiere el macho a la hembra durante la cópula.

En la hembra está conformado por un ovario de forma alargada, ubicado próximo a la vesícula excretora, extendiéndose hacia ambos lados del idiosoma para continuarse en un par de oviductos, estos oviductos se generan de las partes laterales del ovario y finalizan en el útero. La vagina se divide en dos porciones, la cervical en la cual desembocarán ambos oviductos y la vestibular que continuará hasta la abertura genital. En relación directa con la porción cervical de la vagina se ubica el receptáculo seminal lo que posibilita que este sitio sirva para almacenar el espermatozoides. En esta misma porción de la vagina y por delante del receptáculo se emplazan de manera angulosa un par de glándulas accesorias, cuyo contenido se vuelca en la vagina, lubricándola y facilitando de este modo el pasaje de los huevos. A medida que los huevos salen de la vagina, toman contacto de forma transitoria con el denominado órgano de Gené, compuesto por dos glándulas cada una con un receptor, situados debajo del escudo dorsal. Estas glándulas producen una secreción que aglutina los huevos, los protege de la desecación y permite la oxigenación del embrión incluso debajo del agua (Parra, 1999).

2.5.5. Ciclo Biológico

La garrapata *R. microplus* presenta un ciclo de vida que se caracteriza por poseer un solo hospedero, generalmente un bovino aunque puede infestar ocasionalmente a los equinos, ovinos y caprinos.

Este ciclo biológico (Figura 6) está dividido en dos fases, una fase parasitaria (Figura 7) y otra de vida libre en las pasturas.

2.5.5.1. Fase parasitaria

La fase parasitaria es completada en el entorno de los 17 a 30 días, dentro de la cual se puede definir una **etapa larval**: neolarva, larva y metalarva, una **etapa ninfa**: ninfa y metaninfa y una **etapa adulta**: meandro, ganandro, neógina, partenógina y teleógina.

Desde el momento que la larva “sube” al animal, busca zonas de la piel finas donde la misma es laxa y vascularizada como son la tabla del pescuezo, entrepiernas, ubre, bolsas testiculares y región perineal; en estas zonas comenzará la succión de sangre ese mismo día. A medida que succionan sangre, las larvas van sufriendo transformaciones y en aproximadamente 3 días pueden “mudar” pasando al estado siguiente; sus dimensiones en esta etapa son 0.6 x 0.4 mm. El estado **ninfa**, se produce alrededor de 5 días post-infección, siendo esta etapa en donde comienza a visualizarse la garrapata con más facilidad, en esta etapa mide aproximadamente 1 mm de largo.

Alrededor del día 9 post-infección la ninfa se inmoviliza comenzando la segunda muda, esta etapa dura aproximadamente entre 2 a 4 días y es el momento donde se produce la diferenciación sexual.

Luego de haber salido de su envoltura **metaninfal**, comienza el dimorfismo sexual, los nuevos adultos, machos o hembras presentan una diferencia de tamaño bien marcada, la hembra, además de tener mayor tamaño se caracteriza por una relativa quietud y una gran avidez de sangre. Los machos surgen al estado adulto en el día 13, pudiendo vivir en el huésped por casi tres meses, miden entre 2 y 2.5 mm. La alimentación de los machos es intermitente, caracterizándose por una gran movilidad y una búsqueda permanente de hembras jóvenes para copular. La hembra adulta emerge de su estado metaninfal aproximadamente a los 11 días post-infestación, aumentando en los primeros días el tamaño y peso de forma muy lenta, luego a partir del día 16 hasta el 18 de vida parasitaria el crecimiento se hace muy rápido llegando su tamaño al doble y cinco veces su peso. En esta etapa es posible observar en la hembra distintos momentos de maduración:

- Hembra Púber (**neógina**) la más pequeña de todas, mide 2 mm, de una coloración verdosa. Se distingue de la ninfa por poseer miembros más largos y gruesos.
- Hembras copulando (**partenógina**), mide entre 3 y 4 mm, su color se va haciendo cada vez más herrumbroso.
- Hembra repleta (**teleógina**), mide entre 7 y 13 mm, marca el fin de la vida parasitaria sobre el animal.

El ciclo parasitario es completado en un tiempo que va de 17 a 30 días, el mayor porcentaje de hembras cae a los 23 días post-infección. En la Tabla 1 se muestran las principales características morfológicas y los acontecimientos fundamentales que se dan en las fases de vida parasitaria de esta garrapata.

Tabla 1: Resumen de las principales características de las fases de vida parasitaria de *R. microplus*.

Fase	tamaño	patas	observaciones
larva	0.6 x 0.4 mm	3 pares	Fijación al hospedero; comienza a alimentarse.
metalarva	1mm	"	Primera observación a los 3 días.
ninfa	1mm de largo	4 pares	Se inmoviliza y se convierte en metaninfa.
metaninfa	2.5-4 mm	"	Comienza dimorfismo sexual.
adulto		"	
macho	2-2.5 mm	"	Muy móvil.
hembra (neógina)	2 mm	"	
hembra (partenógina)	3-4 mm	"	Semingurgitada; si no es fecundada muere en hospedero
hembra (teleógina)	7-13 mm	"	Se desprende del huésped.

2.5.5.2. Fase de vida libre

En esta fase existe una marcada influencia de los factores ambientales, la teleógina (hembra repleta o ingurgitada) se desprende espontáneamente del huésped cayendo al suelo donde busca lugares sombríos y protegidos para desovar.

El período comprendido entre el desprendimiento de la teleógina y la llegada a las pasturas se conoce como **protoquia o preoviposición**.

El factor climático más importante para la evolución de esta etapa es la temperatura, no teniendo la humedad mayor influencia. En condiciones ambientales óptimas se puede realizar en 2 a 4 días, mientras que en áreas templadas puede tener grandes variaciones.

El período que transcurre desde el desove del primer huevo hasta la postura del último se denomina **ootoquia**.

Las teleóginas pueden sobrevivir dentro de un amplio margen de temperatura y humedad. El desove puede completarse entre los 5 a 17 días en condiciones favorables de temperatura, 21 °C - 36 °C con una eficiencia de postura en relación a su peso entre un 45-60%.

Con temperaturas menores a 10°C las teleóginas suspenden la oviposición.

La incubación es el período comprendido entre la finalización del desove y el comienzo de la eclosión de las larvas. Dicho período incluye otro (**metatoquia**) que se define como el tiempo transcurrido entre el cese de la oviposición y la muerte de la hembra.

En la incubación de los huevos es donde los factores ambientales, temperatura y humedad pueden influir decisivamente. Los períodos de incubación óptimos se dan entre los 15°C y 37°C, donde los máximos porcentajes de eclosión están en el entorno de 25 °C y 36 °C, y una humedad relativa del 95 %.

Para que la incubación los huevos llegue a su término, es necesario que dispongan de humedad y temperaturas adecuadas. Los huevos pueden ser afectados por hongos si existe excesiva humedad, mientras que las altas temperaturas y la exposición directa a la luz solar producen la desecación de los huevos.

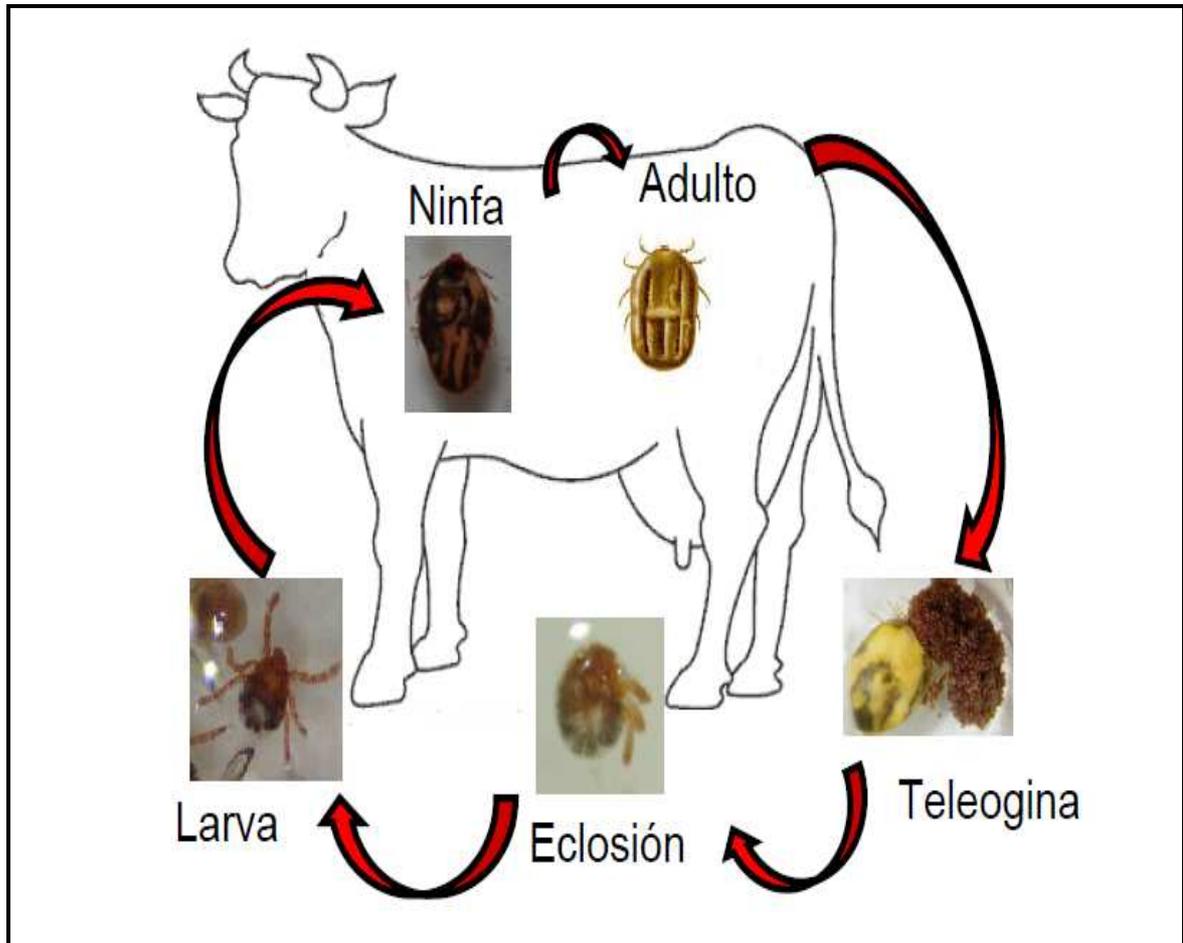


Figura 6: Esquema simplificado del ciclo biológico de la garrapata *R. microplus*. Fase parasitaria: comienza cuando la larva se fija al bovino, finaliza cuando la hembra ingurgitada se desprende del hospedero; Fase de vida libre: comienza cuando la hembra ingurgitada se desprende del hospedero y finaliza cuando la larva toma contacto con el hospedero.

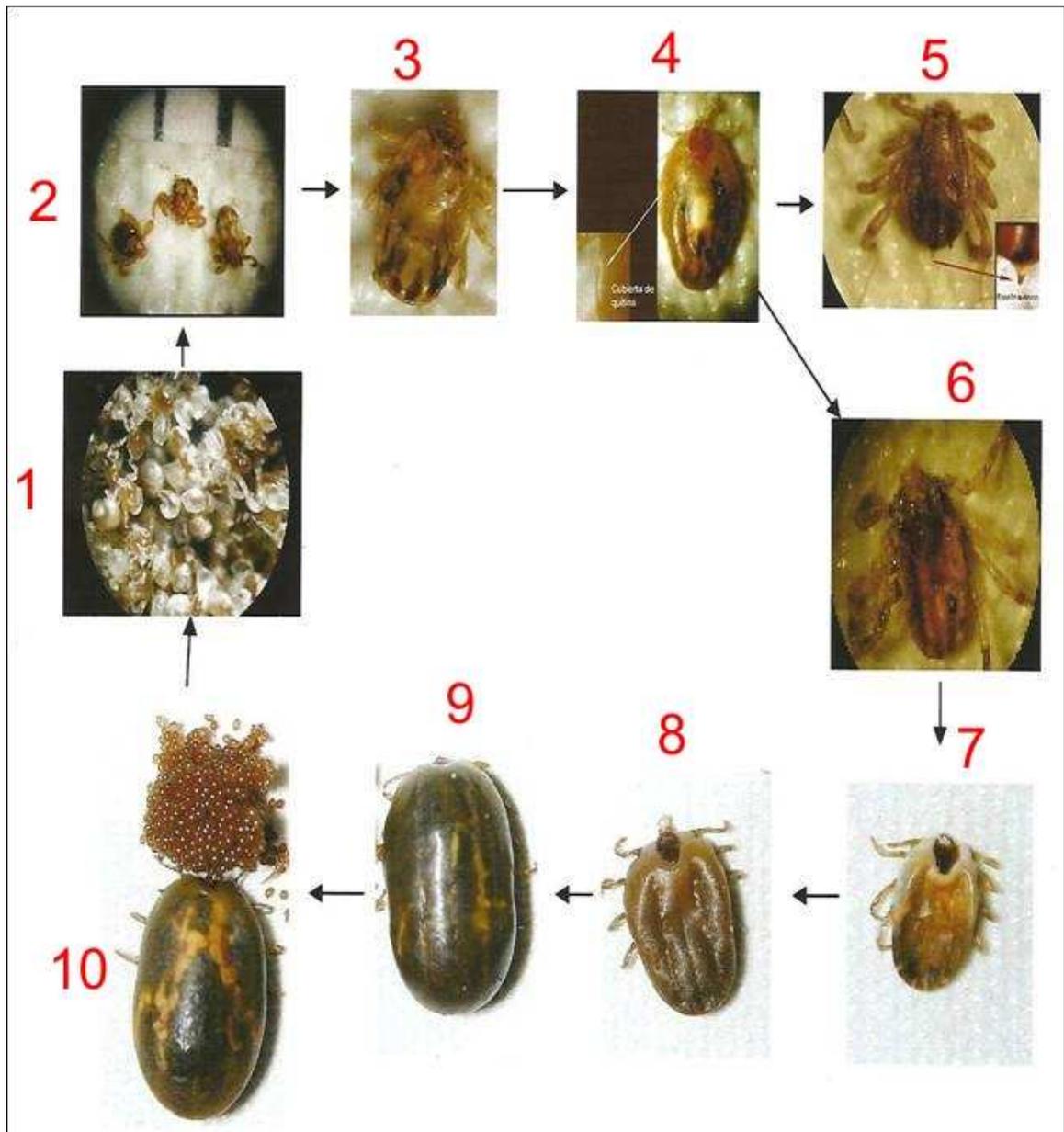


Figura 7: Fase parasitaria del Ciclo Biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: 1. Protozoa, 2 y 3. Ninf, 4. Metaninf, 5. Macho adulto, 6.Hembra adulta, 7 y 8. Partenógina, 9. Teleógina y 10. Protozoa.

2.5.6. Longevidad larval.

La supervivencia de las larvas dependerá de su capacidad de para encontrar al hospedero. El tiempo medio de longevidad, depende de la temperatura y la humedad. En condiciones naturales, las larvas suelen agruparse en numerosos conglomerados en las pasturas (Figura 8). Esta conducta presenta dos ventajas para el mantenimiento de la especie, primero permite que al pasar el animal, un gran número de larvas lo parasiten a la vez, y segundo retarda la muerte de las larvas por desecación.

Con el paso del tiempo las larvas situadas en la periferia del conglomerado se desecan, mueren y caen; de este modo la masa del conglomerado va perdiendo volumen y con ello la desecación de las larvas restantes aumenta.

2.5.7. Tasa de encuentro.

Es la expresión de la probabilidad que tienen las larvas de encontrarse con su hospedador, depende de la amplitud del área por donde se mueven los hospedadores y de la disponibilidad de larvas en las pasturas.

Las temperaturas altas aumentan la actividad de las larvas, los períodos de seca y la baja densidad de animales pueden disminuir la tasa de hallazgo del hospedero.



Figura 8: Larvas de la garrapata *R. microplus* formando conglomerados en las pasturas.

2.6 Proteasas.

El primer término con el que se denominó a las enzimas proteolíticas fue el de proteasas y surgió a finales del siglo XIX como un término general que abarcaba a todas las hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos. Más adelante un grupo de investigadores alemanes sugirió el término proteinasas para denominar a aquellas proteasas que tienen como sustrato a las proteínas, peptidasas y a las enzimas que tienen como sustrato a los péptidos de menor peso molecular. Sin embargo, también fue utilizado el término peptidasa en un sentido más amplio, abarcando a todas las hidrolasas del enlace peptídico (Barrett, 2004). Dado que el uso del término peptidasa ha generado confusión, el Comité de Nomenclatura de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) en el año 1984 recomendó el uso de este término en un sentido general para todas las hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos.

A la información sobre el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) se puede acceder en el sitio <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>.

A medida que esta área de investigación crece, se hace necesario un sistema de nomenclatura y clasificación para facilitar el manejo de toda la información y que además permita la comunicación entre las personas y el almacenamiento y la búsqueda de dicha información sin ambigüedades. En este sentido los sistemas EC y MEROPS, con diferentes criterios, ordenan, clasifican y reúnen la información acerca de las peptidasas.

El sistema EC tiene la desventaja de no tener en cuenta la existencia de grupos estructurales que reflejen las relaciones evolutivas de las peptidasas miembro de cada clase; por esta causa en 1993 Rawlings & Barrett comenzaron el diseño de un sistema de clasificación de peptidasas que salva esa deficiencia y agrupa a las peptidasas teniendo en cuenta esta característica fundamental. El sistema se siguió perfeccionando durante algunos años hasta que en 1996 comenzó a publicarse en la web la base de datos de proteasas MEROPS (Rawlings y col., 2006), <http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>) donde se encuentran más de 192053 secuencias de peptidasas e inhibidores. Este sistema de clasificación tiene en cuenta los conceptos de tipo catalítico, clan, familia y peptidasa.

2.6.1. Nomenclatura de Schechter y Berger.

Schechter & Berger (1967) han propuesto un modelo conceptual para referirse a la especificidad de una peptidasa. En este modelo, totalmente vigente, se propuso que el sitio activo de las peptidasas estaba dividido en subsitios; en la nomenclatura usada se consideran los residuos de aminoácido del sustrato (P) que se unen a subsitios del sitio activo de la enzima (S). Estos residuos se numeran a partir del enlace a ser hidrolizado hacia el N-terminal como P_1 , P_2 , P_3 , etc., en tanto que los que se encuentran hacia el C-terminal se denominan P'_1 , P'_2 , P'_3 , etc. Los subsitios de la peptidasa que “acomodan” los residuos del sustrato se numeran como S_1 , S_2 , S_3 y S'_1 , S'_2 , S'_3 , respectivamente, (Figura 9). El esquema que se presenta a continuación fue obtenido de Turk y Guncar, 2003.

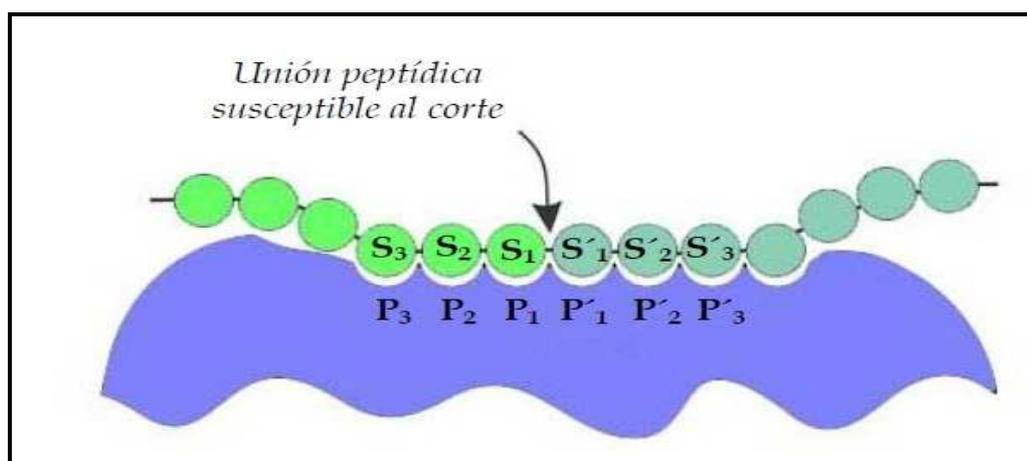


Figura 9: Esquema representativo del sistema de nomenclatura de Schechter y Berger para los subsitios del sitio activo de una peptidasa.

2.6.2. Clasificación.

2.6.2.1. Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB).

Esta clasificación asigna un código numérico a los distintos tipos de enzimas, agrupándolas en seis clases: Oxidorreductasas (1), Transferasas (2), Hidrolasas (3), Liasas (4), Isomerasas (5) y Ligasas (6).

Las proteinasas o peptidasas pertenecen al grupo 3 (hidrolasas) subgrupo 4 (hidrólisis de enlaces peptídicos), por consiguiente las peptidasas son hidrolasas con especificidad por los enlaces peptídicos.

2.6.2.1.1. Clasificación según la ubicación de los enlaces hidrolizados.

Debido a la gran diversidad de reacciones que catalizan estas enzimas la clasificación puede ser subdividida en función de la afinidad que presentan por los aminoácidos localizados en los extremos de los sustratos. Por lo tanto dependiendo si el enlace hidrolizado es entre dos aminoácidos internos, o sobre un enlace entre aminoácidos en el extremo de la cadena polipeptídica, estas se pueden clasificar en endopeptidasas y exopeptidasas respectivamente (Figura 10).

2.6.2.1.1.1. Exopeptidasas.

Estas peptidasas actúan únicamente sobre los extremos de la cadena polipeptídica. Las enzimas que atacan el extremo N-terminal pueden liberar un único residuo aminoacídico y son denominadas como aminopeptidasas, o un di o tripéptido, di y tripeptidilpeptidasas. A su vez las que actúan sobre el extremo C-terminal pueden liberar un único aminoácido, carboxipeptidasas o un dipéptido, peptidildipeptidasas. Otras exopeptidasas son específicas para dipéptidos (dipeptidasas) o remueven residuos terminales que están sustituidos, ciclados o unidos por uniones isopeptídicas (omega peptidasas) (Barrett y col, 1998).

2.6.2.1.1.2. Endopeptidasas.

Hidrolizan uniones internas en las cadenas polipeptídicas, son divididas en subclases en función de su mecanismo catalítico.

PROTEASA	MODO DE ACCIÓN
Exopeptidasas	● - ○ - ○ - ○ - ○ - - -
Aminopeptidasas	● - ● - ○ - ○ - ○ - - -
Carboxipeptidasas	- - - ○ - ○ - ○ - ○ - ● - ●
Endopetidasas	- - - ○ - ○ - ○ - ● - *

Figura 10: Clasificación de peptidasas de acuerdo al tipo de reacción que catalizan. Los círculos vacíos representan residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica, los círculos de color negro indican aminoácidos terminales, el asterisco representa el bloque terminal. Las flechas indican el sitio de acción de las peptidasas.

2.6.2.1.2. Clasificación según sus respectivos mecanismos catalíticos.

Basados en el grupo funcional presente en el sitio activo, las peptidasas se pueden clasificar en los siguientes grupos: serina, treonina, cisteína y aspártico peptidasas, dependientes de metales (metalo peptidasas) y de mecanismo catalítico desconocido.

- **Serina y treonina peptidasas**

Las peptidasas en las cuales el mecanismo catalítico depende del hidroxilo de un residuo de Serina o Treonina los cuales actúan como nucleófilo sobre el enlace peptídico, son denominadas peptidasas serínicas o treonínicas, o también serina peptidasas o treonina peptidasas.

- **Cisteína peptidasas**

Las peptidasas cisteínicas presentan gran analogía en el mecanismo catalítico con las serínicas, en razón de que en ambos grupos la enzima y el sustrato forman un complejo covalente debido a que el nucleófilo es parte de un aminoácido. El dador de protones en todas las peptidasas cisteínicas identificadas es un residuo de histidina (al igual que en la mayoría de las peptidasas serínicas) y el nucleófilo es el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína.

- **Aspártico peptidasas**

El mecanismo catalítico involucra residuos de ácido aspártico en el sitio activo de la cadena peptídica, unidos a una molécula de agua que actúa como nucleófilo.

- **Metalo peptidasas**

Las metalo peptidasas se pueden dividir en dos grupos: las que sólo requieren iones zinc para la catálisis y las que necesitan dos iones metálicos que actúen co-catalíticamente, como en el caso de las peptidasas en las que el cobalto y el manganeso son esenciales para su actividad. El ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico es mediado al igual que en las peptidasas aspárticas por una molécula de agua.

- **Glutamato peptidasas**

El mecanismo sugerido es un ataque nucleofílico por una molécula de agua activada por la cadena lateral del ácido glutámico 136 formando el intermediario tetraédrico con el átomo de carbono del enlace peptídico que se escinde. La asistencia electrofílica y la estabilización del oxiónion son provistas por la amida de la Glutamina 153.

- **Peptidasas de mecanismo catalítico desconocido**

En este grupo se incluyen todas aquellas peptidasas a las que con la información disponible actualmente no es posible ubicarlas en ninguna de las categorías mencionadas anteriormente.

2.6.2.2. Sistema MEROPS.

La base de datos MEROPS, es un sistema de clasificación de peptidasas en el que las mismas son asociadas en familias y clanes.

Una **familia** está constituida por un grupo de peptidasas en el que las secuencias aminoacídicas de cada miembro muestran una relación estadísticamente significativa con al menos una de otro miembro de la familia en la zona de la molécula responsable de la actividad peptidásica (Rawlings y Barrett, 1993).

El término **Clan** se utiliza para describir un grupo de familias cuyos miembros han evolucionado a partir de una proteína ancestral común, pero que han divergido tanto que su relación no puede ser establecida simplemente por la comparación de sus estructuras primarias, la evidencia más clara que muestra que dos familias están relacionadas y pertenecen al mismo clan es la similaridad de sus estructuras tridimensionales (Rawlings y Barrett, 1993; Barrett y Rawlings, 1995). Una peptidasa se distingue de las demás por diferencias en, su actividad, estructura u origen genético.

Los identificadores usados comienzan con una letra que indica el tipo catalítico de las peptidasas: Aspárticas (A), Cisteínicas (C), Glutámicas (G), Metalo (M), Asparagínicas (N),

clanes que contienen peptidasas de más de un tipo catalítico (P), Serinicas (S), Treonínicas (T), sin clasificar (U).

2.7. Digestión de proteínas en garrapatas.

Las garrapatas son artrópodos hematófagos obligados que se alimentan exclusivamente de la sangre del huésped a lo largo de toda su vida. La sangre ingerida por las garrapatas es una fuente rica de proteínas, la cual es fundamental para procesos anabólicos como la vitelogenénesis y la producción de huevos.

El proceso de digestión de las proteínas contenidas en la sangre ingerida por las garrapatas difiere en gran medida con el de los insectos. En estos últimos, la digestión de proteínas se produce rápidamente y tiene lugar en el lumen del intestino. Sin embargo en las garrapatas, la digestión de las proteínas presentes en la sangre ingerida es un proceso intracelular lento (Balashov, 1972), cuyas características intracelulares han sido estudiadas en células epiteliales del intestino de muchas especies de garrapatas ixodidae y agarisade (Raikhel, 1974, 1975, 1978; Balashov y Raikhel, 1978). En ixódidos, la sangre lisada es transportada por medio de endocitosis en fase fluida, generalmente este mecanismo se considera no selectivo (Coons y col., 1986). Mediante observaciones histológicas se ha revelado que la hemólisis de los eritrocitos del hospedero ocurre en el lumen del intestino medio (Agbede y Kemp, 1985), seguido por endocitosis y digestión lisosomal en las células epiteliales (Coons y col. 1986; Lara y col., 2005).

La hemoglobina principal componente de los eritrocitos, es la proteína más abundante de la sangre, la misma es un nutriente esencial, y por lo tanto la hemólisis es crítica en el proceso por el cual las garrapatas obtienen los nutrientes. Estudios realizados por (Lara y col., 2005) mostraron que las células digestivas de la garrapata común del ganado, *R. microplus* tienen especificidad por la hemoglobina mediada por receptores de la vía endocítica. La digestión de hemoglobina y otras proteínas presentes en la sangre del hospedero se produce en vesículas de las células intestinales, llamadas lisosomas y endosomas, (Coons y Alberti, 1999 ; Sonenshine, 1991). La hemoglobina parece ser reconocida por un receptor de superficie celular específico que es blanco hacia una población de grandes vesículas, que son capaces de acidificar las proteínas, siendo esto consistente con la presencia de peptidasas con un pH óptimo ácido en el intestino de la garrapata. Cualquiera sea la naturaleza molecular del receptor de hemoglobina en las células digestivas, la existencia de distintos receptores, compartimentos celulares, posibles peptidasas y transportadores de membrana dedicados a la digestión de

hemoglobina pueden ser explicados como una protección contra la potencial toxicidad del grupo hemo e ilustra la complejidad de adaptación para la digestión de hemoglobina.

En los últimos años se han llevado a cabo investigaciones para caracterizar los mecanismos de la digestión de la sangre en las garrapatas, estos estudios se han centrado en enzimas individuales presentes en varias especies de garrapatas y se han identificaron principalmente cisteína peptidasas (por ejemplo, Renard y col., 2000. ; Sojka y col., 2007 ; Tsuji y col., 2008) y aspártico peptidasas (Boldbaatar y col, 2006).

Las cisteína peptidasas han sido descritas frecuentemente actuando en procesos de degradación en muchas especies de artrópodos, como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, la cucaracha *Blattella germanica* (Liu y col., 1996) el gusano de seda *Bombyx mori* (Kageyama y Takahashi, 1990) y la garrapata *Ornithodoros moubata* (Fagotto, 1990). A su vez estas peptidasas son fundamentales en casi todos los procesos del ciclo de vida de los parásitos hematófagos, y se cree que tienen un rol esencial en una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo la degradación de proteínas reguladoras y procesos digestivos (Sajid y col., 2002).

La catepsina L es una cisteína peptidasa perteneciente al Clan CA, familia C1. Generalmente es sintetizada como una preproenzima que es procesada a proenzima y dirigida al lisosoma por el marcador de reconocimiento, la manosa-6-fosfato lisosomal (Von y col., 1985). La proenzima luego es procesada a una forma madura (Barret y col., 1981). La catepsina L madura está involucrada en procesos del sistema inmune, modulación y alteración del funcionamiento celular. (Dickinson y col., 2002). Estas peptidasas tienen un pH óptimo ácido, y su actividad sería máxima en el ambiente ácido de los lisosomas (Sajid y col., 2002). En varios endo y ectoparásitos hematófagos, la catepsina L participa en la adquisición de nutrientes catabolizando la hemoglobina y los péptidos del hospedero. (Tort y col., 1999; Brady y col., 1999). A su vez tienen un papel fundamental en el intestino degradando la hemoglobina de la sangre del hospedero en la garrapata *R. microplus* (Renard y col., 2000).

La asparagina endopeptidasa (AE) (AEP, EC 3.4.22.34) legumaína, es una cisteína asparagina peptidasa específica en animales, dicha peptidasa está categorizada en el clan CD (Chen y col., 1997) y pertenece a la familia de cisteína peptidasas, C13.

Las primeras legumaínas fueron descritas en plantas leguminosas (Ishii y col., 1992), desde entonces varios ortólogos han sido descritos en muchos protozoarios y metazoarios (Muntz y Shutov, 2002; León- Félix y col., 2004; Caffrey y col., 2004; Watts y col., 2005), en los parásitos *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepática*, en mamíferos incluyendo humanos, ratón, rata y

cerdos (Sajid y Mc Kerrow, 2002). Estas peptidasas son generalmente enzimas lisosomales, activas a pH ácido con un clivaje específico por el sitio carbonilo del residuo de asparagina en la posición P1 de las proteínas (Chen y col., 2000).

Aspártico peptidasas y otras relacionadas con las serina peptidasas se han identificado en la garrapata dura *Haemaphysalis longicornis*, esta garrapata ubicada en Asia, parasita ciervos (Hoogstraal y Aeschlimann, 1982), caprinos, porcinos (Hoogstraal y col., 1968), bovinos, perros, equinos, ovinos, humanos, mamíferos salvajes y aves (Soulsby, 1988). Las aspártico peptidasas identificadas en esta garrapata han sido implicadas en la digestión de sangre, específicamente en la digestión de Hemoglobina y Albúmina respectivamente. (Miyoshi y col., 2004 b; Boldbaatar y col., 2006).

Peptidasas de otras clases también se expresan en el intestino de garrapatas, por ejemplo, una leucina aminopeptidasa y una serina endopeptidasa hemolítica se encuentran en el citoplasma y la luz, respectivamente (Hatta y col., 2006. ; . Miyoshi y col, 2007). Las aminopeptidasas son exopeptidasas que catalizan la remoción de aminoácidos en la posición N-terminal de proteínas y péptidos (Taylor, 1993). Estas peptidasas están constituidas por un conjunto muy diverso de peptidasas con importantes roles en el mantenimiento, crecimiento, desarrollo y defensas de la célula. Históricamente las aminopeptidasas fueron consideradas como un set de enzimas ubiquitinas con roles en la homeostasis celular. En adición a su rol en el paso post- proteosoma o proteólisis intracelular, las aminopeptidasas participan en funciones específicas, tienen un rol muy importante en varios procesos fisiológicos, como por ejemplo formando parte de la regulación de vías metabólicas, control del ciclo celular y degradación selectiva de proteínas (Brownless y Williams, 1993).

Las leucina aminopeptidasas están constituidas por un grupo diverso de metalo peptidasas, y son miembros de las familias M1 o M17 cuyas familias se diferencian en tener distintas estructuras, mecanismos y roles en animales, plantas y procariontas. Las M17 son hexaméricas y unen dos cationes mientras que las M1 no son hexaméricas y unen un solo catión.

LAP es una de las mayores aminopeptidasas citosólicas y ha sido identificada en numerosos microorganismos, plantas, vertebrados e invertebrados. Las aminopeptidasas incluida la LAP también ha sido reportadas funcionando como enzimas digestivas (Nisbet y Billingsley, 2002; Bozic y col., 2003; Mc Carthy y col., 2004; Okuda y col., 2005), activando o inactivando biopéptidos, y participando regulación en vías de señalización (Colloms y col., 2004; Strater y col., 2004). Estas múltiples funciones de las aminopeptidasas incluyendo a LAP han sido foco

de estudios sobre nuevos blancos para la creación de vacunas antiparasitarias. Vacunación contra los endoparásitos *Haemonchus contortus* (Newton y Munn, 1999) y *Fasciola hepática* (Piacenza y col., 1999) y la directa aplicación de inhibidores específicos de aminopeptidasas para el control de la infestación por la mosca verde *Lucilia cuprina* en ovejas (Reed y col., 1999). Más allá de la hidrólisis de Leu esta peptidasa participa en la maduración, activación o degradación de otros sustratos (Grandjean y col., 1973; Coons y col., 1986).

Las LAPs M17 pueden ser blancos para nuevas drogas contra infecciones parásitas. En el parásito *Plasmodium falciparum* agente causante de la Malaria está presente (PfLAP) la cual participa en la última etapa del catabolismo de la hemoglobina, generando y regulando un pool de aminoácidos libres necesarios para la síntesis de proteínas y el mantenimiento de la estabilidad osmótica (Agyei y col., 1995; Caperucci y col., 2010). Se sabe que la leucina aminopeptidasa tiene un importante rol en la biología de parásitos. En helmintos, LAPs han sido caracterizadas aunque existen evidencias que su participación es vital en procesos del ciclo celular. En el trematodo *Schistosoma mansoni* esta enzima ha sido localizada en el intestino, tegumento y huevos.

Si bien se sabe muy poco sobre las características moleculares y funciones biológicas de las aminopeptidasas en las garrapatas, se ha reportado la presencia de actividad aminopeptidasa en intestino, glándulas salivares (Kerlin y Hughes, 1992) y embriones (Ibrahim, 1998).

En el año 2006, Hatta y colaboradores identificaron actividad LAP en la garrapata *Haemaphysalis longicornis*, siendo la primer actividad LAP detectada en una garrapata dura. La LAP identificada para *Haemaphysalis longicornis* (HILAP), muestra una alta conservación de motivos de secuencias consenso con la familia de aminopeptidasas citosólicas M17.

Recientemente, se ha llevado a cabo un enfoque más sistemático y se determinó un conjunto de secuencias de cDNA de cisteína y aspártico peptidasas en el intestino de la garrapata *Ixodes ricinus*. Esta garrapata presente en Europa y Asia, infecta al ganado bovino, venados, ovejas y otros mamíferos de gran tamaño como los humanos. (Sojka y col., 2008).

A su vez se ha reportado el transcriptoma del intestino medio de la garrapata del perro, *Dermacentor variabilis* el cual contiene un panel de enzimas proteolíticas de cuatro clases principales (Anderson y col., 2008).

Si bien el contenido de las peptidasas presentes en el tejido intestinal de las garrapatas no se conoce en su totalidad, Horn M. y col, 2009 utilizando una plataforma proteómica y con la ayuda

de herramientas bioquímicas elucidaron como la hemoglobina podría ser digerida proteolíticamente en la garrapata *Ixodes ricinus*.

En este modelo de degradación (Figura 11) llevado a cabo por enzimas proteolíticas, se estableció que tres endopeptidasas podrían ser las encargadas del clivaje inicial de la molécula de Hemoglobina, estas peptidasas serían: catepsina D, catepsina L y legumaína. La catepsina D, sería la principal peptidasa en este paso, mientras que el rol de la catepsina L sería de apoyo. La legumaína es menos efectiva con respecto al grado de fragmentación que las anteriores, esta peptidasa sería la encargada de completar la digestión en esta etapa, obteniéndose largos fragmentos de péptidos. Las peptidasas catepsina B y C son dominantes en los siguientes pasos de degradación de hemoglobina. La catepsina B ejerce una actividad dual endopeptidasa y peptidil dipeptidasa que genera péptidos pequeños y remueve dipéptidos carboxi terminales, la catepsina C funciona como una dipeptidil peptidasa responsable de la producción de dipéptidos por recorte del amino terminal. Así estas dos enzimas ejecutarían la descomposición masiva de los largos fragmentos peptídicos convirtiéndolos en dipéptidos. Estos autores suponen que in vivo también se incorporaría la acción de mono-peptidasas, como serina carboxipeptidasas (SCP) y leucina aminopeptidasa (LAP) que actuarían en la liberación de aminoácidos.

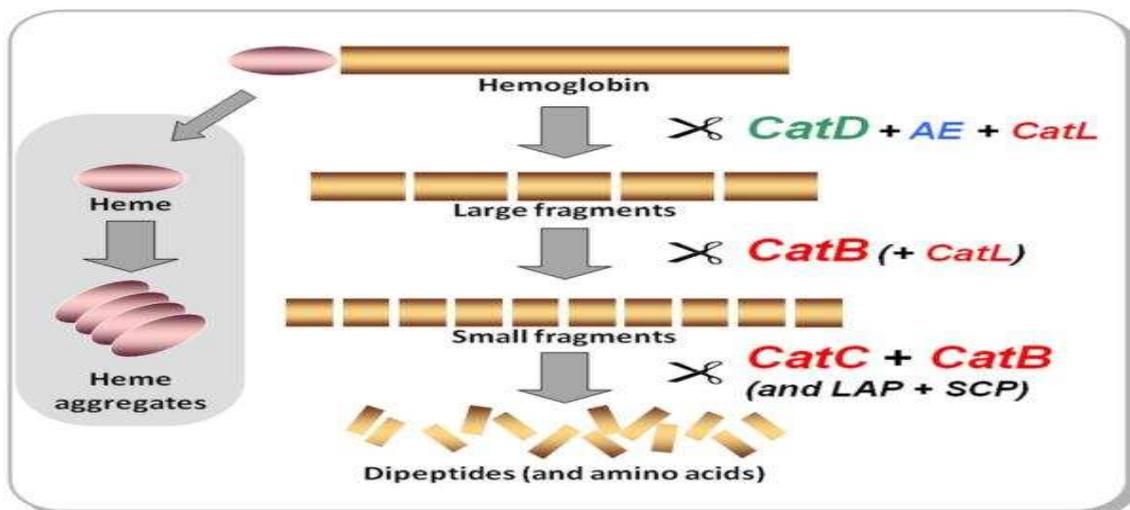


Figura 11: Modelo de degradación de la Hemoglobina por enzimas proteolíticas de la garrapata *I. ricinus*. catepsina D (CatD), catepsina L (CatL), legumaína (AE), catepsina B (CatB), catepsina C (CatC), serina-carboxipeptidasas (SCP) y leucinaminopeptidasa (LAP). Las enzimas están codificadas por color según pertenencia a un clan; clan AA aspártico peptidasas (verde), clan CD cisteína peptidasas (azul), clanCA (tipo-papaína) cisteína peptidasas (rojo), y serina y metalo peptidasas (negro).

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Caracterizar e identificar actividad proteolítica en extractos de garrapatas hembras engordadas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, cepa Mozo.

Objetivos específicos:

- Disección de garrapatas hembras engordadas.
- Preparación de extractos y caracterización primaria.
- Detección de actividad proteolítica en los extractos de garrapata: intestino, ovarios, huevos y tubos de Malpighi.
- Estudios de actividad proteolítica tipo leucinaminopeptidasa (LAP), catepsina L y legumaína en los extractos (intestino, ovarios, huevos y tubos de Malpighi).
- Inmunodetección de LAP en los extractos de trabajo por Western-blot.
- Purificación parcial de la peptidasa tipo LAP detectada en el intestino.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Obtención de extractos de garrapata.

4.1.1. Disección de garrapatas.

4.1.1.1. Materiales.

Lupa estereoscópica (Olympus, modelo SZ30), placas de Petri de vidrio, pinzas, papel autoadhesivo, etanol 70%, tampón fosfato de sodio salino (PBS) 10 mM pH 7.3, tubos Falcon y bisturí.

Todo el material fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos previo a la disección.

Se utilizaron aproximadamente 80 garrapatas hembras engordadas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, cepa Mozo, caídas de bovinos en el mismo día o anterior a su colecta. Dichas garrapatas fueron cedidas por el departamento de parasitología del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de (Uruguay), Instituto Rubino (Dilave) donde dicha cepa es mantenida desde el año 1973.

4.1.1.2. Procedimiento.

Las garrapatas fueron transportadas al laboratorio en una placa de Petri cerrada. Antes de comenzar con la disección, las mismas fueron lavadas con etanol 70% varias veces para eliminar residuos del hospedero y luego secadas con papel absorbente. Una vez limpias y secas, cada garrapata fue colocada con la zona ventral sobre una cinta de papel adhesiva adherida a una placa de Petri; este procedimiento se realizó para facilitar la manipulación y su posterior disección.

La disección fue realizada mediante dos métodos:

1. Se realizó una incisión en el contorno del escudo con un bisturí, retirándose el mismo por tracción mediante pinzas estériles.
2. Mediante el uso de una pinza estéril se presionó el capítulo y luego con la ayuda de un bisturí se realizó un corte a la altura del prosoma, con ayuda de otra pinza se apretó la garrapata para liberar los órganos a través de la abertura realizada.

Una vez abierta la garrapata se procedió a la extracción de los diferentes órganos. Con ayuda de una pinza estéril, de una aguja y bajo una lupa estereoscópica se fueron separando las distintas partes, con sumo cuidado de no romper los tejidos; al mismo tiempo que se fue lavando la zona despejada con PBS para eliminar el grueso de sangre y visualizar mejor los distintos órganos a disecar. Una vez limpiada la zona se procedió a extraer con pinza los distintos órganos que fueron colocados a un lado, en grupos separados por categoría de órgano, y mantenidos sobre unas gotas de PBS limpio para seguir con los lavados. Se procedió a la extracción de tubos de Malpighi, intestino y ovarios de todas las garrapatas disecadas. Los órganos disecados se agruparon por categorías en una nueva placa de Petri limpia sobre más PBS y se realizaron numerosos lavados con solución tamponada de fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7.4 para eliminar la sangre bovina ingerida por la garrapata. Una vez limpios fueron suspendidos en un volumen mínimo de PBS y conservados en tubos Falcon a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Las carcasas vacías se descartaron como material biológico contaminado en bolsas rojas de logo característico según protocolo del Instituto de Higiene, acorde a la normativa nacional vigente.

Nota: las glándulas salivares son difíciles de preservar intactas durante este procedimiento. Si bien se colectó alguna glándula, la gran mayoría se perdió por lo cual no se pudo preparar este tipo de material para su análisis posterior.

4.1.2. Oviposición.

Para la obtención de huevos se partió de aproximadamente 20 garrapatas hembras de la cepa Mozo que fueron obtenidas, transportadas y limpiadas como se describió en el ítem anterior. Las mismas se mantuvieron vivas en placas de Petri durante varios días a temperatura ambiente permitiendo que las mismas realizaran la oviposición (Figura 12). Los huevos se cosecharon en un tubo Falcon estéril mediante la ayuda de una espátula y se conservaron congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

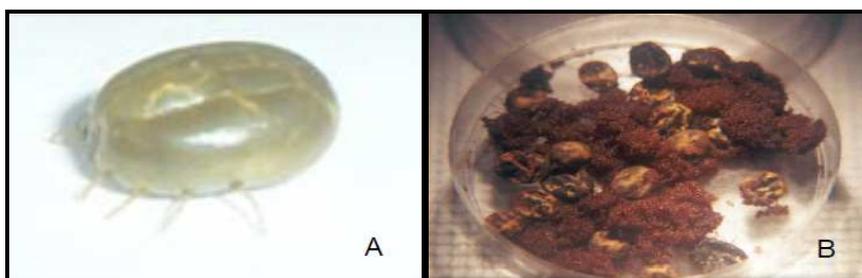


Figura 12: Aspecto de las hembras adultas inmediatamente después de caídas del bovino. A) hembra adulta de garrapata *R. microplus*, B) hembras repletas poniendo huevos.

4.1.3. Preparación de extractos.

4.1.3.1. Para la caracterización primaria de actividad.

Los órganos suspendidos en (PBS) fueron trasvasados a un nuevo tubo Falcon limpio. Posteriormente los órganos fueron procesados para lograr su disgregación. Para ello el material obtenido de intestino, ovarios o tubos de Malpighi fueron triturados con un homogeneizador de vidrio esmerilado, mientras que para el extracto de huevos se utilizó un homogeneizador eléctrico (PRO 200, Pro Scientific Inc Oxford, CT) el cual facilitó la ruptura de la cubierta del huevo y la disgregación de las membranas. El sistema se mantuvo en hielo picado durante todo el procedimiento.

Cada homogenizado fue trasvasado a otro tubo Falcon limpio y se procedió a la lisis celular mediante ultrasonicación (en baño de hielo) por un tiempo total de 3 minutos, en ciclos compuestos por pulsos de 60 segundos (20% de potencia) y pausas de 30 segundos, para este procedimiento se utilizó un homogeneizador ULTRASONIC 4710 (Cole-Palmer Instrument Co.). Luego se centrifugó a 22000 g por 20 minutos a 4 °C en una centrífuga de alta velocidad (HANIL SUPRA 22 K, Corea) para separar el sobrenadante del pellet de cada muestra.

Para los extractos de intestino y huevos luego de la centrifugación se filtró el sobrenadante con una gasa para eliminar restos de lípidos.

Se guardaron alícuotas de los extractos obtenidos a -80 °C hasta su utilización

4.1.3.2. Para la purificación.

Para la cromatografía de afinidad se preparó un extracto nuevo de intestino igual que en el ítem anterior pero utilizando el agregado de inhibidores específicos de cisteína y serina proteasas de forma de evitar la degradación de las enzimas a purificar. Se utilizó E-64 y PMSF con una concentración final en el ensayo de 10 µM y 2000 µM respectivamente para un total de 300 µL aproximadamente de intestinos colectados y procesados.

4.2. Análisis del Patrón Electroforético por SDS-PAGE.

Con el fin de evaluar el patrón proteico de los extractos preparados previamente, se realizó un análisis electroforético mediante el método descrito por Laemmli, U.K. (Laemmli, 1970), en un sistema de electroforesis vertical (Atto Corporation, Japón) a temperatura ambiente.

Preparación de la muestra: Las proteínas fueron desnaturalizadas mediante un tratamiento con ditioneitol (DTT) para romper los puentes disulfuros internos, calor y detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) el cual actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas. 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.

Procedimiento: Para el ensayo se prepararon geles de (8 x 9) cm de espesor 1 mm, con una concentración de poliacrilamida de 12.5% para el gel de resolución y 5% para el gel concentrador.

Se sembraron por pocillo 5 µL de los extractos de intestino (149 µg), tubos de Malpighi (14.4 µg) y ovarios (66.5 µg), 12 µL del extracto de huevos (144 µg).

La corrida electroforética se realizó en buffer de electroforesis (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1%, pH 8.3), aplicando una corriente constante de 30 mA/gel, la misma se dio por finalizada cuando el frente de corrida estuvo a 0,5 cm del borde inferior del gel.

Revelado: La visualización de las proteínas se realizó con tinción de azul de Coomassie para revelar una concentración de 0.1 - 0.5 µg por banda (Harlow, 1988). Para ello una vez finalizada la corrida electroforética, se retiró el casete de la cuba y se colocó el gel en un recipiente con solución de colorante, Coomassie Brilliant Blue R-250 0.25% en solución de metanol: ácido acético: agua (45:10:45); se incubó toda la noche bien tapado a temperatura ambiente en agitación suave.

Para completar la coloración se retiró la solución de tinción que es reciclada, y se mantuvo el gel durante una hora sumergido en solución decolorante (reciclada) para extraer el primer exceso de colorante. Esta solución se descartó y se agregó sobre el mismo solución decolorante nueva, preparada con una mezcla de metanol: ácido acético: agua (45:10:45), el gel se mantuvo sumergido y en agitación, hasta que las bandas de proteínas teñidas de azul aparecen sobre fondo transparente.

Cálculo de los pesos moleculares aparentes:

Los pesos moleculares aparentes de cada proteína se calcularon por método gráfico. Para ello se comparan las movilidades relativas de cada proteína (Rf) con respecto a la de una mezcla estándar de peso molecular conocidos (New England Biolabs Protein Ladder (10–250 KDa) P7703s el cual contiene una mezcla de doce proteínas recombinantes de alta pureza. La Rf se define como la relación: avance de la banda (cm)/avance del frente de corrida (cm), medidas desde el comienzo del gel separador y sobre el gel teñido y escaneado.

La movilidad electroforética relativa **Rf** es inversamente proporcional al logaritmo del PM. Se grafica el log de PM vs Rf, se calcula la mejor recta por mínimos cuadrados y se interpolan los valores de Rf para cada proteína problema.

4.3. Cuantificación de proteínas.

Para determinar la concentración de proteínas presente en los extractos estudiados, se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA) usando un kit comercial (BCA Pierce, Thermo Scientific), adaptado a micro placas de 96 pocillos (Maxi Sorp, NUNC). Este método combina la reducción del ion cúprico (Cu^{2+}) a ion Cuproso (Cu^{+1}) en un medio alcalino (reacción de Biuret) y la detección de este catión (Cu^{+1}) usando un reactivo complejante que contiene el ácido bicinconínico. El producto final de la reacción es de color púrpura, formado por la unión de dos moléculas de BCA con una del ion cuproso. El complejo hidrosoluble formado puede ser detectado y cuantificado por su absorbancia a 560 nm.

La albúmina de suero bovino (BSA) fue usada como estándar; se partió de una solución patrón de BSA cuya concentración es de 9.88 mg/mL a partir de la cual se realizó una dilución de forma de obtener una solución de trabajo de 1mg BSA/mL (1000 $\mu\text{g/mL}$). A partir de la solución de trabajo, se prepararon 100 μL de cada dilución de la curva estándar. Para la preparación del reactivo de trabajo se mezclaron 50 partes del reactivo A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico, tartrato sódico en hidróxido de sodio 0.1 M) y 1 parte del reactivo B (hidróxido de sodio al 4%).

En la micro placa se sembraron por pocillo: 10 μL de cada extracto por duplicado de garrapata (intestino, huevos, ovarios y tubos de Malpighi), 10 μL de cada punto del estándar y una columna de la placa con 200 μL por pocillo de buffer fosfato salino (PBS) el cual fue utilizado como blanco. Luego de sembradas las muestras y el estándar, se adicionaron 200 μL del reactivo de trabajo.

Posteriormente la placa fue incubada a 37°C durante 30 minutos.

Culminado el tiempo de incubación se procedió a la lectura de la absorbancia a 560 nm usando un espectrofotómetro (MCC/340, MultiSkan).

Los valores obtenidos de absorbancia fueron interpolados en la curva estándar y se realizaron los cálculos correspondientes.

4.4. Determinación de actividad proteolítica.

4.4.1. A: Zimogramas en gel.

El zimograma en gel es una técnica que permite detectar actividad enzimática en una mezcla compleja de proteínas luego de separarlas electroforéticamente. Se realiza con poliacrilamida y a diferencia de las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), se trata de utilizar condiciones suaves (sin agentes reductores y sin hervir las muestras) para evitar la pérdida de actividad de las enzimas estudiadas.

La polimerización de la poliacrilamida se realiza en presencia de gelatina soluble o de Hemoglobina (Hb) que actuarán como sustratos de las enzimas proteolíticas a estudiar. Para lo cual se preparó un gel separador (running) al 10% en ACRI-BIS usando en vez de agua una solución de gelatina o de Hb 0,5% (p/v) (la gelatina fue disuelta en agua destilada caliente y preparada fresca en el momento) (Tabla 2) de esta manera el gel resultante contendrá gelatina (colágeno desnaturizado) o hemoglobina desnaturizada.

En el gel se sembraron 5 µL de los extractos de garrapata (intestino, huevos, ovario y tubos de Malpighi) en 15 µL de buffer de muestra 4X por pocillo.

La corrida electroforética se realizó en las mismas condiciones descritas para el SDS-PAGE con la precaución de no hervir las muestras en el buffer. Una vez terminada la corrida, el gel se enjuagó en H₂O destilada y se realizaron dos lavados de 30 minutos cada uno con 300 mL de una solución de Tritón X-100 0,25% en agua, con agitación a temperatura ambiente. Luego el gel fue incubado toda la noche a 37 °C en 200 mL de tampón citrato 0,1 M pH 4,5, cisteína 10 mM, esta incubación favorece la actividad de las proteasas a pH ácido. Una vez finalizado el tiempo de incubación se procedió a la tinción de las proteínas presentes en las muestras con CBB R-250 durante 24Hs.

Tabla 2: Soluciones utilizadas para la preparación de los geles de gelatina y Hemoglobina (Hb).

Soluciones	Runing 10%	Stack
ACRIS-BIS30%	5 mL	0,835 mL
agua d. con gelatina o (Hb)	4,35 mL
agua d.	3,5 mL
Tris-HCl pH8,8	5,5 mL
Tris-HCl pH6,8		0,625 mL
SDS 20%	75 µL	25 µL
APS	50 µL	25 µL
TEMED	10 µL	20 µL

El resultado esperado en este tipo de geles, es que en la zona donde se ubicó una proteasa activa, la gelatina o hemoglobina habrán sido degradadas, observándose una zona blanca (bandas traslúcidas) donde hubo degradación de las proteínas, sobre fondo violeta.

4.3.1 . B: Ensayos con péptidos sintéticos por análisis fluorimétrico.

La actividad proteolítica de los diferentes extractos se analizó y cuantificó (cuando fue posible) por fluorimetría utilizando sustratos peptídicos sintéticos acoplados a un fluoróforo, la molécula 7-amino-metil-cumarina (AMC), y específicos para cada actividad ensayada.

Los sustratos utilizados se conservaron a - 20 °C como una solución stock de Dimetilformamida (DMF) cuya concentración se muestra en la (Tabla 3).

Tabla 3: Concentración de sustratos peptídicos stock (mM) para las peptidasas estudiadas.

Proteasa	Sustrato	Con. Sustrato stock (mM)
catepsina L	Z-Phe-Arg-AMC	100
leucinaminopeptidasa	L-Leu-AMC	10
legumaína	Z-Ala-Ala-Asn-AMC	45

Para cuantificar la actividad detectada por fluorimetría se trabajó con una curva estándar de AMC realizada en las mismas condiciones de los ensayos y en forma simultánea a éstos. Los puntos del estándar se seleccionaron en el tramo lineal de la curva con un rango de concentración de AMC de (0.1 -1.0 µM) (Tabla 4). Las diluciones del estándar se prepararon a partir de una solución stock de AMC 10 mM diluido en el mismo buffer que se utilizó en los ensayos y cada vez que se realizaron las medidas.

La cantidad AMC liberado se midió en unidades de fluorescencia (UF) en un fluorímetro lector de microplacas Fluostar Galaxy (BMG-Lab Technology, Alemania) usando filtros de 370 nm para la luz de excitación y de 440 nm para la luz de emisión, valores característicos de la molécula de AMC.

Tabla 4: Preparación del estándar AMC a partir de una solución stock de AMC 10 µM.

[AMC] 10 µM	volumen AMC 10 µM (µL)	tampón de trabajo (µL)
0,1	4	396
0,25	10	390
0,5	20	380
0,75	30	370
1,0	40	360

Los ensayos fueron realizados por duplicado en microplacas negras de 96 pocillos (Microwill, Apogent). A su vez para todos los ensayos se utilizó como blanco el sustrato correspondiente para cada proteasa y el tampón utilizado en cada caso. Además se sembraron 100 μ L de cada punto de una curva estándar de AMC realizada en las mismas condiciones de los ensayos mencionados anteriormente a los distintos pH. La reacción se llevó a cabo a 37 °C, en oscuridad, durante una hora.

Se definió una unidad de enzima (UE) como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de un μ mol de AMC por minuto a 37°C.

4.4.2.1. Preparación de controles para actividades en intestino.

Durante la preparación del extracto de intestino se tuvo la precaución de lavar los intestinos numerosas veces en PBS antes de su homogenizado (5 lavados de 15 minutos cada uno), de forma de reducir al mínimo posible, mediante dilución, la contaminación con sangre bovina.

Para descartar falsos positivos debidos a la contaminación con sangre del huésped en los ensayos de actividad proteolítica tipo: catepsina L, aminopeptidasa y legumina, se realizaron ensayos control usando sangre bovina obtenida de un animal donante sano, del Campo Experimental del Instituto de Higiene.

Para este ensayo la sangre de un mismo animal se dividió en dos partes: una muestra de sangre entera y una muestra de sangre conteniendo citrato de sodio como anticoagulante. La sangre entera se mantuvo a temperatura ambiente para permitir la formación del coágulo. Previamente a la determinación de la actividad enzimática, las muestras fueron centrifugadas a 2000 g durante 15 minutos.

Luego de la centrifugación, para la muestra de sangre entera se obtuvo un pellet que corresponde a células y proteínas insolubles presentes (coágulo) y un sobrenadante que corresponde al suero donde se encuentran las proteínas solubles. Para la muestra de sangre con anticoagulante luego de la centrifugación se obtuvo un pellet que contiene las células y un sobrenadante (plasma) donde se encuentran las proteínas solubles. Sobre cada una de éstas muestras, en diluciones seriadas, se realizaron los respectivos ensayos control.

4.4.2.2. Actividades Proteolíticas Investigadas.

4.4.2.2.1. Actividad tipo aminopeptidasa, basado en un ensayo descrito por Hatta y col. (2006) con algunas modificaciones.

Los ensayos de actividad aminopeptidasa se realizaron en un volumen total de reacción de 200 μL , comenzando con el agregado de 170 μL de una solución tampón Tris-HCl 50 mM, MnCl_2 1 mM, EDTA 5 mM pH 8 a la cual se le adicionaron 20 μL del sustrato L-Leucina-7-amino-4-metilcumarina (Leu-AMC) con una concentración en el ensayo de 1000 μM y por último se añadieron 10 μL de cada muestra/control a ensayar.

Si bien no se realizaron estudios de especificidad sobre otros aminoácidos amino terminales que demostraran la preferencia por Leu, a lo largo de este trabajo se denominará esta actividad como tipo leucinaminopeptidasa (LAP).

4.4.2.2.2. Actividad tipo legumaina, basado en un ensayo descrito por Alim y col. (2007) con algunas modificaciones.

La actividad legumaina se determinó siguiendo el protocolo descrito en por Alim y col. (2008) con algunas modificaciones.

Se prepararon dos mezclas de reacción conteniendo una solución tampón citrato de sodio 50mM -EDTA 1mM - DTT 1M (sistema A) o con el agregado de 0,05% Chaps (sistema B) pH 7, y el sustrato Z-Ala-Ala-Asn-AMC con una concentración final en el ensayo de 300 μM .

Se sembraron 95 μL por pocillo de cada mezcla de reacción y luego se agregaron 5 μL de cada muestra.

4.4.2.2.3. Determinación del pH óptimo para la actividad proteolítica tipo catepsina L.

La actividad proteolítica fue medida usando el sustrato Z-Phe-Arg-AMC con una concentración final de 100 μM en el ensayo; preparado a partir de una solución stock 100 mM diluido en metanol. Como activador se utilizó DTT con una concentración final de 10 mM. El volumen final de reacción fue de 100 μL conteniendo 70 μL de solución tampón: ácido cítrico 0,1 M / disodio H fosfato 0,067 M pH 4, 15 μL de sustrato 100 μM , 10 μL de DTT 10 mM y 5 μL de muestra a ensayar. Se evaluó la actividad catepsina L a diferentes pHs con el objetivo de determinar su pH óptimo. El tampón utilizado fue el ácido cítrico 0,1 M / disodio H fosfato 0,067 M a pHs (3; 3,4; 4; 5; 5,6; 6; 7; 7,8).

4.4.2.3. Ensayos de inhibición.

Los ensayos de inhibición fueron realizados en las mismas condiciones y con el mismo procedimiento que los ensayos de actividad proteolítica por fluorimetría descritos anteriormente, pero además se agregaron varios inhibidores (Sigma-Aldrich) a cada una de las muestras (Tabla 5), los mismos fueron incubados con cada muestra en el tampón correspondiente para cada peptidasa mencionado anteriormente, durante 15 minutos a 37 °C antes del agregado del sustrato. En el caso de la actividad tipo catepsina L, los ensayos de actividad fueron realizados a los pHs donde dicha actividad fue máxima. Para la actividad tipo legumina no se realizaron ensayos de inhibición.

Como control no inhibido (100 % actividad) se utilizó cada extracto sin inhibidor.

Tabla 5: Inhibidores utilizados específicos para distintas peptidasas.

Inhibidor	Especificidad	[efectiva] μM	[ensayo] μM
bestatina	LAP	1	10
PMSF	serina	1000	2000
E-64	cisteína	10	10
pepstatina-A	aspártico	1	1
EDTA	metalo	10000	10000
iodoacetamida	cisteína y serina	10000	10000

4.5. Inmunoblot.

Para la inmunodetección de LAP se intentó realizar un inmunoblot usando un anticuerpo específico desarrollado contra la LAP recombinante de un experimento de vacunación de *Fasciola hepática*.

Procedimiento: las muestras de *R. microplus* (intestino, huevos y ovarios) fueron corridas en un gel SDS-PAGE al 10%, y electro transferidas a una membrana de celulosa de acuerdo con el método descrito por Towin y col. (1979).

Se cortaron papeles Whatman del mismo tamaño del gel (8x9 cm), se apilaron y humedecieron en el tampón Tris 48 mM con glicina 39 mM, SDS 0.037% y metanol 20%. Se presionó la pila de papeles para remover las burbujas de aire, luego se colocó la membrana de nitrocelulosa sobre la pila de papeles y se removió el aire entre ambos. Posteriormente se colocó el gel sobre la membrana (previamente se lavó la superficie con agua destilada para eliminar el SDS) y se

eliminaron las burbujas. Encima del gel se colocó otra pila de papeles Whatman humedecidos con el mismo tampón mencionado anteriormente y se eliminaron las burbujas. Una vez armado el sándwich (pila de papeles, membrana, gel y papeles) se colocó en la cámara de transferencia. Dicha transferencia se realizó a 1.2 mA/cm^2 durante una hora y media (Kyhse-Andersen y col., 1984).

Luego de la transferencia se marcaron los carriles del gel en la membrana con lápiz de grafito. La membrana de nitrocelulosa fue teñida con el colorante Fast Green (control de transferencia) y luego lavada con PBS. La membrana fue incubada durante una hora en una solución tampón fosfato salino (PBS) con detergente polisorbato 20 (tween 20) al 1% (PBS-T) para bloquear los sitios inespecíficos, durante una hora a temperatura ambiente. Una vez finalizado el bloqueo se realizaron tres lavados con PBS-T 0,1% de cinco minutos cada uno.

Después se incubó la membrana con el suero de oveja anti-LAPr Fh (LAP recombinante de *Fasciola hepática*), dilución (1/200 en PBS-T) durante una hora a temperatura ambiente. Pasada la hora se realizaron tres lavados con PBS-T 0,1% de cinco minutos cada uno.

Luego se incubó la membrana con el antisuero secundario anti IgG de oveja (conjugado a Peroxidasa de oveja) (dilución 1/3000 en PBS-T 0,1%) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-T 0,1% de cinco minutos cada uno.

Para el revelado se utilizó una solución: 10 mL de buffer trietanolamina 10 mM pH 7,5, 2 mL de 4-cloro-1-naftol 2,8 mM en metanol 100% y 5 μL de peróxido de hidrógeno 30%) preparada en el momento.

4.6. Purificación de actividad tipo LAP.

Basados en la capacidad de la bestatina de inhibir la actividad LAP, se intentaron aislar las enzimas responsables de la misma, mediante una cromatografía de afinidad por bestatina.

4.6.1. Cromatografía de Afinidad bestatina - sefarosa.

Se utilizó un sistema de afinidad con bestatina, inhibidor específico de la actividad tipo LAP. Se utilizó una columna de bestatina-sefarosa preparada anteriormente en el laboratorio por métodos estándares donde la bestatina se unió covalentemente a una matriz de EAH-Sefarosa a través de carbodiimida.

La columna empaquetada tiene un volumen de matriz aproximado de 2 mL. Todos los tampones utilizados para este ensayo fueron previamente filtrados por una membrana con un tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$.

Preparación de la muestra de intestino a aplicar: El extracto de intestino preparado como se describió en el ítem 4.1.3.2 de este apartado fue descongelado; se tomaron 300 μL (8946 μg) del mismo y se dializaron empleando una membrana para diálisis (Spectra/Por Meorder N° 132720) de corte MWCO: MWCO: 3,500 da, Diámetro: 11,5 mm, ancho de la membrana: 18 mm, Volumen/longitud: 1 mL/cm contra 460 mL de solución tampón de equilibración (Tris-HCl 0,05M pH 8.5) durante 48 horas a 4°C. El dializado se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente en una ultracentrífuga de alta velocidad inmediatamente antes de ser usado.

Procedimiento: La columna fue lavada con el tampón Tris-HCl pH 8,5 0,05 M, NaCl 1,0 M el día anterior a la corrida exhaustivamente con más de 20 volúmenes de columna, para eliminar de la matriz de la misma cualquier elemento proteico ajeno a nuestro sistema biológico en estudio, los lavados se realizaron hasta confirmar la ausencia de proteínas eluidas por medida de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1201, Japón). Una vez limpia la columna, fue equilibrada con tampón Tris-HCl 0,05 M pH 8,5, para ello se pasaron por la columna (10 volúmenes de columna=20 mL) de tampón de equilibrio a un flujo de 0,5 mL/minuto mediante bomba peristáltica. La columna se consideró equilibrada cuando la absorbancia a la salida de la columna mostró una línea de base estable y con valores a 280 nm próximos al tampón de equilibración.

Se aplicaron 200 μL del extracto de intestino (34 mg/mL) previamente dializado y centrifugado, diluido en 250 μL de tampón de equilibración. Para eliminar las proteínas no retenidas por la matriz, se realizaron varios lavados de la columna, los eluidos se recogieron de a 1,5 mL y se midió la absorbancia a 280 nm para seguir el perfil de proteínas no retenidas y asegurarse la completa remoción de las proteínas no unidas a la matriz. El lavado se dio por finalizado cuando la absorbancia en los eluidos alcanzó niveles cercanos a cero. Se recogieron 49 alícuotas de 1,5 mL c/u (volumen total =73,5 mL).

La elución de las proteínas que se unieron a la bestatina se realizó con un gradiente escalonado de NaCl (0,1 M; 0,25 M; 0,5 M y 1,0 M) en tampón Tris-HCl 0.05 M pH 8.5. Para cada escalón se utilizaron 4 volúmenes de columna y se colectaron fracciones de 1.5 mL en tubos eppendorf.

Se siguió el perfil de elución de proteínas a 280 nm en las fracciones colectadas de cada escalón. Inmediatamente después de colectadas al pie de la columna, las distintas fracciones fueron analizadas para monitorear la actividad tipo LAP, y conocer el perfil y cantidad de

proteínas. Una vez terminado el ensayo la columna se lavó con H₂O bi destilada y se dejó en EtOH 20 %.

4.6.2. Análisis de las fracciones obtenidas en la purificación.

4.6.2.1. Monitoreo de actividad proteolítica tipo LAP.

La actividad tipo LAP se determinó mediante ensayos fluorimétricos en todos los tubos donde los valores de absorbancia a 280 nm fueron superiores a los obtenidos para la línea de base (picos de elución), muestra de intestino dializada y testigo.

4.6.2.2 Perfil de proteínas por SDS - PAGE

Con el fin de determinar la presencia y la pureza de las alícuotas obtenidas en la purificación de LAP, se realizaron separaciones electroforéticas de proteínas en condiciones desnaturalizantes y utilizando geles de poliacrilamida al 12,5% en presencia de SDS de las fracciones correspondientes a los máximos de absorbancia a 280 nm y los pooles concentrados de las fracciones correspondientes a los picos de proteína obtenidos.

El revelado de las proteínas se realizó considerando la concentración proteica de las muestras ensayadas en función de la sensibilidad de dos métodos: la tinción con Azul de Coomassie para revelar una concentración de 0.1-0.5 µg por banda (Harlow, 1988) descrito anteriormente, y la tinción con Plata adecuada para una concentración de 1-10 ng de proteína por banda, método descrito en Antibodies a Laboratory Manual, Harlow-Lane.

4.6.2.3. Cuantificación de Proteínas.

Mediante el método (BCA) descrito anteriormente, se determinó la concentración proteica presente en las fracciones correspondientes al máximo de cada pico de elución de la cromatografía, a las fracciones pooleadas y concentradas de cada pico, muestra dializada (muestra de partida utilizada en la cromatografía) y muestra de intestino sin dializar (Testigo).

4.6.2.4. Criterio de formación de Pooles.

Las fracciones que contenían los picos de elución se juntaron y se concentraron mediante el sistema que utiliza una celda de ultrafiltración con agitador incluido, empleando una membrana MILLIPORE (YM3 exclusión molecular 3000 Da), se cuantificó y se determinó la actividad.

4.6.2.5. Monitoreo de actividad legumaina.

La actividad tipo legumaina se determinó en los picos de elución concentrados, muestra de intestino dializada y testigo como se describe previamente en el ítem 4.4.2.2.2.

4.7. Procesamiento de imágenes.

Las imágenes presentadas en este trabajo, fueron digitalizadas mediante el uso de un escáner en formato TIFF a una resolución de 300 DPI y editadas mediante el programa Photoshop CS4.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización primaria.

5.1.1. Disección de garrapatas, extracción de órganos y preparación de extractos.

La disección de las garrapatas hembras adultas engordadas, fue realizada mediante dos procedimientos como se describe en el ítem 4.1.1.2. Sin embargo el procedimiento elegido para la preparación de los extractos utilizados en este trabajo fue el primero, debido a que con el segundo método fue muy difícil lograr que los intestinos no se desintegraran durante la extracción de los mismos. Además con el primer procedimiento se logró visualizar e identificar los diferentes órganos con mayor facilidad.

Una vez disecadas las garrapatas se procedió a la extracción de los intestinos, tubos de Malpighi, ovarios y glándulas salivares (Figura 13).

Debido a la gran dificultad de visualizar, y por lo tanto de extraer las glándulas salivares no se pudo obtener suficiente material como para preparar dicho extracto.

Los huevos fueron obtenidos como se describe en el ítem 4.1.2., la cosecha de los mismos se realizó luego de 10 días, momento en el cual dimos por finalizada la oviposición debido a que obtuvimos suficiente cantidad de huevos como para preparar el extracto, obteniendo una masa de huevos de 5g.

Culminada la extracción de los órganos de las garrapatas, se prepararon los extractos como fue descrito previamente en el ítem 4.1.3., los mismos fueron utilizados en todos los ensayos presentados en este trabajo.



Figura 13: Vista de los órganos internos de una garrapata hembra adulta engordada *R. microplus* de la cepa **Mozo**; obtenidos por el método de disección 2: se observan estructuras bien conservadas de ovarios, glándula salivares, intestino y tubos de Malpighi luego de la disección y el lavado de los mismos con PBS. Las flechas indican los órganos que fueron extraídos.

5.1.2. Cuantificación de Proteínas

Para determinar la concentración de proteínas presente en los extractos de la garrapata *R. microplus* y en muestras de sangre bovina, se utilizó el método del ácido bicinconónico (BCA) usando un kit comercial. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6 y los cálculos realizados se muestran en el anexo.

Tabla 6: Cuantificación de proteínas. Se muestra la concentración de proteínas (mg/mL) para los extractos de garrapata: tubos de Malpighi, intestino, ovarios y huevos. Muestra de sangre bovina: plasma, células, coágulo y suero, ND: no determinado.

Extracto	[Proteínas] mg/mL
tubos de Malpighi	3.27 +/- 0.08
intestino	29.81 +/- 0.08
ovarios	13.34 +/- 0.08
huevos	120.09 +/- 0.08
Sangre	[Proteínas] mg/mL
plasma	8.10 +/- 0.08
células	19.00 +/- 0.08
coágulo	20.03 +/- 0.08
suero	23.20 +/- 0.08

5.1.3. Análisis del patrón electroforético de los extractos de garrapata *R. microplus* por SDS-PAGE.

Con el fin de determinar el patrón electroforético de las proteínas presentes en los extractos de las garrapatas *R. microplus* se realizó una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE). Se corrieron los extractos de intestino, huevos, tubos de Malpighi y ovarios y un marcador de peso molecular comercial. El patrón proteico se visualizó mediante una tinción con Coomassie Brilliant Blue R250 a modo de establecer y comparar de manera cuantitativa las concentraciones de dichas proteínas.

El patrón electroforético obtenido se muestra en la Figura 14 y los pesos moleculares aparentes de cada proteína, calculados mediante un método gráfico se muestran en la Tabla 7.

Para el extracto de ovarios (línea OV) se visualizaron proteínas entre 275-29 KDa. Al reducir el extracto se obtuvieron proteínas en el rango de 200-35 KDa.

Se analizaron dos extractos de intestino (línea Ine IN), para el primer extracto se visualizaron al menos ocho proteínas con pesos moleculares aparentes incluidos en el rango de 250-52 KDa. Al reducir los puentes disulfuro de las proteínas presentes en el extracto se obtuvieron cuatro proteínas o sus formas oligoméricas con pesos moleculares aparentes entre 79 KDa y 39 KDa. Para el segundo extracto de intestino se obtuvo un patrón electroforético similar, en este caso se visualizaron por lo menos siete proteínas con pesos moleculares aparentes en el rango de 254-52 KDa. En condiciones de reducción de puentes disulfuro, se obtuvieron proteínas con peso molecular aparente de 166 KDa, 79 KDa, 64 KDa, 53 KDa y 39 KDa.

En el extracto de huevos (línea H) se observan al menos nueve proteínas con un peso molecular aparentes entre 222 y 27 KDa. Al reducir los extractos se obtuvieron al menos siete proteínas entre 157 KDa y 32 KDa.

Para el extracto de tubos de Malpighi (línea Ma), se observó la presencia de al menos dos proteínas con pesos moleculares aparentes de 250 KDa y 53 KDa, sin embargo al reducir dicho extracto no se evidenciaron dichas proteínas, esto puede ser debido a que al romper los puentes disulfuros se hayan obtenido oligómeros de peso molecular muy bajo no pudiendo ser detectados mediante esta técnica o que no se haya sembrado suficiente extracto en el carril correspondiente y se haya perdido proteína.

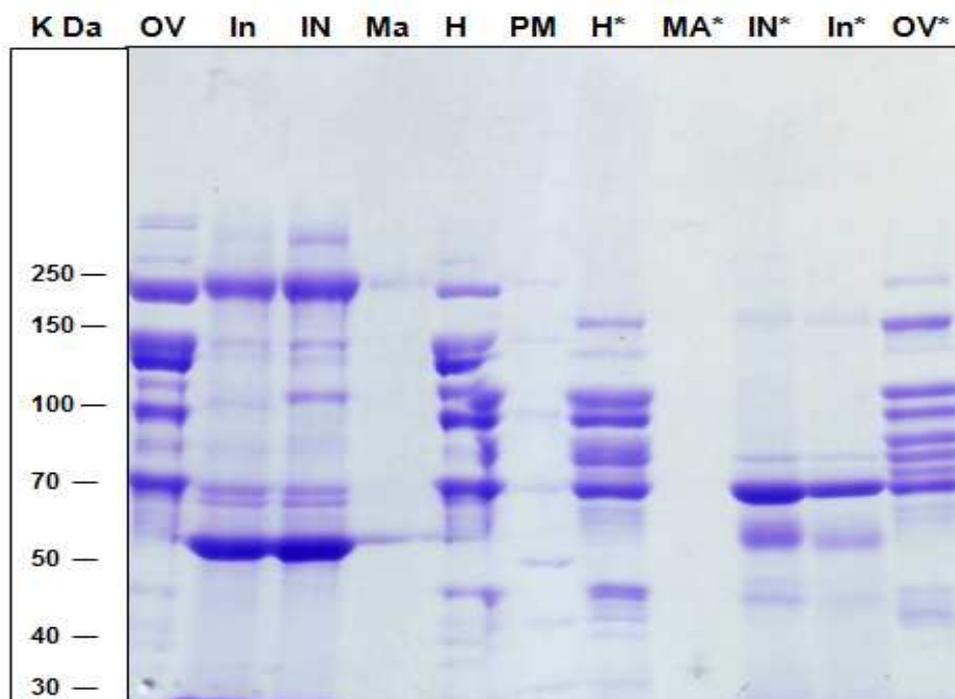


Figura 14: Patrón electroforético de los extractos de garrapata. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5% en condiciones desnaturalizantes, con el agregado o sin agregado de DTT. (OV) ovario; (IN) intestino; (In) intestino; (H) huevos; (MA) tubos de Malpighi; (PM) marcador de peso molecular; El (*) indica las muestras reducidas.

Tabla 7: Pesos moleculares aparentes (KDa) de cada proteína; calculados por método gráfico, comparando las movilidades relativas de cada proteína (Rf) con respecto a una mezcla estándar de proteínas de peso molecular conocidos; El (*) indica las muestras reducidas.

Extracto de <i>R. microplus</i>	Peso molecular aparente (KDa)
tubos de Malpighi (MA)	250; 53
tubos de Malpighi (MA*)
intestino (In)	250; 149; 141; 109; 88; 71; 66; 52
intestino (In*)	166; 79; 64; 52; 39
intestino (IN)	250; 195; 149; 144; 71; 66; 52
intestino (IN*)	166; 79; 64; 53; 39
ovarios (OV)	275; 228; 200; 149; 127; 106; 90; 73; 59; 45; 37; 32; 29
ovarios (OV*)	200; 157; 111; 100; 90; 81; 67; 41; 35
huevos (H)	222; 190; 138; 111; 98; 67; 40; 30; 27
huevos (H*)	157; 134; 100; 83; 69; 42; 32

5.2 Detección de actividad proteolítica

5.2.1. Zimogramas

Los zimogramas en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina o hemoglobina fueron realizados para determinar la presencia de actividad proteolítica a pH ácido en los diferentes extractos de *R. microplus*. Las zonas con actividad proteolítica se visualizan como zonas traslúcidas en el gel, éstas son generadas por la digestión de las proteínas hemoglobina o gelatina en ese sitio por la peptidasa.

Para el extracto de intestino se observan por lo menos dos zonas con actividad hemoglobinasasa (Figura 15.A, línea IN), una zona bien marcada con migración rápida y la otra de migración media no tan marcada. Para dicho extracto se evidenciaron cuatro zonas con actividad gelatinasa, de las cuales dos tienen migración baja y dos migración media (Figura 15.B, línea IN). Si comparamos la actividad entre los dos sustratos utilizados, podemos observar que existen mayor número de zonas de digestión con actividad gelatinasa (Figura 15.B) que hemoglobinasasa (Figura 15.A).

Para el extracto de ovario (línea OV) se evidenció una zona de digestión gelatinasa con migración media. No se evidenció actividad proteolítica a pH ácido tanto hemoglobinasasa como gelatinasa en los extractos de huevos y tubos de Malpighi (Figura 15.A y 15.B, líneas H y MA respectivamente).

Estos ensayos fueron repetidos al menos dos veces para cada sustrato obteniéndose resultados similares entre los duplicados en todos los casos. El extracto de productos de excreción/secreción de *Fasciola hepática* (línea PES) utilizado como control, mostró importante actividad enzimática, indicando que el zimograma funcionó correctamente.

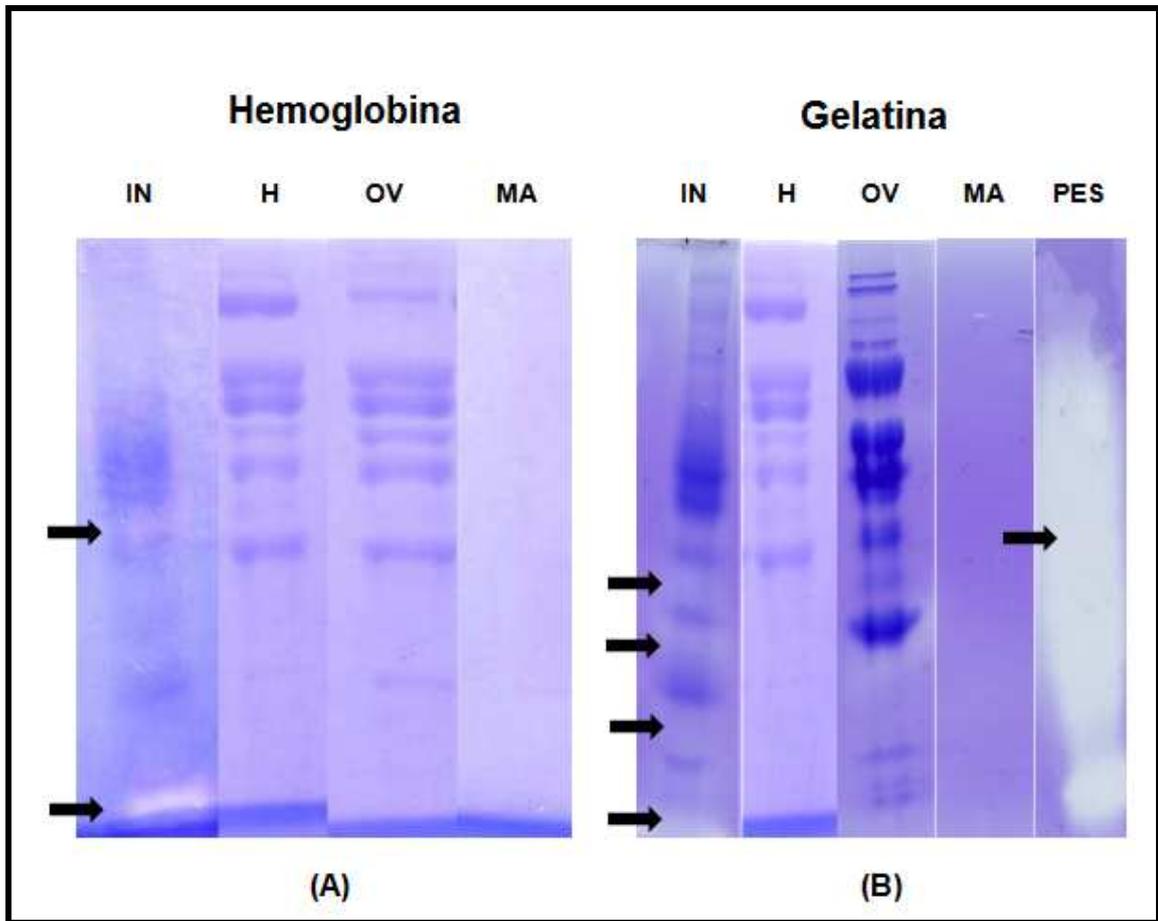


Figura 15: Zimogramas. Se muestran las zonas con actividad Hemoglobinasa (A) y Gelatinasa (B), determinadas en tampón citrato 0,1 M pH 4.5, cisteína 10 mM a 37°C, estas se visualizan como zonas traslúcidas sobre el gel y se indican en la figura con una flecha. Los extractos de la garrapata *R. microplus* analizados: IN (intestino), H (huevos), MA (tubos de Malpighi) y OV (ovarios); como control (+): PES (Productos de excreción/secretión de gusanos adultos de *Fasciola hepática*).

5.2.2. Ensayos de actividad proteolítica con péptidos sintéticos por análisis fluorimétrico.

5.2.2.1. Ensayos de actividad tipo catepsina L en extractos de la garrapata *R. microplus*.

Mediante ensayos fluorimétricos se estudió la actividad proteolítica tipo catepsina L en los extractos: intestino, tubos de Malpighi, ovarios y huevos de *R. microplus*.

En la Tabla 8 se muestran los resultados del ensayo para el extracto de tubos de Malpighi y huevos; La actividad tipo catepsina L obtenida fue de 2.53 (U) para el extracto de tubos de Malpighi y 3.51 (U) para el extracto de huevos.

Tabla 8: Resultados de actividad tipo catepsina L en extractos de *R. microplus*. Se muestran las unidades de fluorescencia (UF) por duplicado liberadas por los extractos: tubos de Malpighi (t. de Malpighi) y huevos, (muestras sin diluir), luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato Z-Phe-Arg-AMC 100 µM, buffer citrato de sodio/fosfato de sodio 50 mM, pH 4 y 10 mM DTT.

Actividad tipo catepsina L en extractos de <i>R. microplus</i> .						
Muestra	UF 1	UF 2	UF promedio	µM	µmoles	µmoles/min (U)
t. de Malpighi	12252	13334	12793	1.516	151.6	2.53
huevos	20060	20219	20140	2.106	210.5	3.51
blanco	756	708	732
Curva de calibración de AMC						
[AMC] µM	UF 1	UF 2	UF promedio			
0.1	8043	8681	8362			
0.25	16736	17952	17344			
0.5	30087	30378	30233			
0.75	42166	42442	42304			
1	58924	57365	58145			
UF promedio vs [AMC] µM			UF promedio= 12453 [AMC]-6080.1; R ² = 0.9876			

En la Tabla 9 se muestran los resultados del ensayo de actividad tipo catepsina L para el extracto de intestino, muestras de sangre bovina y extracto de ovarios.

Los ensayos de actividad en muestras de sangre bovina se realizaron para descartar falsos positivos debidos a la contaminación del extracto de intestino con sangre del huésped, para ello se ensayaron dos muestras de sangre bovina, una con anticoagulante y la otra entera.

Los valores de actividad en UF obtenidos para las muestras de sangre bovina (células, coágulo y suero) fueron muy bajos, quedando por debajo de la curva de calibración de AMC y por tanto no pudieron ser cuantificados, para el plasma se obtuvieron 0.24 U, mientras que para el extracto de intestino se obtuvieron 1.8 U. Al comparar la actividad obtenida en las muestras de sangre bovina con la actividad presente en el extracto de intestino, podemos observar que los valores de actividad obtenidos para el extracto de intestino son muy superiores a los obtenidos para las muestras de sangre bovina. Por lo tanto podemos afirmar que la actividad tipo catepsina L encontrada corresponde mayoritariamente a la actividad presente en el extracto de intestino. La actividad tipo catepsina L obtenida para el extracto de ovarios fue de 0.41 U.

Tabla 9: Actividad proteolítica tipo catepsina L en muestras de sangre bovina, extracto de intestino y ovarios. Se muestran las unidades de fluorescencia (UF) liberadas por las muestras de sangre bovina (sin diluir), extracto de intestino (dilución 1/1000) y extracto de ovarios (dilución 1/100) luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato Z-Phe-Arg-AMC 100 µM, buffer citrato de sodio/fosfato de sodio 50 mM a pH 4 y 10 mM DTT; Curva de calibración de AMC.

Actividad tipo catepsina L en muestras de sangre bovina, intestino y ovario							
MUESTRA	UF1	UF2	UF promedio	UF Promedio-B	µM	µmoles	µmoles/min(U)
suero	9114	9035	9075	7979
células	9918	9513	9716	8620
plasma	16720	16458	16589	15493	0.144	14.4	0.24
coágulo	2343	2539	2441	1345
ovarios (1/100)	21841	21469	21655	20559	0.248	24.83	0.41
Intestino (1/1000)	64980	64490	62253	61157	1.082	108.2	1.8
Curva de calibración de AMC							
[AMC]µM	UF1	UF2	UF promedio				
0.1	15792	15703	15792				
0.25	19575	19106	19341				
0.5	30417	30029	30223				
0.75	45270	45167	45219				
1	58154	58559	58357				
UF promedio vs [AMC] µM			UF promedio= 48691*[AMC]+ 8467.7; R ² = 0.9876				

5.2.2.2. Determinación del pH óptimo de la actividad proteolítica tipo catepsina L para los extractos de garrapata.

Con el fin de determinar el pH óptimo, se evaluó la actividad tipo catepsina L a diferentes pHs en los extractos: intestino, huevos, ovarios y tubos de Malpighi de la garrapata *R. microplus*.

En la Tabla 10 se muestra la actividad proteolítica tipo catepsina L en unidades de fluorescencia (UF) a los pHs estudiados.

A partir de los valores de UF mostrados en la Tabla 10 para los diferentes extractos, podemos afirmar que todos los extractos analizados presentan actividad tipo catepsina L a todos los pH ensayados.

El extracto de intestino mostró actividad máxima a pH 5, con 62253 UF liberadas, disminuyendo de forma gradual en el rango de pH 4-6 y disminuyendo de forma significativa a valores inferiores a 4 y mayores a 6.

En el extracto de huevos se observó que la mayor actividad se encuentra a pH 4 con 20463 UF liberadas, dicha actividad disminuye abruptamente a pH mayores y menores a este valor.

Al igual que el extracto de huevos, el extracto de ovarios mostró actividad máxima a pH 4, en este caso se obtuvieron 15452 UF, disminuyendo marcadamente a pH mayores a 5 y menores a 4.

Por último para el extracto de tubos de Malpighi, la actividad fue máxima a pH 5.6, con un valor de 6427 UF, cayendo significativamente a pHs mayores e inferiores a este valor.

En la Figura 16 se muestra como varía la actividad tipo catepsina L a los diferentes pHs analizados para los extractos de garrapata.

Tabla 10: Resultados de pH óptimo de la actividad tipo catepsina L. Se muestra la actividad tipo catepsina L expresada en (UF) por duplicado UF1 y UF2, UF promedio, UF- blanco, y el desvío estándar para los diferentes pH ensayados en los extractos de intestino (dilución 1/2000), huevos (sin diluir), ovarios (dilución 1/100 y tubos de Malpighi (sin diluir) de *R. microplus*, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato Z-Phe-Arg-AMC 100 µM, buffer citrato de sodio /fosfato de sodio 50 mM y 10 mM DTT.

Extracto de tubos de Malpighi							
pH	Blanco (B)	UF1	UF2	UF1-B	UF2-B	UF promedio	desvío estándar
3	1307	4095	3948	2788	2641	2715	104
3.4	1201	2427	2572	1226	1371	1299	103
4	1465	3815	3746	2350	2281	2316	49
5	1577	4788	4468	3211	2891	3051	226
5.6	1256	7447	7918	6191	6662	6427	333
6	942	3684	3525	2742	2583	2663	112
7	1297	2335	2480	1038	1183	1111	103
7.8	1107	1774	1767	667	660	664	5
Extracto de huevos							
pH	Blanco (B)	UF1	UF2	UF1-B	UF2-B	UF promedio	desvío estándar
3	1687	13641	13932	11954	12245	12100	206
3.4	1649	14026	14660	12377	13011	12694	448
4	1416	21375	22382	19959	20966	20463	712
5	1512	7112	7231	5600	5719	5660	84
5.6	1489	2685	2709	1196	1220	1208	17
6	1488	2706	2669	1218	1181	1200	26
7	1524	2719	2703	1195	1179	1187	11
7.8	1673	3586	3526	1913	1853	1883	42
Extracto de ovarios							
pH	Blanco (B)	UF1	UF2	UF1-B	UF2-B	UF promedio	desvío estándar
3	1502	6598	6697	5096	5195	5146	70
3.4	1437	8342	8684	6905	7247	7076	242
4	1514	16779	17153	15265	15639	15452	264
5	1516	12938	12606	11422	11090	11256	235
5.6	3480	8124	8539	4644	5059	4852	293
6	1372	6294	6291	4922	4919	4921	2
7	1264	1843	1853	579	589	584	7
7.8	1748	2475	2463	727	715	721	8
Extracto de intestino							
pH	Blanco (B)	UF1	UF2	UF1-B	UF2-B	UF promedio	desvío estándar
3	2583	17354	18614	14771	16031	15401	891
3.4	2382	29380	28940	26998	26558	26778	311
4	2404	43130	46236	40726	43832	42279	2196
5	2482	64980	64490	62498	62008	62253	346
5.6	3226	64990	64529	61764	61303	61534	326
6	7010	60380	60497	53370	53487	53429	83
7	2396	18367	17410	15971	15014	15493	677
7.8	2426	12618	12029	10192	9603	9898	416

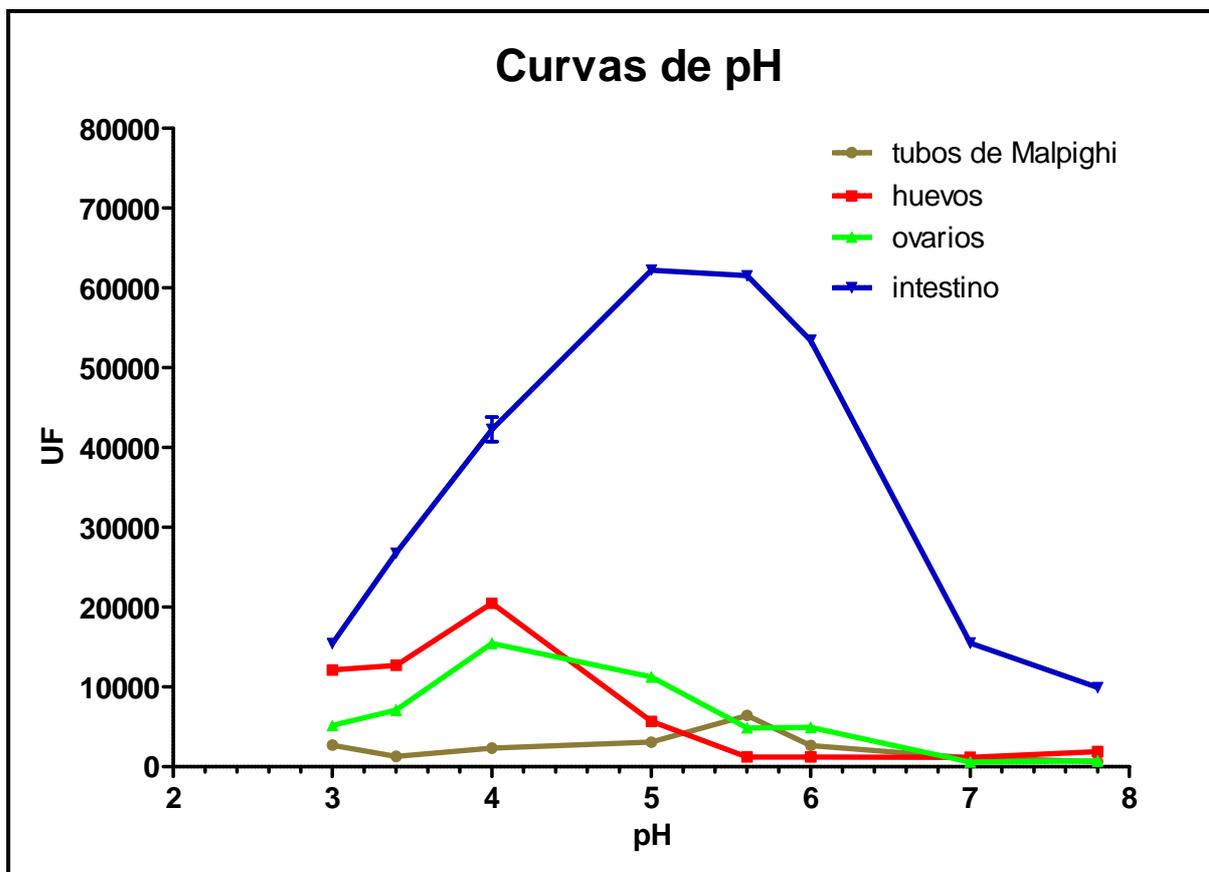


Figura 16: Variación de la actividad tipo catepsina L en extractos de garrapata *R. microplus* para los diferentes pHs. Se muestran las unidades de fluorescencia (UF) liberadas por los extractos luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato Z-Phe-Arg-AMC 100 µM, buffer citrato de sodio /fosfato de sodio 50 mM a los pHs (3, 3.4, 4, 5 5.6, 6, 7, 7.6) y 10 mM DTT.

En la Tabla 11 se muestra de manera resumida la actividad tipo catepsina L expresada en UF para los extractos de *R. microplus* a los pHs donde fue máxima dicha actividad.

Tabla 11: Resumen de actividad tipo catepsina L en extractos de *R. microplus*. Resultados obtenidos luego de 1 hora de incubación a 37 °C con el sustrato Z-Phe-Arg-AMC 100 µM, buffer citrato de sodio /fosfato de sodio 50 mM a los pHs donde dicha actividad fue máxima y 10 mM DTT.

pH	MUESTRA	UF promedio
5.6	tubos de Malpighi	6427
4	huevos	20463
4	ovarios	15452
5	intestino	62253

5.2.2.3. Ensayos de inhibición de la actividad tipo catepsina L para los extractos de *R. microplus*.

Los datos experimentales obtenidos al estudiar el efecto de los inhibidores sobre la actividad Z-Phe-Arg-AMC en los extractos de la garrapata *R. microplus* se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Ensayos de inhibición de la actividad tipo catepsina L en extractos de *R. microplus*. Resultados obtenidos luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato Z-Phe-Arg-AMC 100 µM, buffer citrato de sodio/fosfato de sodio 50 mM a los pHs donde fue máxima dicha actividad y 10 mM DTT.

INTESTINO	UF1	UF2	UF1-B	UF2-B	UF promedio	Desvío estándar	% Actividad remanente
IN+PMSF	13740	13101	12383	11744	12064	452	111
IN+E-64	1371	1258	14	0	7	10	0
IN+EDTA	13394	13300	12037	11943	11990	66	110
IN+PEP-A	7299	7674	5942	6317	6130	265	56
IN+Bt	14826	14844	13469	13487	13478	13	124
INTESTINO	12328	12124	10971	10767	10869	144	100
Blanco	1376	1338	1357
OVARIO	UF1	UF2	UF1-B	UF2-B	UF promedio	Desvío estándar	% Actividad remanente
OV+PMSF	4581	4776	3224	3419	3322	138	102
OV+E-64	1255	1278	0	0	0	0	0
OV+EDTA	4385	4520	3028	3163	3096	95	95
OV+PEP-A	6308	6407	4951	5050	5001	70	154
OV+Bt	5371	5184	4014	3827	3921	132	121
OVARIO	4596	4612	3239	3255	3247	11	100
Blanco	1376	1338	1357
HUEVOS	UF1	UF2	UF1-B	UF2-B	UF promedio	Desvío estándar	% Actividad remanente
H+PMSF	18102	19765	16745	18408	17577	1176	156
H+E-64	3600	3917	2243	2560	2402	224	21
H+EDTA	11319	11867	9962	10510	10236	387	91
H+PEP-A	14036	15188	12679	13831	13255	815	118
H+Bt	13422	12376	12065	11019	11542	740	103
HUEVOS	13011	12138	11654	10781	11218	617	100
Blanco	1376	1338	1357
MALPIGHI	UF1	UF2	UF1-B	UF2-B	UF promedio	Desvío estándar	% Actividad remanente
MA+PMSF	3078	3195	1721	1838	1780	83	345
MA+E-64	2116	2084	759	727	743	23	142
MA+EDTA	4548	4631	3191	3274	3233	59	617
MA+PEP-A	6270	6071	4913	4714	4814	141	919
MA+Bt	4712	4890	3355	3533	3444	126	657
MALPIGI	1925	1836	568	479	524	63	100
Blanco	1376	1338	1357

El extracto de intestino en presencia del inhibidor E-64 específico para cisteína peptidasas mostró una inhibición total de la actividad tipo catepsina L, en presencia del inhibidor pepstatina-A la inhibición fue de 44%, mientras que en presencia de los inhibidores PMSF específico para serina peptidasas, bestatina específico para LAP y EDTA específico para metalo peptidasas no se observó inhibición de la actividad tipo catepsina L (Figura 17).

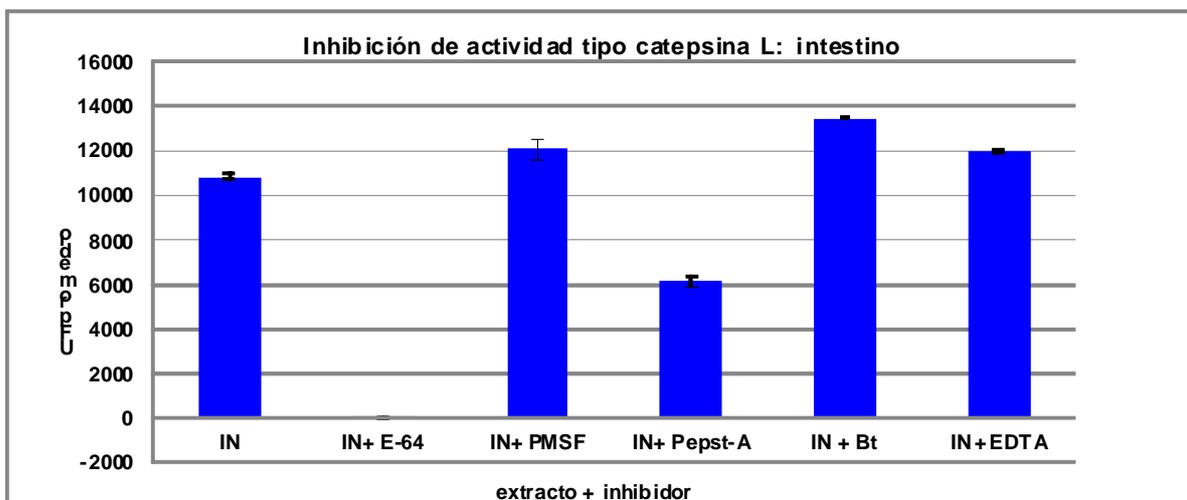


Figura 17: Inhibición de la actividad tipo catepsina L para el extracto de intestino. Se muestran las UF promedio de la actividad tipo catepsina L en presencia de los inhibidores E-64, PMSF, pepstatina-A (Pepst-A), bestatina (Bt) y EDTA para el extracto de intestino de *R. microplus*; control extracto de intestino (IN) sin inhibidor, luego de 1 hora de incubación a 37 ° C con el sustrato Z-Phe-Arg-AMC 100 μM, buffer citrato de sodio/fosfato de sodio 50 mM a pH 5 y 10 mM DTT.

Para el extracto de ovarios se observó una inhibición total de la actividad tipo catepsina L en presencia del inhibidor E-64, en presencia de EDTA se observó una inhibición de la actividad tipo catepsina L de 5%. Los inhibidores PMSF, bestatina y pepstatina-A no inhibieron de forma alguna la actividad tipo catepsina L detectada en el extracto de ovarios (Figura 18).

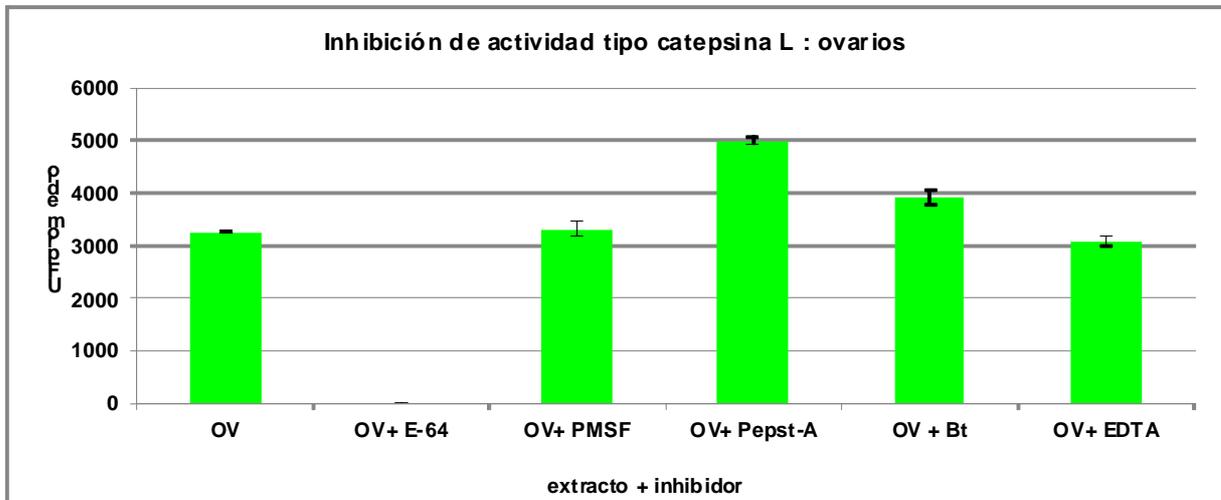


Figura 18: Inhibición de la actividad tipo catepsina L para el extracto de ovarios. Se muestran las UF promedio de la actividad tipo catepsina L en presencia de los inhibidores E-64, PMSF, pepstatina-A (Pepst-A), bestatina (Bt) y EDTA para el extracto de ovario de *R. microplus* con los inhibidores E-64, PMSF y EDTA; control extracto de ovarios (OV) sin inhibidor, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato Z-Phe-Arg-AMC 100 µM, buffer citrato de sodio /fosfato de sodio 50 mM a pH 4 y 10 mM.

Para el extracto de huevos en presencia del inhibidor E-64 se evidenció una inhibición de 79% de la actividad tipo catepsina L, en presencia de EDTA la inhibición fue de 9%, y no se observó inhibición en presencia de los inhibidores PMSF, bestatina y pepstatina-A (Figura 19).

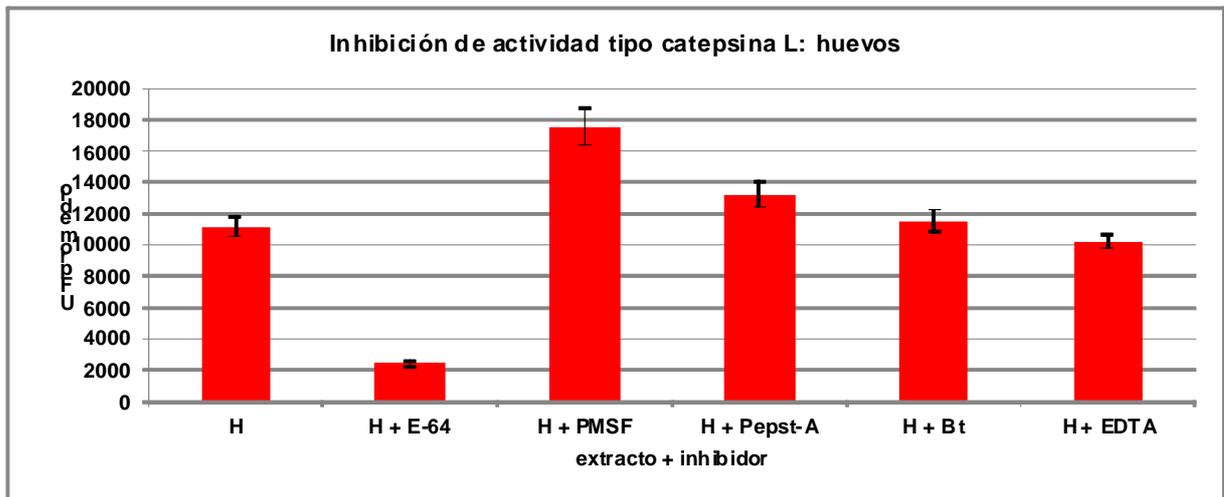


Figura 19: Inhibición de la actividad tipo catepsina L para el extracto de huevos. Se muestran las UF promedio de la actividad tipo catepsina L en presencia de los inhibidores E-64, PMSF, pepstatina-A (Pepst-A), bestatina (Bt) y EDTA para el extracto de huevos; control extracto de huevos (H) sin inhibidor, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato Z-Phe-Arg-AMC 100 µM, buffer citrato de sodio /fosfato de sodio 50 mM a pH 4 y 10 mM DTT.

La actividad tipo catepsina L obtenida para el extracto de tubos de Malpighi, no se vio afectada de forma alguna en presencia de los inhibidores: EDTA, E-64, bestatina, pepstatina-A y PMSF (Figura 20).

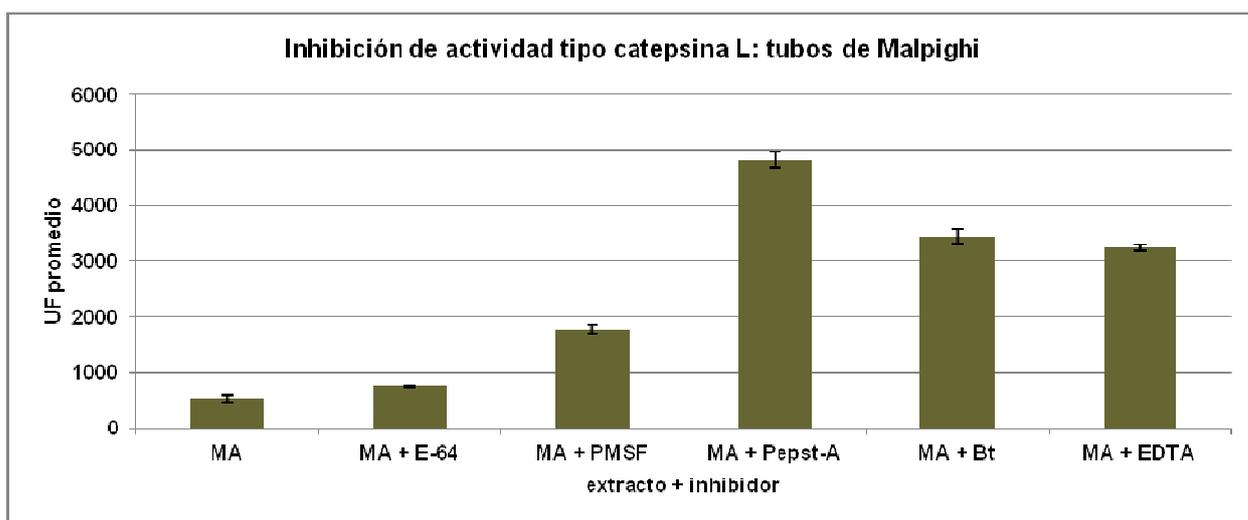


Figura 20: Inhibición de la actividad tipo catepsina L para el extracto de tubos de malpighi. Se muestran las UF promedio de la actividad tipo catepsina L en presencia de los inhibidores E-64, PMSF, pepstatina-A (Pepst-A), bestatina (Bt) y EDTA para el extracto de tubos de Malpighi; control extracto de tubos de Malpighi (MA) sin inhibidor, luego de 1 hora de incubación a 37 °C con el sustrato Z-Phe-Arg-AMC 100 µM, buffer citrato de sodio /fosfato de sodio 50 mM a pH 5.6 y 10 mM DTT.

5.2.2.4. Ensayos de actividad tipo leucinaminopeptidasa en extractos de la garrapata *R. microplus*.

Mediante ensayos fluorimétricos se estudió la actividad proteolítica tipo Leucinaminopeptidasa (LAP) en los extractos de intestino, tubos de Malpighi, ovarios y huevos de *R. microplus*.

Para el extracto de intestino simultáneamente se determinó actividad tipo LAP en muestras de sangre bovina (huésped) para descartar falsos positivos. Los valores de actividad proteolítica obtenidos para las muestras de sangre bovina fueron los siguientes: plasma 1.94 U, células 2.28 U, coágulo 0.84U y suero 2.71 U. El valor de actividad proteolítica tipo LAP obtenido para el extracto de intestino fue de 26.9 U (Tabla 13). Al comparar los resultados obtenidos para el extracto de intestino con los obtenidos para las muestras de sangre bovina, observamos que la actividad proteolítica tipo LAP presente en el extracto de intestino es mucho mayor que la actividad presente en las muestras de sangre bovina. Por lo tanto podemos afirmar que la

actividad tipo LAP corresponde mayoritariamente a la actividad presente en el extracto de intestino.

Tabla 13: Resultados de actividad tipo LAP para las muestras de sangre bovina y el extracto de intestino. Se muestran las unidades de fluorescencia (UF) realizadas por duplicado para las muestras de sangre entera y con anticoagulante y extracto de intestino (IN); las (UF) promedio; μM (UF interpolados en la curva de calibración de AMC), μmoles y (U) unidades enzimáticas, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato leu-AMC en tampón Tris-HCl 50 mM, MnCl₂ 1 mM, EDTA 5 mM pH 8. Las diluciones se muestran (), (sd) sin diluir.

Actividad tipo LAP en muestras de sangre bovina y extracto de intestino							
MUESTRA	UF1	UF2	UF promedio	UF promedio-B	μM	μmoles	$\mu\text{moles/min (U)}$
plasma (sd)	31783	32518	32151	30833	0.583	116.600	1.94
células (sd)	36358	37756	37057	35739	0.683	136.600	2.28
células (1/100)	3034	2124	2579	1261
células (1/200)	2351	2365	2358	1040
células (1/400)	1894	1967	1931	613
coágulo (sd)	15495	16420	15958	14640	0.251	50.200	0.84
coágulo (1/50)	3050	2124	2587	1269
coágulo (1/25)	1840	1601	1721	403
suero (sd)	45150	41570	43360	42042	0.813	162.600	2.71
suero (1/50)	6522	6726	6624	5306
suero (1/100)	3802	3827	3815	2497
suero (1/200)	1873	2122	1998	680
suero (1/400)	1740	1789	1765	447
IN (1/10)	45202	49876	47539	46221	8.056	1611.2	26.9
blanco (B)	1295	1341	1318	0
Curva de calibración de AMC							
[AMC] μM	UF1	UF2	UF promedio				
0.1	6960	5917	6439				
0.25	18063	14637	16350				
0.5	28166	27295	27731				
0.75	34265	35385	34825				
1	54039	52924	53482				
UF promedio vs [AMC] μM			UF promedio= 53154*[AMC] +3397.8 R ² = 0.999				

La actividad proteolítica tipo LAP para el extracto de tubos de Malpighi no pudo ser cuantificada debido a que los valores de actividad en UF obtenidos quedaron por debajo de la curva de calibración de AMC y por tanto no pudieron ser interpolados en dicha curva. Sin embargo las UF obtenidas para este extracto (3210 UF) son superiores a las obtenidas para el blanco del ensayo (756 UF), de este modo podemos decir que el extracto de tubos de Malpighi contiene trazas de actividad tipo LAP (Tabla 14).

Tabla 14: Resultados de actividad tipo LAP para el extracto de tubos de Malpighi. Se muestran las unidades de fluorescencia (UF) realizadas por duplicado para el extracto de tubos de Malpighi (muestra sin diluir); (UF) promedio; UF Promedio-blanco (B); μM (UF interpolados en la curva de calibración de AMC), μmoles y (U) unidades enzimáticas, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato leu-AMC en tampón Tris-HCl 50 mM, MnCl_2 1 mM, EDTA 5 mM pH 8.

Actividad tipo LAP para el extracto de tubos de Malpighi							
MUESTRA	UF1	UF2	UF promedio	UF promedio-B	μM	μmoles	$\mu\text{moles}/\text{min}(\text{U})$
MA	3921	4011	3966	3210
blanco (B)	745	767	756	0
Curva de calibración de AMC							
[AMC] μM	UF1	UF2	UF promedio				
0.1	9076	9797	9437				
0.25	16138	16591	16365				
0.5	28890	29798	29344				
0.75	40494	45279	42887				
1	58416	55900	57158				
UF promedio vs [AMC] μM			UF promedio= $53154 \cdot [\text{AMC}] + 3397.8$; R= 0.999				

La actividad tipo LAP presente en el extracto ovario corresponde a 8.67U, mientras que la actividad tipo LAP presente en el extracto de huevos es de 19.6 U. En las Tablas 15 y 16 se muestran las curvas de calibración de AMC y los resultados obtenidos de actividad proteolítica tipo LAP para los extractos de ovarios y huevos respectivamente.

Tabla 15: Resultados de actividad tipo LAP para el extracto de ovarios. Se muestran las unidades de fluorescencia (UF) realizadas por duplicado para el extracto de ovario (dilución ()) y DOC de *Fasciola hepática* (control); las (UF) promedio; UF Promedio-blanco (B); μM (UF interpolados en la curva de calibración de AMC), μmoles y (U) unidades enzimáticas, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato leu-AMC en tampón Tris-HCl 50 mM, MnCl_2 1 mM, EDTA 5 mM pH 8.

Actividad tipo LAP para el extracto de ovarios							
MUESTRA	UF1	UF2	UF promedio	UF promedio-B	μM	μmoles	$\mu\text{moles}/\text{min}(\text{U})$
OV (1/20)	11721	12311	12016	11245	0.1301	520.24	8.67
blanco (B)	784	757	771	0
C+ DOC Fh	12511	12890	12701	11930	0.1427	28.5	0.48
Curva de calibración de AMC							
[AMC] μM	UF1	UF2	UF promedio				
0.1	11145	10144	10645				
0.25	17080	15526	16303				
0.5	29826	32128	30977				
0.75	45653	46743	46198				
1	58327	57447	57887				

UF promedio vs [AMC] μM	UF promedio= $5425 \cdot [\text{AMC}] + 4188$; R= 0.996
------------------------------------	--

Tabla 16: Resultados de actividad tipo LAP para el extracto de huevos. Se muestran las unidades de fluorescencia (UF) realizadas por duplicado para el extracto de huevos (dilución (1/80) y DOC de *Fasciola hepática* (control); las (UF) promedio; UF Promedio-blanco (B); μM (UF interpolados en la curva de calibración de AMC), μmoles y (U) unidades enzimáticas, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato leu-AMC en tampón Tris-HCl 50 mM, MnCl₂ 1 mM, EDTA 5 mM pH 8.

Actividad tipo LAP para el extracto de huevos							
MUESTRA	UF1	UF2	UF promedio	UF promedio-B	μM	μmoles	$\mu\text{moles/min(U)}$
H(1/80)	13970	15299	14635	13699	0.0736	1178.1	19.6
Blanco (B)	855	936	896	0
Curva de calibración de AMC							
[AMC] μM	UF1	UF2	UF promedio				
0.05	9535	10687	10111				
0.1	15186	15840	15513				
0.25	22567	24180	23374				
0.5	36570	35912	36241				
0.75	42093	44374	43234				
1	64890	64951	64921				
UF promedio vs [AMC] μM	UF promedio= $46793 \cdot [\text{AMC}] + 10253$; R ² = 0,9744						

5.2.2.5. Ensayos de inhibición de actividad tipo leucinaminopeptidasa (LAP).

Para confirmar la presencia de actividad tipo LAP detectada previamente en los extractos de garrapata, realizamos ensayos de inhibición, los resultados obtenidos para los extractos de intestino, huevos y ovarios se muestran en la Tabla 17; para el extracto de tubos de Malpighi no se realizaron ensayos de inhibición debido a que se obtuvieron trazas de actividad tipo LAP.

Tabla 17: Ensayos de inhibición de actividad tipo LAP en extractos de *R. microplus*. Resultados obtenidos luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato leu-AMC en tampón Tris-HCl 50 mM, MnCl₂ 1 mM, EDTA 5 mM, pH 8.

INTESTINO	UF1	UF2	UF1-B	UF2-B	UF Promedio	Desvío estándar	% Actividad remanente
Blanco	2838	3073	2956	166
DOC Fh	65000	65000	62044	62044	62044	0
(DOC Fh)+Bt	3609	3501	653	545	599	76	1
IN+Bt	22991	23848	20035	20892	20464	606	39
IN+PMSF	63817	62964	60861	60008	60435	603	114
IN+E-64	61054	62567	58098	59611	58855	1070	111
IN+PEP-A	49522	52483	46566	49527	48047	2094	91
IN+EDTA	30985	30003	28029	27047	27538	694	52
IN+IA	54655	54321	51699	51365	51532	236	97
IN	55349	56306	52393	53350	52872	677	100
OVARIOS	UF1	UF2	UF1-B	UF2-B	UF Promedio	Desvío estándar	% Actividad remanente
Blanco	4336	4189	4263	104
OV+Bt	7993	7946	3730	3683	3707	33	13
OV+PMSF	34362	32640	30099	28377	29238	1218	105
OV+E-64	31866	33562	27603	29299	28451	1199	102
OV+PEP-A	29274	26587	25011	22324	23668	1900	85
OV+EDTA	17895	17605	13632	13342	13487	205	48
OV+IA	21890	27693	17627	23430	20529	4103	74
OV	32759	31537	28496	27274	27885	864	100
HUEVOS	UF1	UF2	UF1-B	UF2-B	UF Promedio	Desvío estándar	% Actividad remanente
Blanco	2182	2329	2256	104
H+Bt	21713	23200	19457	20944	20201	1051	84
H+PMSF	33271	31998	31015	29742	30379	900	126
H+E-64	24854	23041	22598	20785	21692	1282	90
H+PEP-A	52649	54170	50393	51914	51154	1076	212
H+EDTA	25346	26785	23090	24529	23810	1018	99
H+IA	26746	27563	24490	25307	24899	578	103
H	27074	25616	24818	23360	24089	1031	100

La actividad tipo LAP detectada en el extracto de intestino fue inhibida 61% en presencia del inhibidor específico para LAP, bestatina, mientras que en presencia de EDTA, inhibidor de metalo peptidasas dicha actividad fue inhibida 48 %; la presencia de los inhibidores PMSF y E-64 no afectaron de forma alguna la actividad tipo LAP. Los inhibidores iodoacetamida y pepstatina-A inhibieron la actividad tipo LAP 3% y 9% respectivamente (Figura 21).

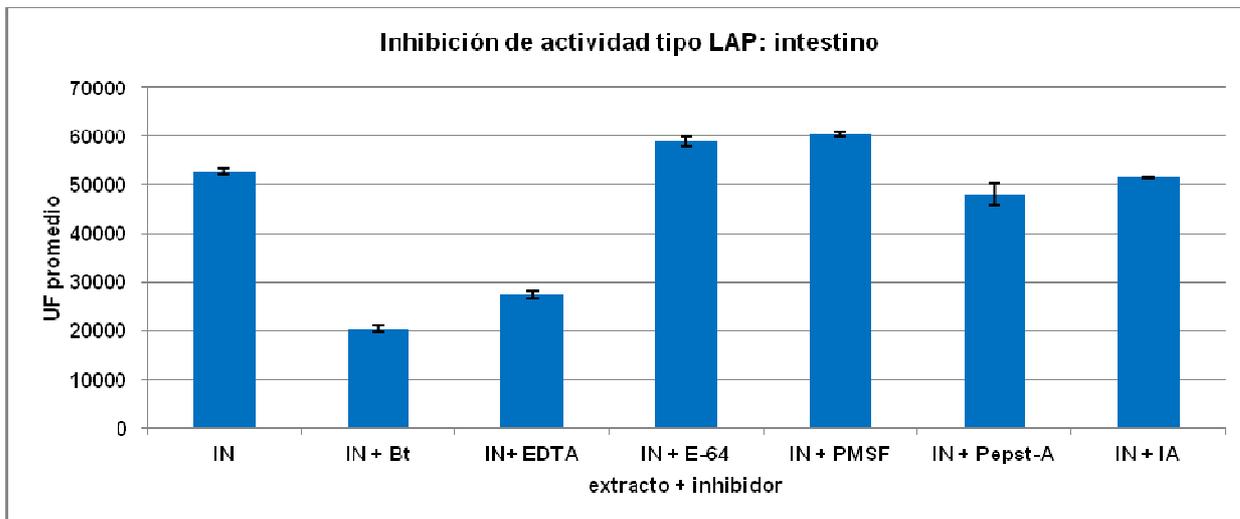


Figura 21: Inhibición de actividad tipo LAP para el extracto de intestino. Se muestran las UF promedio de la actividad tipo LAP en presencia de los inhibidores E-64, PMSF, pepstatina-A (Pepst-A), bestatina (Bt), EDTA e iodoacetamida (IA) para el extracto de Intestino de *R. microplus*; control extracto de intestino (IN) sin inhibidor, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato leu-AMC en tampón Tris-HCl 50mM, MnCl₂ 1 mM, EDTA 5 mM pH 8.

Para el extracto de ovarios en presencia de bestatina se observó una inhibición de la actividad tipo LAP de 87 %, en presencia de EDTA la inhibición fue de 52%, en presencia de los inhibidores PMSF y E-64 no se observó inhibición. En presencia de pepstatina-A e iodoacetamida se observó una inhibición de 15% y 26% respectivamente (Figura 22).

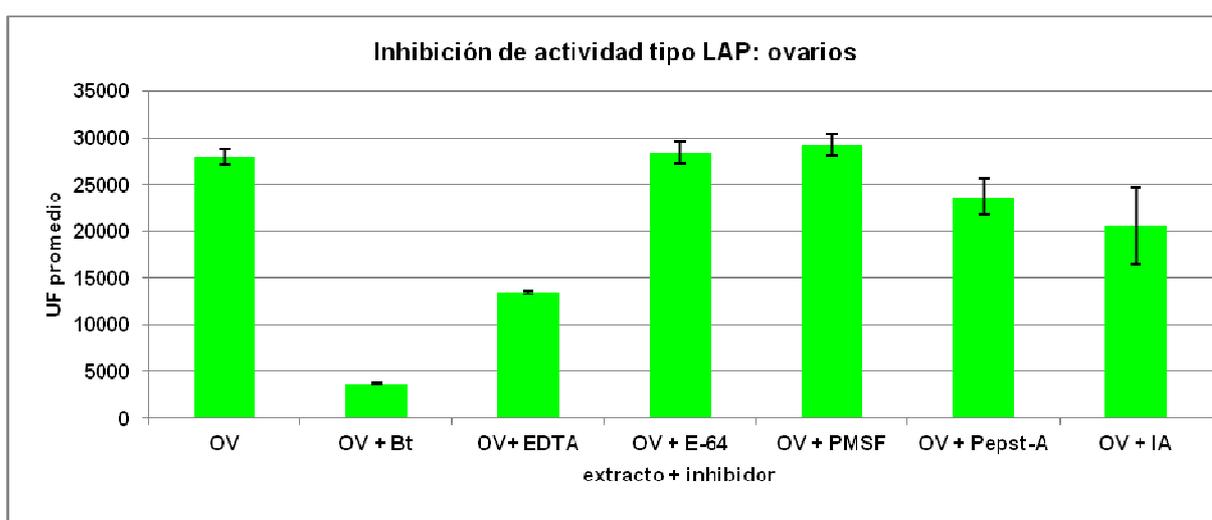


Figura 22: Inhibición de actividad tipo LAP para el extracto de ovarios. Se muestran las UF promedio de la actividad tipo LAP en presencia de los inhibidores E-64, PMSF, pepstatina-A (Pepst-A), bestatina (Bt), EDTA e

iodoacetamida (IA) para el extracto de ovarios de *R. microplus*; control extracto de ovarios (OV) sin Inhibidor, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato leu- AMC en tampón Tris-HCl 50 mM, MnCl₂ 1 mM, EDTA 5 mM pH 8. Para el extracto de huevos no fue posible inhibir la actividad tipo LAP detectada previamente en dicho extracto (Figura 23). Los ensayos de inhibición se repitieron varias veces, en todos los casos no se logró inhibir dicha actividad.

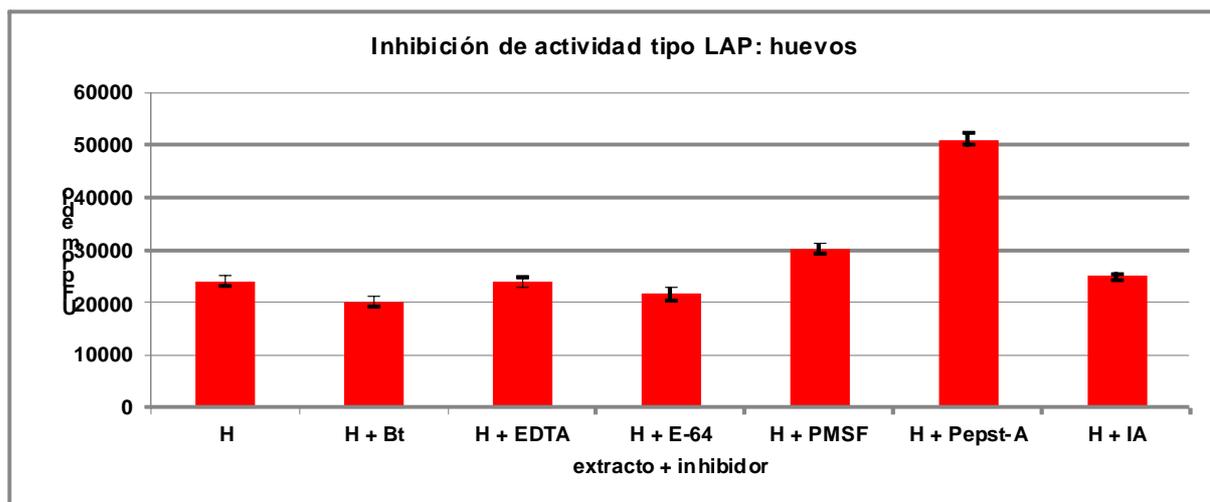


Figura 23: Inhibición de actividad tipo LAP para el extracto de huevos. Se muestran las UF promedio de la actividad tipo LAP en presencia de los inhibidores E-64, PMSF, pepstatina-A (Pepst-A), bestatina (Bt), EDTA e iodoacetamida (IA) para el extracto de huevos de *R. microplus*; control extracto de huevos (H) sin Inhibidor, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato leu-AMC en tampón Tris-HCl 50 mM, MnCl₂ 1 mM, EDTA 5 mM pH 8.

Debido a lo anterior y sospechando la presencia de interferencias que causarían problemas en el sistema durante la detección de actividad a las longitudes de onda usadas para la molécula de AMC, se realizó un ensayo de fluorimetría para el extracto de huevos en presencia y ausencia de AMC sin el agregado de sustrato. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18: Extracto de huevos (H) (diluciones: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) en presencia de AMC (muestra + 0.5 µM AMC), y en ausencia de AMC (muestra + tampón: Tris-HCl 50 mM, MnCl2 1 mM, EDTA5 mM, pH 8).

	con AMC			sin AMC		
Muestra	UF 1	UF 2	UF promedio	UF 1	UF 2	UF promedio
H	7525	7607	7566	5619	4973	5296
H (1/2)	6152	6391	6272	4506	4449	4478
H (1/4)	5195	5967	5581	3553	3518	3536
H(1/8)	5998	6217	6108	3293	3174	3234
H (1/16)	5449	5911	5680	2650	2513	2582
blanco	1310	1230	1270
curva de calibración de AMC						
[AMC] µM	UF 1	UF 2	UF promedio			
0.1	6872	7280	7076			
0.25	15831	12287	14059			
0.5	30017	28613	29315			
0.75	44772	45413	45093			
1	58591	58158	58375			

Al agregar 0.5µM de AMC se esperaría tener una lectura de al menos 29315 UF, sin embargo obtuvimos valores menores, de esta forma podríamos suponer la presencia de moléculas en el extracto de huevos que absorbieron la luz emitida por el AMC. El ensayo sin AMC estaría indicando que los huevos emitirían luz a las longitudes de onda usadas para detectar el AMC.

5.2.2.6. Actividad tipo legumina en extractos de la garrapata *R. microplus*.

Mediante ensayos fluorimétricos se estudió la actividad proteolítica tipo legumina en extractos de intestino, ovarios, tubos de Malpighi y huevos de garrapatas hembras engordadas *R. microplus*, cepa Mozo, siguiendo el protocolo descrito por A. Alim 2008 con algunas modificaciones.

Los ensayos fueron realizados mediante dos sistemas de trabajo, el sistema (A) sin el agregado de Chaps (detergente neutro) y el sistema (B) en presencia de Chaps 0.05%, de este modo se trató de determinar cómo afecta este detergente neutro a la actividad tipo legumina en los extractos de garrapata.

De forma simultánea a la determinación de la actividad proteolítica tipo legumina en el extracto de intestino de *R. microplus*, se determinó actividad tipo legumina en muestras de sangre bovina con el fin de descartar falsos positivos debidos a contaminación del extracto de intestino con sangre del huésped. En la Tabla 19 se muestran las curvas de calibración de AMC

realizadas para ambos sistemas de trabajo y los resultados obtenidos en UF para las muestras de sangre bovina y para el extracto de intestino. Los valores obtenidos en UF para las muestras de sangre bovina quedaron por debajo de la curva de calibración de AMC, por lo tanto estos datos no pudieron ser cuantificados. A su vez si comparamos los valores de actividad obtenidos para las muestras de sangre bovina con los valores obtenidos para el extracto de intestino, observamos que estos últimos son superiores, a partir de estos resultados podemos afirmar que la actividad tipo legumaína obtenida corresponde mayoritariamente a la actividad presente en el extracto de intestino de la garrapata *R. microplus*.

En la Tabla 20 se muestra la actividad tipo legumaína en (U) obtenida para ambos sistemas de trabajo. Para el sistema (A) se obtuvo una actividad de 23.45 U mientras que para el sistema (B) se obtuvo 29.74 U. Por lo tanto podemos afirmar que en presencia de Chaps aumenta la actividad tipo legumaína presente en el extracto de intestino.

Tabla 19: Resultados de actividad tipo legumaina para las muestras de sangre bovina y extracto de intestino. Se muestra la cantidad de AMC liberado en UF, por duplicado UF1 y UF2, UF promedio y el desvío estándar para los sistemas (A) y (B) y la curva de calibración de AMC, luego de 1 hora de incubación con el sustrato Z-Ala-Ala-Asn-AMC 300 µM en solución tampón citrato de sodio 50mM-EDTA 1mM, DTT 1M (sistema A) o con el agregado de 0,05% Chaps (sistema B), pH 7. Las diluciones se muestran ().

Actividad tipo legumaina en extractos de intestino y muestras de sangre bovina.							
Sistema (A)							
Muestra	UF1	UF2	UF1-blanco	UF2- blanco	UF promedio	Desvío estándar	
coágulo	3286	3340	2226	2280	2253	38	
suero	2701	2754	1641	1694	1668	37	
células	3630	3414	2570	2354	2462	153	
plasma	3333	3466	2273	2406	2340	94	
IN 1/100	8590	7925	7530	6865	7198	470	
IN 1/400	3455	3351	2395	2291	2343	74	
blanco	1060	
Sistema (B)							
Muestra	UF1	UF2	UF1-blanco	UF2- blanco	UF promedio	Desvío estándar	
coágulo	3345	3421	1467	1543	1505	54	
suero	3200	3284	1322	1406	1364	59	
células	2412	2313	534	435	485	70	
plasma	3896	3792	2018	1914	1966	74	
IN(1/100)	9367	9082	7489	7204	7347	202	
IN (1/400)	3937	3921	2059	2043	2051	11	
blanco	1878	
Curvas de calibración de AMC							
Sistema (A)				Sistema (B)			
[AMC] µM	UF1	UF2	UF promedio	[AMC] µM	UF1	UF2	UF promedio
0.1	6421	6525	6473	0.1	4215	4670	4443
0.25	12444	14540	13492	0.25	11367	12664	12016
0.5	23270	24448	23859	0.5	22363	22634	22499
0.75	34614	37666	36140	0.75	38859	45963	42411
1.0	54141	55284	54713	1.0	55643	60292	57968
UF promedio vs [AMC] µM				UF promedio vs [AMC] µM			
UF promedio= 52037[AMC] – 123.74; R ² = 0.985				UF promedio= 60073*[AMC] – 3371; R ² = 0.9882			

Tabla 20: se muestra la actividad tipo legumaina expresada en µmoles y µmoles/min (U) del el extracto de intestino (IN) para los sistemas A y B.

Actividad tipo legumaina para el extracto de intestino			
Sistema (A)			
Muestra	µM	µmoles	µmoles/min (U)
IN	14.07	1407	23.45
Sistema (B)			
Muestra	µM	µmoles	µmoles/min (U)

IN	17.84	1784	29.74
----	-------	------	-------

Los ensayos de actividad proteolítica realizados para los extractos de tubos de Malpighi, ovarios y huevos mostraron valores en (UF) muy bajos, no pudieron ser interpolados en las curvas de calibración, por lo tanto no pudieron ser cuantificados. Sin embargo estos valores fueron mayores que los obtenidos para el blanco del ensayo, de esta forma podemos decir que para dichos extractos obtuvimos trazas de actividad enzimática tipo legumaína. La curva de calibración de AMC y los resultados de actividad tipo legumaína para los extractos de garrapata se muestran en la tabla 21. Si comparamos los resultados de actividad tipo legumaína obtenidos en los dos sistemas de trabajo para los extractos de tubos de Malpighi y ovarios, podemos observar que los valores de actividad son mayores para el sistema (A). Mientras que para el extracto de huevos se obtuvieron resultados similares en ambos sistemas.

Tabla 21: Resultados de actividad tipo legumaína para los extractos: tubos de Malpighi, ovarios y huevos. Se muestra la cantidad de AMC liberado en UF, por duplicado UF1 y UF2, UF promedio y el desvío estándar para los sistemas (A) y (B) de los extractos de t. de Malpighi (MA), ovario (OV), huevos (H) y como control (+) productos de excreción/ secreción de *Fasciola hepática* (PES Fh) y la curva de calibración de AMC, luego de 1 hora de incubación con el sustrato z-Ala-Ala-Asn-AMC 300 µM en solución tampón citrato de sodio 50mM-EDTA 1mM, DTT 1M (sistema A) o con el agregado de 0,05% Chaps (sistema B), pH 7.

Actividad tipo legumaína en extractos de tubos de Malpighi, ovarios y huevos.							
Sistema (A)							
Muestra	UF1	UF2	UF1-blanco	UF2-blanco	UF promedio	Desvío estándar	
MA	2843	2724	906	787	847	84	
OV	3640	3503	1703	1566	1635	97	
H	2858	2800	921	863	892	41	
PES Fh	65000	65000	
blanco	1990	1883	1937	
Sistema (B)							
Muestra	UF1	UF2	UF1-blanco	UF2-blanco	UF promedio	Desvío estándar	
MA	3003	3074	381	452	417	50	
OV	3611	3590	989	968	979	15	
H	3426	3550	804	928	866	88	
PES Fh	65000	65000	
blanco	2549	2695	2622	
Curva de calibración de AMC							
Sistema (A)				Sistema (B)			
[AMC] µM	UF1	UF2	UF promedio	[AMC] µM	UF1	UF2	UF promedio
0.1	7310	7849	7580	0.1	5606	7922	6764
0.25	17282	18887	18085	0.25	18754	18071	18413
0.5	33870	35981	34926	0.5	31724	36393	34059
0.75	49803	50632	50218	0.75	46976	49698	48337
1.0	57054	59785	58420	1.0	62544	64367	63456
UF promedio vs [AMC] µM				UF promedio vs [AMC] µM			
UF promedio= 57836*[AMC] - 3770.5; R ² = 0.985				UF promedio= 62069*[AMC] - 129.7; R ² = 0.9979			

5.3. Análisis por Western blot de extractos de garrapata *R. microplus*.

Para este ensayo utilizamos un suero policlonal específico contra LAP de *Fasciola hepática* desarrollado en ovejas en nuestro laboratorio, para tratar de identificar la molécula tipo LAP en los extractos de garrapata con actividad tipo LAP. De este modo si existiese reactividad cruzada entre las LAPs de garrapata y *Fasciola hepática* por Western-blot podríamos identificar la/s molécula/s responsables de dicha actividad.

El Western-blot muestra que el antisuero reconoce algunas proteínas del extracto de huevos y de ovarios, mientras que para el extracto de intestino se observa un reconocimiento muy débil (Figura 24, líneas A). La mayoría son descartadas por falta de especificidad, como lo demuestra la reactividad de estas también con los sueros normales de oveja, usados como controles negativos (líneas C y D). En el extracto de intestino se observó un reconocimiento específico contra una proteína a los 150 KDa y otra de reactividad más tenue cercana a los 35 KDa, mientras que para el extracto de huevos se observa un reconocimiento específico débil del entorno de los 110 KDa. Para el extracto de ovarios no se evidencia reconocimiento específico de LAP con el antisuero utilizado.

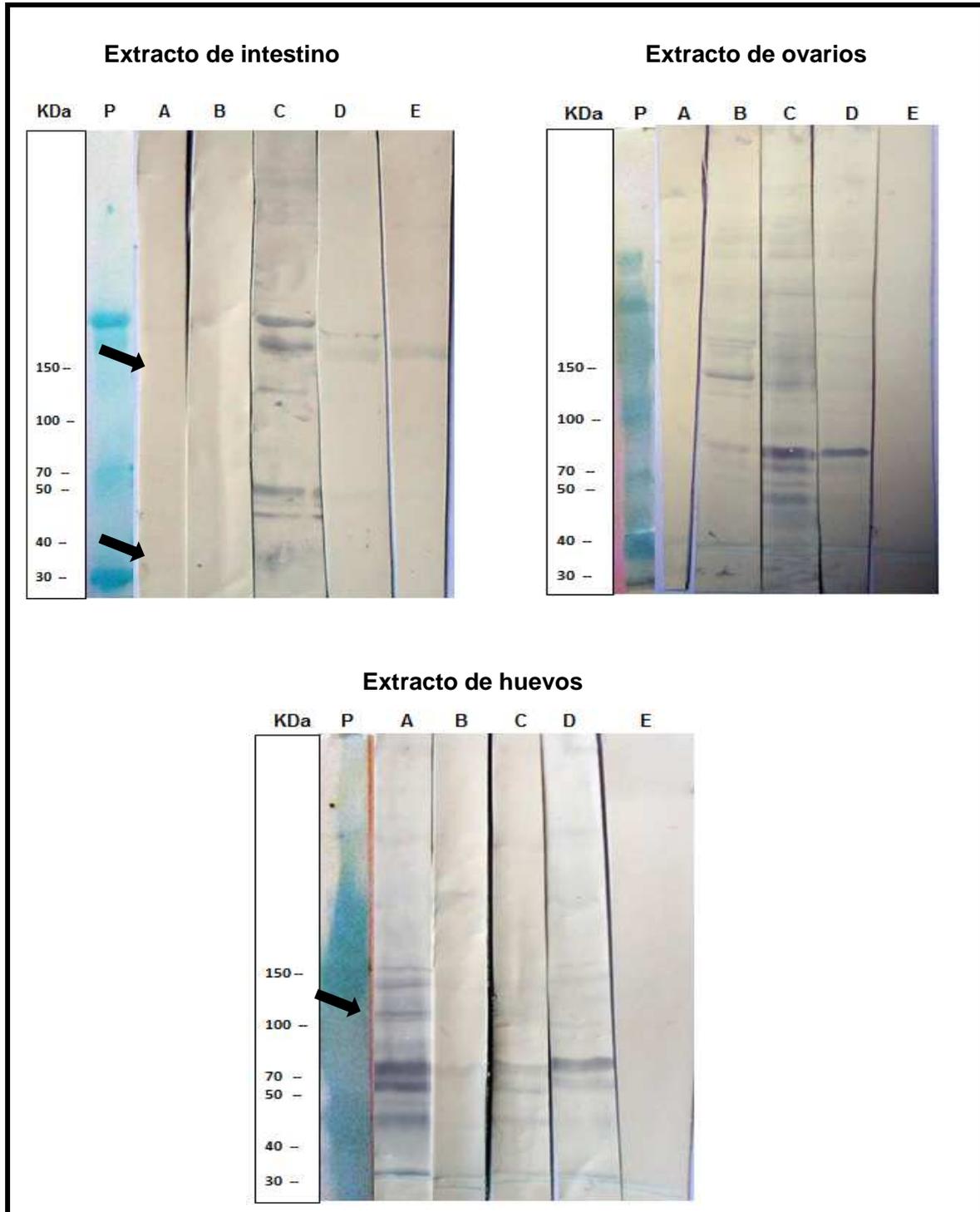


Figura 24: Análisis de reactividad de extractos de *R. microplus* por Western Blot enfrentados a: **A.** suero de oveja específico anti LAP recombinante de *F. hepática*, **B.** LAP nativa de *F. hepática* inmovilizada mostrando la reactividad del suero específico (control+), **C.** suero normal de oveja (-) semana 2, **D.** suero normal de oveja (-) semana 0, **E.** control de conjugado, **P.** patrón proteico de cada extracto revelado con Fast green, **KDa.** Estándar de peso molecular.

5.4. Purificación de actividad tipo LAP.

Basados en la capacidad de la bestatina de inhibir la actividad LAP, se intentaron aislar las enzimas responsables de la misma, mediante una cromatografía de afinidad por bestatina.

En la Figura 25 se muestra el cromatograma obtenido a partir de las medidas de absorbancia de las fracciones eluidas de la cromatografía del extracto de intestino de *R. microplus*.

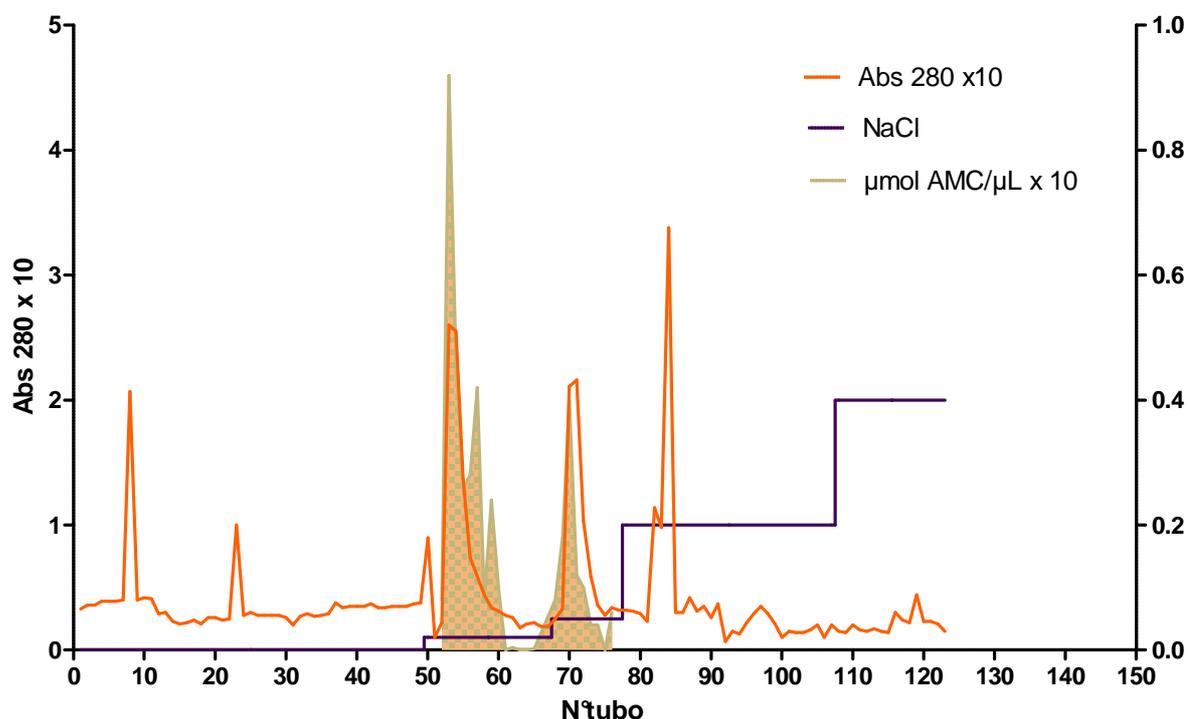


Figura 25: Cromatografía de afinidad LAP- bestatina. Cromatograma correspondiente al análisis de 200 μ l del extracto de intestino de hembras engordadas *R. microplus*. El extracto de intestino se aplicó a la columna equilibrada con tampón Tris-HCl 0,05 M pH 8,5. Las proteínas fueron eluidas con Tris-HCl 0,05 M pH 8,5, en un gradiente escalonado 0.1-2.0 M NaCl, (—) y se evaluó la presencia de proteínas mediante el monitoreo de la absorbancia a 280 nm (—).

Los picos al comienzo del cromatograma corresponden a la fracción de proteínas no retenidas (NR) por la columna. Con los posteriores pasajes del tampón 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. Se colectaron 18 fracciones eluidas para el primer escalón del gradiente 0.1 NaCl, observándose un primer pico bien definido cuya absorbancia fue máxima en el tubo 53, obteniendo 0.260 abs. Para el segundo

escalón del gradiente 0.25 M se colectaron 10 fracciones eluidas obteniéndose un segundo pico, cuyo máximo de absorbancia fue de 0.216 abs (tubo 71). Para el tercer escalón de NaCl 1M se colectaron 30 fracciones obteniéndose un tercer pico cuya absorbancia máxima fue de 0.338 abs (tubo 84). Para el escalón de NaCl 2M se colectaron 16 fracciones que no contenían proteínas.

5.4.1. Monitoreo de actividad tipo LAP

Para determinar cuál de estos picos contenía la actividad tipo LAP, en una primera instancia se monitoreo dicha actividad solamente en las fracciones donde la absorbancia fue máxima; la curva de calibración del ensayo y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22: Resultados de actividad tipo LAP para los picos obtenidos en la purificación. Se muestran las unidades de fluorescencia (UF) realizadas por duplicado para los picos de elución donde la absorbancia fue máxima: tubos 53, 71 y 84, extracto de intestino dializado (Testigo), fracción no retenida tubo 1 (NR1), fracción no retenida última tubo 49 (NR último), las (UF) promedio y la curva de calibración del ensayo, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato leu-AMC en tampón Tris-HCl 5 mM, MnCl₂ 1 mM, EDTA 5 mM pH 8.

Actividad tipo LAP en cromatografía				
Muestra	UF1	UF2	UF promedio	UF promedio-B
Blanco	893	901	897
Testigo	30300	30419	30360	29463
NR1	940	946	943	46
NR último	884	1043	964	67
Tubo 53	6538	6335	6437	5540
Tubo 71	2687	2702	2695	1798
Tubo 84	1095	1141	1118	221
Curva de calibración de AMC				
[AMC] μ M	UF 1	UF 2	UF promedio	
0.1	8926	5117	7022	
0.25	21553	19327	20440	
0.5	36654	32741	34698	
0.75	50025	42931	46478	
1.0	63467	57749	60608	
UF promedio vs [AMC] μ M		UF promedio=57448*[AMC]+3975.8; R ² = 0.9906		

Para las fracciones de proteínas no retenidas NR1 y NR último se obtuvieron 46 UF y 67 UF respectivamente. Estos valores no pudieron ser interpolados en la curva de calibración por quedar por debajo de la misma y por lo tanto no pudieron ser cuantificados.

La mayor actividad tipo LAP identificada fue en el tubo 53 (fracción donde la absorbancia fue máxima para el pico 1) con 5540 UF seguida del tubo 71 (fracción donde la absorbancia fue máxima para el pico 2) con 1798 UF, y para el tubo 84 (fracción donde la absorbancia fue máxima para el pico 3) se obtuvieron 221 UF. Posteriormente se determinó actividad tipo LAP en el resto de las fracciones que componen los tres picos visualizados en el cromatograma. Para el primer pico se determinó actividad tipo LAP en las fracciones (52-65), para el pico 2 en las fracciones (68-76), por último para el tercer pico en las fracciones (81-91). La curva de calibración para el ensayo y los resultados de actividad tipo LAP se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23: Curva de calibración de AMC y resultados de actividad tipo LAP para los tres picos obtenidos, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato leu-AMC e n tampón Tris-HCl 5 mM, MnCl₂ 1 mM, EDTA 5 mM pH 8.

Resultados de actividad LAP				
pico 1				
N° tubo	UF	UF-B	µM AMC	µmol AMC/µL
52	6368	3600
53	28200	25432	0.463	0.463
54	16156	13388	0.227	0.227
55	11408	8640	0.134	0.134
56	11909	9141	0.144	0.144
57	15163	12395	0.208	0.208
58	6645	3877
59	10528	7760	0.117	0.117
60	7041	4273
61	3878	1110
62	4650	1882
63	4077	1309
64	3980	1212
65	4593	1825
pico 2				
N tubo	UF	UF-B	µM AMC	µmol AMC/µL
68	3621	853
69	6157	3389
70	12083	9315	0.148	0.148
71	4880	2112
72	4113	1345
73	3026	258
74	2824	56
75	2663	0
76	3066	298
pico 3				
N° tubo	UF	UF-B	µM AMC	µmol AMC/µL
81	2645	0
82	2781	13
87	2445	0
90	2432	0
91	2674	0
Curva de calibración de AMC				
[AMC] µM	UF 1	UF 2	UF promedio	

0.1	7534	5931	6733
0.25	13607	13312	13460
0.5	32514	23622	28068
0.75	55364	29620	42492
1	56585	45577	51081
UF promedio vs [AMC] μM		UF promedio=51161*[AMC]+1762.7; R²= 0.9906	

En la tabla 23 se observa que la actividad tipo LAP está presente en las fracciones que componen los picos 1 y 2, mientras que en las fracciones que componen el pico 3 no se evidenció actividad tipo LAP.

Posteriormente las fracciones colectadas de cada pico donde se obtuvo actividad (picos 1 y 2) se juntaron y se concentraron por separado, el pico 1 fue concentrado diez veces y el pico 2, nueve veces. Una vez concentrados los picos, se determinó la actividad tipo LAP en cada pico. La curva de calibración y los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 24. A partir de estos resultados podemos observar que la actividad tipo LAP presente en el extracto de intestino (IN) disminuyó marcadamente luego de la diálisis (T). La actividad tipo LAP obtenida luego de concentrar el pico 1, fue de 0.76 U mientras que la actividad del pico 2 concentrado fue de 0.6 U.

Tabla 24: Resultados de actividad tipo LAP para los picos concentrados obtenidos en la purificación. Se muestran las unidades de fluorescencia (UF) realizadas por duplicado para los picos de elución concentrados: pico 1 y pico 2 concentrados 10 y 9 veces respectivamente; extracto de intestino dializado (Testigo), muestra de intestino sin dializar (IN) y la curva de calibración de AMC para el ensayo, luego de 1 hora de incubación a 37°C con el sustrato leu-AMC en tampón Tris-HCl 5 mM, MnCl₂ 1 mM, EDTA 5 mM pH 8. Las diluciones se indican ().

Actividad tipo LAP							
Muestra	UF	UF	UF promedio	UF promedio-B	μM	μM*dil	U (μmoles/min)
Blanco (B)	2652	3118	2885
Pico 1 concentrado	30355	25283	27819	24934	0.453	0.76
Pico 2 concentrado	23910	21727	22819	19934	0.358	0.6
Testigo (1/50)	61436	59152	60294	57409
Testigo (1/100)	25220	25401	25311	22426	0.405	41	68.3
IN (1/100)	46847	42855	44851	41966	0.777	78	130
Curva de calibración de AMC							
[AMC] μM	UF 1	UF 2	UF promedio				
0.1	7793	7285	7539				
0.25	11601	13354	12478				
0.5	30917	27516	29217				
0.75	37592	38933	38263				
1	56013	53614	54814				
UF promedio vs [AMC] μM		UF promedio=52516*[AMC] + 1153.3; R²= 0.9904					

En la Tabla 25 se muestra la actividad tipo LAP total recuperada para los picos 1 y 2 concentrados y la actividad presente en la muestra de intestino aplicada a la columna.

A partir de los cálculos realizados obtuvimos un rendimiento de 18%.

Tabla 25: Resultados de actividad tipo LAP para los picos concentrados obtenidos en la purificación.

Muestra	Volumen (mL)	Actividad (U)	Actividad total (U)
Pico 1 concentrado	2	0.76	152
Pico 2 concentrado	1.5	0.6	90
Testigo	0.2	68.3	1366

5.4.2. Cuantificación de proteínas.

Tabla 26: Concentración de proteínas para los tubos donde fue máxima la absorbancia: tubos 53, 71 y 84; Pico 1 concentrado; Pico 2 concentrado y extracto de intestino dializado testigo (T).

Muestra	[Proteínas] mg/mL
Tubo 53	0.11 +/- 0.08
Tubo 71	0.11 +/- 0.08
Tubo 84
P1 concentrado	0.36 +/- 0.08
P2 concentrado	0.65 +/- 0.08
Testigo	33.90 +/- 0.08

5.4.3. Perfil de proteínas por SDS - PAGE

Con el fin de determinar la presencia y la pureza de las alícuotas obtenidas en la purificación de LAP, se realizaron separaciones electroforéticas de proteínas en condiciones desnaturizantes utilizando geles de poliacrilamida al 12,5% en presencia de SDS de los picos 1 y 2 concentrados de las fracciones correspondientes a los picos de proteína obtenidos. Se realizaron tinciones con AgNO_3 y con Coomassie Brilliant 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. En la Figura 26 se muestra el patrón electroforético obtenido para las distintas fracciones analizadas.

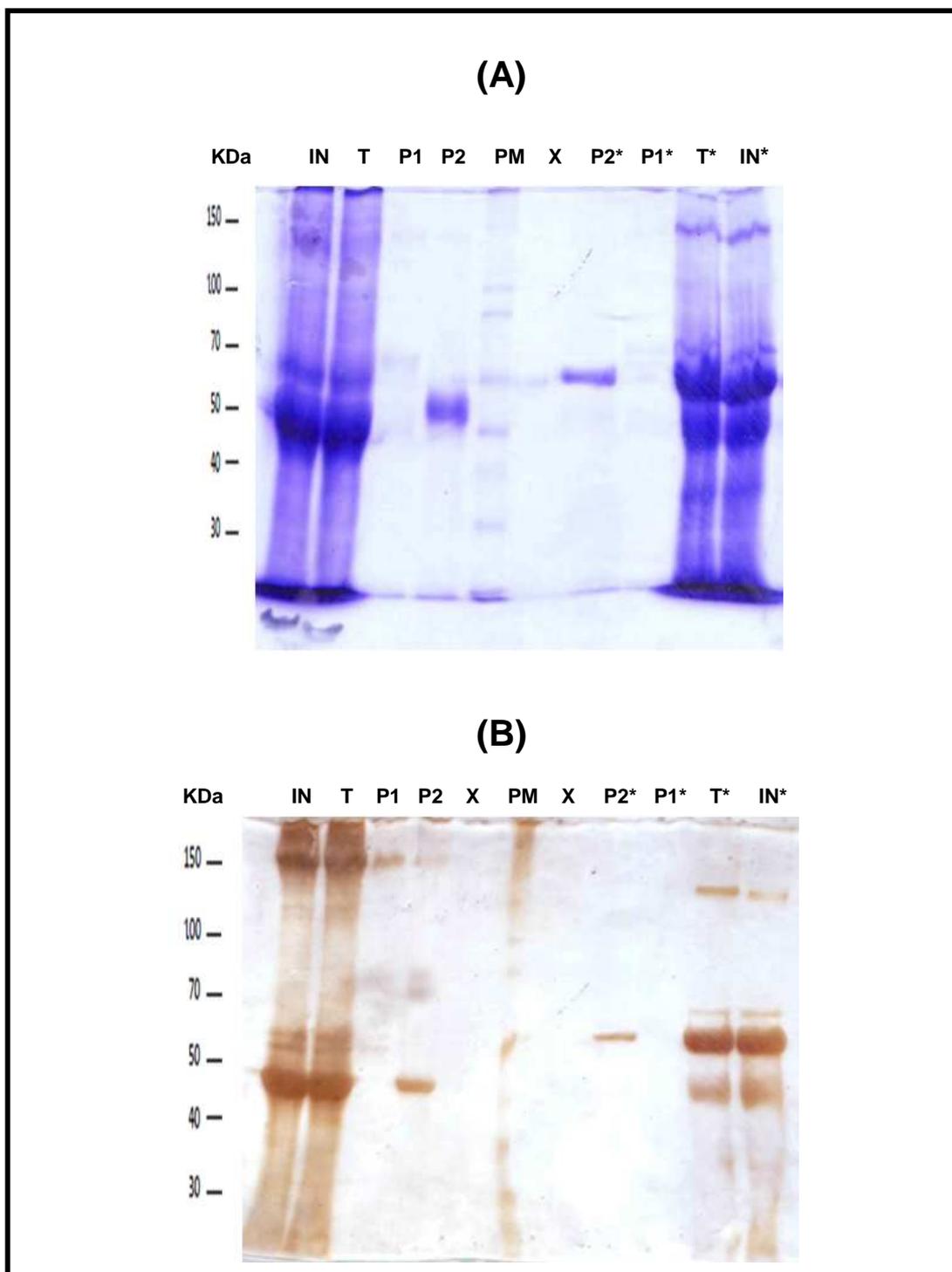


Figura 26: Análisis de la cromatografía por SDS-PAGE. Electroforesis en gels de poliacrilamida al 12.5 % en condiciones desnaturizante/reductoras (A) Análisis del extracto de intestino teñido con Coomassie Brilliant Blue. (B) Análisis del extracto de intestino teñido con AgNO_3 . Volúmenes sembrados: 10 μl del extracto de intestino sin dializar (IN), 10 μl del extracto de intestino dializado (T), pico 1 concentrado (P1), pico 2 concentrado (P2), (*) muestras reducidas.

5.4.4. Monitoreo de actividad tipo legumaina.

La actividad tipo legumaina se analizó mediante fluorimetría utilizando un sustrato peptídico sintético, en los picos de elución concentrados y en la muestra de intestino dializada (testigo) como se describe previamente en el ítem 4.4.2.2.2. Los resultados y la curva de calibración del ensayo se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27: Resultados de actividad tipo legumaina para los picos concentrados 1 y 2 y para el pico 3 obtenidos en la purificación, luego de 1 hora de incubación con el sustrato Z-Ala-Ala-Asn-AMC 300 μM en solución tampón citrato de sodio 50mM-EDTA 1mM, DTT 1M, 0,05% Chaps, pH 7.

Actividad tipo legumaina							
Muestra	UF1	UF2	UF promedio	UF promedio-B	μM	μmoles	$\mu\text{moles/min (U)}$
Blanco (B)	5432	5093	5263
Pico 1 concentrado	6647	6421	6534	1272
Pico 2 concentrado	7908	7675	7792	2529
Pico 3	5226	4803	5015
Testigo	61466	50860	56163	50901	0.874	87.4	1.457
No retenido	5478	4665	5072
Curva de calibración de AMC							
[AMC] μM	UF1	UF2	UF promedio				
0.1	8157	7515	7836				
0.25	14293	15780	15037				
0.5	30805	28873	29839				
0.75	42724	45332	44028				
1	57857	58161	58009				
UF promedio vs [AMC] μM			UF promedio = $56328 \cdot [\text{AMC}] + 1659.2$; $R^2 = 0.9995$				

A partir de los resultados mostrados en la tabla 27 podemos observar que los picos 1 y 2 concentrados y el pico 3, no presentan actividad tipo legumaina.

6. DISCUSION

La línea de investigación de este trabajo se focalizó en identificar y caracterizar actividad proteolítica en diferentes órganos de la garrapata *R. microplus*, cepa Mozo, basados en estudios previos realizados por otros autores en varias garrapatas.

Comenzamos por realizar una caracterización primaria de los extractos de trabajo, mediante el análisis del patrón electroforético obtenido para los extractos de la garrapata *R. microplus*.

El perfil electroforético obtenido para los dos extractos de intestino analizados fue muy similar (Figura 14, líneas In e IN), en ambos extractos se evidenciaron claramente al menos ocho proteínas con un peso molecular aparente en el rango de 250-52 KDa. Al reducir los puentes disulfuros con DTT, solamente se observaron proteínas con pesos moleculares aparentes en el rango de 166-79 KDa (Figura 14, líneas In* e IN*). Por lo tanto podemos suponer que las proteínas visualizadas en este ensayo para el extracto de intestino están compuestas por varias subunidades, las cuales podrían ser las de pesos moleculares aparentes en el entorno de 166-79 KDa y otras subunidades tendrían un peso molecular muy bajo por lo cual no fue posible visualizarlas. A partir de la bibliografía consultada no fue posible identificar las proteínas detectadas en este ensayo. Sin embargo, estudios realizados por Kongsuwan y col., 2009 mediante análisis proteómicos en el intestino de hembras parcialmente engordadas *R. microplus* revelaron la presencia de 120 proteínas, y de estas un número inusualmente grande fueron asociadas con el metabolismo energético, transporte, unión a lípidos, estrés oxidativo y detoxificación. La electroforesis bidimensional fue realizada en el rango de 10 a 80 KDa, donde la mayor parte de estas proteínas fue hallada en el rango de 20 a 60 KDa. Las proteínas encontradas fueron categorizadas según su función acorde a la información obtenida desde las bases de datos de ontología de genes (GO) y bibliografía de referencia. La identificación de proteínas fue categorizada funcionalmente por tener roles en la unión, catálisis, transporte, traducción, regulación transcripcional, regulación traduccional, plegado de proteínas, chaperonas con actividad antioxidante y mantenimiento estructural. La mayor parte de las proteínas identificadas fueron intracelulares lo cual es consistente con el hecho de que en garrapatas, la digestión se lleva a cabo gradualmente dentro de células del tracto intestinal luego de la endocitosis (Sonenshine, 1991). Varias enzimas proteolíticas que están directamente involucradas en la digestión o asistencia de la digestión de hemoglobina, como

peptidasas tipo legumina, metalopeptidasas, peptidasas tipo catepsina L y tipo catepsina B, cisteinopeptidasas, leucinaminopeptidasas y cistatina fueron detectadas en intestino.

En el extracto de huevos se evidenciaron varias proteínas con pesos moleculares aparentes entre 222 y 27 KDa (Figura 14, línea H). La abundancia de proteínas en los huevos se puede relacionar a que en esta etapa del ciclo de vida se necesitan muchas proteínas para el desarrollo embrionario; el desarrollo de los embriones de artrópodos requiere que los nutrientes propios estén disponibles en el momento adecuado. El mayor volumen de huevos de artrópodos está compuesto por gránulos de la yema del huevo, organelos especializados que contienen el material de reserva y la maquinaria enzimática necesaria para hacer que estas reservas estén disponibles. Es sabido que la mayor proteína contenida en estos gránulos es la vitelina (VT). En la garrapata y en la mayoría de los insectos la VT representa entre el 80 y 90 % de las proteínas totales presentes en los gránulos de vitelo (Rosell y Coons, 1991b). Las vitelinas son lipoglicofosfoproteínas de origen materno que poseen alto peso molecular, están formadas por 6 a 9 subunidades variando de 35 a 160 KDa cada una (Rosell y Coons, 1991 a). En el patrón electroforético para el extracto de huevos (Figura 14, línea H*) se observa la presencia de prácticamente todas las proteínas o subunidades en el rango de 35 a 160 KDa, por lo cual podemos suponer que estas subunidades se corresponden con las subunidades de la VT.

El patrón electroforético obtenido para el extracto de ovarios es muy similar al obtenido para el extracto de huevos, donde se observan varias proteínas o subunidades en el rango de 35 a 160 KDa (Figura 14, línea OV*). Por lo tanto la VT sería el principal componente de las proteínas del ovario de las garrapatas engordadas.

Por último para el extracto de tubos de Malpighi se visualizaron al menos dos proteínas, con pesos moleculares aparentes de 250 KDa y 53 KDa (Figura 14, línea Ma), en presencia de DTT dichas proteínas no fueron visualizadas (Figura 14, Ma*). Suponemos que al reducir los puentes disulfuro las subunidades que componen dichas proteínas tengan pesos moleculares muy bajos no pudiendo ser resueltas en este gel, otra explicación podría ser que no se haya sembrado suficiente muestra y por lo cual no fue posible visualizarlas.

A partir de zimogramas hemos demostrado que el extracto del intestino de las garrapatas engordadas adultas de la cepa Mozo, contiene numerosas enzimas proteolíticas, como lo evidencia el zimograma con gelatina (Figura 15, B). Así mismo constatamos actividad específica sobre la hemoglobina mediante zimogramas con hemoglobina bovina (Figura 15, A). Trabajos previos usando técnicas diferentes mostraron la existencia en larvas e intestino de hembras

adultas actividad hemoglobinas (Renard y col. 2000) (Estrela y col 2010); Sin embargo nuestro zimograma muestra además claramente que esta actividad está asociada a al menos a dos endopeptidasas, de movilidades electroforéticas bien diferenciadas; la más activa al pH analizado pH= 4.5 presenta una movilidad electroforética rápida, mientras que la otra hemoglobinas presenta menor actividad y menor movilidad electroforética (Figura 15). Esto sugiere que al igual que para la garrapata *Ixodes ricinus* (Horn y col. 2009), la digestión de la hemoglobina en *R. microplus* podría explicarse mediante una cascada hemoglobinolítica, en la que participarían al menos dos endopeptidasas.

Para profundizar en la caracterización de esta cascada hemoglobinolítica se utilizaron sustratos sintéticos específicos, focalizando la búsqueda en las peptidasas que se cree podrían actuar en las etapas iniciales de la cascada de degradación de hemoglobina, como son catepsina L y legumaína (cisteína peptidasas), y en las etapas finales, LAP.

Mediante ensayos de actividad proteolítica utilizando el sustrato peptídico sintético fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC, se detectó actividad tipo catepsina L en los extractos de garrapata: intestino, ovarios y huevos.

Para el extracto de intestino la actividad tipo catepsina L obtenida fue de 1.8 U, la cual comparada con el control de plasma utilizado (0.24 U), representa una actividad siete veces superior; teniendo en cuenta que el intestino fue lavado numerosas veces, la contaminación de sangre que pudiera haber quedado en la muestra no podría explicar un valor tan alto de actividad (Tabla 9). A partir de lo anterior podemos afirmar que la actividad tipo catepsina L detectada, corresponde mayoritariamente a la presente en el extracto de intestino. Al evaluar la curva de pHs para esta actividad (Figura 16) se observó actividad tipo catepsina L a todos los pH ensayados, obteniéndose un valor óptimo (máxima actividad) a pH 5. A pHs mayores a 6 e inferiores a 4 dicha actividad disminuyó de forma significativa. Para confirmar que la actividad encontrada se corresponde con cisteína peptidasa se hicieron ensayos de inhibición con distintos inhibidores (Tabla 12; Figura 17); los resultados de este ensayo muestran que en presencia del inhibidor E-64 específico para cisteína peptidasas, la actividad tipo catepsina L fue 100 % inhibida, lo que es concordante con otros autores (Renard y col., 2000). A partir de los resultados mencionados anteriormente podemos concluir que la actividad detectada corresponde mayoritariamente a la actividad presente en el extracto de intestino de *R. microplus* y dicha actividad es máxima a pH 5.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Renard y col., 2002, estos autores realizaron ensayos de actividad con sustratos cromogénicos sintéticos específicos utilizando

una enzima recombinante de *R. microplus*, la rBmCL1; esta enzima exhibió una gran actividad hidrolítica sobre el sustrato específico para cisteína peptidasas Bz-Phe-Arg-pNa y también fue inhibida por E-64. Las curvas de pH mostraron un pH óptimo de 5.5, valor ligeramente superior al encontrado por nosotros; la diferencia de pH podría deberse a que nosotros trabajamos con la enzima nativa y estos autores con la enzima recombinante. La actividad tipo catepsina L también fue detectada en el intestino de las garrapatas *H. longicornis* e *I. ricinus*. Para la garrapata *H. longicornis* mediante ensayos fluorimétricos se detectó actividad cisteína peptidasa tipo catepsina L, denominada (HICPL-A); la enzima exhibió una elevada actividad hidrolítica sobre el sustrato fluorogénico específico para cisteína peptidasas Z-Phe-Arg-AMC y dicha actividad fue máxima a pH 3.6, a su vez la actividad fue inhibida completamente por E-64 (Yamaji y col., 2009). Resultados similares fueron obtenidos para la garrapata *I. ricinus* utilizando el mismo sustrato fluorogénico (Horn y col., 2009). Si bien estos autores realizaron ensayos fluorimétricos con el sustrato peptídico Z-Phe-Arg-AMC y realizaron ensayos de inhibición al igual que nosotros, utilizaron la enzima recombinante y a su vez un sistema de trabajo distinto al nuestro, esto podría explicar que el pH óptimo es diferente al determinado en este trabajo.

Para el extracto de ovarios se obtuvo una actividad tipo catepsina L de 0.41 U (Tabla 9), dicha actividad fue confirmada mediante ensayos de inhibición, los cuales mostraron que en presencia de E-64 la enzima fue inhibida 100% (Tabla 12; Figura 18). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Fernández y col., 2007, quienes reportaron la presencia actividad tipo catepsina L en ovarios de garrapatas adultas *R. microplus*. A partir de la curva de pHs se determinó que la actividad fue máxima a pH 4, a pHs superiores a 4 e inferiores a 6 la actividad disminuyó gradualmente, mientras que a pHs mayores a 6 la actividad disminuyó marcadamente (Figura 16).

Para el extracto de huevos se obtuvo actividad tipo catepsina L de 3.51 U (Tabla 8), dicha actividad fue confirmada mediante ensayos de inhibición, obteniéndose en presencia de E-64, una inhibición del 80% (Tabla 12; Figura 19). La curva de pH mostró que la actividad es óptima a pH 4, a pHs mayores a 5 la actividad disminuyó marcadamente siendo casi nula, mientras que a pHs menores a 4 la actividad disminuye gradualmente (Figura 16). Estos resultados son similares a los descritos por Seixas y colaboradores en el año 2003, quienes encontraron en extractos de huevos de *R. microplus* una cisteína endopeptidasa degradadora de vitelina (VTDCE), la que se cree participaría en la degradación de vitelina durante la embriogénesis. La actividad de esta cisteína peptidasa es óptima a pH 4, y es tipo o parecida a una catepsina L, a

su vez VTDCe hidroliza albúmina, hemoglobina, gelatina y vitelina. A partir de lo anterior podríamos suponer que la actividad tipo catepsina L detectada en nuestro extracto de huevos podría ser debida a la presencia de VTDCe en el extracto. Otros autores también han reportado la presencia de cisteína endopeptidasas participando en la degradación de los gránulos de la yema de huevos en *B. germánica*, *Drosophila melanogaster*, *O. moubata* y *Bombyx mori* (Liu y col., 1996; Medina y col 1988; Fagotto, 1990; Kageyama 1990).

En el extracto de tubos de Malpighi se detectó actividad sobre el sustrato Z-Phe-Arg-AMC con un valor de 2.53 U (Tabla 8), sin embargo dicha actividad no pudo ser confirmada a partir de los ensayos de inhibición realizados, ya que en presencia del inhibidor específico para cisteína peptidasas E-64 la actividad tipo catepsina L no fue inhibida de forma alguna (Tabla 12; Figura 20). La curva de pHs mostró actividad a todos los pHs ensayados, siendo esta actividad máxima a pH 5.6. A valores de pH mayores y menores a 5.6, la actividad disminuyó de forma significativa (Figura 16). La presencia de actividad tipo catepsina L en este extracto fue encontrada en la garrapata *I. ricinus* (Sojka y col., 2008).

Para todos los extractos analizados en este trabajo la actividad tipo catepsina L fue máxima a pH ácido, a pH mayores a 7 dicha actividad disminuye marcadamente siendo casi nula, lo cual es consistente con reportes previos que muestran que las cisteínas peptidasas tienen un pH óptimo ácido (Sajid y col., 2002).

Nuestros resultados a partir de los ensayos fluorimétricos realizados con el sustrato específico Leu-AMC, demuestran la presencia de actividad tipo LAP en los extractos de intestino y ovarios de la garrapata *R. microplus*.

Para el extracto de intestino se obtuvo una actividad tipo LAP de 26.9 U, esta actividad es trece veces mayor a la actividad obtenida para el plasma de sangre bovina utilizado como control (Tabla 13); de esta forma podemos asegurar que la actividad tipo LAP detectada corresponde mayoritariamente a la actividad presente en el extracto de intestino. Dicha actividad fue confirmada mediante ensayos de inhibición; en presencia del inhibidor bestatina, específico para LAP, la actividad fue inhibida 61% mientras que en presencia de EDTA inhibidor de metalopeptidasas la actividad fue inhibida 48% (Tabla 17; Figura 21). Si bien no hemos encontrado en la bibliografía consultada, reportes de actividad LAP en la garrapata *R. microplus*, la presencia de actividad LAP en otras garrapatas fue descrita previamente por otros autores. En el año 2006, Hatta y colaboradores encontraron actividad LAP para la garrapata dura *Haemaphysalis longicornis*, la cual fue denominada (HILAP). Esta peptidasa muestra una alta conservación de

motivos de secuencias consenso con la familia de aminopeptidasas citosólicas M17. Mediante análisis filogenéticos observaron que HILAP se encuentra en la rama más cercana a los miembros LAP de mamíferos. Análisis de homología también mostraron que tienen una alta identidad con LAP de mamíferos y baja identidad con las LAPs de los insectos, *A. gambiae* y *D. melanogaster*; Esta evidencia indica fuertemente que la HILAP posee una función similar a la LAP de mamíferos. Dicha aminopeptidasa fue detectada en la fracción soluble de homogenados de adultos de *H. longicornis*. Mediante inmuno histoquímica se localizó HILAP endógena en el citosol, células del epitelio del intestino medio, glándulas salivares y células epidérmicas. Estos órganos tienen un rol muy importante en los procesos de alimentación de sangre de las garrapatas. Se cree que la digestión de la sangre en garrapatas hematófagas ocurre intracelularmente. Durante la digestión, las aminopeptidasas y carboxipeptidasas son responsables de la hidrólisis de los polipéptidos generados por el clivaje de endopeptidasas en el sistema digestivo de artrópodos (Billingsley y Downe, 1985). De forma similar el agente causante de la Malaria *P. falciparum* y de los trematodos de la sangre humana *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum* utilizan aminopeptidasas citosólicas incluyendo LAP como enzimas terminales de la degradación de la hemoglobina presente en la sangre del hospedero (Gavigan y col., 2001; Mc Carthy, 2004). Se cree que la HILAP presente en las células epiteliales del intestino medio podría funcionar como una de las enzimas pertenecientes al mecanismo de la digestión de la hemoglobina del hospedero. La expresión de HILAP es alta en el período inicial de alimentación (1-3 días) luego de ello descende. La baja expresión de HILAP puede indicar una disminución en el número de células expresando HILAP, especialmente células digestivas del epitelio del intestino. Estos resultados también sugieren que HILAP está involucrada en la digestión de la sangre con la liberación de aminoácidos libres de las proteínas de la sangre en el intestino. La HILAP endógena no se expresa en períodos de no alimentación. Por otro lado Horn y colaboradores en el año 2009, determinaron mediante ensayos fluorimétricos utilizando el sustrato específico para LAP, Leu-AMC la presencia de una leucinaminopeptidasa en extractos de intestino de *I. ricinus*, siendo la máxima actividad a pH 6.5; a su vez esta actividad fue inhibida por bestatina.

Para el extracto de ovarios se obtuvo una actividad tipo LAP de 8.67 U (Tabla 15), los ensayos de inhibición mostraron que en presencia del inhibidor bestatina dicha actividad fue inhibida 87 % y en presencia de EDTA la actividad fue inhibida 52% (Tabla 17; Figura 22). De esta forma podemos afirmar que en el extracto de ovarios se encuentra presente una peptidasa tipo LAP. La presencia de una leucina aminopeptidasa denominada (HILAP), fue reportada para la

garrapata *Haemaphysalis longicornis*, esta peptidasa tiene un rol vital en el desarrollo de los oocitos (Hatta, y col., 2010).

Para el extracto de huevos se obtuvo una actividad tipo LAP de 19.6 U (Tabla 16); esta actividad no pudo ser confirmada mediante ensayos de inhibición, ya que en presencia de bestatina, inhibidor específico de LAP, se obtuvo una inhibición de 16 % y en presencia de EDTA la inhibición fue de 1% (Tabla 17; Figura 23). Las repeticiones de los ensayos mostraron resultados similares. Debido a lo anterior, realizamos un ensayo de fluorimetría para el extracto de huevos en presencia y ausencia de AMC y sin el agregado de sustrato (Tabla 18), los resultados de este ensayo mostraron que existen moléculas en el extracto que absorben la luz emitida por el AMC. Para confirmar la presencia de actividad tipo LAP en el extracto de huevos se debería encontrar un sistema adecuado de trabajo, de forma de eliminar las interferencias que provoca la fluorescencia intrínseca de los huevos. Para ello se podrían realizar ensayos utilizando sustratos cromogénicos.

Para el extracto de tubos de Malpighi se obtuvieron trazas de actividad tipo LAP (Tabla 14), dichos valores no pudieron ser cuantificados y no se realizaron ensayos de inhibición.

Por último se realizaron ensayos preliminares para la determinación de actividad tipo legumaína en los extractos de la garrapata *R. microplus*, utilizando un sustrato peptídico sintético específico para dicha actividad, el Z-Ala-Ala-Asn-AMC.

Revisando bibliografía de peptidasas presentes en garrapatas, encontramos que Sojka y col., 2007 aislaron y caracterizaron una asparaginil endopeptidasa (legumaína) en el intestino de la garrapata *Ixodes ricinus* (IrAE), siendo esta legumaína la primera en ser descrita en garrapatas. La estructura primaria completa de IrAE descrita por estos autores tiene características en común con la de los humanos (Chen y col., 1997) y *Schistosomma mansoni* (Caffrey y col, 2000). La IrAE presente *I. ricinus* tiene un pH óptimo para la hidrólisis del sustrato Z-AAN-AMC de 5.5 y dicha actividad declina bruscamente a pHs superiores a 6. Se cree que este fenómeno es debido muy probablemente a la inestabilidad de la actividad de IrAE a pH neutro, esta inestabilidad también ha sido reportado en plantas (Ishii, 1994) y legumaínas de mamífero (Chen y col 1997). La demostración de que una asparaginil endopeptidasa se exprese en el intestino de *I. ricinus* sugiere fuertemente que la función de esta enzima está asociada con la degradación de hemoglobina del hospedero. Resultados similares fueron obtenidos por Horn y col., 2009, quienes comprobaron la presencia de una legumaína en el intestino de la garrapata *I. ricinus* siendo la actividad máxima en el rango de pH 5.5-6, esta legumaína participa en los pasos iniciales de la degradación de hemoglobina.

Por otra parte Alim y col., 2007 y 2008, caracterizaron el gen de dos legumainas que se expresan en el intestino de la garrapata *Haemaphysalis longicornis*: (HILgm) y (HILgm2), estas peptidasas poseen propiedades funcionales y bioquímicas similares. Mediante análisis de secuencias y estudios filogenéticos determinaron que la legumaina HILgm detectada en esta garrapata es homóloga a la de mamíferos, plantas y parásitos helmintos. Las legumainas presentes en *H. contortus* (Oliver y col., 2006) y *S. mansoni* (El Meanawy y col., 1990) fueron expresadas en el epitelio del intestino y se cree que participarían en la digestión de la hemoglobina.

La peptidasa recombinante rHILgm2, fue activa a pH neutro y alcalino, la hidrólisis de sustratos sintéticos fue óptima a pH 7 a 37°C, mismo pH y temperatura que se obtuvo para HILgm (Alim y col., 2007). La legumaina para *H. contortus* y *S. mansoni* hidrolizaron los sustratos a pH 7 y pH 6.8 respectivamente. (Dalton y col., 1995; Oliver y col., 2006). Ensayos de inmunohistoquímica, inmunoblot y análisis de los perfiles de transcripción del mRNA mostraron una sobre regulación de la expresión del mRNA de HILgm2 endógena durante los procesos de alimentación de sangre del hospedero. Estos resultados indican una crítica relación entre HILgm2 y la digestión de la sangre ingerida. La peptidasa recombinante rHILgm2 digiere fragmentos de hemoglobina bovina, previamente degradados por la catépsina D, sugiriendo de este modo que la legumaina de *H. longicornis* actúa cooperando con la cascada de peptidasas aspárticas para completar la degradación de hemoglobina. El hecho de que existan genes ortólogos de las Aes en otros parásitos hematófagos, que se expresan en el intestino de *S. mansoni* (Caffrey y col. 2000) y *H. contortus* (Oliver y col 2006) sugiere una función conservada por esta especificidad de acción, quizás por contribuir discretamente en el clivaje de la hemoglobina y o el procesamiento de otras peptidasas del clan CA y AA que actúan completando la degradación del sustrato (Dalton y Brindley 1996); Caffrey y col., 2004; Delcroix y col., 2006).

En este trabajo se realizaron ensayos preliminares para la determinación de actividad tipo legumaina en los extractos de la garrapata *R. microplus*, siguiendo el protocolo descrito por Alim y col., 2008 a pH 7 donde estos autores determinaron que dicha actividad fue máxima. A su vez se estudió como afecta a la actividad legumaina, la presencia del detergente zwitterionico 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato (Chaps), detergente utilizado comúnmente para solubilizar proteínas.

Para el extracto de intestino de *R. microplus* se obtuvo actividad tipo legumaina en los dos sistemas de trabajo analizados, en ausencia y presencia de Chaps (sistema A y B)

respectivamente. La actividad tipo legumaína obtenida para el sistema A, fue de 23.45 U y para el sistema B, 29.74 U (Tabla 20). Los controles realizados en muestras de sangre bovina mostraron valores de actividad muy bajos no pudiendo ser cuantificados; a partir de estos resultados podemos concluir que la actividad tipo legumaína detectada corresponde mayoritariamente a la actividad tipo legumaína presente en el extracto de intestino. Por otro lado al comparar los valores obtenidos de actividad en los dos sistemas de trabajo, podemos observar que en presencia de Chaps dicho valor es superior al obtenido en ausencia de Chaps (Tablas 19 y 20), de esta forma podemos concluir que en presencia del detergente Chaps aumenta la actividad tipo legumaína presente en el extracto de intestino.

Para los extractos de ovarios, huevos y tubos de Malpighi se obtuvieron trazas de actividad tipo legumaína para los dos sistemas de trabajo analizados. La presencia de Chaps no favorece dicha actividad para los extractos de ovarios y tubos de Malpighi mientras que para el extracto de huevos la actividad tipo legumaína prácticamente no se ve afectada (Tabla 21).

Para confirmar la presencia de la legumaína en los extractos de garrapata examinados, se deberían realizar ensayos de inhibición con inhibidores específicos para dicha peptidasa, estos ensayos no fueron realizados por no contar en nuestro laboratorio con inhibidores específicos para legumaínas.

Para proseguir con la caracterización de la actividad tipo legumaína encontrada en los extractos de la garrapata *R. microplus*, además de los ensayos de inhibición con inhibidores específicos, se deberían realizar curvas de pH. De esta manera se podría determinar el pH óptimo para dicha actividad y conocer si la actividad tipo legumaína detectada en el extracto de intestino de *R. microplus* se asemeja a la actividad legumaína presente en *I. ricinus* o *H. longicornis*.

Como ensayo complementario para la detección de LAP en los extractos de garrapata *R. microplus* se realizó un inmunoblot, para lo cual se utilizó un anticuerpo específico desarrollado para la LAP recombinante de *Fasciola hepática* de un experimento de vacunación realizado en nuestro laboratorio en investigaciones de fasciolosis. Los resultados de este ensayo mostraron para el extracto de intestino un reconocimiento específico al observarse una banda cercana a los 150 KDa y otra banda tenue cercana a los 35 KDa, mientras que para el extracto de huevos se observa un reconocimiento específico débil en el entorno de los 110 KDa. Para el extracto de ovarios no se evidencia reconocimiento específico de LAP.

A partir de la cromatografía de afinidad por bestatina (inhibidor específico de LAP), para el extracto de intestino se intentó purificar parcialmente la peptidasa LAP. En el cromatograma

(Figura 25) se visualizan tres picos de elución bien definidos. Con el fin de esclarecer en una primera instancia la existencia de afinidad por bestatina de dicha enzima, se realizaron ensayos de actividad proteolítica en los picos de elución (Tabla 23), a partir de estos ensayos pudimos determinar que la actividad tipo LAP se encuentra presente en los picos de elución 1 y 2 obtenidos en el primer escalón del gradiente 0.1M (pico 1), y en el segundo escalón del gradiente 0.25M (pico 2). Los ensayos de actividad tipo LAP luego de concentrar los picos de elución mostraron una actividad de 0.76 U para el pico 1 y 0.6 U para el pico 2. La actividad tipo LAP presente en la muestra de intestino dializada utilizada como testigo fue de 68.3 U (Tabla 25). Por otro lado, la actividad presente en el extracto de intestino previo a la diálisis fue mucho mayor que la actividad presente luego de la misma, suponemos que durante dicho proceso la enzima se degradó. Los cálculos realizados revelan que solamente se pudo recuperar 18 % de la actividad presente en el extracto de intestino previo a la purificación. Esta marcada disminución de la actividad tipo LAP luego de la purificación puede ser debida a que la enzima haya perdido actividad o se halla degradado durante el desarrollo de la cromatografía. A su vez descartamos que la enzima haya quedado retenida en la columna debido a que utilizamos altas concentraciones de NaCl. También podemos descartar que la enzima haya eluido en el no retenido ya que la actividad obtenida en esas fracciones fue casi nula.

La electroforesis de los picos concentrados 1 y 2 correspondientes al extracto de intestino (Figura 19) fue visualizada por medio de las tinciones con Coomassie y AgNO_3 , en ambos geles se observó un perfil similar en casi en la totalidad de las proteínas que interaccionaron con la matriz de bestatina. Suponemos que la LAP es la proteína que se visualiza en ambos picos a valores superiores a 150 KDa.

Por último los ensayos de actividad tipo legumina no mostraron actividad en los picos concentrados 1 y 2.

7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo hemos demostrado que en el extracto de intestino de las garrapatas engordadas *R. microplus*, cepa Mozo se encuentran presentes varias enzimas proteolíticas.

Se confirmó la presencia de actividad tipo catepsina L en los extractos de intestino, ovarios y huevos como fue reportado previamente para garrapatas *R. microplus*, a su vez se obtuvo el pH óptimo de dicha actividad para los extractos analizados; esta actividad fue detectada por primera vez en la cepa Mozo.

Se determinó actividad tipo LAP para el extracto de intestino por primera vez en garrapatas *R. microplus*, cepa Mozo; mediante una cromatografía de afinidad por bestatina se logró recuperar 18 % de la actividad tipo LAP presente en el extracto previo a la purificación.

Se tienen como futuros objetivos identificar las proteínas presentes en los extractos de garrapata: intestino, ovarios, huevos y tubos de Malpighi mediante espectrometría de masas; confirmar que las actividades tipo catepsina L, LAP y legumina detectadas en los extractos de trabajo sean efectivamente debido a la presencia de estas peptidasas. Determinar mediante ensayos fluorimétricos la presencia de actividad proteolítica de otras peptidasas involucradas en la degradación de hemoglobina.

8. BIBLIOGRAFIA

- Agbede, R., and Kemp, D., 1985. Digestion in the cattle tick *Boophilus microplus*: light microscope study on the gut cells in nymphs and females. *Int. J. Parasitol.* 16, 35-41.
- Agyei, A., and Runham, N. 1995. Studies on the morphology, Physiological changes in the midguts of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. *Int. J. Parasitol.* 25, 55-62.
- Alim, M., Tsuji, N., Miyoshi, T-, Islam, M., Huang, X., Motobu, M., Fujisaki, K. 2007. Characterization of asparaginyl endopeptidase/legumains in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* involved in blood-meal digestion. *J. Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 911-922.
- Alim, M., Tsuji, N., Miyoshi, T-, Islam, M., Huang, X., Hatta, T., Fujisaki, K. 2008. HILmg2, a member of asparaginyl endopeptidase/legumains in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* involved in blood-meal digestion. *J. Insect Physiol*54: 573-585.
- Anderson, J.M., Sonenshine, D.E., Valenzuela, J.G., 2008. Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) *BMC. Genomics*.9, 552.
- Balashov, Y.S., 1967. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) - vectors of disease of man and animals (English translation). *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 8, 163-376.
- Balashov, Y.S., Raikhel, A.S., 1978. Ultrafine structure of the midgut of hungry nymphs of *Ornithodoros papillipes* (Acarina, Argasidae) during the assimilation of blood. *Parasitology* 12, 21-26.
- Barker S, Marrell A., 2008. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. In: Bowman A, Nuttal P, editors. *Ticks: biology, disease and control.* Cambridge: Cambridge University Press. P. 1-39.
- Barret, A.J., Kirschke, H., 1981. "Cathepsin B, Cathepsin H and Cathepsin L." *Methods Enzymol*, 80, 535-561.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F., 1998. *Handbook of proteolytic enzymes.* 1st edition, London, Academic Press.
- Barrett, A., Rawlings, N., and Woessner, J., 2004. *Handbook of Proteolytic Enzymes* (A. Barrett, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) 2nd edition, London, Academic Press.

- Bautista Garfias, R., 2006. Entomología Veterinaria Esencial. INIFAP. p. 24-46.
- Boldbaatar, D., Sikalizyo S., C., Battsetseg, B., Xuan, X., Fujisaki, K., 2006. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. Insect. Biochem. Mol. Biol. 36, 25-36.
- Bozic, N., Vujcic, Z, Nenadovic, V, Ivanovic, J., 2003. Partial purification and characterization of midgut leucyl aminopeptidase of *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 134, 231-241.
- Brady, C.P., Dowd, A.J., Brindley, P.J., Ryan, T., Day, S.R., Dalton, J.P., 1999. "Recombinant expression and localization of *Schistosoma mansoni* cathepsin L1 support its role in the degradation of host hemoglobin". Infect Immun, 67, 368-374.
- Brownless, J., Williams, C., 1993. Peptidases, peptides and the mammalian blood-brain barrier. J. Neurochem. 60, 780-793.
- Caissie, R., Beaulieu, F., Giroux, M., Berthod, F., Landry, P.E., 2008. Cutaneous myiasis: diagnosis, treatment, and prevention. J Oral Maxillo fac Surg.; 65: 560-8.
- Caffrey, C., Mathieu, M., Gaffney, A., Salter, J., Sajid, M., Lucas, K., Frankin, C., Bogyo, M., McKerrow, J., 2000. Identification of a cDNA Encoding an active asparaginyl Endopeptidase of *Schistosoma mansoni* and Its Expression in *Pichia pastoris*. FEBS Lett, 466, 244-248.
- Caffrey, C., McKerrow, J., Salter, J., Sajid, M., 2004. Blood in guts: an update on *schistosome* digestive peptidases. Trends Parasitol. 20, 241-248.
- Caperucci, D., et col., 2010. Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1987 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. Micron 41, 710-721.
- Chen. J., Stevens. R., Barrett, A., 1997. Cloning Characterization of mouse Legumain. Mol. Biol. Cell. 8, 2616-2616.
- Coons, L.B., Alberti, G., 1999. The Acari-Ticks. In Microscopic Anatomy of Invertebrates. In: Harrison FW, Foelix R, editors. Chelicerata Arthropoda. Vol. 8B. Wiley-Liss; New York. 267-514.

- Coons, L.B., Rosell, D.E., Tarnowski, B.I., 1986. Bloodmeal digestion in ticks. En: Sauer J, eds. Morphology, physiology and behavioral biology of ticks. Chichester: Ellis Horwood, 248-71.
- Cutullé, C., Jonsson, N., Seddon, J., 2009. Population structure of Australian isolates of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet. Parasitol. 161, 283-291.
- Dalton, J., Hola-Jamriska, L., Brindley, P., 1995. Asparaginy endopeptidase activity in adult *Schistosoma mansoni*. Parasitol. 111, 575-580.
- Dalton, J., Brindley, P., 1996. Schistosoma asparaginy endopeptidase Sm32 in hemoglobin digestion. Parasitol. 12, 125.
- Dantas-Torres, F., 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) Acari Ixodidae): from taxonomy to control. Vet. Parasitol. 152, 173-85.
- Delacroix, M., Sajid, M., Caffrey, C., Lim, K., Dvorak, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C., McKerrow, J. 2006. A Multienzyme Network Functions in intestinal protein digestion by a plathelminth parasite. J. Biol. Chem. 281, 39316-39329.
- Dickinson, D.P., 2002. "Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease." Crit Rev Oral Biol Med, 13, 238-275.
- El Meanawy, M., Aji, T., Philips, N., Davis, R., Salata, R., Malhotra, I., McClain, D., Aikawa, M., Davis, A. 1990. Definition of the complete *Schistosoma mansoni* hemoglobinase mRNA sequence and gene expression in developing parasites. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 43, 67-68.
- Epidemiología y campaña sanitaria Garrapata *Boophilus microplus* MGAP., 1994.
- Errico, F., Nari, A., Cuore, U., Mendoza, R., Suarez, H., Mesa, P., Fernández, S., Sosa, E., Salada, E., Saporiti, D., 2008. Una nueva ley de lucha contra la garrapata *Boophilus microplus* en el Uruguay. Grupo técnico de garrapata.(MGAP/DIGESEGA),(<http://www.planagropecuario.org.uy>)
- Estrela, A., Seixas, A., Termignoni, C., 2010A cysteine endopeptidase from tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) larve with vitellin digestion activity. Comp. Biochem. Mol. Biol. 148, 410-416.

- Fagotto, F., 1990. Yolk degradation in tick eggs. I. Occurrence of a cathepsin 1-like acid proteinase in yolk spheres. *Arch Insect Biochem Physiol* 14: 217-235.
- Grandjean, O, and Aeschlimann, A 1973. Contribution to the study of digestion in ticks: histology and fine structure of the midgut epithelium of *Ornithodoros moubata*, Murray (Ixodoidea, Argasidae) *acta Trop.* 30, 193-212.
- Hagen S. J. A., Kopp A., 1999. Estudios de resistencia a acaricidas en la garrapata bovina *Boophilus microplus* en América Central. Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal. Puerto Vallarta, Jalisco. México, 33-35.
- Hall, M.J.R., Smith, K.G.V., 1993. Diptera causing myiasis in man. En: medical insects and arachnids. Lane RP, Crosskey RW, editors. London: Chapman y Hell, P., 429-69.
- Hatta, T., Kazama, K., Miyoshi, T., Umemiya, R., Liao, M., Inoue, N., Xuan, X., Tsuji, N., Fujisaki, K., 2006. Identification and characterization of a leucine aminopeptidase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Int. J. Parasitol.* 36, 1123-1132.
- Hatta, T., Tsuji, N., Miyoshi, T., Islam, M., Alim, A., Yamaji, A., Fujisaki, K., 2010. Leucine aminopeptidase, HILAP, from tick *Haemaphysalis longicornis*, plays vital roles in the development of oocytes. *Int. J. Parasitol.* 59, 286-289.
- Hoogstraal, H. and Aeschlimann, A., 1982. Tick-host specificity. *Bull. Soc. Entom. Suisse* 55, 5-32.
- Hoogstraal, H., Roberts, F.H.S., Kohls, G.M., Tipton, V.J., 1968. Review of *Haemaphysalis (Kaiseriana) longicornis* Neumann (resurrected) of Australia, New Zealand, New Caledonia, Fiji, Japan, Korea, and northeastern China and URSS, and its parthenogenetic and bisexual populations (Ixodoidea: Ixodidae). *J. Parasitol.* 54(6), 1197-1213.
- Hope, F.W., 1840. On insects and their larvae occasionally found in the human body. *Trans R Entomol Soc London.* 2, 256- 71.
- Horn, M., Nussbaumerová, M., Sanda, M., Kovárová, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C.R., Kopáček, P., Mares, M., 2009. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chem. Biol. Mol.* 16, 1053 -1063.

- Ibrahim, M., 1998. Traffic of the tick embryo basic protein during embryogenesis of the camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 22, 481-495.
- Ishii, S., 1994. Legumain: asparaginyl endopeptidase. *Methods in Enzymology*, 244, 604-625.
- Kerlin, R., Hughes, S., 1992. Enzymes in saliva from four parasitic arthropods. *Med. Vet. Entomol.* 6, 121-126.
- Kumar S., Paul, A., Sharma, K., Kumar, R., Tewari, S.S., Chaudhuri, P., Ray, D.D., Ranvet, A.K., and Ghosh, S., 2011. Diazinon resistant status in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from different agro-climatic regions of India. *Vet. Parasitol.* 181, 274-281.
- Lara, F.A., Lins, U., Bechara, G.H., Oliveira, P.L., 2005. Tracing heme in a living hemoglobin degradation and heme traffic in digest cell of the cattle tick *Boophilus microplus*. *I. Exp. Biol.* 208, 3093-3101.
- Lindsay R, Stancil J, Ray J.M., 2010. Myiasis of facial wounds by *Cochliomyia hominivorax* sustained in a natural disaster in Haití. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 143, 596-6.
- Liu, X., McCarron, R., Nordin, J., 1996. A cysteine protease that processes insect vitellin. Purification and partial characterization of the enzyme and the proenzyme. *The Journal of Biol. Chem.* 271, 33344-33351.
- López, G., 1980. *Claves para identificación de garrapatas*. Control de Garrapatas: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). J.A., Ed., 171 p.
- Madder, M.E., Thys, D., Geysen, D., Baudoux, J., and Horak, C., 2007. *Boophilus microplus* ticks found in West Africa. *Exp. Appl. Acarol.* 43, 233-234.
- McCarthy, E., Stack, C., Donnelly, S., Doyle, S., Mann, V., Brindley, P., Stewart, M., Day, T., Maule, A., Dalton, J., 2004. Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Int. J. Parasitol.* 34, 703-714.
- Mendiola, J., Alonso, M., Marquetti, M.C., Finaly, C., 1996. *Boophilus microplus*: multiple proteolytic activities in the midgut. *Exp. Parasitol.* 82, 27-33.
- Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M.K., Kamio, T., Fujisaki, K., 2004b. Cloning and molecular characterization of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 34, 799-808.

- Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M.K., Huang, X., Motobu, M., Alim, M.A., Fujisaki, K., 2007. Molecular and reverse genetic characterization of serine proteinase-induced haemolysis in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *J. Insect Physiol.* 53, 195-203.
- Newton, S., Munn, E., 1999. The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Today* 15, 116-122.
- Nuñez, L.J., Muñoz, C.M., Moltedo, I.H., 1987. *Boophilus microplus*: la garrapata común del ganado vacuno. Primera reimpression corregida y actualizada con apéndices, Ed. Hemisferio Sur S.A. Buenos aires, Argentina, 184 páginas.
- Nuttall, P.A., Trimnell, A.R., Kazimirova, M., and Labuda, M., 2006. Antitick vaccines I: Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*, 28, 155-163.
- Nisbet, A and Billingsley, P. 2002. Characterisation of aminopeptidase activity in scab mites (*Psoroptes* spp.) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1123-1131.
- Odongo, D., Kamau, L., Skilton, R., Mwaura, S., Nitsch, C., Musoke, A., Taracha, E., Daubenberger, C., Bishop, R., 2007. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. *Vaccine*. Jan 26; 25(7), 1287-96.
- Okuda, K., Caroci, A., Ribolla, P., Marinotti, O., de Bianchi, A., Bijovsky, A., 2005. Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. *J. Insect. Physiol.* 51, 769-776.
- Oliver, E., Skuce, P., McNair, C., Knox, D., 2006. Identification and characterization of an asparaginyl proteinase (Legumain) from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *parasitol.* 133, 237-244.
- Pal, R. and Wharton, R.H., 1974. Control of Arthropods of Medical and Veterinary Importance. Plenum Press, New York.
- Parra, M.H., Peláez, S.L., Segura, C.F., Arcos, J.C., Londoño, A., Díaz, E., Vanegas, M.A., 1999. Manejo integrado de garrapatas en bovinos. Serie modular para la capacitación en tecnologías agropecuarias, Corporación Colombiana de Investigación agropecuaria 2,72-77.

- Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, I., Dalton, J., Carmona, C., 1999. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect. Immun.* 67, 1954-1961.
- Raikhel, A.S., 1974. An electron microscopic study endocytosis in the midgut cells of the tick *Hyalomma asiaticum*. *Tsitologiya* 16, 1499- 1509.
- Raikhel, A.S., 1975. An electron microscopic study of intracellular digestion in midgut cells of the tick *Hyalomma asiaticum*. I. The formation of primary and secondary lysosomes. *Tsitologiya* 17, 748-753.
- Raikhel, A.S., 1978. An electron microscopic study of intracellular digestion in midgut cells of the tick *Hyalomma asiaticum*. II. Formation of residual bodies. *Tsitologiya* 22, 142-146.
- Rawlings, N.D., and Barrett, A.J., 1993. "Evolutionary families of peptidases". *Biochem. J.*, 290, 205-18.
- Rawlings, N., and Barrett A., 1995. "Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism". *Methods in Enzymology*, 248, 105 -120.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., and Barrett, A.J., 2006. *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, 34, 270-272.
- Reed, B., Chandler, D, Sandeman, R., 1999. Aminopeptidases potential targets for the control of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Int. J. Parasitol.* 29, 839-850.
- Renard, G., García, J.F., Cardozo, F.C., Richter, M.F., Sakanari, J.A., Ozaki, L.S., Termignoni, C., Masuda, A., 2000. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 30, 1017-1026.
- Renard, G., Lara, F., Cardoso, F., Miguens, F., Dansa-Petretski, M., Termignoni, C., Masuda, A., 2002. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Mol. Biol.* 11, 325-328.
- Rodríguez, M., Penichet, M.L., Mouris, A.E., Labarta, V., Luaces, L.L., Rubiera, R., Cordovés, C., Sánchez, P.A., Ramos, E., Soto, A., 1995. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet Parasitol.* 57(4), 339-49.
- Sajid, M., McKerrow, J., 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol.* 120, 1-21.

- Schechter, I., and Berger, A., 1967. "On the size of the active site in proteases. I. Papain", *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 27, 157-62.
- Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdusek, O., Caffrey, C.R., Mares, M., Kopáček, P., 2008. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasite Vectors*. 1(1), 7.
- Sojka, D., Hajdusek, O., Dvorak, J., Sajid, M., Franta, Z., Schneider, E.L., Craik, C.S., Vancova, M., Buresova, V., Bogyo, M., Sexton, K.B., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., Kopacek, P., 2007. IrAE-An asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 37, 713-724.
- Solari, M.A., Nari, A., Cardozo, H., 1992. *Babesia bigemina* on the production of beef cattle in Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Suppl* 3, 143-9. Impact of *Babesia bovis*.
- Solari, M.A., 2006. Epidemiología y perspectivas en el control de hemoparásitos. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú.
- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of the Tick*. vol. 1. Oxford University Press; New York.
- Sossai, S., Peconick, A.P., Sales-Junior, P.A., Marcelino, F.C., Vargas, M.I., Neves, E.S., Patarroyo, J.H., 2005. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.*; 37(3-4), 199-214.
- Soulsby, E.J.L., 1988. *Parasitología y enfermedades de los animales domésticos*. 7a edición. Nueva Editorial Interamericana. 823 pág.
- Taylor, A., 1993. Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J.* 7, 290-298.
- The International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD) 2004 a. Ticks of veterinary and medical importance: Africa, (<http://www.icttd.nl>).
- The International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD) 2004 b. Ticks of veterinary and medical importance: Latin America. (<http://www.icttd.nl>).
- Tort, J., Brindley, P.J., Knox, D., Wolfe, K.H., Dalton, J.P., 1999. "Proteinases and associated genes of parasitic helminthes." *Adv. Parasitol*, 43, 161-266.
- Tsuji, N., Miyoshi, T., Battsetseg, B., Matsuo, T., Xuan, X., Fujisaki, K. A., 2008. Cysteine protease is critical for *Babesia spp.* transmission in *Haemaphysalis* ticks. *PLoS Pathog.* 4(5):e1000062. doi: 10.1371/journal.ppat.1000062.

- Turk, D., and Guncar, G., 2003. "Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets". *Acta Crystallogr.D. Biol. Crystallogr.*, 59, 203-13.
- Valle, M.R., Mèndez, L., Valdez, M., Redondo, M., Espinosa, C.M., Vargas, M., Cruz, R.L., Barrios, H.P., Seoane, G., Ramirez, E.S., Boue, O., Vigil, J.L., Machado, H., Nordelo, C.B., Piñeiro, M.J., 2004. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac. *Exp Appl Acarol*, 34 (3-4), 375-82.
- Von, K., Hasilik, A., 1985. "Lysosomal enzymes and their receptors." *J Cell Biol*, 101, 2253-2262.
- Walker, A.R., Bouattour, A., Camicas, J.L., Estrada-Pena, Horak, I.G., Latif, A.A., .Pegram, R.G, and Prestan, P.M., 2003. Ticks of Domestic Animals in Africa: A guide to identification of species. Bioscience Reports, Edinburgh, Scotland, UK.
- Willadsen, P., Bird, P., Cobon, G.S., Hungerford, J.,1995. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 110 Suppl: S43-50.
- Willadsen, P., Riding, G.A., McKenna, R.V., Kemp, D.H., Tellam, R.L., Nielsen, J.N., Lahnstein, J., Cobon, G.S., Gough, J.M., 1989 .Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J. Immunol.* 15, 143(4), 1346-51.
- Yamaji, K., Tsuji, N., Miyoshi, T., Islam, M., Hatta, T., Alim, M., Anisuzzaman., Takenaka, A., Fujisaki, K., 2009. Hemoglobinase activity of a cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Int. J. Parasitol* 58, 232-237.

9. ANEXO

Tabla 1: Curva de calibración de BSA para determinación de proteínas en extractos de *R. microplus*.

Curva de calibración BSA			
[BSA]	Abs 1	Ab 2	Abs Promedio
1	0.536	0.536	0.536
0.8	0.431	0.433	0.432
0.6	0.36	0.358	0.359
0.5	0.21	0.21	0.21
0.25	0.138	0.138	0.138
0.1	0.112	0.107	0.1095
Abs promedio vs [BSA]			Abs Promedio = 0.4937[BSA] + 0.0434; R ² = 0.9889

Tabla 2: Concentración de proteínas para los extractos de tubos de Malpighi (MA), intestine (IN), ovaries (OV) y huevos (H) de *R. microplus*. Las diluciones realizadas se muestran ().

Muestra	Abs 1	Abs2	Abs 1 -B	Abs 2 - B	Promedio	Desvio	[proteínas]mg/mL	[proteínas] *dil	Promedio
MA	1.145	1.087	1.062	1.004	1.033	0.041	2.003		
MA 1/10	0.294	0.283	0.211	0.200	0.205	0.008	0.327	3.273	3.27
IN 1/10	1.630	1.615	1.547	1.532	1.539	0.011	3.029		
IN 1/20	0.916	0.921	0.833	0.838	0.835	0.004	1.603		
IN 1/40	0.524	0.511	0.441	0.428	0.434	0.009	0.791	31.647	29.81
IN 1/80	0.297	0.302	0.214	0.219	0.216	0.004	0.350	27.968	
OV 1/10	0.870	0.860	0.787	0.777	0.782	0.007	1.495		
OV 1/20	0.470	0.483	0.387	0.400	0.393	0.009	0.708	14.162	13.34
OV 1/40	0.281	0.282	0.198	0.199	0.198	0.001	0.313	12.526	
OV 1/80	0.173	0.170	0.090	0.087	0.088	0.002	0.090		
H 1/10	2.538	2.484	2.455	2.401	2.428	0.038	4.829		
H1/20	2.370	2.438	2.287	2.355	2.321	0.048	4.612		
H1/40	1.339	1.341	1.256	1.258	1.257	0.001	2.457		
H 1/80	0.827	0.909	0.744	0.826	0.785	0.058	1.501	120.089	120.09

Tabla 3: curva de calibración de BSA para determinación de proteínas en muestras de sangre bovina.

Curva de calibración BSA			
[BSA]	Abs1	Abs2	Abs promedio
0.1	0.41	0.394	0.402
0.25	0.836	0.81	0.823
0.5	12.447	13.005	12.726
0.6	14.379	13.685	14.032
0.8	15.533	16.842	16.1875
1	19.975	19.633	19.804
Abs promedio vs [BSA]			Abs Promedio = 23.358x[BSA] -1.99; R ² = 0.92

Tabla 4: Concentración de proteínas para muestra de sangre bovina (dilución de las muestras: 1/50, 1/100, 1/200).

Muestra	Abs 1	Abs 2	Abs promedio	Abs promedio-B	[proteínas] mg/mL	[proteínas] mg/mL x dil.	[proteínas] mg/mL
plasma 1/50	0.904	0.95	0.767	0.684	0.114	5.7	8.1
plasma 1/100	0.66	0.63	0.541	0.458	0.105	10.5	
plasma 1/200	0.391	0.423	6.533	6.45	0.361
células 1/50	11.926	12.675	6.362	6.279	0.354	17.7	19
células 1/100	0.792	0.798	0.683	0.6	0.111	
células 1/200	0.563	0.575	0.491	0.407	0.103	20.06	
coágulo 1/50	0.39	0.419	0.36	0.277
coágulo 1/100	0.31	0.33	0.278	0.195
coágulo 1/200	0.249	0.246	0.925	0.842	0.121	20	20
suero 1/50	15.974	1.601	8.45	8.366	0.443	22.15	23
suero 1/100	0.987	0.925	0.786	0.703	0.115	
suero 1/200	0.817	0.586	0.817	0.733	0.117	23.4	

