

AAQ 8639

TESIS
ED 2007
S3

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA
SOBRE HEMOGLOBINA DE LA FRACCIÓN CITOSÓLICA DE *Ascaris***

suum

Trabajo especial de grado para optar al título de
Licenciado en Educación mención Biología y Química

Thais Salazar

Tutor: Prof. Zadila Suárez PhD.

Caracas, febrero de 2007

Aprobación del Tutor

En mi carácter de tutor del Trabajo Especial de Grado titulado: Caracterización bioquímica de la actividad hidrolítica sobre hemoglobina de la fracción citosólica de *Ascaris suum*, realizado por la Br. Thais Salazar para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del jurado examinador designado.

En Caracas, a los 08 días del mes de febrero de 2007



Prof. Zadila Suárez Ph. D

C.I. V-2 981 141

A mis Padres.

Agradecimientos

A los estudiantes y profesionales que forman parte del laboratorio de bioquímica de la Universidad Simón Bolívar.

A mis profesores y compañeros de clases de la UCAB, con su apoyo muchas cosas son posibles.

En especial, a la Prof. Zadila Suárez, más que una tutoría este trabajo significa un proceso de aprendizaje en lo personal y en lo académico.

Índice de Contenido

	Pág.
Resumen.....	9
I. Introducción.....	10
II. Problema.....	19
III. Justificación.....	20
IV. Objetivos de la Investigación	21
V. Metodología.....	22
VI. Técnicas e Instrumentos.....	24
VII. Resultados y Discusión	28
VIII. Análisis	46
VIII. Conclusiones.....	49
IX. Referencias	51

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Fraccionamiento de la fracción citosólica en DEAE-celulosa.	29
Tabla 2. Purificación parcial de la actividad hidrolítica presente en el pico 3 de DEAE.....	31
Tabla 3. Purificación parcial del pico 3A de DEAE en Matrex Blue.....	33
Tabla 4. Determinación del pH óptimo para la actividad hidrolítica presente en el pico 3B de DEAE.....	35
Tabla 5. Determinación de la temperatura óptima para la actividad proteolítica presente en el pico 3B DEAE.....	37
Tabla 6. Especificidad de sustrato del pico 2 MB.....	40
Tabla 7. Especificidad de sustrato del pico 2 MB proveniente de 3A DEAE	41
Tabla 8. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica del pico 2 MB sobre Hb bovina.....	44

Índice de Gráficos

Pág.

Gráfico 1. Curva de calibración para determinación de concentración de proteínas. .27	27
Gráfico 2. Perfil de elución de las proteínas y de la actividad hidrolítica sobre Hb de las fracciones aisladas de la columna de DEAE celulosa.....28	28
Gráfico 3. Determinación de la actividad sobre Hemoglobina bovina a pH 7,5 de los diferentes picos eluidos de DEAE.....30	30
Gráfico 4. Patrón de elución de proteínas de Matrex Blue por el método de Bradford.31	31
Gráfico 5. Determinación del pH óptimo para la actividad hidrolítica presente en el pico 3B DEAE.....36	36
Gráfico 6. Dependencia de la actividad hidrolítica del pico 3 de la temperatura.37	37
Gráfico 7. Cromatografía en Sephadex G-75 del pico 3 de DEAE.....38	38
Gráfico 8. Parámetros moleculares para cromatografía en Sephadex G-75.....38	38
Gráfico 9. Especificidad de sustrato del pico 2 Matrex Blue.....40	40
Gráfico 10. Especificidad de sustrato del pico 2 Matrex Blue.....41	41

Índice de Figuras

Pág.

Figura 1. Representación del ciclo de vida de <i>Ascaris</i>	17
Figura 2. Electroforesis en geles de poliacrilanida al 13,5% de los picos de DEAE.....	30
Figura 3. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 13,5% de las fracciones aisladas de Matrex Blue proveniente del Pico 3 DEAE	32
Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 13,5% de las fracciones aisladas de Matrex Blue	34
Figura 5. Hidrólisis de la hemoglobina por el pico 2MB.....	43

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
ESCUELA DE EDUCACIÓN
Trabajo especial de grado en Educación
Mención Biología y Química

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA SOBRE
HEMOGLOBINA DE LA FRACCIÓN CITOSÓLICA DE *Ascaris suum*

Autor: Thais Salazar
Tutor: Prof. Zadila Suárez Ph. D
Febrero 2007

Resumen

En el trabajo se describen las principales características bioquímicas de una proteasa aislada de la fracción citosólica de *Ascaris suum* con actividad hidrolítica sobre hemoglobina. Cromatografía de exclusión molecular y SDS-PAGE indican que la proteasa esta constituida por una sola subunidad de masa molecular relativa de 43 kDa.

La actividad hidrolítica fue purificada parcialmente usando cromatografías en DEAE y Matrex Blue, logrando purificar 21 veces la banda responsable de la actividad hidrolítica. La proteasa presentó la mayor actividad a pH 7,5 y la temperatura óptima de hidrólisis sobre Hb correspondió a 30°C.

Se reporta para esta experiencia que el pico 2 MB, contienen bandas de dos proteasas. La actividad hidrolítica sobre hemoglobina, y otros sustratos parece estar relacionada a la banda de 43 kDa, debido que el inhibidor EGTA no tiene efecto sobre la actividad de esta preparación parcialmente purificada. Los estudios de inhibición indican que la actividad proteolítica presente en la preparación es inhibida por pepstatina, inhibidor específico de aspartato proteasas.

Análogamente, el gel de degradación y los estudios de actividad enzimática indican que la banda de 43 kDa pertenece al grupo de la cistein-proteasas.

Palabras claves: *Ascaris suum*, cistein-proteasas, caracterización bioquímica.

I.Introducción

El recambio de proteínas es un proceso importante en los organismos vivos. Las proteínas que han cumplido con su función pueden ser degradadas en sus aminoácidos constituyentes, los cuales a su vez pueden ser utilizados en la síntesis de nuevas proteínas. Gran parte de la degradación es llevada a cabo por las proteasas mediante una reacción hidrolítica que consiste en la adición de una molécula de agua en la recurrente ruptura del enlace peptídico.

En general la degradación de proteínas cumple varias funciones dentro de la célula: protectora, por remover péptidos que son dañinos para la célula, regulatoria, por controlar la concentración de enzimas ó proteínas regulatorias, y metabólica, a través de la liberación de aminoácidos que pueden ser utilizados para otros propósitos.

Clasificación de las Proteasas

Basándose en los conocimientos actuales sobre el sitio activo y la secuencia primaria, las proteasas se dividen en cuatro importantes grupos; las serin-proteasas, las metaloproteasas, las cistein-proteasas y las aspartato-proteasas según lo descrito por McKerrow y Doenhoff (1988).

El grupo serin-proteasas se caracteriza por tener en el sitio activo el aminoácido (aa) serina, requerido para la unión del sustrato. Otro elemento importante es la presencia de un grupo catalítico que incluye histidina y ácido aspártico como han señalado Stryer, Berg y Tymoczko (2002). Ejemplos claros de este grupo “son los factores de complemento y coagulación, además de las enzimas digestivas Tripsina y Quimiotripsina”. Específicamente desde 1967 es conocido que Quimiotripsina actúa con un mecanismo de dos pasos para realizar la hidrólisis. La primera etapa es un ataque nucleofílico y la segunda etapa, comprende la formación de un intermediario tetrahédrico, acil- enzima.

El segundo grupo conformado por las metaloproteasas, “requieren de un ión metálico que, por lo general, posee la proteína” y éste se encuentra en el sitio activo. El mecanismo es activado por una molécula de agua, que se comporta como un nucleófilo y ataca a un grupo carbonilo del péptido. Ejemplos de metaloproteasas incluyen a las colagenasas de los vertebrados, las carboxipeptidasas y las aminopeptidasas. Stryer y col (2002) han descrito este grupo como el de mayor tamaño de las enzimas hidrolíticas.

El grupo de las cistein-proteasas, es homólogo a las serin- proteasas, se diferencian en cuanto al residuo que se encuentra en el sitio activo, éste es un grupo que posee el aa cisteína según lo descrito por McKerrow y Doenhoff (1988). El mecanismo de hidrólisis que usan estas proteasas es similar en comparación con el grupo serin, “el residuo de cisteína es activado por el residuo de histidina, que juega un papel en el

ataque nucleofílico al enlace peptídico”. Ejemplos de esta familia son la papaina, algunas catepsinas de los lisosomas, las calpains y las caspasas.

El último grupo, de las proteasas descritas, son las aspartato proteasas, “la principal característica de este es que el sitio activo posee dos residuos de ácido aspártico, que actúan juntos para permitir la hidrólisis de la molécula”. Un ejemplo de esta es la renina, cuya función es regular la presión arterial.

Familias de cistein-proteasas

Barrett y Rawlings (1994) describieron 21 familias de proteasas que pertenecen al grupo de las cistein, haciendo distinción de la familia Hemoglobinas (denominada C13) específicamente para *Schistosoma mansoni*. Indicando que esta familia tiene la particularidad de reaccionar más rápido en presencia de ácido iodoacético. Los autores aclaran la existencia de dos proteasas localizadas en el tracto digestivo del parásito, la primera es una catepsina B que pertenece a la familia papaina (C1), mientras que la segunda que tiene poca homología con la papaina y presenta una baja tasa de hidrólisis sobre el sustrato pero es reconocida por α_2 -macroglobulina.

Purificación y caracterización bioquímica de proteasas de *Schistosoma mansoni* y *Dirofilaria immitis*

En el reporte publicado por Dresden y Deelder (1979) muestran evidencias sobre una proteasa con grupo tiol en el parásito *S. mansoni*, semejante en cuanto a susceptibilidad de inhibición y afinidad por los compuestos organomercuriales a la catepsina B. La muestra empleada para estos estudios fue obtenida de 45 ratones infectados con 1500 cercarias. Luego de 45 días los gusanos fueron extraídos y posteriormente liofilizados. Cromatografías en ACA 54 y en Sepharosa (con ácido aminofenilmercurio) permitieron purificar la proteasa con un 90 % de recuperación.

Estudios del efecto de diferentes reactivos como azufre, 2- mercaptoetanol y ditiotreitól sobre la actividad hidrolítica usando azocoll como sustrato, confirmaron que la proteasa pertenecía al grupo de la cistein-proteasas. Ambos investigadores lograron probar que los dos compuestos, con grupos sulfidrilos, estimulaban la actividad proteolítica. Además, corroboraron que la cisteína produjo un efecto de estimulación equivalente a DTE y este último agente fue responsable de un cambio en la densidad óptica (a 540 nm) cercano a 0,7 unidades.

Los estudios de inhibición, realizados para caracterizar la proteasa, demostraron que la mayor inhibición fue obtenida con leupeptina, seguido de dibromoacetofenona y tosil-lisina-clorometilcetona, mientras los inhibidores específicos de serin-

proteasas, aspartato proteasas y metaloproteasas no lograron afectar las fracciones activas.

Linquist, Senf, y McKerrow (1986) lograron purificar y caracterizar una proteasa acídica del grupo de las cistein- proteasas de adultos de *S. mansoni*. La enzima fue purificada 300 veces usando cromatografías subsecuentes, en ACA 54 y en una columna de cromatoenfoque.

La enzima purificada con un pH optimo de 5 fue activada por reactivos protectores de residuos sulfidrílicos, y mostró una Km para hemoglobina de 0, 29 μ M y una actividad específica de 27 μ g degradados/min/mg de enzima a 37 °C.

Según los datos reportados por Linquist y col (1986), leupeptina mostró la mayor efectividad de inhibición sobre la enzima así como los derivados de clorometilcetona, péptido similar en secuencia a la leupeptina.

Estudios descritos por Sato, Nagai y Suzuki (1993), en otro parásito, reportaron la presencia de una proteasa acídica que degrada hemoglobina, específicamente, en *Dirofilaria immitis*, agente infeccioso de perros y gatos.

La muestra fue obtenida de las arterias pulmonares de perros infectados. Los gusanos fueron liofilizados y almacenados a -20 °C. En el proceso de purificación fueron utilizadas cromatografías en Sephadex G-75 y en Pepstatina agarosa, siendo

las fracciones activas recromatografiadas en ambos pasos. Con este procedimiento se logró purificar 437 veces la actividad hidrolítica.

Entre las características bioquímicas, el peso molecular reportado por SDS-PAGE fue de 42 kDa. El punto isoelectrico de la proteasa purificada osciló entre 5,8 y 6,4; y los análisis de la composición de aminoácidos revelaron cierta analogía con la catepsina D. El pH óptimo estuvo comprendido en el intervalo de 2,5 a 3,8.

Los estudios de especificidad de sustrato indicaron que la velocidad de hidrólisis relativa fue significativa con sustratos como Hb bovina (57,8 %) y albúmina de suero bovino (38,4 %) tomando como referencia la velocidad de hidrólisis (100 %) con Hb humana.

Por último, el inhibidor más eficaz para la proteasa purificada fue la pepstatina, resultando sin efecto otros compuestos como EDTA, ácido iodoacético, clorometil cetonas y leupeptina.

Papel fisiológico de la proteasa de *Schistosoma mansoni*

Los adultos de *Schistosoma mansoni* ganan nutrientes por la digestión intracelular de hemoglobina (Hb) que obtienen al ingerir los eritrocitos del hospedador. Esta degradación es el mecanismo mediante el cual los *Schistosomas* adquieren los aminoácidos necesarios para su crecimiento y desarrollo. La degradación de Hb por

proteasas dependientes de cisteína ha sido demostrada en adultos de este parásito helminto por Dresden, Ruthedge y Chappel (1981). Posteriormente, Wasilewski, Lim, Phillips y McKerrow (1996) describieron que los inhibidores peptidil fluorometil cetonas y peptidil acil metil cetonas, específicos de las cistein-proteasas, lograron bloquear la degradación de hemoglobina *in vitro* en *Schistosoma mansoni* y la producción de huevos por la hembra, debido a la carencia de los grupos hemo. Como consecuencia, la inhibición de la degradación después de una semana produjo la muerte de la larva migratoria al hospedador definitivo. Estos resultados indican que inhibidores específicos de cistein-proteasas son candidatos para la quimioterapia de las infecciones producidas en helmintos.

Ascaris suum

Ascaris es un helminto parásito del hombre y del cerdo, básicamente se conoce que su ciclo de vida es directo y se divide en dos fases, la fase pre-parasitaria y la fase parasitaria. Fontera (2002) ha descrito que en una etapa inicial las hembras de *Ascaris* depositan los huevos inmaduros en el intestino delgado, estos salen con las heces de los cerdos y se dispersan en el medio exterior. Los huevos en el suelo llegan a ser infectantes a las 3 o 4 semanas, las larvas raramente eclosionan (2 en la figura 1) y normalmente la infección se realiza después de la ingestión de alimentos que poseen los huevos, en esta fase pueden contagiar tanto a cerdos como a humanos.

La segunda etapa, la fase parasitaria se da después de la ingestión y la eclosión de los huevos en el intestino delgado. Las larvas que emergen de los mismos realizan la primera muda (de cutícula) y penetran la pared intestinal continuando con una migración tisular.

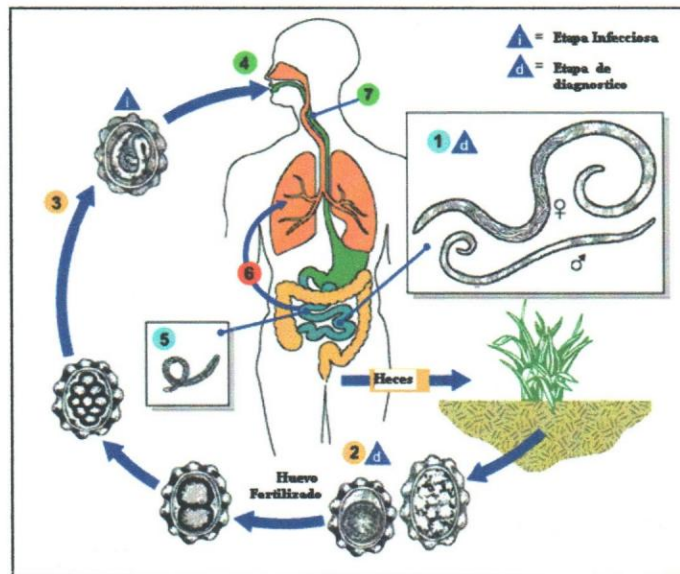


Figura 1. Representación del ciclo de vida de *Ascaris*

La mayoría de las larvas toman la vía del sistema porta-hepático y el hígado, este órgano lo pueden alcanzar 24 horas después. Del hígado pasan vía sanguínea al corazón para alcanzar el tejido pulmonar en un período que puede variar entre los 5 o 6 días. Las larvas emergen de los tubos capilares, alveolares y emigran del árbol bronquial hacia la faringe, vía por la cual son deglutidos y llegan al intestino, donde alcanzan el estadio adulto.

Degradación de Hemoglobina en *Ascaris*

Estudios preliminares realizados en el Laboratorio de Bioquímica de Parásitos de la Universidad Simón Bolívar, indican la presencia de una actividad hidrolítica sobre la hemoglobina en la fracción citosólica del músculo de *Ascaris suum*.

En *Ascaris suum* se han descrito dos hemoglobinas diferentes a la del hospedador, la de fluido parentérico y la de pared corporal que se encuentra embebida en el músculo del parásito. La estructura de la hemoglobina de fluido parentérico fue descrita por Okasaki y Witterberberg (1965).

Con respecto a su función, la hemoglobina del fluido parentérico de *Ascaris* cataliza la reacción del NO (óxido nítrico) con el O₂ unido al hemo para producir nitrato. Así puede actuar como un detoxificante del O₂ usando el NO endógeno como un co-sustrato, proceso que se conoce desde la publicación de Minning, Gow, Bonaventura, Braun, Dewhirst, Golberg y Stamler (1999). El mecanismo está descrito en una serie de 10 pasos que conlleva a la formación de nitritos, como una forma de manejar el oxígeno molecular.

II. Problema

En *Ascaris suum* también existen proteasas que degradan hemoglobina y es el conocimiento de algunas características bioquímicas, como la determinación de la temperatura y pH óptimo, estudios de especificidad de sustrato e inhibidores, lo que contribuirá a asignarle un posible papel fisiológico a estas proteasas.

Además, como ha sido descrito, hasta el presente no se ha otorgado ninguna función específica de la hemoglobina de pared corporal de *Ascaris suum* presente en el músculo, proteína capaz de difundirse a la fracción citosólica. Estudios realizados por Sanchez (1992) mostraron que la Hb de pared está constituida por dos subunidades idénticas de 17 kDa.

Por lo anterior, se propuso purificar parcialmente estas proteasas de la fracción citosólica del músculo del parásito para caracterizarlas bioquímicamente. La caracterización bioquímica de estas proteasas pretendió contribuir a determinar cual es el papel de la misma en el metabolismo de *Ascaris*, a través de los estudios de especificidad de sustrato utilizando caseína, mioglobina, hemoglobina bovina, hemoglobina de *Ascaris* en conjunto con los estudios de inhibición específicos para proteasas ácidas y cistein-proteasas.

III. Justificación

Como la actividad hidrolítica sobre hemoglobina de fracción citosólica del músculo de *Ascaris* fue fuertemente estimulada por cisteína, y las cistein-proteasas han sido utilizadas como blanco en el diseño de drogas para controlar infecciones parasitarias (McKerrow y Sajid 2002), la caracterización bioquímica de la proteasa de esta fracción que degrada hemoglobina, puede contribuir al diseño racional de drogas para el tratamiento de la infecciones producidas por helmintos. Adicionalmente, estos estudios contribuirán a esclarecer la posible función nutricional de la hemoglobina de pared corporal de *Ascaris suum*.

IV. Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Caracterizar bioquímicamente la actividad hidrolítica sobre hemoglobina de la fracción citosólica del músculo de *Ascaris suum*.

Objetivos específicos

- Purificar parcialmente la actividad hidrolítica sobre hemoglobina de la fracción citosólica por cromatografías subsecuentes en DEAE-celulosa y Matrex Blue.
- Determinar el pH y la temperatura óptima de la actividad hidrolítica aislada de DEAE celulosa.
- Determinar el peso molecular de la proteína nativa por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-75.
- Determinar la actividad hidrolítica de la fracción activa de DEAE sobre: Hb bovina, Hb de la pared corporal de *Ascaris*, mioglobina, caseína y albúmina de suero bovino (BSA).
- Observar la degradación de la hemoglobina por la proteasa mediante SDS-PAGE.

V. Metodología

Nivel de la Investigación

La caracterización bioquímica de la actividad hidrolítica que degrada hemoglobina en *Ascaris* variedad *suum* es un estudio exploratorio y descriptivo. Es exploratorio, porque hasta el momento para este helminto, son escasos los conocimientos de las proteasas que degradan hemoglobina, y es descriptivo porque a través de los estudios de especificidad de sustrato, determinación de peso molecular y las condiciones óptimas para la actividad proteolítica, se definen las características bioquímicas principales de las proteasas presentes en la fracción citosólica.

Diseño de la Investigación

El estudio es experimental porque se aisló parte de la actividad hidrolítica sobre hemoglobina presente en fracción citosólica, y se determinaron las condiciones óptimas de pH, temperatura, sustratos e inhibidores de esta actividad.

Población de Estudio

Se tomó como población los *Ascaris*, hembras y machos, que son extraídos del intestino delgado de los cerdos del Matadero Caracas, ubicado en la carretera vieja de

Los Teques, estado Miranda y trasladados al Laboratorio de Bioquímica de Parásitos de la Universidad Simón Bolívar.

Muestra

La muestra de partida estuvo comprendida por los machos y hembras que presentaron las mejores condiciones durante su procesamiento, es decir, gusanos adultos (de mayor tamaño) y sanos, con forma cilíndrica y color rosa. Posterior a la selección, fue obtenida la fracción citosólica aislada de músculo de *Ascaris* variedad *suum* mediante centrifugación diferencial propuesta por Saz y Lescure (1968) a partir de 40 gramos de gusanos.

El procedimiento consistió en la disección del músculo frío de *Ascaris*, el cual fue separado y luego distribuido en porciones de 5 gramos (gr). Una vez reducido el músculo en trocitos muy pequeños con una tijera, fueron homogenizadas las porciones con 35 ml de medio mitocondrial, este último, conformado por sacarosa al 0,24 M, EDTA a 0,005 M y BSA 0,15 %, efectuando el proceso a bajas temperaturas hasta obtener una solución homogénea, libre de partículas. Se realizó una primera centrifugación de 1000 rpm en un rotor SS- 34 Sorvall (2500 xg) durante 10 minutos. Seguidamente, el sobrenadante fue filtrado en lana de vidrio y centrifugado nuevamente a 8.500 rpm (21600 xg) en el mismo rotor durante 30 min, obteniendo así la fracción citosólica libre de mitocondrias, ya que las mismas precipitan a esta velocidad.

VI. Técnicas e Instrumentos

Cromatografía de Intercambio y Afinidad

Las proteasas presentes en la fracción citosólica del músculo de *Ascaris* fueron fraccionadas por cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-celulosa. Las fracciones activas eluidas de esta columna con buffer Tris/HCl 25 mM pH 7,5; 2-Mercaptoetanol 5 mM 0,15 M NaCl, capaces de degradar hemoglobina, fueron caracterizadas y sometidas a otros procedimientos de fraccionamiento para la eliminación de proteínas contaminantes. Para lograrlo, se empleó cromatografía de afinidad en Matrex Blue para la purificación de esta actividad, basándose en las interacciones de la unión de la proteína a un ligando.

Ensayos de actividad enzimática

La actividad proteolítica fue medida con hemoglobina (Hb) comercial (SIGMA) y con caseína desnaturalizada con NaOH según el procedimiento de Osman (2003). La mezcla de ensayo contenía en un volumen final de 1 ml : 0,2 ml de la proteína sustrato (2 mg), 0,2 ml de buffer Tris-HCl 25 mM pH 7,5 ó 0,2 ml de Buffer acetato 0,2 M pH 4,0 para hemoglobina, y buffer acetato 0,2 M pH 4,5 para caseína. La reacción se inició con la adición de 0,1-0,2 ml de la preparación enzimática (volumen variable según su procedencia : 0,1 ml de fracción citosólica o 0,2 ml de las fracciones obtenidas por cromatografía); y detenida después de 1 hora de incubación

a 37° C con ácido tricloacético (TCA) al 12,5%. La mezcla fue centrifugada a 3000 xg por 20 min. La absorbancia a 280 del sobrenadante fue medida contra un control tratado de la misma manera, al cual se le añadió el TCA antes de adicionar la enzima.

Para los estudios de inhibición se empleó la misma metodología, excepto que la preparación de enzima fue pre-incubada con los inhibidores, pepstatina, E-64 y Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) antes de añadirla al ensayo.

Se definió una unidad catalítica como la cantidad de enzima que cataliza un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm en 60 minutos bajo las condiciones de ensayo descritas.

Estudios de actividad enzimática y especificidad de sustrato

Las fracciones más puras con actividad hidrolítica sobre Hb, como las eluidas de la columna de Matrex Blue (MB), fueron utilizadas en los estudios de especificidad de sustrato y con los inhibidores.

Con respecto a la especificidad de sustrato, fue seguido el mismo protocolo empleado para la actividad enzimática, la variación consistió en adicionar sustratos diferentes a la hemoglobina comercial. Estos fueron hemoglobina de *Ascaris*, mioglobina comercial, BSA y caseína.

Cromatografía de exclusión molecular

Para la determinación del peso molecular de la proteasa parcialmente purificada se empleó una columna (1x 35 cm) de Sephadex G-75 equilibrada con buffer Tris-HCL 25 mM 0,15 NaCl. El perfil de elución de las proteínas y de las actividades fueron determinadas respectivamente mediante el método de Bradford (1976) y el método de Osman (2003) descritos en la metodología.

Electroforesis en gel de poliacrilamida/bisacrilamida al 13,5 % y al 15 %

La composición peptídica y pureza de las fracciones, aisladas durante los procedimientos de fraccionamientos, fue determinada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970).

La técnica de SDS-PAGE también fue utilizada para seguir la degradación de la hemoglobina bovina por la proteasa de *Ascaris* : 2 µg de la proteína sustrato fueron incubados con 2 µg de la proteasa parcialmente purificada proveniente de cromatografía de afinidad en buffer Tris- HCl 25 mM a pH 7,5, en presencia y en ausencia de cisteína por un tiempo de 18 horas. Los ensayos fueron mantenidos a temperatura constante en un incubador Multi-Block Heaten. La reacción fue detenida por la adición de un volumen igual a 17 µl del buffer muestra para SDS-PAGE y por

calentamiento a ebullición por 3 minutos. Los productos de la degradación fueron separados en gel de poliacrilamida y visualizados por Coomassie Blue R-25.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de las fracciones activas se determinó por método de Bradford (1976), y se utilizó una solución albúmina de suero bovino (BSA) en una concentración de 0,2 mg/ml como estándar para la elaboración de la curva de calibración.

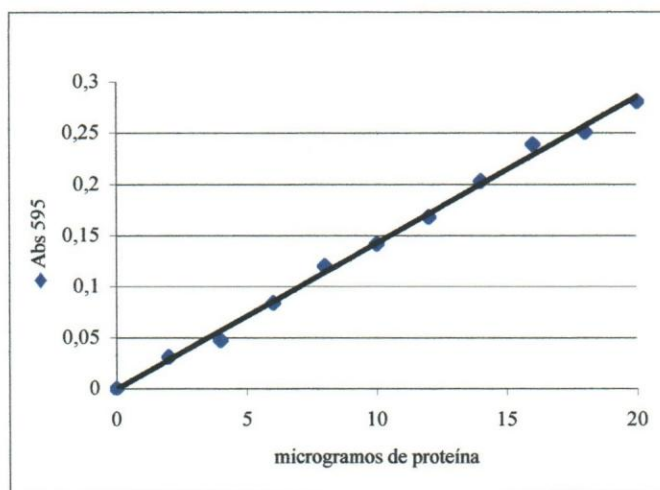


Gráfico 1. Curva de calibración para determinación de concentración de proteínas. La concentración para cada fracción se estimó por la ecuación de la recta $C = K(\text{Abs}) + B$. Para este gráfico K , tiene un valor de 69,768 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ y B de 0,0573.

El gráfico 1 es un ejemplo de la concentración aproximada de las diluciones del estándar de BSA, que fueron utilizadas para determinar la concentración de cada una de las muestras.

VII. Resultados y Discusión

A. Purificación Parcial de la Actividad Hidrolítica sobre Hemoglobina

Con la finalidad de purificar y caracterizar la actividad hidrolítica sobre Hb de la fracción citosólica del músculo de *Ascaris*, esta fue sometida a cromatografías subsecuentes, en columnas de DEAE - Celulosa y Matrex Blue. La fracción citosólica del músculo *Ascaris suum* fue aislada en un medio carente de BSA. La modificación impidió la contaminación de las fracciones activas con albúmina de suero bovino. Adicionalmente, para reducir la contaminación con otros componentes intracelulares la muestra fue re-centrifugada a 9000 rpm (23000 xg) en un rotor SS-34 Sorvall, precediendo este paso a las cromatografías. El gráfico 1 muestra la elución de las fracciones activas en la primera cromatografía reportándose la actividad por fracción en cada una de las muestras señaladas.

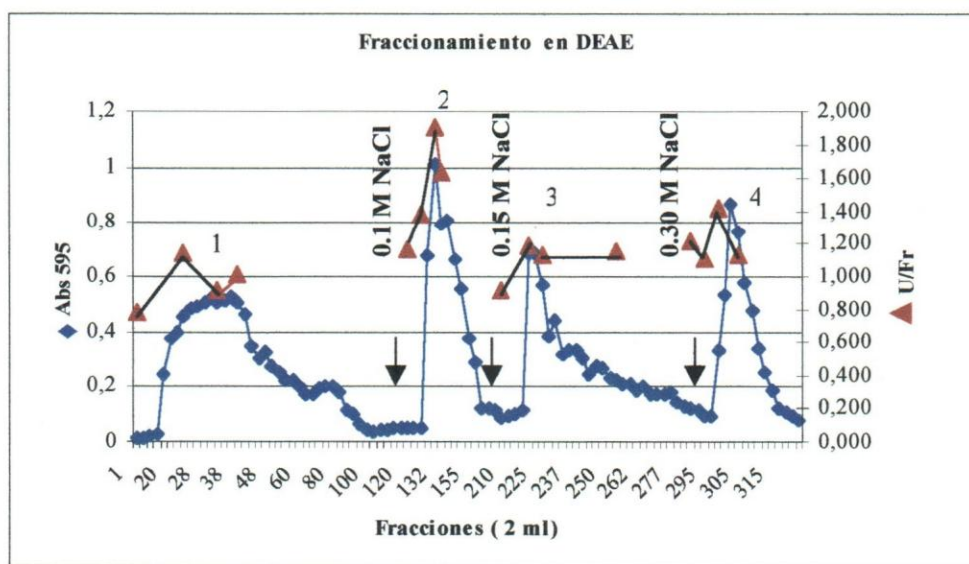


Gráfico 2. Perfil de elución de proteínas (♦) y de la actividad sobre Hb (▲) de las fracciones aisladas de la columna de DEAE-celulosa. La fracción citosólica (275 mg de proteínas totales) fue aplicada a una columna (2.5 x 8.6 cm) equilibrada con buffer Tris/ HCl 25 mM, 5 mM 2-ME, pH 7,5.

Ahora bien, la actividad específica (AE) de los picos obtenidos del fraccionamiento, es reportada en la tabla 1 y, fue medida usando como sustrato Hb bovina (Sigma) con una concentración de 2 mg/ml y cisteína 10 mM por ensayo. Aunque el pico 3 presentaba una actividad específica 0,76 U/mg, esta fracción tenía la finalidad de determinar la composición peptídica y caracterizar las actividades hidrolíticas presentes en el mismo.

La referida tabla también muestra que la Hb bovina, en presencia de cisteína y a pH 7,5, es hidrolizada por los diferentes picos de DEAE. Esta afirmación se puede confirmar con los cambios de actividad reportados en el gráfico 3, donde se resumen los resultados de los ensayos de actividad enzimática en ausencia y presencia de cisteína con los picos eluidos de la cromatografía de DEAE-Celulosa.

TABLA 1
Fraccionamiento de la fracción citosólica en DEAE-celulosa.

Fracción	Vol	Concentración de proteínas		Actividad Hidrolítica		
		(mg/ml)	(mg Totales)	U/ml	U/mg	U Totales
Citosólica	87,0	3,10	270,0	2,13	0,69	185,3
Pico 1 DEAE	33,5	0,34	11,4	0,32	0,93	31,20
Pico 2 DEAE	10,5	6,40	67,2	0,66	0,89	41,90
Pico 3 DEAE	31,0	0,70	21,7	0,53	0,76	16,40
Pico 4 DEAE	23,5	1,69	39,7	0,40	0,24	9,40

*Columna equilibrada con el Buffer Tris/ HCl 25 mM 2-Mercaptoetanol (ME) 5mM. Los picos 1, 2, 3 y 4 fueron eluidos respectivamente con el buffer de equilibrio y con soluciones de NaCl de 0,1, 0,15 y 0,3 en el mismo.

En el gráfico 3 se describe que la presencia de cisteína estimula significativamente la capacidad de hidrólisis.

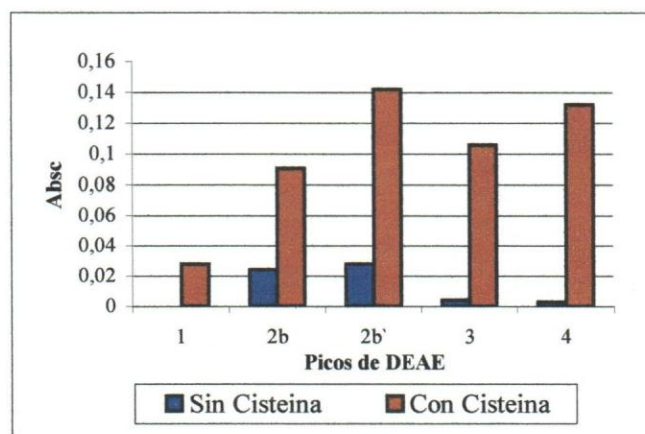


Gráfico 3. Determinación de la actividad sobre Hemoglobina bovina a pH 7,5 de los diferentes picos eluidos de DEAE

La composición peptídica de las fracciones aisladas de DEAE-Celulosa se muestra en la figura 2. Se logró observar que las fracciones eluidas de la columna de DEAE con 0,1 NaCl (el pico 2 corresponde a las muestras 4, 5 y 6 de la figura) presentan o están contaminadas de la banda de 17 kDa de Hb de pared corporal, mientras que los otros picos 1, 3 y 4 están libres de contaminación con esta banda.

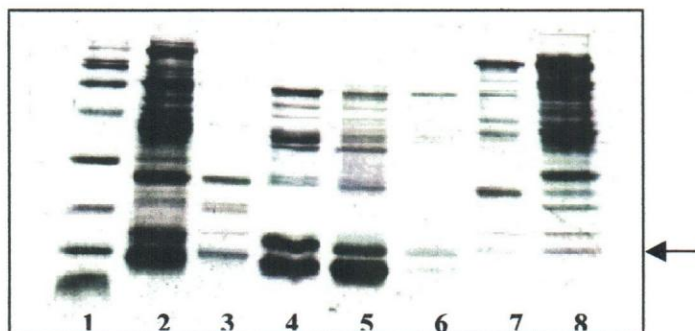


Figura 2. Electroforesis en geles de poliacrilanida al 13,5% de los picos de DEAE-Celulosa. 1. Standard de amplio rango de Bio Rad; 2. Fracción citosólica sin BSA 30 µg; 3. Pico 1 de DEAE 25µg; 4. Pico 2A DEAE 25µg; 5. Pico 2B de DEAE 25 µg; 6. Pico 2C DEAE 4.6 µg; 7. Pico 3 DEAE 6µg; 8. Pico 4 DEAE 25µg.

La tabla 2 hace referencia a la purificación de la actividad hidrolítica presente en el pico 3 DEAE en Matrex Blue, estos datos, a semejanza de la cromatografía en DEAE fueron obtenidos por la medición de la actividad específica sobre hemoglobina por el método de Osman (2003). Los pooles provenientes de MB fueron realizados en base a la absorbancia a 595nm indicativa del contenido de proteínas de las fracciones (Gráfico 4).

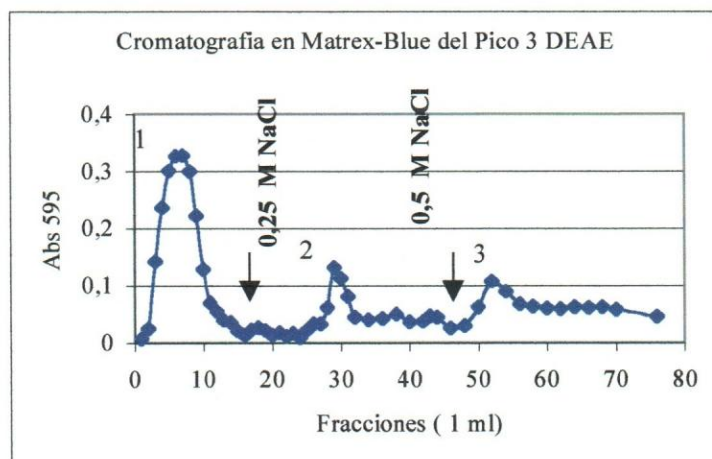


Gráfico 4. Patrón de elución de proteínas de Matrex Blue por el método de Bradford. 3 mg del pico 3 DEAE colocado en una columna de 2 ml. El pico 1 Matrex Blue (MB) fue formado con las fracciones de la 3 a la 10; el pico 2 MB con las fracciones de la 28 a la 31; el pico 3 MB de la 52 a la 56.

TABLA 2

Purificación parcial de la actividad hidrolítica presente en el pico 3 de DEAE.

Muestra	Vol	mg/ml	U/ml	AE*	UT	% Rendimiento	Purificación
Pico 3 DEAE	15,4	0.7	0.53	0.76	8.12	100	1X
Pico 1 MB	8	0,178	0,480	2,7	3,84	47	3,6 X
Pico 2 MB	4	0,028	0,455	16,3	1,82	22	21,4 X
Pico 3 MB	6	0,031	0,42	13,5	2,52	31	17,8 X
					8,18		

*AE en unidades/mg de proteína

La figura 3 muestra la composición peptídica de los pools realizados posterior a la cromatografía de afinidad. La muestra cuatro (4) corresponde al primer pico obtenido en esta cromatografía que eluye con buffer de equilibrio Tris/ HCl 25 mM. La muestra cinco (5) al pico 2 que eluye con Buffer de Equilibrio con 0,25 M NaCl y la última muestra, fue aplicada en el bolsillo 6 y contiene el pico 3 eluido con 0,5 M NaCl.

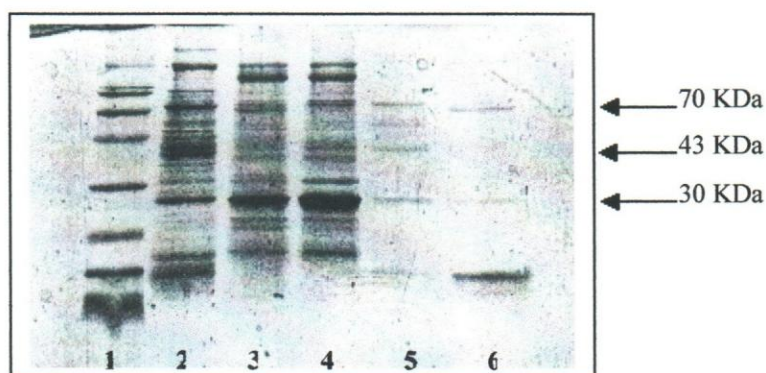


Figura 3.. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 13,5% de las fracciones aisladas de Matrex Blue (MB) proveniente del Pico 3 DEAE. 1. Standard de amplio rango Bio Rad, 15 μ l; 2. Fracción citosólica 20 μ g; 3. Pico 3 DEAE (concentrado y desalado) 20 μ g; 4 Pico 1 de MB 20 μ g; 5 Pico 2 MB 7,5 μ g; 6 Pico 3 MB 8.5 μ g.

En la figura 3 se observa la presencia, en las muestras 4 y 5 (pico 1 y 2 de MB respectivamente) de una banda cercana en PM a la reportada por Sato y col. (1993). Estudios realizados en el laboratorio asocian la banda de 43 kDa con la actividad hidrolítica sobre hemoglobina.

Además se observa en los picos 1, 2 y 3 (correspondientes a las muestras 4, 5 y 6 de la figura 3) la presencia de las bandas de 70 kDa y 30 kDa que corresponde a la proteasa que eluye con 0,30 M NaCl de la columna de DEAE-Celulosa.

La composición peptídica y la actividad de las fracciones que eluyen de la columna de DEAE-Celulosa con 0,15 M NaCl fueron los criterios empleados para separar el pico 3 en dos pooles : 3A y 3B

Cromatografías posteriores del pico 3A dieron como resultado que aún separando las fracciones de DEAE, tomando en cuenta la actividad específica y la composición peptídica reportadas en las electroforesis, la composición del pico 3 es principalmente una combinación de la proteasas que eluyen con 0,1 M NaCl y 0,30 M NaCl de la cromatografía en DEAE. La Tabla 3 resume los resultados del aislamiento de la banda de 43 kDa usando como muestra el pico 3A de DEAE.

TABLA 3

Purificación parcial del pico 3A de DEAE en Matrex Blue.

Muestra	Vol	mg/ml	U/ml	AE	UT	% Rendimiento	Purificación
Pico 3A	35	1,37	0,455	0,33	15,9	100	
Pico 1 MB	4	0,43	0,145	0,33	0,58	4	1x
Pico 2 MB	6	0,05	0,175	3,5	1,05	7	11x
Pico 3 MB	3	0,02	0,165	8,25	0,495	3	25x

La figura 4, muestra la composición peptídica de las fracciones aisladas de la columna de Matrex Blue. En esa figura puede observarse la banda de 43 kDa la de 30 y 70 kDa. Estas bandas de 70 kDa y 30 kDa, han sido reportadas experimentalmente por Monzón (2006), y parecen corresponder a las subunidades de la proteasa heterodimérica dependiente de calcio (Ca^{2+}) y cisteína, la calpaina.

La calpaina está constituida por dos subunidades de 80 y 30 kDa según estudios descritos por Tompa, Baki, Schád y Friedrinch (1996) y representa uno de los principales componentes del pico 2 MB y pico 3 MB.

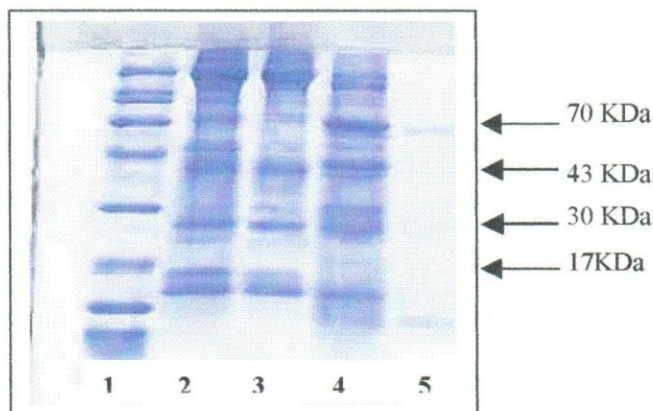


Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 13,5% de las fracciones aisladas de Matrex Blue (MB). La muestra colocada en la columna fue el pico 3A proveniente DEAE después del desalado y concentrado (9 mg). 1. Standard de amplio rango Bio- Rad. 10 µg; 2. Pico 3A (concentrado y desalado) 20 µg; 3. Pool 1 MB 20 µg; 4. Pool 2 MB 17,5 µg; 5. Pico 3 MB.

B. Caracterización bioquímica de las fracciones activas aisladas durante la purificación

1. Determinación del pH y la temperatura óptima

Para determinar el pH y la temperatura óptima se empleó el pico 3B de DEAE-Celulosa. Los resultados se resumen en la tabla 4. Este pico 3B fue usado debido que, al realizarse la electroforesis al 13,5% acrilamida/bisacrilamida correspondiente a la separación y comparar el pico 3A y 3B, se presentó más limpio de las bandas de 70 kDa y 34 kDa (Referencia standard preteñido de amplio rango).

TABLA 4

Determinación del pH óptimo para la actividad hidrolítica presente en el pico 3B de DEAE.

pH	ABS c	U/ml	AE(U/mg)
3,0	0,057	0,285	0,864
4,0	0,072	0,360	1,091
4,5	0,044	0,220	0,667
5,0	0,033	0,165	0,500
6,5	0,112	0,560	1,697
7,5	0,137	0,685	2,076
8,0	0,134	0,670	2,030
8,5	0,085	0,425	1,288

El gráfico 5 indica dos incrementos en la actividad específica del pico 3B a diferentes pH. El primero corresponde a 4,0, coincidiendo con el pH óptimo que ha

sido reportado en *S. mansoni* para una proteasa cuya actividad proteolítica es dependiente de cisteína a pH 3,9 en extractos del mismo organismo. Dresden y Deelder (1979) indicaron la posible función de esta actividad que hidroliza hemoglobina y su implicación en la nutrición del parásito. Sin embargo, se evidencia en el mismo gráfico que para este ensayo la mayor actividad específica está hacia el rango de pH básico, alrededor de 7,5. Estos resultados sugieren la presencia de varias proteasas en el pico 3B de DEAE dependientes de cisteína a diferentes pH.

Sin embargo, con respecto a la dependencia del pH en las cistein-proteasas McKerrow y Sajid (2002) han descrito que en los parásitos las mismas son activas y siguen siendo estables a pH neutro, por lo que se considera viable que la misma tenga actividad hidrolítica sobre Hb a pH 4,0 y 7,5.

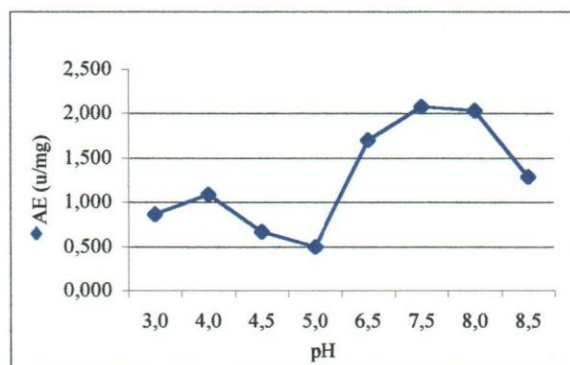


Gráfico 5. Determinación del pH óptimo para la actividad hidrolítica presente en el pico 3B DEAE.

Con respecto a la temperatura óptima del pico 3B, los ensayos fueron repetidos hasta 3 veces por cada temperatura. En la tabla 5, se presentan los promedios de estos tres ensayos reportando la actividad específica promedio para cada experiencia.

TABLA 5

Determinación de la temperatura óptima para la actividad proteolítica presente en el pico 3B DEAE

Temp °C	AE (U/mg)		
	Exp 1	Exp 2	Exp 3
25	1,394	1,061	0,758
30	1,621	1,364	0,909
37	1,833	0,758	0,909
40	2,045	0,758	0,606

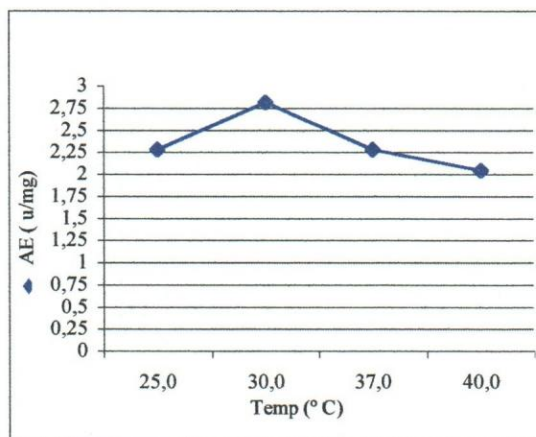


Gráfico 6. Dependencia de la temperatura de la actividad hidrolítica del pico 3B. La actividad promedio de tres ensayos por cada temperatura es mostrada.

El gráfico 6 indica que la temperatura óptima de la actividad hidrolítica sobre hemoglobina es 30 °C. Las variaciones observadas en la tabla 4 se deben a que la composición de 3B no es homogénea, posiblemente por la presencia de la subunidades de otra proteasa que eluye con 0,30 M NaCl de DEAE.

2. Determinación del peso molecular del pico 3

Para determinar el tamaño de la proteína nativa fue empleada una columna de Sephadex G-75 (1 x 35 cm), la misma permite excluir las proteínas que contengan pesos moleculares superiores a 75 kDa.

La gráfica 7, representa el patrón de elución de proteínas y de actividad de la columna. Se observan dos picos de actividad, uno alrededor de la fracción 10 y otro alrededor de la fracción 15.

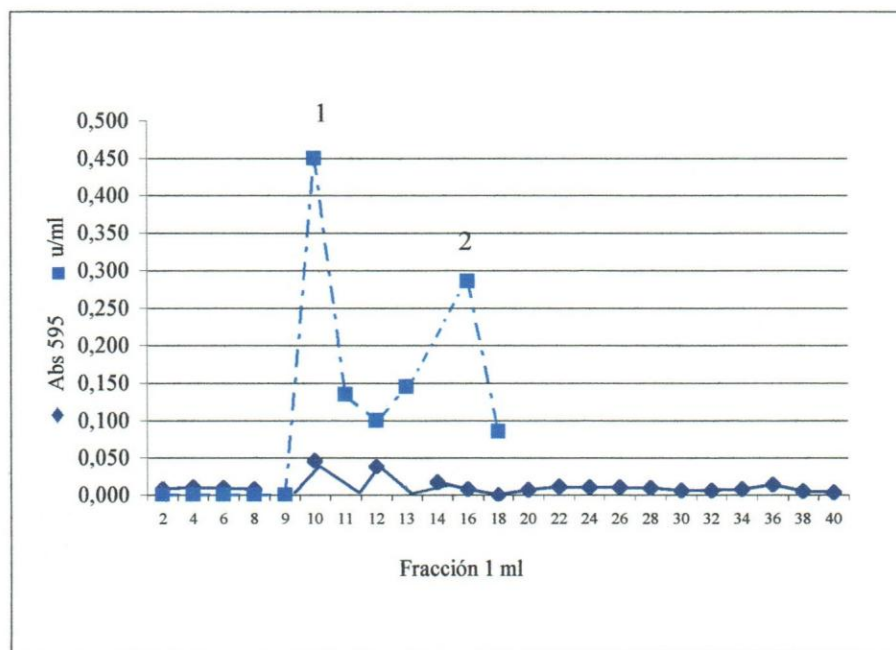


Gráfico 7. Cromatografía en Sephadex G-75 del pico 3 de DEAE. Una alícuota de 1.2 ml (0.812 mg de proteína) del pico 3 fue aplicada a una columna de 1 x 35 cm (27,5 ml) equilibrada con buffer Tris HCl 25 mM pH 7,5.

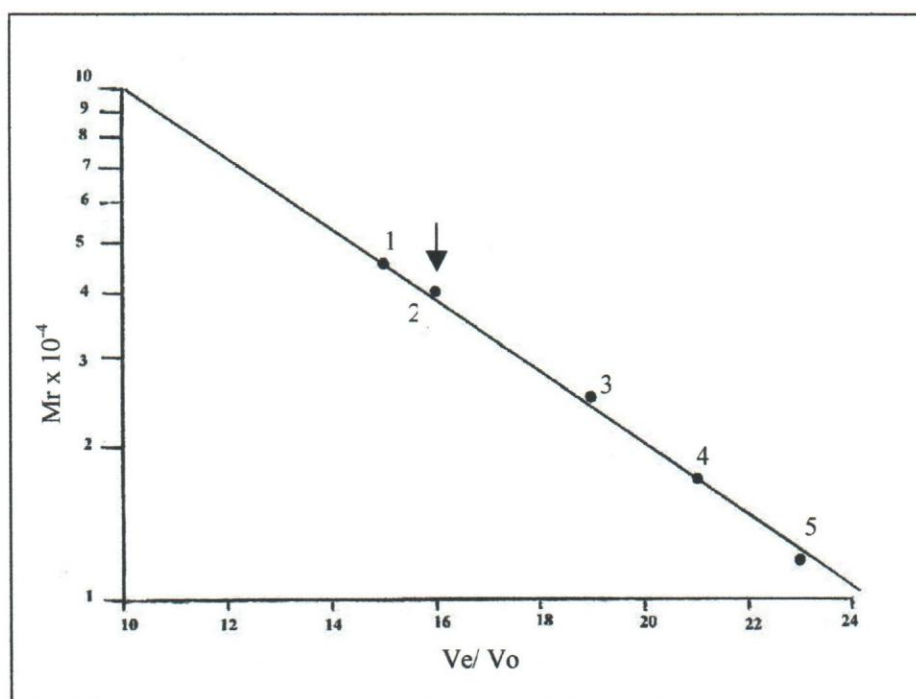


Gráfico 8. Parámetros moleculares para la cromatografía en Sephadex G- 75. Para la elaboración de la curva de calibración se utilizaron; 1. Ovoalbúmina 45 kDa; 2. Peroxidasa 40 kDa; 3. Quimiotripsinogeno 25 kDa; 4. Ribonucleasa A 15 kDa; 5. Citocromo C 12.5 kDa.

El volumen de elución del primer pico de actividad está cercano al volumen de exclusión de la columna (8 ml). El segundo pico de actividad eluye como una proteína de 40 kDa, esto se puede observar con claridad al incluir las fracciones picos en la curva de calibración representada en el gráfico 8.

3. Especificidad de sustrato del pico 2 MB

En los estudios de especificidad de sustrato se utilizó la preparación más limpia aislada de MB, el pico 2. Los resultados de estos estudios se muestran en los gráficos

9 y 10, mientras la actividad específica, con los diferentes sustratos, está resumida en las tablas 6 y 7.

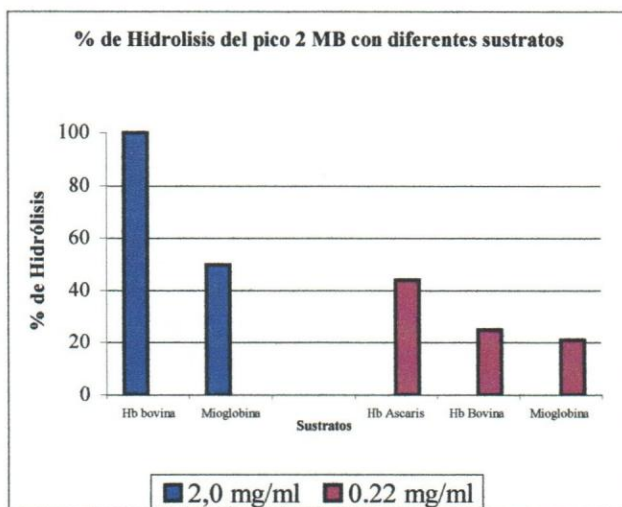


Grafico 9. Especificidad de sustrato del pico 2 Matrex Blue. La muestra utilizada fue proveniente del pico 3 de la purificación señalada en la tabla 2.

Tabla 6

Especificidad de sustrato del pico 2 MB

Sustrato	Concentración de sustrato	Abs c	U/ml	AE
Hb bovina	2mg/ml	0,091	0.028	16
Mioglobina	2 mg/ml	0,045	0.225	11,25
Hb de <i>Ascaris</i>	0,22	0,040	0.200	10
Hb bovina	0,22	0,023	0,115	5,75
Mioglobina	0,22	0,019	0,095	0,475

* La fuente de enzima usada en estos estudios es el pico 2 MB proveniente del pico 3 DEAE (0,02 mg/ml)

El gráfico 9 muestra la actividad en porcentaje (%) para dos concentraciones de proteínas sustrato por ensayo, tomando como referencia que la velocidad de hidrólisis con Hb bovina es del 100 % a una concentración de 2 mg/ml. En el gráfico se observa que la tasa de hidrólisis relativa muestra la mayor especificidad del pico 2 de MB es

por la Hb de *Ascaris* (44 %) seguida de la Hb Bovina (25 %) y por último, mioglobina (21%). Un segundo estudio de especificidad de sustrato con el pico 2 MB se muestran en el gráfico 10.

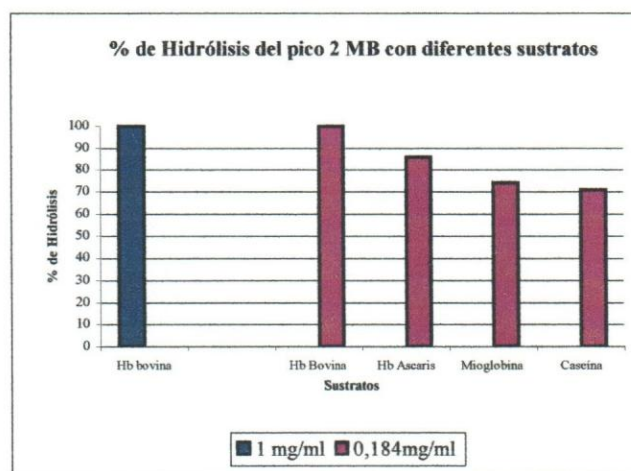


Gráfico 10. Especificidad de sustrato del pico 2 Matrex Blue. La muestra utilizada fue proveniente del pico 3A de la purificación señalada en la tabla 3.

En el gráfico 10 se observa que la mayor especificidad de sustrato del pico 2MB (proveniente de 3A DEAE) es por Hb bovina (tasa relativa del 100 %), seguida por Hb corporal de *Ascaris*, 86 % mioglobina, 74 % y caseína a pH 7,5 con 71 %. La alta actividad observada con Hb de pared en ambos ensayos sugiere un papel nutricional para esta proteasa aislada de la fracción citosólica de *Ascaris*.

Tabla 7

Especificidad de sustrato del pico 2 MB proveniente de 3A DEAE

Concentración				
Sustrato	sustrato	Abs c	U/ml	AE
Hb bovina	1 mg/ml	0,035	0,175	3,5
Hb bovina	0,184	0,035	0,175	3,5
Hb de <i>Ascaris</i>	0,184	0,031	0,155	3,1
Mioglobina	0,184	0,026	0,130	2,6
Caseína	0,184	0,025	0,125	2,5

* La concentración de proteínas del pico 2 MB en el ensayo es de 0.05 mg/ml

Como la actividad sobre hemoglobina no fue bloqueada con EGTA, un quelante de Ca^{2+} , es posible descartar la degradación de las proteínas sustrato por calpaina (Ver tabla 8).

Con respecto a la hidrólisis sobre BSA, este sustrato a una concentración de 0,172 mg, presentó una actividad específica de 0,31 (U/mg) usando como fuente de enzima el pico 2 MB, por lo que se considera poco significativa la hidrólisis sobre la albúmina de suero bovino.

4. Determinación de la actividad hidrolítica sobre Hb por SDS-PAGE.

La degradación de Hb bovina por la proteasa presente en el pico 2 MB se siguió también por SDS-PAGE con el fin de determinar si la proteasa era capaz de degradar la banda correspondiente a la Hb. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 5, en ella se observa que sólo ocurrió degradación de la banda de hemoglobina cuando esta proteína fue preincubada con la proteasa en presencia de cisteína.

Se evidencia con claridad que la muestra colocada en el bolsillo 5, la cual poseía una solución de cisteína 1mM, es capaz de activar la acción de la proteasa sobre Hb. Estos resultados están de acuerdo con la observación que la actividad presente, en todos los picos aislados de DEAE, es estimulada por cisteína (descrito en el gráfico 3).

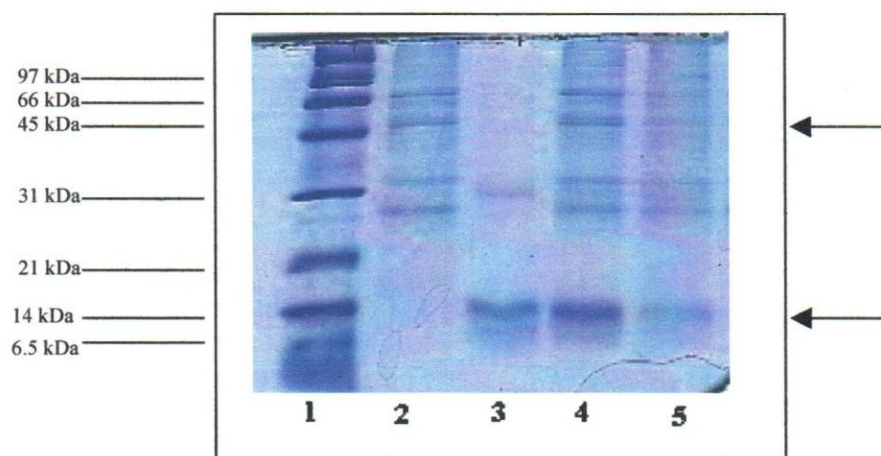


Figura 5. Degradación de la banda de hemoglobina por el pico 2 MB. SDS- PAGE en gel de acrilamida al 15%. En estos estudios la Hb bovina fue preincubada en presencia y en ausencia de cisteína por 18 h a 37 °C antes de ser sometida a la corrida electroforética 1. Standard amplio rango Bio Rad. ; 2. Pico 2 MB 2 µg. 3.Hb bovina 2 µg; 4. 2 µg Hb bovina con 2 µg del pico 2 MB (Hb: proteasa = 1:1) ; 5. 2 µg de Hb Bovina con 2 µg del pico 2MB en presencia de cisteína 1 mM.

5. Estudios de inhibición

Con la finalidad de mejorar y ampliar la caracterización, se realizaron estudios con inhibidores específicos de proteasas. Dos fracciones activas fueron utilizadas en estos estudios: El pico 3 DEAE y el pico 2 MB.

Como ha sido demostrado experimentalmente, gran parte de la actividad específica es estimulada por cisteína en todos los picos de DEAE. Por esta razón, se determinó el efecto de E-64 sobre la actividad hidrolítica del pico 3 DEAE. E-64 a una concentración de 1mM inhibió la actividad de este pico sobre Hb en 18,4 %. Por el contrario, pepstatina no afectó la actividad hidrolítica de este pico sobre caseína a pH 4,5.

El efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica del pico 2 MB se muestra en la tabla 8. En este caso, pepstatina bloqueó en 91 % la actividad del pico 2 MB sobre Hb bovina a pH 7,5. Estos resultados son opuestos a los descritos para el pico 3 DEAE, se le atribuyen principalmente a dos condiciones, la primera, que gracias a las cromatografías subsecuentes, se logró una separación de las proteasas más efectiva que la realizada en DEAE y, segundo, que el buffer de equilibrio usado para obtener el pico 2 MB tenía en sus componentes 2- Mercaptoetanol, por lo que no se puede observar una inhibición significativa (mayor del 25 %) de la actividad del pico 2.

TABLA 8

Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica del pico 2 MB sobre HB bovina

Inhibidor	U/ml*	Inhibición %
Enzima	0,235	0
Enzima + Pepstatina (1 μ M)	0,020	91
Enzima + E-64 (20 mM)	0,210	11
Enzima	0,175	0
Enzima + EGTA (10mM)	0,160	9
Enzima	0,410	0
Enzima + PMSF (10mg/ml)	0,590	0

* Todos los ensayos se realizaron a pH 7,5 usando hemoglobina bovina como sustrato.

Sin embargo, el porcentaje de inhibición con pepstatina es análoga a la reportada por Sato y col (1993) para la proteasa ácida de PM de 42 kDa de *Dirofilaria immitis*.

Ahora bien, para el E-64 las condiciones son similares a los ensayos realizados en DEAE, pero la concentración seleccionada para los estudios realizados con 2 MB salen del rango de la concentración óptima del inhibidor (fue mayor al nivel óptimo), esto debido a que el E-64 usado en los ensayos tanto en DEAE como en MB, ya había perdido su actividad inhibidora. El EGTA fue incluido por actuar como agente quelante sobre el calcio, al ser parte de la composición peptídica del pico 2 MB, la proteasa que eluye con 0,30M NaCl, se deseaba evaluar su efecto sobre la muestra. Sin embargo, este no afectó significativamente la actividad proteolítica de 2 MB sobre Hb bovina. Por último, no ocurrió inhibición alguna con el PMSF, excluyendo que las proteasas presentes en el pico 2 MB provenientes de DEAE pertenezcan al grupo de las serin-proteasas.

VIII. Análisis

Con respecto a la cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción citosólica sin BSA esta permitió separar en 4 picos la actividad proteolítica sobre Hb e identificar que todas son dependientes de cisteína.

El estudio de la composición peptídica del pico 3 de DEAE-celulosa indicó que el mismo estaba compuesto por las proteasas que eluyen de DEAE-celulosa con 0,10 M NaCl (pico 2) y con 0,30 M NaCl (pico 4) debido a que contenía la banda de 43 kDa denominada “hemoglobinasas” y al heterodímero de calpaína, formado por las subunidades de 70 y 30 kDa.

El mayor rendimiento se obtuvo cuando todas las fracciones activas eluidas de DEAE-celulosa con 0,15 M NaCl, identificadas como pico 3, fueron cromatografiadas en Matrex blue. Este procedimiento permitió recuperar 8 unidades totales, de las cuales el 53% estaban asociadas con los picos 2 y 3 de MB. La actividad específica de estos picos fue de 16,3 y 13,5 U/mg respectivamente.

La banda de 43 kDa, presente en el pico 2 MB, fue purificada unas 21 veces en comparación con el pico 3 de DEAE-celulosa que fue la muestra aplicada a la columna de MB. Estudios homólogos en *Dirofilaria immitis* y *Schistosoma mansoni* han reportado una mayor purificación de la banda con actividad hidrolítica sobre hemoglobina, para el primer caso 437 veces y para el segundo, 304 veces.

Con respecto a la caracterización bioquímica, la determinación del peso molecular por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex- G-75, permitió adscribirle a la proteasa nativa un peso de 40 kDa. Los resultados obtenidos por SDS-PAGE, permitieron estimar en base a la movilidad relativa el peso de la subunidad, que fue de 43 kDa. La proteasa purificada de *Dirofilaria immitis* cuando fue sometida a SDS-PAGE mostró una única banda de 42 kDa, muy cercano al valor obtenido para la proteasa de *Ascaris suum*. Con respecto a la temperatura y pH óptimo, los resultados indican que a 30 °C y pH 7,5 se obtiene la mayor actividad proteolítica.

La banda de 43 kDa, también fue identificada como uno de los principales componentes del pico 2 MB en los análisis electroforéticos, esta preparación presentó un alto grado de inhibición con pepstatina (91%), una alta estimulación con cisteína, y una baja inhibición por una preparación comercial de E-64. La poca inhibición observada con E-64 (11%) puede deberse a que la solución haya perdido su capacidad inhibitoria con el tiempo.

Otra característica del pico 2 MB obtenido por cromatografía del pico 3 de DEAE es esta columna de afinidad, es que mostró la mayor actividad hidrolítica con Hb de pared corporal de *Ascaris* (10 U/mg), siendo su actividad más baja cuando se usó mioglobina, caseína o BSA como sustratos.

La observación de que la preparación de MB posee dos proteasas diferentes que son afectadas de manera distinta por inhibidores específicos sugiere un mecanismo

análogo al descrito en *S. mansoni* para la degradación de hemoglobina, en el cual participan varias proteasas, actuando de manera secuencial.

Por último, se descarta que las subunidades que corresponden al heterodímero de calpaina sean responsables de la principal actividad hidrolítica sobre hemoglobina presente en el pico 2 MB, porque los resultados de los ensayos realizados con EGTA muestran que la actividad de este pico no fue inhibida cuando se añadió este quelante de calcio al medio de reacción.

VIII. Conclusiones

La cromatografía en DEAE-celulosa permitió separar 4 picos de actividad proteolítica sobre Hb dependiente de cisteína. Específicamente el pico 3, eluido de la columna de DEAE-celulosa con 0,15 M NaCl presentó la mayor actividad proteolítica a pH 7,5 y 30 °C, y fue estimulado 27 veces por cisteína.

La cromatografía en Matrex blue de las fracciones activas eluidas de DEAE con 0.15 M NaCl permitió purificar la actividad 21 veces. La mayor actividad específica estaba presente en el pico 2 de MB eluido con 0.25 M NaCl.

Los resultados de la caracterización del pico 2 MB, indican que contiene principalmente una banda de 43 kDa, y las bandas de 30 y 70 kDa con movilidad relativa similar a las subunidades regulatoria y catalítica de calpaina.

El peso molecular determinado por SDS-PAGE para la proteasa responsable de la actividad hidrolítica del pico 3 de DEAE es de 43 kDa.

La mayor actividad degradativa del pico 2 MB se obtuvo con Hb de pared corporal de *Ascaris*. La actividad específica sobre la Hb de *Ascaris* fue aproximadamente 2 veces mayor que la obtenida con Hb bovina a la misma concentración. . Adicionalmente, el pico 2 MB fue capaz de degradar la banda de Hb

bovina pero, sólo en presencia de cisteína, en los estudios de degradación realizados por SDS-PAGE.

IX. Referencias

- Barrett, J. y Rawlings, N. (1994) *Methods in Enzymology. Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases*. Academic Press. San Diego, California.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Dresden, M. y Deelder, A. (1979). *Schistosoma mansoni*: Thiol Proteinase Properties of Adults worms "Hemoglobinase". *Exp. Parasitol.* 48: 190-197.
- Dresden, MH., Ruthedge, ML. y Chappel, CL. (1981). Properties of the acid proteinase from *Schistosoma mansoni* adults. *Mol. Biochem. Parasitol.* 4 (1-2):61-66.
- Fontera, E. (2002). Repercusiones orgánicas de la infección experimental por *Ascaris suum* en el cerdo ibérico. Universidad de Extremadura.
- Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the Assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Linquist, R., Senf, A. y McKerrow, M. (1986) *Schistosoma mansoni*: Purification and Characterización of the Major Acidic Proteinase from Adults Worms. *Exp. Parasitol.* 61: 398-404.
- McKerrow, J y Doenhoff, M. (1988). Schistosome Proteases. *Parasitol. Today.* 4: 334-340.
- Minning, D., Gow, A., Bonaventura, J., Braun, R., Dewhirst, M., Golberg, D. y Stamler, J. (1999). *Ascaris* haemoglobin is a nitric oxide-activated deoxygenase. *Nature*, 401: 497-502.
- McKerrow, J y Sajid, M. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120:1-21.
- Monzón, M. (2006). Aislamiento y caracterización parcial de la proteasa m-calpaina presente en la fracción citosólica de *Ascaris lumbricoides* variedad *suum*. Trabajo especial de Grado no publicado para optar por el título de Licenciada en Educación mención Biología y Química. Universidad Católica Andrés Bello. Caracas.

Okasaki, T. y Witterberberg, J. (1965). The haemoglobins of *Ascaris* perienteric fluid III. Equilibria with oxygen and carbon monoxide. *Biochim. Biophys.* 503-511.

Osman, A. (2003). Barley and Malt proteins and proteinases: I. Highly Degradable Barley Protein Fraction (HDBPF), a Suitable Substrate for Malt Endoprotease Assay. *J. Inst. Brew.*, 109,(2): 135-141.

Sanchez, B. (1992) Las Hemoglobinas de *Ascaris Suum*. Un estudio Comparado. Tesis de grado no publicada para optar por el título de Licenciada en Biología, Universidad Simón Bolívar, Sartenejas.

Sato, K., Nagai, Y. y Suzuki, M. (1993). Purification and partial characterization of and acid proteinase from *Dirofilaria immitis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58: 293-300.

Saz, H. y Lescure, G. (1968). Effects of anticestodal agents on mitochondria from the nematode, *Ascaris lumbricoides*. *Mol. Pharmacol.* 4: 407-410.

Stryer, L., Berg, J y Tymoczko, J. (2002). Biochemistry. W.H Freeman and Company. New York.

Tompa, P., Baki, A., Schád, É. y Friedrich, P. (1996). The calpain Cascade. μ -calpain activates m-calpain. *Journal. Biol. Chem.* 271 (52): 33161-33164.

Wasilewski, M., Lim, K., Phillips, J. y McKerrow, J. (1996). Cysteine protease inhibitors block *Schistosoma* hemoglobin degradation *in vitro* and decrease worm burden and egg production *in vivo*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 81:179-189.