



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

Identificación de proteasas liberadas por el miracidio de *Fasciola hepatica* durante el proceso de invasión a caracoles del género *Lymnaea*

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

LUZ BELINDA ORTIZ ALEGRÍA

TUTORA:

DRA. MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN

COMITÉ TUTORAL:

**DR. HÉCTOR QUIRÓZ ROMERO
DRA. IRENE CRUZ MENDOZA**

México D. F.

Junio, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi mamá, Juana Alegría, por ser la principal impulsora de este proyecto en mi vida, por todo el apoyo y el cariño que siempre me has brindado.

A mi papá Gustavo Ortiz por el apoyo, ya que a pesar de la distancia, te preocupas por mí y me apoyas en todos mis proyectos.

A Brenda porque eres parte de este logro, me has dado tu apoyo en todos los aspectos de mi vida y eres incondicional.

A Gustavo porque me has apoyado, te preocupas constantemente y has cambiado nuestras vidas.

A July por preocuparte por mi, hacer que mi vida sea mucho más alegre y siempre animarme.

A la Doctora Dolores Correa por impulsarme a lograr este sueño, guiarme en los diferentes caminos de la vida, pero principalmente por ser una persona excepcional.

A mi familia Alegría: Alegría-Ruíz, Alegría-Díaz, Silva-Alegría, Alegría-Gallegos, Alegría-Fuentes, Alegría-Arias y Alegría-Magaña, por el apoyo en todos los aspectos de mi vida, para que siempre estemos unidos como hasta ahora. Gracias por ser geniales.

A Carlos Catana, porque a pesar de las dificultades de la vida, siempre has estado a mi lado, en los momentos tristes y en los alegres. Mil Gracias.

A mi amiga Claus, porque a pesar de los tropiezos, he recibido tu apoyo y se ha forjado una amistad más fuerte.

A mis amigos Carlos Catana, Alma Gutiérrez, Claudia Rico, Jazmín Osorio, Juan Peña, Anahí Soria, Carlos Lugo, Ángel Islas, Cynthia Castro, Roberto Razo, Norma Pérez, Adriana Méndez, para que sigamos siendo tan unidos y no nos separemos. Gracias por todos los lindos momentos, las experiencias difíciles, pero sobre todo por las sonrisas y carcajadas.

A mi amiga Lidia Castañeda, espero sigamos juntas para siempre.

A Paola Rodríguez y Tania Estrada por ser mis amigochas de toda la vida.

A Perla Acevedo porque en los últimos años has sido una buena amiga y me das consejos, me escuchas y me apoyas.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por ser mi casa, darme una formación de universitaria y permitirme alcanzar este propósito.

A mi familia Ortiz-Alegría por el apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida.

A la Doctora Dolores Correa por enseñarme muchas cosas, no sólo en el aspecto científico, sino en la vida en general. Por ser mamá, maestra y amiga.

A la Doctora Irene Cruz por todo el apoyo brindado, en varios aspectos, para la realización total de esta tesis. Gracias por la enseñanza en el manejo de parásitos y el cultivo de caracoles.

Al Doctor Héctor Quiroz Romero por todos sus consejos, pero sobre todo por sus enseñanzas académicas tan amplias.

A la QFB. Claudia Patricia Rico Torres por la ayuda con la colección y procesamiento de las muestras biológicas; en la estandarización de pruebas y valiosos comentarios, pero sobre todo por su apoyo incondicional y su grandiosa amistad.

Al MVZ. Carlos Cedillo Pelaéz por el apoyo para la obtención e interpretación de los resultados de la microscopía electrónica de transmisión.

Al Prof. Joel Rodríguez López por el procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión y sobre todo por su calidez humana.

Al M. en C. Ignacio de la Mora de la Mora por la ayuda en la estandarización de la zimografía.

Al Doctor Gabriel López Velázquez por la ayuda con la estandarización y determinación de la actividad enzimática, pero sobre todo por sus ideas y valiosos comentarios.

Al Doctor Horacio Reyes Vivas por la ayuda con la determinación de la actividad enzimática y por sus valiosos comentarios.

A la M. en C. Karina Hernández Guzmán por la ayuda para la colección de parásitos, pero sobre todo por ser una buena amiga.

A mis amigos del laboratorio de Inmunología Experimental: Heriberto Caballero, Edith Medina, Claudia Rico, Irma Cañedo, Héctor Luna, Sandra Murrieta, José Luis Hernández, Esther Calderon, Mónica Olmedo, Carlos y Armando. Gracias por todo.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología Experimental de la Subdirección de Medicina Experimental, del Instituto Nacional de Pediatría, SSa y en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Esta tesis fue parcialmente financiada por el proyecto PAPIIT IN208703.

La alumna fue becaria de CONACYT de agosto de 2005 a julio de 2007, con número de registro 201685.

RESUMEN

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria causada por *Fasciola hepatica*, cuyo ciclo biológico se desarrolla en dos tipos de hospederos: uno definitivo, un mamífero, y otro intermediario, un caracol de la familia *Lymnaeidae*. La fase infectiva para los caracoles corresponde al miracidio, el cual para infectar al molusco se pega por su extremo anterior al epitelio del caracol y secreta sustancias que lisan la parte del tejido por donde penetra, para después convertirse en esporoquiste, redia y cercaria. En la actualidad no se cuenta con información sobre las moléculas participantes en la invasión del miracidio de *F. hepatica*. Entre las enzimas que posiblemente participen en la penetración a los caracoles están las proteasas. Por tanto, el objetivo fue determinar la presencia de proteasas en el miracidio de *Fasciola hepatica* e identificar sus características bioquímicas. Las proteínas del miracidio se analizaron por medio de electroforesis SDS-PAGE y geles de gelatina, y se encontró que el patrón proteico y las bandas correspondientes a las proteasas son diferentes a las de los productos de E-S y proteínas somáticas del adulto. Se observó que algunas de las proteasas encontradas corresponden al tipo de las cisteín-proteasas, ya que son capaces de degradar el sustrato fluorescente Z-phe-arg-NHMec; además se activan en presencia de ditiotreitól y se inhiben por el 5-metil-metano-tiosulfonato, activador e inhibidor específicos de cisteín-proteasas, respectivamente. Aparentemente dichas proteasas no son las mismas que utiliza el parásito adulto, ya que presentan peso molecular y perfiles de actividad e inhibición diferentes; además, no son detectadas por anticuerpos anti-catepsinas L1 y L2, que son las principales en el adulto. Finalmente, la invasión del caracol por el parásito cambia el patrón de proteínas radicalmente, y la inhibición de proteasas con una mezcla poliespecífica impide este cambio. La conclusión general del trabajo es que el miracidio de *F. hepatica* utiliza proteasas para invadir a su hospedero intermediario, parte de las cuales son cisteín proteasas diferentes a las del adulto. Las proteasas podrían ser blanco de inhibición y por ende de bloqueo del ciclo biológico.

Palabras clave: caracoles del género *Lymanea*, *Fasciola hepatica*, invasión, proteasas.

ABSTRACT

Fasciolosis is a parasitic illness caused by *Fasciola hepatica*. Its life cycle occurs within two host types: definitive, mammals, and intermediate, *Lymnaea* snails. The infective phase for the mollusc is the miracidium, which adheres through its anterior side to the snail epithelium and secretes lytic substances; then it penetrates and transforms itself into sporocyst, rediae and cercariae. Actually, no information about the molecules involved in the invasion process of the *F. hepatica* miracidium is available. Among the possible participating enzymes in penetration are proteases. The aim of this work was to determine the presence of proteases in the miracidium and to identify their biochemical characteristics. The proteins were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis and gelatin gels, and it was observed that the protein and proteases patterns were different to those of adult somatic and excretion-secretion extracts. Cystein-proteases were demonstrated by activity measured through degradation of the fluorescent substrate Z-phe-arg-NHMec, activation by dithiothreitol (specific for these enzymes) and inhibition by 5-methyl-methanethiosulfonate (also specific). Apparently, the miracidium proteases are different to the adult enzymes because of their molecular weights, activity and inhibition profiles; in addition, they are not detected by anti-cathepsin L1 and L2 antibodies, main adult proteases. Finally, the parasite invasion to the snail strongly modifies the protein pattern, and the inhibition, by a polyspecific cocktail prevents this change. The general conclusion of this work is that *F. hepatica* miracidium uses proteases to invade its intermediate host, some of them are cystein-proteases, different to the adult. Proteases could be inhibition targets to block the life cycle.

Key words: *Lymnaea* snail, *Fasciola hepatica*, invasion, proteases.

CONTENIDO

RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
ANTECEDENTES	1
Generalidades	1
Ciclo biológico	2
<i>Fasciola hepatica</i> y su hospedero intermediario (caracoles limnéidos).....	3
Efecto del miracidio de <i>Fasciola hepatica</i> sobre su caracol hospedero	5
Reconocimiento y unión del miracidio de <i>Fasciola hepatica</i> a caracoles del género <i>Lymnaea</i>	6
Estructura del miracidio de <i>Fasciola hepatica</i>	8
Proteasas de <i>Fasciola hepatica</i>	11
Proteasas de <i>Fasciola gigantica</i> y <i>Schistosoma mansoni</i> , parásitos similares a <i>Fasciola hepatica</i>	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
METODOLOGÍA	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Colecta de material biológico	19
Obtención de miracidios de <i>F. hepatica</i>	19
Obtención de parásitos adultos de <i>F. hepatica</i>	20
Preparación de proteínas de excreción-secreción del parásito adulto de <i>F. hepatica</i>	20
Obtención de proteínas somáticas de <i>F. hepatica</i> adulta.....	20
Obtención de proteínas del miracidio de <i>F. hepatica</i>	21
Electroforesis en geles de poliacrilamida	21
Zimografía	21
Identificación del tipo de proteasa	22
Purificación de proteasas	22
Inmunización de conejos con proteínas de <i>F. hepatica</i> adulta.....	23
Inmunización de ratones con proteínas del extracto completo de miracidios de <i>F. hepatica</i> y de caracoles <i>L. humilis</i>	23

Western blot	24
Estudios de microscopia electrónica de transmisión (MET)	24
Determinación de la actividad enzimática	25
Cultivo de caracoles <i>Lymnaea humilis</i>	26
Análisis de proteínas de caracoles <i>L. humilis</i> infectados con miracidios de <i>F. hepatica</i>	26
VARIABLES DEL ESTUDIO.....	27
RESULTADOS	28
Colecta de huevos y parásitos adultos de <i>F. hepatica</i>	28
Estudios de microscopia electrónica de transmisión	28
Obtención de las proteínas de excreción-secreción y somáticas del parásito adulto y del miracidio de <i>F. hepatica</i>	30
Producción de antisueros	30
Patrón electroforético de los extractos de <i>F. hepatica</i>	31
Western blot	31
Zimografía	32
Actividad enzimática.....	33
Patrón proteico de caracoles <i>L. humilis</i> infectados con miracidios de <i>F. hepatica</i>	34
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	39
PERSPECTIVAS	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CUADROS	51
FIGURAS	58

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Tipos celulares y estructuras componentes del miracidio de *Fasciola hepatica*.
- Cuadro 2.** Algunas técnicas empleadas para demostrar la presencia de ciertos componentes en las glándulas del miracidio de *F. hepatica*.
- Cuadro 3.** Algunas proteasas reportadas de *Fasciola hepatica*.
- Cuadro 4.** Procedimientos de microscopía electrónica de transmisión para el estudio de *Fasciola hepatica*.
- Cuadro 5.** Concentración y cantidad total de las proteínas obtenidas de los extractos de miracidios y adultos de *F. hepatica*.
- Cuadro 6.** Título de los sueros de conejo y de ratones inmunizados con proteínas de *F. hepatica* y de *L. humilis*.
- Cuadro 7.** Número de bandas reconocidas, en tres muestras proteicas del adulto, del miracidio y de caracoles, por los tres anticuerpos anti-*F. hepatica* adulta, anti-miracidio y anti-*L. humilis*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*.
- Figura 2.** Diagrama que muestra la morfología general de los caracoles del género *Lymnaea*.
- Figura 3.** Proceso de invasión del miracidio de *F. hepatica* a *L. truncatula*.
- Figura 4.** Diagrama que representa el arreglo de las células epiteliales del miracidio de *F. hepatica*.
- Figura 5.** Diagrama que muestra la estructura celular de una sección transversal del miracidio de *F. hepatica*.
- Figura 6.** Estructura de la catepsina L1 de *Fasciola hepatica*.
- Figura 7.** Árbol filogenético en el que se muestra la ubicación de las catepsinas de *Fasciola hepatica*.
- Figura 8.** Diagrama de flujo que muestra los pasos generales de la metodología desarrollada.
- Figura 9.** Número de adultos y huevos de *F. hepatica* colectados en el Rastro Municipal de Toluca, Estado de México.
- Figura 10.** Corte semi-fino de miracidios de *F. hepatica* en los que se indican las medidas.
- Figura 11.** Acercamiento de cortes semi-finos que muestran miracidios de *F. hepatica* incubados a pH 5.0 y 7.2.
- Figura 12.** Microfotografía del extremo apical del miracidio de *F. hepatica*.
- Figura 13.** Microfotografía de la estructura de la papila apical del miracidio de *F. hepatica*.
- Figura 14.** Microfotografía de un corte de la parte media del miracidio de *F. hepatica*.
- Figura 15.** Microfotografía del extremo posterior del miracidio de *F. hepatica*.
- Figura 16.** Microfotografías del extremo anterior de miracidios de *F. hepatica* incubados en dos pH's diferentes.

- Figura 17.** Microfotografías de la papila apical de miracidios de *F. hepatica* incubados en dos pH's diferentes.
- Figura 18.** Patrón electroforético de las proteínas del parásito adulto y de los miracidios de *F. hepatica*.
- Figura 19.** Western blot que muestra las bandas de E-S, somáticas del adulto, de miracidios de *F. hepatica* y *L. humilis* reconocidas por anticuerpos anti-somático, anti-E-S y anti-Catepsinas L del adulto, anti-miracidios y anti-*L. humilis*.
- Figura 20.** Geles de acrilamida-gelatina que muestran las enzimas proteolíticas presentes en las muestras de adultos y miracidios de *F. hepatica*.
- Figura 21.** Actividad proteolítica de los diferentes extractos de *F. hepatica*.
- Figura 22.** Gel de acrilamida que muestra el patrón proteico de caracoles *L. humilis* infectados con miracidios de *F. hepatica*.

ANTECEDENTES

Generalidades

Fasciola hepatica es un trematodo cuya clasificación taxonómica es la siguiente (Dalton, 1999):

Reino Animalia
Phylum Platyhelminthes
Clase Trematoda
Subclase Digenea
Orden Echinostomida
Suborden Echinostomata
Familia Fasciolidae
Género *Fasciola*
Especie *hepatica*

Este parásito puede infectar a cualquier mamífero, incluyendo al ser humano y a algunas especies silvestres como canguros, elefantes, ciervos y aves; los animales más afectados, sin embargo, pertenecen a diversas especies de animales domésticos, como los bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, equinos y conejos (Quiroz, 1990; Hurtrez-Boussés *et al.*, 2001).

La fasciolosis es una enfermedad zoonótica que se ha considerado como una de las infecciones helmínticas más comunes de los rumiantes, con alta prevalencia en áreas tropicales, aunque su distribución es mundial y es reconocida como un serio problema veterinario debido a que induce bajas en la productividad de carne, leche, y lana, lo que origina grandes pérdidas económicas (Hurtrez-Boussés *et al.*, 2001). Actualmente, la fasciolosis es una enfermedad humana re-emergente, se sabe que al menos 17 millones de seres humanos están infectados con el parásito y 180 millones se encuentran en riesgo de infección (Mas-Coma *et al.*, 1999; Hurtrez-Boussés *et al.*, 2001). Se han reportado casos en países de los cinco continentes, presentando síntomas severos y patología, con características epidemiológicas particulares (Mas-Coma *et al.*, 2001).

Ciclo biológico

Los parásitos adultos de *Fasciola hepatica* se alojan en los conductos biliares de los hospederos mamíferos definitivos, dentro de los cuales producen huevos por autofecundación (ya que son hermafroditas) o por fecundación cruzada. Los huevos son ovalados y poseen un opérculo; son liberados con la bilis y salen al medio ambiente junto con las heces (Cruz-Reyes, 1986; Quiroz-Romero, 1990). Si las condiciones de humedad y temperatura son adecuadas, dentro del huevo madura el embrión, el cual 12 a 14 días después eclosiona, liberándose el miracidio. Para el proceso de eclosión se han propuesto varias hipótesis, una de ellas indica que la liberación se debe al aumento de movimientos de la larva; otra postula que el opérculo se rompe por la presión osmótica generada en el interior; una tercera hipótesis menciona que por acción de la luz se provoca una alteración en la permeabilidad de la membrana de la parte viscosa y por ello se abre; la última hipótesis sugiere que la eclosión se da gracias a la acción de enzimas proteolíticas, las cuales son estimuladas por la luz, siendo ésta la teoría más apoyada (Wilson, 1968). El miracidio es una larva ciliada, cuyo periodo infectante es muy limitado, ya que sólo puede sobrevivir alrededor de 24 horas, mientras nada activamente hasta encontrar a un caracol anfibio dulceacuícola de la familia *Lymnaeidae* (Hurtrez-Boussés *et al.*, 2001; Mas-Coma *et al.*, 2001). El miracidio penetra al caracol a través del epitelio y se desprende de las células epiteliales ciliadas que lo cubren. Una vez dentro se genera un esporoquiste, el cual migra y se aloja en la glándula digestiva del caracol; después produce de 5 a 8 redias por partenogénesis (reproducción asexual), las cuales en condiciones favorables, originarán redias hijas y en algunos casos redias nietas. A continuación, las redias se transportan hasta el hepato-páncreas, en dónde se producen las cercarias, organismos con cola, las cuales abandonan al molusco y nadan hasta enquistarse en algún vegetal, originando las metacercarias. El ciclo evolutivo dentro del caracol dura de 5 a 6 semanas (de Souza *et al.*, 2002). Las metacercarias pueden permanecer viables hasta por un año, con alta humedad y bajas temperaturas. Los

hospederos definitivos se infectan al consumir vegetales contaminados con metacercarias, las que al desenquistarse en el tubo digestivo, dejan en libertad a las fasciolas juveniles, también llamadas adoleescarias (NEJ, por sus siglas en inglés, Newly Excisted Juvenil). Éstas al penetrar la pared intestinal, llegan a la cavidad abdominal y avanzan hasta el hígado. Después de 3 ó 4 días, los estadios juveniles atraviesan la cápsula de Glisson y migran durante 6 semanas por el parénquima hepático, hasta alcanzar finalmente los conductos biliares donde culmina su desarrollo en aproximadamente 4 semanas. Cuando las fasciolas alcanzan su madurez sexual y comienzan a producir huevos (Dunn-Angus, 1983; Quiroz-Romero, 1990). El ciclo de vida se puede observar en la figura 1.

***Fasciola hepatica* y su hospedero intermediario (caracoles limnédidos)**

Se han reportado por lo menos 26 especies de caracoles, pertenecientes a siete géneros distintos, que pueden actuar como hospederos intermediarios de *F. hepatica*. Sin embargo, existen datos que indican que el parásito alcanza su estadio de cercaria sólo en unas cuantas especies de caracoles adultos (Dunn-Angus, 1983). Los caracoles del género *Lymnaea* son los principales hospederos intermediarios; estos moluscos son cosmopolitas, con miembros en todos los continentes, en las grandes islas y aún en algunas islas oceánicas pequeñas. *Fasciola hepatica* es un parásito originalmente asociado a Europa, donde es casi exclusivamente transmitido por *Lymnaea truncatula* (Sindou *et al.*, 1991). Aunque *L. truncatula* puede ser encontrado a más de 2,600 m de altitud en Europa, *F. hepatica* es típico de tierras bajas y no se ha hallado a grandes altitudes en dicho continente. Esta distribución se relaciona principalmente a la temperatura, ya que se sabe que el desarrollo larvario no se lleva a cabo a menos de 10° C (Mas-Coma *et al.*, 2001). Existen otras especies de limnédidos que pueden ser infectadas por el parásito: *L. auricularia*, *L. columella*, *L. glabra*, *L. natalensis*, *L. palustris*, *L. pereger*, *L. stagnalis* y *L. tomentosa* (Nansen, 1976). En México se ha reportado a

Lymnaea (Fossaria) cubensis, *L. humilis* y *L. bulimoides* principalmente (Cruz-Mendoza *et al.*, 2002). De manera natural se observó un mayor desarrollo del parásito en los caracoles de la especie *L. humilis* que en los *L. bulimoides* (Cruz-Mendoza *et al.*, 2004). Si bien esto puede deberse a factores de tipo ambiental, existe la posibilidad de que las especies tengan sensibilidades diferentes a la invasión por los miracidios (Cruz-Mendoza *et al.*, 2005).

Los caracoles requieren un medio acuático, en especial durante su periodo de crecimiento larvario; sin embargo, hay algunos que pasan la mayor parte de su vida en el medio terrestre (McCraw, 1957). Estos moluscos soportan la desecación y durante este período se entierran en el lodo y entran en una fase de disminución de actividad metabólica (Cawston, 1929). Los caracoles prefieren vivir en un hábitat ligeramente ácido, y se alimentan principalmente de algas, aunque en condiciones de laboratorio ingieren alimentos muy variados, como lechuga, avena o alimento para peces (Boray, 1969). En condiciones experimentales se mantienen en lodo estéril y húmedo, con agua aireada, con temperaturas de 22 a 24°C (Boray, 1969; Gutiérrez *et al.*, 2002). Se ha observado que se completa una generación de caracoles en aproximadamente tres semanas (McCraw, 1961).

El miracidio de *F. hepatica* penetra en diversas especies de caracoles a través del manto y en menor grado a través del pie o de los tentáculos (figura 2). Se sabe que la entrada del miracidio vía el manto es la más favorable para la migración y el desarrollo del esporoquiste, con la mayoría de los parásitos localizándose en la zona renopericardial a las 4 a 5 horas post-exposición (figura 2; Préveraud-Sindou y Rondelaud, 1995).

El miracidio de *F. hepatica* es capaz de discriminar entre diferentes especies de caracoles durante el proceso de acercamiento (Dalton, 1999). Existen factores que pueden afectar el proceso de infección; entre los más importantes se encuentran la humedad y la temperatura de la tierra (Christensen *et al.*, 1978). Además, se ha visto que cuando los caracoles se someten a condiciones de estrés, justo antes de la exposición a miracidios, se incrementa el porcentaje de infección (Abrous *et al.*, 2001). Se sabe que la capacidad de unión del miracidio a su hospedero

intermediario se ve afectada por el tiempo, el número de parásitos por caracol y algunos factores físico-químicos (como el nivel de salinidad o el pH) (Christensen *et al.*, 1978). Por otro lado, se ha visto que en un rango de pH entre 7 y 9, la capacidad del miracidio es óptima, mientras que los pHs por debajo de 5 o por arriba de 10 matan a los parásitos *in vitro* (Cruz-Reyes, 1986). Cruz-Mendoza y colaboradores (2006) observaron el efecto del pH (de 4.0 hasta 10.0) cuando los caracoles *L. humilis* se co-incubaron con 3 miracidios de *F. hepatica* durante 4 horas. Encontraron que los moluscos solos sobrevivieron en todos los pH's, excepto a pH 4.0; en el medio de pH neutro los caracoles en contacto con el trematodo sobrevivieron hasta 18 días, pero murieron a pHs menores a 6.5 y mayores a 9.0 cuando estaba presente el parásito, lo que probablemente se deba a la muerte de los miracidios a esos pHs, que podría ocasionar la liberación de enzimas líticas al medio y éstas afectar a los hospederos (Cruz-Mendoza *et al.*, 2006).

Efecto del miracidio de *Fasciola hepatica* sobre su caracol hospedero

Se ha observado que el miracidio de *F. hepatica* ejerce algunos efectos nocivos sobre los caracoles, incluyendo actividad o decremento en la fecundidad, incremento en la mortalidad, aumentada actividad de la glándula digestiva, cambios metabólicos y sensibilidad incrementada a estrés ambiental (Sindou *et al.*, 1990; Sindou *et al.*, 1991; Gutiérrez *et al.*, 2000). También se ha reportado que la presencia del parásito produce necrosis epitelial en los riñones de los caracoles (Préveraud-Sindou y Rondelaud, 1992). Por otro lado, el molusco es capaz de montar una "respuesta inmune" de la que no se tienen aún muchos datos (Jackson, 1976). Se conoce que en el plasma del caracol se encuentran algunas enzimas, como glicosidasas, que son activas a pH fisiológico (7.2-7.4); se sugiere que éstas juegan un papel importante en la inflamación y degradación de microorganismos (Zelck, 1999). Además, en respuesta a la infección el caracol

genera una reacción amebocítica, que corresponde a una reacción celular generalizada y localizada entre el pericardio y el riñón, capaz de producir daño al parásito (Roundelaud y Barthe, 1982). Monteil y Matricón-Gondran (1991) reportaron una producción incrementada de hemocitos en caracoles *L. truncatula* infectados con *F. hepatica*. Sin embargo, para asegurar su sobrevivencia el parásito es capaz de evadir la respuesta del caracol, gracias a que logra expresar sobre su superficie algunos antígenos propios del caracol y de esta forma no es reconocido por las células del “sistema inmune” del molusco (Jackson, 1976; Lodes y Yoshino, 1990). Asimismo, se ha reportado la existencia de caracoles susceptibles y resistentes a la infección por el trematodo (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Reconocimiento y unión del miracidio de *Fasciola hepatica* a caracoles del género *Lymnaea*

Después de eclosionar, el miracidio nada activamente en busca de un caracol hospedero, penetra y se transforma en esporoquiste, para continuar con su ciclo biológico (Préveraud-Sindou y Rondelaud, 1995). El miracidio no es capaz de penetrar al molusco después de la primera hora de haber salido del huevo y la capacidad óptima de invasión es de 1.5 a 2 horas después de la eclosión; posteriormente la habilidad declina lentamente (Dunn-Angus, 1983; Dalton, 1999).

El proceso de invasión de un caracol por el miracidio de *Fasciola hepatica* incluye:

- 1.- Unión a la superficie del hospedero.
- 2.- Penetración de la superficie corporal del caracol.
- 3.- Migración hasta el sitio de localización.

El hecho de que el parásito encuentre a su hospedero intermediario y la existencia de un contacto miracidio-caracol ha sido tema de mucho debate; se han planteado varias hipótesis, una de ellas consiste en que el trematodo que nada libremente encuentra a su hospedero como resultado de movimientos al azar; otra se basa en

la idea de que existe un mecanismo específico de atracción y unión, debido principalmente a la presencia de moléculas tanto del caracol, como del miracidio (Nansen, 1976; Davids y Yoshino, 1995); para apoyar esta última, se ha reportado que la unión es estimulada por ácidos grasos de cadena corta presentes en el *mucus* del caracol y que atraen al parásito (Kalbe *et al.*, 1997). En el momento en que el miracidio entra en contacto con el caracol, empieza a girar sobre su eje mayor (Dalton, 1999). Entonces, se dan interacciones mecánicas entre la papila apical del miracidio y las microvellosidades del caracol, que son necesarias para una unión estable; enseguida el parásito comienza a secretar el contenido de sus glándulas, apical y unilaterales, antes de la penetración al tejido del caracol. Se ha reportado la presencia de glicoconjugados macromoleculares en el *mucus* del caracol como sustancias capaces de estimular al miracidio para que penetre (Kalbe *et al.*, 1997).

Para el proceso de penetración del miracidio al caracol, se cuenta con dos supuestos, uno de ellos contempla un proceso mecánico, con la papila apical del miracidio actuando como una cuña que separa las células epidérmicas del hospedero, lo que permitiría la entrada del parásito (Buzzell y Gerald, 1983). Otra opción se basa en la presencia de una perforación en el epitelio del caracol, la cual es creada por la lisis de las células epiteliales; por tanto, esta acción parece ser más química que mecánica (Kendall, 1965). En general, se apoya la idea de que la penetración se lleva a cabo por la acción histolítica de una secreción de las glándulas presentes en el extremo anterior del miracidio (Kendall, 1965; Buzzell y Gerald, 1983; Dunn-Angus, 1983). De acuerdo a algunos estudios el proceso de penetración se ha dividido en tres fases (Kendall, 1965; Dalton, 1999):

- (I) En menos de 1 minuto, después de la unión, las células ciliadas del extremo anterior se desprenden.
- (II) Los cilios remanentes golpean violentamente y después de 5 minutos los cilios son separadas cerca de la superficie celular.

- (III) El miracidio permanece embebido en la superficie del caracol cerca de 15 minutos antes del inicio de la migración a través del tejido del caracol.

En la figura 3 se pueden observar microfotografías del proceso de invasión de un miracidio de *F. hepatica* a un caracol limnéido, en las que es posible observar que una vez que el parásito encuentra la zona del molusco que va a invadir, libera algunas sustancias capaces de producir lisis en las células epiteliales del caracol, lo que indica que no se trata de un proceso mecánico, sino de uno lítico (Kendall, 1965).

Estructura del miracidio de *Fasciola hepatica*

La ultraestructura del miracidio de *Fasciola hepatica* se ha descrito por medio de estudios de Microscopía Electrónica. Se ha observado que posee distintos tipos celulares y estructuras muy particulares, de las cuales se conocen sólo algunas características; sin embargo, todavía faltan por identificar algunos detalles, como el número exacto de células que posee (cuadro 1) (Wilson, 1969; Southgate, 1970).

A continuación se describen algunas características de las células del miracidio de *F. hepatica* que se han identificado:

- a. Células epiteliales: La superficie del miracidio de *F. hepatica*, cubierta con una delgada capa de mucopolisacáridos ácidos, consta de 21 células epiteliales largas y de 1.5 μm de ancho, están acomodadas en cinco hileras de seis, seis, tres, cuatro y dos células, del lado anterior hacia el posterior, respectivamente (figura 4). Dichas células epiteliales poseen cilios anclados de forma longitudinal y se caracterizan por poseer una gran cantidad de mitocondrias y de glicógeno (Wilson, 1969; Southgate, 1970).

- b. Capa citoplásmica: Entre las células epiteliales se ha identificado una capa citoplásmica delgada, también llamada capa sub-epidérmica, que da origen a las crestas intercelulares prominentes, está asociada a un material fibroso extracelular y posee varios núcleos (figura 4 y 5) (Wilson, 1969).
- c. Fibras musculares: Por debajo de la capa delgada de citoplasma se ubican fibras musculares circulares y longitudinales; las últimas son más grandes cuando se encuentran en los extremos del miracidio; pueden ser anucleadas y su citoplasma es granular con mitocondrias grandes y agregaciones de glicógeno (Wilson, 1969).
- d. Células vesiculadas: Entre las fibras musculares se encuentran células con una forma larga y son vesiculadas, se encuentran ordenadas en tres grupos: un pequeño número de células ubicadas por atrás del poro excretor, un número mayor que se encuentra detrás del cerebro y un grupo pequeño por enfrente de éste mismo órgano; el tercer grupo se comunica con la base de la papila apical. La característica principal de este tipo celular es que en su citoplasma posee un gran número de vesículas similares a aquellas presentes en las crestas intercelulares; el citoplasma periférico está elongado en proyecciones y las puntas pasan entre las fibras musculares para formar conexiones con la delgada capa citoplásmica (Wilson, 1969).
- e. Células germinales: En el extremo posterior del miracidio se ha identificado un grupo de células germinales, las cuales se caracterizan por poseer un núcleo muy grande y presentan una forma irregular (Wilson, 1969).
En la figura 5 se muestra un diagrama de un corte transversal en los que se puede identificar algunos de los tipos celulares presentes en el miracidio de *F. hepatica*.
- f. Papila apical: El extremo anterior del miracidio tiene una proboscis móvil, retráctil y muscular, que corresponde a una papila apical, la cual juega un papel importante en la penetración del tejido del caracol. Contiene una glándula apical grande y cuatro glándulas unilaterales (Wilson, 1969;

Wilson, 1971). La glándula apical del miracidio es una estructura prominente de tamaño variable y forma un ducto que pasa a un extremo de la papila apical. Es un sincitio que posee tres o cuatro núcleos, es más ancha en el lado posterior y ocupa la mayoría del centro de la papila apical (Wilson, 1969; Wilson, 1971). A cada lado se encuentran pares de glándulas unicelulares que son llamadas células glandulares accesorias, las cuales tienen conductos que están comunicadas con un extremo de la papila apical. Estas células se parecen mucho a las células vesiculadas, pero difieren en que están abiertas por ductos en la base de la papila apical hasta comunicarse con los puentes intercelulares entre las células epiteliales (Wilson, 1971).

La glándula apical del miracidio contiene gránulos secretores, cada uno de ellos consiste de un centro oscuro rodeado por un espacio estrecho y un halo delgado (Wilson, 1969). Buzzell y Gerald (1983) encontraron que la glándula apical se tiñe con Azul Victoria-ácido perfórmico (PFA-VB), la cual es una tinción para identificar cisteínas, lo que indicaría la presencia de proteínas dentro de los gránulos secretores (cuadro 2). Además, se ha indicado que el número y concentración de los gránulos apicales disminuye durante la unión del miracidio al caracol (Buzzell y Gerald, 1983). Wilson (1971) demostró la presencia de fosfatasa ácida (enzima hidrolítica) en el citoplasma de la glándula apical y en las células epiteliales del miracidio. Además, describió la presencia de agentes citolíticos y cuerpos secretores en las células glandulares. Para poder identificar estas estructuras se han llevado a cabo algunos estudios de microscopía electrónica en los que se emplearon distintos protocolos, por lo cual los resultados pueden ser variables. Sin embargo, no se cuenta con estudios más detallados sobre la existencia de proteasas presentes en la glándula apical o en células cercanas a ella, que podrían participar en el proceso de invasión de los miracidios a los caracoles limnéticos.

Proteasas de *Fasciola hepatica*

Generalidades de las proteasas

Las proteasas son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos y por tanto, originan el desensamble de proteínas. La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (1984) ha recomendado utilizar el término peptidasa para el conjunto de hidrolasas de enlaces peptídicos. Las peptidasas comprenden dos grupos de enzimas: endopeptidasas y exopeptidasas; las cuales cortan enlaces peptídicos en puntos dentro de la secuencia de la proteína y remueven los aminoácidos secuencialmente desde el extremo amino terminal o carboxilo terminal, respectivamente. El término proteasa es utilizado como un sinónimo de endopeptidasa. Existen 4 clases de proteasas, las cuales se han clasificado de acuerdo a su mecanismo catalítico (Rawlings y Barrett, 1993):

Serin-proteinasas: Esta clase comprende dos familias, la familia de la quimiotripsina, que incluye las enzimas de los mamíferos, como la tripsina o la elastasa y la familia de la substilina, que incluye a las enzimas bacterianas. La estructura general tridimensional es diferente en las dos familias, sin embargo, tienen el mismo sitio geométrico activo y la vía de catálisis procede por el mismo mecanismo. Exhiben afinidad por diferentes sustratos y especificidades variables, las cuales están relacionadas con las sustituciones de aminoácidos en los sub-sitios de la enzima que interactúan con los residuos de los sustratos. Los tres residuos que forman el sitio activo son esenciales en el proceso de hidrólisis peptídica.

Cisteín-proteinasas: Esta familia incluye las proteasas de plantas como la papaína, la actinidina o la bromelaína, algunas catepsinas lisosomales mamíferas, calpaínas citosólicas (activadas por calcio) y algunas proteasas parasitarias (por ejemplo de *Trypanosoma* o *Schistosoma*). La papaína es el prototipo y es la más

estudiada de la familia. También son llamadas tiol-proteasas, debido a que en su sitio activo poseen un grupo tiol (formado por dos azufres que se unen).

Asparto-proteinasas: La mayoría pertenecen a la familia de la pepsina, en la que se encuentran enzimas digestivas como la pepsina, quimiosina, catepsinas D lisosomales, enzimas procesadoras como la renina y algunas proteasas fúngicas. Una segunda familia comprende enzimas virales del tipo de la proteasa del virus del SIDA, también llamada retropepsina. Son moléculas bilobulares con el sitio activo localizado entre los dos lóbulos homólogos. Cada lóbulo contribuye con un residuo de aspartato del sitio activo catalítico, de tal manera que requieren la dimerización para formar una enzima activa.

Metalo-proteinasas: Son encontradas en bacterias, hongos y en organismos superiores. Difieren ampliamente en sus secuencias y en sus estructuras; sin embargo, la mayoría de estas enzimas contienen un átomo de zinc, el cual es activo catalíticamente. En algunos casos el zinc puede ser reemplazado por otro metal como el cobalto o el níquel sin pérdida de la actividad. Un ejemplo de este tipo de enzimas es la termolisina bacteriana.

Las proteasas se han identificado en diversos sistemas biológicos, desde virus hasta vertebrados. En organismos parásitos se ha visto que entre las principales se encuentran las cisteín-proteasas (Sajid y Mckerrow, 2002). Algunos estudios de filogenia molecular sugieren que se desarrollaron temprano en la evolución y funcionan como una herramienta para degradar proteínas, ya sea intra o extracelularmente, de acuerdo a las necesidades de los parásitos, como son nutrición, invasión tisular o celular, enquistamiento, desenquistamiento, eclosión, procesamiento o activación de proteínas o evasión del sistema inmune del hospedero; esto indica que muchas de las cisteín-proteasas tienen una gran número de funciones extra-lisosomales. De acuerdo a diversos estudios se sabe que las cisteín-proteinasas parasitarias más importantes corresponden a las

proteasas “tipo papaína”, las cuales se han dividido en dos tipos C1 (catepsinas B y L) y C2 (tipo calpaína) (Sajid y Mckerrow, 2002).

Proteasas de Fasciola hepatica

Los estadios de *Fasciola hepatica* invasivos para el hospedero definitivo secretan enzimas proteolíticas hacia el medio en el que se encuentran. Se sabe que la función primaria de dichas proteasas es la degradación extracelular de proteínas del hospedero para nutrición, invasión y migración; otras son requeridas para la activación de otras enzimas del parásito (Law *et al.*, 2003). La adolescaria, también llamada parásito joven recién desenquistado, presenta enzimas proteolíticas en extractos somáticos y en material de excreción-secreción, las cuales se han sugerido participan en la degradación de tejidos del hospedero mamífero, lo que le permite penetrar en la pared del intestino y después atravesar el hígado, proceso que dura aproximadamente 7 semanas, hasta llegar y alojarse en los conductos biliares (cuadro 3; Dalton y Heffernan, 1989; Tkalcevic *et al.*, 1995; Law *et al.*, 2003).

Las proteasas de *F. hepatica* adulta de origen somático y secretadas han mostrado tener actividad contra una variedad de sustratos, como son gelatina, hemoglobina, colágeno, inmunoglobulina, globina, albúmina, laminina, fibronectina y células T ovinas (Law *et al.*, 2003). Esto es apoyado por algunos trabajos en los que demostraron por microscopía electrónica, que el parásito adulto posee dos tipos de células en el glicocálix del tegumento, que difieren en la naturaleza de sus vesículas secretorias, las cuales contienen proteasas con distintas características (Gallagher y Threadgold, 1967; Threadgold, 1976; Hanna, 1980a; Hanna 1980b). Una vez alojados en los conductos biliares de los hospederos definitivos, los parásitos liberan productos de excreción-secreción, en los cuales se han identificado algunas proteasas; siendo las más estudiadas las catepsinas L1 y L2 (CL1 y la CL2), las cuales corresponden a cisteín-proteasas (cuadro 3; Berasaín *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2004; Alcalá-Canto *et al.*, 2005).

No se cuenta con informes en la literatura mundial sobre la existencia de proteasas presentes en los estadios de *F. hepatica* que se desarrollan en los moluscos hospederos y tampoco hay reportes sobre enzimas liberadas por el miracidio cuando se encuentra en contacto con su hospedero, las cuales le permitirían la penetración a los tejidos del caracol y su posterior desarrollo, para así continuar con su ciclo biológico.

Catepsinas

Las catepsinas pertenecen a una clase de enzimas proteolíticas que son expresadas por todos los parásitos helmintos y en muchos casos son secretadas (Dalton *et al.*, 2003). *Fasciola hepatica* posee actividad enzimática de tipo cisteín-proteasa, cuya presencia se ha reportado en los productos de excreción-secreción.

Catepsinas L: En el parásito adulto se han reportado algunas proteasas, siendo las catepsinas L1 y L2 las predominantes, llamadas FheCL1 y FheCL2, respectivamente; representan las principales proteínas en el medio de cultivo cuando las fasciolas se incuban a 37°C (Dowd *et al.*, 1994). La mayoría de estas catepsinas L son expresadas por las células que delimitan el intestino del parásito (Simpkin *et al.*, 1980; Dalton *et al.*, 2003). Se han aislado transcritos que codifican para ambas proteasas a partir de bibliotecas de cDNA, los cuales dan origen a zimógenos con estructuras similares a las catepsinas L de vertebrados, que consisten de un péptido señal hidrofóbico (12-20 residuos), un pro-segmento (100 residuos) y la enzima madura (200 residuos). El pro-péptido es un potente inhibidor de la enzima madura (Roche *et al.*, 1999). Ésta última consiste de una cadena polipeptídica simple o de una cadena pesada unida por un puente disulfuro a una cadena ligera (figura 6; Smith *et al.*, 1993; Stack *et al.*, 2008). Las FheCL1 y FheCL2 no poseen sitios de N-glicosilación en la porción de la enzima madura. La secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de la CL2 de *F.*

hepatica es 47% homóloga a las catepsinas L de hígado de pollo, de rata y humana, y 40% similar a la de *Trypanosoma cruzi*. Además, posee 20% de similitud con la catepsina B de *Schistosoma mansoni* (Dowd *et al.*, 1994). De acuerdo a estudios filogenéticos se ha planteado que las catepsinas de *F. hepatica* y *F. gigantica* aparecieron hace 19 millones de años y que la FHeCL1 se encuentra más cerca de la catepsina L de *F. gigantica*, que de la FheCL2 (figura 7; Sajid y McKerrow, 2002; Irving *et al.*, 2003). La FheCL1 tiene un peso molecular de 27 kDa y la FheCL2 de 29 kDa (Dowd *et al.*, 1994). Se ha visto, mediante ensayos con geles de gelatina (zimografía), que las catepsinas L son capaces de degradar esta proteína (Smith *et al.*, 1993). Su especificidad se ha examinado con diferentes sustratos peptídicos fluorogénicos; ambas demostraron una alta actividad catalítica por el sustrato comercial carbobenzoxi-fenilalanil-arginil-7-amino-4-trifluorometil-coumarina (Z-Phe-Arg-NHMec) (Rege, *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1994; Cordova *et al.*, 2001; Law *et al.*, 2003). Además, la FheCL2 es capaz de degradar sustancias que contienen prolina en la posición P2, y por ello, el sustrato carbobenzoxi-glicil-prolil-arginil-7-amino-4-trifluorometilcoumarina (Z-Gly-Pro-Arg-NHMec), se emplea para distinguir entre ambas catepsinas (Dalton *et al.*, 2003). Las catepsinas L de *F. hepatica* son activas en un amplio rango de pH, de 3.0 hasta 10.0, presentando su máxima actividad a pH 8.0. Algunos estudios de estabilidad han demostrado que la FheCL1 retiene el 100% de actividad cuando es incubada a 37° C durante 24 horas, y aún 72 horas después conserva hasta el 90% de su actividad original. Sin adición de agentes inhibidores, las catepsinas L pierden toda su actividad después de 3 ciclos de congelación/descongelación. Además, se ha visto que se incrementa su actividad en presencia de EDTA, lo que sugiere que las catepsinas se inhiben por iones metálicos como el Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ y Hg²⁺ (Dowd *et al.*, 2000).

Catepsina B: En el estadio joven de *F. hepatica* se ha observado la presencia de la Catepsina B (FhCatB), como la proteasa principal (Law *et al.*, 2003). Esta proteína pertenece al tipo de las cisteín-proteasas, está compuesta por 326

aminoácidos, tiene un peso molecular de 29 kDa, un pH óptimo de 7.5; posee actividad gelatinolítica, digiere inmunoglobulinas ovinas y albúmina de suero bovino, sin embargo no es capaz de degradar hemoglobina bovina. Degrada el sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-NHMec con mayor preferencia que el Z-Arg-Arg-NHMec y Z-Arg-NHMec. También se ha reportado la presencia de catepsina L1 y L2, pero en menor proporción que la catepsina B (Wilson *et al.*, 1998).

Proteasas de *Fasciola gigantica* y *Schistosoma mansoni*, parásitos similares a *Fasciola hepatica*

Mohamed y colaboradores (2005) identificaron la presencia de actividad proteolítica en algunos estadios de *Fasciola gigantica*, desde huevos de 0 a 12 días hasta miracidios y adultos. Tanto el total de unidades como la actividad específica de proteasa en los huevos se incrementaron gradualmente del día 0 al día 12 de desarrollo; también en los miracidios y los adultos hubo un incremento significativo en la actividad proteolítica (Mohamed *et al.*, 2005).

Se han realizado algunos trabajos para el estudio de las proteasas de *Schistosoma mansoni*, principalmente analizando las del parásito adulto, ya que es el que se encuentra en humanos, y menos sobre la presencia en otros estadios (Asch y Dresden, 1979; Chapell y Dresden, 1987; Smith *et al.*, 1994; Brady *et al.*, 1999). Se sabe que todas las fases de este trematodo poseen cisteín-proteinasas, teniendo de mayor a menor actividad el extracto completo del parásito adulto, los productos de excreción-secreción, la cercaria, el miracidio, la esquistosómula, los huevos y el esporoquiste (Marikovsky *et al.*, 1988; Monroy y Dresden, 1996; Dalton *et al.*, 1997). Se sabe que el parásito adulto y la esquistosómula secretan enzimas proteolíticas, las cuales están involucradas, al igual que en *F. hepatica*, en una amplia variedad de funciones, como la adquisición de nutrientes, la penetración y el movimiento a través de los tejidos de los hospederos mamíferos (Marikovsky *et al.*, 1988; Yoshino *et al.*, 1993; Dalton *et al.*, 1996; Caffrey *et al.*, 1997;).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fase infectiva de *Fasciola hepatica* para caracoles del género *Lymnaea* corresponde al miracidio, que penetra a éste gracias al reconocimiento y posterior unión al tejido epitelial del caracol. Esta fase del parásito cuenta con un tegumento en el cual hay células que poseen vesículas, las cuales podrían contener proteínas y enzimas hidrolíticas, que le permitirían romper una parte del tejido del caracol y así penetrar. Una observación que apoya esto es que conforme comienza el proceso de penetración, la cantidad de gránulos apicales disminuye. Además, se tienen datos reportados acerca de *Schistosoma mansoni*, un parásito similar en varios aspectos biológicos, en los que se ha confirmado la presencia de proteasas que son secretadas cuando se encuentra en contacto con su hospedero intermediario, el caracol *Biomphalaria glabrata*. En la literatura no se cuenta con informes de cuales podrían ser las proteasas presentes en los gránulos del miracidio de *Fasciola hepatica*. Si el miracidio es capaz de liberar proteasas al medio, y así poder invadir a sus hospederos intermediarios, es importante conocerlas, identificarlas y caracterizarlas, para así, relacionarlas con las proteasas informadas en la literatura mundial de los otros estadios del parásito, como la adolescaria y el parásito adulto. Además, el estudio de la interacción entre el miracidio y caracoles del género *Lymnaea*, permite establecer un modelo de la relación hospedero-parásito que se puede estudiar en condiciones de laboratorio útil tanto para otros estadios del mismo parásito, como de otros filogenéticamente relacionados. La identificación de alguna proteasa que sólo sea expresada por el miracidio se puede tomar en cuenta como blanco farmacológico para control en los hospederos intermediarios.

HIPÓTESIS

El miracidio de *Fasciola hepatica* expresa proteasas diferentes a las reportadas para el parásito adulto.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de proteasas en el miracidio de *Fasciola hepatica* e identificar sus características bioquímicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar las proteasas del miracidio de *F. hepatica* con aquellas reportadas para el parásito adulto.

METODOLOGÍA

En la figura 8 se puede observar el diagrama de flujo pre-establecido, en el que se indican los pasos generales que se desarrollaron.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material biológico

En el Rastro Municipal de Toluca, Estado de México, se colectaron vesículas biliares e hígados de bovinos infectados con *Fasciola hepatica*.

Se recolectaron muestras de lodo y caracoles del género *Lymnaea* en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agro-Silvo-Pastoril (CEIEPASP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, localizado en Chapa de Mota, Estado de México (zona endémica de fasciolosis).

Obtención de miracidios de *F. hepatica*

El contenido de vesículas biliares, en el que se encontraban los huevos del parásito, se dejó reposar y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron cuatro a cinco lavados con agua destilada. Los huevos se incubaron en oscuridad y a una temperatura constante de 26° C, alrededor de 18 días. Una vez transcurrido este tiempo, se tomó una muestra y se revisó al microscopio para observar los huevos del parásito con el embrión completamente formado en su interior. Se colocaron en refrigeración (4° C) y en oscuridad hasta su uso. Para la eclosión de los miracidios, se pusieron los huevos maduros a 30 cm de una fuente luminosa, alrededor de 45 minutos, al microscopio se observaban los huevos vacíos y los miracidios en movimiento.

Obtención de parásitos adultos de *F. hepatica*

Se colectaron los parásitos adultos de los conductos biliares de hígados y se depositaron en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.01 M, estéril, a 37° C. Para su lavado, se colocaron en PBS 0.01M, pH 7.2, conteniendo una mezcla comercial de antibióticos (Sigma), a una concentración 5x; se mantuvieron en agitación lenta por 10 min, a 37° C. Se realizaron cinco lavados, y un sexto con solución balanceada de sales de Hanks (1X), con antibióticos (5x).

Preparación de proteínas de excreción-secreción del parásito adulto de *F. hepatica*

Los parásitos adultos, recién lavados, se depositaron en cajas Petri con medio de cultivo RPMI-1640 (0.5 mL por parásito), que contenía antibióticos 1X; y se incubaron durante 12 horas, a 37° C y agitación lenta. El sobrenadante, en el que se encontraban los productos de excreción-secreción (E-S) del trematodo, se filtró con membranas de 0.20 µm. A una parte del filtrado se le añadió una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Sigma). Ambas partes se fraccionaron y se congelaron en nitrógeno líquido (-192° C) hasta su uso.

Obtención de proteínas somáticas de *F. hepatica* adulta

Los parásitos adultos congelados se pesaron y se colocaron en un mortero estéril, se adicionó nitrógeno líquido, se molió hasta la obtención de un polvo fino, el cual se recuperó en PBS estéril, en una relación 0.5 mL de PBS/g de fasciolas y se homogeneizó, hasta que al microscopio no se observaron detritus celulares. Se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos. En el sobrenadante se encontraban las proteínas somáticas del parásito, se cuantificaron y a una parte, se le añadieron inhibidores de proteasas. Se fraccionó y se congeló a -192° C hasta su uso.

Obtención de proteínas del miracidio de *F. hepatica*

Una vez que eclosionaron los miracidios, se separaron de los huevos vacíos mediante sedimentación. Enseguida, se centrifugaron a 3,000 rpm, durante 20 min, a 4° C. Se colectó el botón de miracidios, el cual se sonicó en frío por 5 ciclos de 20 segundos, cada uno, con descanso de 40 segundos; se colectó una fracción, a la que se le llamó extracto completo. El siguiente paso consistió en centrifugar 30 minutos, a 13,500 rpm y a 4° C, se colectó el botón y el sobrenadante. Las tres porciones colectadas se fraccionaron y se congelaron a -192° C hasta su uso.

A todas las muestras se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (1976) con el reactivo comercial de Bio-Rad.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Esta técnica se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970), utilizando geles de poliacrilamida-SDS. Se utilizó un marcador de peso molecular, de amplio rango, comercial (Bio-Rad). Las muestras de los productos de excreción-secreción, de extractos completos del parásito adulto y de los miracidios, se disolvieron en amortiguador de muestra, el cual contenía glicerol (10%), Tris-HCl, 2M pH 6.8, y azul de bromofenol (0.01%). Los geles se sometieron a electroforesis vertical, mediante un voltaje constante (200 V), con amortiguador de glicina (0.192 M), Tris-HCl (0.025 M) y SDS (1%). Posteriormente los geles se tiñeron con azul de Coomassie brillante R-250 disuelto en metanol (0.1%) y fueron desteñidos con una solución de metanol: ácido acético: agua (20:10:70).

Zimografía

Las muestras de los sobrenadantes, de excreción-secreción, de extractos completos del parásito adulto y de los miracidios, además del marcador de peso molecular, se diluyeron en amortiguador que contenía SDS. Se calentaron en baño maría, antes de cargarlas en geles al 12% de poliacrilamida (para su

separación), conteniendo 0.1 % de gelatina como sustrato (GS-PAGE) (Heussen y Dowdle, 1980; Dalton y Heffernan, 1989; García-Carreño *et al.*, 1993; Leber y Balkwill, 1997; Piacenza *et al.*, 1997). Los geles se sometieron a electroforesis vertical, mediante un voltaje constante (200 V) con amortiguador de glicina (0.192 M), Tris-HCl (0.025 M) y SDS (1%). El siguiente paso consistió en lavar dos veces los geles en una solución amortiguadora, que contenía Triton X-100 (2.5%), 30 minutos, en agitación lenta y a 37° C. Después se incubaron por 2 horas en el amortiguador de incubación solo, en agitación lenta y a 37° C. Enseguida, se tiñeron los geles con azul de Coomassie brillante-R disuelto en metanol: ácido acético: agua (20:10:70); las bandas blanquecinas correspondían a las proteasas que actuaron sobre la gelatina (Dalton y Heffernan, 1989).

Identificación del tipo de proteasa

Las muestras del adulto y de los miracidios, se incubaron en diferentes compuestos y se probaron mediante zimografía y para actividad enzimática:

Potenciadores de tiol-proteasas: DTT (ditiotreitól) a una concentración final de 5mM (Dalton y Heffernan, 1989).

Inhibidores de tiol-proteasas: MMTS (5-metil-metano-tiosulfonato) a concentración final de 100 y 500 µM.

Purificación de proteasas

Las catepsinas L1 y L2 del parásito adulto fueron purificadas y donadas en el laboratorio de Bioquímica Genética, del Instituto Nacional de Pediatría. Los productos de excreción-secreción del trematodo adulto se sometieron a cromatografía de intercambio iónico en HPLC, utilizando una columna de Q sefarosa (Amersham), equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, y detectadas a una absorbancia de 280 nm. Las fracciones colectadas, enriquecidas con catepsina, se concentraron. A continuación, se colocaron en una columna de filtración en gel Superdex 75 (Amersham), equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 7.0. Las enzimas

purificadas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE).

Inmunización de conejos con proteínas de *F. hepatica* adulta

Se inmunizaron conejos con proteínas de excreción-secreción, proteínas somáticas y catepsinas purificadas del parásito adulto. Se llevó a cabo el siguiente esquema de inmunización:

Día cero: se inyectó, vía subcutánea, una cantidad equivalente a 200 µg de proteína con adyuvante completo de Freund (v/v).

Días 15, 30 y 45: se inoculó la misma cantidad de proteína, con adyuvante incompleto de Freund (v/v).

En cada inmunización se tomó una muestra de sangre y se separó el suero, el cual se fraccionó y se congeló a -20° C, hasta su uso. Se continuó el esquema de inmunización hasta tener un título de anticuerpos mayor a 1:32,000, el cual se determinó por ELISA indirecto para detección de anticuerpos anti-proteínas del adulto de *F. hepatica* (Pfister *et al.*, 1984).

Inmunización de ratones con proteínas del extracto completo de miracidios de *F. hepatica* y de caracoles *L. humilis*

Se emplearon ratones de la cepa Balb/c; 2 de ellos se inmunizaron con proteínas del extracto completo de 2 caracoles *L. humilis*. Otros 4 ratones se inmunizaron con miracidios completos. Se llevó a cabo el siguiente esquema de inmunización:

Día cero: se inyectó, vía intraperitoneal, una cantidad equivalente a 200 µg de proteína con adyuvante completo de Freund o con 5, 10, 15 o 20 miracidios vivos.

Día 7: se inoculó la misma cantidad de proteína, con adyuvante incompleto de Freund o con la cantidad correspondiente de miracidios.

En cada inmunización se tomó una muestra de sangre y se separó el suero, el cual se fraccionó y se congeló a -20° C, hasta su uso. Se determinó el título de anticuerpos por ELISA indirecto para detección de anticuerpos anti-proteínas del miracidio de *F. hepatica* y caracol *L. humilis*.

Western blot

El primer paso consistió en una electroforesis de proteínas, de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970), utilizando geles de poliacrilamida al 11%, en condiciones reductoras. Se colocaron, en carriles contiguos, las siguientes muestras: proteínas de excreción-secreción del adulto, proteínas somáticas del adulto y proteínas somáticas del miracidio. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de acuerdo al método de Towbin y colaboradores (1979). A continuación, las membranas se bloquearon toda la noche a 4° C, en leche descremada al 5% disuelta en PBS con Tween al 0.05% (PBS-T), para evitar uniones inespecíficas. Se lavaron tres veces con PBS-T y dos veces con PBS.

El segundo paso consistió en la inmunodetección, para la cual, las membranas se cortaron, dejando juntas las tres muestras. Cada membrana se incubó con los sueros de conejos y de ratones inmunizados con proteínas de *F. hepatica*, en el caso de los controles negativos se empleó la muestra de suero pre-inmune de un conejo y de un ratón, a una dilución 1: 500 en PBS-T, por 2 horas a 37° C. Se realizaron tres lavados con PBS-T y dos con PBS. Enseguida, cada membrana se incubó con un conjugado comercial (Sigma) anti-IgG de conejo o ratón-peroxidasa, a una dilución 1:1000, en PBS-T; se incubaron a 37° C durante dos horas. Después de realizar los lavados correspondientes, se reveló con la solución cromógeno/sustrato, que contenía por cada 10 mL de PBS: 0.06 g de 4-cloro-1-naftol, disuelto en 10 mL de metanol absoluto y 10 µL de H₂O₂ al 30%.

Estudios de microscopía electrónica de transmisión (MET)

Esta metodología se desarrolló en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Se realizó un ensayo piloto, de acuerdo a los estudios reportados para el análisis de adultos y miracidios de *F. hepatica* y con base a algunos protocolos similares (Hunter, 1984; Vázquez Nin y Echeverría, 2000), y las condiciones elegidas se muestran en el cuadro 4. Los miracidios recién eclosionados se colocaron en tubos de polipropileno de 15 mL,

se centrifugaron a 1,000 rpm durante 5 minutos y se dejaron reposar por 5 minutos, con esto quedaron en el fondo los huevos vacíos y los no eclosionados, mientras que en el sobrenadante se observaron los miracidios nadando. Para la obtención de un “botón” de los parásitos, el sobrenadante se pasó a tubos nuevos y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 minutos, a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron los amortiguadores de fosfatos de diferentes pH's (5.0 y 7.0) a cada botón y se incubaron durante 10 minutos. Una vez que se desarrolló el procedimiento mencionado en el Cuadro 4, se realizó la observación en un microscopio electrónico, marca Zeiss modelo EM900, a 50 Kv. Se tomaron imágenes en placas fotográficas, marca Kodak 4489, se revelaron e imprimieron.

Determinación de la actividad enzimática

Para identificar el tipo de actividad enzimática presente en los miracidios, se empleó el siguiente sustrato, el cual se ha utilizado para evidenciar a las proteasas del parásito adulto (Cordova *et al.*, 2001; Law *et al.*, 2003; Rege, *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1994):

Z-Phe-Arg-NHMec (NHMec = Metilcoumarina-7 amida) (Sigma).

Para un volumen final de 1 mL, se agregó ditioneitol (DTT) 5 mM, 13 μ mol del sustrato y se disolvieron en amortiguador de Tris 1.0 M, pH 7.0. A continuación, se adicionaron 60 μ g de proteína total de cada una de las muestras, a la mezcla anterior, se incubó a 37°C y se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro de fluorescencia (Marca Perkin Elmer), a una longitud de onda de excitación 370 nm y emisión 440 nm.

Se realizó un ensayo de inhibición de cisteín-proteasas, agregando MMTS (5-metil, metano-tiosulfonato) a concentración final de 100 y 500 μ M. Además, se verificó el efecto de agregar un potenciador: DTT, a una concentración final de 500 μ M.

Cultivo de caracoles *Lymnaea humilis*

El lodo colectado se filtró a través de una malla para la eliminación de piedras, plantas, entre otros residuos; y se colocó en charolas, se le adicionó carbonato de calcio, en una relación de 4g/kg de tierra. Se esterilizó en autoclave (121 lb, 20 minutos). En cajas Petri se colocó una capa del lodo y se dejó secar hasta obtener una superficie firme y uniforme. Los caracoles colectados se depositaron en las cajas para comenzar su ciclo de reproducción; se alimentaron con alga verde 2 a 3 veces por semana, cuando son pequeños. Una vez que cumplieron 20 días de vida, se alimentaron con alga y con alimento comercial para peces. Los caracoles seguían su crecimiento hasta que ovopositaban y se obtenían las masas ovígeras, las cuales contenían caracoles, los que al salir de estas masas se pasaban a nuevas cajas con lodo y así continuar el ciclo.

Análisis de proteínas de caracoles *L. humilis* infectados con miracidios de *F. hepatica*

Se llevaron a cabo tres ensayos distintos, adicionando:

- 1.- 1 caracol.
- 2.- 0 y 3 miracidios + 1 caracol.
- 3.- 0 y 3 miracidios + 1 caracol + 2 µg de una mezcla de inhibidores de proteasas comercial SIGMA.

Se prepararon amortiguadores de fosfatos (0.01M) y de glicina (0.01M) de pH 7.0, del cual se tomaron 50 µL y se colocaron en pozos de placas de ELISA. En primer lugar se colocaron los miracidios y enseguida se pusieron en contacto con los caracoles. Se tomaron los sobrenadantes a las 0 y 20 horas, manteniendo la temperatura constante (23°C).

Estos ensayos se hicieron en 6 repeticiones cada uno. Se colectaron los sobrenadantes y se analizaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 8%.

VARIABLES DEL ESTUDIO

Variables Dependientes:

- Presencia de banda con actividad de proteasa: variable dicotómica.
- Proteasas degradan o no sustratos: variable cualitativa.
- Proteasas se inhiben o no: variable cualitativa.
- Actividad enzimática: degradación del sustrato: variable dicotómica.

Variables Independientes:

- Fuente de proteasas: nominal; extractos crudos, sobrenadantes o productos de excreción secreción de adultos o miracidios.
- Tiempo: variable numérica continua.

RESULTADOS

Colecta de huevos y parásitos adultos de *F. hepatica*

Se realizaron 27 visitas al Rastro Municipal de Toluca, Estado de México, en el periodo de agosto de 2006 a junio de 2007, y se colectaron huevos y parásitos adultos de *F. hepatica*, a partir de hígados con lesiones. Se contaron y los datos obtenidos se graficaron de acuerdo a la fecha de colecta, obteniéndose el mayor número, tanto de huevos como de adultos, en los meses de septiembre a diciembre, como era de esperarse pues son los meses de lluvias, cuando la transmisión de *F. hepatica* es máxima (figura 9).

Estudios de microscopía electrónica de transmisión

Se obtuvieron cortes semi-finos de los “botones” de miracidios, los cuales se revisaron y analizaron y a partir de ellos se determinó la región que se sometería a cortes finos. Los miracidios midieron 50 μm de largo x 14 μm de ancho (figura 10). Se observó que la superficie del miracidio está rodeada de células aplanadas con múltiples cilios. El extremo anterior en la mayoría de los cortes es más ancho en comparación con el resto del miracidio. Presenta una papila apical, la cual se proyecta externamente en forma nodular y ocasionalmente asemeja estar contraída con retracción de la estructura papilar. Por debajo de las células ciliadas, se aprecia otro grupo de células de forma aplanada, con mayor afinidad tintoreal y un núcleo sin forma definida. A partir del segundo tercio y hasta el extremo posterior se observan otras células, las cuales no tienen una forma específica, están intensamente teñidas y no presentan núcleo. Asimismo, en el interior del parásito las diferentes células descritas están delimitadas por una matriz extracelular de poca afinidad tintoreal y de discreto aspecto fibrilar. También se

observaron algunas estructuras vesiculares de aspecto homogéneo sugerentes de vacuolas lipídicas (figura 10).

No se pudieron identificar diferencias entre los parásitos incubados a pH 5.0 y aquellos de pH 7.2 en los cortes semi-finos obtenidos de los miracidios (figura 11).

Al analizar los cortes finos se observó que el miracidio posee una estructura prominente en el extremo anterior, la cual corresponde a la papila apical, delimitada por una membrana de moderada electrodensidad, de aspecto fibrilar y superficie irregular. Dentro de esta papila se encuentran unas vesículas de forma redondeada con diferente grado de electrodensidad, rodeadas de un halo electrolúcido, que miden aproximadamente 0.6 μm de diámetro; además, se observan otros cuerpos esféricos de mayor electrodensidad, de aproximadamente 0.2 μm de diámetro (figuras 12 y 13). Entre la membrana externa y a cada lado de la glándula apical se observan estructuras alargadas, que poseen vesículas redondas de moderada electrodensidad de 0.1 μm , aproximadamente. Debajo de la papila apical se observa material fibrilar denso e irregular (figura 13).

Toda la superficie del miracidio está compuesta de células epiteliales que poseen una gran cantidad de mitocondrias, y en cuya cara externa se encuentran anclados varios cilios. Por debajo de dichas células se puede apreciar otro tipo celular de forma alargada, con un núcleo de moderada electrodensidad que abarca la mitad del citoplasma; se identificó una gran cantidad de cuerpos esféricos, muy pequeños y electrodensos en el citoplasma (figura 14). También se observaron algunas fibras alargadas electrodensas, las cuales se ubican entre estos dos tipos celulares y de acuerdo a lo descrito, corresponden a fibras musculares (figura 14).

La parte posterior del miracidio termina en forma triangular, las células predominantes son germinales, las cuales no presentan una forma definida; se caracterizan por poseer un núcleo muy grande que ocupa la mayor parte del citoplasma; no se lograron identificar otras estructuras en el citoplasma y no se logró apreciar otro tipo celular (figura 15).

Se formaron dos grupos de miracidios, y se incubaron en dos amortiguadores a pH 5.0 y 7.2; las estructuras principales que se compararon fueron las del extremo anterior de los parásitos, enfocándose en la papila apical, pues es donde se encontraron las vesículas de interés y por donde el parásito hace contacto con el hospedero para penetrar (figuras 12 y 13). Se encontró que en aquellos miracidios incubados a pH 5.0 las mitocondrias de las células epiteliales habían sufrido alteraciones, ya que se observan con las crestas deformadas y eran de tamaño anormalmente grande (figura 16). A nivel de la glándula apical, los principales cambios fueron que a pH 5.0, el contenido de las vesículas es menos electrodenso, lo que indicaría que la sustancia que se encuentra en el interior es diferente o se ha perdido, además, se observa un mayor número de estas estructuras con un halo electrolúcido (figura 17).

Obtención de las proteínas de excreción-secreción y somáticas del parásito adulto y del miracidio de *F. hepatica*

La concentración y cantidad total de proteínas obtenidas de los diferentes extractos producidos de miracidios y adultos de *F. hepatica*, se muestran en el cuadro 5. Como puede observarse, la cantidad de proteína obtenida de cada miracidio es 10,000 veces menor que de cada adulto, lo que es congruente con la diferencia en sus tamaños, un adulto mide aproximadamente 20 a 30 mm de largo, mientras que un miracidio es de 50 a 80 μm .

Producción de antisueros

En el cuadro 6 se presentan los datos de los títulos de los antisueros de conejo y de ratón producidos contra los extractos somático, productos de E-S, las catepsinas L1 y L2 del adulto, y los miracidios de *F. hepatica*.

Patrón electroforético de los extractos de *F. hepatica*

Se obtuvo una mejor separación de las proteínas en geles al 11% de acrilamida (figura 18). Como se puede observar, la mayoría de las proteínas E-S del adulto se encuentran presentes entre las proteínas somáticas, mientras que la mayor parte de las proteínas del extracto completo de los miracidios son diferentes a ambas muestras del parásito adulto. El E-S presentó 15 bandas, las cuales van de 5 a 210 kDa, mientras que en la muestra de proteínas somáticas con E-S del adulto se identificaron 19 bandas, las cuales se encontraban en un rango de 10 a 210 kDa. Las proteínas somáticas sin E-S presentaron el mismo rango de peso molecular, sin embargo, desaparecieron algunas bandas y otras tuvieron una intensidad menor, por ejemplo las que van de 60 a 100 kDa. En las tres muestras mencionadas del parásito adulto se identificaron, de acuerdo a su peso molecular (27 y 29 kDa), a las catepsinas L1 y L2. En el extracto completo de los miracidios se encontraron 14 bandas, las cuales presentan pesos moleculares en un rango de 18 a 115 kDa (figura 18).

Western blot

Se realizaron ensayos de western blot para comparar los patrones de reconocimiento cruzado homólogo y heterólogo con el fin de encontrar antígenos únicos y compartidos entre los estadios (cuadro 7 y figura 19). El suero anti-E-S identificó bandas en su antígeno homólogo, en el somático y en menor proporción en las proteínas de los miracidios. Los anticuerpos anti-somático del adulto reconoce en ambas muestras del adulto y del miracidio. En ambas preparaciones del adulto las proteínas más fuertemente reconocidas son aquellas de 27 y 29 kDa, que corresponden a las catepsinas L1 y L2; esto se confirmó con el suero anti-Catepsinas. Se observó que los anticuerpos anti-E-S y anti-somático del adulto reconocen algunas bandas en el antígeno de los miracidios, pero los

anticuerpos anti-Catepsinas L1 y L2 dieron resultados negativos (cuadro 7 y figura 19). El suero de ratón con anticuerpos anti-miracidio reconoció 12 bandas del antígeno homólogo; en las preparaciones del adulto y aun del caracol se observan algunas bandas. Los anticuerpos anti-*L. humilis* reconocieron algunas bandas en el somático del adulto y el miracidio, pero no en los productos de E-S.

Zimografía

Para realizar las zimografías se probaron diferentes condiciones, como la concentración de gelatina en el gel; como la recomendada por la literatura es 0.1%, se probó ésta, así como 0.05% y 0.01%, se encontró que la última opción es la que permitía observar la degradación adecuadamente.

En cuanto al tiempo de los lavados y de incubación de los geles en el amortiguador, los estudios previos recomiendan dos opciones, ambas a 37° C y agitación lenta: 2 lavados de 30 minutos e incubación por 2 horas y 2 lavados de 60 minutos e incubación toda la noche, siendo la primera la que permitió observar las proteasas más nítidamente. En otra prueba se verificó el efecto de agregar Tritón X-100 al amortiguador para llevar a cabo los lavados, ya que se sabe que este compuesto permite la renaturalización parcial de las proteínas. Lo que se encontró fue que su uso mejora los resultados, pues cuando no se agrega al amortiguador de incubación se pueden observar las bandas proteicas, pero no hay actividad proteolítica.

Se verificó el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica y se encontró que al calentar las muestras a 92° C se perdía la capacidad de degradar la gelatina, por lo que en adelante se emplearon las muestras sin someterlas a altas temperaturas. Asimismo, se corrieron las muestras obtenidas a partir de los parásitos que se lavaron en dos diferentes amortiguadores, como la solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) y solución de glicina, ambas a pH 7.2, siendo la última la que permitió observar más proteasas activas, mientras que el

PBS inhibía a algunas enzimas. Las muestras de E-S y somáticas del adulto necesitan la presencia de DTT para poder observar las proteasas activas, por lo que en todos las pruebas se les adicionó este agente.

Después de varios ensayos se comprobó que las mejores condiciones para observar las bandas de proteasas eran:

- a) Gelatina de piel de cerdo al 0.01%.
- b) Tiempo de lavado: dos veces con amortiguador de incubación, con Tritón X-100 al 2.5%, 30 minutos y a 4° C (reducida actividad enzimática).
- c) Incubación con amortiguador de incubación durante 2 horas, agitación lenta y a 37°C.

Una vez estandarizada la zimografía se corrieron las muestras proteicas del parásito adulto y de los miracidios. Se observó que los productos de excreción-secreción del adulto presentan siete bandas de degradación, con los siguientes pesos moleculares: 27, 29, 37, 40, 48, 70 y 90 kDa. En la preparación somática del adulto se encontraron seis proteasas de 32, 35, 47, 55, 70 y 80 kDa. En las proteínas solubles obtenidas de los miracidios en ausencia de DTT, se pueden observar ocho bandas, cuyos pesos moleculares son: 20, 27, 40, 45, 70, 90, 93 y 112 kDa; cuando se agregó el agente reductor cambió el patrón, observándose sólo cuatro bandas de 28, 40, 45 y 93 kDa. En cuanto a las proteínas contenidas en el “botón” de los miracidios (proteínas no solubles), se identificaron ocho bandas en ausencia de DTT, las cuales tenían un peso aproximado de 22, 40, 45, 80, 90, 93 y 180 kDa. En la muestra del botón con DTT, se aprecian las bandas de 40 y 93 kDa (figura 20).

Actividad enzimática

Al agregar las muestras de E-S, el extracto completo y las proteínas del sobrenadante de los miracidios a la mezcla de reacción, inmediatamente comienzan a degradar el sustrato Z-phe-arg-NHMec, lo que indica la presencia de

enzimas proteolíticas. El MMTS, agente reductor de cisteínas, inhibió la actividad enzimática, lo que se observó por una disminución de la fluorescencia. Cuando se agregó el MMTS a la muestra de E-S se inhibió casi por completo la actividad proteolítica, sin embargo, el efecto de este compuesto sobre la muestra del extracto completo y del sobrenadante de los miracidios fue menor pues no desaparece la actividad. En las tres muestras mencionadas se observó que la inhibición es reversible ya que cuando se agregó el DTT (potenciador de la actividad de cisteín-proteasas) se recuperó la actividad proteolítica, sin embargo, también existen diferencias entre los E-S y los miracidios, ya que en éstos últimos tarda más tiempo en recuperar la actividad enzimática inicial (figura 21).

Patrón proteico de caracoles *L. humilis* infectados con miracidios de *F. hepatica*

El análisis de las proteínas de los caracoles *Lymnaea humilis*, retados con tres miracidios, indican que cuando infectan al molusco su patrón proteico se modifica, en comparación con el limnéido no infectado o cuando se adicionan inhibidores de proteasas el patrón proteico del caracol se mantiene (figura 22).

DISCUSIÓN

El miracidio de *Fasciola hepatica* es una larva ciliada que invade caracoles del género *Lymnaea*, en los que se lleva a cabo su desarrollo hasta llegar a cercaria; después sale para enquistarse y entonces es ingerida por el hospedero definitivo y de esta manera continuar su ciclo biológico. Las fases infectantes de los hospederos definitivo e intermediario son diferentes en muchas características morfológicas y funcionales. Sin embargo, ambos estadios deben destruir tejido para invadir a su hospedero. Los resultados obtenidos por medio de microscopía electrónica de transmisión permitieron corroborar la presencia de vesículas esféricas con contenido granular en la papila apical. Al analizar los miracidios incubados a pH 5.0 se observó que las mitocondrias de las células epiteliales estaban dilatadas; pero el efecto más notorio fue aquel observado en las vesículas de la papila apical, las cuales presentaron menor electrodensidad, lo que sugiere que el contenido cambió o desapareció. No se conoce el contenido de dichas vesículas, sin embargo, Buzzell (1983) encontró que la glándula apical se tiñe con Azul Victoria-ácido perfórmico (PFA-VB), tinción para identificar cisteínas, lo que indica la presencia de proteínas. Además, Kendall (1965), demostró que al encontrar a su hospedero la primera parte del miracidio que se pega es la papila apical, de la cual se liberan sustancias que lisan el epitelio del caracol por donde penetra; por lo que el contenido de estas vesículas podría estar participando en el proceso. Esta idea es apoyada por el estudio realizado por Cruz-Mendoza y colaboradores (2006), quienes indican que el pH del medio afecta la viabilidad de los caracoles *Lymnaea humilis* cuando están en presencia de miracidios de *F. hepatica*: los moluscos co-incubados con miracidios a pH 5.0 mueren sin infectarse. Los autores sugieren que este hecho podría deberse a que el parásito muere a pH 5.0 y libera proteasas activadas que matan a los caracoles. El presente estudio confirmó la presencia de proteasas en el miracidio de *F. hepatica*; sin embargo, es importante notar que aparentemente son diferentes a las del parásito adulto. Debido a las diversas funciones propuestas para las

enzimas proteolíticas de *F. hepatica* (siendo las más importantes las cisteín-proteasas), se afirma que juegan un papel muy importante en el ciclo biológico del parásito, por ello muchos trabajos se han enfocado en su estudio, principalmente en las del adulto y menos sobre la presencia en otros estadios. El hecho de haber encontrado proteasas en el miracidio de *F. hepatica* concuerda con la idea de que las necesita para poder llevar a cabo ciertas actividades, como la invasión de su caracol hospedero. Además, se sabe que los miracidios de otros trematodos, como *F. gigantica* y *S. mansoni*, también expresan proteasas. Mohamed y colaboradores (2005) estudiaron la actividad proteolítica presente en algunos estadios de *F. gigantica*, desde huevos de 0 a 12 días hasta miracidios y adultos. Tanto el total de unidades como la actividad específica de proteasas en los huevos se incrementaron gradualmente del día 0 al día 12 de desarrollo; también en los miracidios y los adultos hubo un incremento significativo en la actividad proteolítica. Estos resultados los atribuyen a que los dos últimos estadios invaden tejidos de los hospederos, por lo que necesitan estas enzimas para lograrlo (Mohamed *et al.*, 2005).

Mediante los resultados obtenidos en este estudio se pudo identificar que el miracidio de *F. hepatica* expresa proteasas diferentes a las del parásito adulto, ya que se observó que el patrón proteico de los miracidios es diferente al del adulto, tanto para las proteínas de excreción-secreción como las somáticas. Además, en el western blot se identificó que son pocos los antígenos de los miracidios reconocidos por los anticuerpos dirigidos contra proteínas del parásito adulto y viceversa. Asimismo, se encontró que los anticuerpos purificados y dirigidos contra las catepsinas L1 y L2, principales proteasas en el adulto, no reaccionan con bandas equivalentes en el miracidio. Este último presenta actividad proteolítica, lo que se pudo corroborar ya que posee proteínas que degradan la gelatina; sin embargo, éstas presentan pesos moleculares diferentes a las proteasas encontradas en los productos de E-S y entre las proteínas somáticas del adulto, con distinta sensibilidad a la presencia de DTT. De acuerdo a los pesos moleculares obtenidos, se pudo apreciar que son 9 bandas con actividad de

proteasa. Además, algunas de las proteínas de los miracidios, tanto del extracto completo como de las solubles, presentaron actividad enzimática del tipo de las cisteín proteasas, ya que fueron capaces de degradar el sustrato comercial Z-phe-arg-NHMec y fueron inhibidas por MMTS y activadas por DTT. Los resultados demostraron que el miracidio no expresa las principales proteasas del adulto (Catepsinas L1 y L2), pero no se pudo descartar que una de las que sí expresa sea la que utiliza por el parásito joven (adolescaria) para invadir al hospedero mamífero, la Catepsina B: el sobrenadante del miracidio presentó una proteasa de 29 kDa en presencia de DTT compatible con esta posibilidad (Law *et al.*, 2003).

Mediante la técnica de despliegue diferencial (“differential display”), se ha estudiado la variación de expresión de diversos genes entre el adulto y las formas juveniles de *F. hepatica*, observándose 22% de bandas específicas para el estadio adulto y 14% del parásito joven. Estos resultados indican que existe un gran cambio en la expresión genética durante el desarrollo del parásito (Reed, 1998), lo que apoya la idea de que el miracidio también presenta un cambio en las proteínas expresadas. Además, se ha visto que en otros parásitos, como *S. mansoni*, ambos estadios (miracidio y adultos) expresan cisteín proteasas, sin embargo, se ha comprobado que no son las mismas, lo que indica que hay un cambio en la expresión de proteínas funcionales (Asch y Dresden, 1979; Chapell y Dresden, 1987; Smith *et al.*, 1994; Brady *et al.*, 1999). Se sabe que todas las fases de *S. mansoni* poseen cisteín-proteinasas, teniendo de mayor a menor actividad el extracto completo del parásito adulto, los productos de excreción-secreción, la cercaria, el miracidio, la esquistosómula, los huevos y el esporoquiste (Marikovsky *et al.*, 1988; Monroy y Dresden, 1996; Dalton *et al.*, 1997). Se cuenta con algunos informes sobre actividad proteolítica en el miracidio de *S. mansoni*; las proteasas parecen estar localizadas en las glándulas laterales de penetración del extremo anterior del parásito (Eklun-Natey *et al.*, 1985; Yoshino *et al.*, 1993; Fryer *et al.*, 1996). Yoshino y colaboradores (1993) demostraron la presencia de proteasas en extractos de miracidios y de esporoquistes de *S. mansoni*, así como en productos de excreción-secreción obtenidos de miracidios incubados 24 horas en un medio

nutritivo. Dichos autores encontraron, mediante ensayos de actividad enzimática, que los extractos de miracidios y de esporoquistes fueron capaces de degradar el sustrato CBZ-Phe-Arg-NHMec, siendo 2 a 7 veces más alta la actividad específica en los miracidios que en los esporoquistes. Con el uso de inhibidores de tiol-proteasas (E-64 y leupeptina) observaron que disminuía la actividad proteolítica. El pH óptimo fue determinado, probando en un rango de pH de 3 a 7, y se identificó que a pH 6.0 se presentó la mayor actividad. Además, identificaron que las bandas de 19 y 36 kDa eran las que poseían actividad de enzimas proteolíticas. En este mismo trabajo se reportó el aislamiento de proteínas del plasma del caracol *Biomphalaria glabrata*, las cuales fueron degradadas por las proteasas del esporoquiste de *S. mansoni*. Fryer y colaboradores (1996) confirmaron la presencia de tiol-proteasas en los miracidios de *S. mansoni*, gracias al uso de un inhibidor de dichas enzimas que se encuentra en el plasma de *B. glabrata*. Se ha propuesto que la liberación de dichas enzimas proteolíticas podría jugar un papel importante en la penetración e invasión de los tejidos de los caracoles hospederos, adquisición de nutrientes por medio de la digestión extracelular de proteínas del caracol o modulación de la respuesta de defensa por parte del hospedero (Yoshino *et al*, 1993; Fryer *et al*, 1996). Además, se ha analizado que las CL1 y CL2 presentes en el parásito adulto de *S. mansoni*, no son las mismas enzimas proteolíticas que las del miracidio ni de los huevos (Brady *et al.*, 2000). Estas afirmaciones también apoyan la idea de que el miracidio de *F. hepatica* expresa proteasas con características diferentes a las del adulto, sin embargo, se necesitan algunos estudios más para comprobar esto.

CONCLUSIONES

El miracidio de *Fasciola hepatica* produce al menos 9 proteasas.

Algunas de las enzimas proteolíticas del miracidio de *F. hepatica* pertenecen al tipo de las cisteín-proteasas.

El miracidio de *Fasciola hepatica* expresa proteasas diferentes a las de excreción-secreción y somáticas del parásito adulto.

PERSPECTIVAS

Sería interesante determinar el tipo de cada una de las proteasas expresadas por el miracidio de *F. hepatica*, con el uso de otros sustratos fluorogénicos comerciales, además de inhibidores y potenciadores de actividad enzimática. Se cuenta con la tecnología, espectrometría de masas, para secuenciar alguna(s) de las proteasas encontradas y verificar a qué corresponden.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. 2001. The stress of *Lymnaea truncatula* just before miracidial exposure with *Fasciola hepatica* increased the prevalence of infection. *Experimental Parasitology*. **99**: 49-51.
2. Alcalá-Cantó Y, Ibarra-Velarde F, Gracia-Mora J, Sumano-López H. 2005. *Fasciola hepatica* proteolytic activity in liver revealed by in situ zymography. *Parasitology Research*. **96**: 308–311.
3. Asch HL, Dresden MH. 1979. Acidic thiol proteinase activity of *Schistosoma mansoni* egg extracts. 1979. *Journal of Parasitology*. **65**: 543-549.
4. Berasaín P, Goñi F, McGonigle S, Dowd A, Dalton JP, Frangione B, Carmona C. 1997. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *Journal of Parasitology*. **83**: 1-5.
5. Boray JC. 1969. Experimental Fasciolosis in Australia. *Advances in Parasitology*. **7**: 95-205.
6. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal of Biochemistry*. **72**: 246-251.
7. Brady CP, Dowd AJ, Brindley PJ, Ryan T, Day SR, Dalton JP. 1999. Recombinant expression and localization of *Schistosoma mansoni* cathepsin L1 supports its role in the degradation of host hemoglobin. *Infection and Immunity*. **67**: 398-374.
8. Brady CP, Brindley PJ, Dowd AJ, Day SR, Dalton JP. 2000. *Schistosoma mansoni*: Differential expression of cathepsins L1 and L2 suggests discrete biological functions for each enzyme. *Experimental Parasitology*. **94**: 75-83.
9. Buzzell GR, Gerald R. 1983. Composition, secretion, and fate of the glands in the miracidium and sporocyst of *Fasciola hepatica* L. *Journal of Helminthology*. **57**: 79-84.

10. Caffrey CR, Rheinberg CE, Moné H, Jourdane J, Li YL, Ruppel A. 1997. *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, and *S. rodhaini*: cysteine-class cathepsin activities in the vomitus of adult worms. *Parasitology Research*. 83: 37–41.
11. Cawston FG. 1929. The resistance of limnaeidae to desiccation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 22: 335-339.
12. Chappell CL, Dresden MH. 1987. Purification of cysteine proteinases from adult *Schistosoma mansoni*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 256: 560-568.
13. Christensen NO, Cansen P, Frandsen F. 1978. The influence of some physico-chemical factors on the host-finding capacity of *Fasciola hepatica* miracidia. *Journal of Helminthology*. 52: 61-67.
14. Collins RP, Stack CM, O'Neill SM, Doyle S, Ryan T, Brennan GP, Mousley A, Stewart M, Maule AG, Dalton JP, Donnelly S. 2004. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence. Propeptide cleavage sites and gastrodermal cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 17038–17046.
15. Cordova M, Jara J, Del Nery E, Hirata IY, Araujo MS, Carmona AK, Juliano MA, Juliano L. 2001. Characterization of two cysteine proteinases secreted by *Fasciola hepatica* and demonstration of their kininogenase activity. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 116: 109-115.
16. Cruz-Mendoza I, Ibarra-Velarde F, Naranjo-García E, Quintero MT, Lecumberri-López J. 2002. Identificación taxonómica, estacionalidad y grado de infección con *Fasciola hepatica* de moluscos huéspedes y no huéspedes intermediarios del trematodo en el rancho de la Universidad Autónoma de Hidalgo, en Tulancingo, Hidalgo, México. *Veterinaria México*. 33: 188-200.
17. Cruz-Mendoza I, Figueroa JA, Correa D, Ramos-Martínez E, Lecumberri-López J, Quiroz-Romero H. 2004. Dynamics of *Fasciola hepatica* infection

- in two species of snails in a rural locality of Mexico. *Veterinary Parasitology*. **121**: 87-93.
18. Cruz-Mendoza I, Ibarra-Velarde F, Quintero-Martínez MT, Naranjo-García E, Lecumberri-López J, Correa D. 2005. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in cattle and *Lymnaea (Fossaria) humilis* snails in central Mexico. *Parasitology Research*. **95**: 283-286.
 19. Cruz-Mendoza I, Naranjo-García E, Quintero-Martínez MT, Ibarra-Velarde F, Correa D. 2006. Exposure to *Fasciola hepatica* miracidia increases the sensitivity of *Lymnaea (Fossaria) humilis* to high and low pH. *Journal of Parasitology*. **92**: 650-652.
 20. Cruz-Reyes A. 1986. Fasciolosis. Volumen conmemorativo centenario del descubrimiento del ciclo de *Fasciola hepatica*. Thomas y Leuchert. 1883. México. 91-114.
 21. Dalton JP, Heffernan M. 1989. Thiol proteases released *in vitro* by *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **35**: 161-166.
 22. Dalton JP, Clough KA, Jones MK, Brindley PJ. 1996. Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity*. **64**: 1328–1334.
 23. Dalton JP, Clough KA, Jones MK, Brindley PJ. 1997. The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology*. **114**: 105-112.
 24. Dalton, JP. 1999. Fasciolosis. Ed. CABI Publishing. USA. 544 pp.
 25. Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moiré N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG, Donnelly SM. 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology*. **33**: 1173–1181.
 26. Davids BJ, Yoshino TP. 1995. *Schistosoma mansoni*: Excretory-secretory polypeptides exhibit selective binding to plasma components of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*. **81**: 292-301.

27. de Souza CP, Magalhaes KG, Passos LK, Pereira dos Santos GC, Ribeiro F, Katz N. 2002. Aspects of the maintenance of the life cycle of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella* in Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. **97**: 407-410.
28. Dowd AJ, Smith AM, McGonigle S, Dalton JP. 1994. Purification and characterization of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. European Journal of Biochemistry. **223**: 91-98.
29. Dowd AJ, Dooley M, Fágáin C, Dalton JP. 2000. Stability studies on the cathepsin L proteinase of the helminth parasite, *Fasciola hepatica*. Enzyme and Microbial Technology. **27**: 599-604.
30. Dunn-Angus M. 1983. Helmintología veterinaria. El Manual Moderno. México. 390 pp.
31. Eklun-Natey DT, Wüest J, Swiderski Z, Striebelt HP, Huggel H. 1985. Comparative scanning electron microscope (SEM) study of miracidia of four human schistosome species. International Journal for Parasitology. **15**: 33-42.
32. Fryer SE, Bender RC, Bayne CJ. 1996. Inhibition of cysteine proteinase from *Schistosoma mansoni* larvae by α -macroglobulin from the plasma of *Biomphalaria glabrata*. Journal of Parasitology. **82**: 343-347.
33. Gallagher SSE, Threadgold LT. 1967. Electron-microscope studies of *Fasciola hepatica*. The interrelationship of the parenchyma with other organ systems. Parasitology. **57**: 627-632.
34. García-Carreño FL, Dimes LE, Haard NF. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Analytical Biochemistry. **214**: 65-69.
35. Gutiérrez A, Perera G, Yong M, Sánchez J, Wong L. 2000. Life-history traits of *Fossaria cubensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) under experimental exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. **95**: 747-752.

36. Gutiérrez A, Yong M, Wong L, Sánchez J. 2002. The effect of isolation on reproduction and growth of *Pseudosuccinea columella* (Pulmonata: Lymnaeidae): a snail conditioned water experiment. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. **97**: 869-870.
37. Gutiérrez A, Pointier JP, Fraga J, Jobet E, Modat S, Perez RT, Yong M, Sánchez J, Loker ES, Théron A. 2003. *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. Experimental Parasitology. **105**: 211–218.
38. Hanna REB. 1980a. *Fasciola hepatica*: An immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and the sheep. Experimental Parasitology. **50**: 155-170.
39. Hanna REB. 1980b. *Fasciola hepatica*: Autoradiography of protein synthesis, transport, and secretion by the tegument. Experimental Parasitology. **50**: 297-304.
40. Heussen C, Dowdle EB. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Analytical Biochemistry. **102**: 196-202.
41. Hunter E. 1984. Practical Electron Microscopy. Cambridge University Press. Segunda edición. Canadá. 173 pp.
42. Hurtrez-Boussés S, Meunier C, Durand P, Renaud F. 2001. Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). Microbes and Infection. **3**: 841-849.
43. Irving JA, Spithill TW, Pike RN, Whisstock JC, Smooker PM. 2003. The Evolution of Enzyme Specificity in *Fasciola* spp. Journal of Molecular Evolution. **57**: 1–15.
44. Jackson TFHG. 1976. Intermediate host antigens associated with the cercariae of *Schistosoma haematobium*. Journal of Helminthology. **50**: 45-47.
45. Kalbe M, Haberl B, Haas W. 1997. Miracidial host-finding in *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata* is stimulated by species-specific

- glycoconjugates released from the host snails. *Parasitology Research*. **83**: 806-812.
46. Kendall SB. 1965. Relationships between the species of *Fasciola* and their molluscan hosts. *Advances in Parasitology*. **3**: 62-91.
 47. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4 B. *Nature*. **227**: 680-685.
 48. Law RHP, Smooker PM, Irving JA, Piedrafita D, Ponting R, Kennedy NJ, Whisstock JC, Pike RN, Spithill TW. 2003. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infection and Immunity*. **71**: 6921-6932.
 49. Leber TM, Balkwill FR. 1997. Zymography: A single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical Biochemistry*. **249**: 24-28.
 50. Lodes MJ, Yoshino TP. 1990. The effect of Schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. *Journal of Invertebrate Pathology*. **56**: 75-85.
 51. Marikovsky M, Fishelson Z, Arnon R. 1988. Purification and characterization of proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **30**: 45-54.
 52. Mas-Coma S, Esteban JG, Bargues MD. 1999. Epidemiología de la fascioliasis humana: revisión y propuesta de nueva clasificación. *Bulletin of the World Health Organization*. **77**: 340-346.
 53. Mas-Coma S, Funatsu IR, Bargues D. 2001. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*. **123**: 115-127.
 54. McCraw BM. 1957. Studies on the anatomy of *Lymnaea humilis* say. *Canadian Journal of Zoology*. **35**: 751-768.
 55. McCraw BM. 1961. Life history and growth of the snail *Lymnaea humilis* say. *Transactions of the American Microscopical Society*. **80**: 16-27.

56. Meaney M, Fairweather I, Brennan GP, Forbes AB. 2004. Transmission electron microscope study of the ultrastructural changes induced in the tegument and gut of *Fasciola hepatica* following *in vivo* drug treatment with clorsulon. *Parasitology Research*. **92**: 232-241.
57. Mohamed SA, Fahmy AS, Mohamed TM, Hamdy SM. 2005. Proteases in egg, miracidium and adult of *Fasciola gigantica*. Characterization of serine and cysteine proteases from adult. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*. **142**: 192–200.
58. Monroy FP, Dresden MH. 1996. The developmental expression of cysteine proteinases in *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*. **26**: 109-112.
59. Monteil JF, Matricon-Gondran M. 1991. Hemocyte production in trematode-infected *Lymnaea truncatula*. *Parasitology Research*. **77**: 491-497.
60. Nansen P. 1976. A study on snail location by *Fasciola hepatica* using radioisotopically labelled miracidia. *Parasitology*. **72**: 163-171.
61. Piacenza L, Acosta D, Dowd A, McGonicle S, Dalton J, Carmona C. 1997. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica*: time course of the inhibitory effect of serum from experimentally infected rabbits demonstrated by gelatin-substrate polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Helminthology*. **71**: 333-338.
62. Pfister K, Daveau C, Ambroise-Thomas P. 1984. Partial purification of somatic and excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* and their application for the serodiagnosis of experimental and natural fascioliasis using an ELISA. *Research in Veterinary Science*. **37**: 39-43.
63. Préveraud-Sindou M, Rondelaud D. 1992. *Fasciola hepatica*: Early lesions in the viscera of seven pulmonate species alter penetration of the miracidium. *Parasitology Research*. **78**: 360-362.
64. Préveraud-Sindou M, Rondelaud D. 1995. Localization and outcome of *Fasciola hepatica* sporocysts in *Lymnaea truncatula* subjected to mono- or plurimiracidial exposure. *Parasitology Research*. **81**: 265-267.

65. Quiroz-Romero H. 1990. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Ed. Limusa. México. 876 pp.
66. Rawlings ND, Barrett AJ. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*. **290**: 205-218.
67. Reed MB, Spithill TW, Strugnell RA, Panaccio M. 1998. *Fasciola hepatica*: Stage-specific expression of novel gene sequences as identified by differential display. *Experimental Parasitology*. **89**: 169-179.
68. Rege AA, Herrera PR, Lopez M, Dresden MH. 1989. Isolation and characterization of a cysteine proteinase from *Fasciola hepatica* adult worms. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **35**: 89-95.
69. Remane *et al.*, 1989. En: The Body Structure of Snails and Slugs. Characteristics of Gastropod Morphology. <http://www.weichtiere.at/english/gastropoda/morphology.html>. Acceso: 24-06-2007.
70. Roche L, Tort J, Dalton JP. 1999. The propeptide of *Fasciola hepatica* cathepsin L is a potent and selective inhibitor of the mature enzyme. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **98**: 271-277.
71. Rondelaud D, Barthe D. 1982. Relationship of the amoebocyte-producing organ with the generalized amoebocytic reaction in *Lymnaea truncatula* Müller infected by *Fasciola hepatica* L. *Journal of Parasitology*. **68**: 967-969.
72. Sajid M, Mckerrow JH. 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **120**: 1-21.
73. Simpkin KG, Chapman CR, Coles GC. 1980. *Fasciola hepatica*: a proteolytic digestive enzyme. *Experimental Parasitology*. **49**: 281-287.
74. Sindou P, Rondelaud D, Barthe D. 1990. Visceral pathology and size of the host snail: comparative studies in *Lymnaea glabra* infected by *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*. **76**: 280-281.
75. Sindou P, Cabaret J, Rondelaud D. 1991. Survival of snails and characteristic lesions of *Fasciola hepatica* infection in four European species of *Lymnaea*. *Veterinary Parasitology*. **40**: 47-58.

76. Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A, Dalton JP. 1993. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **62**: 1-8.
77. Smith AM, Dalton JP, Clough KA, Kilbane CL, Harrop SA, Hole N, Brindley PJ. 1994. Adult *Schistosoma mansoni* express cathepsin L proteinase activity. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **67**: 11-19.
78. Southgate VR. 1970. Observations on the epidermis of the miracidium and on the formation of the tegument of the sporocyst of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. **61**: 177-190.
79. Stack CM, Caffrey CR, Donnelly SM, Seshadri A, Lowther J, Tort JF, Peter R, Collins PR, Robinson MW, Xu W, McKerrow JH, Craik CS, Geiger SR, Marion R, Brinen LS, Dalton JP. 2008. Structural and functional relationships in the virulence-associated Cathepsin L proteases of the parasitic liver fluke, *Fasciola hepatica*. *The Journal of Biological Chemistry*. **283**: 9896–9908.
80. Threadgold LT. 1976. *Fasciola hepatica*: Ultrastructure and histochemistry of the glycocalyx of the tegument. *Experimental Parasitology*. **39**: 119-134.
81. Tkalcevic J, Ashman D, Meeusen E. 1995. *Fasciola hepatica*: rapid identification of newly excised juvenile proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **213**: 169-174.
82. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels of nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **76**: 4350-4354.
83. Vázquez Nin G, Echeverría O. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Ed. Facultad de Ciencias, UNAM y Fondo de Cultura Económica. México. 160 pp.
84. Wilson RA. 1968. The hatching mechanism of the egg of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*. **58**: 79-89.

85. Wilson RA. 1969. Fine structure of the tegument of the miracidium of *Fasciola hepatica* L. The Journal of Parasitology. **55**: 124-133.
86. Wilson RA. 1971. Gland cells and secretions in the miracidium of *Fasciola hepatica*. Parasitology. **63**: 225-231.
87. Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM, Spithill TW. 1998. *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. Experimental Parasitology. **88**: 85-94.
88. Life cycle of *Fasciola hepatica*, en: www.cbu.edu. Acceso 10-03-2007.
89. Yoshino, TP, Lodes MJ, Rege AA, Chappell CL. 1993. Proteinase activity in miracidia, transformation excretory-secretory products, and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. Journal of Parasitology. **79**: 23-31.
90. Zelck UE. 1999. Glycosidase activities in plasma of naive and schistosome-infected *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). Parasitology. **119**: 563-568.

CUADROS

Cuadro 1. Tipos celulares y estructuras componentes del miracidio de *Fasciola hepatica*

Tipo de células / Estructuras	Número	Ubicación	Características
Células epiteliales	21	Superficie	Acomodadas en 5 hileras (6, 6, 3, 4, 2). Su núcleo se localiza al centro, con grandes cantidades de cromatina (en gránulos de diferente tamaño).
Crestas intercelulares	Se desconoce	Entre las células epiteliales	Su citoplasma es granular denso, contiene vesículas unidas a la membrana y electro-opacas. Poseen cuerpos membranosos con pequeñas cantidades de material electro-opaco. Se une a las papilas.
Capa citoplásmica	Se desconoce	Debajo de las células epiteliales	Parece estar hecha de restos de citoplasma, conecta las crestas intercelulares con las células vesiculadas.
Fibras musculares longitudinales	12 a 22	Debajo de la capa citoplásmica	Más grandes en el extremo anterior y posterior
Fibras musculares circulares	30	Debajo de la capa citoplásmica	Citoplasma granular, con grandes mitocondrias y agregaciones de glucógeno. Pueden ser enucleadas
Células vesiculadas	10 a 20	Debajo de la capa citoplásmica y de las fibras musculares	3 grupos: 1. En región detrás del poro excretor. 2. En región detrás del cerebro. 3. En región anterior del cerebro: se comunica con la base de la papila apical. Son largas y aplanadas. Su núcleo se localiza de manera central, tienen un retículo endoplásmico prominente en el citoplasma perinuclear. Poseen vesículas electro-opacas (iguales a las vesículas de las crestas intercelulares).
Células germinales	Se desconoce	Debajo de las células vesiculadas	Se desconoce

Cuadro 2. Algunas técnicas empleadas para demostrar la presencia de ciertos componentes en las glándulas del miracidio de *F. hepatica*

Técnica	Fundamento	Glándula apical	Glándula lateral
PAS	Carbohidratos	Neg	Pos
PAS + saliva	Carbohidratos	Neg	Pos
Azul alciano	Mucopolisacáridos ácidos	Neg	Neg
Negro Sudán	Lípidos	Neg	Neg
HgBPB	Proteínas	Neg	Neg
DMAB-nitrito	Triptofano unido a proteínas	Neg	Neg
PFA-VB	Cisterna	Pos	Neg
VB	Glándulas	Pos	Neg

PAS= Ácido peryódico, HgBPB= Azul de bromofenol mercúrico, DMAB-nitrito= Dimetilaminobenzaldehído-nitrito, PFA-VB= Ácido perfórmico, VB= Azul Victoria.

Cuadro 3. Algunas proteasas reportadas de *Fasciola hepatica*

Nombre	Peso molecular (kDa)	Estadio que la expresa	Otras características	Referencia
Catepsina B	--	Parásito joven	339 aa proteína inmadura y 254 aa proteína madura. Exopeptidasa. Degrada gelatina.	Law <i>et al.</i> 2003
Catepsina L1	25	Parásito adulto	Cisteín-proteasa	Cordova <i>et al.</i> 2001
Catepsina L2	26	Parásito adulto	Cisteín-proteasa	Cordova <i>et al.</i> 2001
Proteasas de excreción-secreción	46	Parásito adulto	Degradan gelatina. Activas en rango de pH: 4.5 a 8.0. Cisteín-proteasas (inhibidas por PMSF, iodoacetamida y estimuladas por cis y DTT).	Dalton y Heffernan. 1989.
	44			
	42			
	40			
	28			
	27.5			
Proteasas de excreción-secreción	88	Parásito adulto	Degradan gelatina. Activas en rango de pH: 3.0 a 4.5. Cisteín-proteasas (inhibidas por PMSF, iodoacetamida y estimuladas por cis y DTT). En productos de E-S.	Dalton y Heffernan. 1989.
	83			
	80			
	76			
	60			
Catepsina L1	--	Parásito adulto	Degrada colágeno tipo III y IV, laminina y fibronectina. No degrada elastina.	Berasaín <i>et al.</i> 1997.
Catepsina L2	--	Parásito adulto	En productos de E-S. Degrada colágeno tipo III y IV, laminina y fibronectina. No degrada elastina.	Berasaín <i>et al.</i> 1997.

--=no se reporta; aa=aminoácidos; PMSF=fenilmetilsulfonil fluoruro; DTT=Ditiotreitol; cis= cisteína; E-S=Excreción-Secreción.

Cuadro 4. Procedimientos de microscopía electrónica de transmisión para el estudio de *Fasciola hepatica*

	Protocolo de esta tesis	Wilson, 1969	Southgate, 1970	Meaney et al, 2004
Espécimen	Miracidios recién eclosionados	Miracidios recién eclosionados	Miracidios completos	Parásitos adultos
Fijación	Glutaraldehído 4 %	Glutaraldehído 3 %	Glutaraldehído 6.5%	Glutaraldehído 4% - sucrosa 3 %
Amortiguador	Cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.2	Cacodilato, pH 7.2	PBS 0.1 M, pH 7.8	Cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4
Tiempo, Temperatura	60 min, 4°C	30 min, 4°C	10 min-2 h, 4°C	30 min y cortados 4 h Cacodilato
Lavados	Cacodilato 0.2 M (pH 7.2), 10 min		PBS + sucrosa 0.2%, dos cambios, 4°C	0.1 M (pH 7.4) - sucrosa 3%, 24 h, 4°C
Pos-fijación	OsO ₄ 1%, 1 h, T amb	OsO ₄ , 4 h	OsO ₄ 1%, en amortiguador acetato-veronal de sodio, pH 7.5; 1 h	OsO ₄ 1%, 1 h
Deshidratación	Etanol al 60, 70, 80, 90, 95%; 7 min. 3 veces en etanol absoluto; 10 min; T amb	Alcohol	Etanol al 60, 70, 80, 90, 95%; 4°C, 5 min. 3 veces en etanol absoluto; 15 min; T amb	Serie de etanol
Intermediario	Óxido de propileno, 15 min, 2 veces		Óxido de propileno-Tolueno (1:1), dos cambios, 30 min, T amb	
Pre-inclusión	Óxido de propileno-resina (EPON 812) (2:1), 1 h. Óxido-resina (1:1) 48-72 h. Resina pura, 1 h, 60°C.	Mezcla Araldita-Epon	Óxido de propileno-Tolueno-Araldita (1:1:1), 30 min, 60°C	
Inclusión	Resina pura, 1 h, 60°C.	Resina curada	Araldita, 8.5 h, 60°C	Resina Agar

Cuadro 4. Procedimientos de microscopía electrónica de transmisión para el estudio de *Fasciola hepatica*
Continuación

Cortes	Semi-finos y finos sobre rejillas de cobre	Rejillas con formvar y carbón	Sobre rejillas sin cubrir, cubiertas con carbón o colodión	
Contraste	Acetato de uranilo (4%) - citrato de plomo	Acetato de uranilo – citrato de plomo	Acetato de uranilo (3%) - citrato de plomo	
Kv	50	60	60-80	100

Cuadro 5. Concentración y cantidad total de las proteínas obtenidas de los extractos de miracidios y adultos de *F. hepatica*

Muestra	Concentración (mg/mL)	Número de parásitos (g tejido)	mL colectados	mg totales	mg/parásito
Productos de E-S	1,2	100 (17.3)	39,0	45,6	0,46
Somático sin E-S	10,3	50 (8.0)	13,8	142,7	0,91
Somático completo	15,9	15 (1.7)	1,7	27,0	3,04
EC miracidios	0,6	3000	1,9	1,0	0,0003
Sobrenadante miracidios	0,6	2000	0,5	0,3	0,0002
Botón miracidios	0,5	2000	0,3	0,1	0,0001

Cuadro 6. Título de los sueros de conejo y de ratones inmunizados con proteínas de *F. hepatica* y de *L. humilis*

Inmunógeno	Especie inmunizada	Título
Anti-E-S	Conejo	1:256,000
Anti-Somático	Conejo	1:64,000
Anti-Catepsina	Conejo	1:32,000
Anti-miracidios	Ratón	1: 16000
Anti-caracol	Ratón	1:16000

Cuadro 7. Número de bandas reconocidas, en tres muestras proteicas del adulto, del miracidio y de caracoles, por los tres anticuerpos anti-*F. hepatica* adulta, anti-miracidio y anti-*L. humilis*

Antisuero contra:	Número de bandas reconocidas en el antígeno:			
	E-S de adultos	Somático adultos	Miracidios	Caracoles <i>L. humilis</i>
E-S del adultos	11	7	4	0
Somático adultos	8	16	7	3
Miracidios	4	4	12	3
Caracol <i>L. humilis</i>	0	2	1	7
Catepsinas L1 y L2	2	2	1*	0

* Banda muy tenue.

FIGURAS

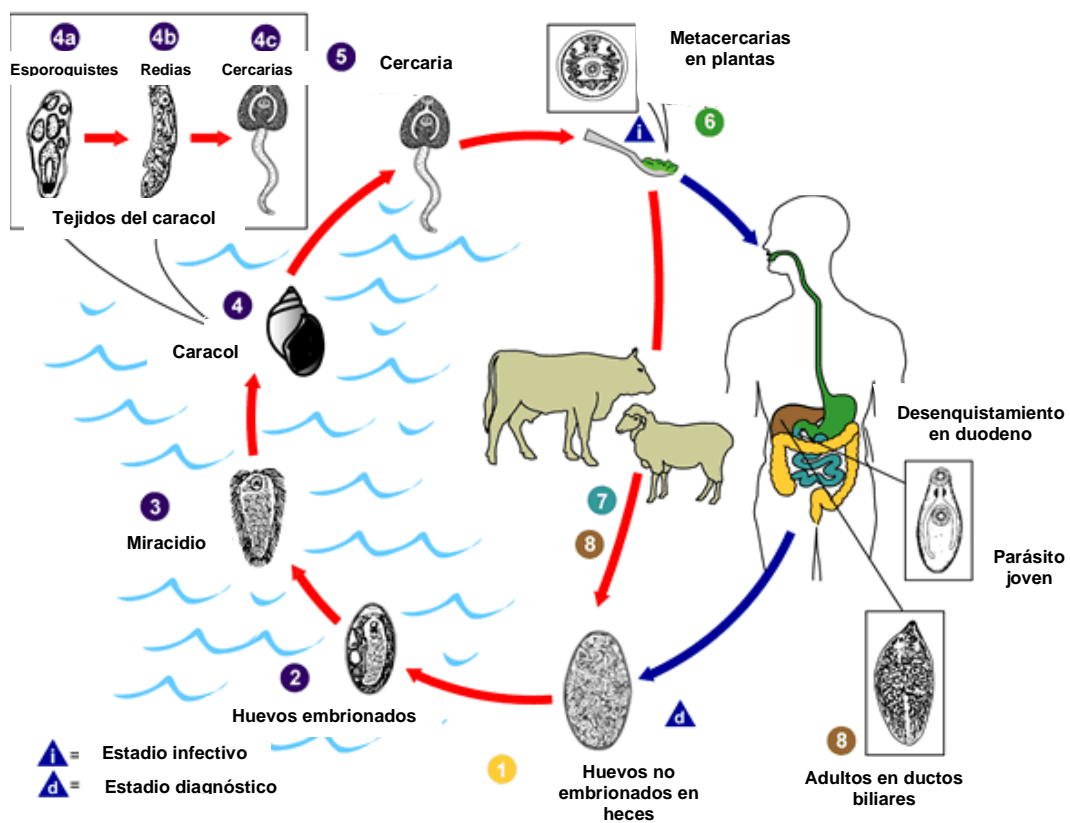


Figura 1. Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*.
Tomado de www.cbu.edu

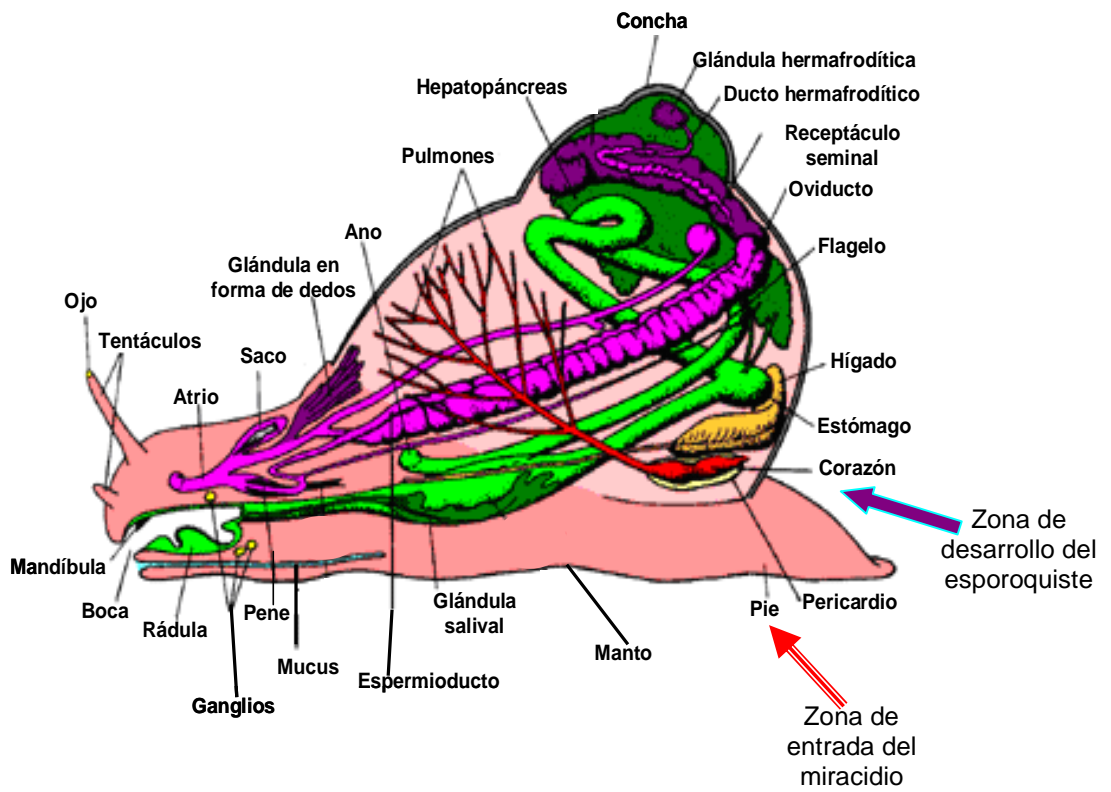


Figura 2. Diagrama que muestra la morfología general de los caracoles del género *Lymnaea*.
 Tomado de Remane, 1989.

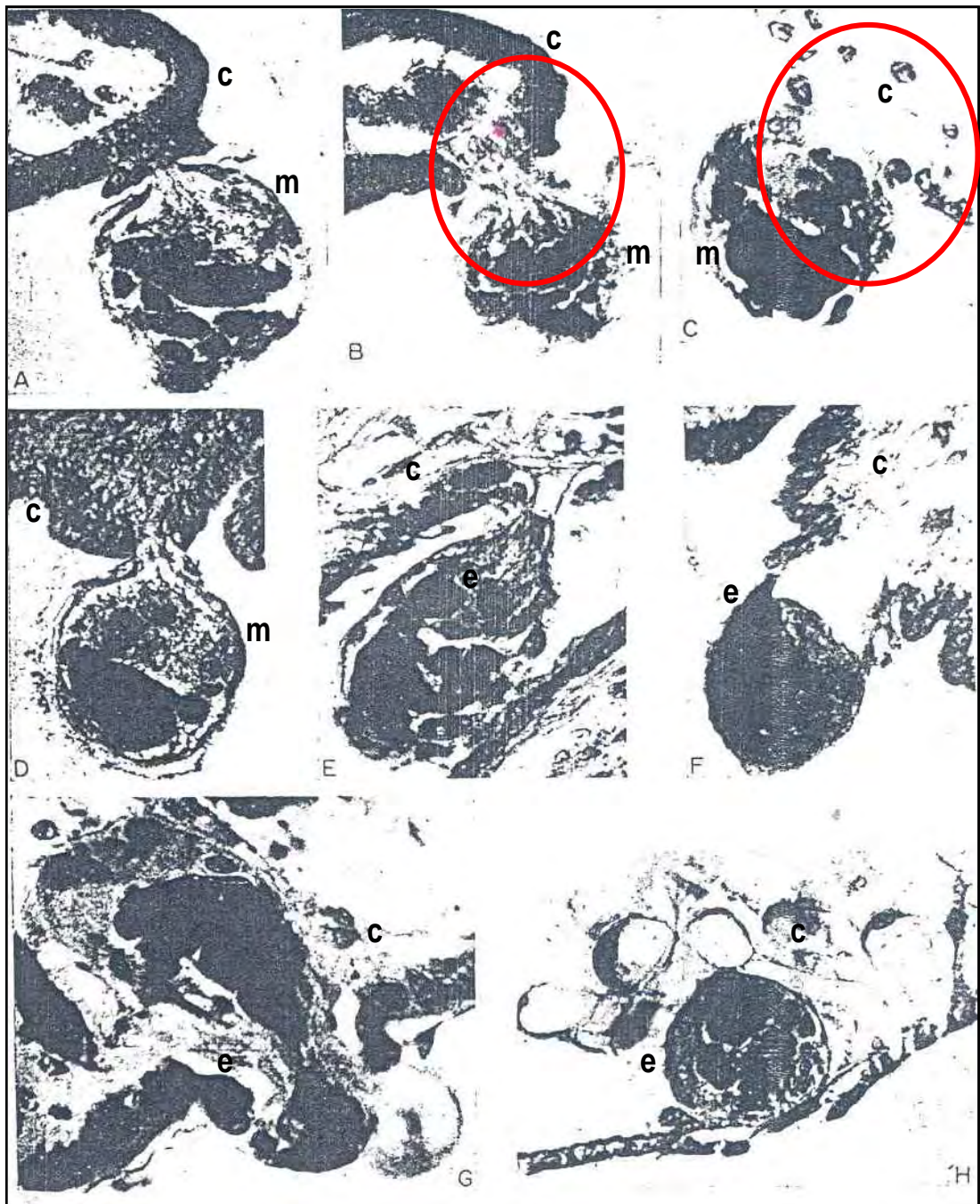


Figura 3. Proceso de invasión del miracidio de *F. hepatica* a *L. truncatula*. **A, B y C.** Unión del miracidio (m) al epitelio del caracol (c), en los círculos se puede observar lisis de las células epiteliales del molusco. **D y E.** Unión del miracidio tejidos sub-epiteliales del molusco. **F, G y H.** Desarrollo del esporoquiste (e). Tomado y modificado de Kendall, 1965.

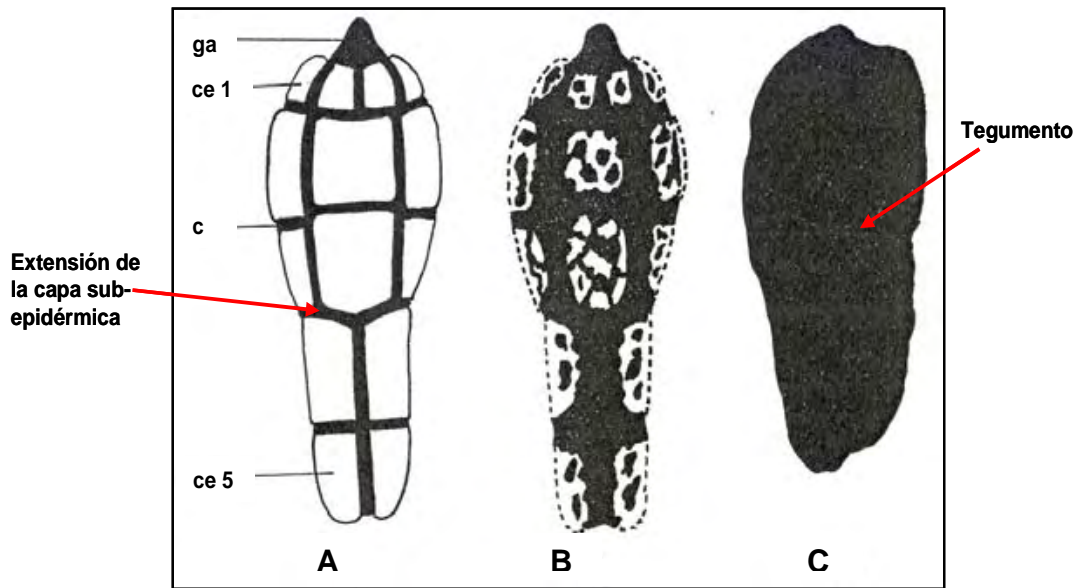


Figura 4. Diagrama que representa (A) el arreglo de las células epiteliales (ce) del miracidio de *F. hepatica* y la presencia de una capa sub-epidérmica; (B) superficie expuesta una vez que el parásito ha perdido las ce; (C) esporoquiste. c= capa-sub-epidérmica; ga= glándula apical. Tomado de Southgate, 1970.

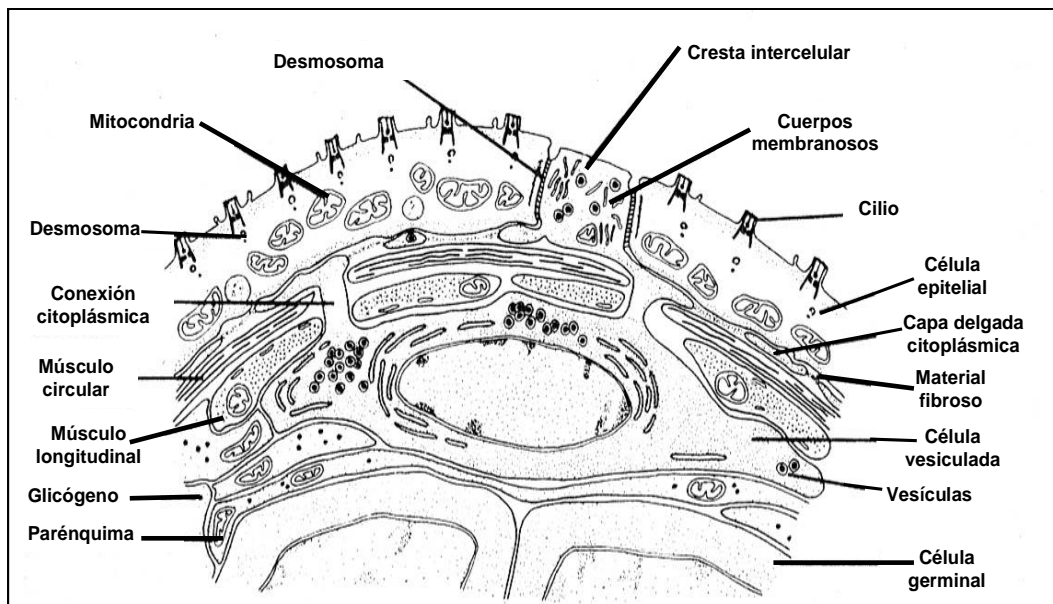


Figura 5. Diagrama que muestra la estructura celular de una sección transversal del miracidio de *F. hepatica*. Tomado de Wilson, 1969.

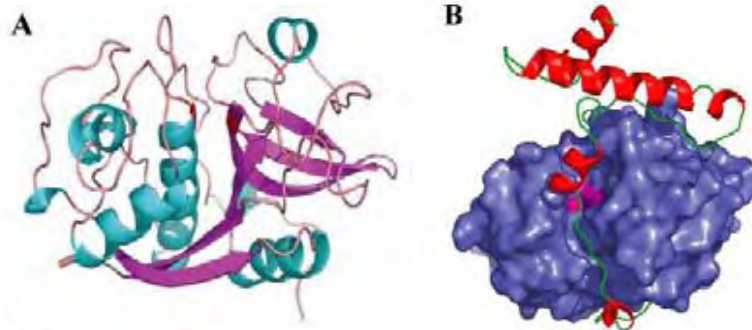


Figura 6. Estructura de la catepsina L1 de *Fasciola hepatica*.
A. Figura de cintas. **B.** Figura de densidades electrónicas.
 Tomado de Stack, 2008.

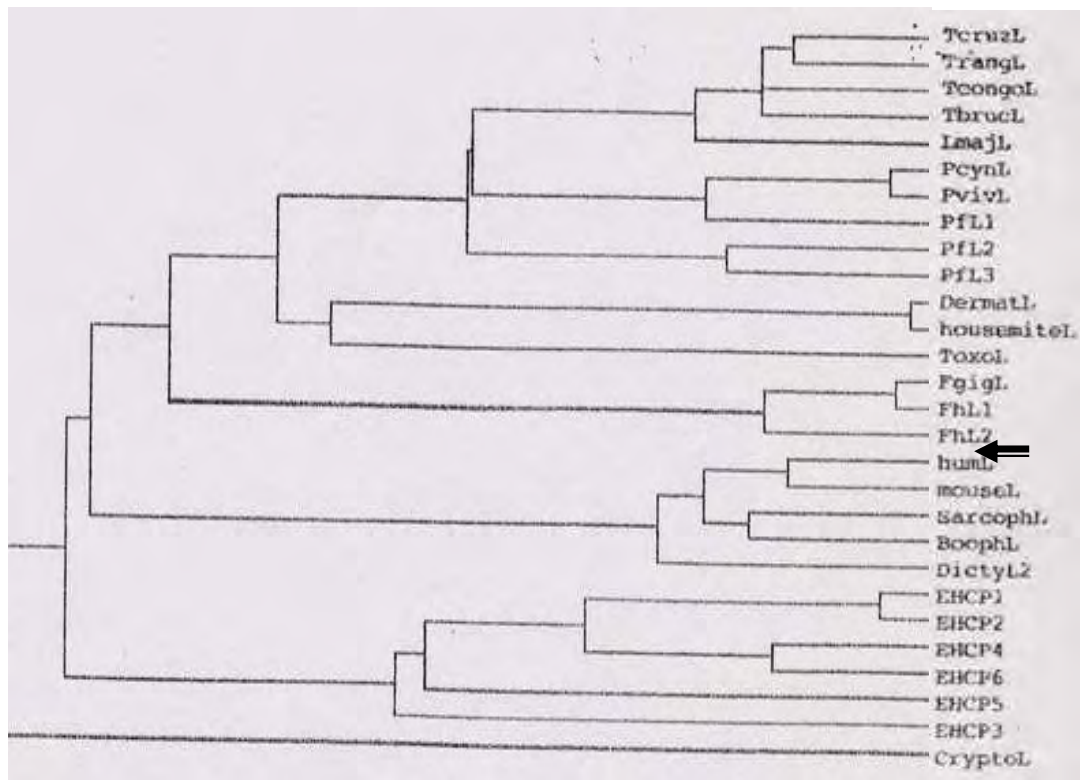


Figura 7. Árbol filogenético en el que se muestra la ubicación de las catepsinas de *Fasciola hepatica*.
 Tomado de Sajid y McKerrow, 2002

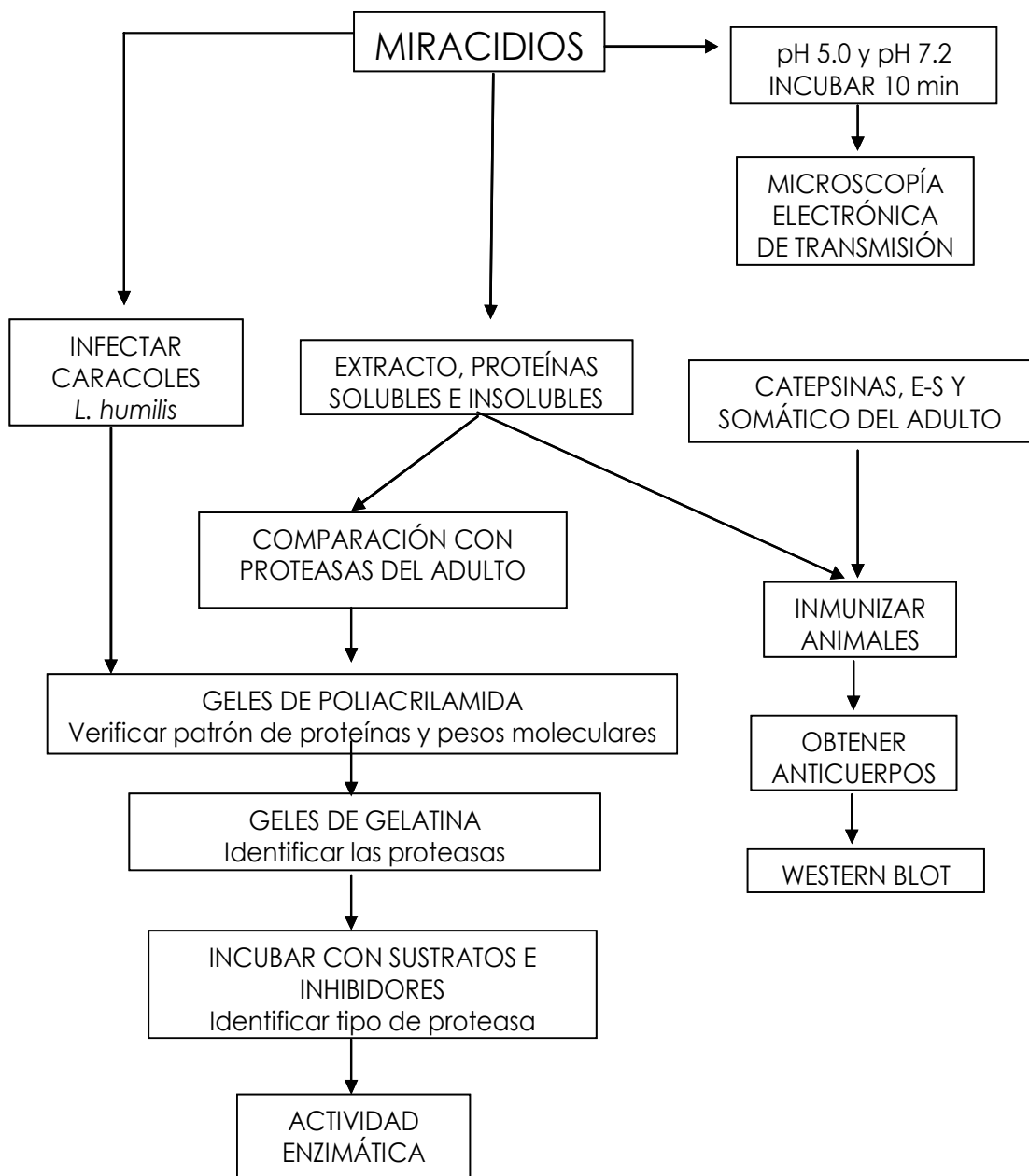


Figura 8. Diagrama de flujo que muestra los pasos generales de la metodología desarrollada.

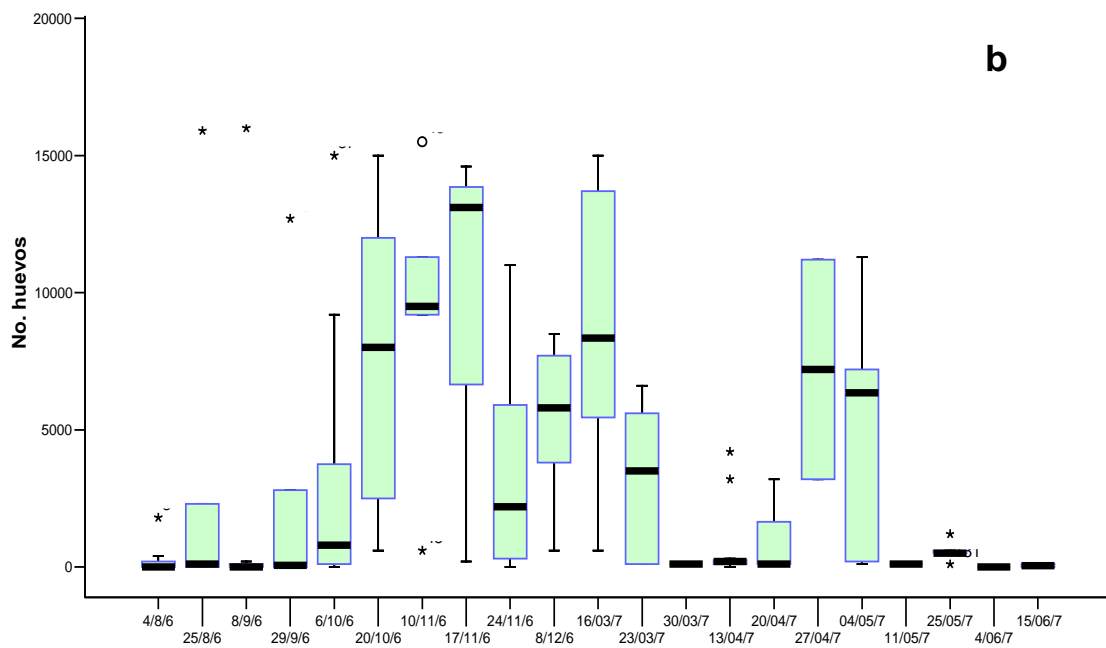
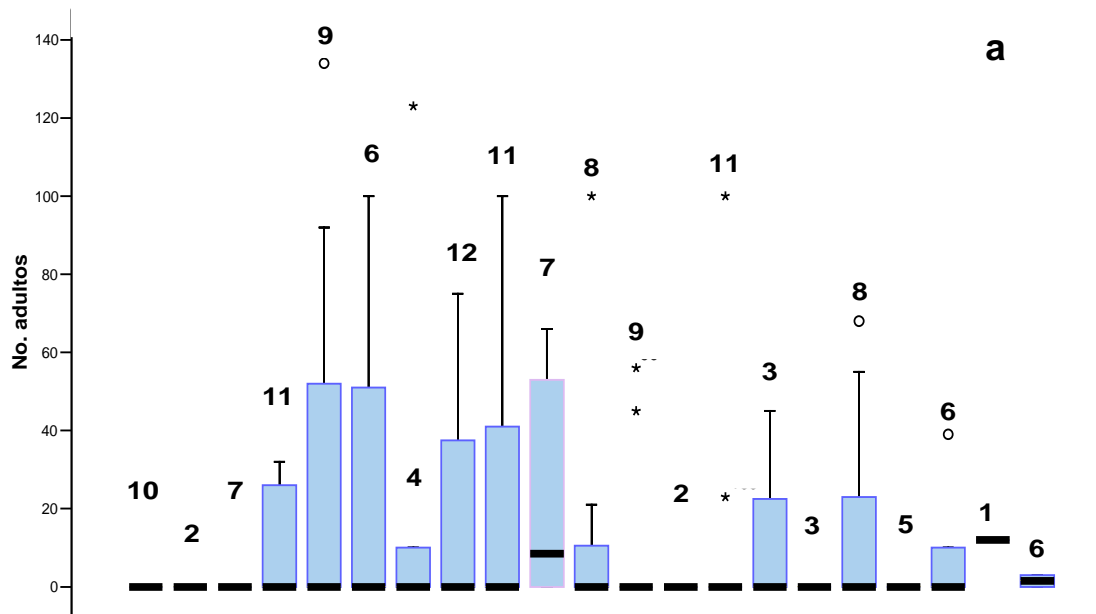


Figura 9. Número de adultos (a) y huevos (b) de *F. hepatica* colectados en el Rastro Municipal de Toluca, Estado de México. Las cajas representan los percentiles 75 y 25; las rayas negras el percentil 50, t las barras los percentiles 90 y 10. Los números en la parte superior indican el número total de órganos colectados. Los asteriscos y los círculos son resultados de órganos individuales que tuvieron cargas superiores al percentil 90.



Figura 10. Corte semi-fino de miracidios de *F. hepatica* en los que se indican las medidas. Tinción con Azul de Toluidina.

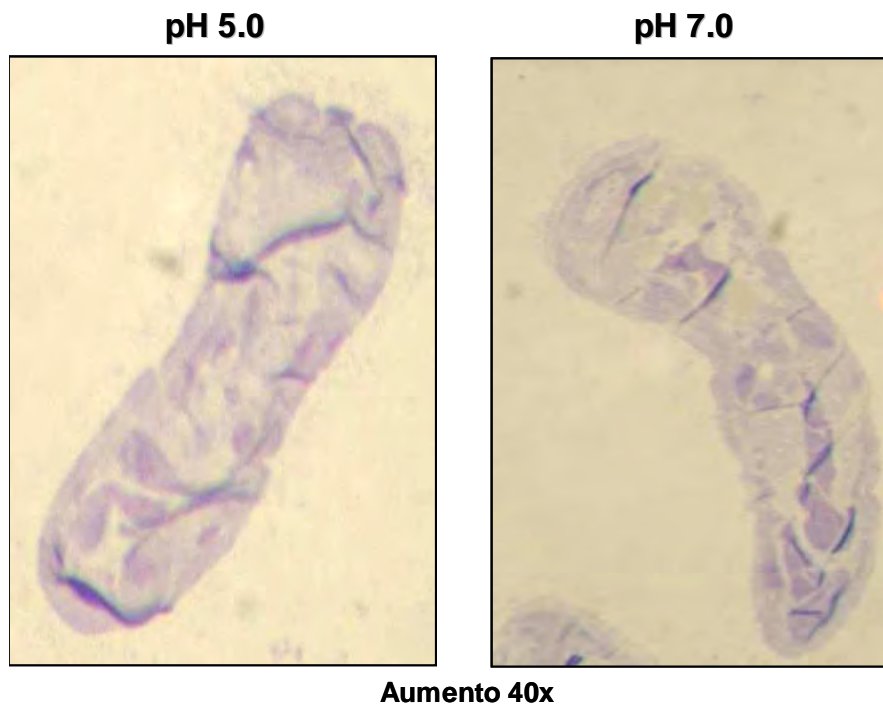


Figura 11. Acercamiento de cortes semi-finos que muestran miracidios de *F. hepatica* incubados a pH 5.0 y 7.2. Tinción con Azul de Toluidina.

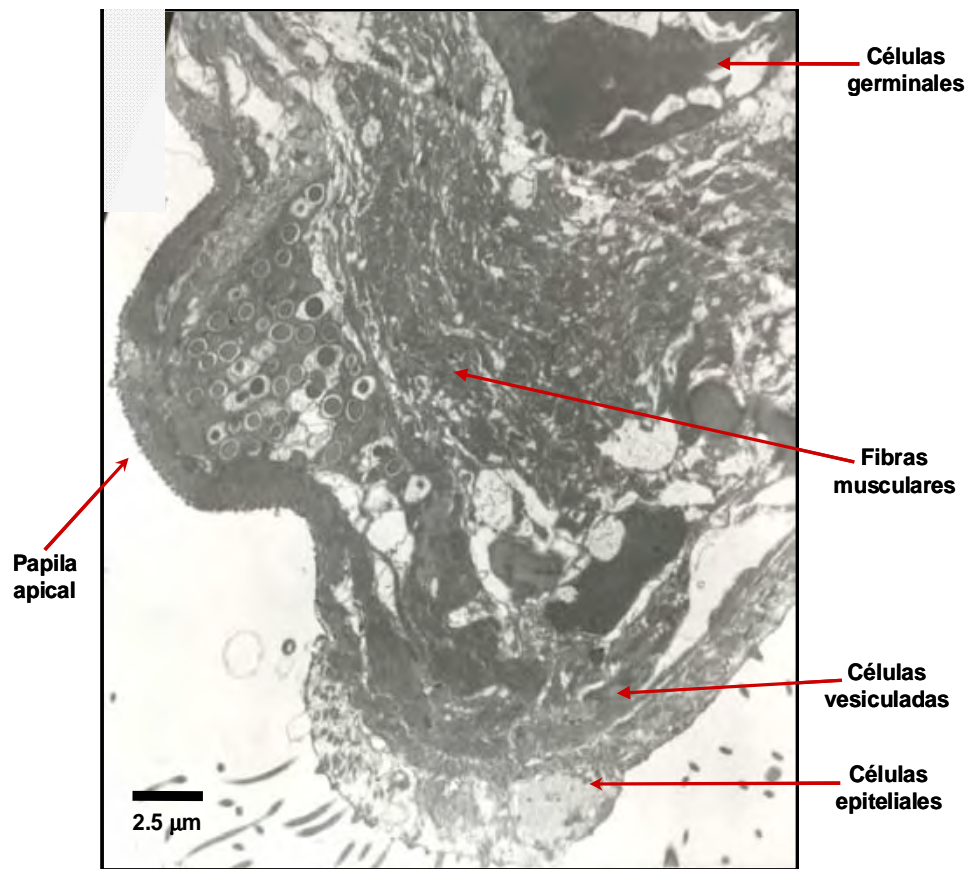


Figura 12. Microfotografía del extremo apical del miracidio de *F. hepatica*. Se puede observar una estructura predominante que corresponde a la papila apical.

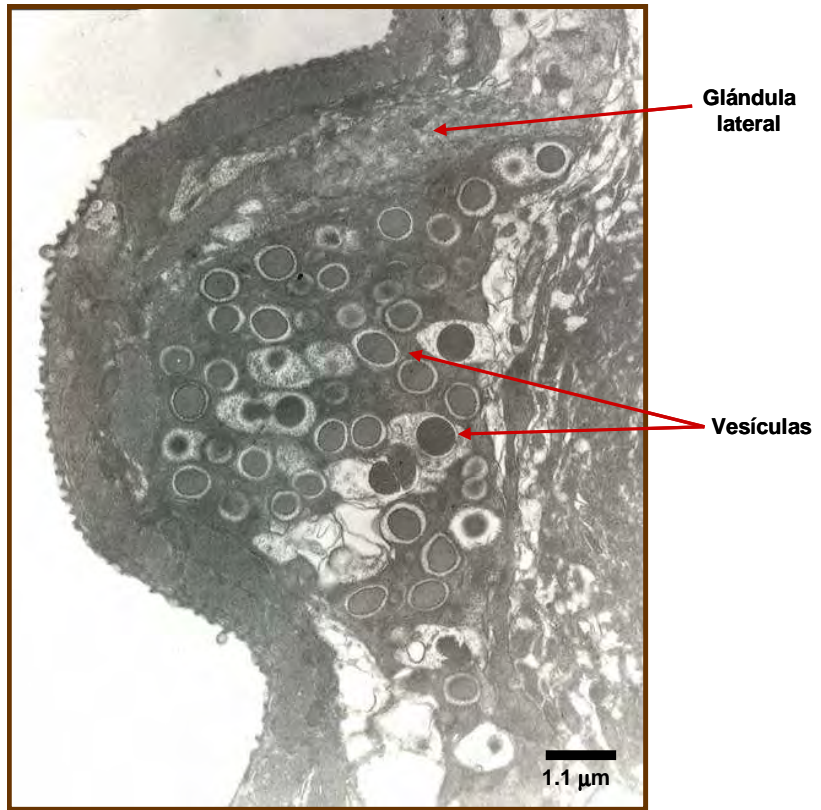


Figura 13. Microfotografía de la estructura de la papila apical del miracidio de *F. hepatica*, nótese las vesículas esféricas.

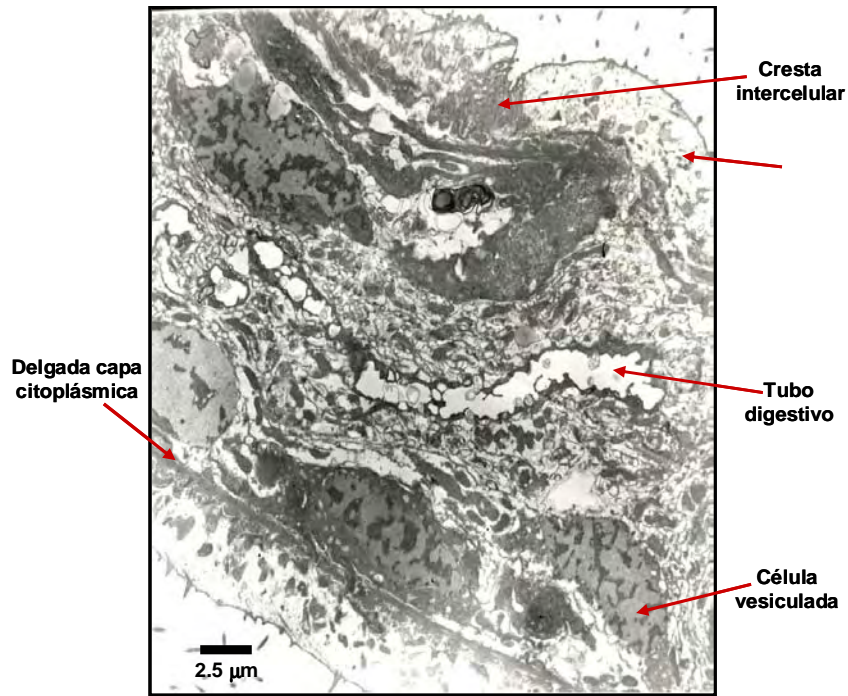


Figura 14. Microfotografía de un corte de la parte media del miracidio de *F. hepatica*.

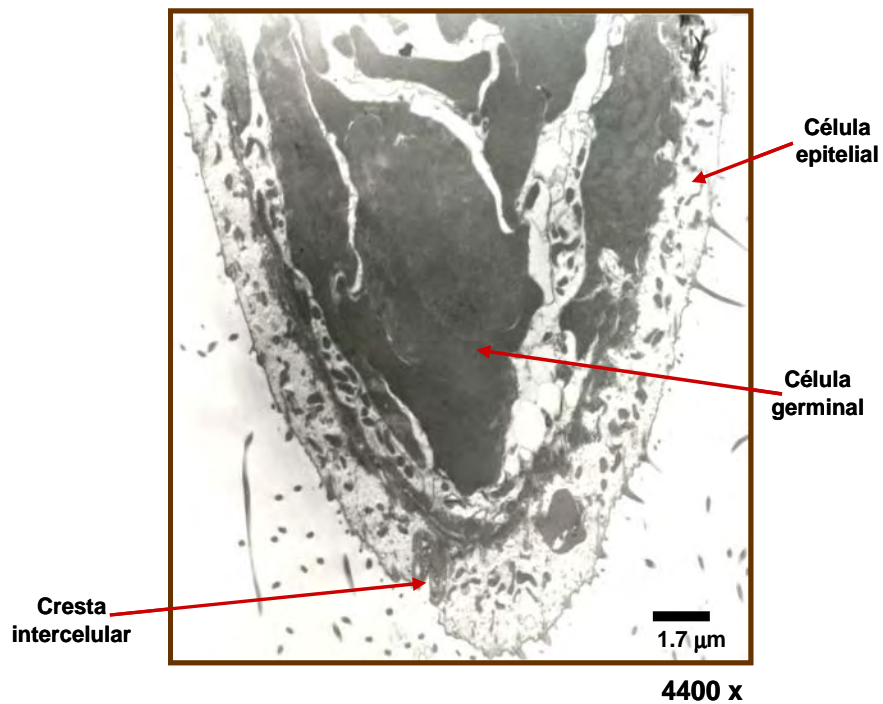


Figura 15. Microfotografía del extremo posterior del miracidio de *F. hepatica*.

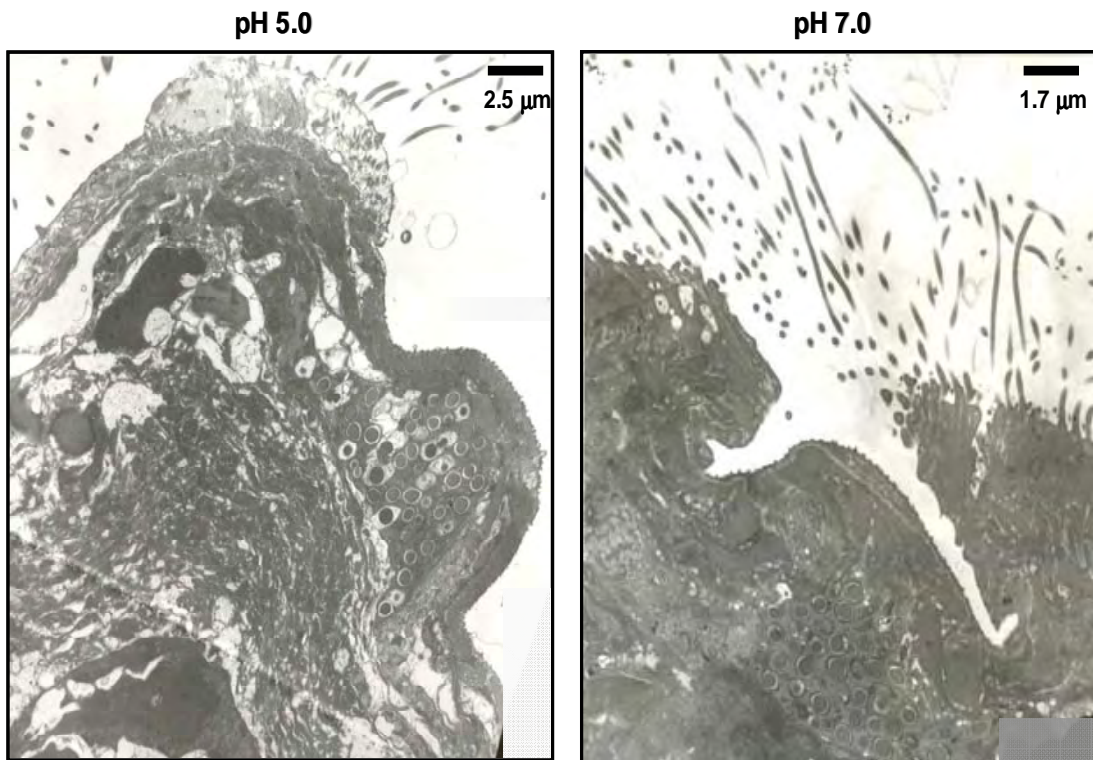


Figura 16. Microfotografías del extremo anterior de miracidios de *F. hepatica* incubados en dos pH's diferentes.

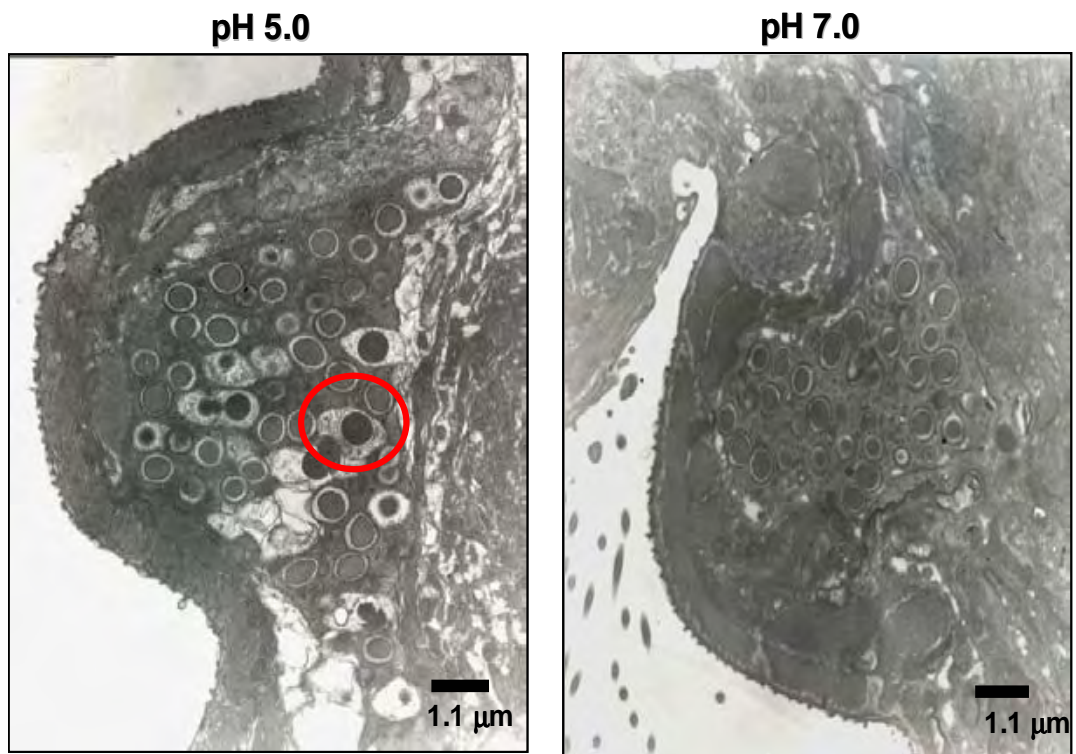


Figura 17. Microfotografías de la papila apical de miracidios de *F. hepatica* incubados en dos pH's diferentes. En círculo se encuentra marcada una vesícula con diferentes características.

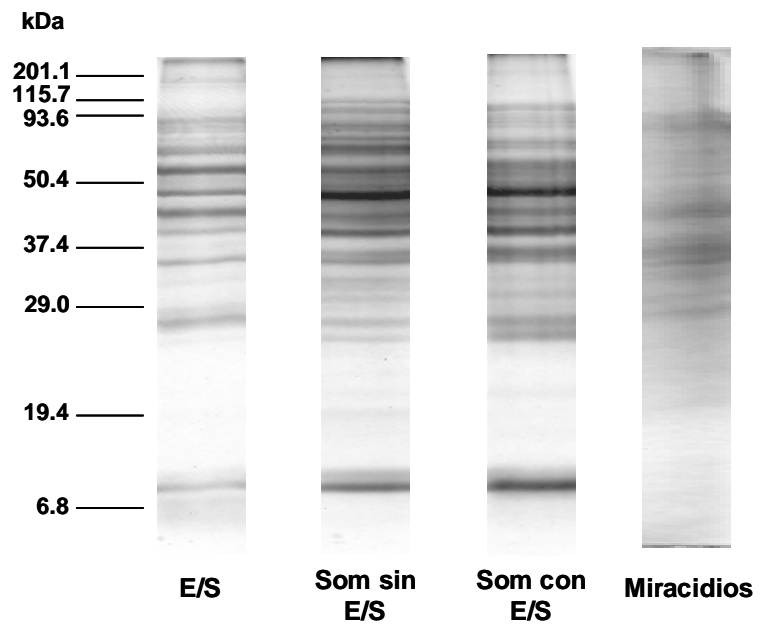


Figura 18. Patrón electroforético de las proteínas del parásito adulto y de los miracidios de *F. hepatica*, en geles al 11% de acrilamida.

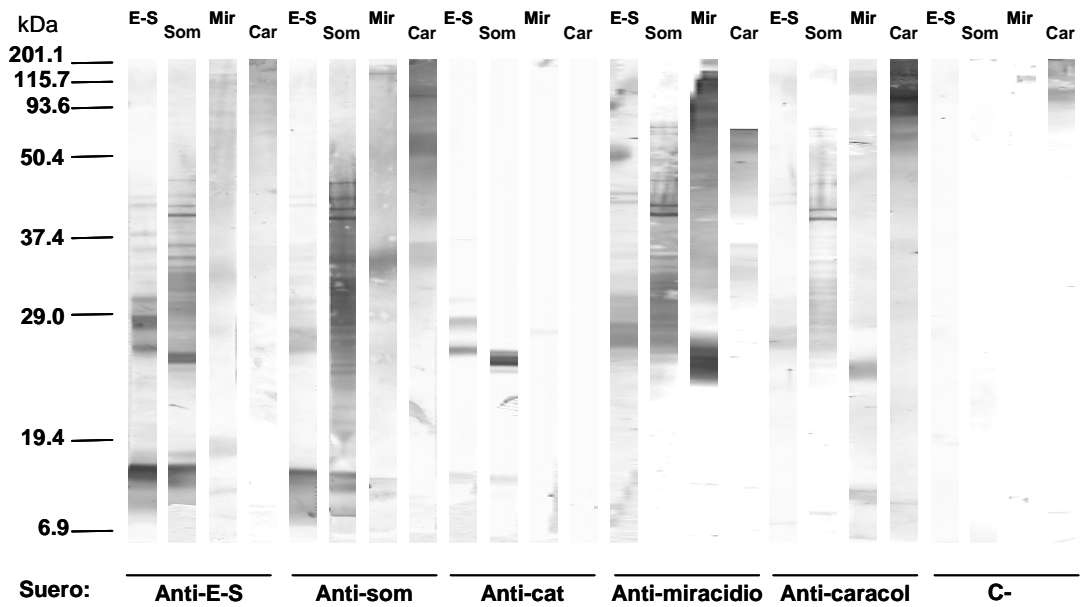


Figura 19. Western blot que muestra las bandas de E-S, somáticas del adulto, de miracidios de *F. hepatica* y *L. humilis* reconocidas por los anticuerpos anti-somático, anti-E-S y anti-Catepsinas L del parásito adulto, anti-miracidios y anti-*L. humilis*. Los sueros negativos no presentan bandas.

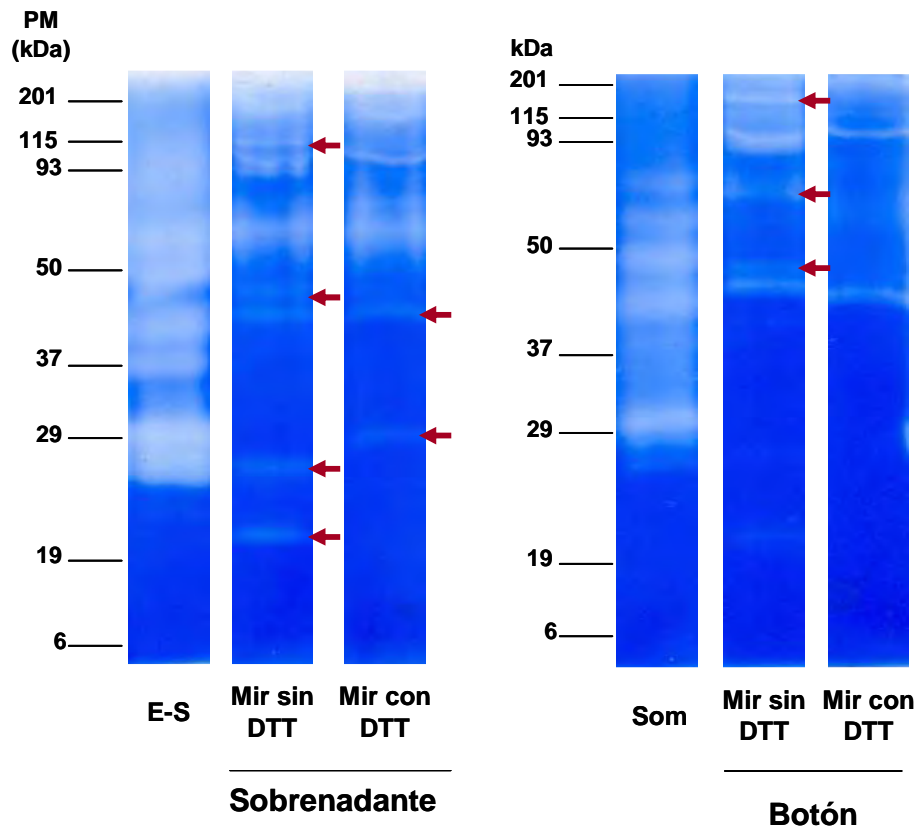


Figura 20. Geles de acrilamida-gelatina (0.01%) que muestran las enzimas proteolíticas presentes en las muestras de adultos y miracidios de *F. hepatica*. Las flechas indican bandas únicas en cada muestra.

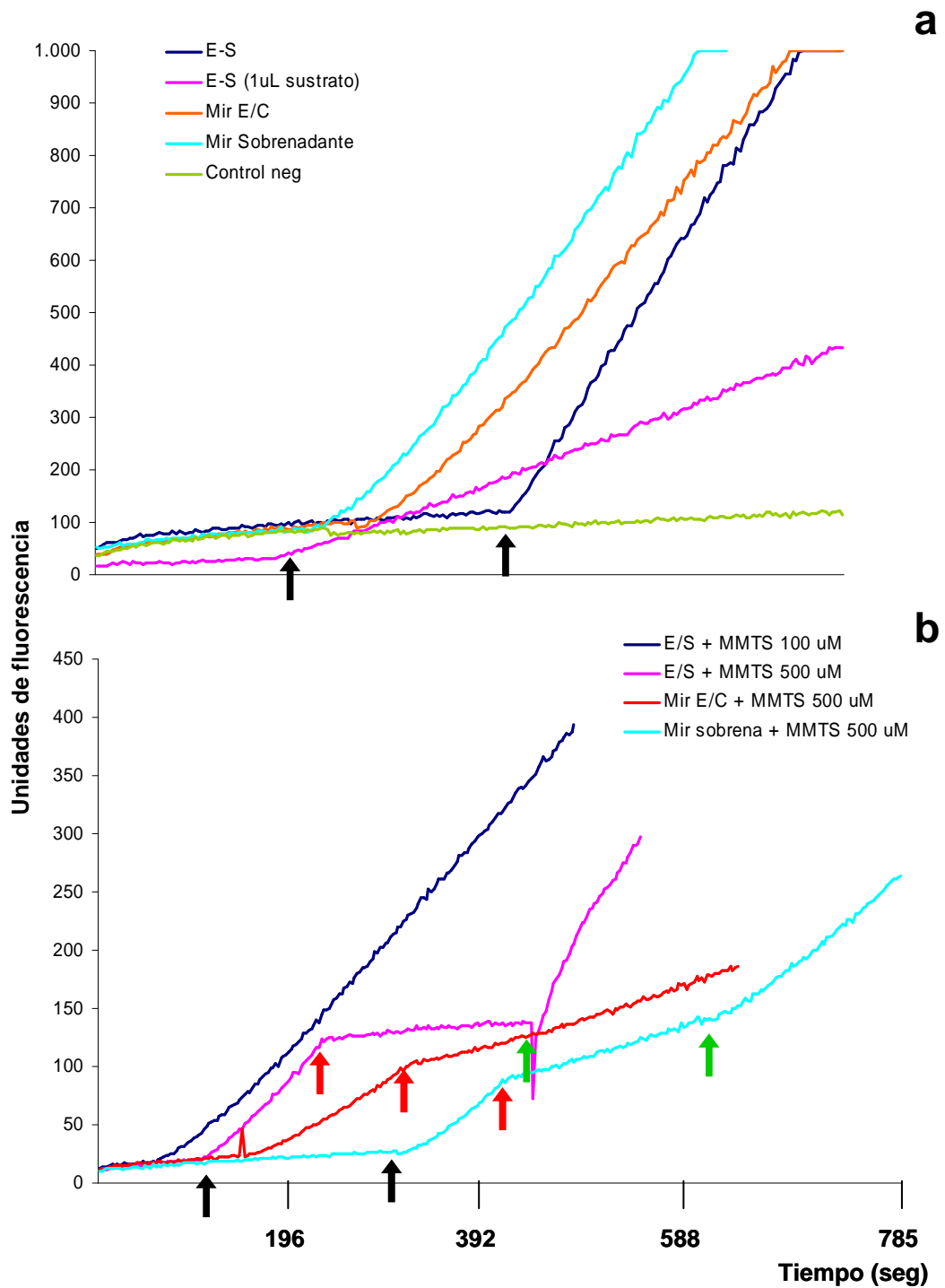


Figura 21. a) Actividad proteolítica de los extractos de *F. hepatica*. b) Efecto del inhibidor (MMTS, flechas rojas) y del potenciador (DTT, flechas verdes) de cisteín-proteasas. La actividad se midió añadiendo el sustrato Z-phe-arg-NHMec (flechas negras).

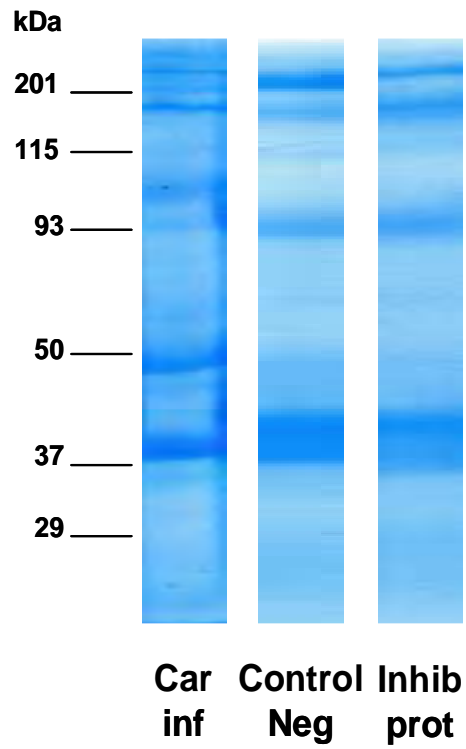


Figura 22. Gel de acrilamida (8%) que muestra el patrón proteico de caracoles *L. humilis* infectados difiere con el del control negativo o cuando se encontraban en presencia de inhibidores de proteasas.