



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

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

**PRONÓSTICO Y EVALUACIÓN
ANTI-*Fasciola hepatica* DE LOS INHIBIDORES
DE LAS CATEPSINAS B Y L**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS**

P R E S E N T A

Yazmín Alcalá Canto

Tutor: Froylán Ibarra Velarde
Comité Tutorial: Héctor Sumano López
Jesús Gracia Mora

México, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 hija Valeria, porque es lo más maravilloso que la vida me ha dado.

A mi esposo Aldo por apoyarme, quererme y comprenderme siempre.

A mis padres y hermanos, por todo el apoyo y cariño que siempre me han otorgado.

AGRADECIMIENTOS

A mis apreciables tutores, por la dedicación, apoyo e invaluables recomendaciones que siempre me proporcionaron.

A los distinguidos académicos designados como sinodales en el examen de candidatura y de grado, por sus útiles sugerencias.

A los responsables y personal del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, por el notable apoyo administrativo recibido a lo largo de mis estudios.

Al personal del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su amistad incondicional y apoyo en todo momento.

Al personal del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en particular al Dr. Fernando Constantino Casas, Jefe de Departamento, al Dr. Enrique Aburto y al Señor Luis por la ayuda proporcionada para la elaboración de esta Tesis.

Al Dr. John P. Dalton, adscrito a la University of Technology Sydney, Australia, por sus valiosas sugerencias.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, por el apoyo recibido para realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el sobresaliente apoyo que otorga a las personas interesadas en la investigación.

Al Dr. Francisco Trigo Tavera, Director de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por el apoyo brindado para la realización de los estudios de posgrado.

A mi amiga Lilia Gutiérrez Olvera por la ayuda, afecto y lealtad que siempre me ha brindado.

A mis amigos y personal de la Dirección General de Salud Animal de la SAGARPA, Lupita Reyes, Arturo Villalobos, Lulú Molina, Sr. Jorge Aguirre, Dr. Assad Heneidi, Sara Aguilar, Mara González, Dr. Octavio Carranza, Paty Alvarado, Luzma, Memo, Erika, Dr. Jorge Padilla, Lic. Castro, Dr. Arturo Campomanes, Dra. Marcela Fuentes, Ing. Toño y Dra. Nina Molina porque me enseñaron a crecer como persona y profesionalista.

A mis alumnos, quienes me han permitido aprender más.

CONTENIDO

Tema	Página
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Presentación del problema.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Proteasas.....	2
2. 2. Inhibidores irreversibles de proteasas.....	4
2. 3. Detección de actividad de las proteasas.....	6
2.3.1. Northern blot y Transcriptasa Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	7
2.3.2. Western blot e Inmunohistoquímica.....	7
2.3.3. Espectrofotometría y Fluorometría	7
2.3.4. Zimografía.....	7
2.4. Zimografía <i>in situ</i> (ISZ).....	8
2.5. Diseño de inhibidores basados en la estructura mediante el uso de proteínas.....	9
2.6. Cisteino proteasas parasitarias.....	10
2.7. Inhibidores de las cisteino proteasas como agentes antiparasitarios.....	11
2.8. Proteasas de <i>Fasciola. hepatica</i>	12
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	16
5. JUSTIFICACIÓN.....	17
ARTÍCULO 1: <i>Fasciola hepatica</i> proteolytic activity in liver revealed by in situ zymography	18
ARTÍCULO 2: Dose-response inhibition of proteolytic activity by a cysteine protease inhibitor in a murine model of fasciolosis.....	22

ARTÍCULO 3: Effect of a cysteine protease inhibitor on <i>Fasciola hepatica</i> (liver fluke) fecundity, egg viability, parasite burden and size in experimentally-infected sheep.....	27
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIÓN.....	39
REFERENCIAS.....	40
CUADROS Y FIGURAS	
Cuadro 1. Eficiencia comparativa de fármacos anti- <i>Fasciola hepatica</i>	51
Cuadro 2. Espectro de eficiencia de los fármacos a dosis recomendadas contra <i>Fasciola hepatica</i> en ovinos.....	52
Cuadro 3. Clases catalíticas de proteasas.....	53
Cuadro 4. Comparación de las propiedades de las catepsinas B y L de mamíferos.....	54
Cuadro 5. Catepsinas L y B parasitarias como factores de virulencia en la interacción hospedador-parásito.....	55
Cuadro 6. Catepsinas L y B parasitarias involucradas en la biología del parásito.....	56
Figura 1. Papeles fisiológicos de las cisteino proteasas en los mamíferos.....	57
Figura 2. Inhibidores de cisteino proteasas que contienen ácido epoxisuccínico.....	58
Figura 3. Estructura del complejo formado por la interacción del E-64 con una cisteino proteasa.....	59
Figura 4. Vista esquemática de la ISZ.....	60
Figura 5. Esquema de la célula intestinal en <i>Fasciola hepatica</i> en la fase secretoria y absorbente de su ciclo.....	61

RESUMEN

La evidencia obtenida a partir de estudios *in vitro* sugiere que las cisteino proteasas, específicamente las catepsinas B y L de *Fasciola hepatica*, desempeñan papeles clave en la invasión del hígado del hospedador, evasión de la respuesta inmune, nutrición y fecundidad del parásito. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de un inhibidor de cisteino proteasas *in vivo* en un modelo murino y ovino de fasciolosis. Utilizando la técnica de zimografía *in situ* con película fotográfica, se reveló la inhibición dosis-dependiente de la actividad proteolítica en el tejido hepático de ratones experimentalmente infectados inducida por la administración intraperitoneal del inhibidor específico de cisteino proteasas N-[N-(L-3-trans-carboxioxirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina (E-64). En el experimento desarrollado en el hospedador ovino se observó que la inyección intraperitoneal de [L-transepoxisuccinil-leucilamido (3-metil) butano; E-64-C] (Ep-475) disminuyó significativamente los niveles séricos de las enzimas AST, LDH y GGT, y con ello se asumió una reducción en la magnitud del daño hepático. En ambos modelos animales los inhibidores de cisteino proteasas redujeron significativamente tanto la oviposición como viabilidad de los huevos de *F. hepatica* y en el ovino los trematodos fueron más pequeños que los extraídos de los testigos no tratados ($P < 0.05$). Los resultados sugieren que las catepsinas de *F. hepatica* desempeñan un papel esencial tanto en la fisiología del parásito como en la migración parenquimal, lo cual permite señalarlas como blancos potenciales para la intervención farmacológica.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*; catepsinas; inhibidores; proteasas; zimografía *in situ*.

ABSTRACT

Evidence from *in vitro* studies suggests that *Fasciola hepatica* cysteine proteases, specifically cathepsins B and L, play key roles in host liver tissue invasion, immune response evasion, nutrition, and parasite fecundity. The aim of this study was to determine the effect of a cysteine protease inhibitor *in vivo* in a murine and ovine model of fasciolosis. Using the film *in situ* zymography technique, the dose-dependent inhibition of proteolytic activity in liver tissue of experimentally-infected mice by intraperitoneal administration of N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine (E-64) was revealed. In the experiment carried out in the ovine host, it was observed that the intraperitoneal injection of [L-transepoxy succinyl-leucylamide (3-metil) butane; E-64-C] (Ep-475) significantly decreased serum levels of the enzymes AST, LDH, and GGT, indicating a decreased liver damage. In both animal models the cysteine protease inhibitors significantly reduced *F. hepatica* egg production and viability, and flukes collected from treated-sheep livers were smaller than those collected from untreated controls ($P < 0.05$). Results suggest that *F. hepatica* cathepsins play an essential role in physiology and parenchymal migration, which pinpoints them as potential targets for pharmacological intervention.

Keywords: *Fasciola hepatica*; cathepsins; inhibitors; proteases; *in situ* zymography.

INTRODUCCIÓN

1. Presentación del problema

El trematodo *Fasciola hepatica* es el agente causal de la fasciolosis en ovinos y bovinos. De los 36 millones de bovinos existentes en México, 18 millones están expuestos a la infección por *F. hepatica*, de éstos, 6 millones se encuentran infectados, por lo que se requieren entre 12 y 15 millones de dosis de fasciolicidas por año para tratar de controlar esta parasitosis (Quiroz e Ibarra, 2000). La fasciolosis es también un patógeno emergente de humanos particularmente en Bolivia, Perú, Ecuador, Egipto e Irán (O'Neill *et al.*, 1998; Mas-Coma *et al.*, 1999; Rokni *et al.*, 2002). Actualmente existen en el mercado varios fármacos disponibles para el tratamiento de la fasciolosis en animales, incluyendo al closantel, clorsulon, rafoxanide, nitroxinil y triclabendazol, entre otros (Cuadros 1 y 2). Después de la dosificación, se obtiene la concentración terapéutica de estos medicamentos en sangre por 1-2 días y por consiguiente solamente se eliminan las infecciones existentes. Por lo tanto, los animales que se encuentran en las pasturas contaminadas son susceptibles a reinfectarse. Entre los fármacos anteriormente mencionados, el triclabendazol requiere de una mención particular, debido a que es el único medicamento que actúa contra los estadios juveniles de la enfermedad, es decir, aquéllos que migran a través del hígado e inducen la fasciolosis aguda. Este antiparasitario comenzó a comercializarse en Irlanda en 1983 y ha tenido mucho éxito. Sin embargo, ya se detectaron cepas resistentes al triclabendazol en Irlanda (Anon, 1995), Australia (Fairweather y Boray, 1999), Escocia (Mitchell *et al.*, 1998) y Holanda (Moll *et al.*, 2000; Gaasenbeek *et al.*, 2001). Es por ello que el control de la fasciolosis depende de la identificación de blancos potenciales parasitarios que permitan diseñar nuevos fármacos y vacunas que proporcionen un beneficio visible a los productores a un precio competitivo.

2. Antecedentes

2.1. Proteasas

Las proteasas, conocidas también como proteinasas, peptidasas, o enzimas proteolíticas, forman uno de los grupos de proteínas más grandes e importantes. Estas enzimas están involucradas en un número importante de procesos fisiológicos, incluyendo digestión, coagulación sanguínea, recuperación de heridas, diferenciación celular y crecimiento (Powers *et al.*, 2002). Las proteasas pueden categorizarse de acuerdo con sus especificidades de sustrato o mecanismos de catálisis. Las enzimas que degradan los extremos de un polipéptido se conocen como exopeptidasas, y aquéllas que lo hacen dentro del polipéptido se llaman endopeptidasas. Con base en el mecanismo de hidrólisis peptídica, las proteasas se clasifican en cinco grupos o clases principales: aspártico, serino, treonino, cisteino y metalo proteasas. El Cuadro 3 muestra las características más importantes de las principales proteasas catalíticas.

Actualmente se cuenta con datos sobre la secuencia de aminoácidos de alrededor de 450 peptidasas de más de 1400 organismos (bacterias, protozoarios, hongos, plantas, animales y virus) y se han organizado en familias evolutivas y clanes de acuerdo con lo sugerido por Rawlings y Barret (1994), quienes propusieron que una familia de peptidasas contiene un grupo de enzimas que demuestra evidencia sobre su relación evolutiva mediante sus estructuras terciarias similares, por el orden de los residuos catalíticos en sus secuencias, o por la secuencia común alrededor de sus residuos catalíticos.

Las cisteino proteasas (CP) son proteínas con masas moleculares de 21-30 kDa. Su mayor actividad hidrolítica se obtiene a un pH de 4.0 a 6.5 (Grzonka *et al.*, 2001). La actividad enzimática de las CP se relaciona principalmente con la degradación enzimática de proteínas. Las catepsinas son proteasas lisosomales que están distribuidas en tejidos normales y están involucradas en una gran variedad de procesos fisiológicos. Las exopeptidasas son las catepsinas B, C, H y X, y las endopeptidasas son las catepsinas L, S, V y F. Cabe señalar que la catepsina B presenta también función de endopeptidasa. Todas las CP lisosomales son catepsinas, pero no todas las catepsinas son CP lisosomales. Las

catepsinas D y E son aspártico proteasas, mientras que las catepsinas A y G son serino proteasas y las catepsinas E y G no son proteasas lisosomales (Turk y Guncar, 2003). Las CP son probablemente las enzimas hidrolíticas más ampliamente representadas y una de sus funciones principales es la degradación de proteínas intra y extracelulares. Sin embargo, las actividades de las CP no se confinan solamente al catabolismo, ya que también tienen papeles importantes como en la síntesis de citocinas y prohormonas (Thornberry *et al.*, 1992), presentación de antígenos (Riese y Chapman, 2000), metabolismo de precursores de proteínas (Bernstein *et al.*, 1996), apoptosis (Patel *et al.*, 1996), activación del complemento (Frade *et al.*, 1998), envejecimiento (Di Paolo *et al.*, 1992), resorción ósea mediada por osteoclastos (Garnero *et al.*, 1998) y eventualmente, invasión de células neoplásicas (Lah y Kos, 1998; Koblinsky *et al.*, 2000). La Figura 1 esquematiza algunas de las principales funciones de las cisteino proteasas en los mamíferos. La catepsina B también actúa como una proteasa proapoptótica involucrada en la citotoxicidad. El daño hepático y la fibrosis son características cardinales de la mayoría de las enfermedades crónicas del hígado. Estos procesos se combinan para provocar cirrosis y falla hepática. Los mecanismos del daño del hepatocito son complejos e involucran la interacción de citocinas, ácidos biliares tóxicos, células inflamatorias y alteraciones en el flujo vascular. Los mecanismos interdependientes y multifacéticos que culminan en daño hepático ha hecho que se dificulte la identificación de los procesos dominantes. Además de la apoptosis, virtualmente todas las enfermedades hepáticas están asociadas con una respuesta inflamatoria. La relación entre la apoptosis del hepatocito y la inflamación es compleja, pero los conceptos recientes sugieren un mecanismo potencial entre estos dos procesos. Se ha demostrado que la apoptosis induce la liberación de quimocinas CXC en el hígado, agentes potentes quimiotácticos de neutrófilos (Luster, 1998; Belperio *et al.*, 2000). En concordancia con estos datos, la inhibición de la apoptosis en hepatocitos bloquea la trans migración de neutrófilos al hígado durante las condiciones dañinas (Jaeschke, 2002). Consecuentemente, la fibrosis, daño hepático y la inflamación, son, en parte, catepsina B-dependientes (Canbay *et al.*, 2003). Entre las enzimas lisosomales, las catepsinas B y L han sido objeto de numerosos estudios, y en el en el Cuadro 4 se resumen sus características principales.

2.2. Inhibidores irreversibles de proteasas

La proteólisis descontrolada, indeseable, o no regulada, puede conducir a muchos estados patológicos, tales como el enfisema, choque, infecciones virales, cáncer, enfermedad de Alzheimer, inflamación y artritis. Por consiguiente, los inhibidores de las proteasas tienen una utilidad potencialmente considerable para la intervención terapéutica en una gran variedad de estados patológicos (Powers *et al.*, 2002).

Los primeros inhibidores irreversibles específicos de serino, cisteino y treonino proteasas fueron diseñados mediante la adición de un reactivo a un sustrato. Los primeros reactivos utilizados fueron agentes alquilantes, tales como halocetonas. Subsecuentemente, se comenzaron a diseñar otros inhibidores, con base en la variación entre el sitio de especificidad de las diversas proteasas. Esta especificidad está determinada por la forma y carácter electrostático de los distintos subsitios de unión. El diseño de inhibidores ha progresado más allá del estadio de simplemente añadir un reactivo a la secuencia peptídica apropiada y específica para la proteasa blanco. Actualmente se utilizan dos modos principales para desarrollar nuevos inhibidores de proteasas. El primero involucra una revisión rápida de bibliotecas de moléculas pequeñas que se encuentran a la mano. De este modo se han descubierto varias estructuras de inhibidores, sin embargo, este procedimiento en masa revela frecuentemente numerosos compuestos que no son interesantes. Por ejemplo, al realizar la revisión de inhibidores de cisteino proteasas, generalmente se encuentran muchos agentes alquilantes no específicos u agentes oxidantes. La otra manera de llegar al descubrimiento de un inhibidor, consiste en el diseño de fármacos basado en las estructuras utilizando la cristalografía con rayos X (Kuntz *et al.*, 1994). De acuerdo con su mecanismo de inhibición, estos inactivantes se dividen en: agentes alquilantes (fluorometilcetonas, clorometilcetonas, aciloximetilcetonas, epóxidos, aziridinas, vinilsulfonas, entre otros), agentes acilantes (beta-lactámicos, lactonas, azapeptídicos y una gran variedad de derivados heterocíclicos), agentes fosfonilantes (fosfonatos peptídicos y fosfonil fluoruros), mientras que los agentes sulfonilantes comprenden en su mayoría a los sulfonil fluoruros (Powers *et al.*, 2002). Una vez que se diseña un inhibidor para una

proteasa, se realizan numerosas modificaciones a su estructura para mejorar su especificidad y potencia. Muy frecuentemente, se determina un gran número de estructuras cristalinas de complejos enzima-inhibidor y se utiliza el modelado molecular para guiar el trabajo de diseño. La modificación sistemática de las estructuras de los inhibidores actuales ofrece muchas oportunidades para mejorar la potencia del inhibidor y su selectividad (Powers *et al.*, 2002).

Los inhibidores específicos de las catepsinas podrían ser útiles para el estudio de sus funciones biológicas individuales. Hanada *et al.* descubrieron un nuevo tipo de inhibidor irreversible de las CP (Hanada *et al.*, 1978). El primer inhibidor de este tipo fue aislado de *Aspergillus japonicus*, se identificó como N-[N-(L-3-trans-carboxioxirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina (E-64) e inhibe específicamente a las catepsinas B, L y a la papaina. Hashida *et al.* descubrieron el mecanismo *in vivo* de inhibición de las catepsinas B y L mediante el uso de E-64 y sus derivados. Esos estudios propusieron que estos inactivantes son los más útiles inhibidores de las cisteino proteasas *in vivo*, de acuerdo con las siguientes propiedades: *i.* Inhibición específica y potente; *ii.* Permeabilidad efectiva en células y tejidos; *iii.* Baja toxicidad; *iv.* Facilidad de síntesis y estabilidad (Hashida *et al.*, 1982). En general, el E-64 y sus derivados inhiben eficientemente a la mayoría de las CP, papaina, ficina, bromelaina, catepsinas B, H, F, K, L, O, S, V, X, calpain, calpaina II y cruzaina. Las CP estreptocócicas, las dipeptidil peptidasas y la clostripaina se inhiben lentamente por el E-64. No inhibe serino, aspártico ni metalo proteasas. Sin embargo, no todas las CP son inhibidas por el E-64. Como ejemplo están la legumaina y las caspasas. Una vez que se reconoció el poder inhibidor del E-64 hacia las CP, comenzaron a sintetizarse un gran número de derivados dirigidos hacia ciertas catepsinas, como la B y la L, *e.g.* E-64a, E-64 c (Ep-475), E-64d (loxistatina), circinamida, catestatina C, CA028, CA030, CA074 y CLIK 148. La Figura 2 esquematiza las fórmulas químicas del E-64, Ep-475 y CA030, inhibidores de cisteino proteasas caracterizados por poseer ácido epoxisuccínico. La inactivación de las CP provocada por los inhibidores derivados del ácido epoxisuccínico se produce por la alquilación del residuo de cisteína activo, como consecuencia de la apertura nucleofílica del anillo epóxido (Schirmeister, 1999). Estos derivados han sido propuestos

como posibles agentes terapéuticos y se han utilizado en una gran variedad de estudios biológicos, así como en estudios de la función biológica de las CP (Powers *et al.*, 2002).

Debido a que estos compuestos forman un enlace covalente entre el grupo epoxisuccinilo del E-64 y el grupo tiol activo de las CP, la inhibición es irreversible y no competitiva (Katunuma y Kominami, 1995). Este inhibidor forma uniones de hidrógeno o contactos electrostáticos cortos con los átomos polares de los residuos del sitio activo de la proteasa, es decir, existe una unión covalente entre el átomo de carbón del epoxi del inhibidor y un átomo del residuo activo de cisteína de la enzima (Matsumoto *et al.*, 1999) (Figura 3). También es importante mencionar que los estudios en los que se han intentado combinar las características estructurales de los inhibidores del tipo E-64 y CA030 en construcciones “quiméricas”, permitieron descubrir que para incrementar la eficiencia y selectividad de inhibición se requiere de un diseño *de novo*. Además, la potencia de los inhibidores selectivos de la catepsina B se limita por la dependencia tan marcada al pH al interactuar con la enzima (Schaschke *et al.*, 1997). Desde su descubrimiento, el E-64 ha sido utilizado como una herramienta para el diagnóstico acertado de la actividad de las CP.

2.3. Detección de actividad de las proteasas

El entendimiento de la función de las proteínas en el contexto de su ambiente natural celular es quizás uno de los retos más grandes que deben enfrentar disciplinas tales como la bioquímica, biología y fisiología animal. La visualización de la activación enzimática y su regulación dentro de una célula o un animal en tiempo real, proporciona un fundamento para el entendimiento de cómo funciona la proteína y con ello vías metabólicas. Las enzimas pueden ser reguladas por múltiples mecanismos, tales como su expresión espacial y temporal y unión a moléculas pequeñas o co-factores de proteínas. De ese modo, los intentos para entender las regulaciones funcionales de una enzima utilizando un ensayo *in vitro* son generalmente erróneos. Además es difícil concebir cómo el uso de condiciones *in vitro* fijas puede imitar las condiciones *in vivo*. Es por ello que se postula que tienen más valor las herramientas para determinar la actividad enzimática en el contexto de una célula intacta, o de preferencia, dentro de un organismo (Baruch *et al.*, 2004). Se han descrito

varias técnicas para determinar la presencia de proteasas en los tejidos, entre las que destacan las siguientes pruebas:

2.3.1. Northern blot y Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Estos métodos se utilizan para cuantificar el ácido ribonucleico mensajero (RNAm) en extractos de tejidos (Liotta y Petricoin, 2000). Sin embargo, la actividad transcripcional no refleja necesariamente la cantidad y actividad de la proteína de un determinado gene.

2.3.2. Western blot e Inmunohistoquímica

Estas técnicas se emplean para determinar la presencia y localización de las proteasas, pero no proporcionan información sobre la actividad de las mismas, debido a que las proteasas se sintetizan como proformas inactivas o pre-proformas que requieren un procesamiento proteolítico para su activación. Además, los inhibidores endógenos de las proteasas pueden unirse a ellas e inactivarlas (Frederiks y Mook, 2004).

2.3.3. Espectrofotometría y Fluorometría

La actividad de las proteasas puede ser estimada a través de la detección de la liberación de los grupos 4-metoxi-2-naftilamina (MNA), 7-amino-4-metilcumarina (AMC) y 7-amino-4-trifluorometilcumarina (AFC), entre otros; así como de péptidos específicos de un sustrato como los azopéptidos que se liberan a partir de la azocaseína (Smith *et al.* 1975).

2.3.4. Zimografía

La zimografía es una técnica sencilla, sensible, cuantificable y funcional para el análisis de la actividad proteolítica en extractos celulares y tisulares y tiene más de 20 años de haber sido introducida. El método estándar para la zimografía se basa en el análisis electroforético de las proteasas en geles de poliacrilamida-sodio-dodecil-sulfato copolimerizados con un sustrato proteico, particularmente gelatina, caseína o fibrina. La tinción del gel con azul de

Coomassie revela los sitios de proteólisis como bandas blancas sobre un fondo azul oscuro (Heussen y Dowdle, 1980). La zimografía ofrece ventajas sobre otros métodos, dado que no se requieren materiales costosos y pueden detectarse proteasas con diferentes pesos moleculares que tengan actividad hacia el mismo sustrato en un mismo gel. Sin embargo, no se puede obtener información sobre la localización de la actividad proteolítica en las células o tejidos (Frederiks y Mook, 2004).

2.4. Zimografía *in situ* (ISZ)

La ISZ es una técnica relativamente de bajo costo que se fundamenta en la detección de un sustrato en particular y más importante, localiza las actividades de las proteasas en secciones tisulares. La ISZ fue utilizada por primera vez para detectar en anfibios la actividad enzimática liberada por tejidos en desarrollo (Gross y Lapierre, 1962). Recientemente, se ha utilizado para localizar actividades de proteasas, en su mayoría de metalo proteasas en varios tejidos. El principio general se basa en que un sustrato enzimático específico para cierta(s) proteasa(s) se deposita en o bajo una sección congelada de un tejido no fijado con formalina. Durante el periodo de incubación el sustrato se digiere por las enzimas activadas en su localización nativa de una manera dependiente de la dosis y el tiempo. Después del periodo de incubación se puede detectar la lisis del sustrato por microscopía de luz o microscopía de fluorescencia, permitiendo la localización precisa de la actividad proteolítica específica en las secciones de tejido. Se pueden seguir dos tipos de protocolos relativos a la ISZ con base en la naturaleza de los sustratos seleccionados. El primero consiste en utilizar una emulsión fotográfica que contiene un sustrato, como la gelatina. En la ISZ con película fotográfica (FIZ), una sección no fija de tejido congelado se monta en una laminilla histológica de vidrio y se sumerge en una emulsión autoradiográfica que contiene al sustrato. Las laminillas cubiertas se incuban a una temperatura óptima en una cámara húmeda para permitir que ocurra la reacción de la proteasa. Después de la incubación, la actividad proteolítica puede ser detectada mediante microscopía de luz como hoyos blancos sobre un fondo oscuro de sustrato no lisado causado por la lisis enzimática de la emulsión fotográfica que contiene el sustrato. El segundo protocolo involucra el uso de un sustrato marcado con fluorescencia, en el que una

sección tisular congelada se monta en una laminilla de vidrio previamente cubierta con un sustrato marcada con un fluorógeno. Después de la incubación en una cámara húmeda y oscura, la actividad enzimática puede observarse mediante microscopía de fluorescencia como hoyos negros sobre un sustrato fluorescente, ya que la lisis del sustrato marcado con el fluorógeno resulta en la pérdida de fluorescencia. Ambos tipos de ISZ tienen el mismo objetivo, es decir, la identificación y localización microscópica de la actividad enzimática en secciones de tejidos congelados no fijados. Cada protocolo tiene sus ventajas y desventajas. Por un lado, en la FIZ las laminillas son muy sensibles a las variaciones en humedad durante la incubación, ya que no son tratadas ni cubiertas previo a este proceso (Yan y Blomme, 2003). En la Figura 4 se muestra la representación esquemática de la ISZ.

2.5. Diseño de inhibidores basados en la estructura mediante el uso de proteínas

Los métodos de diseño de fármacos basados en estructuras moleculares identifican las interacciones favorables y desfavorables entre un inhibidor potencial y su receptor blanco, y de ese modo maximizan las interacciones benéficas para incrementar la afinidad de unión y la actividad intrínseca. Un paso lógico en este proceso consiste en obtener una estructura exacta del receptor o del complejo ligando-receptor (Read *et al.*, 1984). La cristalografía de rayos X continúa siendo la mejor fuente de información de alta resolución sobre las estructuras proteicas. Sin embargo, se consume una considerable cantidad de tiempo entre lo que se determina la secuencia de una proteína y se resuelve su estructura. Las dificultades en la expresión de proteínas, y más comúnmente, en su cristalización pueden retrasar la determinación de la estructura a través de rayos X. No obstante, cuando un blanco proteico es homólogo a otra proteína o grupo de proteínas de estructura conocida, se puede proponer una estructura modelada sensible (Zuiderweg *et al.*, 1988). La comparación entre las estructuras modeladas y de cristal permite obtener la exactitud esperada a partir de estructuras construidas mediante el modelado molecular. Asimismo, el modelado molecular permite pronosticar posibles sitios activos, regiones de unión de ligandos, residuos estructuralmente importantes, y residuos predictivos de funciones nuevas (Weber, 1990). La construcción y validación de los modelos tridimensionales de las estructuras de cisteino proteasas, así como el proceso de minimizar la energía puede llevarse a cabo con

estrategias computacionales a fin de maximizar los resultados en el menor tiempo posible (Avram *et al.*, 2003).

2.6. Cisteino proteasas parasitarias

Las enfermedades parasitarias están distribuidas predominantemente en áreas como África, Asia, Centro y Sudamérica (Choi y Lerner, 2001). A pesar de los esfuerzos realizados para controlar la diseminación de enfermedades parasitarias que representan un riesgo de salud pública, tales como la malaria, amibiasis, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, entre otras, la incidencia de estas enfermedades se encuentra en aumento (Oaks *et al.*, 1991; Colley, 2000; Pepin y Meda, 2001; Brooks y Hoberg, 2001). La mayoría de estas enfermedades se tratan con fármacos que fueron desarrollados hace décadas y por consiguiente la eficacia ha disminuido debido al aumento de resistencia de los parásitos. Por otro lado, algunos de ellos producen efectos secundarios indeseables después de tratamientos prolongados (Urbina, 2002). Además no existen vacunas disponibles para la prevención de infecciones parasitarias en humanos y animales domésticos (Dalton y Mulcahy, 2001). Así pues, es factible postular que el control de estas enfermedades se dificulta debido a la falta de blancos farmacológicos en los parásitos. En contraste al simple papel digestivo de otras enzimas, las cisteino proteasas parasitarias han sido relacionadas con papeles indispensables en la biología de muchas especies de parásitos, por ejemplo, en la replicación o crecimiento, diferenciación celular e invasión del hospedador (McKerrow, 1989; North *et al.*, 1990; Souza *et al.*, 1992; Mottram *et al.*, 1997; Tort *et al.*, 1999; Rosenthal, 1999). Se ha demostrado que muchas de estas proteasas son factores de virulencia, ya que degradan proteolíticamente componentes del sistema inmune del hospedador, incluyendo inmunoglobulinas y componentes del sistema del complemento. También son capaces de degradar proteínas de la matriz extracelular y fomentar el procesamiento de varios zimógenos tales como las procolagenasas y las proenzimas del sistema de coagulación (Keene *et al.*, 1986; McKerrow *et al.*, 1993; DeCarlo *et al.*, 1997; Que y Reed, 2000). Se han logrado resultados alentadores en experimentos que utilizan inhibidores de las cisteino proteasas y que han validado la factibilidad de considerarlas

como blancos para la quimioterapia antiparasitaria (McKerrow, 1989; McKerrow *et al.*, 1993; Brindley *et al.*, 1997; Caffrey *et al.*, 2000).

2.7. Inhibidores de las cisteino proteasas como agentes antiparasitarios

Varios estudios han confirmado la eficacia de los inhibidores de las cisteino proteasas en la inactivación de las funciones y eliminación de parásitos tanto en cultivos de tejidos (Meirelles *et al.*, 1992; Harth *et al.*, 1993; Ashall *et al.*, 1990; Bonaldo *et al.*, 1991) como *in vivo*. Por ejemplo, se demostró que los dipéptidos derivados de las fluorometil cetonas pueden curar una infección murina de malaria (Rosenthal *et al.*, 1993). Sin embargo, las dosis requeridas para el tratamiento provocaban efectos tóxicos, aunque reversibles. El desarrollo subsecuente de otros inhibidores de las cisteino proteasas eliminó el problema asociado con la toxicidad. Se ha demostrado también la eficacia de los dipéptidos derivados de las vinil sulfonas en modelos murinos de malaria (Olson *et al.*, 1999), así como en la disminución de la replicación de *Leishmania major* en un modelo animal de leishmaniasis cutánea (Selzer *et al.*, 1999). Adicionalmente se han llevado a cabo estudios *in vivo* en modelos murinos de la enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*. En experimentos independientes se ha confirmado la capacidad de los dipéptidos derivados de las vinil sulfonas para evitar que los ratones sucumban ante una infección letal (Engel *et al.*, 1998). Además, el desarrollo de inhibidores de las cisteino proteasas biodisponibles oralmente ha propiciado la realización de estudios que confirman la eliminación de los parásitos (Olson *et al.*, 1999). Estos estudios *in vivo* proporcionan una prueba importante de que los inhibidores de las cisteino proteasas pueden controlar selectivamente las infecciones parasitarias sin evidencia de efectos tóxicos al hospedador. La baja o nula toxicidad que se ha observado en los estudios *in vivo* se debe probablemente al hecho de que algunos blancos parasitarios se encuentran en una ubicación más vulnerable, en comparación con la localización intralisosomal o tisular de las proteasas del mamífero, o bien, a que las concentraciones de las proteasas del hospedador dentro de los lisosomas u otros compartimentos celulares pueden exceder por mucho la concentración de los blancos parasitarios comparables (McKerrow, 1999; McKerrow *et al.*, 1999). Los Cuadros 5 y 6

enfatan los papeles fisiológicos de las catepsinas B y L parasitarias, dado que esto ha impulsado la investigación para el diseño de fármacos a partir de inhibidores de proteasas.

2.8. Proteasas de *Fasciola hepatica*

Se han obtenido varias proteasas a partir de extractos de *F. hepatica*, sus regurgitaciones o fluidos de cultivo y se han clonado los genes que codifican para algunas de ellas. Los estudios han revelado una variedad de enzimas únicas que pueden ser detectadas en distintas etapas del ciclo biológico del parásito. Por ejemplo, el análisis electroforético ha revelado 11 proteasas en especímenes inmaduros y maduros, aunque algunas de éstas parecen ser producidas solamente por estadios inmaduros (Dalton y Heffernan, 1989). Se han sugerido varias funciones para las proteasas, entre ellas, evasión de la respuesta inmune, formación de coágulos de fibrina, penetración en tejidos del hospedador, excavación del tejido hepático y ulceración del ducto biliar (Behm y Sangster, 1999). *F. hepatica* se alimenta principalmente de sangre, utilizando la ventosa oral para adherirse y alimentarse. La contracción coordinada de los músculos meridionales, ecuatoriales y radiales en las ventosas de los trematodos genera una fuerza poderosa de succión que arranca un trozo de tejido del hospedador hacia la ventosa, lo cual lleva efectivamente el alimento a la faringe. La succión continua ejercida tanto por ésta como por la ventosa, en combinación con la acción pulsatoria de la musculatura en la parte anterior del trematodo es suficiente para abrir los vasos sanguíneos superficiales y crear un flujo sanguíneo que llega a la luz intestinal del parásito mediante la actividad peristáltica de la faringe y/o esófago (Howell, 1970). La sangre se hemolisa rápidamente en las condiciones ácidas del lumen intestinal en los trematodos hematófagos, su presencia en el intestino y la distensión resultante del lumen inducen un flujo inmediato de secreciones digestivas desde la gastrodermis. La digestión en los trematodos es predominantemente intraluminal y extracelular. Cualquier desecho residual, incluyendo el pigmento de hematina aparece en el lumen intestinal y no en las células intestinales, por lo que su eliminación es básicamente una cuestión de regurgitación. La gastrodermis de los trematodos es generalmente secretoria y absorbente, con ambos procesos operando concurrentemente, aunque una u otra función puede predominar en cualquier momento. La Figura 5 muestra que en *F. hepatica*

las células intestinales sufren transformaciones cíclicas, involucrando una fase secretoria en la que existe un aparato de Golgi activo y cuerpos secretorios del tipo zimógeno, seguidos por una fase de absorción intensa cuando las lamelas superficiales son numerosas.

Las sustancias excretadas y secretadas por *F. hepatica* se conocen como productos de excreción-secreción. La remoción de productos de desecho, tales como productos finales del metabolismo se considera excreción, mientras que la descarga de sustancias que juegan un papel en la interacción con el hospedador o el alimento se llama secreción. Muchos de los productos de excreción-secreción son inmunogénicos y pueden ser usados para el diagnóstico de fasciolosis en animales y humanos, permitiendo reacciones sensibles incluso en los estadios tempranos de la enfermedad (Tielens, 1999). En los productos de excreción-secreción de *F. hepatica* existe una abundancia de enzimas proteolíticas, lo cual fue demostrado por primera vez al probar los efectos del material secretado en la digestión de un sustrato de gelatina (Spithill *et al.*, 1999). Los primeros experimentos demostraron que la actividad proteolítica en el material de excreción-secreción era del tipo de cisteino proteasas. Como se mencionó anteriormente, las cisteino proteasas comprenden numerosas clases, entre las que se encuentran las catepsinas L y B, las cuales han sido particularmente estudiadas en *F. hepatica*. La catepsina L 1 (CL1) tiene un peso molecular aparente de 27 kDa (Smith *et al.*, 1993) y la catepsina L 2 (CL2) de 29.5 kDa (Dowd *et al.*, 1995).

Se ha propuesto que las catepsinas L de *F. hepatica* desempeñan un número de papeles funcionales incluyendo penetración tisular mediante la excavación de un tracto migratorio, dado que se ha demostrado que las catepsinas L degradan eficientemente las proteínas de la matriz intersticial, tales como fibronectina, laminina y colágeno (Berasain *et al.*, 1997). Estas enzimas también facilitan la adquisición de nutrientes (Dalton y Heffernan, 1989; Smith *et al.*, 1993; Yamasaki *et al.*, 1992). También se les ha implicado en la evasión inmune por la degradación de las regiones Fc de los anticuerpos (Dalton y Heffernan, 1989; Smith *et al.*, 1993), IgG bovina (Chapman y Mitchell, 1982), IgG2a murina (Smith *et al.*, 1993), y evitan que los eosinófilos se adhieran *in vitro* a las fasciolas juveniles recién desenquistadas (Carmona *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1994). Las catepsinas L también se involucran en la supresión y/o modulación de la respuesta inmune. Prowse *et al.* (2002) demostraron que la catepsina L obtenida a partir de los productos de

excreción-secreción de *F. hepatica* suprime la proliferación de linfocitos T ovinos y reduce la expresión de marcadores de superficie CD4 en los linfocitos T ovinos y humanos. Esta catepsina también suprime la respuesta Th1 e induce la no protectora del tipo Th2 por parte del hospedador (Dalton *et al.*, 2003). Por otro lado, estas enzimas participan en la generación de coágulos de fibrina que podrían evitar el acceso de las células inmunes efectoras a la superficie del trematodo (Dowd *et al.*, 1995). La revisión de bibliotecas genómicas confirmó que estas proteasas eran del tipo de la catepsina L y pronosticaron una proteína de aproximadamente 326 aminoácidos. Se probó que el adulto de *F. hepatica* contiene genes múltiples que codifican para la catepsina L. En contraste, los estadios juveniles recién desenquistados de *F. hepatica* secretan una cisteino proteasa con una secuencia homóloga a la Catepsina B, la cual puede estar involucrada en la invasión tisular, regeneración del glicocálix o desenquistamiento de las metacercarias (Spithill *et al.*, 1999). Se han usado como vacunas contra el parásito las catepsinas L que se derivan del material de excreción-secreción de *F. hepatica*. Esto se demostró por primera vez en ovinos por Wijffels *et al.* (1994). Los resultados indicaron que no existió reducción en la carga parasitaria de los animales vacunados, sin embargo, los conteos de huevos en heces se redujeron significativamente (69.7%) hasta 2.7 huevos por gramo por trematodo en los ovinos vacunados, en contraste con 9.2 huevos por gramo por trematodo en los testigos no vacunados. El mecanismo mediante el cual ocurrió esta disminución en fecundidad no fue aparente, ya que no hubo correlación entre los conteos fecales y el título de anticuerpos contra la catepsina L. La eficacia de la catepsina L como vacuna contra fasciolosis se ha examinado más recientemente (Dalton *et al.*, 1996). Se produjo un efecto anti-fecundidad en bovinos, lo cual permitió concluir que la reducción en la producción de huevos es una consecuencia secundaria del metabolismo debido a un efecto primario en la alimentación por la inhibición de la actividad de la catepsina L; y que la oviposición en *F. hepatica* requiere la actividad de una segunda catepsina L tisular, la cual es neutralizada por la vacuna, interfiriendo con la fecundidad. Dalton *et al.* (1996) observaron una reducción en el tamaño de los trematodos recuperados de los bovinos vacunados, sugiriendo que los efectos en la respuesta inmune en bovinos y ovinos pueden ser diferentes. Es importante señalar que la catepsina L puede desempeñar un papel importante en el procesamiento de los

precursores de la proteína principal de la cubierta del huevo de *F. hepatica* (vitelina B), lo cual concuerda con el efecto de la vacuna sobre los huevos del trematodo, a través de la inhibición de la actividad de la catepsina L. Además, la catepsina L ha sido inmunolocalizada en la glándula de Mehlis de parásitos adultos. La glándula de Mehlis es un conjunto de células que secretan sustancias que catalizan la formación de la cubierta del huevo. Se ha especulado que la catepsina L de la glándula de Mehlis es el blanco de la respuesta inmune en los animales vacunados, lo cual interfiere con la síntesis del huevo (Spithill *et al.*, 1999). Law *et al.* (2003) informaron que se desconocen las funciones de la catepsina B proteasa de *F. hepatica*. Sin embargo, se ha observado que se libera por el estadio temprano y migratorio del parásito hasta las 5 semanas postinfección, por lo que se sugiere que esta enzima está involucrada en el desenquistamiento y/o migración del parásito juvenil en el hospedador. Asimismo, la catepsina B de *F. hepatica* es esencial para su virulencia, ya que su producción disminuye en estadios juveniles irradiados atenuados, por lo que se sugiere que la atenuación puede estar asociada con la pérdida de la actividad de la catepsina B. Se considera que la catepsina B es un blanco terapéutico potencial contra la fasciolosis, debido a que la neutralización de su actividad puede reducir la habilidad del parásito juvenil para establecer la infección y por lo tanto, eliminar la enfermedad antes de que se presente el daño hepático derivado de la migración del trematodo. Otras cisteino proteasas son la Fas1 (26 kDa) y Fas2 (25 kDa), las cuales se utilizan como antígenos de inmunodetección y ofrecen una alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la fasciolosis humana (Cordova *et al.*, 1999).

HIPÓTESIS

La administración de un inhibidor de cisteino proteasas *in vivo* reduce la magnitud del daño hepático provocado por los estadios migratorios de *F. hepatica*.

OBJETIVOS

1. Evaluar la actividad inhibitoria del N-[N-(L-3-trans-carboxioxirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina (E-64) sobre las cisteino proteasas de *F. hepatica* durante el periodo migratorio del parásito en el hígado del hospedador mamífero.
2. Establecer la relación dosis-respuesta de la inhibición de la proteólisis provocada por el E-64, utilizando la técnica de zimografía *in situ* con película fotográfica a diferentes dosis en un modelo murino de fasciolosis.
3. Determinar el efecto de la administración de un inhibidor de cisteino proteasas sobre la fecundidad y viabilidad de los huevos de *F. hepatica* en un modelo murino y en el hospedador ovino.
4. Determinar el efecto de la administración de un inhibidor de cisteino proteasas sobre el tamaño del trematodo y carga parasitaria en el hospedador ovino.
5. Evaluar la magnitud del daño hepático provocado por *F. hepatica* en ovinos tratados con un inhibidor de cisteino proteasas mediante la medición de las enzimas aspartato aminotransferasa, L-lactato deshidrogenasa y gamma-glutamilttransferasa.

JUSTIFICACIÓN

Debido al problema del costo o toxicidad relacionada con los fármacos fasciolicidas, así como al riesgo de surgimiento de cepas de *F. hepatica* resistentes a la quimioterapia antiparasitaria, se requieren nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad. El diseño de fármacos debe dirigirse idealmente al estudio de blancos potenciales, entre los que se incluyen las proteasas parasitarias. Estas enzimas están involucradas en la fisiología y patogenicidad de *F. hepatica*, ya que se sugiere que desempeñan un papel clave en la migración a través del hígado del hospedador, nutrición, fertilidad del trematodo y evasión de la respuesta inmune del mamífero. La demostración *in vivo* de que las catepsinas están implicadas en la fisiología y patogénesis del trematodo permite sugerir que estas enzimas son blancos potenciales para la quimioterapia anti-*F. hepatica*. Los inhibidores de las cisteino proteasas pueden considerarse posibles candidatos a fármacos fasciolicidas al reducir o inactivar la actividad proteolítica ejercida por las catepsinas del trematodo.

DISCUSIÓN

La infección por *F. hepatica* se caracteriza por el daño que provoca en el tejido del hígado durante la fase migratoria parenquimal del parásito. Se ha considerado que las proteasas contribuyen al daño tisular mencionado. Howell (1966) describió una colagenasa que podría causar licuefacción tisular. Dawes (1963a) se propuso explicar por qué la cavidad causada por estadios migratorios, especialmente aquéllos en las últimas etapas de migración, eran mucho más grandes que el parásito en sí. Sugirió que la lisis tisular se debía a la acción de enzimas leucocitarias del hospedador, aunque postuló la posibilidad de que existieran proteasas en las regurgitaciones del trematodo, las cuales podrían contribuir con la lisis tisular (Dawes, 1963b). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados en la investigación durante los últimos 30 años, no se había presentado evidencia convincente sobre el papel de las proteasas de *F. hepatica* en la fisiología y patogenicidad del parásito. Se han detectado varias proteasas a partir de extractos somáticos del parásito, así como de sus productos de excreción-secreción obtenidos mediante el cultivo *in vitro*. Estos estudios sugirieron que las proteasas, principalmente del tipo de las catepsinas L y B, podrían estar involucradas en la penetración de tejidos del hospedador, evasión de la respuesta inmune y daño hepático (Behm y Sangster, 1999). Las catepsinas L derivadas del material de excreción-secreción de *F. hepatica* obtenido *in vitro* han sido probadas como vacunas contra el parásito. Los estudios demostraron que la proteína induce un efecto anti-fecundidad tanto en ovinos como en bovinos y en estos últimos también ejerce una eficacia antihelmíntica significativa. Exceptuando los ensayos vacunales referidos, la mayoría de las observaciones e hipótesis sobre las funciones de las catepsinas L y B de *F. hepatica* se han derivado de experimentos *in vitro* y no se contaba con evidencia suficiente que permitiera indicar que las enzimas desarrollan las funciones sugeridas *in vivo*.

Las técnicas moleculares disponibles para identificar y caracterizar proteasas en células y tejidos, tales como el análisis Northern blot y la Reacción en Cadena de la Polimerasa, se usan para cuantificar el RNAm de la proteasa. Sin embargo, la actividad del RNAm no necesariamente refleja la cantidad y actividad de la proteína producto de un gene en particular, debido a los mecanismos de regulación de proteínas. Otras técnicas son la

inmunohistoquímica y Western blot, utilizadas para evaluar la expresión a nivel proteína. No obstante, estas técnicas no proporcionan información sobre la actividad de las proteasas en los tejidos debido a que muchas enzimas se sintetizan en una forma inactiva o de proenzima. Adicionalmente, existen inhibidores endógenos de proteasas en los tejidos y pueden interferir con los resultados. La técnica de zimografía en gel ha sido usada para evaluar la actividad de gelatinasa en varios tejidos normales y neoplásicos. Sin embargo, los procesos de extracción de tejidos pueden activar otras enzimas o resultan en la interacción de las enzimas activas con sus inhibidores endógenos presentes en células y tejidos (Hrabec *et al.*, 2002; Pucci-Minafra *et al.*, 2001). Además, si la actividad específica de una proteasa está presente en una parte pequeña del tejido enfermo, no puede ser detectada debido a su dilución en el proceso de extracción (Yan y Blomme, 2003).

Por otro lado, la zimografía *in situ* (ISZ) ofrece la capacidad de estimar actividades de proteasas en combinación con su localización en secciones tisulares. Una variación de la técnica de ISZ consiste en utilizar gelatina en la superficie de una película fotográfica sin revelar, lo que se conoce como ISZ con película fotográfica (FIZ por sus siglas en inglés: Film *in situ* zymography). Este ensayo fue utilizado en el presente estudio y resultó económico, rápido y sencillo. Es importante señalar que además se puede aplicar a una gran variedad de enzimas proteolíticas bajo diversas condiciones de pH (5.0-8.5) y sales (hasta 5 M NaCl). Además, no se requirió de equipo sofisticado de laboratorio. Esta técnica se ha utilizado principalmente para la detección de la actividad gelatinolítica de metaloproteasas en neoplasias, por lo que, hasta donde se tiene conocimiento, el presente estudio es el primer informe sobre el uso de esta técnica en parasitología veterinaria. Esta técnica tiene también aplicación potencial en el diseño de fármacos para evaluar su eficacia y determinar la dosificación apropiada (Yan y Blomme, 2003). En conclusión, la ISZ es una herramienta útil que al ser utilizada en combinación con técnicas moleculares de patología y biología, proporciona datos que pueden apoyar el entendimiento del papel de ciertas proteasas en varios procesos patológicos y fisiológicos. Con seguridad en un futuro esta técnica será optimizada a fin de permitir que su uso se expanda en estudios parasitológicos.

Una vez que se cuenta con la técnica adecuada para detectar la posible actividad proteolítica ejercida por un parásito, se debe considerar la interferencia de las cisteino proteasas del hospedador, particularmente las catepsinas B y L. Una de las funciones de la catepsina B en los mamíferos consiste en actuar como una proteasa preapoptótica en la citotoxicidad hepática inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y los ácidos biliares tóxicos (Canbay *et al.*, 2003). Tomando en cuenta lo anterior y con el objetivo de detectar si la catepsina B del mamífero se activa durante el daño hepático provocado por *F. hepatica*, se determinó comparar el patrón de degradación gelatinolítica en ratones genéticamente deficientes en catepsina B (Cat B^{-/-}) con el de animales normales. Los resultados obtenidos en el primer experimento del presente estudio permitieron sugerir que durante la fase parenquimal de la fasciolosis se presenta una actividad proteolítica producida por el parásito. En las secciones del hígado de ratones infectados que no fueron tratados con el inhibidor irreversible de cisteino proteasas E-64 se reveló un significativo grado de proteolisis. Las áreas principales en donde se observó la actividad de las catepsinas coincidió con la localización de *F. hepatica* en el hígado, lo cual proporciona evidencia de que las catepsinas en efecto son importantes para el proceso de invasión tisular (Berasain *et al.*, 1997). Por otro lado, la gelatinolisis fue inactivada en un 85% *in vivo* por el E-64. Dado que la proteolisis se presentó tanto en los ratones Cat B^{-/-} como en los normales, es razonable sugerir que la actividad proteolítica observada en el hígado de ratones infectados se debió principalmente a la excreción-secreción de catepsinas parasitarias que facilitan la migración de *F. hepatica* en su fase parenquimal y no a las proteasas lisosomales del mamífero (Alcala-Canto *et al.*, 2005). Dado que no existen estudios sobre la medición de la actividad de catepsinas B endógenas en un modelo animal de fasciolosis, se sugiere el desarrollo de experimentos que cuantifiquen los niveles de catepsina B activa en el hígado de mamíferos infectados con *F. hepatica*.

Una vez que se obtuvo evidencia *in vivo* del papel desempeñado por las cisteino proteasas en la migración de *F. hepatica* a través del hígado, se estableció la relación dosis-respuesta de la inhibición de la proteolisis mediante la técnica FIZ, al utilizar el E-64 a distintas dosis en un modelo murino de fasciolosis. La inhibición máxima de la proteolisis

se logró utilizando 50 mg/kg/día. Sin embargo, el análisis de regresión sugirió una dosis de 40 mg/kg como la dosis más baja con la eficacia más alta (87% de inhibición proteolítica). En la evaluación *in vivo*, las dosis más altas no incrementaron los parámetros establecidos por la dosis de 50 mg/kg/día (Alcala-Canto *et al.*, 2006). Este resultado concuerda con los estudios de Hashida *et al.* (1982) quienes demostraron que la inyección intraperitoneal de E-64 a las ratas inhibía la catepsina B hasta cierto grado solamente, y al aplicar dosis más altas no se observó mayor inhibición. Los autores sugirieron que el E-64 se incorpora al citosol en su forma libre y después es transportado a los lisosomas, en donde se une a las cisteino proteasas. Al igual que en el experimento anterior, la FIZ reveló una inhibición parcial de la degradación de gelatina. La persistencia de proteolisis residual en presencia del inhibidor podría indicar la participación de otras enzimas del trematodo que no sean sensibles al E-64, tales como enzimas que degradan tripsina, quimotripsina, colágeno, hemoglobina e inmunoglobulinas, las cuales ya han sido detectadas en los productos metabólicos del parásito (Fairweather *et al.*, 1999), o bien, que las interacciones químicas son solamente capaces de producir un efecto tipo agonístico parcial.

Los ratones tratados con 50 mg/kg/día E-64 sobrevivieron a la infección letal un promedio de casi once días más que los testigos no tratados. Estos resultados pueden ser indicativos de que la actividad de las cisteino proteasas está involucrada en la patogénesis de la fasciolosis. El hecho de que el E-64 inhiba la proteolisis causada por *F. hepatica* en el hígado de ratones fue un hallazgo alentador, ya que la mortalidad debida a fasciolosis en los ovinos es una consecuencia directa de la patología hepática causada por los parásitos migrantes (Dalton *et al.* 1996).

Este estudio informa por primera vez que la administración intraperitoneal del E-64 inhibe la actividad proteolítica del parásito en una manera dosis-dependiente, afectando además la oviposición y viabilidad de los huevos del trematodo en el modelo murino. Sin embargo, es importante recordar que existe una variación considerable entre las especies animales susceptibles a *F. hepatica*. Aunque los trematodos parecen realizar una migración similar en el ratón y el ovino, el tamaño tan pequeño del hígado del ratón acelera y exagera la patología. Además los parásitos no causan hemorragias dentro de los ductos

biliares. La fisiología de alimentación de *F. hepatica* en los ductos biliares del ratón es diferente a la del ovino (Behm y Sangster, 1999). Por consiguiente, el ratón no puede ser considerado como un hospedador modelo ideal en el caso de la fasciolosis. La experiencia con el modelo murino sugirió la aplicación en ovinos de uno de Ep-475, uno de los inhibidores de catepsinas B y L más potentes utilizado en estudios *in vivo* (Hashida *et al.* 1980), para buscar evidencia sobre el papel de las proteasas de *F. hepatica* en el hospedador natural.

El daño hepático en la fasciolosis ovina se refleja en un aumento de las actividades séricas de las enzimas aspartato aminotransferasa, L-lactato deshidrogenasa y gamma-glutamilttransferasa, entre otras. En el experimento 3, los ovinos infectados, tratados o no con Ep-475, manifestaron una elevación significativa ($P < 0.05$) de la LDH a partir de la semana 4 postinfección en comparación con los niveles detectados en los testigos no infectados. Durante este tiempo se considera que los estadios juveniles se encuentran creciendo y migrando a través del hígado hacia los ductos biliares. Sin embargo, las concentraciones medias de LDH en los animales tratados con Ep-475 fueron significativamente más bajas que en los no tratados, a pesar de que se encontraron fuera de los valores fisiológicos. Los niveles medios de AST aumentaron en el grupo infectado y no tratado a partir de la semana 4 postinfección, en contraste con el grupo tratado, ya que en éste la actividad enzimática se elevó de la semana 7 a 9 postinfección y retornó a los rangos preinfección en la semana 10. Esta diferencia intergrupala puede ser parcialmente explicada por la extensión de las lesiones parenquimatosas. Como se demostró anteriormente, las catepsinas de *F. hepatica* están involucradas en la patogenicidad del parásito, lo cual puede correlacionarse con los niveles máximos de LDH y AST. Entonces, puede considerarse seguro sugerir que la interacción del Ep-475 con las catepsinas del trematodo ejerció cierto efecto protector en el parénquima hepático. Esta protección pudo haberse presentado por la inhibición de las proteasas parasitarias, lo cual interfirió con su nutrición, desarrollo y migración. Por otro lado, los niveles medios de GGT indicativos de hiperplasia en el ducto biliar (Dalton *et al.* 1996) fueron significativamente ($P < 0.05$) más bajos en el grupo tratado con relación al no tratado. De acuerdo con estos resultados, es razonable sugerir que

la inhibición de la actividad de las catepsinas parasitarias produjo menor daño ductular y en consecuencia niveles más bajos de GGT en el grupo tratado, o bien, en el caso de esta última enzima, puede especularse que la GGT mantuvo concentraciones más bajas en los ovinos tratados debido a que los trematodos adultos en el ducto biliar no son tan dañinos para el epitelio biliar como los estadios juveniles, lo cual concuerda con datos demostrados por Ferre *et al.* (1996, 1997). Estos resultados difieren con los que han sido observados en estudios de fármacos anti-*F. hepatica*, dado que con estos últimos generalmente se obtienen concentraciones séricas de enzimas hepáticas significativamente similares a los niveles preinfección después del tratamiento (Rew *et al.*, 1978; Suhardono *et al.*, 1991; Martínez-Moreno *et al.*, 1997).

En este experimento no se observó eficacia antihelmíntica del Ep-475, ya que no se redujo la carga parasitaria de los animales tratados, resultado que coincide con los experimentos vacunales de *Schistosoma bovis* (Bushara *et al.*, 1993; De Bont *et al.*, 2003) en los que no se redujo la carga parasitaria después de inmunizar a los animales con enzimas del trematodo. No obstante, un hallazgo alentador del presente estudio consistió en la reducción significativa en el tamaño de los trematodos de ovinos tratados. Este resultado es similar al informado por Dalton *et al.* (1996) en un ensayo vacunal que empleó catepsina L. Por consiguiente, puede considerarse seguro proponer que la incapacidad de *F. hepatica* para alimentarse indujo un subdesarrollo en el parásito.

Tanto en el experimento 2 como en el 3 se observó que el inhibidor de cisteino proteasas tiene un efecto reductor sobre la oviposición y viabilidad de los huevos de *F. hepatica*. Este resultado relativo a la disminución en la fecundidad y capacidad de embrionar concuerda con los datos de Dalton *et al.* (2003) y Wijffels *et al.* (1994), quienes realizaron ensayos vacunales con catepsinas L. El mecanismo exacto mediante el cual el inactivante químico afecta la fecundidad y capacidad para embrionar no se conoce, pero se puede especular que el inhibidor afecta la producción de los huevos y la viabilidad como resultado de la falta de adquisición de nutrientes por parte del parásito. El efecto sobre la fecundidad y viabilidad de los huevos puede deberse también al subdesarrollo de

estructuras reproductivas que contienen catepsina L e intervienen en la formación del huevo (Dalton *et al.*, 1996).

A pesar de que el inhibidor de cisteino proteasas utilizado carece de eficacia antihelmíntica y no evita el daño hepático completamente, se puede considerar que ofrece un cierto grado de protección al afectar el tamaño de los parásitos, su fecundidad y capacidad para embrionar, sin efectos secundarios discernibles para el hospedador. Considerando que la transmisión de la fasciolosis se favorece por la contaminación de las pasturas con huevos viables, los efectos anti-fertilidad de un inhibidor de proteasas determinado podrían ayudar a prevenir la transmisión de la enfermedad y por consiguiente reducir la prevalencia de fasciolosis en las áreas endémicas. Adicionalmente, aún cuando los animales llegaran a infectarse, la administración oportuna de un inhibidor de catepsinas podría disminuir la severidad de las lesiones hepáticas causadas por los estadios juveniles en el parénquima hepático, y consecuentemente reducir la morbilidad y mortalidad.

CONCLUSIÓN

Se demostró por primera vez *in vivo* que las catepsinas de *F. hepatica* están involucradas en la patogenicidad y fisiología parasitaria y que su actividad proteolítica se reduce significativamente mediante la administración de inhibidores específicos de las cisteino proteasas, sin provocar efectos secundarios discernibles en el hospedador. Consecuentemente, estas enzimas son blancos potenciales para la quimioterapia antiparasitaria. Se sugiere que se lleven a cabo estudios futuros de inhibidores de las cisteino proteasas como agentes antiparasitarios potenciales con el objeto de diseñar farmacológicamente derivados más potentes y eficaces.

REFERENCIAS

1. Quiroz RH, Ibarra VF (coordinadores académicos). Temas selectos de Parasitología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Parasitología, 2000.
2. O'Neill SM, Parkinson M, Strauss W, Angles R, Dalton JP. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fascioliasis) in a human population in the Bolivian altiplano using purified cathepsin L cysteine protease. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 417–423.
3. Mas-Coma S, Bargues MD, Esteban JG. Human fasciolosis. In: Dalton, J.P., (Ed.), *Fasciolosis*, CAB International, Wallingford: UK, 1999, pp. 411–434.
4. Rokni MB, Massoud J, O'Neill SM, Parkinson M, Dalton JP. Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of northern Iran: application of cathepsin L-ELISA. *Diagn. Microbiol. Infect Dis* 2002; 44: 175–179.
5. Fairweather I, Boray JC. Mechanisms of fasciolicide action and drug resistance in *Fasciola hepatica*. In: Dalton JP, editor. *Fasciolosis*. Oxford: CAB International, 1999: 225-268.
6. Anon., 18 March 1995. Resistance to fluke drug found on Sligo farm. *Irish Farmer's J.* 2.
7. Mitchell GBB, Maris L, Bonniwell MA. Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet Rec* 1998; 143: 399.
8. Moll L, Gassenbeek CPH, Vellema P, Borgsteede FHM. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. *Vet Parasitol* 2000; 91: 153–158.
9. Gaasenbeek CPH, Moll L, Cornelissen JBWJ, Vellema P, Borgsteede FHM. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet Parasitol* 2001; 95: 37–43.
10. Powers JC, Asgian JL, Ekici OD, James KE. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* 2002; 102: 4639-4750.

11. Lecaille F, Brömme D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: Their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* 2002; 102: 4459-4488.
12. Rawlings ND, Barret AJ. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol* 1994; 244: 461-486.
13. Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczek W, Wieczerzak E, Ciarkowski J, Drabik P, Janowski R, Kozak M, Jaskolski M, Grubb A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Bioch Pol* 2001; 48:1-20.
14. Turk D and Guncar G. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003; 59:203-13.
15. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Millar DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, Elliston KO, Ayala JM, Casano FJ, Chin J, Ding G, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Palyha OC, Raju SM, Rolando AM, Salley JP, Yamin TT, Lee TD, Shively JE, Maccross M, Mumford RA, Schmidt JA, Tocci MJ. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992; 768-774.
16. Riese RJ and Chapman HA. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 107-113.
17. Bernstein HG, Kirschke H, Wiederanders B, Pollak KH, Zipress A, Rinne A. The possible place of cathepsins and cystatins in the puzzle of Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol* 1996; 27: 225-247.
18. Patel T, Gores G, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 1996; 10: 587-597.
19. Frade R, Rodriguez-Lima F, Huang S, Xie K, Guillame N, Bar-Eli M. Procathepsin-L, a protease that cleaves human C3 (the third component of complement), confers high tumorigenic and metastatic properties to human melanoma cells. *Cancer Res* 1998; 58: 2733-2736.
20. Di Paolo BR, Pignolo RJ, Cristofalo VJ. Over-expression of the two-chain form of cathepsin B in senescent WI-38 cells. *Exp Cell Res* 1992; 201: 500-505.

21. Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, Foged NT, Delmas PD, Delaisse JM. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* 1998; 273: 32347-32352.
22. Lah TT, Kos J. Cysteine proeinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem* 1998; 379: 125-130.
23. Koblinsky JE, Ahram M, Sloane BF. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 2000; 291: 113-135.
24. Chapman HA, Riese JP, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 63-88.
25. Nakagawa TY, Brissette WH, Lira PD, Griffiths RJ, Petrushova N, Stock J, McNeish JD, Eastman SE, Howard ED, Clarke SR, Rosloniec EF, Elliott EA, Rudensky AY. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 1999; 10:207-217.
26. Roth V, Deussing J, Botchkarev VZ, Pauly Evers M, Saftig P, Hafner A, Schmidt P, Schmahl W, Scherer J, Anton-Lamprecht I, von Figura K, Peters C. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* 2000; 14: 2075-2086.
27. Luster AD. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 4: 1287-1292.
28. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 1-8.
29. Jaeschke H. Inflammation in response to hepatocellular apoptosis. *Hepatology* 2002; 35: 964-966.
30. Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi J, Feldstein A, Bronk SF, Rydzewski R, Tanai M, Gores G. Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *J Clin Invest* 2003; 112: 152-159.
31. Barret AJ and Kirscke H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* 1981; 80: 535-561.
32. Kuntz ID, Meng EC, Shoichet BK. Structure-based molecular design. *Acc Chem Res* 1994; 27: 117-123.

33. Hanada K; Tamai M, Yamagishi M, Ohmura S; Sawada J; Tanaka I. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric Biol Chem* 1978; 42: 523-528.
34. Hashida S, Kominami E, Katunuma N. Inhibitions of cathepsin B and cathepsin L by E-64 *in vivo*. II. Incorporation of [3H]E-64 into rat liver lysosomes *in vivo*. *J Biochem (Tokyo)*. 1982; 91:1373-80.
35. Schirmeister T. Inhibition of cysteine proteases by peptides containing aziridine-2,3-dicarboxylic acid building blocks. *Biopolymers* 1999; 51: 87-97.
36. Katunuma N, Kominami E. Structure, properties, mechanisms, and assays of cysteine protease inhibitors: cystatins and E-64 derivatives. *Methods Enzymol* 1995; 382-397.
37. Matsumoto K, Mizoue K, Kitamura K, Tse W, Huber C, Ishida T. Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. *Biopolymers (Peptide Science)* 1999; 51: 99-107.
38. Schaschke N, Assfalg-Machleidt I, Machleidt W, Turk D, Moroder L. E-64 analogues as inhibitors of cathepsin B. On the role of the absolute configuration of the epoxysuccinyl group. *Bioorg Med Chem* 1997; 5: 1789-1797.
39. Baruch A, Jeffery DA, Bogoy M. Enzyme activity-it's all about image. *TRENDS Cell Biol* 2004; 14: 29-35.
40. Liotta L, Petricoin E. Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet* 2000; 1:48-56.
41. Frederiks W, Mook O. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on *in situ* zymography of gelatinases: Reviews and protocols. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 711-722.
42. Smith RE, Van Frank RM. The use of aminoacid derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamine for the assay and subcellular localization of tissue proteinases. In: Dingle JT, Dean RJ, editors. *Lysosomes in Biology and Pathology*. Amsterdam: North-Holland, 1975, 193.
43. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrilamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 1980; 102: 196-202.

44. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *proc Natl Sci USA* 1962; 48: 1014-1022.
45. Yan SJ, Blomme EAG. In situ zymography: A molecular pathology technique to localize endogenous protease activity in tissue sections. *Vet Pathol* 2003; 40: 227-236.
46. Read RJ, Brayer GD, Jurasek L, James MN. Critical evaluation of comparative model building of *Streptomyces griseus* trypsin. *Biochemistry* 1984; 23: 6570-6575.
47. Zuiderweg ER, Henkin J, Mollison KW, Carter GW, Greer J. Comparison of model and nuclear magnetic resonance structures for the human inflammatory protein C5a. *Proteins* 1988;3:139-45.
48. Weber IT. Evaluation of homology modeling of HIV protease. *Proteins* 1990; 7: 172-184.
49. Avram S, Svab I, Bologna C, Flonta ML. Correlation between the predicted and the observed biological activity of the symmetric and nonsymmetric cyclic urea derivatives used as HIV-1 protease inhibitors. A 3D-QSAR-CoMFA method for new antiviral drug design. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 287-296.
50. Choi C.M, Lerner E A. Leishmaniasis is an emerging infection. *J Invest Dermatol Sym Pro* 2001; 6: 175-182.
51. Oaks SC, Mitchell VS, Pearson, GW, Carpenter CCJ. eds. *Malaria: obstacles and opportunities*. Washington: National Academy Press, 1991.
52. Colley DG. Parasitic diseases: opportunities and challenges in the 21st century *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 79-87.
53. Pepin J, Meda HA. The epidemiology and control of human African trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 2001; 49: 71-132.
54. Brooks DR, Hoberg EP. Parasite systematics in the 21st century: opportunities and obstacles. *Trends Parasitol.* 2001; 17: 273-275.
55. Urbina JA. Chemotherapy of Chagas' disease. *Curr Pharm Des* 2002; 8: 287-295.
56. Dalton JP, Mulcahy G. Parasite vaccines--a reality?. *Vet Parasitol* 2001; 98: 149-167.
57. McKerrow JH. Parasite proteases. *Exp Parasitol.* 1989; 68: 111-115

58. Souza AE, Waugh S, Coombs GH, Mottram JC. Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. FEBS Lett 1992; 311: 124-127.
59. Mottram JC, Frame MJ, Brooks DR, Tetley L, Hutchison JE, Souza AE, Coombs GHJ. The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. Biol Chem 1997; 272: 14285-14293.
60. Tort J, Brindley PJ, Knox D, Wolfe KH, Dalton JP. Proteinases and associated genes of parasitic helminths. Adv Parasitol 1999; 43: 161-266.
61. Rosenthal PJ. Proteases of protozoan parasites. Adv Parasitol. 1999; 43: 105-159.
62. Keene WE, Petitt MG, Allen S, McKerrow JH. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. J Exp Med 1986; 163: 536-549.
63. McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. Annu Rev Microbiol 1993; 47: 821-853.
64. DeCarlo AA Jr, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. J Dent Res 1997; 76: 1260-1270.
65. Que X, Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 196-206.
66. Brindley PJ, Kalinna BH, Dalton JP, Day SR, Wong JY, Smythe ML, McManus DP. Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. Mol Biochem Parasitol 1997; 89: 1-9.
67. Caffrey CR, Scory S, Steverding D. Cysteine proteinases of trypanosome parasites: novel targets for chemotherapy. Curr Drug Targets 2000; 1: 155-162.
68. Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. Mol and Biochem Parasitol 1992; 52: 175-184.

69. Harth G, Andrews N, Mills AA, Engel J, Smith R, McKerrow JH. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. Mol and biochem Parasitol 1993; 58: 17-24.
70. Ashall F, Angliker H, Shaw E. Lysis of trypanosomes by peptidyl fluoromethyl ketones. Biochem Biophys Res Comm 1990; 170: 923-929.
71. Bonaldo MC, D'Escoffier LN, Salles JM, Goldberg S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Exp Parasitol 1991; 73: 44-51.
72. Rosenthal PJ, Lee GK, Smith RE. Inhibition of a *Plasmodium vinckei* cysteine proteinase cures murine malaria. J Clin Invest 1993; 91: 1052-1056.
73. Olson JE, Lee GK, Semenov A, Rosenthal PJ. Antimalarial effects in mice of orally administered peptidyl cysteine protease inhibitors. Bioorg Med Chem 1999; 7: 633-638.
74. Selzer PM, Pingel S, Hsieh I, Chan VJ, Engel JC, Russell DG, Sakanari JA, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 11015-11022.
75. Engel JC, Doyle PS, Hsieh I, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp Med 1998; 188: 725-734.
76. McKerrow JH. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation and mechanism of action. Int J Parasitol 1999; 29: 833-837.
77. McKerrow JH, Engel JC, Caffrey CR. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. Bioorg Med Chem 1999; 7: 639-644.
78. Ward W, Alvarado L, Rawlings ND, Engel JC, Franklin C, McKerrow JH. A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. Cell 1997; 89: 437-444.
79. Dalton JP, Heffernan M. Thiol proteases released *in vitro* by *Fasciola hepatica*. Mol Biochem Parasitol 1989; 35: 161-166.
80. Behm CA, Sangster NC. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: Dalton JP, editor. Fasciolosis. Oxford: CAB International, 1999: 185-217.

81. Howell MJ. Ingestion by two species of digenetic trematodes. *J Parasitol* 1970; 56: 391-392.
82. Robinson G and Threadgold LT. Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. XII. The fine structure of the gastrodermis. *Exp Parasitol* 1975; 37: 20-36.
83. Halton DW. Nutritional adaptations to parasitism within the platyhelminthes. *Int J Parasitol* 1997; 27: 693-704.
84. Tielens AGM. Metabolism. In: Dalton JP, editor. *Fasciolosis*. Oxford: CAB International, 1999: 277-305.
85. Spithill TW, Smooker PM, Sexton JL, Bozas E, Morrison CA, Creaney J, Parsons JC. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: Dalton JP, editor. *Fasciolosis*. Oxford: CAB International, 1999: 377-410).
86. Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A, Dalton JP. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62: 1-8.
87. Dowd AJ, McConigle S, Dalton JP. *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase cleaves fibrinogen and produces a novel type of fibrinogen clot. *Eur J Biochem* 1995; 232: 241-246.
88. Berasain P, Goni F, McGonigle S, Dowd A, Dalton JP, Frangione B, Carmona C. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J Parasitol* 1997; 83: 1-5.
89. Yamasaki H, Kominami E, Aoki, T. Immunocytochemical localization of a cysteine protease in adult Works of the liver fluke *Fasciola* sp. *Par Res* 1992; 78: 574-580.
90. Chapman CB and Mitchell GF. Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 1982; 11: 165-178.
91. Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica in vitro* prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Par* 1993; 62: 9-17.
92. Smith AM, Carmona C, Dowd AJ, McGonigle S, Acosta D, Dalton JP. Neutralization of the activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. *Par Immunol* 1994; 16: 325-328.

93. Prowse RK, Chaplin P, Robinson HC, Spithill TW. *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferatin *in vitro* and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. *Parasite Immunol* 2002; 24: 57-66.
94. Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moire N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG, Donnelly SM. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol.* 2003; 33:1173-1181.
95. Wijffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, Campbell N, Sexton J, Wicker J, Bowen F, Friedel T, Spithill TW. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Exp Parasitol* 1994; 78: 132-148.
96. Dalton JP, McGonicle S, Rolph TP, Andrews SJ. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with haemoglobin. *Infect Immun* 1996; 64: 5066-5074.
97. Law RHP, Smooker PM, Irving JA, Piedrafita D, Ponting R, Kennedy NJ, Whisstock JC, Pike RN, Spithill TW. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infect Immun* 2003; 71: 6921-6932.
98. Cordova M, Reategui L, Espinoza JR. Immunodiagnostic of human fasciolosis with *Fasciola hepatica* cysteine proteinases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 54-57.
99. Howell RM. Collagenase activity of immature *Fasciola hepatica*. *Nature* 1966; 209: 713-714.
100. Dawes B. Hyperplasia of the bile duct in fascioliasis and its relation to the problem of nutrition in the liver-fluke, *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* 1963a; 53: 123-133.
101. Dawes B. Some observations of *Fasciola hepatica* L. during feeding operations in the hepatic parenchyma of the mouse, with notes on the nature of liver damage in this host. *Parasitology* 1963b; 53: 135-143.

102. Hrabec E, Stre M, Nowak D, Greger J, Suwalski M, Hrabec Z. Activity of type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in primary pulmonary carcinomas: a quantitative analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 197-204.
103. Pucci-Minafra I, Minafra S, La Rocca G, Barranca M, Fontana S, Alaimo G, Okada Y. Zymographic analysis of circulating and tissue forms of colon carcinoma gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) separated by mono- and two-dimensional electrophoresis. *Matrix Biol* 2001; 20: 419-427.
104. Alcalá-Canto Y, Ibarra-Velarde F, Sumano-Lopez H, Gracia-Mora J. *Fasciola hepatica* proteolytic activity in liver revealed by in situ zymography. *Parasitol Res* 2005; 96: 305-311.
105. Alcalá-Canto Y, Ibarra-Velarde F, Sumano-Lopez H, Gracia-Mora J, Alberti-Navarro A. Dose-response inhibition of proteolytic activity by a cysteine protease inhibitor in a murine model of fasciolosis. *Parasitol Res* 2006; 98:438-442.
106. Fairweather I, Threadgold LT, Hanna REB. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In: Dalton JP, editor. *Fasciolosis*. Oxford: CAB International, 1999: 47-111
107. Hashida S, Towatari T, Kominami E, Katunuma N. Inhibitions by E-64 derivatives of rat liver cathepsin B and cathepsin L *in vitro* and *in vivo*. *J Biochem* 1980; 88: 1805-1811.
108. Ferre I, López P, Rojo-Vázquez F, González-Gallego J. Experimental ovine fascioliasis: antipyrine clearance as indicator of liver damage. *Vet Parasitol* 1996; 62: 93-100.
109. Ferre I, Ortega LM, Rojo-Vázquez FA. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vet Parasitol* 1997; 68: 261-267.
110. Rew RS, Colglazier, Enzie FD. Effect of diamfenetide on experimental infections of *Fasciola hepatica* in lambs: anthelmintic and clinical investigations. *J Parasitol* 1978; 64: 290-294.
111. Suhardono, Widjajanti S, Stevenson P, Carmichael IH. Control of *Fasciola gigantica* with triclabendazole in Indonesian cattle. *Trop Anim Health Prod* 1991; 23: 217-220.

- 112.** Martinez-Moreno A, Jimenez V, Martinez-Crus MS, Martinez-Moreno FJ, Becerra C, Hernandez S. Triclabendazole treatment in experimental goat fasciolosis: anthelmintic efficacy and influence in antibody response and pathophysiology of the disease. *Vet Parasitol* 1997; 68: 57-67.
- 113.** Bushara HO, Bashir ME, Malik KH, Mukhtar MM, Trottein F, Capron A, Taylor MG. Suppression of *Schistosoma bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione S-transferase or keyhole limpet haemocyanin. *Parasite Immunol* 1993; 15: 383-390.
- 114.** De Bont J, Claerebout E, Riveau G, Schacht AM, Smets K, Conder G, Brake DA, Capron A, Vercruysse J. Failure of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental *Fasciola hepatica* infection. *Vet Parasitol* 2003; 113: 135-144.
- 115.** Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moire N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG, Donnelly SM. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol* 2003; 33: 1173-1181.

Cuadro 1. Eficiencia comparativa de fármacos anti-*Fasciola hepatica* (Fairweather y Boray, 1999)

Fármaco	Vía de administración	Dosis mg/kg		Dosis máxima tolerada en ovinos mg/kg	Índice de seguridad en ovinos	Edad mínima del parásito en semanas, eficiencia ≥ 90%	
		Ovinos	Bovinos			Ovinos	Bovinos
Hexaclorofeno	Oral	15	20	40	2.6	12	12
Bitionol	Oral	75	30	75	1	> 12	> 12
Oxiclozanida	Oral	15	13-16	60	4.0	12	> 14
Niclofolan	Oral	4	3	12	3.0	12	> 12
	Subcutánea	NR	0.8			NR	> 12
Nitroxinil	Subcutánea	10	10	40	4.0	8	10
Brotianida	Oral	5.6	NR	27	4.8	12	NR
Rafoxanide	Oral	7.5	7.5	45	6.0	6	12
	Subcutánea	NR	3			NR	12
Closantel	Oral	7.5-10	NR	40	4.0	6-8	NR
	Subcutánea	NR	3			NR	> 12
Diamfenetida	Oral	80-120	100	400	3.3-5.0	1 día a 6 sem.	1 día a 7 sem.
Albendazol	Oral	4.75	10	30	8	> 12	> 12
Triclabendazol	Oral	10	12	200	20-40	1	1
Clorsulon	Oral	---	7	100	5		8
	Subcutánea	---	2				> 12

NR= No recomendada

Cuadro 2. Espectro de eficiencia de los fármacos a dosis recomendadas contra *Fasciola hepatica* en ovinos (Fairweather y Boray, 1999)

Fármaco	Edad del parásito en semanas													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Bitionol, Hexaclorofeno, Oxiclozanida, Niclofolan, Albendazol, Clorsulon										50-70%		80-99%		
Clorsulon (oral)								90-99%						
Nitroxinil, Closantel							50-90%			91-99%				
Rafoxanide				50-90%			91-99%							
Triclabendazol	90-99%		99-100%											
Diamfenetida	100-91%						80-50%							

Cuadro 3. Clases catalíticas de proteasas (Lecaille y Brömme, 2002)

Clases catalíticas	Número total	Propiedades	Proteasas comunes
Metalo proteasas	159	La mayoría posee un átomo de Zn que es catalíticamente activo.	Metalo proteasas
Serino proteasas	140	La mayoría posee la triada catalítica Asp-His-Ser.	Quimotripsina, tripsina, calicreina.
Cisteino proteasas	121	La catálisis ocurre a través de la formación de un intermediario covalente, el cual involucra un residuo de cisteína e histidina.	Catepsinas lisosomales, calpains citosólicas.
Aspártico proteasas	18	La catálisis ácido-base en general conlleva a la formación de un intermediario neutral tetrahedral no covalente.	Enzimas digestivas como la pepsina y enzimas procesadoras como la renina. Proteasas virales.

Cuadro 4. Comparación de las propiedades de las catepsinas B y L de los mamíferos (Barret y Kirscke, 1981)

	Catepsina B	Catepsina L
Sustrato recomendado	Z-Arg-Arg-AMC*	Z-Phe-Arg-AMC**
Actividad de aminopeptidasa	No	No
Actividad de endopeptidasa	Moderada	Alta
Actividad de exopeptidasa	Sí	No

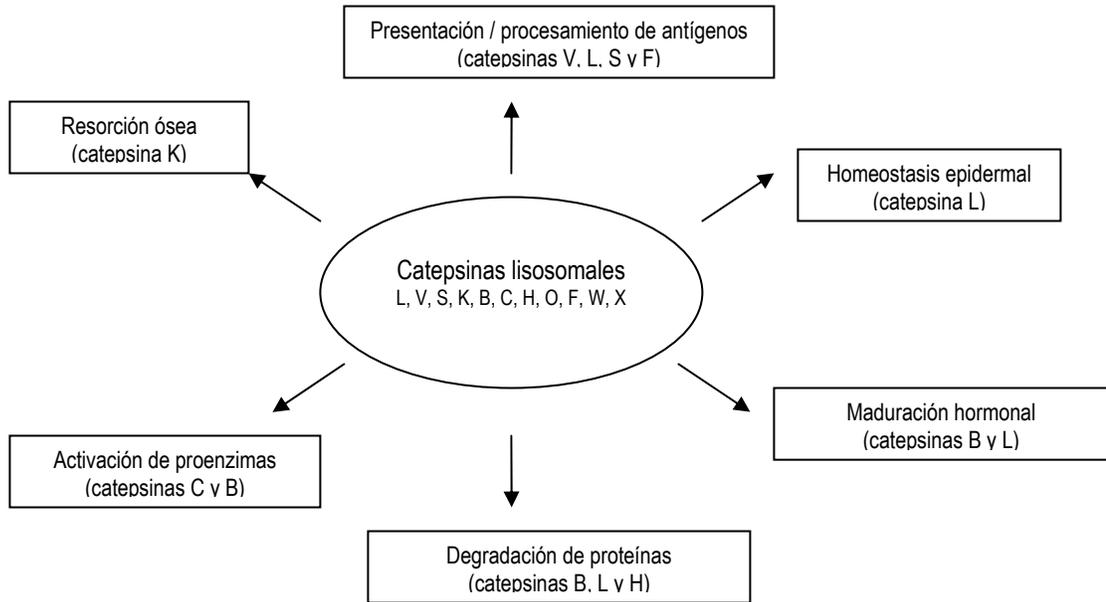
* Abreviaturas: Z, benciloxycarbonil; AMC, 7-amino-4-metilcumarina

Cuadro 5. Catepsinas L y B parasitarias como factores de virulencia en la interacción hospedador-parásito

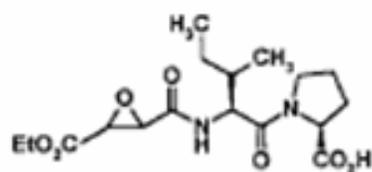
FUNCIÓN	EJEMPLOS	REFERENCIA
Penetración dérmica/Tisular	<i>Trypanosoma</i> <i>Trichomonas</i> <i>Plasmodium</i> <i>Leishmania</i> <i>Toxoplasma</i> <i>Schistosoma</i>	McKerrow, 1989; Oaks <i>et al.</i> , 1991 Souza <i>et al.</i> , 1992; Mottram <i>et al.</i> , 1997; Rosenthal <i>et al.</i> , 1999;
Invasión del organismo del hospedador	<i>Fasciola</i> <i>Dermatophagus</i>	McKerrow, 1989; Dalton y Mulcahy, 2001
Destrucción de proteínas del hospedador	<i>Trichomonas</i> <i>Plasmodium</i> <i>Entamoeba</i> <i>Fasciola</i> <i>Schistosoma</i> <i>Paragonimus</i>	Keene <i>et al.</i> , 1986 McKerrow, 1989; McKerrow <i>et al.</i> , 1993; Brindley <i>et al.</i> , 1997; McKerrow, 1999; Dalton y Mulcahy, 2001; Que y Reed, 2002
Degradación de la matriz extracelular	<i>Haemonchus</i>	Tort <i>et al.</i> , 1999
Evasión de la respuesta inmune	<i>Trypanosoma</i> <i>Giardia</i> <i>Trichomonas</i> <i>Fasciola</i> <i>Schistosoma</i> <i>Necator</i> <i>Toxocara</i> <i>Haemonchus</i> <i>Dermatophagus</i>	McKerrow, 1989; Brindley <i>et al.</i> , 1997; DeCarlo <i>et al.</i> , 1997; Tort <i>et al.</i> , 1999; McKerrow, 1999; Colley, 2000; Pepin y Meda, 2001; Lecaille <i>et al.</i> , 2002

Cuadro 6. Catepsinas L y B parasitarias involucradas en la biología del parásito

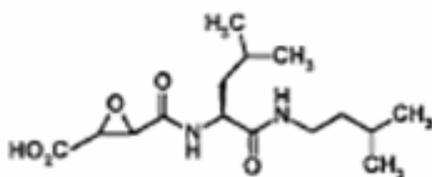
FUNCIÓN	EJEMPLOS	REFERENCIA
Actividad de hemoglobinas	<i>Trichomonas</i> <i>Plasmodium</i> <i>Entamoeba</i> <i>Ascaris</i> <i>Necator</i> <i>Haemonchus</i> <i>Schistosoma</i> <i>Fasciola</i> <i>Paragonimus</i>	Rosenthal <i>et al.</i> , 1993; Brindley <i>et al.</i> , 1997; Olson <i>et al.</i> , 1999; McKerrow, 1999; Dalton y Mulcahy, 2001; Lecaille <i>et al.</i> , 2002
Nutrición	<i>Entamoeba</i> <i>Plasmodium</i> <i>Trichuris</i> <i>Ancylostoma</i> <i>Toxocara</i> <i>Haemonchus</i> <i>Dermatophagus</i>	Keene <i>et al.</i> , 1986; McKerrow, 1989; McKerrow, 1999; McKerrow <i>et al.</i> , 1999; Lecaille <i>et al.</i> , 2002 Que y Reed, 2002
Crecimiento, desarrollo y replicación	<i>Trypanosoma</i> <i>Leishmania</i> <i>Trichomonas</i> <i>Schistosoma</i> <i>Fasciola</i> <i>Paragonimus</i> <i>Onchocerca</i> <i>Ascaris</i> <i>Brugia'</i> <i>Dermatophagus</i>	McKerrow, 1989; Ashall <i>et al.</i> , 1990; Bonaldo <i>et al.</i> , 1991; Meirelles <i>et al.</i> , 1992; Harth <i>et al.</i> , 1993; Selzer <i>et al.</i> , 1999; Caffrey <i>et al.</i> , 2000; Dalton y Mulcahy, 2001
Desenquistamiento	<i>Giardia</i>	Ward <i>et al.</i> , 1997



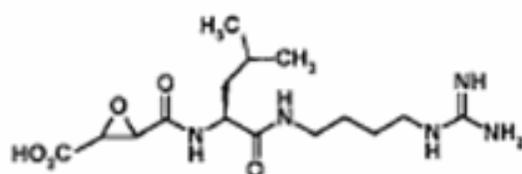
**Figura 1. Papeles fisiológicos de las cisteino proteasas en los mamíferos
(Chapman, *et al.*, 1997; Nakagawa *et al.*, 1999; Roth *et al.*, 2000)**



(A) CA030

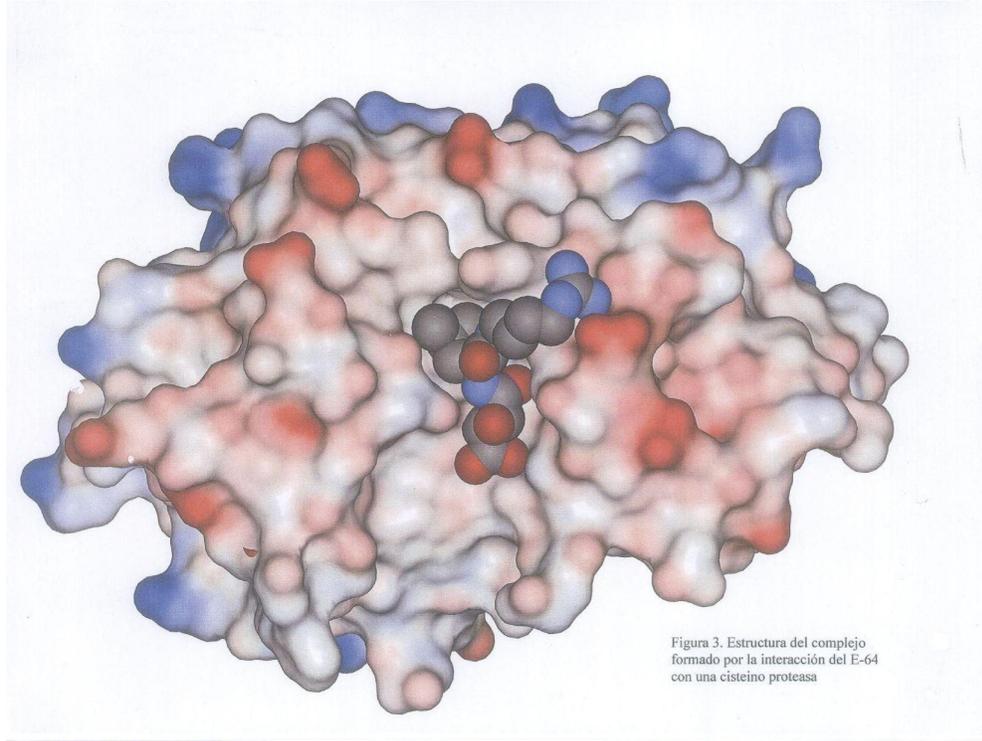


(B) EP-475



(C) E-64

Figura 2. Inhibidores de cisteino proteasas que contienen ácido epoxisuccínico (Schirmeister, 1999).



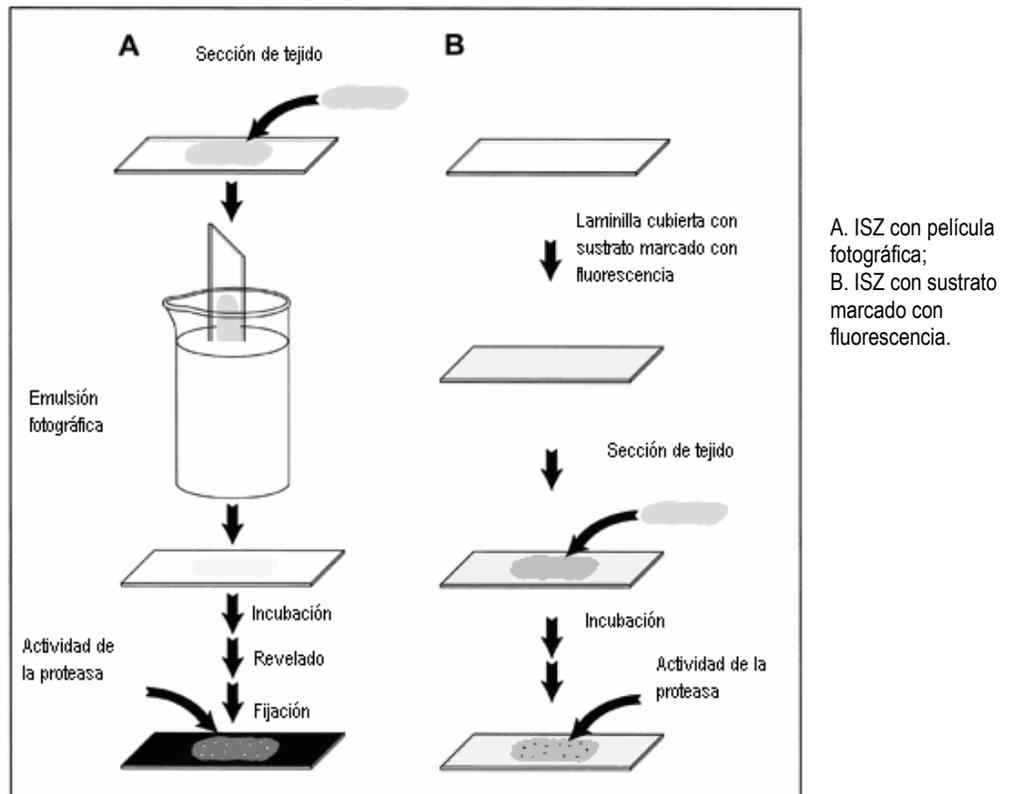


Figura 4. Vista esquemática de la ISZ (Yan y Blomme, 2003).

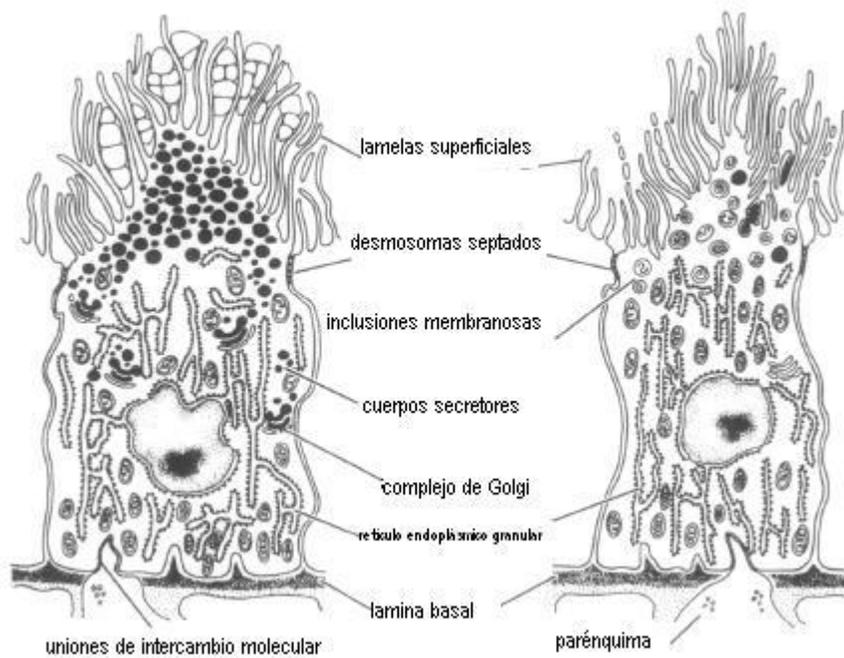


Figura 5. Esquema de la célula intestinal en *Fasciola hepatica* en la fase secretoria (izquierda) y absorbente (derecha) de su ciclo (Robinson y Threadgold, 1975; Halton, 1997).