

## Artículos Originales

### Enzimas y glicoproteínas presentes en extractos de vermes adultos de *Fasciola hepatica*

#### *Enzymes and glycoproteins present in extracts of adult Fasciola hepatica worms*

Diana E. Ballen<sup>1\*</sup>, Mairym Barrios<sup>1</sup>, Greslena Aparicio<sup>1</sup> & Italo M. Cesari<sup>1,2</sup>

#### RESUMEN

*Fasciola hepatica* es un trematodo que causa lesiones en el hígado y vías biliares afectando a herbívoros y al hombre, constituyendo un problema de salud pública en zonas agrícolas a nivel mundial. El parásito posee glicoproteínas y enzimas que facilitan su penetración y migración en los tejidos hospederos. El objetivo fue evaluar estos componentes en extractos [fracción soluble (FS) y fracción particulada (FP)] de vermes adultos de *F. hepatica*. Las fracciones fueron analizadas para proteínas, carbohidratos, actividades enzimáticas, y por electroforesis (SDS-PAGE-15%) en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R). En FS, la concentración de carbohidratos fue 5,63  $\mu\text{mol/mL}$ ; se detectó la presencia de fosfohidrolasas, glicosidasas y peptidasas, sobresaliendo la actividad Fosfatasa Acida (1,19  $\mu\text{mol/h/mg}$ , pH 5,0). En FP, la concentración de carbohidratos fue más elevada (7,89  $\mu\text{mol/mL}$ ); se observaron valores elevados de Fosfatasa Alcalina (5,79  $\mu\text{mol/h/mg}$ ), Fosfatasa Acida (1,67  $\mu\text{mol/h/mg}$ ) y moderados de Fosfodiesterasa (0,280  $\mu\text{mol/h/mg}$  pH 9,6). Se detectó actividad Acetilcolinesterasa mayor en FS que en FP (3,95 A/h vs. 1,68 A/h). En SDS-PAGE ambos extractos mostraron polipéptidos de ~80 a 10-kDa; el pre-tratamiento de las muestras con sodio-metaperiodato redujo el número de bandas en cada extracto, sugiriendo la presencia de glicocomponentes. En conclusión, se hallaron enzimas y glicocomponentes en los extractos de *F. hepatica* estudiados, lo cual constituye un aporte en la búsqueda de posibles blancos inmunológicos y farmacológicos para el control de esta parasitosis.

**Palabras clave:** *Fasciola hepatica*, actividades enzimáticas, glicoproteínas, trematodos.

#### SUMMARY

*Fasciola hepatica* is a trematode that causes damage to the liver and biliary tract in both herbivores and man, and is thus an important public health concern in agricultural areas worldwide. This parasite contains glycoproteins and enzymes that facilitate its penetration of, and migration through, host tissues. The aim of this study was to evaluate the relative proportions of these components in the soluble fraction (SF) and *n*-butanol-solubilized extracts of the particulate fraction (PF) of whole homogenates of adult *F. hepatica* worms. Extracts were analyzed for protein and carbohydrate content, and hydrolytic activity. In addition, 15% SDS-PAGE electrophoresis was performed under non-reducing (NR) and reducing (R) conditions to identify other components. The SF contained 5.63  $\mu\text{mol carbohydrate/mL}$ , as well as phosphohydrolases, glycosidases and peptidases, with a high acid phosphatase activity (1.19  $\mu\text{mol/h/mg}$ , pH 5.0) that seemed to be characteristic of this fraction. The PF contained 7.89  $\mu\text{mol carbohydrate/mL}$ , with high alkaline phosphatase (5.79  $\mu\text{mol/h/mg}$ ) and acid phosphatase (1.67  $\mu\text{mol/h/mg}$ ), and moderate phosphodiesterase (0.280  $\mu\text{mol/h/mg}$  pH 9.6) values. Acetylcholinesterase activity was higher in the SF than the PF (3.95 A/h vs. 1.68 A/h). SDS-PAGE analysis showed the presence of polypeptides in both the SF and the PF of ~80 to 10-kDa. Pretreatment with sodium-metaperiodate reduced the number of bands in each extract suggesting the presence of glycocomponents. The notable presence of enzymes and glycocomponents in the SF and PF extracts of adult *F. hepatica* worms is a first step towards the eventual identification of new immunological and pharmacological targets for the control of this disease.

**Key words:** *Fasciola hepatica*, enzymatic activity, glycoproteins, trematodes.

<sup>1</sup> Unidad de Trematodiasis. Centro de Microbiología y Biología Celular. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe, Apartado 21827, Miranda, Venezuela.

<sup>2</sup> Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Câncer, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis, Universidad de Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

\* Autor de correspondencia: eleanni@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

La fascioliasis es una enfermedad parasitaria, causada por el helminto trematodo *Fasciola hepatica* de amplia distribución mundial, que afecta a herbívoros tales como rumiantes, cerdos, equinos, roedores y otros, así como también al hombre (Mas-Coma *et al.*, 2009). A nivel mundial, alrededor de 17 millones de personas se encuentran infectadas y 180 millones están en riesgo de infección, constituyendo un problema de salud pública (WHO, 2010). Los vermes de *F. hepatica* migran a través de varios tejidos hospederos hasta alcanzar los conductos biliares causando daño hospedero en su desplazamiento. De manera similar a lo hallado en la mayoría de los trematodos, *Fasciola* sp. posee enzimas, necesarias para su migración, crecimiento, diferenciación, nutrición que le ayudan a adaptarse a su hospedador, y cumplir su ciclo de vida a fin de garantizar su persistencia (Norbury *et al.*, 2011).

Se han identificado y caracterizado enzimas en los productos de excreción-secreción de *F. hepatica*, algunas consideradas como antígenos en el inmunodiagnóstico de la fascioliasis, otras como candidatas para el desarrollo de vacunas o como proteínas que protegen al parásito de la respuesta inmunitaria del hospedador, entre las cuales destacan: las catepsinas L y D, la tierrodoxina (TRX), la enolasa, la glutatión S-transferasa (GST), la leucina aminopeptidasa (LAP), así como la proteína de unión a ácidos grasos (FABP), la proteína tipo saposina y la superóxido-dismutasa Cu/Zn (SOD-Cu/Zn) (Acosta *et al.*, 2008; Boukli *et al.*, 2011; Dalton *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2011; Figueroa-Santiago *et al.*, 2011; Farhnaka *et al.*, 2013; Gonzales-Santana *et al.*, 2013; Morphew *et al.*, 2007), y otras con potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Robinson *et al.*, 2013).

En los helmintos, el tegumento es una estructura sincicial citoplasmática anucleada que recubre toda la superficie del parásito (Dalton *et al.*, 2004). Es la interfase que ayuda al parásito a mantener su homeostasis, allí ocurre la absorción e intercambio de nutrientes importante para su supervivencia. En el tegumento residen componentes responsables de los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria y que protegen al parásito contra agentes oxidantes (i.e., enzimas antioxidantes) (Dalton *et al.*, 2004). Dada su importancia en la nutrición y en la evasión

de la respuesta inmunológica, algunas proteínas presentes en el tegumento de los trematodos han sido consideradas blancos ideales para el desarrollo de drogas antihelmínticas y de vacunas (Loukas *et al.*, 2007; Meaney *et al.*, 2003; Mulvenna *et al.*, 2010).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de glicoproteínas y enzimas en la fracción soluble (FS) y la fracción particulada (FP) obtenidas de los vermes adultos de *F. hepatica*, con el propósito de facilitar su eventual identificación molecular y evaluación como potenciales blancos de acción contra este parásito. Se realizaron determinaciones enzimáticas a diferentes pH, según protocolos descrito previamente por Cesari *et al.* (2000), usando curvas de calibración ( $A_{405}$  nm vs. nmol) para interpolar la absorbancia de los grupos *p*-nitrofenol o *p*-nitroanilina liberados por la hidrólisis de los respectivos sustratos sintéticos, y se realizaron también análisis del respectivo perfil proteico mediante SDS-PAGE.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Preparación de las fracciones soluble y particulada de vermes adultos de F. hepatica*

Vermes adultos de *F. hepatica* fueron resuspendidos en 2 mL de agua milli-Q, agregando inhibidores de enzimas proteolíticas [PMSF (1 mM), Na<sub>2</sub>-EDTA (1-2 mM), Leupeptina (5-10 µg/mL), Aprotinina (1 µg/mL), Pestatina A (1-15 µg/mL)]. Los parásitos fueron homogeneizados y la suspensión resultante fue ultracentrifugada a 100.000 g por 2 h a 4°C (Ultracentrífuga Beckman Modelo L8-55). El sobrenadante representó la Fracción Soluble (FS); el sedimento se resuspendió en agua milli-Q, se re-homogenizó y se ultracentrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. El sobrenadante de esta última centrifugación se descartó y el sedimento membranoso o fracción particulada (FP) se resuspendió en 1 mL de agua milli-Q y la suspensión se sometió a un proceso de extracción butanólica.

### *Extracción de la fracción particulada con n-butanol*

A 1 mL de FP se le añadió 1 mL de *n*-butanol saturado con agua (v/v), se agitó vigorosamente por 10 min y la emulsión se centrifugó a 20.000 g/20 min a 4°C. Se descartó la fase orgánica y se recuperó la fase acuosa, mientras que el material sólido restante en la interfase fue re-extraído con *n*-butanol. A ambas

fracciones se les determinó proteínas por el método de Bradford (1976) y carbohidratos por el método fenol-ácido sulfúrico descrito por Masuko *et al.* (2005).

#### Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas ensayadas fueron: (1) Fosfatasa ácida (FAc, pH 5,0) y Fosfatasa alcalina (FAL, pH 9,6), utilizando *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) como sustrato. (2) Fosfodiesterasa alcalina (FDE, pH 9,6) con el sustrato 5'-timidina-monosfosfo-*p*-nitro-éster (5'-TMP). (3) Los sustratos L-leucin y L- $\alpha$ -alanil *p*-nitroanilida fueron usados para medir las actividades leucina (LAP; pH 8,0) y alanina aminopeptidasa (AAP; pH 8,0) respectivamente. (4) La N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa ( $\beta$ -NAG; pH 5,5) se determinó con *p*-nitrofenil  $\beta$ -N-acetilglucosaminida y la  $\alpha$ -Manosidasa ( $\alpha$ -MAN; pH 5,6) con *p*-nitrofenil  $\alpha$ -manósido (Cesari *et al.*, 2000). Las reacciones realizadas a pH ácido y alcalino se detuvieron con 1 N NaOH, excepto las reacciones aminopeptidasas donde se utilizó ácido acético a 2 M. La absorbancia (A) a 405 nm se leyó en un lector de placas SpectraMax 250 (Molecular Devices). Los valores de  $A_{405}$  nm se interpolaron en curvas de calibración de  $A_{405}$  nm vs. nmol de *p*-nitrophenol [*p*-NP] o *p*-nitroanilida [*p*-NA]. La actividad enzimática fue expresada en términos de micromoles de sustrato hidrolizado por hora [ $\mu$ mol/h], definiéndose a la actividad específica como la actividad referida a la concentración de proteínas ( $\mu$ mol/h/mg). El ensayo para acetilcolinesterasa (AChE, pH 7,6) se realizó a 37°C empleando como sustrato yoduro de acetilcolina (Ellman *et al.*, 1961). La lectura se hizo a 405 nm y la actividad específica fue expresada como A/h referida a la concentración de proteínas [A/h/mg].

#### Electroforesis unidimensional en Geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los componentes proteicos (10  $\mu$ g) de FS y FP se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE al 15% en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R, con  $\beta$ -mercaptoetanol) según Laemmli (1970). El gel fue teñido con Azul de Coomassie. Se evaluó la presencia de componentes glicosilados en FS y FP, utilizando un kit para detección de glicoproteínas (Immuno-Blot Kit for Glycoprotein Detection. Bio-Rad N° 170-6490).

#### Análisis Estadísticos

Todos los datos fueron procesados y analizados estadísticamente por Excel (Microsoft® Office®). Todas las actividades enzimáticas fueron reportadas como promedio  $\pm$  3 DEM de  $\mu$ mol/h/mg y A/h/mg para la actividad enzimática AChE de 3 experimentos independientes (n = 3).

## RESULTADOS

#### Determinación de carbohidratos en las preparaciones FS y FP de adultos de Fasciola

Se observó mayor presencia de compuestos glicosilados en FP (7,89  $\pm$  0,55  $\mu$ mol/mL) que en FS (5,63  $\pm$  0,77  $\mu$ mol/mL).

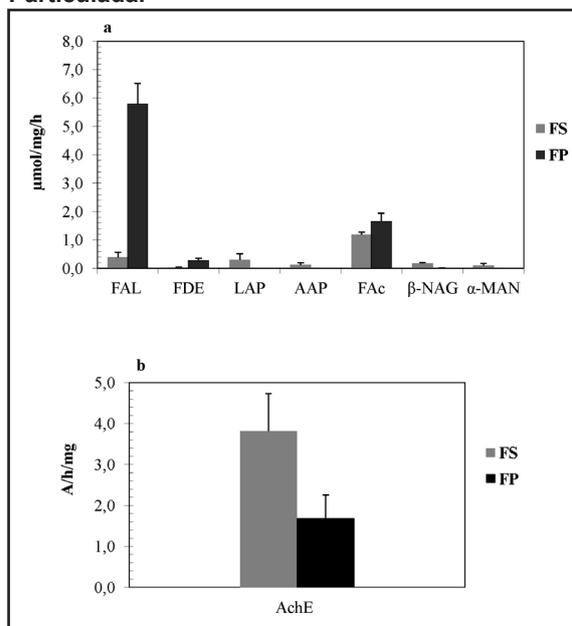
#### Actividad enzimática en FS y FP

Los resultados indican que en la FP, las actividades enzimáticas FAL (pH 9,6; 5,79  $\pm$  0,718  $\mu$ mol/mg/h), FAc [pH 5,0; 1,67  $\pm$  0,27  $\mu$ mol/mg/h] y FDE [pH 9,6; 0,28  $\pm$  0,08  $\mu$ mol/h/mg] fueron más elevadas que en la FS [FAL, pH 9,6; 0,383  $\pm$  0,18  $\mu$ mol/mg/h; FAc, pH 5,0; 1,190  $\pm$  0,089  $\mu$ mol/mg/h; FDE, pH 9,6; 0,028  $\pm$  0,02  $\mu$ mol/mg/h] (Fig. 1a). Las actividades monoaminopeptidasas LAP [pH: 8,0; 0,299  $\pm$  0,22  $\mu$ mol/mg/h] y AAP [pH: 8,0; 0,123  $\pm$  0,07  $\mu$ mol/mg/h] se hicieron presentes solo en FS, mientras que las glicosidasas  $\beta$ -NAG [0,006  $\pm$  0,010  $\mu$ mol/mg/h] y  $\alpha$ -MAN [0,002  $\pm$  0,0  $\mu$ mol/mg/h] fueron muy bajas en FP que en la FS [ $\beta$ -NAG, pH: 5,6; 0,173  $\pm$  0,04  $\mu$ mol/mg;  $\alpha$ -MAN, pH: 5,6; 0,108  $\pm$  0,06  $\mu$ mol/h/mg] (Fig. 1a). Con respecto a la AChE (determinada a pH 7,6) fue mayor en FS [3,95 A/h/mg] que en FP [1,68 A/h/mg] (Fig. 1b).

#### 1D SDS-PAGE (15%)

Perfil de proteínas: Se observaron bandas en FS [NR y R] con masa molecular comprendida entre 62 y 10 kDa (Fig. 2, carril 1 y 2). Las bandas NR detectadas en FS fueron de 62, 60, 48, 45, 38, 36, 32, 25, 24, 21, 15, 14, 13, 12, 11 y 10 kDa (carril 1); luego de reducción, la mayoría de las bandas continuaron viéndose como tal en el gel pero con intensidad variable, excepto las de 62, 48 y 32 kDa que desaparecieron, apareciendo una banda de 40 kDa (carril 2).

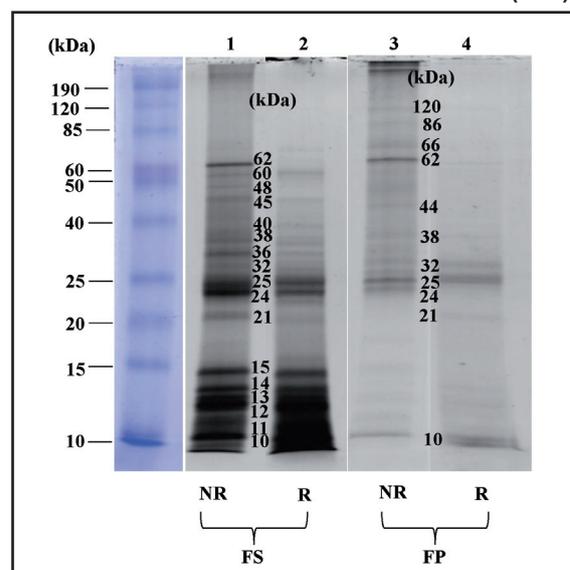
**Fig. 1. Actividades enzimáticas en FS (100.000 g) y FP solubilizada mediante extracción butanólica, detectadas a diferentes pHs sobre sustratos sintéticos. (a) FAL (Fosfatasa Alcalina; pH 9,6), FDE (Fosfodiesterasa; pH 9,6), LAP (Leucina Aminopeptidasa; pH 8,0), Alanina Aminopeptidasa (AAP; pH 8,0), FAc (Fosfatasa Acida; pH 5,0),  $\beta$ -NAG (N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidasa; pH 5,5),  $\alpha$ -MAN ( $\alpha$ -manosidasa; pH 5,5). (b) Actividad acetilcolinesterasa (AChE; pH 7,6). Resultados de 3 experimentos independientes (n = 3, promedio  $\pm$  3 DEM). FS: Fracción Soluble; FP: Fracción Particulada.**



En geles 1D de FP en condiciones NR (Fig. 2, carril 3), se observó un patrón más simple de aproximadamente 10 bandas en el intervalo de 120 a 10 (~ 120 kDa, 86, 66, 62, 44, 38, 32, 25, 24, 10). Luego de reducción (Fig. 2, carril 4), continuaron observándose las bandas de 62, 38, 32, 25 y 10kDa pero con intensidad variable, desapareciendo las bandas de alto p.m., las de 44 y 24 kDa, y apareciendo una banda de 21 kDa.

**Perfil de glicoproteínas:** Después de tratamiento de la FS con el kit para detección de glicoproteínas (Immuno-Blot Kit for Glycoprotein Detection), bajo condiciones NR (Fig. 3a, carril, 2), se observaron bandas de aprox. 64, 60, 42, 25, 23, 14 y 12 kDa; luego de reducción, se continuaron viendo las mismas bandas pero con intensidad variable; aparecieron bandas de 50, 39 y 28 kDa (carril, 4) y

**Fig. 2. SDS-PAGE (15%) en condiciones NR (no reductoras) y R (reductoras) de FS y FP del parásito adulto *F. hepatica*. (10 µg de cada fracción) luego de tinción con Coomassie. FS (NR, carril 1), FS (R, carril 2), FP (NR, carril 3), FP (R, carril 4). Marcadores de Peso Molecular Pre-teñidos (kDa).**

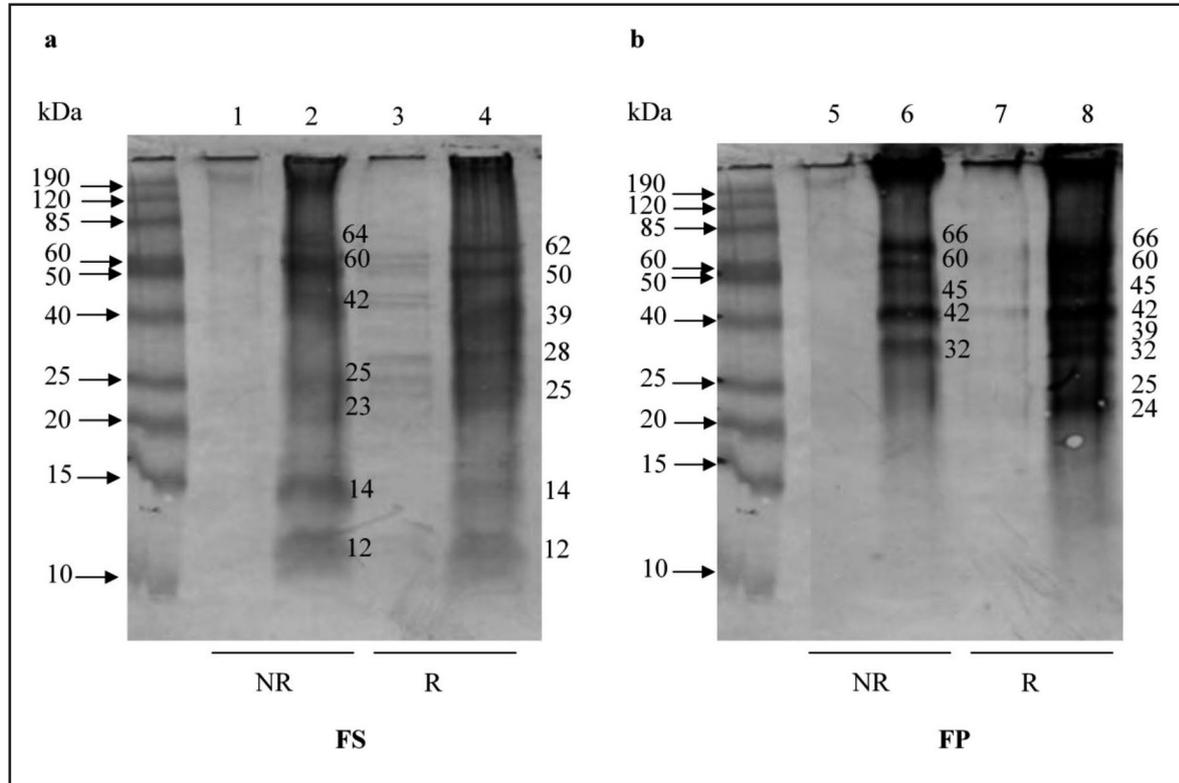


desaparecieron las de 64, 42 y 23 kDa (Fig. 3a, carril, 4). Los carriles 1 y 3 corresponden a la FS no tratada con el kit (Fig. 3a). En FP, tanto en condiciones NR como en R (Fig. 3b, carril 6 y 8), se detectaron bandas de 66, 60, 45, 42 y 32 kDa, excepto que en FP (R) aparecieron bandas de 39, 25 y 24 kDa (carril 8). Los carriles 6 y 7 corresponden a la FP no tratada con el kit (Fig. 3b).

## DISCUSIÓN

La expresión y secreción de enzimas en los parásitos es de importancia fundamental en los procesos de invasión, nutrición, desarrollo, adaptación, virulencia, evasión y modulación inmune del hospedador por parte del parásito, todo lo cual ha sido descrito en *Fasciola* sp. (McVeigh *et al.*, 2012; Norbury *et al.*, 2011). En el presente estudio, reportamos la presencia diferencial de enzimas y glicocomponentes en las fracciones subcelulares soluble (FS) y particulada (FP) de vermes adultos de *F. hepatica*. Las actividades enzimáticas que se mostraron más relevantes en términos cuantitativos fueron las fosfomonoesterasas, estando la FAL (pH 9,6) y la FAc (pH 5,0) bastante elevadas en FP. El haber encontrado actividades con pH óptimo diferentes

**Fig. 3.** Detección mediante blotting de componentes glicosilados (glicoproteínas) en FS y FP del parásito adulto *F. hepatica* tratadas con kit para detección de carbohidratos. Los componentes fueron separados por SDS-PAGE (15%) en condiciones NR y R. (a) FS (NR, carril 2), FS (R, carril 4); (b) FP (NR, carril 6), FP (R, carril 8). Controles (muestras no tratadas para detección de carbohidratos): (a) FS (NR, carril 1; R, carril 3); (b) FP (NR, carril 5; R, carril 7). Marcadores de Peso Molecular Pre-teñido (kDa).



en la misma fracción se podría explicar porque el sedimento a 100 000 x g contiene tanto fragmentos de membrana plasmática del tegumento de estos trematodos (sede usual de las enzimas que trabajan *in vitro* a pH alcalino) como fragmentos intracelulares de membrana que delimitan compartimentos ácidos y organelas enteras como los lisosomas (sede usual de enzimas catabólicas que funcionan a pH ácido). Las proteínas unidas a membrana se extrajeron utilizando el solvente orgánico *n*-butanol, que desnatura y despolimeriza la mayor parte de proteínas de membrana sin afectar completamente aquellas que poseen cierto grado de glicosilación (glicoproteínas), muchas de las cuales logran preservar su estructura, función catalítica y antigenicidad después de este proceso, como ha sido demostrado en *S. mansoni* (Cesari *et al.*, 2005; 2002).

Hasta ahora no hemos encontrado descripción de actividad FAL asociada con preparaciones membranosas de *Fasciola* sp. Por otra

parte, la actividad FAc hallada en FS concuerda con resultados reportados por Probert & Lwin, (1974) quienes detectaron alta actividad FAc [pH 4,5 - 5,0] y baja actividad FAL [pH 9,0] en extractos solubles y fracciones subcelulares (mitocondrial y lisosomal) de *F. hepatica*. Los estudios realizados con *S. mansoni* han reportado que la FAL está asociada con fracciones membranosas de la cercaría, esquistosómulo, vermes adultos, particularmente en la superficie, donde parece jugar un papel importante en la invasión y adaptación del parásito al hospedador (Araujo-Montoya *et al.*, 2011; Cesari *et al.*, 1981; Fernández & Cortéz, 2002), y es considerada candidata a ser ensayada como vacuna contra la esquistosomiasis mansoni (Sulbaran *et al.*, 2013). Se observó actividad Fosfodiesterasa alcalina (FDE) más elevada en FP que en FS. Esta enzima, hasta ahora con función desconocida en este parásito, fue detectada en extractos solubles de *F. hepatica* (Mansour & Mansour, 1979). La FDE hidroliza enlaces fosfodiésteres y es estimulada por cloruro de magnesio y calcio, formando parte del

sistema de enzimas (junto con FAL y difosfohidrolasa) de recuperación de bases nucleotídicas (Braschi & Wilson, 2006; Cesari *et al.*, 1992).

No se observaron actividades monoaminopeptidasas en FP; pero en FS, se detectaron actividades de  $\alpha$ -AAP (la cual libera preferiblemente alanina), y LAP (que libera leucina). Acosta *et al.* (1998) describieron actividad LAP en un extracto soluble de *F. hepatica* y su actividad se observó asociada principalmente con las células del tracto digestivo, lo cual concuerda con la actividad LAP hallada en FS. Por otra parte, la LAP forma parte de los productos de excreción-secreción de *F. hepatica* y es considerada un marcador de diagnóstico por ser un antígeno inmunodominante en esta fracción (Marcilla *et al.*, 2008); además, es capaz de inducir protección contra la fascioliasis en animales (Acosta *et al.*, 2008).

Las actividades glicosídicas N-Acetil- $\beta$ -Glucosaminidasa ( $\beta$ -NAG) (que degradan oligosacáridos unidos por enlaces tipo-N, como en la mucina) y  $\alpha$ -manosidasa ( $\alpha$ -MAN), enzimas de origen lisosomal, solo se detectaron en FS. Hasta ahora, no hemos visto reportes de éstas actividades en *Fasciola* sp.; sin embargo, estudios realizados por Irwin *et al.* (2004) describieron la presencia de  $\beta$ -glucosaminidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -hexosaminidasa en productos de excreción-secreción de *F. hepatica*, extrapolando estar probablemente involucradas en la degradación de azúcares y glicoproteínas hospederas durante la penetración en los tejidos del hospedador y en la digestión de glicoproteínas que sirven para su nutrición. En el trematodo *Paragonimus westermani*, la actividad  $\beta$ -NAG se halló elevada en FS, siendo en este caso ser una enzima probablemente relacionada con la necesidad de degradar los numerosos sustratos glicosilados comúnmente presentes en las secreciones pulmonares, su hábitat natural (Gómez *et al.*, 2010). La  $\alpha$ -MAN, también involucrada en la degradación de mucinas, fue igualmente detectada en esta fracción de *P. westermani* (Gómez *et al.*, 2010).

En el presente trabajo, la actividad AChE fue más marcada en la FS que en la FP, lo cual concuerda con los reportado por Frady & Knapp (1967), quien detectó esta actividad en extractos solubles de la etapa adulta de *Fasciola* sp. Arnon *et al.* (1999) hallaron esta enzima asociada al tejido muscular y en la superficie del tegumento de *S. mansoni* ayudando

a la adquisición de glucosa como nutriente para la supervivencia del parásito.

Los estudios realizados en FS y FP mediante análisis por SDS-PAGE, en condiciones reductoras y no reductoras, mostraron la presencia de proteínas comunes en ambas fracciones, identificadas con las masas moleculares de: 62, 45-44, 38, 32, 25, 24, 21 y 10 kDa. Éstos resultados concuerdan, y además se ven reforzados, con los estudios de Meshgi *et al.* (2008) obtenidos con una preparación de antígenos somáticos de adultos de *F. hepatica* en la cual se caracterizó el perfil de proteínas, reportando bandas de aprox. 62, 46, 36, 33 y kDa. De manera semejante, De Almeida *et al.* (2007) observaron en un extracto soluble del parásito, luego de SDS-PAGE (15%) y WB bajo condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR), bandas de 66, 45, 21, 12, 11, 10 y 9 kDa; estos autores reportaron además un reconocimiento específico de antígenos de 57, 46-44, 38, 10, 9 y 8 kDa en FS por sueros de pacientes infectados, considerado relevante para el diagnóstico de ésta enfermedad parasitaria.

En el presente trabajo, se halló mayor contenido glicosídico en la FP que en FS. El tegumento de *F. hepatica* es de naturaleza sincicial cubierto de un glicocalix, contiene numerosas mitocondrias y vesículas secretoras, y está delimitado por dos capas membranosas de 12 nm (Threagold, 1976). En *F. hepatica*, el tegumento es una de las regiones de contacto del parásito con el medio que lo rodea y por lo tanto constituye una de las interfases entre el parásito y el hospedador, siendo la otra interfase la mucosa intestinal que recubre el aparato digestivo de estos parásitos. Se encuentra involucrado en la renovación de la membrana externa, nutrición (mediante la internalización de moléculas), modulación, secreción, transducción de señales y en la evasión inmune (Wilson, *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de varios estudios de proteómica en diferentes preparaciones de *F. hepatica*, incluyendo tegumento y secreciones, publicados recientemente (Haçariz, *et al.*, 2014., Morales & Espino, 2012., Wilson, *et al.*, 2011), no hemos podido encontrar aún información sobre las enzimas y los componentes que fueron objeto del presente estudio, los cuales, podrían ser de importancia funcional para el parásito y también para la respuesta inmunológica, pudiendo quizás ser eventuales blancos para el desarrollo de drogas y vacunas.

Debido a la selectiva resistencia a la desnaturalización por *n*-butanol de glicoproteínas, asumimos en consecuencia que la mayoría de las moléculas que observamos en FP, luego de SDS-PAGE, está glicosilada. Usando un kit para la tinción de glicoproteínas, pudimos de hecho demostrar la mayoritaria presencia de bandas glicosiladas en los perfiles electroforéticos de FS y en el extracto butanólico de FP. En esta última fracción, entre las bandas fuertemente detectadas llama la atención, el componente de 42 kDa. La banda de 42 kDa podría corresponder a la actina, una proteína muy conservada entre especies con masa molecular de 45-42 kDa. En *F. hepatica*, los filamentos de actina están localizados en el tegumento del parásito adulto (Tansattit *et al.*, 2006), y es considerada candidata potencial para vacuna contra la fascioliasis (Boukli *et al.*, 2011).

Los resultados descritos en el presente trabajo muestran la presencia de actividades enzimáticas y glicocomponentes en las FS y FP de vermes adultos de *F. hepatica*. Las actividades enzimáticas FAL y FAc fueron las más relevantes en la FP, siendo la actividad FAL muy alta en esta fracción. Aunque la relevancia de la presencia y/o ausencia de cada componente glicosídico y enzimático en *F. hepatica* aún no está completamente definida, los componentes descritos, deben ser estudiados con mayor profundidad hasta confirmar su identidad molecular ya que podrían ofrecer posibles blancos para el entendimiento de la interacción parásito-hospedador, de intervención inmunológica y/o farmacológica, así como constituirse en antígenos con alta sensibilidad y especificidad para el inmunodiagnóstico de la fascioliasis.

#### CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no existen conflictos de intereses en la realización de este trabajo.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Douglas Oliva quien obtuvo los gusanos adultos de *Fasciola hepatica* a partir de los conductos biliares de hígados infectados de ganado que llegaron al matadero Industrial de Paraguaná, Bel C.A, Yaracal- Edo. Falcón, y gentilmente nos los donó.

#### REFERENCIAS

- Acosta D., Gonhi F. & Carmona, C. (1998). Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* **84**: 1-7.
- Acosta D., Cancela M., Piacenza L., Roche L., Carmona C. & Tort, J. (2008.) *Fasciola hepatica*. Leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **158**: 52-64.
- Araujo-Montoya B. O., Rofatto H. K., Tararam C. A., Farias L. P., Oliveira K. C., Verjovski-Almeida S., *et al.* (2011). *Schistosoma mansoni*: Molecular characterization of alkaline phosphatase and expression patterns across life cycle stages. *Exp Parasitol.* **129**: 284-291.
- Arnon R., Silman I. & Tarrab-Hazdai R. (1999). Acetylcholinesterase of *Schistosoma mansoni*: functional correlates. Contributed in honor of Professor Hans Neurath's 90 birthday. *Prot. Sci.* **8**: 2553-2561.
- Boukli N. M., Delgado B., Ricaurte M. & Espino A. M. (2011). *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*: identification of common proteins by comparative proteomic analysis. *J. Parasitol.* **97**: 852-861.
- Bradford M. (1976). A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Braschi S. & Wilson R. (2006). Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol. Cell Proteom.* **5**: 347-356.
- Cesari I. M., Simpson A. & Evans W. (1981). Properties of a series of tegumental membrane bound phosphohydrolase activities of *Schistosoma mansoni*. *Biochem. J.* **198**: 467-473.
- Cesari I. M., Bouty I., Bout D., De Noya B. & Hoebeke J. (1992). Parasites enzymes as tool to investigate immune response. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **87**: 55-65.

- Cesari I. M., Ballen D. E., Perrone T., Hoebeke J. & Bout D. (2000). Enzyme activities in *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen. *Int. J. Parasitol.* **86**: 1137-1140.
- Cesari I. M., Mendoza L., Ballen D. E. & Alarcón de Noya B. (2002). Evaluación del "IEFA" como técnica de inmunodiagnóstico en el programa de lucha contra la bilharziosis. *Bol. Dir. Malaritol. San. Amb.* **42**: 29-32.
- Cesari I. M., Ballen D. E., Mendoza L. & Matos C. (2005). Detection of *Schistosoma mansoni* membrane antigens by immunoblot análisis of sera of patients from low transmission areas. *Clin. Diag. Lab. Inmunol.* **12**: 280-286.
- Dalton J., Neill S., Stack C., Collins P., Walshe A., Sekiya M., et al. (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int. J. Parasitol.* **33**: 1173-1181.
- Dalton J. P., Skelly P. & Halton D. W. (2004). Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. *Can. J. Zool.* **82**: 211-232.
- De Almeida M., Ferreira M., Planchart S., Terashima A., Maco V., Marcos L., et al. (2007). Preliminary antigenic characterization of an adult worm vomit preparation of *Fasciola hepatica* by infected human sera. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **49**: 31-35.
- Ellman G., Courtney K., Andres V. & Feather R. (1961). A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.
- Escalante H., Davelois K., Ortiz P., Rodríguez H., Diaz H. & Jara C. (2011). Estandarización de la técnica de western blot para el diagnóstico de la fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública.* **28**: 454-461.
- Farahnak A., Golestani A. & Eshraghian M. (2013). Activity of superoxide dismutase (SOD) enzyme in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* parasites. *Irian J. Parasitol.* **8**: 167-170.
- Fernandez M. & Cortez J. (2002). *Caracterización bioquímica e inmunológica de la actividad enzimática del esquistosómulo de Schistosoma mansoni*. Tesis de Pregrado, Bioanálisis, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.
- Figuroa-Santiago I., Delgado B. & Espino A. (2011). *Fasciola hepatica* saposin-like protein-2 based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **70**: 355-361.
- Fraday C. & Knapp S. (1967). A radioisotopic assay of acetylcholinesterase in *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* **53**: 298-302.
- Gomez E., Ballen D. E., Tulio M., Díaz Z., Zavala-Jaspe R., Alarcón de Noya B., et al. (2010). Diversidad enzimática de la fracción soluble de un aislado venezolano de adultos *Paragonimus* sp. *Bol. Mal. Salud Amb.* **1**: 75-84.
- Gonzales-Santana B., Dalton J. P., Vásquez Camargo F. & Parkinson M. (2013). The diagnosis of human Fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant cathepsin L protease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**: e2414.
- Haçarız O., Baykal A. T., Akgün M., Kavak P., Sağiroğlu M. Ş. & Sayers G. P. (2014). Generating a detailed protein profile of *Fasciola hepatica* during the chronic stage of infection in cattle. *Proteomics.* **14**: 1519-1530.
- Irwin J., Morrissey P., Ryan J., Walshe A., O'Neill S. M., et al. (2004). Glycosidase activity in the excretory-secretory products of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol.* **29**: 465-472.
- Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Loukas A., Tran M. & Pearson M. S. (2007). Schistosome membrane proteins as vaccines. *Int. J. Parasitol.* **37**: 257-263.
- Mansour T. & Mansour J. (1979). Phosphodiesterase in the liver fluke. *Fasciola hepatica*. *Biochem. Pharmacol.* **26**: 2325-2330.

- Marcilla A., De la Rubia J., Sotillo J., Bernal D., Carmona C., Villavicencio Z., *et al.* (2008). Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**: 95-100.
- Mas-Coma S., Valero M. A. & Bargues M. D. (2009). *Fasciola*, Lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol.* **69**: 41-146.
- Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S. & Lee Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochem.* **339**: 69-72.
- Meaney M., Fairweather I., Brennan G. P., McDowell L. S. & Forbes A. B. (2003). *Fasciola hepatica*: effects of the fasciolicide clorsulon *in vitro* and *in vivo* on the tegumental surface, and a comparison of the effects on young- and old-mature flukes. *Parasitol. Res.* **91**: 238-250.
- Meshgi B., Eslami A. & Hemmatzad F. (2008). Determination of somatic and excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using SDS-PAGE. *Iranian J. Vet. Res.* **9**: 77-80.
- McVeigh P., Maule A. G., Dalton J. P. & Robinson M. W. (2012). *Fasciola hepatica* virulence associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes Infect.* **14**: 301-310.
- Morales A. & Espino A. M. (2012). Evaluation and characterization of *Fasciola hepatica* tegument protein extract for serodiagnosis of human fascioliasis. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**: 1870-1878.
- Morphew R. M., Wright H. A., LaCourse E. J., Woods D. J. & Brophy P. M. (2007). Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during *in vitro* culture ex host. *Mol. Cell. Proteomics.* **6**: 963-972.
- Mulvenna J., Moertel L., Jones M. K., Nawaratna S., Lovas E. M., Gobert G. N., *et al.* (2010). Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. *Int. J. Parasitol.* **40**: 543-554.
- Norbury L., Beckham S., Pike R., Grams R., Spithill T., Fecondo J., *et al.* (2011). Adult and juvenile *Fasciola* cathepsin L proteases: Different enzymes for different roles. *Biochem.* **93**: 604-611.
- Probert A. & Lwin T. (1974). Kinetic properties, and location of nonspecific phosphomonoesterases in subcellular fractions of *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* **35**: 253-261.
- Robinson M. W., Dalton J. P., O'Brien B. A. & Donnelly S. (2013). *Fasciola hepatica*: The therapeutic potential of a worm secretome. *Int. J. Parasitol.* **43**: 283-291.
- Sulbarán G., Noya O., Brito B., Ballén D. E. & Cesari I. M. (2013). Immunoprotection of mice against *Schistosomiasis mansoni* using solubilized membrane antigens. *PloS. Negl. Trop. Dis.* **7**: e2254.
- Tansatit T., Sahaphong S., Riengrojpitak S., Viyanant V. & Sobhon P. (2006). Immunolocalization of cytoskeletal components in the tegument of the 3-week-old juvenile and adult *Fasciola gigantica*. *Vet. Parasitol.* **135**: 269-278.
- Threadgold L. (1976). *Fasciola hepatica*: ultrastructure and histochemistry of the glycoalyx of the tegument. *Exp. Parasitol.* **39**: 119-134.
- Wilson R. A., Wright J. M., de Castro-Borges W., Parker-Manuel S. J., Dowle A. A., *et al.* (2011). Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. *Int. J. Parasitol.* **4**: 1347-1359.
- WHO (2010). *Neglected tropical Diseases*. [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.who.int/neglected/fascioliasis/index.html>. [Consulta: septiembre de 2011].

Recibido el 05/01/2014  
Aceptado el 11/08/2014