

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
HEMOGLOBINASA DEL CITOSOL DEL MÚSCULO DE
*ASCARIS SUUM***

MARITZA E. DE LOS RÍOS Y ZADILA SUÁREZ DE MATA

*Laboratorio de Bioquímica de Helmintos Parásitos,
Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela
Correo electrónico: manena6667@yahoo.com, zsuarez@usb.ve*

Resumen. Una enzima que preferencialmente cataliza la hidrólisis de la hemoglobina de pared corporal de *Ascaris* ha sido purificada del citosol del músculo del nematodo. La hemoglobinasa de *Ascaris* fue dos veces más activa con la hemoglobina de pared corporal que con la hemoglobina bovina, y degrada en SDS-PAGE la banda de la hemoproteína de *Ascaris* (Mr 17.000). El procedimiento de purificación de la hemoglobinasa consistió en aislamiento de la fracción citosólica de *Ascaris*, cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa, y cromatografía de afinidad en Matrex-blue. La proteasa fue purificada 54 veces y mostró una actividad específica de 36,6 unidades por miligramo. El peso molecular de la proteína nativa (Mr = 86.000 mediante cromatografía de filtración en gel), y el tamaño de la subunidad (Mr = 43.000 por SDS-PAGE), indican que la proteasa es un dímero. Su actividad enzimática sobre hemoglobina bovina a pH 7,5 fue inhibida por E-64 un 73%, y estimulada por cisteína 60 veces, indicando que es una cisteín proteasa. Los resultados de este estudio sugieren que esta proteasa, actúa regulando los niveles intracelulares de la hemoglobina de pared corporal de *Ascaris*, y que la hemoglobina puede servir como fuente de aminoácidos y de grupos hemo para la nutrición y sobrevivencia del parásito. *Recibido: 08 junio 2011, aceptado: 20 octubre 2011.*

Palabras clave. *Ascaris suum*, Proteasa, Hemoglobina, Hemoglobinasa, Hemoglobina de pared corporal, SDS-PAGE.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A HEMOGLOBINASE
FROM THE CYTOSOLIC FRACTION OF *ASCARIS SUUM* MUSCLE

Abstract. An enzyme that preferentially catalyzes the hydrolysis of *Ascaris* body wall hemoglobin has been purified from the cytosol of the nematode muscle. *Ascaris* hemoglobinase was two times more active with body wall hemoglobin than with bovine hemoglobin, and degraded in SDS-PAGE the band of the *Ascaris* hemoprotein (Mr 17,000). The hemoglobinase purification procedure consisted of isolation of *Ascaris* cytosolic fraction, ion exchange chromatography on DEAE-Cellulose, and affinity

chromatography on Matrex-blue. The protease was purified 54-fold and showed a specific activity of 36.6 units per mg of protein. The native molecular weight of *Ascaris* hemoglobinase (Mr = 86,000 by gel filtration chromatography), and the size of the subunit (Mr = 43,000 by SDS-PAGE) indicate that the protease is composed of two subunits of the same molecular weight. The highest activity of *Ascaris* hemoglobinase with bovine hemoglobin at pH 7.5 was inhibited 73 % by E-64, and was stimulated 60-fold by cysteine indicating that is a cysteine protease. The results of this study suggest that this protease might be involved in the regulation of intracellular levels of body wall hemoglobin, and that this hemoglobin could serve as a source of aminoacids and heme group for the nutrition and survival of the parasite. *Received: 08 June 2011, accepted: 20 October 2011.*

Key words. *Ascaris suum*, Protease, Hemoglobin, Haemoglobinase, Hemoglobin wall body, SDS-PAGE.

INTRODUCCIÓN

El *Ascaris lumbricoides* es el gusano cilíndrico no segmentado más grande, que parasita el intestino delgado de humanos y de cerdos. Este nematodo, está difundido en todo el mundo y centenares de millones de personas están infectadas por él (Municio. 1997). Para el año 2006, se estimaba cerca del billón de personas infectadas con *Ascaris* (McKerrow *et al.* 2006).

Los parásitos para poder crecer, desarrollarse y sobrevivir en distintos hospederos y ambientes, y conjuntamente realizar todas sus funciones biológicas, necesitan del consumo de nutrientes que son adquiridos mediante la digestión de proteínas del hospedero, como la hemoglobina en el caso de *Schistosoma*. El término “hemoglobinasas” define a una endoproteasa que está envuelta en la digestión de hemoglobina, fue aplicado por primera vez, para describir la actividad cisteína proteasa de la catepsina B de *Schistosoma* (Dalton *et al.* 1995).

Dos de las proteasas mejor caracterizadas de parásitos, que catalizan la degradación de hemoglobina del hospedero son la catepsina-B1 de *Schistosoma mansoni* y la falcipaina 2 de *Plasmodium falciparum*. Además, otras proteasas que degradan hemoglobina han sido descritas en estos parásitos (Sajid y McKerrow. 2002).

Una ruta similar para la degradación de hemoglobina está presente en los productos de secreción y excreción de nemátodos que se alimentan de sangre. Los productos de secreción y excreción de *Necator americanus* contienen una mezcla de enzimas proteolíticas, entre ellas dos cisteín proteasas: las catepsinas

B y L (Brown *et al.*1995). Adicionalmente, inhibidores de cisteín proteasas bloquean un 50% la degradación de hemoglobina por *Haemonchus contortus*.

Delcroix *et al.* (2006), demostraron que varias cisteín proteasas funcionan en conjunto, para la degradación de proteínas en el tracto digestivo en *Schistosoma*, y que proteasas específicas pueden iniciar la degradación de proteínas del hospedero. La catepsina D, juega un papel primordial en la hidrólisis inicial de la hemoglobina, liberando dos péptidos de pesos moleculares comprendidos entre 6 y 16 kDa, que a su vez son degradados por catepsinas B y L.

La localización de las proteasas de los parásitos en distintas fracciones subcelulares (Brindley *et al.*2001), algunas de ellas asociadas con proteínas con anclaje tipo GPI, apoya el interés en caracterizar las proteasas presentes en el citosol del músculo de *Ascaris*. Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio de Bioquímica de Helmintos Parásitos de la Universidad Simón Bolívar, permitieron observar que cuando el material citosólico es aplicado a una columna de DEAE-Celulosa éste se separa en cuatro picos que presentan actividad proteolítica sobre hemoglobina bovina. El primer pico es eluido de la columna con buffer de equilibrio Tris.HCl 25 mM, pH 7,5; mientras los picos restantes eluyen con concentraciones crecientes de NaCl (0,1M, 0,15M y 0,25) en el buffer de equilibrio. La actividad hemoglobinasas de los cuatro picos es estimulada por cisteína, lo que indica el predominio de cisteín proteasas en el citosol del músculo de *Ascaris*.

Como la mayor actividad hemoglobinasas dependiente de cisteína, está asociada con el pico 2 de DEAE-Celulosa (que eluye con NaCl 0,1M), este trabajo propone la purificación y caracterización de una de las proteasas responsables de esta actividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Los helmintos adultos de *Ascaris* fueron obtenidos del intestino delgado de cerdos procesados en los mataderos del Tuy (Santa Teresa del Tuy, Edo. Miranda) y de Caracas (carretera vieja de Los Teques, Edo. Miranda). Se mantuvieron en solución salina isotónica durante su traslado al laboratorio y en un período no mayor de 24 horas se les extrajo el tejido muscular mediante disección en frío.

Aislamiento de la fracción citosólica. La fracción citosólica del músculo de gusanos adultos fue aislada por centrifugación diferencial según el procedimiento de Saz y Lescure (1969). Cada 5 gramos de músculo fresco

fueron cortados hasta convertirlos en papilla, resuspendidos en 35 ml de medio mitocondrial (sacarosa 0,24M, EDTA 5mM, pH 7,4) y homogenizados en frío utilizando un envase de vidrio de homogenización THOMAS C653 con un motor EBERBACH con torque. El homogenato se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos a 4 °C en un rotor SS-34 de una centrífuga SORVALL Modelo RC2-B (Sorvall, Wilmington, DE, EUA). El sobrenadante resultante fue filtrado a través de lana de vidrio y centrifugado a 8500 rpm durante 30 minutos a 4°C. El pellet fue descartado y el sobrenadante obtenido correspondió a la fracción citosólica libre de mitocondria.

Determinación de la actividad proteolítica. La actividad hidrolítica de las fracciones aisladas durante la purificación se determinó espectrofotométricamente a 280 nm por el método de Osman (2003), midiendo la absorbancia del sobrenadante de ácido tricloroacético (TCA) que contiene los productos de degradación de la proteína sustrato. En este ensayo la mezcla contiene; 0,2 ml de la hemoglobina bovina comercial de Sigma (1 mg); 0,2 ml de buffer Tris.HCl 25 mM, pH 7,5. La reacción se inicia con la adición de la preparación de la enzima (0,2 ml) más 10 μ l de cisteína (100mM), y fue detenida después de una hora a 40°C con la adición de TCA al 12,5%. La mezcla de reacción se centrifugó a 5.000 rpm por 20 minutos en una centrífuga SORVALL rotor SS-34, luego de haber permanecido 10 minutos en hielo. La absorbancia a 280 nm del sobrenadante se midió contra un control tratado de la misma manera, al cual se le añadió TCA previo a la adición de la enzima. Una unidad de actividad catalítica es definida como la cantidad de enzima que cataliza un incremento en absorbancia de 1 unidad a 280 nm en 60 minutos bajo las condiciones de ensayo descritas. Este ensayo se utilizó para seguir la actividad enzimática durante la purificación y en la caracterización de la enzima.

Determinación de la concentración de proteínas. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976). Albúmina de suero bovino fue utilizada como standard para la elaboración de la curva de calibración.

Electroforesis en gel de Poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La composición peptídica de las fracciones obtenidas durante la purificación, se determinó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 13,5% siguiendo el método de Laemmli (1970). Se utilizaron como proteínas de referencia, las presentes en el standard de amplio rango de BioRad; miosina 200.000, β - galactocidasa 116.250, fosforilasa b 97.400, albúmina de suero bovino 66.200, ovoalbúmina 45.000, anhidrasa carbónica 31.000, inhibidor de tripsina 21.500, lisozima 14.400 y aprotinina 6.500 Dalton.

PURIFICACIÓN DE LA HEMOGLOBINASA DE ASCARIS

La fracción citosólica fue sometida a cromatografía en una columna DEAE-Celulosa (2,5 x 8,0 cm) con un volumen de 40 ml. El primer pico de proteínas fue eluido con buffer de equilibrio Tris.HCl 25 mM, pH 7,5. Las proteínas que interactuaron con la resina fueron eluidas con concentraciones crecientes de NaCl (0,1 M, 0,15 M y 0,25 M) en el buffer de equilibrio. Las fracciones activas eluidas de DEAE-Celulosa con NaCl 0,1M, fueron juntas y desaladas por ultrafiltración a través de Amicon 30. La muestra desalada se aplicó a una columna de agarosa azul (Matrex-Blue) (1 x 3 cm), equilibrada con buffer Tris.HCl 25mM, pH 7,5. Un primer pico de proteínas fue eluido de la columna con el buffer de equilibrio. Dos picos con actividad proteolítica fueron eluidos de la columna con NaCl 0,25 y 0,5M.

PURIFICACIÓN DE LA HEMOGLOBINA DE PARED CORPORAL DE ASCARIS

Para los estudios de especificidad de sustrato, uno de los sustratos empleados fue la hemoglobina de pared corporal de *Ascaris suum*, purificada previamente en el laboratorio utilizando una modificación a la metodología de Hamada y colaboradores (1962), y que consistió en cromatografía en DEAE-Celulosa, cromatografía en Matrex-blue y ultrafiltración a través de una membrana XM-50 de Amicon. Para evaluar la pureza de la proteína se siguió el cociente de las absorbancias a 412 nm y 280 nm de todas las fracciones aisladas y el espectro de luz ultravioleta característico de la hemoproteína.

RESULTADOS

PURIFICACIÓN DE LA HEMOGLOBINASA DE ASCARIS

La cromatografía de la fracción citosólica en DEAE-Celulosa permitió aislar cuatro picos con actividad sobre hemoglobina (Fig.1). El pico 2 contenía el 15 % del total de la actividad proteolítica presente en el citosol (Tabla 1). Además, la actividad proteolítica de este pico fue incrementada hasta 19 veces por cisteína, e inhibida un 80 % por E-64 un inhibidor específico de cisteína proteasas (datos no mostrados). Los demás picos mostraron actividad proteolítica sobre hemoglobina (Hb) bovina y dependiente de cisteína.

La mayor actividad proteolítica del pico 2 de DEAE-Celulosa se obtuvo sobre hemoglobina (0,69 unidades/ml), siendo su actividad sobre caseína unas 23 veces menor (0,03 unidades/ml), es por ello, que este pico fue seleccionado para aislar una de las proteínas responsables de la actividad hemoglobinasa. La cromatografía del pico 2 de DEAE en Matrex blue permitió fraccionar en tres picos la actividad hemoglobinasa (Fig. 2). Adicionalmente, la cromatografía en

Matrex blue permitió obtener fracciones con actividad proteolítica libres de Hb de pared corporal. La Hb no interactuó con la resina, y estuvo asociada al primer pico de proteínas que fue eluído con buffer de equilibrio.

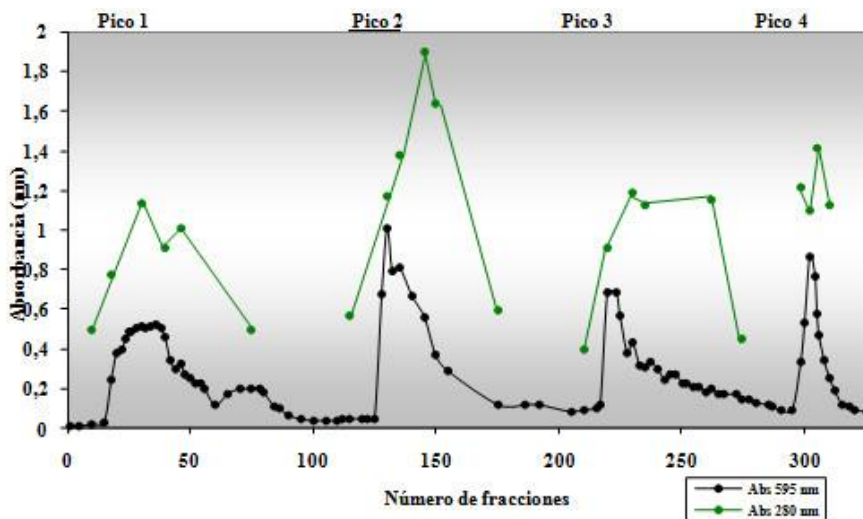


Figura 1. Cromatografía en DEAE-Celulosa del citosol del músculo de *Ascaris*. Patrón de elución de las proteínas presentes en 44 ml de citosol. 275 mg de proteínas totales fueron aplicados a una columna de DEAE-Celulosa (2,5 x 8,0 cm) equilibrada en buffer Tris.HCl 25mM pH 7,5. El pico 1 fue eluído con buffer de equilibrio, los picos restantes se eluyeron con concentraciones crecientes de NaCl (0,1M, 0,15M y 0,25 M) en el buffer de equilibrio. El patrón de elución de las proteínas fue seguido por el método de Bradford a 595nm. La actividad proteolítica de las fracciones fue seguida por el método de Osman a 280nm.

Tabla 1. Purificación de la hemoglobinasa del pico 2 DEAE-Celulosa del citosol del músculo de *Ascaris suum*.

Fracción	Unidades Totales	Proteínas Totales (mg)	Actividad Específica Unidades mg Prot	Rendimiento (%)	Purificación (x)
Citosol	188,5	277,2	0,68	100	1
DEAE-Celulosa (Pico 2)	27,6	31,03	0,89	14,6	1,3
Matrex-Blue (Pico 2A)	5,68	0,3167	17,93	3,0	26,4
Matrex-Blue (Pico 2B)	5,96	0,1731	34,46	3,01	50,68
Matrex-Blue (Pico 3)	3,37	0,092	36,6	1,78	53,8

Durante la purificación de la proteasa la actividad proteolítica se determinó utilizando el método de Osman (2003) y para la determinación de la concentración de proteínas, se empleó el método de Bradford (1976).

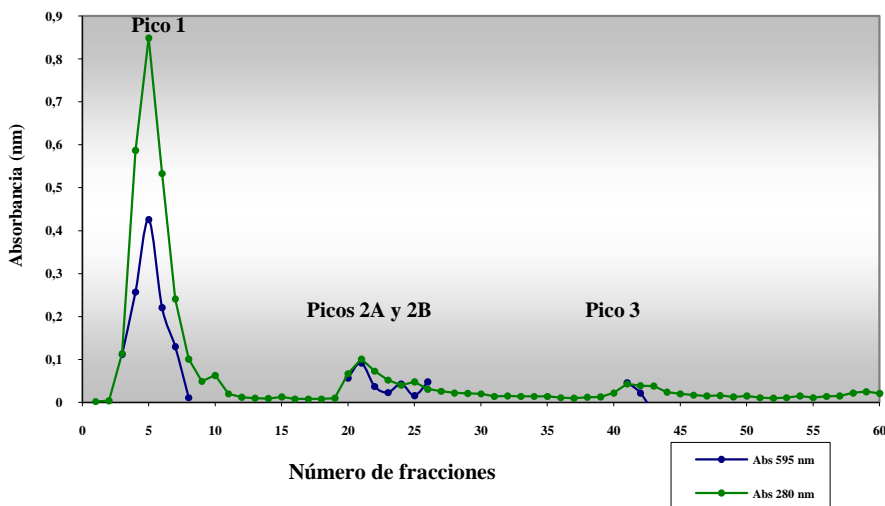


Figura 2. Patrón de elución de las proteínas del pico 2 de DEAE-Celulosa en la columna de Matrex-Blue. El Pico 2 de DEAE-Celulosa (5 mg de proteínas) fue aplicado a una columna de 1 x 3 cm equilibrada en buffer 25mM Tris.HCl pH 7,5. El pico 1 fue eluído con buffer de equilibrio, los picos restantes se eluyeron con concentraciones crecientes de NaCl (0,25 M y 0,5 M) en el buffer de equilibrio.

La composición peptídica del pico 2 de DEAE se muestra en la Fig. 3. El pico 2 DEAE contiene 4 bandas acentuadas y muy bien definidas de 66,5; 39, 29 y 17 kDa. Una quinta banda localizada inmediatamente debajo del estándar de ovoalbúmina, que pareciera ser un duplete, migra con una movilidad relativa de aproximadamente 43,5 kDa (Fig. 3, Bolsillo 4).

El pico 3 de Matrex blue eluido con NaCl 0,5 M, mostró la mayor actividad específica de 36,6 unidades por miligramo de proteína (Tabla 1) y una sola banda de 43 kDa en SDS-PAGE (Fig. 3, Bolsillo 8), la misma banda observada en el pico 2 DEAE (Fig. 3, bolsillo 4). A partir de este momento se asoció la proteína de 43 kDa (p43) con la actividad hemoglobinasas. Estos resultados indican que en *Ascaris* como en *P. westermani* la actividad hemoglobinasas está asociada a proteínas mayores de 40 kDa (Choi y col., 2006).

La proteasa purificada mostró un incremento considerable de hasta 60 veces en su actividad hemoglobinasas en presencia de cisteína (de 0,005 U/ml a 0,300 U/ml). Lo que sugiere que la enzima purificada es una cisteín proteasa.

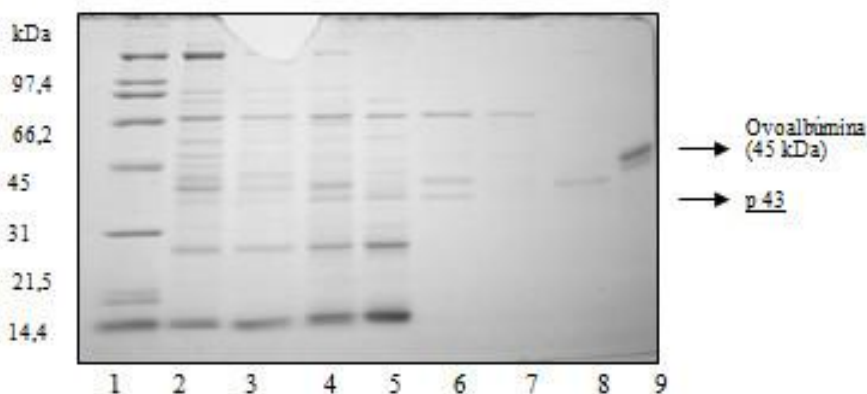


Figura 3. Electroforesis de las fracciones aisladas durante la cromatografía del pico 2 DEAE-Celulosa en Matrex-blue. El contenido de cada bolsillo fue: 1- Standard de amplio rango 15 μ l; 2- Fracción citosólica (25 μ g); 3- Pico 2 DEAE-Celulosa (25 μ g); 4- Pico 2 DEAE-Celulosa concentrado y desalado (25 μ g); 5- Pool 1 de Matrex-blue (Fr 4-6; 22,7 μ g); 6- Pool 2A Matrex-blue (Fr 20-22; 4,3 μ g); 7- Pool 2B Matrex-blue (Fr 23-26; 2 μ g); 8- Pool 3 Matrex-blue (Fr 41-42; 2 μ g); 9- Ovoalbúmina (25 μ g). La corrida electroforética se realizó en geles de poliacrilamida al 13,5%.

CARACTERIZACIÓN DE LA HBNASA PURIFICADA

Peso molecular y subunidades componentes. El peso molecular de la hemoglobinasas (Hbnasa) de *Ascaris* se determinó cromatográficamente en una columna de Sephacryl S-300 (1 x 35 cm) equilibrada y eluida con buffer

Tris.HCl 25mM pH 7,5. El volumen de elución de la enzima corresponde a una proteína de Mr = 86 kDa (Fig. 4).

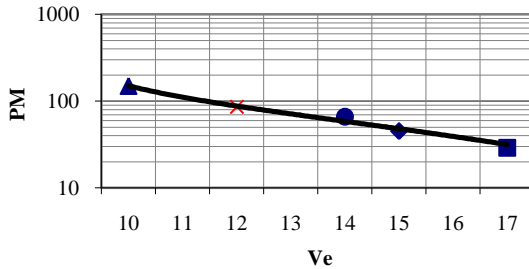


Figura 4. Determinación del peso de la proteína nativa. PM: peso molecular; Ve: volumen de elución. Proteínas estándar: Alcohol dehidrogenasa (▲); BSA (●); Ovoalbúmina (◆); Anhidrasa Carbónica (■). Hemoglobinasa (x).

El número y tamaño de las subunidades en la proteína nativa fue determinado por SDS-PAGE. La enzima disociada dio lugar a una sola banda peptídica con una movilidad electroforética que corresponde a un Mr de 43 kDa (Fig. 5).

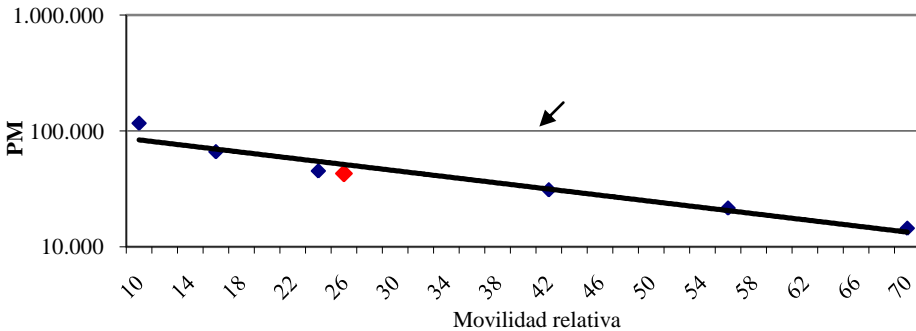


Figura 5. Curva de calibración para la estimación del tamaño de la subunidad de la hemoglobinasa purificada de *Ascaris*. PM: peso molecular; Mr: movilidad relativa. La flecha indica la posición de la migración de la banda de la hemoglobinasa (◆). Las proteínas estándar fueron: β-galactocidasa (116.250), albúmina de suero bovino (66.200), ovoalbumina (45.000), anhidrasa carbónica (31.000), inhibidor de tripsina (21.500), lisozima (14.400).

pH óptimo para la degradación de hemoglobina. El pH óptimo para la degradación de Hb por la enzima purificada fue de 7,5 (Fig. 6). Se puede observar que a medida que el pH se acerca al pH fisiológico, la proteasa va incrementando considerablemente su actividad hidrolítica sobre la hemoglobina bovina, este resultado se correlaciona con el hecho de que el parásito, en su vida

adulta, se encuentra inmerso en el interior del intestino delgado de su organismo hospedero cuyo rango de pH oscila entre 5 a 7.

Interesantemente, este resultado indica que no solamente existen serin proteasas con pH óptimo de 7,5 (Yoo *et al.* 2004), sino que las cisteín proteasas del citosol de *Ascaris* trabajan mejor a pH por arriba de la neutralidad, a diferencia de lo descrito para la mayoría de las cisteín proteasas de otros organismos que son acídicas.

Temperatura y tiempo óptimo para la degradación de hemoglobina. La actividad hemoglobinasas aumenta con la temperatura a la que se sometió el ensayo enzimático, siendo la temperatura óptima para la degradación 40°C y el tiempo 60 minutos.

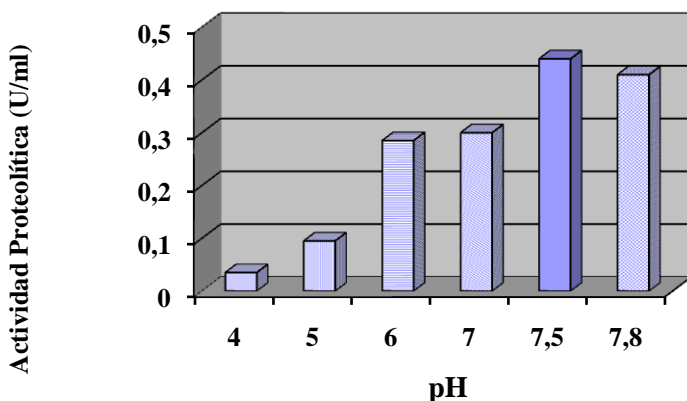


Figura 6. pH óptimo de la hidrólisis de la Hb bovina por la hemoglobinasas presente en las fracciones activas de Sephacryl S-300. Los ensayos enzimáticos se realizaron con Hb bovina y cisteína 1mM. La concentración de enzima usada en los ensayos fue 26,12 μ g/ml ensayo.

Efecto de inhibidores específicos sobre la proteasa purificada. Los estudios con inhibidores de proteasas se describieron en la Tabla 2. La más alta inhibición (73,3 %) ocurrió en presencia de E-64, inhibidor específico de cisteín proteasas.

Tabla 2. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la hemoglobinasa purificada.

Inhibidor	Concentración	Actividad proteolítica (U/ml)	Inhibición%
Sin inhibidor	-----	0,405	-----
E-64	0,056 mM	0,108	73,3
PMSF	0,57 mM	0,465	0
Pepstatina A	0,029 mM	0,285	29,6
EDTA	10 mM	0,260	35,8

Los ensayos enzimáticos se realizaron en presencia de Hb bovina 1mg a pH 7,5 y cisteína 1mM. En todos los ensayos la concentración de la proteasa fue 45,52 μ g por ml de ensayo. E-64 = Trans – Epoxy succinyl – L – leucylamido (4 – guanidino) Butano. PMSF = Phenylmethylsulfonyl fluoride. EDTA = Ethylenedinitrilo tetraacetic acid.

Especificidad de sustrato de la Hbnasa de Ascaris. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 7. La Hbnasa de *Ascaris* degradó favorablemente tanto la hemoglobina bovina como la mioglobina, siendo la primera el sustrato predilecto por la enzima. Por lo tanto, esta proteasa pudiese formar parte de las hemoglobinasas dependientes de cisteína que degradan la hemoglobina del hospedero como un mecanismo de sobrevivencia del parásito.

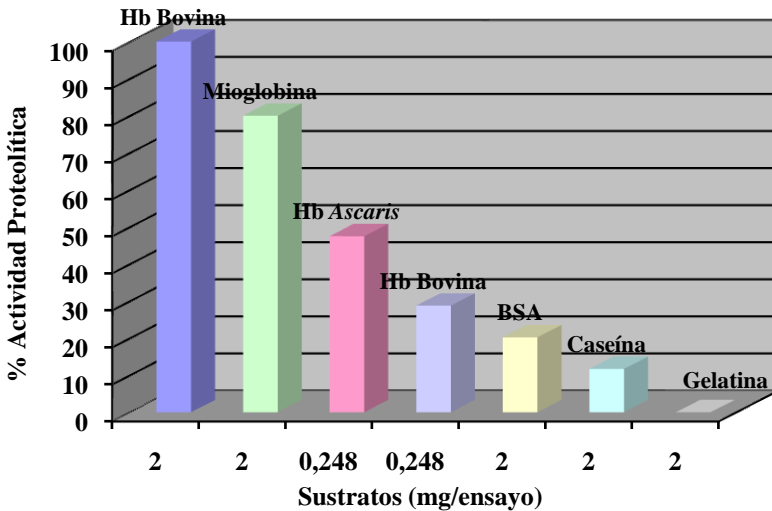


Figura 7. Estudios de Especificidad de sustrato. Los ensayos enzimáticos se realizaron en presencia de 1mM cisteína y a pH 7,5, siendo la fuente de enzima el pico 3 Matrex blue. En todos los ensayos la concentración de proteína del pico 3 se mantuvo constante (29,8 μ g/ml ensayo).

Cuando se compara la actividad enzimática obtenida con la hemoglobina de pared de *Ascaris* y la hemoglobina bovina a concentraciones iguales de la proteína sustrato (0,248 mg por ensayo), se observa que la enzima de *Ascaris* degrada más eficazmente la Hb de pared que la Hb bovina, ya que la actividad sobre la Hb de *Ascaris* fue 1,7 veces mayor que sobre la Hb bovina (Fig. 7).

Estudios de degradación. Con el objeto de comprobar si la proteasa purificada se trata de una hemoglobinasas dependiente de cisteína que degrada tanto Hb bovina como la Hb de pared de *Ascaris*, se realizaron estudios de degradación controlada de las bandas de las proteínas sustrato con la proteasa purificada. Se incubaron preparaciones de la enzima purificada con la Hb bovina y con la Hb de pared de *Ascaris* a 40°C durante 24 horas, previo a ser sometidas a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras en un gel de acrilamida al 15%.

La Figura 8, representa el patrón electroforético de la degradación de las Hb bovina y Hb de pared de *Ascaris* por parte de la proteasa purificada, en una relación de peso 2:1 (3,6 μ g hemoglobina: 1,8 μ g enzima). El bolsillo 3 contiene Hb bovina; el bolsillo 4 contiene Hb bovina más la proteasa (Pool 3 Matrex-blue); el bolsillo 5, contiene la mezcla de incubación más cisteína 1mM. Por otro lado, en el bolsillo 7 contiene la Hb de pared de *Ascaris*, y en el bolsillo 8, la Hb de *Ascaris* incubada con la proteasa purificada en presencia de cisteína (1mM). Los bolsillos 6 y 9 contienen la proteasa usada en estos estudios.

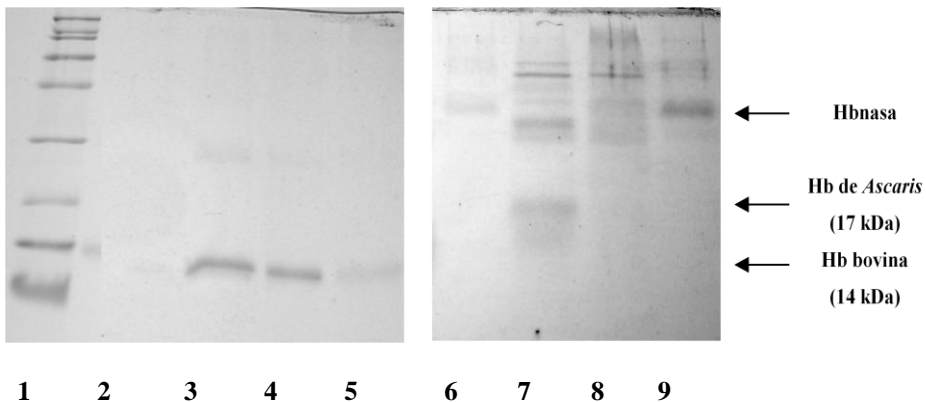


Figura 8. Degradación de la hemoglobina bovina y de la Hb de pared de *Ascaris* por la hemoglobinasas purificada. La mezcla de degradación fue incubada a 40°C por 24 horas. La reacción se detuvo añadiendo el buffer de muestra para SDS-PAGE. En los bolsillos: 1. Standard de amplio rango; 2. Hbnasa (1,8 μ g); 3. Hb bovina 3,6 μ g; 4. Hb bovina (3,6 μ g) + Hbnasa (1,8 μ g); 5. Hb bovina (3,6 μ g) + Hbnasa (1,8 μ g) + Cisteína 1mM; 6. Hbnasa (1,8 μ g); 7. Hb *Ascaris* (3,6 μ g); 8. Hb *Ascaris* (3,6 μ g) + Hbnasa (1,8 μ g) + Cisteína

1mM; 9. Hbnasa (2 μ g). La corrida electroforética se realizó en geles de poliacrilamida al 15%.

En el gel mostrado en la Figura 8, se observó una leve disminución en la intensidad de la banda de 14 kDa de la Hb bovina cuando fue incubada con la proteasa no tratada con cisteína (bolsillo 4); y la banda disminuyó casi por completo, cuando la mezcla de incubación contenía a la proteasa tratada con cisteína, bolsillo 5. Este comportamiento indica una vez más que la enzima purificada es del tipo cisteín proteasa.

De la misma manera, la banda de 17 kDa de la Hb de pared de *Ascaris* desaparece cuando a la mezcla de incubación se le añade la cisteína (bolsillo 8). Con lo que se concluye que la hemoglobinasa purificada de 43 kDa es capaz de degradar la Hb de pared del propio parásito y la Hb bovina.

DISCUSIÓN

La cromatografía en DEAE-Celulosa del citosol de células musculares del adulto *Ascaris suum* (Fig. 1) permitió aislar cuatro picos con actividad hemoglobinasa estimulada por cisteína, indicando el predominio de tiol proteasas como ha sido descrito para las proteasas secretadas por *Fasciola hepática* (Dalton y Heffernana. 1989).

El pico 2 de DEAE-Celulosa contenía la mayor actividad hidrolítica sobre hemoglobina bovina dependiente de cisteína. En este estudio se propuso purificar y caracterizar la banda responsable de la actividad hemoglobinasa contenida en este pico. Para ello se sometió el pico 2 a cromatografía de afinidad en una columna de Matrex-Blue (Fig. 2) que permitió asociar la actividad hemoglobinasa con una banda de 43 kDa (Fig. 3).

Con este procedimiento se logró purificar la enzima 54 veces y obtener una preparación aparentemente homogénea con una actividad específica de 36,6 unidades por miligramo de proteína y un rendimiento de 1,78 % (Tabla 1). La actividad hemoglobinasa de la proteasa purificada se incrementó 60 veces en presencia de cisteína lo que indica que la proteasa aislada es del tipo cisteín proteasa.

Los estudios de caracterización de la hemoglobinasa purificada de *Ascaris* permitieron asignarle a la enzima nativa un peso molecular de 86 kDa, y a su subunidad un tamaño de 43 kDa. Estos resultados indican que la Hbnasa de *Ascaris* es una proteína dimerica constituida por subunidades de aparentemente el mismo tamaño.

La actividad de la Hbnasa purificada es favorecida a pH fisiológico (Fig. 6) y a una temperatura de 40°C, condiciones que son propias del intestino delgado del hospedero donde el parásito reside, se desarrolla y reproduce. La cisteín proteasa purificada mostró un pH óptimo de 7,5 para la hidrólisis de hemoglobina, a diferencia de las catepsinas de *Schistosoma* que hidrolizan la Hb a un pH óptimo ácido (Becker *et al.* 1995; Dalton *et al.* 1996; Brady *et al.* 1999), y de otras cisteín proteasas del tipo hemoglobinasa que en su mayoría son ácidas (Sato *et al.* 1993; Choi *et al.* 2006).

Los estudios de especificidad de sustrato mostrados en la Figura 7, indican que los mejores sustratos para la actividad proteolítica de la Hbnasa son la Hb de pared de *Ascaris*, la Hb bovina y la mioglobina. No se observó actividad proteolítica con gelatina, y las actividades obtenidas con albúmina de suero bovino (BSA) y caseína representan el 20% y el 12% de la actividad obtenida a concentraciones iguales de proteína sustrato en el ensayo (2 mg). La proteasa mostró mayor actividad con la Hb de pared de *Ascaris* que la Hb bovina, a concentraciones iguales de ambas proteínas, siendo su actividad 2 veces mayor con la hemoglobina del parásito. Estos resultados apoyan la propuesta de que esta proteasa en el interior del organismo del parásito participa en la regulación de los niveles intracelulares de la Hb de pared. Es importante señalar que tanto la proteasa como el sustrato se encuentran en un mismo compartimiento subcelular, el citosol, facilitando así los procesos degradativos.

Adicionalmente, la Hb de pared, debido a la presencia de actividad Hbnasa en el citosol, puede tener un papel nutricional, ya que los péptidos producidos por la degradación de esta Hb pueden seguir siendo degradados por otras proteasas miembros de una compleja cascada enzimática, como ha sido señalado en otros parásitos como *A. caninum* (Williamson *et al.* 2004) y *S. mansoni* (Delcroix *et al.* 2006), y de esta manera contribuir a la nutrición y sobrevivencia del parásito.

El hecho de observar por SDS-PAGE (Fig. 8) una degradación completa de la banda de Hb de pared en presencia de cisteína sugiere que la Hbnasa de *Ascaris* puede ser una endopeptidasa, como ocurre con la proteasa ácida de 42 kDa purificada del adulto de *D. immitis*, capaz de degradar Hb y mioglobina (Sato *et al.* 1993).

Además, al no observarse en el gel de degradación de hemoglobina (Fig. 8), bandas que correspondan a péptidos menores o iguales a 6 kDa, de acuerdo con el estándar de aptotina (6,5kDa), es posible que la Hbnasa de *Ascaris* pueda actuar de manera similar a las catepsinas B1 y L1 de *S. mansoni* que degradan la hemoglobina en péptidos de pesos moleculares comprendidos entre 6 y menores de 16 kDa (Delcroix *et al.* 2006).

Estos estudios, permitieron asignarle un papel fisiológico a la Hb de pared, servir de fuente de aminoácidos para el parásito. Además, permitieron purificar y caracterizar la proteasa que es capaz de degradarla.

CONCLUSIONES

Este estudio permitió purificar y caracterizar una Hbnasa presente en el citosol de células musculares del adulto de *Ascaris suum*. El procedimiento desarrollado, nos permitió purificar la proteína 54 veces con una actividad específica de 36,6 unidades/mg. La proteasa purificada es un dímero de subunidades de 43 kDa. Es una cisteín proteasa capaz de hidrolizar Hb bovina a pH 7,5 porque su actividad fue inhibida por E-64 un 73% y estimulada por cisteína 60 veces. Los estudios de especificidad de sustrato de la Hbnasa purificada junto con los estudios de degradación de la banda de Hb empleando SDS-PAGE, demostraron que la mayor actividad y la mayor degradación se obtuvieron con la Hb purificada del mismo parásito. La degradación de la Hb de pared corporal por la hemoglobinas de *Ascaris* permite identificar esta proteína como un sustrato endógeno para la Hbnasa de *Ascaris* y asignarle por primera vez un papel nutricional a esta hemoglobina.

AGRADECIMIENTOS

Al Decanato de Estudios de Postgrado de la Universidad Simón Bolívar (Estado Miranda, Venezuela) y al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) por haber financiado esta investigación.

LITERATURA CITADA

- BECKER, M.M., HARROP, S.A., DALTON, J.P., KALINNA, B.H., MCMANUS, D.P., AND PAUL J. BRINDLEY. 1995. Cloning and Characterization of the *Schistosoma japonicum* Aspartic Proteinase Involved in Hemoglobin Degradation. The Journal of Biological Chemistry. 270(41): 24496-24501.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantitative of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- BRADY, C.P., DOWD, A.J., BRINDLEY, P.J., RYAN, T., DAY, S.R., AND JOHN P. DALTON. 1999. Recombinant Expression and Localization of *Schistosoma mansoni* Cathepsin L1 Support its Role in the Degradation of Host Hemoglobin. Infection and Immunity. 67 (1): 368-374.
- BRINDLEY, P.J., KALINNA, B.H., WONG, J.Y., BOGITSH, B.J., KING, L.T., SMYTH, D.J., VERITY, C.K., ABBENANTE, G., BRINKWORTH, R.I., FAIRLIE, D.P., SMYTHE, M.L., MILBURN, P.J., BIELEFELDT-OHMANN, H., ZENG, Y., MCMANUS, D.P. 2001. Proteolysis of human hemoglobin by Schistosome cathepsin D. Mol. Biochem. Parasitol. 112 (1): 103-112.

- BROWN, A., BURLEIGH, J.M., BILLET, E.E., PRITCHARD, D.L. 1995. An initial characterization of proteolytic enzymes secreted by the adult stage of the human hookworm *Necator americanus*. *Parasitology*. 110: 555-563.
- CHOI, J-H., LEE, J-H., YU, H-S., JEONG, H-J., KIM, J., HONG, Y-C., KONG, H-H., AND DONG-IL CHUNG. 2006. Molecular and biochemical characterization of hemoglobinase, a cysteine proteinase, in *Paragonimus westermani*. *Korean Journal of Parasitology*. 44 (3): 187-196.
- DALTON, J.P. AND MARY HEFFERNANA. 1989. Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 35(2): 161-6.
- DALTON, J.P., SMITH, A.M., CLOUGH, K.A. AND P.J. BRINDLEY. 1995. Digestion of Haemoglobin by Schistosomes: 35 Years On. *Parasitology Today*. 11(8): 299-303.
- DALTON, J.P., CLOUGH, K.A., JONES, M.K., BRINDLEY, P.J. 1996. Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* 64 (4):1328-1334.
- DELCROIX, M., SAJID, M., CAFFREY, C.R., LIM, K.C., DVOŘÁK, J., HSIEH, I., BAGHAT, M., DISSOUS, C. AND JAMES H. MCKERROW. 2006. A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J. Biol.Chem.* 1-30.
- HAMADA, K., OKASAKI, T., SHUKUYA, R. AND KAZIRO, K. 1962. Hemoglobins from *Ascaris lumbricoides* I. Purification of Hemoglobin from Body-wall Tissue and Its Spectral Properties. *The Journal of Biochemistry*. 52(4): 290-296.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*. 227: 680-685.
- MCKERROW, J.H., CAFFREY, C., NELLY, B., LOKE, P., AND MOHAMMED SAJID. 2006. *Porteases in Parasitic Diseases*. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1: 497-536.
- MUNICIO, A.M. 1997. *Ciencias de la Naturaleza*. Volumen 6. Editorial Planeta. Barcelona (España).
- OSMAN, A. M. 2003. Barley and Malt Proteins and Proteinases: I. Highly Degradable Barley Protein Fraction (HDBPF), a Suitable Substrate for Malt Endoprotease Assay. *Journal of The Institute of Brewing*. 109 (2): 135-141.
- SAJID, M., J. M. MCKERROW. 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 120: 1- 21.
- SATO, K., NAGAI, Y., AND SUZUKI MAMORU. 1993. Purification and partial characterization of an acid proteinase from *Dirofilaria immitis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 58: 293 – 300.
- SAZ, H. AND LESCURE. 1969. The Functions of phosphoenol iruvate carbixikinase and malic enzyme in the anaerobic formation of succinate by *Ascaris lumbricoides*. *Com. Biochem. Physiol.* 30 (1):49-60.
- WILLIAMSON, A.L., LECCHI, P., TURK, B.E., CHOE, Y., HOTEZ, P.J., MCKERROW, J.H., CANTLEY, L.C., SAJID, M., CRAIK, C.S., LOUKAS, A. 2004. A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *J Biol. Chem.* 279(34):35950-7.
- YOO, J. IL, LEE, Y.S., SONG, CY., AND BONG SU KIM. 2004. Purification and Characterization of a 43-Kilodalton Extracellular Serine Proteinase from *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(2): 722-726.