

**ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL****PURIFICATION OF THE 28KDA CATHEPSIN L FROM *FASCIOLA HEPATICA*****PURIFICACIÓN DE CATEPSINA L DE 28 KDA DE *FASCIOLA HEPATICA***Luis Arias¹; G. Miryam López¹ & Alvaro Marcelo¹

¹Facultad de Medicina Humana, Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición "Alberto Guzmán Barrón", Universidad Nacional Mayor de San Marcos ²Facultad de Ciencias Biológicas-U.Nacional Mayor de San Marcos
Correo electrónico: biofalasclebr@hotmail.com

The Biologist (Lima), 13(2), jul-dec: 359-366 .

ABSTRACT

This work aims to isolate the 28KDa proteinase from the parasite *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). This cysteinyl protease was purified by classical methods such as the ammonium sulphate precipitation, G-25 and G-75 gel filtration chromatographies, affinity chromatography with thiol sepharose 4B and SDS-PAGE 12% electrophoresis. The enzymatic activity of Cathepsin L was monitored in each step of purification using a specific substrate. The cysteine proteinase was observed as a pure and homogenous band in the SDS-PAGE gel. The recovery percentage was 12.7%, with a specific activity of 337,500 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ and a purification factor of the enzyme of 260. Using this simple scheme of purification we purified to homogeneity the cathepsin L of 28KDa from the regurgitate in an effective way compared with other alternative methods. The amount of protein obtained was 0.032 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The enzyme showed as a homogenous band during the electrophoresis in polyacrylamide gel with 12.5% SDS-PAGE and the molecular weight was 28 kDa according to its relative mobility.

Key words: cathepsin L, chromatography, electrophoresis, *Fasciola hepatica*, proteinase.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo aislar la proteinasa de 28KDa a partir del parásito *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). Esta cisteinil proteasa fue purificada por protocolos clásicos tales como la precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de exclusión molecular G-25, G-75, cromatografía de afinidad tiol sefarosa 4B y electroforesis SDS-PAGE al 12 %, siendo monitoreada la actividad enzimática en cada etapa de la purificación. La cisteinil proteinasa se observó como una banda homogénea y pura en el gel SDS-PAGE, la cual tiene una recuperación de 12,7%, 337,500 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de actividad específica y un número de 260 veces de purificación de la enzima respecto del extracto crudo. Mediante este esquema se purificó la catepsina L de 28 KDA a partir del regurgitado de una manera efectiva comparado con otras alternativas. La cantidad de proteína obtenida fue de 0,032 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. La enzima migró como una banda homogénea durante la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS-PAGE al 12,5%, y el peso molecular determinado fue de aproximadamente 28 Kda de acuerdo a su movilidad relativa.

Palabras clave: catepsina L, cromatografía, electroforesis, *Fasciola hepatica*, proteinasa.

INTRODUCCION

La fasciolosis constituye un problema para la industria pecuaria y la salud pública en el país (Abarca 1989, Cabanillas, 1989, Aparicio 1991, Alvarado 1993, Aquize 1993, López 1997, Náquira 2000). La prevalencia de esta enfermedad es muy variada y, puede llegar desde de un 10% hasta un 90% de la población humana y del ganado infectado desarrollando cuantiosos gastos por pérdidas de vida y tratamiento (Atías 1991). En el Perú esta enfermedad ha llegado a tener índices alarmantes en las poblaciones ganaderas de la sierra del país (Sanchez 1986, Villanueva *et al.* 1996). Las catepsinas L son fundamentales para que el parásito pueda lograr éxito en su ciclo biológico y llegar al hígado donde se hace adulto (Barrett 1987, Hillyer *et al.* 1987, Rege *et al.* 1989, Chen & Mott 1990, Lopez *et al.* 1997). En un proceso de fasciolosis estas catepsinas L purificadas tienen un alto poder enzimático en esta enfermedad, faltando probar y analizar su potencial como vacuna y valor diagnóstico (Carmona *et al.* 1993, Smith *et al.* 1993, Smith *et al.* 1994, Wijffels *et al.* 1994, Beltran *et al.* 2004). El objetivo de este trabajo fue purificar la catepsinas L de 28 kDa de *Fasciola hepatica* con la finalidad de tener antígeno para posibles diagnósticos de fasciolosis en algunos casos erráticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este trabajo recurrimos a la bioquímica y su tecnología para aislar y purificar la catepsina L. El protocolo aplicado consistió en coleccionar parásitos adultos de *F. hepatica* conocida como duela o kallutaca voz aimara (Joel Flores Checalla; comunicación en personal) en el camal de Yerbateros de Lima, Perú (12°02'35'' LS, 77°01'42'' LW) y someterlos a choque osmótico a 37 °C donde se obtiene el regurgitado.

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas de las fracciones de la purificación fueron cuantificadas usando la técnica de Coomassie Blue (Bradford 1976) a 595 nm.

Determinación de actividad enzimática

La actividad enzimática de las fracciones de la purificación fueron cuantificadas con el método de Kamboj (1993) y Chavira *et al.* 1984. La actividad enzimática de las proteinasas utilizó N-CBZ-Phe-Arg-4 metoxi-β-naftilamida como sustrato específico de catepsina L y midiéndose el producto enzimático a 520 nm.

Etapa I. Obtención de material excretado / secretado (e/s).

A los parásitos adultos de *F. hepatica* obtenidos del camal, se les añadió un volumen de agua destilada. Se incubó en baño María (Scientific Precision) con agitación constante a 37°C durante 2 h. Se filtró el líquido a través de papel filtro añadiéndose fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 0,5 mM y ácido etilen diaminotetraacético (EDTA) 5 mM, antes de guardar en frasco oscuro a -20°C.

Etapa II. Fraccionamiento con sulfato de amonio 0-20%.

Al excretado/secretado se le adicionó sulfato de amonio previamente pulverizado en un matraz, en forma lenta; con agitación constante y en baño de agua helada (3°C) durante 30 min hasta llevar a la solución e/s a un 20 % de saturación. Se procedió posteriormente a centrifugar en la centrífuga Sorwall R2B a 8000 rpm a 4°C por un periodo de 30 min. Se cuantificó la actividad enzimática tanto en el precipitado como en el sobrenadante con el método de Kamboj *et al.* (1993) y se determinó la concentración de proteínas con el método de Coomassie Blue (Bradford 1976). El sobrenadante en su totalidad se llevó a la etapa III (Murray 1995).

Etapa III. Fraccionamiento con sulfato de amonio 20-55%.

Se adicionó sulfato de amonio pulverizado en agitación constante y en baño de agua helada (3°C) durante 40 min para llevar la solución a 55% de saturación. Se procedió a centrifugar en una Sorval R2B a 8000 rpm a 4°C por un periodo de 30 min. Se cuantificó la actividad enzimática tanto en el precipitado como en el sobrenadante con el método Kamboj *et al.* (1993) y se determinó la concentración de proteínas con el método Coomassie Blue (Bradford 1976). El sobrenadante en su totalidad se llevó a la etapa IV (Murray 1995).

Etapa IV. Gel filtración en Sephadex G-25.

A la muestra se le retiró sales de la precipitaciones con sulfato de amonio en la columna Sephadex G-25. El precipitado al 55% se pasó por una columna de Sephadex G-25 para separar proteínas por peso elevado y retirar las sales presentes producto de la etapa anterior de purificación.

Se empacó y calibró una columna con Sephadex G-25; se equilibró con buffer de inicio (Tris HCl 0,1 M; EDTA 1 mM; NaCl 0,5 M; úrea 6 M; PMSF 1 mM). Se adicionó a la columna 1 mL del extracto proteico al 55% (1,24 mg·mL⁻¹ de proteína). Las fracciones eluidas se colectaron en un colector de fracciones Advantec SF-2120 para cuantificar la concentración de proteínas y la actividad enzimática. Las fracciones con mayor actividad siguieron con el siguiente paso de purificación (Braithwaite & Smith 1985).

Etapa V. Cromatografía de afinidad tiol covalente.

Posteriormente se llevó a una columna de afinidad Thiol sepharose 4B específica para proteínas con grupo sulfidrilo. Las dimensiones de la columna fueron 5 cm de altura y 0,7 cm de radio. Se empacó el gel de tiol sepharose 4B en 3 mL, luego de activarla previamente. El gel se hidrató en agua aproximadamente 200 mL por g. Se suspendió

el gel en una solución conteniendo Ditioneitol (DTT) al 1%; bicarbonato de sodio 0,3M; EDTA disódico 1 mM y, pH 8,4. Dejándose reaccionar 40 min a temperatura ambiente, finalmente se empaca en la columna.

Se equilibró lentamente la columna con buffer «starting» (0,1M HCl; 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA; 6 M úrea a pH 7). Se adicionó 4 mL de la muestra, luego se le agregó 10 mL de buffer «starting». Posterior a ello se agregó 10 mL de buffer de equilibrio (0,05 M Tris- acetato: 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA a pH 4;6). Finalmente se agregó 25 mL de buffer de elución (0,1 M Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM PMSF; 20 mM L-Cys a pH 8). Las fracciones con más actividad enzimática pasan a la siguiente etapa de la purificación.

Etapa VI: Concentración con tubos de millipore.

Las fracciones con mayor actividad proteolítica fueron concentradas en las unidades de Millipore de 2 mL de capacidad en una centrífuga refrigerada a 2°C. Se colocaron en tubos Millipore, 2 mL de la muestra en un soporte para centrífuga y se llevaron a la centrífuga Sorwall con rotor SS-34 a 4°C por 40 min a 5000 rpm, del filtrado se analizó la concentración de proteínas y la actividad enzimática.

Etapa VII: Gel Filtración en Sephadex G-75.

Posteriormente, las fracciones concentradas fueron pasadas por una columna de exclusión molecular Sephadex G-75. Se empacó y calibró con estándares de peso molecular una columna con Sephadex G-75, en buffer acetato de sodio (0,1 M, NaCl 0,5 M, y pH 4,6). Se adicionó a la columna 1 mL del precipitado 55% (1,24 mg·mL⁻¹ de proteína). La elución se colectó para ser cuantificada en proteínas, así como la actividad enzimática. Las fracciones con mayor actividad se analizaron por electroforesis su pureza y homogeneidad.

Electroforesis en el gel de poliacrilamida con SDS

Todas las fracciones obtenidas durante la purificación fueron sometidas a electroforesis SDS-PAGE al 12,5% con Tinción de Plata (Laemli 1970, Wray *et al.* 1981, Andrews 1986).

porcentaje de recuperación del 12,7% a partir del extracto crudo (Tabla 1, Fig. 1). En la determinación de pureza y homogeneidad se observó que la enzima migró como una banda homogénea durante la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y el peso molecular determinado es de aproximadamente 28 KDa (Tabla 2, Fig. 2-3).

RESULTADOS

La catepsina L del excretado-secretado de *F. hepatica* fue purificada 260,471 veces con un

Tabla 1. Purificación de la Catepsina L de 28 KDa.

Etapas Purificación	Volumen mL	Proteínas mg·mL ⁻¹	Prot. Total mg	Actividad Enz. umol·mL ⁻¹ ·min ⁻¹	Act. Total umol·min ⁻¹	Act Specific umol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	Porcentaje Recuperación	N ^a veces Purificado
Regurgitado	200	0,656	131,200	0,850	170,000	1,296	100,000	1,000
Sobrenad. 20%	200	0,175	34,980	0,805	161,000	4,603	94,706	3,552
Precipit. 20%	11	8,260	90,860	0,453	4,983	0,055	2,931	0,042
Sobrenad. 55%	215	0,092	19,780	0,076	16,340	0,826	9,612	0,638
Precipit. 55%	13	1,240	16,120	10,500	136,500	8,468	80,294	6,535
Cromat. G25	2	0,600	1,200	40,300	80,600	67,167	47,412	51,837
Cromat. de afinidad	4	0,100	0,400	11,900	47,600	119,000	28,000	91,840
Concent. Millipore	1	0,350	0,350	46,000	46,000	131,429	27,059	101,432
Cromat. G75	2	0,032	0,064	10,800	21,600	337,500	12,7	260,47

Tabla 2. Estándares de proteínas y movilidad relativa.

Proteína estándares	Peso Molecular kDa	Movilidad relativa (Rf)
BSA	66	0,04
Ovoalbúmina	44	0,22
Pepsina	34	0,43
Anhidrasa Carbónica	29	0,6
Tripsina	24	0,7
Lisozima	14,3	0,9
Citocromo C	8,5	0,97

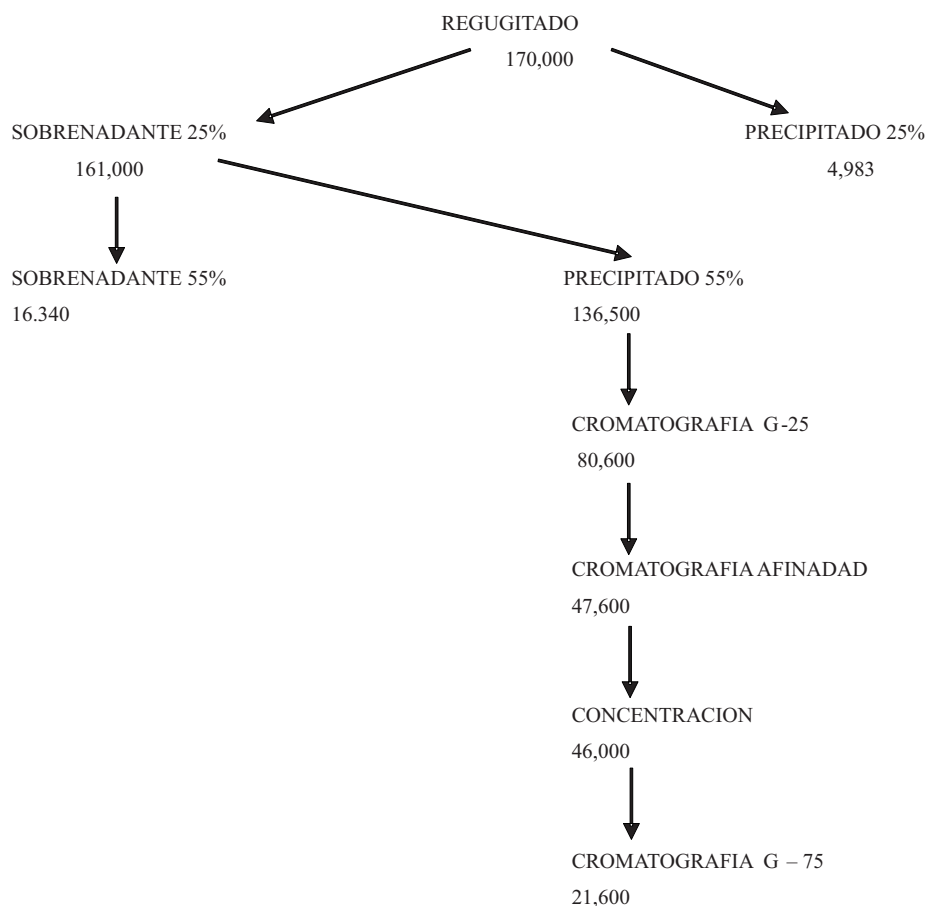


Figura 1. Purificación de catepsina l de 28kda. (Distribución de actividad total) Unidades = $\text{Umol}\cdot\text{min}^{-1}$.

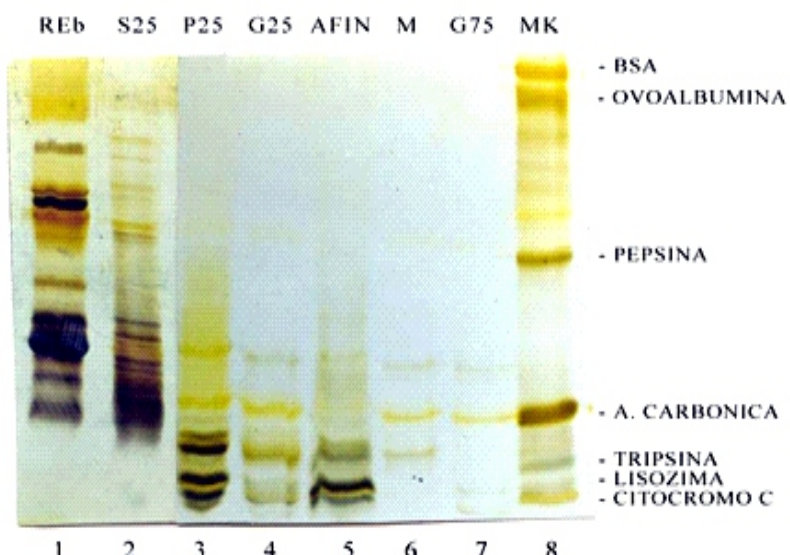


Figura 2. Electroforesis en cada etapa de purificación: Reb, regurgitado, S25 sobrenadante a 25% de saturación, P25 sedimento al 25%, G25 cromatografía con Sephadex G-25, AFin cromatografía de afinidad thiol sepharose, M Millipore, G-75 cromatografía G-75. Se utilizó en una microcomputer electrophoresis power supply, Consort.

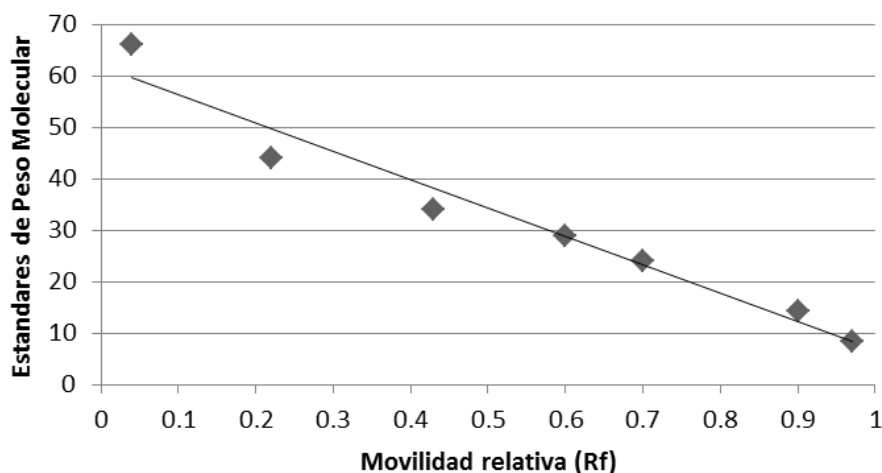


Figura 3. Calibración de estándares de proteínas en un gel al 12% con SDS. Se utilizaron como estándares a seroalbúmina bovina (BSA) de 66 kDa, ovoalbúmina de 44 kDa, pepsina de 34 kDa, anhidrasa carbónica de 29kDa, tripsina de 24 kDa, lisozima de 14,3 kDa y citocromo C de 8,5 kDa.

DISCUSIÓN

La enzima se localiza en los huevos (comunicación personal de Terry Spithill) y en las metacercarias de *F. hepatica*. La catepsina L pertenece a la superfamilia de la papaína. La papaína es una cisteinil proteasa, similar a la Catepsina L. Robinson *et al.* (2008) mencionan que la papaína de *Carica papaya* L. tiene un peso molecular de 23,4 KDa. Dos formas de Catepsina L han sido registradas para *F. hepatica*. Las proteinasas catepsinas L1 (29 KDa) y L2 (29,5 KDa) pueden ser el mecanismo principal por el cual estos parásitos penetran a los tejidos (Smith *et al.* 1993, Dowd *et al.* 1994). Con esta Catepsina L purificada es posible obtener anticuerpos específicos contra esta proteinasa para evaluación de las propiedades inmunológicas de esta proteína.

La purificación con thiol Sepharose es específica para tiol proteinasas si se compara el procedimiento con Sephadex G-100 donde se obtienen varias bandas de interés inmunológico (Antitupa *et al.* 2014). Estas enzimas pueden ser útiles en la producción de vacunas para ganado ovino y vacuno (Dalton *et al.* 2003). El estudio es conducente a obtener antígeno de diagnóstico contra fasciolosis en pacientes en Perú, pues antígenos de otras latitudes podrían dar otras reacciones cruzadas (Kuk *et al.* 2005).

AGRADECIMIENTOS

Fondo especial para el Desarrollo Universitario y CONCYTEC (Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica), subvención N°524S-07-94.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca-Soto, M. 1989. Incidencia de la *Fasciola hepatica* en 3 hospitales del Cuzco; Estudio Clínico epidemiológico, período comprendido Enero 79 – Diciembre 88 (Tesis Univ. Nac. San Agustín – Arequipa).
- Alvarado, C. 1993. *Incidencia de distomatosis hepatica en niños de edad escolar de la zona urbano y rural del Distrito de Tongod, Provincia. San Miguel – Cajamarca.* (Tesis Univ. Nac. de Cajamarca).
- Andrews, A.T. 1986. *Electrophoresis, Theory, Techniques an Biochemical and Clinical Applications.* Clarendon Press – Oxford.
- Antitupa, I.; Quispe, W.; Mayo, H.; Valverde, F. & Sanchez, E. 2014. Purificación de la fracción antigénica 27-28 kDa a partir del antígeno metabólico secretado/excretado de *Fasciola hepatica*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31:288-291.
- Aparicio-Martinez, W. 1991. *Distomatosis hepatica en la población humana en la zona endémica de la irrigación Asillo Azangaro – Puno.* (Tesis Univ. Nac. del Altiplano – Puno).
- Aquize-Palacios, C. 1993. *Determinación de las áreas endémicas a distomatosis en la campiña de Arequipa* (Tesis Univ. Nac. Altiplano – Puno).
- Atias, A. 1991. *Parasitología Clínica.* Publicaciones Técnicas Mediterranea LTDA: Tercera Edición.
- Barret, A.J. 1987. *Proteinases in mamalian cells and tissues.* Nort Holland Publishing Co. Researcer Monograpers in cell and tissue physiology. Vol 2. J.T. Dingle (Ed).
- Beltrán, M.; Tantalean, M.; Meza, H. & Lozano, M. 2004. *Fasciolosis errática.* *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 21: 278-279.
- Braithwaite, A. & Smith, F.J. 1985. *Chromatographic methods.* 4th ed. Chapman and Hall eds. N.Y. USA.
- Bradford, M. 1978. A Rapid and sensitive method the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 – 254.
- Cabanillas, N. 1989. *Fasciolosis en niños de las localidades de Sta. Rosa de Chaquil y Chaquil Pampa.* (Tesis Univ. Nac. Cajamarca).
- Carmona, C.; Andrew, J.; Dowd, A.; Smith, A. & Dalton, J. 1993. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62; 9-18.
- Chavira, R.; Burnett, T. & Hageman, H. 1984. Assaying proteinases with Azocoll. *Analytical Biochemistry*, 136, 446-450.
- Chen, M.G. & Mott, K.E. 1990. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection. *Bulletin tropical diseases*, 87: 1-38.
- Chick, B.F.; Coverdale, D.R. & Jackson, A. 1980. Production effects of liver fluke *Fasciola hepatica* infection in beef cattle. *Australian Veterinary Journal*, 56: 588 – 592.
- Dalton, J.P.; Neill, S.; Stack, C.; Collins, P.; Walshe, A.; Sekuya, M.; Doye, S.; Mulcahy, G.; Hoyle, D.; Khaznadil, E.; Moiré, N.; Brennan, G.; Mousley, A.; Kreshchenko, N.; Maule, A.G. & Donnely, S. 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-Like proteases: Biology, function and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology*, 33:1173-1181.
- Dowd, A; Smith, A; McGonigle, S & Dalton, J. 1994. Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode

- Fasciola hepatica*. European Journal of Biochemistry, 223: 91-98.
- Hillyer, V.; EL Tahir, M.; Haroun, M.; Hernandez, A. & Soler, M. 1987. Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 37: 363-369.
- Kamboj, R.C.; Pal, S.Z.; Raghav, N. & Singh, H. 1993. A selective colorimetric assay for cathepsin L using Z – Phe-Arg-4-Metoxo-B-Naphthylamide. Biochem, 75: 873–878.
- Kuk, S.; Kaplan, M.; Ozdarende, A.; Tonbok, S.; Felek, S. & Kalkan, D. 2005. *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 from a Turkish isolate is related to asiatic isolate is related to asiatic isolates. Acta Parasitologica, 50: 244-248.
- Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- Lopez, M.; Zerda, K.; Bjercke, R.; Naquira, C. & Guerra, H. 1997. Major *Fasciola hepatica* antigen are mainly localized within the digestive tube of the adult. Parasitología al día, 21: 104-108.
- Murray, J. 1995. *Methods in enzymology*. vol 182. *Guide to protein purification*. Academic Press. 894 p.
- Naquira, C. 2000. Fasciolosis. Diagnóstico, 39:187-188.
- Rege, A.; Herrera, P. & Lopez, M. 1989. Cysteine proteinase from *Fasciola hepatica* adult worms. Molecular and biochemical parasitology, 35: 89-96.
- Robinson, MW, Tort, JF, Lowther, J, Donnelly, SM, Wong, E, Xu, W, Colin, MP, Padula, M, Herbert, B & Dalton, J 2008. Proteomics and phylogenetic analysis of the Cathepsin L Protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: Expansion of a repertoire of virulence . Molecular Cell Proteomics, 7:1111-1123.
- Sanchez-Cabrera, C. 1986. *Infección por Fasciola hepatica en hígados de Bovinos (Bos Taurus) sacrificados en el camal municipal de Cajamarca* (tesis Univ. Nac. de Cajamarca).
- Smith, A.; Dowd, A.; Conigle, S. & Keegan, P. 1993. Purification of cathepsin L like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica* Molecular and Biochemical Parasitology, 62: 1-8.
- Smith, A. Carmona, C.; Dowd, A.; Gonigle, S. Acosta & D.; Dalton, J. 1994. Neutralization of activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anticathepsin L antibodies. Parasite Immunology, 16: 325–328.
- Villanueva, J.; Caceres, C. & Lloja, L. 1996. Frecuencia de fasciolosis en *Bos taurus* llegados al camal municipal de Tacna - Perú. Boletín Peruano de Parasitología, 12: 68 pp.
- Wijffels, G.; Panaccio, M.; Salvatore, L.; Wilson, L.; Walker, I. & Spithill, T. 1994. The secreted cathepsin L like proteinases of the trematode *Fasciola hepatica* contain 3-hydroxyproline residues. Biochemical Journal, 299: 781-790.
- Wray, W.; Boulikas, T.; Wray, V. & Hancock, R. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, 118: 197-203.

Received September 8, 2015.

Accepted December 9, 2015.