



Universidad de Granada

Facultad de Farmacia

Departamento de Parasitología

“EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEASA Y DE LA FIJACIÓN DE CO₂
DURANTE EL DESARROLLO *IN VITRO* DE *Hysterothylacium aduncum*
(NEMATODA: ANISAKIDAE), PARÁSITO DE PECES”



ugr

Universidad
de Granada

David Malagón Martínez

Tesis doctoral
(Diciembre 2007)

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Parasitología

“Evolución de la actividad proteasa y de la fijación de CO₂ durante el desarrollo *in vitro* de *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae), parásito de peces”

Directores de la Memoria de Tesis Doctoral:

Dr. Francisco Javier Adroher Auroux Dr. Manuel Díaz López Dra. Rocío Benítez Rodríguez

Memoria que presenta el Licenciado en Bioquímica David Malagón Martínez para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada:

Diciembre 2007

FRANCISCO JAVIER ADROHER AUROX, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada,

MANUEL DÍAZ LÓPEZ, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biología Aplicada de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Almería, y

ROCÍO BENÍTEZ RODRÍGUEZ, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **“Evolución de la actividad proteasa y de la fijación de CO₂ durante el desarrollo *in vitro* de *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae), parásito de peces”** ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada y el Departamento de Biología Aplicada de la Universidad de Almería por DAVID MALAGÓN MARTÍNEZ, Licenciado en Bioquímica por la Universidad de Granada, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Dr. Francisco Javier Adroher Auroux Dr. Manuel Díaz López Dra. Rocío Benítez Rodríguez

Granada, Diciembre 2007

Agradecimientos

“No os obstinéis en descubrir algo práctico. Si no lo conseguís, los que os siguen lo lograrán. Vosotros sólo preocupaos de indagar y soñar.”

John D. Rockefeller (Neva York, 1901), a los científicos presentes en el acto de inauguración del *Rockefeller Institute*, hoy Universidad.

Alguien dijo alguna vez “Sólo al final se sabe por donde había que empezar”, y bien cierto que es esto. Esta ha sido la constante para cada periodo durante la realización de este trabajo, y que al final, ha visto la luz. Y obviamente esto no hubiese concluido de no haber sido por la pertinaz ayuda de mis directores, Javier, Manolo y Rocío, que han tenido que sufrir mi tranquilidad y constantes reservas. Les agradezco enormemente su ayuda y consejos.

Igualmente se lo agradezco a mis padres y a mi hermana, que siempre han estado ahí, apoyándome continuamente sin reservas y que sin ellos esto tampoco hubiera concluido nunca. GRACIAS.

En este tiempo han ocurrido también muchos sucesos, han desaparecido personas a mi alrededor o han sufrido accidentes, un recuerdo para todos. Durante este periodo se crece no sólo en lo académico y profesional, sino también en lo personal, tanto en lo formal, como en lo informal, si, puedo decir que he crecido mucho como persona, gracias a mi y a todas las personas que me han rodeado en este viaje:

un recuerdo muy especial para Sheila, que ha estado ahí, para todo, desde casi el principio hasta casi el final (*^_^*).

a mis mentores Javier y Rocío/Rocío y Javier, a Marga por sus enseñanzas y su estupendo humor, a Luis (Iglesias) por sus enseñanzas su ayuda y su tiempo largos y desinteresados, a Cristina por su tiempo y ayuda, a José Antonio por sus enseñanzas, su tiempo, su ayuda y su buen humor, a Ignacio por su tiempo y enseñanzas, a Pili por su tiempo, a Fran por su tiempo y su “extraño” humor, a Antonio, a M^a Helena y a Paco, a M^a Jesús, a Isa por su ayuda, a Gerardo y a toda la gente de Cádiz, a Alberto Vargas por su tiempo que está hecho de oro y enseñanzas así como por su tutelaje, a Rafael Salto, a Laura y Natalia por su ayuda y disponibilidad siempre presentes (y amabilidad), a Joaqui por sus enseñanzas, su tiempo y su buen humor, a Luis E. (Hueli) por su tiempo, sus enseñanzas, su extremado humor y ayudarme a

comprender mejor las nuevas tecnologías esas, a Adela por su tiempo y enseñanzas y más enseñanzas, a Santiago por su excelente memoria, profesionalidad y puntualidad, a Victor por sus enseñanzas y su tiempo, a Inma por su enseñanzas, a Pepa por sus enseñanzas, a Carmen por su tiempo y amabilidad y Amparo por su tiempo y enseñanzas, a Marina por sus enseñanzas, a Paco por sus enseñanzas, a los que se incorporaron después: Sergio, Manolo y M^a Carmen para que no desesperen, a mi fugaz compañero de laboratorio Guillermo por su tiempo, ayuda y amistad, a toda la gente de Almería incorporada a última hora, en especial a Manolo por su invitación, sus enseñanzas y su tiempo que vale oro, a Toñi por su tiempo y ayuda, a Carmen por su tiempo y ayuda, a Enric por su tiempo y buen humor, a Manuela por su ayuda, a Fran por su tiempo y ayuda, a Javi por su tiempo, ayuda y amistad, a Bea por su tiempo, su especial ayuda y su amistad. Otro recuerdo especial para Miguel, Poncho, Alfonso y Loli, que me han ayudado mucho y me han ofrecido su amistad. Un recuerdo también para Jaime, Pablo, Carmen, Elisa y Eva por su ayuda, M^a Carmen y Gema. A Mariano Valderrama e Hilario Rodríguez por sus inestimables ayudas.

A los que siempre estuvieron ahí y “por ahí”, que no son otros que Raúl, Jorge, Antonio, David y Talum, y otros Davides, los cuales me han instruido especialmente en el aspecto “informal”.

Y a Mari Carmen, la última incorporación de todas, pero no por ello su ayuda ha sido menor.

GRACIAS A TODOS

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la beca predoctoral del Programa de Formación de Personal para la Investigación y el Desarrollo Agroalimentario y Pesquero de Andalucía, de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, por resolución de 23 de agosto de 2002 de la Dirección General de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, y a la subvención del INIA al proyecto ACU01-027.

ÍNDICE

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Justificación	3
Objetivos	4

II. INTRODUCCIÓN

Introducción.....	7
1. Clasificación taxonómica de <i>Hysterothylacium aduncum</i>	8
2. Distribución de <i>Hysterothylacium aduncum</i>	12
3. Ciclo de vida de <i>Hysterothylacium aduncum</i>	12
4. Problemática que representa <i>Hysterothylacium aduncum</i>	16
4.1. Para la acuicultura	16
4.2. Para el consumo humano.....	16

III. ANTECEDENTES

1. Nutrición en nematodos.....	19
1.1. Sistemas implicados en la nutrición	19
1.1.1. Sistema de excreción/secreción	20
1.1.2. Sistema digestivo	21
1.1.2.1. Boca y esófago.....	21
1.1.2.2. Intestino	22
1.1.2.3. Recto y ano.....	23
1.2. Digestión y absorción en nematodos	23
2. Las proteasas y sus funciones en los nematodos	26
2.1. Clasificación y nomenclatura de las proteasas.....	29
2.2. Proteasas aspárticas	34
2.3. Cisteín proteasas	35
2.3.1. Catepsinas cisteínicas B y L.....	36
2.3.1.1. Catepsina B	37
2.3.1.2. Catepsina L	37
2.4. Metaloproteasas	38
2.5. Serín proteasas	40
2.6. Inhibidores de proteasas en nematodos parásitos.....	40

3. Catabolismo glucolítico y fijación de CO ₂	42
3.1. La relación PK/PEPCK.....	45
3.2. Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), EC: 4.1.1.32.....	48
3.3. Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), EC: 4.1.1.31.....	48
3.4. Malato deshidrogenasa (MDH), EC: 1.1.1.37.....	48
3.5. Enzima málica (EM), EC: 1.1.1.39.....	49
3.6. Piruvato carboxilasa (PC), EC: 6.4.1.1.....	50
3.7. Piruvato quinasa (PK), EC: 2.7.1.40.....	50
3.8. Lactato deshidrogenasa (LDH), EC: 1.1.1.27.....	50

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico.....	55
1.1. Aislamiento e identificación de los parásitos.....	55
1.2. Axenización de los parásitos.....	55
2. Cultivo de <i>Hysterothylacium aduncum</i>	56
2.1. Medio de cultivo.....	56
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de los parásitos.....	57
2.3. Tratamiento aplicado a los parásitos para los experimentos de actividad proteolítica.....	59
2.4. Tratamiento aplicado a los parásitos para los experimentos de fijación de CO ₂	60
3. Obtención del extracto soluble de <i>Hysterothylacium aduncum</i>	60
3.1. Obtención del extracto soluble para los experimentos de actividad proteolítica.....	60
3.2. Obtención del extracto soluble para los experimentos de fijación de CO ₂	62
4. Determinación de la actividad enzimática para los experimentos de actividad proteolítica.....	62
4.1. Curva de pH para la actividad proteasa general con un sustrato fluorógeno.....	62
4.2. Ensayos de inhibición a distintos pH con un sustrato fluorógeno general para proteasas.....	65
4.3. Curvas de pH con sustratos fluorógenos específicos para catepsinas B (EC: 3.4.22.1) y B/L (EC: 3.4.22.15).....	68
4.4. Curva de pH con un sustrato fluorógeno para colagenasas.....	70

4.5. Ensayos de inhibición a pH óptimo con un sustrato fluorógeno general para colagenasas	72
4.6. Electroforesis (zimograma).....	74
5. Determinación de la actividad enzimática para los experimentos de fijación de CO ₂ 76	
5.1. Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), EC: 4.1.1.32.....	76
5.2. Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), EC: 4.1.1.31	77
5.3. Malato deshidrogenasa (MDH), EC: 1.1.1.37.....	78
5.4. Enzima málica (EM), EC: 1.1.1.39.....	79
5.5. Piruvato carboxilasa (PC), EC: 6.4.1.1.....	80
5.6. Piruvato quinasa (PK), EC: 2.7.1.40.....	81
5.7. Lactato deshidrogenasa (LDH), EC: 1.1.1.27	82
6. Análisis estadístico	84

V. RESULTADOS

1. Actividad proteolítica en <i>Hysterothylacium aduncum</i>	89
1.1. Actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína.....	89
1.1.1. Larva 3 recién aislada del hospedador (L3 0h)	89
1.1.2. Larva 3 de 48 horas de cultivo (L3 48h).....	90
1.1.3. Larva 4 (L4).....	92
1.1.4. Adulto juvenil (L5J)	94
1.1.5. Adulto (L5).....	96
1.1.6. Comparación estadística de la actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína entre los grupos	98
1.1.6.1. Comparación en función de la pepsina.....	98
1.1.6.2. Comparación en función del ditioneitol (DTT).....	98
1.1.6.3. Comparación entre estados de desarrollo independientemente de pepsina y DTT.....	98
1.1.7. Actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína a lo largo del desarrollo de <i>H. aduncum</i> fijando el pH.....	99
1.1.7.1. pH 3,0	99
1.1.7.2. pH 4,0	102
1.1.7.3. pH 5,5	105
1.1.7.4. pH 7,0	108
1.1.8. Resumen de los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína	111

1.1.9. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína	112
1.2. Inhibición de la actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína mediante inhibidores específicos durante el desarrollo de <i>H. aduncum</i>	116
1.2.1. Inhibición a pH 3,0.....	116
1.2.1.1. Pepstatín A (pH 3,0).....	116
1.2.2. Inhibición a pH 4,0.....	118
1.2.2.1. Pepstatín A (pH 4,0).....	118
1.2.2.2. 1,10-fenantrolina (pH 4,0).....	120
1.2.2.3. E64 (pH 4,0).....	122
1.2.3. Inhibición a pH 5,5.....	124
1.2.3.1. Pepstatín A (pH 5,5).....	124
1.2.3.2. 1,10-fenantrolina (pH 5,5).....	126
1.2.3.3. E64 (pH 5,5).....	128
1.2.3.4. AEBSF (pH 5,5).....	130
1.2.4. Inhibición a pH 7,0.....	132
1.2.4.1. 1,10-fenantrolina (pH 7,0).....	132
1.2.4.2. E64 (pH 7,0).....	134
1.2.4.3. AEBSF (pH 7,0).....	136
1.2.5. Inhibición acumulada de cada tipo de actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína a lo largo del desarrollo de <i>H. aduncum</i> según el pH	137
1.2.5.1. pH 3,0.....	137
1.2.5.2. pH 4,0.....	140
1.2.5.3. pH 5,5.....	142
1.2.5.4. pH 7,0.....	144
1.2.6. Resumen de los datos obtenidos de inhibición de la actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína	146
1.2.7. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de inhibición de la actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína.....	147
1.3. Actividad proteolítica frente a Z-FR-AMC y Z-RR-AMC, para las catepsinas L y B	151
1.3.1. Z-FR-AMC.....	151
1.3.1.1. Larva 3 recién aislada del hospedador (L3 0h)	152
1.3.1.2. Larva 3 tras 48 horas de cultivo (L3 48h).....	153
1.3.1.3. Larva 4 (L4).....	155
1.3.1.4. Adulto juvenil (L5J).....	157
1.3.1.5. Adulto (L5).....	159
1.3.1.6. Comparación estadística de la actividad proteolítica frente a Z-FR-AMC entre los grupos	160
1.3.1.6.1. Comparación en función de la pepsina.....	160
1.3.1.6.2. Comparación entre estados de desarrollo independientemente de la pepsina.....	161

1.3.1.7. Actividad proteolítica frente a Z-FR-AMC a lo largo del desarrollo de <i>H. aduncum</i> fijando el pH.....	161
1.3.1.8. Resumen de los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a Z-FR-AMC	163
1.3.1.9. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a Z-FR-AMC	164
1.3.2. Z-RR-AMC	167
1.3.2.1. Larva 3 recién aislada del hospedador (L3 0h)	167
1.3.2.2. Larva 3 tras 48 horas de cultivo (L3 48h).....	168
1.3.2.3. Larva 4 (L4).....	170
1.3.2.4. Adulto juvenil (L5J)	172
1.3.2.5. Adulto (L5).....	174
1.3.2.6. Comparación estadística de la actividad proteolítica frente a Z-RR-AMC entre los grupos	175
1.3.2.6.1. Comparación en función de la pepsina.....	175
1.3.2.6.2. Comparación entre estados de desarrollo independientemente de la pepsina.....	176
1.3.2.7. Actividad proteolítica frente a Z-RR-AMC a lo largo del desarrollo de <i>H. aduncum</i> fijando el pH.....	176
1.3.2.7.1. pH 7,0	176
1.3.2.7.2. pH 7,5	178
1.3.2.8. Resumen de los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a Z-RR-AMC	180
1.3.2.9. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a Z-RR-AMC	180
1.4. Actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I.....	183
1.4.1. Larva 3 recién aislada del hospedador (L3 0h).....	183
1.4.2. Larva 3 tras 48 horas de cultivo (L3 48h).....	184
1.4.3. Larva 4 (L4).....	186
1.4.4. Adulto juvenil (L5J).....	188
1.4.5. Adulto (L5)	189
1.4.6. Comparación estadística de la actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I entre los grupos	190
1.4.6.1. Comparación en función de la pepsina	190
1.4.6.2. Comparación entre estados de desarrollo independientemente de la pepsina	191
1.4.7. Actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I a lo largo del desarrollo de <i>H. aduncum</i> fijando el pH.....	191
1.4.7.1. pH 6,5.....	192
1.4.7.2. pH 7,0.....	194
1.4.8. Resumen de los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I	196
1.4.9. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I	197
1.5. Inhibición de la actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I mediante inhibidores específicos durante el desarrollo de <i>H. aduncum</i>	200

1.5.1. 1,10-fenantrolina.....	200
1.5.2. AEBSF	202
1.5.3. E64.....	204
1.5.4. Inhibición acumulada de cada tipo de actividad proteolítica frente a DQ- colágeno tipo I a lo largo del desarrollo de <i>H. aduncum</i>	206
1.5.5. Resumen de los datos obtenidos de inhibición de la actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I.....	208
1.5.6. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de inhibición de la actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I	208
1.6. Electroforesis (zimograma de enzimas proteolíticas)	211
2. Fijación de CO ₂ durante el desarrollo de <i>Hysterothyliacium aduncum</i>	212
2.1. PEPCK (EC: 4.1.1.49)	212
2.2. PEPC (EC: 4.1.1.31)	213
2.3. MDH (EC: 1.1.1.37).....	214
2.4. EM (EC: 1.1.1.39)	214
2.5. PC (EC: 6.4.1.1).....	214
2.6. PK (EC: 2.7.1.40).....	215
2.7. LDH (EC: 1.1.1.27)	216
2.8. Fijación de CO ₂ medida	217
2.9. Relación PK/PEPCK.....	218
2.10. Resumen de los datos de AE obtenidos de enzimas relacionadas con la fijación de CO ₂	219
2.11. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de AE de las enzimas relacionadas con la fijación de CO ₂	220

VI. DISCUSIÓN

1. Actividad proteolítica durante el desarrollo de <i>Hysterothyliacium aduncum</i>	223
1.1. Actividad proteolítica general	223
1.1.1. Proteasas aspárticas	229
1.1.2. Metaloproteasas	231
1.1.3. Cisteín proteasas.....	235
1.1.4. Serín proteasas.....	236
1. 2. Actividad de las catepsinas L y B.....	237
1.3. Actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I	239

2. Catabolismo glucolítico y fijación de CO₂ durante el desarrollo de <i>Hysterothylacium aduncum</i>	241
---	------------

VII. CONCLUSIONES

Conclusiones.....	249
--------------------------	------------

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía.....	253
--------------------------	------------

ABREVIATURAS

- **ADP**: adenosina 5' difosfato
- **AE**: actividad específica
- **AEBSF**: fluoruro de 4-(2-aminoetil)sulfonilbenceno
- **Aenz**: actividad enzimática
- **AMC**: 7-amino-4-metil-cumarina
- **ATP**: adenosina 5' trifosfato
- **BODIPY**: 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indacina
- **c.s.p.**: cantidad suficiente para
- **DMSO**: dimetilsulfóxido
- **DTT**: ditioneitol
- **E/S**: excreción/secreción
- **EC**: *Enzyme Commission* (Comisión de Enzimas), perteneciente al Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB)
- **EM**: enzima málca
- **Em**: emisión
- **ES**: error estándar
- **Ex**: excitación
- **E64**: *trans*-epoxi-succinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano
- **GSH**: glutatión reducido
- **IDP**: inosina 5' difosfato
- **ITP**: inosina 5' trifosfato
- **IUBMB**: *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular)
- **K-W**: prueba de Kruskal-Wallis
- **LDH**: lactato deshidrogenasa
- **L2**: Larva 2
- **L3**: Larva 3
- **L3 0h**: Larva 3 de *Hysterothylacium aduncum* recién aislada del hospedador, con la que se inicia el cultivo
- **L3 48h**: Larva 3 de *H. aduncum* tras 48 horas en de cultivo
- **L4**: Larva 4, en *H. aduncum* obtenida tras 12 ó 15 días de cultivo
- **L5J**: Adulto juvenil de *H. aduncum* obtenido tras 21 ó 26 días de cultivo
- **L5**: Adulto de *H. aduncum* obtenido tras 42 ó 60 días de cultivo
- **MDH**: malato deshidrogenasa
- **M3**: tercera muda (paso de tercer a cuarto estadio larvario)
- **M4**: cuarta muda (paso de cuarto estadio larvario a adulto juvenil)
- **NAD⁺**: β-nicotinamida adenina dinucleótido
- **NADH**: β-nicotinamida adenina dinucleótido reducido
- **NADP⁺**: β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- **NADPH**: β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
- **OAA**: oxalacetato (ácido oxalacético)
- **Pi**: fósforo inorgánico en forma de fosfato (ácido ortofosfórico)
- **PAA**: poliacrilamida
- **PAGE**: *polyacrylamide gel electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida)
- **PC**: piruvato carboxilasa
- **PEP**: fosfoenolpiruvato
- **PEPCK**: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
- **Peps**: pepsina

- **PHEN:** 1,10-fenantrolina
- **PIPES:** ácido 1,4-piperazindietanosulfónico
- **PpA:** pepstatín A
- **PSA:** persulfato amónico
- **Sac:** sacarosa
- **SDS:** dodecil sulfato sódico
- **SBFI:** suero bovino fetal inactivado
- **TCA:** ácido tricloroacético
- **TEMED:** *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina
- **Tris:** tris(hidroximetil)-aminometano
- **TR-X:** Texas red (rojo Texas)
- **U.I.:** unidades internacionales
- **U M-W:** prueba de la U de Mann-Whitney
- **URF:** unidades relativas de fluorescencia
- **UV:** ultravioleta
- **Z-FR-MCA:** *N*- α -carboxibenzoil-L-fenilalanil-L-arginil-7-metil-cumarín amida (Cbz-Phe-Arg-MCA)
- **Z-RR-MCA:** *N*- α -carboxibenzoil-L-arginil-L-arginil-7-metil-cumarín amida (Cbz-Arg-Arg-MCA)
- **Z-XR-MCA:** Z-FR-MCA o Z-RR-MCA

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

Hysterothylacium aduncum es uno de los parásitos conocidos con mayor distribución en los ecosistemas acuáticos, sobre todo marinos, pero también tiene presencia en aguas continentales. Aparte de por su ubicuidad, también es muy importante su estudio por pertenecer a un grupo, el de los nematodos, que cuenta con el mayor número de especies identificadas, tras los insectos, y con miembros de una tremenda importancia médica, veterinaria y agrícola (Morris y Sakanari 1994), que hacen de este grupo uno de los más importantes de todos los animales parásitos, y pese a esta importancia, el conocimiento que tenemos sobre ellos no es suficientemente amplio.

Se ha demostrado que existe una gran mortandad entre larvas de arenque (*Clupea harengus*) de piscifactoria infestadas experimentalmente con *H. aduncum* (Balbuena et al., 2000), siendo también muy dañino sobre las larvas de bacalao (*G. morhua*) (Karlsbakk et al., 2001). Por otro lado *H. aduncum* supone un problema de cierta importancia para la acuicultura, sobre todo de salmónidos, bien introducido de forma natural en jaulas marinas (Carvajal et al., 1995) o posiblemente a través de la dieta en agua dulce (Berland 1987). Y aunque este parásito no suponga un grave daño para el pez, se cree que lo somete a un estrés que puede facilitar la colonización por otros organismos patógenos, reduciendo el rendimiento de estos cultivos marinos. Además de las implicaciones para la salud de los peces de cultivo, y las posibles pérdidas en la comercialización debido a ello, hay que sumarle que la infestación con *H. aduncum* también supone pérdidas por el incremento en el consumo de energía que supone la parasitación para el pez (González 1998) y que se traduce en un mayor consumo de alimento.

Hysterothylacium también ha sido relacionado con anisakidosis humanas (Yagi et al., 1996); (Norris y Overstreet 1976); (Overstreet y Meyer 1981) y alergias (Fernández-Caldas et al., 1998), relacionadas con el consumo de pescado.

La comprensión del proceso de la digestión proteica, una función muy importante en la biología de los nematodos, es aún pobre pues el conocimiento se compone de datos fragmentarios y en distintos grupos de nematodos. Se considera que las proteasas son esenciales durante los procesos de desarrollo y en los momentos más críticos de las interacciones parásito-hospedador, por lo que están directamente comprometidas con el crecimiento y supervivencia del parásito. Su identificación y caracterización son importantes para el conocimiento básico de la biología del parásito, y se puede inferir fácilmente su importancia para los nematodos parásitos como factores de virulencia. Debido a esto, las proteasas se contemplan como blancos potenciales para vacunas, fármacos y en el serodiagnóstico, y tendrán una gran importancia para las actuaciones y estrategias antiparasitarias que se desarrollarán en un futuro próximo (Tort et al., 1999; Knox et al., 2001; Dalton et al., 2003). A pesar de esto, en la

mayoría de los casos, las funciones fisiológicas precisas de las proteasas en los parásitos las desconocemos (Britton y Murray 2002).

La degradación de carbohidratos en los helmintos gastrointestinales sigue vías metabólicas poco habituales en el hospedador vertebrado (Barrett 1981a). La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la enzima málica parecen jugar un papel primordial en el metabolismo energético de parásitos tales como los ascaridoideos (*Ascaris suum*) (Van den Bossche y Borgers 1973; Landsperger y Harris 1976; Wilkes et al., 1981; Rohrer et al., 1986). Se sabe que algunas enzimas implicadas en estos procesos, como la enzima málica (Landsperger y Harris 1976), tienen propiedades diferentes a las del hospedador, por lo que se especula con su uso como blanco farmacológico. Por ello es interesante comprobar si en *H. aduncum* también se dan estos procesos, sirviendo de modelo para el estudio de otros anisákidos, especialmente teniendo en cuenta que en diversos nematodos gastrointestinales se ha observado la necesidad de CO₂ como estímulo para su desarrollo, al menos *in vitro* (Rogers 1960; Petronijević et al., 1985; Dávila et al., 2006). Todo ello, nos ayudará a conocer mejor las relaciones parásito-hospedador, siempre de gran importancia tanto desde un punto de vista biológico como a la hora de luchar contra cualquier tipo de parasitosis.

OBJETIVOS:

-Determinar la actividad proteolítica de *Hysterothylacium aduncum*, nematodo parásito de peces, su caracterización parcial y posibles funciones que pueda desempeñar durante el desarrollo *in vitro* desde la fase L3 procedente del pez hospedador intermediario/paraténico hasta adulto maduro.

-Determinar la actividad de las principales enzimas fijadoras de CO₂ implicadas en el metabolismo glucolítico y en la encrucijada del fosfoenolpiruvato (PEP) de *H. aduncum*, para conocer si el tipo de metabolismo de este nematodo es fermentador o fijador de CO₂ y la posible trascendencia del mismo durante el desarrollo *in vitro* desde la fase L3 procedente del pez hospedador intermediario/paraténico hasta adulto maduro.

II. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El término parásito deriva del latín *parasitus*, y éste a su vez del griego clásico *παράσιτος*, de *παρά* (junto a) y *σῆτος* (comida). Anteriormente se usó para referirse al huésped invitado a cenar y que posteriormente no abandonaba la casa del anfitrión, y también para una clase de sacerdotes que obtenían su comida a expensas de los bienes públicos (Clitodemus, en *Athenaeus Grammaticus*, ca. 378 a. de J.C.). Como se aprecia, es un término muy adecuado para denominar a un tipo de organismos cuya forma de vida estriba en establecer una relación con otros organismos consistente en beneficiarse de ellos usando al hospedador como hábitat y fuente de nutrientes resultando al final éste perjudicado.

El parasitismo es probablemente la forma de vida más extendida, y aunque casi ningún organismo nace parasitado, prácticamente todos los organismos están parasitados en alguna medida (Esch y Fernández 1993). En general, el parasitismo resulta ser un modo de vida tan exitoso que ha aparecido independientemente en virus, bacterias, hongos, plantas, protozoos y hasta en casi todos los fila de animales, desde invertebrados hasta cordados, habiendo surgido la parasitología de la necesidad de estudiar a los parásitos y entender sus relaciones con el hospedador.

El organismo objeto de este trabajo es *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802), un parásito nematodo de especies acuáticas, descrito desde hace dos siglos, pero aún existe cierta controversia sobre su sistemática. Durante muchos años ha sido considerado como un subgénero de *Contraecaecum*, pero Hartwich (Hartwich 1957) restablece el género *Thynnascaris* en base a que este último no tiene sistema excretor en forma de cinta, el poro excretor se encuentra situado a la altura del anillo nervioso, y la madurez sexual se produce en peces, y no en aves o mamíferos marinos como sucede en *Contraecaecum*. Deardorff y Overstreet (Deardorff y Overstreet 1980) recuperan la validez del género *Hysterothylacium*, considerando a *Thynnascaris* como sinónimo. Finalmente, Soleim (Soleim 1984) realizó un estudio exhaustivo en el que comparó la morfología de *Thynnascaris adunca* y *Contraecaecum spiculigerum*, llegando a la conclusión de que cada especie pertenecía a géneros diferentes.

Existen varias especies de *Hysterothylacium* conocidas, como son *H. aduncum*, *H. gadi*, *H. auctum*, *H. rigidum*, *H. cornutum*, *H. haze*, si bien *H. aduncum* y *H. gadi* están consideradas por algunos autores como dos subespecies de *H. aduncum*: *H. aduncum aduncum* y *H. aduncum gadi* (Petter y Cabaret 1995). *H. auctum* durante un tiempo fue considerada como la misma especie que *H. aduncum*, pero actualmente se contemplan como dos especies diferentes (Hartwich 1975; Petter y Cabaret 1995). La mayoría han sido encontradas en el Atlántico Norte, pero también en otros lugares como el Pacífico, como es el caso de *H. haze*, que se halló como agente etiológico de la gran mortandad provocada en poblaciones de un pez hospedador, *Acanthogobius flavimanus*, observada en la Bahía de Tokio durante el verano cuando la cantidad de oxígeno disuelta en el agua era baja (Takahashi et al., 1977).

1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Hysterothylacium aduncum*

Hysterothylacium aduncum es un invertebrado protóstomo pseudocelomado del filo *Nematoda* que se encuadra de la siguiente manera en la clasificación taxonómica propuesta por Anderson (Anderson 2000):

REINO: *Animalia*

FILO: *Nematoda*

CLASE: *Secernentea (=Phasmidia)*

ORDEN: *Ascaridida*

SUPERFAMILIA: *Ascaridoidea*

FAMILIA: *Anisakidae*

SUBFAMILIA: *Anisakinae*

GÉNERO: *Hysterothylacium*

ESPECIE: *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802)

Sinonimias: *Hysterothylacium aduncum*, *Thynnascaris adunca*, *Contraecum aduncum*, *Contraecum clavatum*, *Hysterothylacium gadi*, *Hysterothylacium auctum*.

Aparte de las características propias de los ascaridoideos, los anisákidos poseen caracteres morfológicos propios, como son el ventrículo, en ocasiones apéndice ventricular, en otras ocasiones ciego intestinal o ambos, sistema excretor asimétrico y los anillos cuticulares sin espinas (Hartwich 1974).

Figura 11. Larva 3 de *H. aduncum*. **A)** Parte anterior (AN: anillo nervioso; PE: poro excretor; ES: esófago; CI: ciego intestinal; V: ventrículo; AV: apéndice ventricular; I: intestino). **B)** Vista frontal de la parte anterior (P: papilas; LD: labio dorsal; D: diente; LV: labio ventral). **C)** Vista lateral de la parte anterior (P: papila; D: diente). **D)** Vista lateral de la parte posterior (I: intestino; G: glándula rectal; R: recto; A: ano; E: espina). Dibujos tomados de Petter y Maillard (Petter y Maillard 1988) por Iglesias (Iglesias 1999).

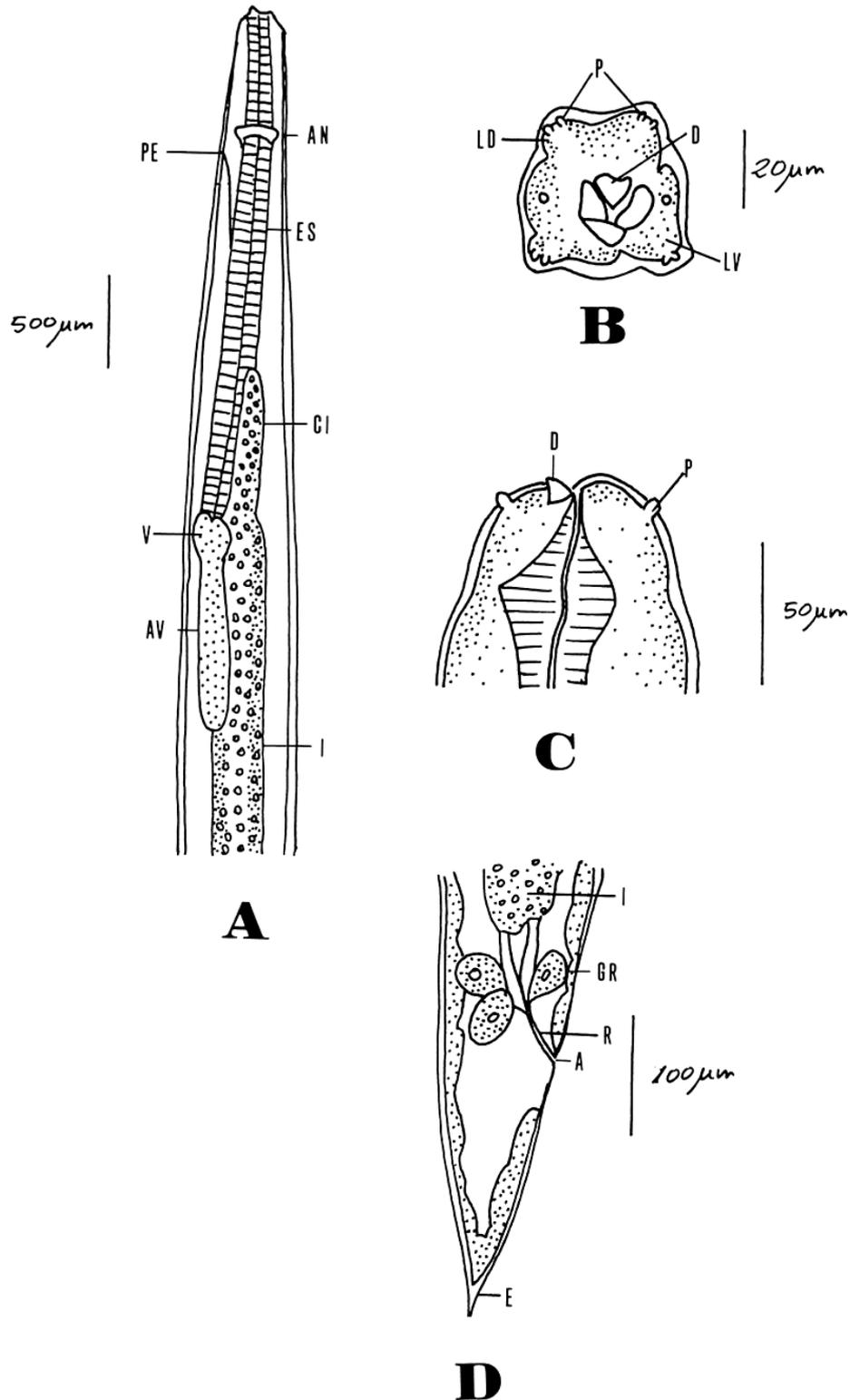


Figura 12. Larva 4 de *H. aduncum*. **A)** Parte anterior (AN: anillo nervioso; PE: poro excretor; ES: esófago; CI: ciego intestinal; V: ventrículo; AV: apéndice ventricular; I: intestino). **B)** Parte anterior, vista dorsal (LD: labio dorsal; P: papila). **C)** Parte anterior, vista ventral (LV: labios ventrales; P: papilas; IL: interlabio). **D)** Vista lateral de la parte posterior (I: intestino; G: glándulas rectales; R: recto; A: ano; M: mucrón). Dibujos tomados de Petter y Cabaret (Petter y Cabaret 1995) por Iglesias (Iglesias 1999).

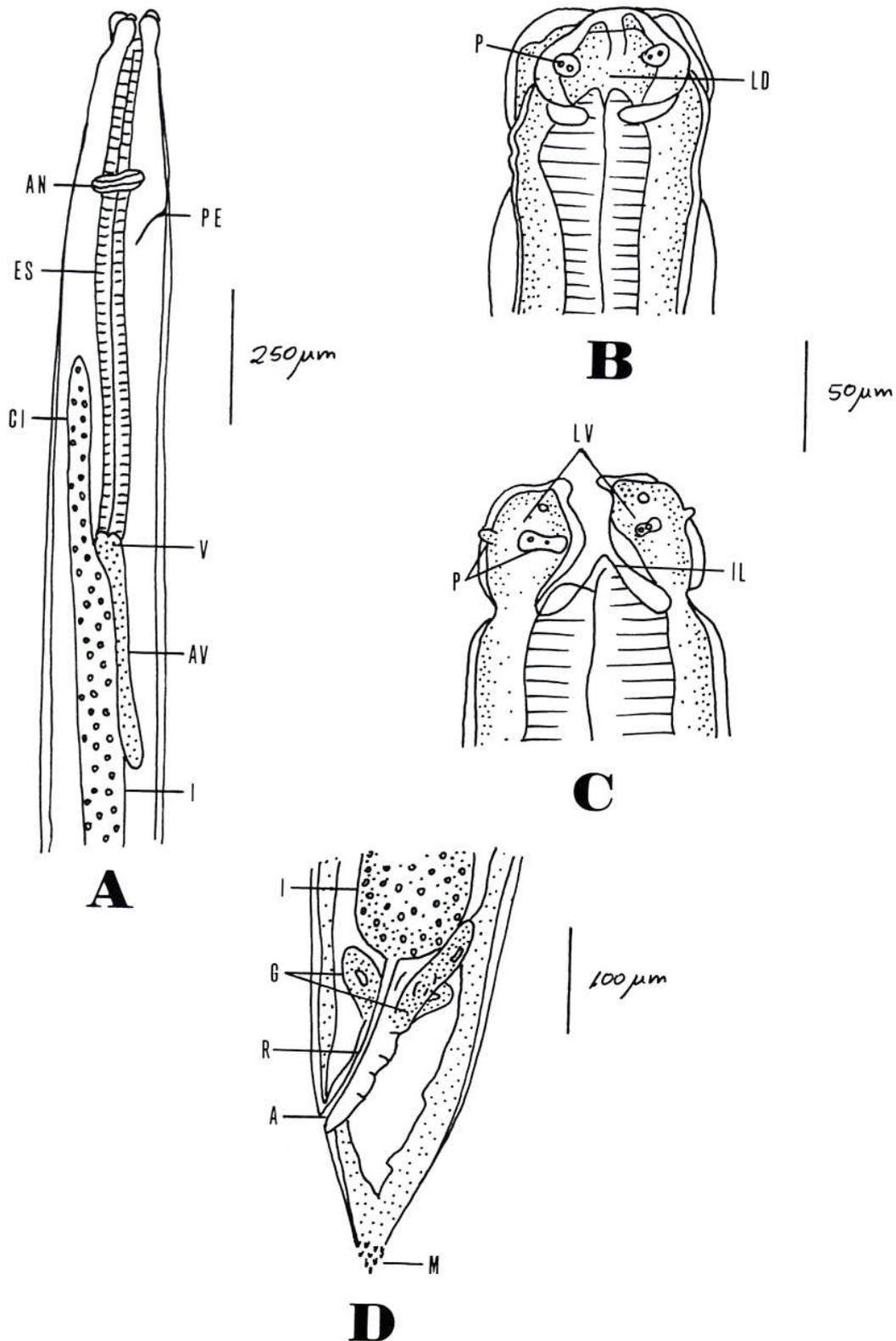
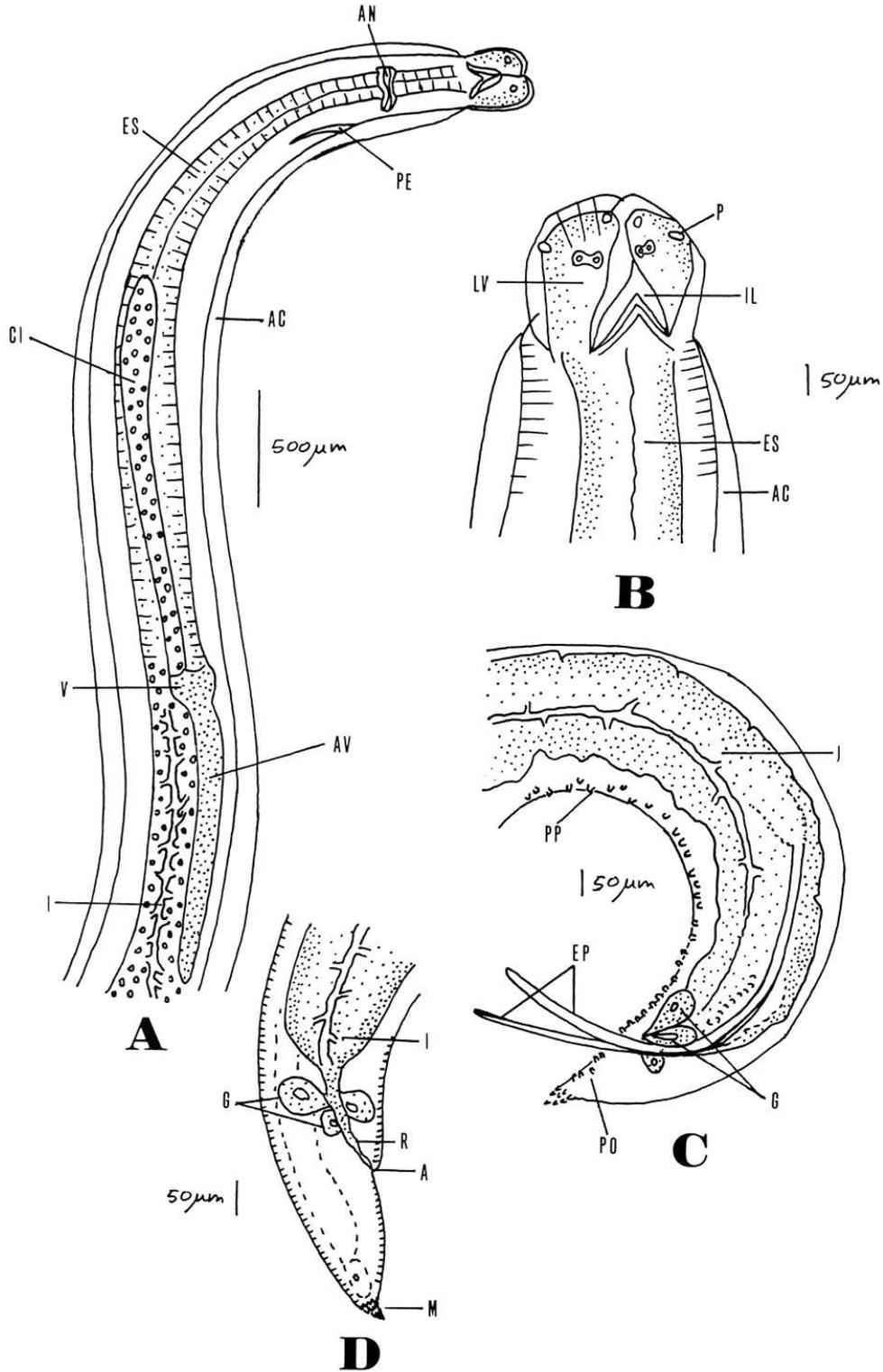


Figura 13. Adulto de *H. aduncum*. **A)** Parte anterior (AN: anillo nervioso; PE: poro excretor; ES: esófago; CI: ciego intestinal; V: ventrículo; AV: apéndice ventricular; I: intestino). **B)** Detalle de la parte anterior, vista ventral (P: papila; IL: interlabio; ES: esófago; AC: ala cervical; LV: labio ventral). **C)** Parte posterior, vista lateral (macho) (I: intestino; PP: papilas preanales; G: glándulas rectales; EP: espículas; PO: papilas postanales). **D)** Parte posterior, vista ventral (hembra) (I: intestino; G: glándulas rectales; R: recto; A: ano; M: mucrón). Dibujos tomados de González y Carvajal (González y Carvajal 1994) por Iglesias (Iglesias 1999).



2. DISTRIBUCIÓN DE *Hysterothylacium aduncum*

H. aduncum es un parásito nematodo perteneciente a un género ubicuo cuyo desarrollo en la naturaleza ocurre en un gran número de especies hospedadoras acuáticas, entre las que se encuentran muchos peces marinos teleósteos de aguas frías y templadas de todo el mundo e incluso de agua dulce (Moravec et al., 1985; Yoshinaga et al., 1987). Es uno de los helmintos con mayor distribución en los peces teleósteos del Atlántico Norte (Balbuena et al., 1998) y el nematodo parásito de peces más abundante del mar del Norte (Klimpel y Rückert 2005), aunque también se encuentra ampliamente distribuido en el hemisferio sur (Carvajal et al., 1995) hasta las aguas antárticas, en donde se han hallado adultos (Rocka 2006).

Diferentes autores han demostrado la presencia de estos nematodos en pescado de consumo frecuente. Estando algunos órdenes de gran importancia económica como por ejemplo clupeiformes, gadiformes, perciformes y pleuronectiformes entre los que se encuentran más ampliamente parasitados por estadios larvarios o adultos. *Clupea harengus* (arenque), *Engraulis encrasicolus* (boquerón), *Gadus morhua* (bacalao), *Merluccius merluccius* (merluza europea), *Merluccius australis* (merluza austral), *Scomber japonicus* (estornino), *Scophthalmus maximus* (rodaballo), *Lepidorhombus whiffiagonis* (gallo), son algunos ejemplos bien conocidos (Huang 1988; Petter y Maillard 1988; Sanmartín et al., 1989; Ruíz-Valero et al., 1992; Andersen 1993; Carvajal et al., 1995; Adroher et al., 1996; Navone et al., 1998; Moravec y Nagasawa 2000; Valero et al., 2000; Álvarez et al., 2002).

La parasitación parece depender de diversos factores como la especie hospedadora, la latitud o zona de captura, la época del año, la talla o edad del pez,... (Chenoweth et al., 1986; Andersen 1993; Adroher et al., 1996).

3. CICLO DE VIDA DE *Hysterothylacium aduncum*

Los adultos de *H. aduncum* ocupan el interior del intestino del pez hospedador definitivo. Las hembras ponen los huevos que salen junto con las heces del pez al medio acuático, normalmente el mar. En el interior del huevo tiene lugar el desarrollo del primer estadio larvario, L1, que proseguirá hasta alcanzar el segundo estadio larvario, L2. En primera instancia se pensaba que la L2, cubierta aún por la cutícula sin desprender de la L1, eclosionaba y podía vivir algún tiempo en el mar libremente hasta ser ingerida por un primer hospedador intermediario invertebrado, que suele ser mayoritariamente un crustáceo copépodo. En el hemocele de este hospedador alcanzaría el tercer estadio larvario, L3, aunque nunca se ha podido demostrar la muda M2 en el mismo y, por último, el hospedador definitivo se infestaría al ingerir al hospedador intermediario con la L3, que mudaría dos veces más hasta alcanzar el estado adulto en el intestino del pez hospedador (Hurst 1984).

Posteriormente se ha demostrado que el ciclo es mucho más complejo. Køie (Køie 1993) afirma que la larva que hay en el interior del huevo sin eclosionar está rodeada por dos cutículas, y eclosiona en forma de L3, pero Measures y Hong (Measures y Hong 1995) tras un estudio realizado mediante microscopía electrónica opinan que es la L2 rodeada por una sola cutícula la que eclosiona del huevo, por lo que no está totalmente dilucidado este punto.

En cualquier caso, tras la eclosión, un crustáceo es el primer hospedador intermediario obligado, ya que el parásito lo necesita para alcanzar un tamaño mínimo adecuado y ser infectivo para un hospedador vertebrado. Si el parásito alcanza en el crustáceo una talla superior a 3 mm será infectivo para los peces, especialmente para los gádidos, que son los principales hospedadores definitivos (Punt 1941; Berland 1961), en cuyo tracto digestivo llegará a adulto.

Cuando el hospedador es depredado por otro invertebrado o por un pez antes de que haya alcanzado la talla mínima para poder infestar al hospedador definitivo, la larva pasará a la cavidad corporal del nuevo hospedador para seguir creciendo como L3. este proceso se repetirá cuantas veces fuere necesario hasta que la L3 alcance el tamaño adecuado que le permita ser infectiva para el hospedador definitivo al ser ingerida por éste al depredar al hospedador que la alberga. En los peces que actúan como hospedadores intermediarios/paraténicos la L3 vive en los tejidos de la cavidad corporal que rodean al tracto gastrointestinal, encapsulada o no, en donde puede aguantar largos periodos de tiempo hasta ser ingerida por un hospedador definitivo.

La L3 de *H. aduncum* se ha encontrado tanto libre en el intestino como encapsulada en la cavidad corporal del hospedador definitivo. Esto puede parecer contradictorio, por lo que se ha postulado que si la L3 llega a su hospedador definitivo y ésta aún no ha alcanzado los 3 mm, la larva migra a la cavidad corporal. En la cavidad corporal se encapsula y aumenta de tamaño, alcanzando unos 2 cm en 2 meses, y regresa a la luz del tracto gastrointestinal ya con el tamaño necesario para poder desarrollarse hasta adulto. Andersen (Andersen 1993) piensa que el nivel de desarrollo de la L3 y la época del año en que la L3 es ingerida por el hospedador final, influyen en la localización de la larva en el mismo, y cree que son pocas las larvas que se desarrollan directamente en el tracto gastrointestinal.

Al final, el número de hospedadores que necesita el parásito durante su ciclo vital depende tanto de la talla que logre alcanzar dentro del hospedador como del propio tamaño del hospedador. El hospedador es determinante en cuanto que puede estar en un nivel primario de la red trófica y poseer un ciclo de vida corto al ser presa habitual de otros miembros de la misma situados en un nivel más alto. Por otro lado el tamaño del hospedador también puede limitar la talla que alcanza la larva dentro del hospedador. Ambos son elementos que van a influir en la consecución por parte de la larva de una talla mínima necesaria para infestar al hospedador definitivo. Estos y otros factores dan lugar a que el camino seguido hasta llegar al hospedador definitivo no sea siempre igual, variando la cantidad y el tipo de hospedadores que utiliza el parásito durante su ciclo vital. Debido a la ubicuidad del parásito y a que las condiciones en los

diferentes ecosistemas son muy variadas, en cada lugar el ciclo seguirá mayoritariamente uno u otro camino hasta llegar al hospedador definitivo.

Desde el punto de vista clásico, todos aquellos hospedadores en los que no ocurre ningún cambio de fase del desarrollo de un parásito no actuarán como hospedadores intermediarios (obligatorios para el desarrollo del parásito), sino como hospedadores de transporte o paraténicos (no obligatorios). La singularidad del ciclo de los anisákidos en general, y de *H. aduncum* en particular, de que la L3 salida del huevo debe pasar obligatoriamente por varios hospedadores sin cambiar de fase antes de ser infectiva para el hospedador final, conduce a un replanteamiento de las definiciones tradicionales de "hospedador intermediario". Pues en este caso, al menos hasta que alcanza la talla necesaria para la infestación del hospedador definitivo, la L3 puede pasar por varios hospedadores que son obligatorios, aunque no se dé ningún cambio de fase larvario (siempre como L3), por lo que muchos autores citan a estos hospedadores como intermediarios e incluso paraténicos, debido a la incapacidad de saber con certeza el papel que desempeña en cada caso dicho hospedador para el parásito.

El número de hospedadores invertebrados descritos para *H. aduncum* es muy grande, e incluye unas 100 especies entre las que encontramos sobre todo artrópodos (copépodos, mísidos, isópodos, anfípodos, eufasiídos, decápodos, cetonátaros), así como algunos ctenóforos, cnidarios y equinodermos (Marcogliese 1996).

Como ya hemos comentado en el apartado anterior (ver apartado II 2.) son muy numerosos los peces teleósteos marinos que pueden actuar como hospedador intermediario/paraténico de este parásito. Además parece que *H. aduncum* es capaz de completar su ciclo en agua dulce, pues se han encontrado larvas y adultos en invertebrados y peces de este hábitat. Se ha demostrado experimentalmente que los huevos fertilizados pueden eclosionar en agua dulce y las larvas se pueden desarrollar también en crustáceos dulceacuícolas, en concreto mísidos, pudiendo infestar peces de aguas continentales como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Yoshinaga et al., 1987; Rokicki 2005).

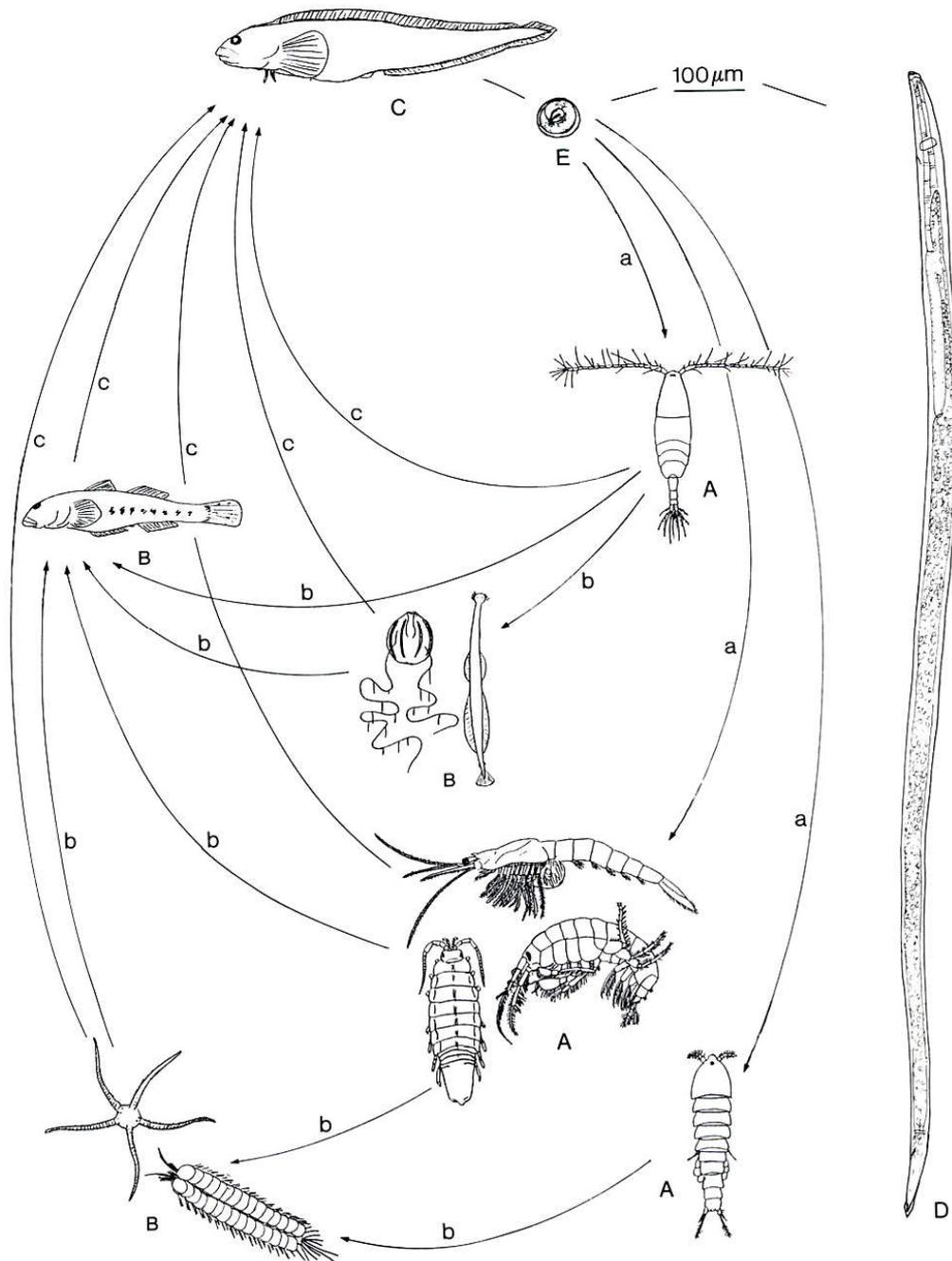


Figura 14. Ciclo de vida de *Hysterothylacium aduncum*. **A)** Primer hospedador intermediario. **B)** Segundo hospedador intermediario/paraténico. **C)** Hospedador definitivo. **D)** L3 de 1,5-2 mm dibujada a la misma escala que el huevo (**E**). **a**, infección del primer hospedador intermediario; L3, $\approx 300 \mu\text{m}$ de longitud; **b**, infección del segundo hospedador intermediario/paraténico, $\approx 0,5 \text{ mm} < \text{L3} < 1 \text{ mm}$? (estrellas de mar, poliquetos), $1,5-2 \text{ mm} < \text{L3} < 3 \text{ mm}$ (peces). **c**, infección del hospedador definitivo: $\text{L3} > 3 \text{ mm}$. Tomado de Køie (Køie 1993).

4. PROBLEMÁTICA QUE PRESENTA *Hysterothylacium aduncum*

4.1. Para la acuicultura

En las costas de Chile, *H. aduncum* se ha visto que es un parásito común con una incidencia creciente en cultivos con jaulas marinas, sobre todo de salmónidos (Carvajal et al., 1995), ya que a las implicaciones para la salud de los peces de cultivo y las posibles pérdidas en la comercialización debido a ello, hay que sumarle que la infestación con *H. aduncum* también supone pérdidas por el incremento en el consumo de energía que supone la parasitación para el pez (González 1998) y que se traduce en un mayor consumo de alimento. Y aunque estos autores no creen que este parásito suponga un grave daño para el pez, sí piensan que lo somete a un estrés que puede facilitar la colonización por otros organismos patógenos, reduciendo el rendimiento de estos cultivos marinos. Sin embargo, el estudio del efecto patógeno de la larva de *H. aduncum* sobre las larvas de arenque (*C. harengus*) en cultivos experimentales mostró una gran mortandad (Balbuena et al., 2000; Karlsbakk et al., 2003), siendo muy dañino también sobre las larvas de bacalao (*G. morhua*) en cultivo alimentadas con plancton obtenido de su medio natural (Karlsbakk et al., 2001). Utilizar como alimento plancton obtenido de su medio natural o una dieta húmeda a base de pescado son posiblemente las principales amenazas y fuentes de infestación de este nematodo para los cultivos de peces (Bricknell et al., 2006). En 1987 Berland (Berland 1987) atribuyó mortandad de trucha arco iris (*O. mykiss*) en cultivo a la presencia de *H. aduncum*, posiblemente introducido a través de una dieta de pescado sin desecar.

4.2. Para el consumo humano

Se ha discutido el papel de *H. aduncum* como agente potencial causante de anisakidosis (Petter 1969; Vermeil et al., 1975; Norris y Overstreet 1976; Overstreet y Meyer 1981; Huang 1988). En 1996, Yagi y colaboradores (Yagi et al., 1996) describieron por primera vez un caso de anisakidosis no invasiva por consumo de pescado crudo (bacalao – *G. morhua* – y salmón – *Salmo salar* –), debida a un adulto inmaduro de *H. aduncum* que fue evacuado en las heces. Los síntomas fueron dolor abdominal crónico y diarrea. Norris y Overstreet (Norris y Overstreet 1976), y Overstreet y Meyer (Overstreet y Meyer 1981) han relacionado dos larvas del género *Hysterothylacium* en sendas anisakidosis humanas. Además es posible que este parásito también sea responsable de reacciones alérgicas cuando se ingiere con el pescado (Fernández-Caldas et al., 1998).

III. ANTECEDENTES

1. NUTRICIÓN EN NEMATODOS

La bibliografía sobre los aspectos fisiológicos de la nutrición En *Hysterothylacium aduncum* y en anisákidos en general es muy escasa, por lo que restringirse a este grupo daría una visión muy sesgada del tema. A causa de esta limitación haremos una revisión de la situación en nematodos, principalmente sobre los nematodos parásitos. Incluso ampliando la visión al filo completo, no hay ninguna especie en la que se conozcan detalladamente alimentación, digestión y requerimientos nutricionales, por lo que quedan muchos aspectos por conocer sobre la nutrición en nematodos (Munn y Munn 2002).

1.1. Sistemas implicados en la nutrición

La gran variedad de hábitats que ocupan los nematodos está ligada a la diversidad de los tipos y modos de alimentación que presentan, lo que se ve reflejado en una serie de características anatómicas y comportamientos asociados, así como en los procesos digestivos y de absorción. En ocasiones, dentro de los nematodos, la ocupación de un nicho alimentario particular tiene implicaciones filogenéticas, como ocurre en los ascáridos.

En general, dependiendo de la especie, el alimento consiste en bacterias, algas, diatomeas, protozoos, hongos, otros nematodos, otros invertebrados, tejidos vegetales, savia, hemolinfa, sangre, fluidos y células de tejidos animales y contenidos intestinales. En algunos nematodos parásitos, los estadios larvarios pueden tener hábitos alimentarios completamente diferentes de los del estadio adulto, como *Haemonchus contortus*, en el que la larva se desarrolla libre y tiene formas de resistencia hasta que consigue infestar a un hospedador (Munn y Munn 2002) o al contrario, como ocurre en los mermitidos, en los que las larvas se desarrollan parasitando a otros invertebrados, principalmente insectos, mientras que los adultos viven de forma libre alimentándose de las reservas adquiridas (Platzer 1980).

Las principales estructuras implicadas en la alimentación de los nematodos son el sistema de excreción/secreción y el sistema digestivo.

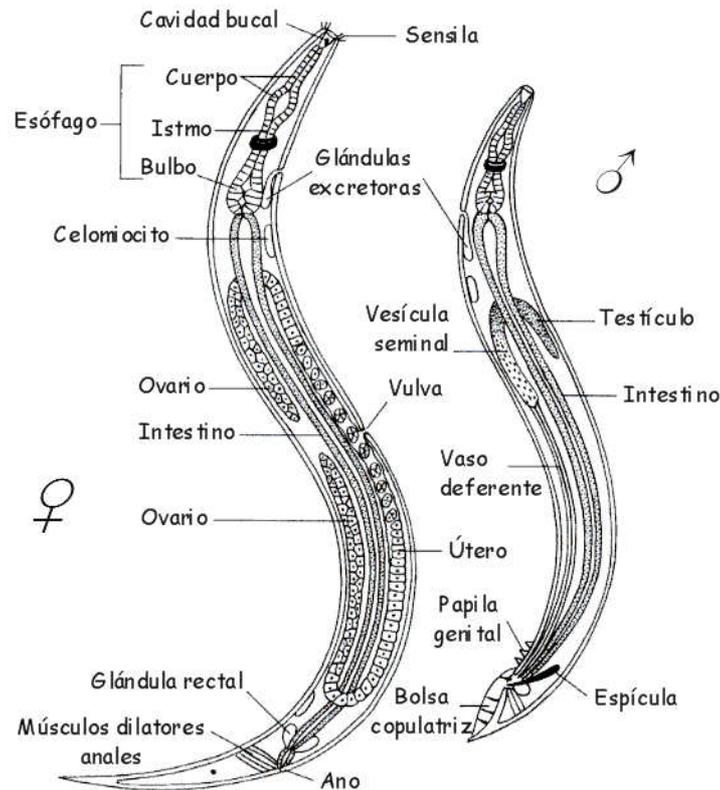


Figura A1. Esquema con las morfologías típicas de una hembra y un macho de un nematodo. Dibujos tomados de William Ober y Claire Garrison (Roberts y Janovy, Jr. 2005b).

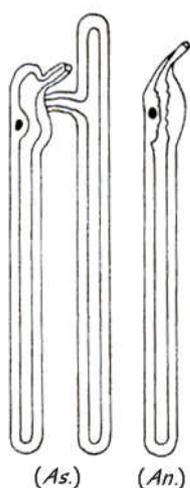
1.1.1. Sistema de excreción/secreción

El sistema de excreción/secreción (E/S) de los nematodos puede ayudarles en la alimentación al secretar enzimas digestivas. Cuando originariamente se describió el sistema de E/S se pensó que su función era la de secretar sustancias elaboradas y excretar desechos al medio externo. Sin embargo actualmente se piensa que sus funciones principales son las de secreción y osmorregulación, aunque las funciones pueden variar con la especie y con la fase de desarrollo. Algunos de los indicios que han llevado a pensar esto son que se ha visto en algunos nematodos como *Anisakis* sp. que la actividad enzimática de las estructuras asociadas al sistema de E/S es elevada y variada, habiéndose descrito numerosos tipos de enzimas (deshidrogenasas, aminopeptidasas, oxidorreductasas, esterasas, y fosforilasas) (Ruitenbergh y Loendersloot 1971b), lo cual está apoyado por estudios ultraestructurales del tejido de E/S (Lee et al., 1973) y otras evidencias, como el hecho de que la excreción se realice principalmente en el intestino. No obstante también existe excreción a través del sistema de E/S, pues se sabe que mediante este sistema se excreta CO₂ y diferentes ácidos orgánicos, entre otros productos.

Existen dos tipos básicos, glandular y tubular. Los glandulares son típicos de las formas de vida libre. Los tubulares adquieren diversas formas, y constan básicamente de dos canales laterales conectados por un canal transversal, el cual se abre al exterior por medio de un poro excretor, cuya situación en el nematodo tiene carácter taxonómico. En *H. aduncum* el poro excretor está situado a la altura del anillo nervioso, en el lateral del tercio anterior del parásito.

Con respecto a la secreción se liberan sustancias antigénicas, enzimas digestivas y enzimas para la muda de la cutícula. En el sistema de E/S de *Pseudoterranova decipiens*, tras ser estimuladas las células neurosecretoras, se libera una leucinoaminopeptidasa durante la ecdisis de la última muda (Davey 1968). En los tricostrongídeos, tanto las células de E/S como las glándulas esofágicas están implicadas en la liberación del fluido de desenvainado de la larva tricostrongílida en la M2 (Sommerville 1982).

Figura A2. Esquema del sistema de E/S de *Ascaris* sp. (*As.*) y de *Anisakis* sp. (*An.*) (Roberts y Janovy, Jr. 2005b).



1.1.2. Sistema digestivo

La mayoría de los nematodos tienen un sistema digestivo completo, como es el caso de *H. aduncum*, que consiste en estomodeo (cavidad bucal y esófago revestidos por la cutícula), en cuyo extremo posterior está presente un ciego esofágico con valor taxonómico, intestino (al inicio existe un divertículo con valor taxonómico, el ciego intestinal) y proctodeo (recto revestido también por la cutícula).

1.1.2.1. Boca y esófago

A la apertura bucal de *H. aduncum* la rodean tres labios, en cuyas inmediaciones la L3 posee un diente horador. En el extremo anterior hay estructuras sensitivas que en general suelen estar implicadas en la localización del alimento. El alimento es succionado por el esófago

(es circular, musculoso y de sección transversal trirradiada), mediante rápidas contracciones lo manda hasta el intestino y lo impulsa a través de éste, el cual está ocluido por la presión que ejerce sobre él el esqueleto hidrostático del pseudocele pues no posee musculatura asociada. Cuando los músculos del esófago están relajados, éste se encuentra ocluido y evita que el alimento vuelva hacia atrás.

Entre los músculos del esófago se sitúan varias glándulas, normalmente tres, una entre cada zona interradiar (siendo la dorsal mayor que las ventrolaterales), que se abren al lumen esofágico. Generalmente estas glándulas secretan sustancias digestivas como enzimas proteolíticas, amilasas, y otras. En *Necator* spp. y *Ancylostoma* spp. las secreciones de las glándulas esofágicas contienen proteasas y hialuronidasas que degradan el tejido y los capilares engullidos por el parásito al anclarse con la cápsula bucal a la mucosa intestinal del hospedador (Munn y Munn 2002), además de proteínas anticoagulantes.

Se ha relacionado el grado de desarrollo de las glándulas esofágicas en algunos nematodos con sus hábitos alimenticios (Hsu 1933). En *Anisakis simplex* se ha relacionado el gran desarrollo de las glándulas esofágicas con las lesiones que aparecen alrededor del extremo anterior del parásito en la pared estomacal de su hospedador (Hsu 1933; Hoeppli 1933). En esta especie se ha visto también que las enzimas proteolíticas se acumulan en gránulos dentro de las glándulas esofágicas, y se piensa que debido a la disposición que presentan las glándulas, las secreciones de la glándula dorsal están implicadas en las actividades extracorpóreas, mientras que las de las dos subventrales lo están en la digestión intestinal (Matthews 1984).

El esófago toma diversas formas según el orden y especie de nematodo, por lo que es un importante carácter taxonómico. En *H. aduncum* el esófago termina en un ventrículo con apéndice ventricular, siendo ambos también glandulares.

1.1.2.2. Intestino

El ventrículo da paso al intestino, que es una estructura tubular simple que termina en el proctodeo. En los nematodos el epitelio intestinal está constituido por una única capa de células, asentadas en la lámina basal compuesta por colágenos, con el borde en cepillo, cuyos repliegues, sustentados por filamentos de actina, en *Ascaris* sp. son largos y numerosos (Munn y Greenwood 1984), incrementan la superficie luminal de 75 a 90 veces (Barrett 1981c). Son muy similares a las microvellosidades intestinales que aparecen en los mamíferos (Van den Bossche y Borgers 1973) y están cubiertas por un glucocáliz.

La parte anterior del intestino de *Ascaris* sp. es principalmente secretora y la posterior de absorción, y se han descrito secreciones tanto de tipo apocrino como merocrino (Barrett 1981c). En los ascáridos existe un gran número de células intestinales, y en los espacios intercelulares a través de las membranas laterales de las mismas es donde ocurren los procesos de transporte. Además de absorber nutrientes, las células epiteliales probablemente excreten productos nitrogenados de desecho, principalmente amonio, gracias a la disponibilidad de agua, ya que

éste es tóxico; pero en otros nematodos que viven en ambientes en donde el agua es un factor limitante, la excreción es ureotélica (Bush et al., 2001).

Los nematodos no tienen musculatura asociada al intestino, así que mueven el contenido luminal con los impulsos que proporciona el esófago muscular y el esqueleto hidrostático, que está gobernado por la musculatura asociada a la pared corporal.

1.1.2.3. Recto y ano

El recto y el ano conforman el proctodeo. Éste consiste en una estructura tubular simple al final del tubo digestivo, a continuación del intestino, revestida de cutícula. En algunos grupos existen glándulas rectales asociadas al proctodeo, que desembocan en la luz rectal (*H. aduncum*, al igual que otros anisákidos, posee glándulas rectales) (Munn y Munn 2002).

Los desechos son expelidos cuando el ano se dilata, en donde se sitúa un esfínter muscular, y la presión hidrostática los fuerza a salir. En condiciones experimentales, *Ascaris lumbricoides* (15-25 cm) renueva el contenido del tracto digestivo en unos 3 minutos, y *Caenorhabditis elegans* (1 mm), que es de mucho menor tamaño, en 45 segundos (Bird y Bird 1991).

1.2. Digestión y absorción en nematodos

Las enzimas digestivas de los nematodos se componen de endopeptidasas (de las cuales las cisteín proteasas han sido particularmente bien estudiadas en los nematodos), exopeptidasas, glucosidasas, lipasas, fosfolipasas y esterases. Las enzimas pueden ser secretadas y liberadas tanto externa como internamente, o bien son proteínas de membrana situadas en la superficie luminal del tubo digestivo.

van den Bossche y Borgers (Van den Bossche y Borgers 1973) observan que *Ascaris suum* presenta un bajo grado de endocitosis en el epitelio intestinal, por lo que piensan que las hidrolasas ácidas presentes en las microvellosidades intestinales podrían llevar a cabo una digestión extracelular de las macromoléculas para absorber después los nutrientes. Se han descrito enzimas de varios tipos implicadas en la digestión de los carbohidratos. En el intestino de *Ascaris* sp. se ha encontrado α -amilasa, maltasa, invertasa, trehalasa e isomaltasa, pero no lactasa. La trehalasa además se ha detectado en el músculo, ovario, oviducto y testículo, por lo que está implicada además de en la digestión en la utilización de trehalosa en los tejidos (Barrett 1981c). En extractos de *H. aduncum* (no se ha hecho una medición específica en el tubo digestivo) se ha detectado actividad α -amilasa, glucoamilasa, maltasa y trehalasa (Zoltowska et al., 2002). En *Nippostrongylus brasiliensis* y en otros nematodos se han hallado diferentes glucosidasas, y se piensa que podrían estar implicadas en la degradación de mucopolisacáridos. En nematodos parásitos de plantas también hay celulasas, pectinasas y quitinasas (Barrett

1981c). Las lipasas también han sido descritas en los nematodos. Se han hallado en diferentes localizaciones como el intestino (*Ascaris* sp., *Leidynema* sp. y *Strongylus* sp.) o el esófago (*Ancylostoma caninum*). La colinesterasa es otra esterasa, secretada al medio en grandes cantidades por algunos nematodos gastrointestinales (como uncinarias y tricostrongílicos), y aunque no se conoce su función, porque no tiene una función digestiva en sí misma, se piensa que puede reducir el peristaltismo del intestino del hospedador, lo cual además de facilitar la estancia del parásito podría estimular la degradación de glucógeno por parte del hospedador aumentando así la glucosa disponible en sangre (Barrett 1981c; Lee 1996; Huby et al., 1999).

Las proteínas de transporte de nutrientes es de esperar que se encuentren en las superficies luminal y basal del tubo digestivo. En *Ascaris* sp. se ha estudiado detalladamente la absorción de hexosas en el intestino. La glucosa pasa mediante transporte activo, y su permeabilidad es sensible al sodio, y la fructosa, la 3-O-metilglucosa y posiblemente la xilosa también pasan por transporte mediado (Schanbacher y Beames, Jr. 1978). También se ha visto transporte de colesterol (los nematodos no pueden sintetizarlo) en el tubo digestivo de *Ascaris lumbricoides*, pero ocurre de modo pasivo (Barrett 1981c).

La absorción de nutrientes ocurre principalmente en el intestino, pero algunos nematodos utilizan además otras estructuras para la ello. Es posible la absorción de nutrientes a través de la cutícula (compuesta por células queratinizadas modificadas), como en *Ascaridia galli* o *Ascaris* sp., y sobre todo en ciertos parásitos de insectos que se hospedan en el hemocele, como *Bradynema* sp. o *Mermis nigrescens*. La larva entomófila de *Mermis nigrescens* se desarrolla en el hemocele de un ortóptero, absorbiendo glucosa a través de la cutícula, mediada por un sistema de transporte (Rutherford y Webster 1974), lo que probablemente está relacionado con el lugar en donde se desarrolla. En algunas filarias también se ha visto que hay absorción de glucosa, además de leucina y adenina, a través de la cutícula (Barrett 1981c).

Hay que destacar la digestión de las proteínas y las proteasas, ya que de todas las enzimas digestivas de los nematodos, esas son de las mejor estudiadas, y tienen una gran importancia para la asimilación de nutrientes. Las proteasas engloban una vasta clase de enzimas hidrolíticas que en todos los animales juegan un papel esencial en los procesos digestivos y del desarrollo, en la dinámica celular, coagulación sanguínea, inflamación, cicatrización, procesado de hormonas...

En los nematodos, como en otros organismos, se distribuyen en diferentes localizaciones a lo largo del cuerpo del animal, según su función. Por ejemplo la actividad gelatinolítica en *Anisakis simplex* (Matthews 1984) está presente mayoritariamente en el lumen intestinal, pero también aparece en el pseudoceloma, las células de la pared corporal y la musculatura del esófago; en las glándulas esofágicas se presentan acumulaciones de gránulos de gelatina digerida y, sin embargo, las células excretoras presentan una actividad gelatinolítica muy escasa, al igual que ocurre en *Ascaris suum* con una aminopetidasa, que además también se describe en los tejidos reproductores femeninos (Rhoads y Fetterer 1998). El esófago glandular de las filarias *Brugia pahangi* y *Brugia malayi* sólo aparece en la L3, y en éste también

se ha observado una distribución granular de cisteín proteasas que se liberan en los productos de E/S durante la tercera muda (Guiliano et al., 2004). Como se ve, la distribución de las proteasas, además de espacial, también puede ser temporal, es decir según la fase de desarrollo en la que se encuentre el parásito. Así por ejemplo en electroforesis con extractos de adultos de *Onchocerca volvulus* no se observa actividad gelatinolítica, mientras que con extractos de larvas sí (Haffner et al., 1998).

La mayoría de los aminoácidos esenciales para los mamíferos lo son, probablemente, también para los nematodos. Así *Caenorhabditis briggsae* y *Ca. elegans* requieren en la dieta histidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina (o su precursor homocisteína), fenilalanina, treonina, triptófano, valina y arginina (Munn y Munn 2002). En los nematodos, se ha localizado transporte de aminoácidos en el tubo digestivo, músculo y tejido reproductor de *Ascaris* sp. y en la larva de *Mermis nigrescens*. En el intestino de *Ascaris* sp. la asimilación de aminoácidos es un proceso mediado no pasivo, pero se desconoce si es posible que ocurra contra gradiente y si es sensible a los iones. Aunque en el músculo y el tejido reproductor de *Ascaris* sp. se ha visto que tiene lugar la asimilación de un aminoácido no metabolizable, la cicloleucina, mediante transporte activo en el tejido reproductor y por difusión en el músculo. En la larva de *M. nigrescens* la asimilación de aminoácidos tiene lugar a través de la cutícula en un proceso mediado (Rutherford et al., 1977).

2. LAS PROTEASAS Y SUS FUNCIONES EN LOS NEMATODOS

Las proteasas en líneas generales pueden suponer aproximadamente un 2% de los genes expresados (Sajid y McKerrow 2002). Durante las últimas dos décadas, las enzimas proteolíticas de muchos parásitos han sido ampliamente estudiadas. Además del papel esperado en la nutrición a expensas de las proteínas del hospedador, las proteasas son importantes para aspectos relevantes de las relaciones parásito-hospedador, hasta el punto de ser consideradas factores de virulencia importantes en algunos parásitos. En los parásitos nematodos, las principales funciones conocidas de las proteasas son las siguientes:

1) Facilitan la penetración en los tejidos del hospedador [gran parte de la morbilidad y mortalidad asociada a la infestación es el resultado de la extensa migración que realizan algunos parásitos a través del hospedador (Morris y Sakanari 1994)], digiriendo las proteínas del mismo, hasta alcanzar el lugar en donde se van a establecer. Éste es normalmente un proceso digestivo externo y en el que los productos no suelen ser asimilados. En el avance de la larva infectiva de los nematodos parásitos de animales desde el lugar de penetración, la piel o el tubo digestivo, hasta el sitio de establecimiento, con frecuencia se pueden observar enzimas proteolíticas secretadas, como se sabe desde hace tiempo que ocurre en los geohelminintos (Lewert y Lee 1956). Se ha comprobado que la penetración de las larvas de nematodos parásitos a través de la piel de los mamíferos en ocasiones se ve bloqueada por la presencia de inhibidores de proteasas.

2) Protegen al parásito del ataque desencadenado por el sistema inmunológico del hospedador, pues son capaces de degradar inmunoglobulinas unidas a antígenos de superficie (Hotez y Pritchard 1995). En algunos casos las proteasas son la principal fuente de antígenos parasitarios, propiciando la respuesta inmunitaria del hospedador. Y es que muchas son especialmente inmunogénicas (Todorova y Stoyanov 2000), lo que favorece procesos de alergia e hipersensibilidad, pero también es una cualidad muy útil para su uso en el serodiagnóstico y el desarrollo de vacunas.

3) Participación en la muda y reabsorción de la cutícula. En presencia de algunos inhibidores específicos de proteasas se observa que el nematodo no puede desprenderse de la cutícula vieja durante la muda. En la muda, las proteasas participan de diferentes modos: activando prohormonas o proenzimas (Hong et al., 1993), degradando las proteínas que anclan la cutícula a la epidermis subyacente (apólis) (McKerrow 1994), o digiriendo la cutícula para reabsorber parte de las proteínas que la componen para elaborar una nueva o para facilitar el desprendimiento de la cutícula vieja intacta (ecdísis) (Gamble et al., 1989). Además podrían

participar procesando propéptidos antes de incorporarse como proteínas a la nueva cutícula (Page 2001). Obviamente participan en el procesado y activación de todo tipo de proteínas.

4) Intervención activa durante el desarrollo embrionario del huevo, en el remodelado de los tejidos durante el desarrollo larvario del nematodo, y seguramente en la degradación de la cubierta del mismo (Hashmi et al., 2002).

5) La función más obvia y generalizada es la digestión de los nutrientes de origen proteico, llevada a cabo en todos los nematodos para facilitar la asimilación y utilización de los nutrientes, pudiendo ser externa o interna (Rhoads y Fetterer 1997). Sin embargo la digestión proteica en nematodos aún es poco conocida. En algunas uncinarias hematófagas, como *Ha. contortus*, se han caracterizado numerosas proteasas de distintos tipos (aspárticas, metaloproteasas y una cisteín proteasa tipo catepsina B) y es probablemente donde mejor se conoce este proceso (Rehman y Jasmer 1998). Se piensa que usan proteasas para la digestión de la hemoglobina pero no existen evidencias directas de la misma en su lumen intestinal, aunque se han descrito muchas proteasas que se expresan en el intestino y que faltan en los productos de E/S, lo que implica que actúan éste. Además, el pH óptimo de muchas de estas proteasas está por debajo del pH de los tejidos del hospedador, lo que sugiere que ejercen su actividad en el ambiente ácido del intestino del parásito.

Tras numerosos estudios con ADN complementario de gran cantidad de proteasas de todo tipo, caracterizaciones bioquímicas, expresión de proteasas recombinantes y localización de la expresión de proteasas en los principales nematodos hematófagos (*Ancylostoma* spp., *Necator americanus* y *Ha. contortus*), se han hallado proteasas homólogas a las que se encuentran en la digestión de la hemoglobina por *Schistosoma* spp. y *Plasmodium* spp. (Williamson et al., 2003b). En *Ancylostoma caninum* se ha caracterizado la cascada enzimática hemoglobinolítica *in vitro* (Williamson et al., 2004), y en los otros nematodos hematófagos se ha asignado a las proteasas intestinales conocidas, y homólogas a las de *Ancylostoma caninum*, *Schistosoma* spp. y *Plasmodium* spp., una posición en la cascada digestiva. Pero como en nematodos el proceso sólo ha sido caracterizado en *Ancylostoma caninum*, esta posición es hipotética y provisional aún, y sería equivalente a la que ocupa su proteasa homóloga en los procesos ya caracterizados. En dicha cascada primero actuarían las proteasas aspárticas generando los primeros péptidos derivados del tetrámero de la hemoglobina, seguidas por cisteín proteasas, metaloproteasas y finalmente las exopeptidasas, que degradarían los péptidos más pequeños resultando en aminoácidos libres y pequeños oligopéptidos que puedan ser absorbidos a través del epitelio intestinal (Williamson et al., 2003b).

En el nematodo de vida libre *Ca. elegans* parece que también hay un proceso sinérgico en la digestión de las proteasas. Así pues, las catepsinas cisteínicas, aunque son capaces por sí solas de digerir algunas proteínas fácilmente degradables como la caseína, necesitan el concurso previo de las catepsinas aspárticas para degradar otras proteínas, mientras que la

catepsina D (aspártica) degrada otras proteínas por sí sola, siendo además capaz de autodigerirse e inactivarse ante la falta de sustrato *in vitro*. Efectivamente, eso es lo que ocurre *in vivo* durante el ayuno: tras 4-8 horas sin ingerir alimento primero descienden los niveles de la catepsina D hasta el 65%, mientras las catepsinas cisteínicas lo hacen pasadas 24 horas. Los datos indican que, aparte de la edad del animal, el estado nutricional es un modulador importante para los niveles de proteasas lisosómicas (Sarkis et al., 1988a; Sarkis et al., 1988b; Hawdon et al., 1989).

Aún no se dispone de datos suficientes para completar el conocimiento del proceso de la digestión proteica en nematodos, estando limitado a datos sueltos de algunos grupos de nematodos.

Últimamente se está invirtiendo un gran esfuerzo en la identificación y estudio de las proteasas implicadas en los procesos de invasión de los tejidos del hospedador, y de la muda de la cutícula, aunque no se conocen con exactitud cómo se integran en los mecanismos de dichos procesos. Así, se considera que las proteasas son esenciales durante los procesos de desarrollo y en los momentos más críticos de las interacciones parásito-hospedador, por lo que están directamente comprometidas con el crecimiento y supervivencia del parásito, y su identificación y caracterización son importantes para el conocimiento básico de la biología del parásito. Se puede inferir fácilmente la importancia de las proteasas para los nematodos parásitos como factores de virulencia, habiendo bastantes especies de nematodos en las que se ha correlacionado significativamente su actividad proteasa con su patogenicidad, entre los que se hallan *Dirofilaria immitis* (Tamashiro et al., 1987), *Nematospiroides dubius* (Monroy et al., 1989), *Strongyloides stercoralis* (McKerrow et al., 1990), *Anisakis simplex* (Sakanari y McKerrow 1990), *Ne. americanus* (Kumar y Pritchard 1992a; Brown et al., 1995), *Onchocerca* spp. (Lackey et al., 1989; Lustigman 1993), *Trichinella spiralis* (Criado-Fornelio et al., 1992), *Trichuris muris* (Drake et al., 1994), *Strongylus vulgaris* (Caffrey y Ryan 1994), *Ancylostoma caninum* (Hawdon et al., 1995) y *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta* (Young et al., 1995).

Debido a esto, las proteasas se contemplan como blancos potenciales para vacunas, fármacos y en el serodiagnóstico, y tendrán una gran importancia para las actuaciones y estrategias antiparasitarias que se desarrollarán en un futuro próximo (Tort et al., 1999; Knox et al., 2001; Dalton et al., 2003).

2.1. Clasificación y nomenclatura de las proteasas

Las proteasas son hidrolasas con especificidad por los enlaces peptídicos, siendo una sola molécula capaz de romper hasta 1.000.000 enlaces por segundo, cuando el enlace peptídico tardaría cientos de años en romperse de manera espontánea (Sajid y McKerrow 2002). A todas las enzimas capaces de hidrolizar el enlace peptídico se les aplica el término general de peptidasas. Las peptidasas están sujetas a una clasificación que difiere bastante de la usada normalmente para el resto de enzimas debido a que no presentan una especificidad de sustrato tan elevada.

La clasificación más usada es la del sistema EC (Enzyme Commission), internacionalmente reconocida, propuesta por la Comisión de Enzimas (cuya sucesora es la IUBMB o International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Esta clasificación contempla el tipo catalítico de las peptidasas, esto es, el tipo de catálisis y mecanismo empleado durante la hidrólisis del enlace peptídico, los cuales dependerán del grupo químico principal responsable de la catálisis, que a su vez vendrá dado por los residuos aminoacídicos que forman el centro activo de la enzima. Así, por ejemplo, las cisteín peptidasas tienen un residuo de cisteína en el sitio catalítico [esto tiene sus implicaciones en las condiciones que necesiten para ser activas, y las cisteín peptidasas van a ser activas en un intervalo de pH entre 4 y 7, principalmente]. De las clases mecanísticas reconocidas en las peptidasas por la IUBMB, cuatro son las principales y mayoritarias, las **peptidasas aspárticas**, las **cisteín peptidasas**, las **metalopeptidasas** y las **serín peptidasas**. Esta será la clasificación que seguiremos en este trabajo.

Las peptidasas se encuentran enclavadas en el grupo EC 3.4, y a su vez se agrupan en dos tipos distintos, exopeptidasas (EC 3.4.11-19) y endopeptidasas (EC 3.4.21-25). Las exopeptidasas hidrolizan los enlaces peptídicos de aquellos residuos aminoacídicos situados en uno de los dos extremos de la cadena polipeptídica, el amino o el carboxilo terminal, siendo las aminopeptidasas las que comienzan la hidrólisis por el extremo amino, y las carboxipeptidasas cortan por el carboxilo. Las endopeptidasas atacan a los enlaces internos de la cadena, es decir, actúan bien en mitad de cadenas largas, lejos de los extremos, y mal sobre los oligopéptidos resultantes, y normalmente se las refiere como proteinasas, pero se emplea el término proteasa para simplificar.

En cualquier caso, la clasificación última de una peptidasa es por su tipo catalítico, y la primera aproximación para la clasificación de una nueva peptidasa con respecto a la clase de mecanística se basa habitualmente en su patrón de respuesta a los inhibidores específicos de clase, junto a otros datos, ya que la clasificación definitiva requiere el conocimiento de su secuencia completa de aminoácidos (García-Carreño 1992).

En las peptidasas se han identificado dos tipos principales de catálisis (ambas con un mecanismo ácido-base): uno de tipo covalente, donde aparece un complejo covalente enzima-sustrato debido a un ataque nucleofílico llevado cabo por un grupo presente en la enzima (el

sulfhidrilo de la cisteína en las cisteín peptidasas, y el hidroxilo de la serina en las serín peptidasas); y otro en el que no aparece el complejo covalente, y el nucleófilo es el agua, a través de un mecanismo que implica al menos a un residuo aspartilo (peptidasas aspárticas) o a un ión metálico (metalopeptidasas).

Hasta la fecha se han descrito más de 130 familias de peptidasas, y en los organismos parásitos se han descrito peptidasas dentro de todos los tipos de catálisis (Cazzulo 2003).

Tabla A1. Clasificación de peptidasas del sistema EC. Datos consultados en la sección de *Enzyme Nomenclature (EC 3.4 (peptidasas))* de la página web de la IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)*) en 2007 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/>).

Sub-subclase	Tipo de peptidasa	Nº de entradas
3.4.11	Aminopeptidasas	20
3.4.13	Dipeptidasas	12
3.4.14	Dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas	8
3.4.15	Peptidil-dipeptidasas	3
3.4.16	Carboxipeptidasas serínicas	4
3.4.17	Metalo-carboxipeptidasas	19
3.4.18	Carboxipeptidasas cisteínicas	1
3.4.19	Omega peptidasas	9
3.4.21	Serín endopeptidasas	98
3.4.22	Cisteín endopeptidasas	52
3.4.23	Endopeptidasas aspárticas	38
3.4.24	Metaloendopeptidasas	80
3.4.25	Treonin peptidasas	1
3.4.99	Endopeptidasas de clase desconocida	0
	Total	345

La hidrólisis del enlace peptídico ocurre mediante el concurso de un intermedio tetraédrico inestable, cuya aparición es forzada por el centro activo de la enzima proteolítica, y los residuos contiguos a un lado y otro del sitio catalítico contribuyen a fijar al sustrato. En las propiedades de estos residuos contiguos reside la especificidad por una secuencia u otra. Cada posición de los residuos recibe un nombre, según un sistema de nomenclatura que introdujeron en 1967 Schechter y Berger (Schechter y Berger 1967) para describir la interacción de las enzimas proteolíticas con su sustrato, y es muy utilizado. Se trata de un sistema que nombra los distintos subsitios (son puntos de la enzima que interaccionan con los residuos del sustrato polipeptídico) de unión de la proteasa. Los residuos de aminoácidos del sustrato que se van a unir a la enzima, y que están en el lado aminoterminal del enlace peptídico que se hidroliza se numeran como P₁, P₂, P₃, y así sucesivamente, empezando a partir del enlace susceptible a la

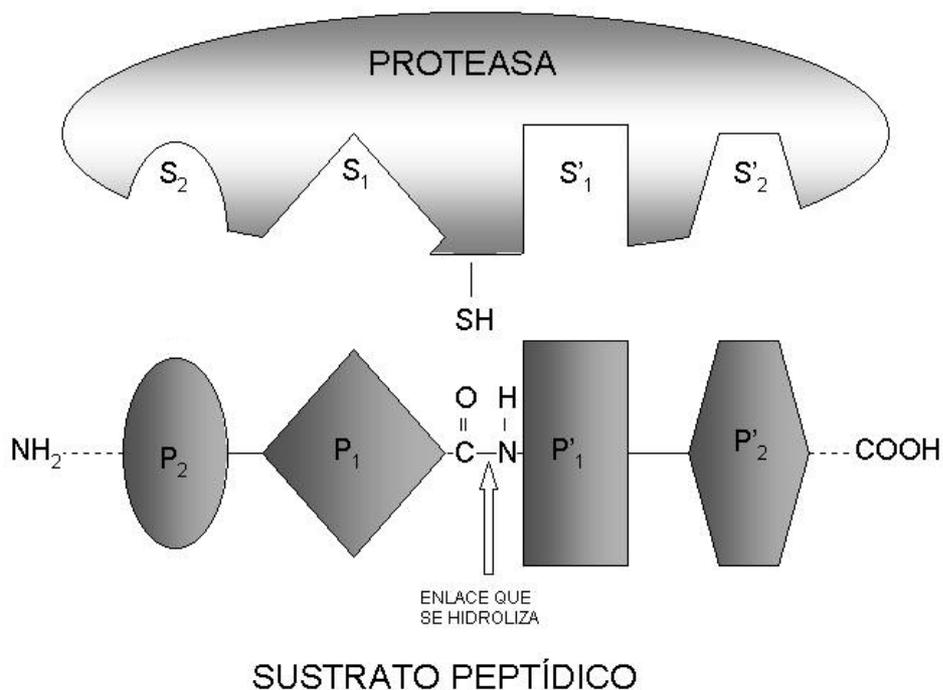
hidrólisis; los residuos situados en el lado carboxiterminal del enlace peptídico que se hidroliza en el sustrato se numeran como P₁, P₂, P₃, y así sucesivamente de igual modo. Se pueden numerar hasta 6 residuos a cada lado del enlace. Los subsitios son residuos que se encuentran en el centro activo de la proteasa, y por analogía son nombrados como S₁, S₂, S₃, S'₁, S'₂, S'₃. Cada subsitio interactúa con su residuo correspondiente en el sustrato, ocurriendo interacciones eléctricas, hidrofóbicas, estéricas, etc. Estos son los residuos de la proteasa que van a definir su especificidad por una secuencia determinada en el sustrato, y por el enlace que se hidroliza:

En el Sustrato: N -...- P₃ - P₂ - P₁ ⊕ P'₁ - P'₂ - P'₃ -...- C

En la Enzima: N -...- S₃ - S₂ - S₁ ⚡ S'₁ - S'₂ - S'₃ -...- C

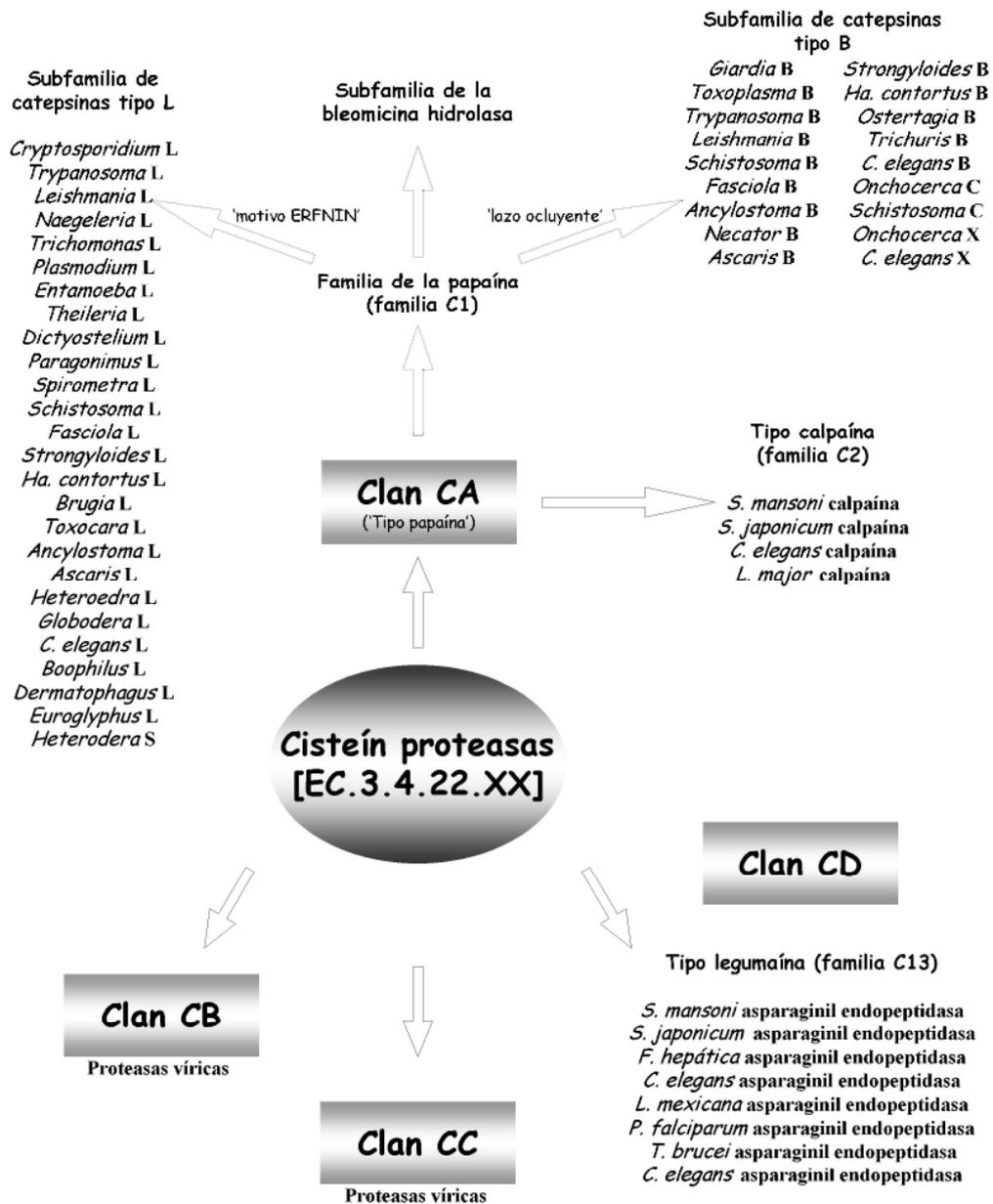
Donde “⚡” representa el residuo del sitio catalítico, y “⊕” representa el enlace peptídico que se hidroliza. Tanto los inhibidores específicos de clase como los sustratos específicos de peptidasas están diseñados para interactuar específicamente con los subsitios de unión del centro activo de la enzima, emulando a los residuos del sustrato polipeptídico natural.

Figura A3. Diagrama que representa la interacción entre el péptido sustrato y el bolsillo del sitio activo de una cisteína proteasa. Fuente: (Sajid y McKerrow 2002).



El problema del sistema de clasificación EC es que se agrupan juntas muchas enzimas que son muy diferentes entre sí, por el compartimento en donde actúan, el momento en que actúan, etc. Por estas razones se ha desarrollado otro sistema de clasificación también muy utilizado que se denomina MEROPS, el cual realiza una clasificación taxonómica (“merops” es el nombre en inglés de un ave cuyo comportamiento social dio a los autores de este sistema la idea de adoptar el término “clan”). Los tres taxones que utiliza son el clan, la familia y la peptidasa. Un clan es un conjunto de familias en las que todas las peptidasas han evolucionado a partir de un sólo ancestro. Las familias del mismo clan se reconocen porque sus peptidasas presentan un patrón similar de plegamiento proteico; una familia es un grupo de enzimas con una homología en la secuencia significativamente alta, más de la mitad de sus residuos, y que poseen relaciones evolutivas; las distintas peptidasas se distinguen entre sí por las diferencias que presentan en su actividad, estructura o genética. El tipo catalítico de las peptidasas en el grupo (cisteínicas, aspárticas, etc) se indica con un código de letras. Normalmente los clanes incluyen a un sólo tipo catalítico, pero algunos incluyen dos o más (Barrett 2001).

Figura A4. Diagrama esquemático de la superfamilia (taxón cuyos miembros poseen menor grado de homología que en la familia) de las cisteín proteasas señalando cómo se relacionan éstas en parásitos. Los grupos de subfamilias están definidos en base al grado de homología presentado en torno a los residuos aminoacídicos del centro activo. Fuente: (Sajid y McKerrow 2002).



2.2. Proteasas aspárticas

Las proteasas o peptidasas aspárticas (EC 3.4.23) se piensa que median en la hidrólisis peptídica mediante una catálisis ácido-base general (sin formación de complejo covalente), frecuentemente a través de dos residuos aspartilos que poseen en su centro activo. Se considera que son el grupo más conservado de las cuatro clases de proteasas (Williamson et al., 2003b).

En *D. immitis* se ha visto que una proteasa aspártica se distribuye principalmente por el intestino, el tejido reproductor y los huevos en desarrollo, por lo que además de en la nutrición, puede estar implicada en la producción de gametos y desarrollo de las microfilarias (Sato et al., 1995).

En extractos de la uncinaria *Ne. americanus* se inhibe la digestión de hemoglobina y fibrinógeno con el inhibidor de proteasas aspárticas pepstatín A (Brown et al., 1995). En nematodos hematófagos se han encontrado dos tipos de proteasas aspárticas intestinales, las de tipo catepsina D (Brown et al., 1995; Harrop et al., 1996; Williamson et al., 2002; Williamson et al., 2003a) y otras más parecidas a las pepsinas de mamífero (Williamson et al., 2003a).

En *Ca. elegans* se ha descrito una catepsina D (las catepsinas son proteasas que aparecen en lisosomas y se sintetizan como proenzimas inactivas) que se piensa esta implicada en la digestión de nutrientes y sus niveles están modulados por el estado nutricional del nematodo, descendiendo en caso de ayuno (Hawdon et al., 1989).

En *On. volvulus*, *Ancylostoma caninum* y *Ca. elegans* se ha identificado una nueva familia de proteasas aspárticas. Esta familia está muy relacionada con la familia de las catepsinas D y E, aunque teniendo más similitud con las E. En la bibliografía consultada se dice que las catepsinas E son secretadas y se sabe que la hembra adulta de *On. volvulus* secreta inhibidores específicos de proteasas aspárticas, por lo que se ha propuesto que estas proteasas se secreten formando un complejo con el inhibidor (Jolodar y Miller 1998). En el homogenado de *Ca. elegans* la mayoría de la actividad es a pH ácido y el 90% se inhibe con el inhibidor de proteasas aspárticas pepstatín A, hallándose evidencias de hasta 12 proteasas aspárticas diferentes (Geier et al., 1999).

En la L4 y adulto de *Os. ostertagi* se ha documentado la presencia de dos proteasas aspárticas que degradan mucinas, hemoglobina y albúmina, una a pH 5,0 y otra a pH 3,0, pero la más ácida degrada además inmunoglobulina G, por lo que debe de ser muy útil para proteger el tracto digestivo de este nematodo del ataque del sistema inmunológico mientras se alimenta de los vasos sanguíneos que irrigan la mucosa intestinal del hospedador (Geldhof et al., 2000).

2.3. Cisteín proteasas

Las cisteín proteasas o cisteín peptidasas (EC 3.4.22) poseen un residuo de cisteína en su centro activo, que participa en una catálisis de tipo covalente en la que se forma un complejo enzima-sustrato intermedio con una unión covalente. El grupo sulfhidrilo es el que lleva a cabo el ataque nucleofílico, formándose así el complejo covalente.

Las cisteín proteasas es la clase de proteasas de la que se dispone de más información en nematodos parásitos, debido a que con su gran diversidad (Pratt et al., 1990; Rheman y Jasmer 1999; Jasmer et al., 2001; Shompole y Jasmer 2001) cubren prácticamente todas las funciones en las que están implicadas las proteasas en los nematodos parásitos, que por otro lado son vitales. Estas enzimas se encuentran tanto en larvas como en adultos, y se cree que están implicadas en la penetración de los tejidos, nutrición y defensa frente al efecto causado por el sistema inmunológico del hospedador (Tort et al., 1999) así como en la muda (Rhoads et al., 1998).

En *Ha. contortus* se han observado cisteín proteasas que producen una degradación extracorpórea *in vitro* de tejidos de una matriz extracelular artificial, debida presumiblemente a los productos de E/S y que podrían facilitar al parásito la llegada hasta los capilares en la mucosa del tracto digestivo y romperlos, para alimentarse de sangre *in vivo* (Karanu et al., 1993; Rhoads y Fetterer 1997). *Os. ostertagi*, que se alimenta del mismo modo, presenta una actividad cisteínica frente a mucinas, por lo que es posible que tenga una función parecida (Geldhof et al., 2000).

En *Ascaris suum* se ha relacionado cisteín proteasas con el proceso de muda, ya que la presencia de Z-Phe-Ala-FMK (inhibidor de cisteín proteasas) evita que el 77% de los individuos se desprendan de la cutícula de L3, aunque su desarrollo continúa (Rhoads et al., 1998). En *B. pahangi* (Hong et al., 1993), *D. immitis* (Richer et al., 1992; Richer et al., 1993) y *On. volvulus* (Lustigman et al., 1996) también se han implicado cisteín proteasas en los procesos de muda. En *Toxocara canis* se ha relacionado una catepsina Z con la muda, pero se ha observado que se expresa de forma constitutiva, por lo que se piensa que ha de tener alguna otra función esencial (Falcone et al., 2000). También se expresa en *On. volvulus* y así mismo se relaciona con la muda (Lustigman et al., 2004). En *Ca. elegans* se expresa en los mismos lugares que en *On. volvulus* (en la epidermis de todas las fases larvares y en el esófago y gónadas del adulto), interviniendo en la muda, así como en otras funciones relacionadas con el desarrollo como la espermatogénesis y el desarrollo embrionario, por lo que se cree que su función está conservada en los nematodos, (Hashmi et al., 2004). En *Ne. americanus* se ha detectado una cisteín proteasa que es mayoritaria en los fluidos que quedan atrapados entre la cutícula de la L2 y la de la L3 infectiva antes de que se desprenda la vieja cutícula (Kumar y Pritchard 1992b), por lo que podría estar también implicada en la muda.

En extractos de *Ha. contortus* (Knox et al., 1993) y en productos de E/S de *Ne. americanus* (Kumar y Pritchard 1993; Brown et al., 1995) se ha observado que hay cisteín

proteasas capaces de degradar hemoglobina, fibrinógeno, colágeno (sólo en *Ha. contortus*) y anticuerpos. En *Ha. contortus*, sin tener en cuenta los productos de E/S, se ha comprobado que el intestino es el lugar donde las cisteín proteasas se encuentran en mayor concentración (Rhoads y Fetterer 1997).

Existen varias familias de cisteín proteasas, pero hay un grupo que está ampliamente representado entre los parásitos más estudiados, siendo por ello uno de los más importantes, es la familia de la papaína, que da nombre al clan al que pertenece (figura A4). El principal grupo de cisteín proteasas que aparece en parásitos, el clan CA (tipo papaína), se caracteriza por disponer de una tríada catalítica en el centro activo consistente en tres residuos de cisteína, histidina y asparagina (Sajid y McKerrow 2002). El análisis de la evolución, localización y función biológica de las cisteín proteasas pertenecientes a este clan en parásitos metazoos y protozoos ha generado importantes conocimientos sobre la bioquímica y función celular de esta familia tan diversa de enzimas, que intervienen en procesos tanto intra como extracelulares (Bond y Butler 1987). Por todo esto, y dada su naturaleza dispar se está viendo que son, junto con otras cisteín proteasas, blancos atractivos para el desarrollo de agentes químicos que las interfieran, y varias son las razones que hacen pensar en ello (McKerrow et al., 1999; Selzer et al., 1999; McKerrow 1999; Sajid y McKerrow 2002):

- poseen diferentes propiedades estructurales y bioquímicas con respecto a las del hospedador, como son el pH óptimo y estabilidad, alteración en los bucles peptídicos o extensión de los dominios.
- la relativa falta de redundancia con respecto al hospedador mamífero. Esto quiere decir que el espectro de afinidad por diferentes sustratos de las diferentes cisteín proteasas en los hospedadores se solapa más que en los parásitos.
- una mayor concentración de cisteín proteasas en los compartimentos intracelulares del hospedador que en los parásitos. En general la actividad cisteín proteasa del hospedador es más robusta.
- una asimilación diferenciada de los inhibidores por los parásitos con respecto al hospedador, gracias entre otras cosas a la gran diversidad que presentan en su localización celular.
- los estudios llevados a cabo para dilucidar los mecanismos de resistencia a los inhibidores de cisteín proteasas en cultivos de parásitos, indican que son independientes a los de los antiparasitarios tradicionales.

2.3.1. Catepsinas cisteínicas B y L

En 1929 Willstätter y Bamann (Willstätter y Bamann 1929) propusieron el término catepsina para describir las peptidasas que actuaban preferentemente en medio ácido y que serían localizadas posteriormente en todas las células y tejidos, y luego se vio que eran de origen lisosómico. Así, las catepsinas son proteasas lisosómicas por definición, que pueden ser

secretadas. Están muy extendidas entre los invertebrados, y se sabe que los fila de protóstomos metazoos primitivos expresan una amplia gama de catepsinas (Tort et al., 1999). La familia de la papaína incluye muchas catepsinas que obviamente son cisteínicas (Berti y Storer 1995). Las proteasas cisteínicas más estudiadas y que más aparecen en los nematodos (y más importantes en parásitos) son las catepsinas de los tipos B y L, que pertenecen a la familia de la papaína (Sajid y McKerrow 2002). Se encuentran organizadas en varias familias multigénicas, por ejemplo hay familias muy bien caracterizadas que se expresan en los tejidos intestinales del adulto de *Ha. contortus* y de *Ca. elegans*. Tal diversidad refleja una gran especialización funcional, la necesidad de una digestión proteica rápida, o bien ambas cosas ya que todas tienen un papel potencial en la digestión de nutrientes (Pratt et al., 1990; Rheman y Jasmer 1999; Jasmer et al., 2001; Shompole y Jasmer 2001).

2.3.1.1. Catepsina B

Entre las catepsinas B de diversas especies de nematodos se ha encontrado una elevada variabilidad en función de la temperatura y pH óptimos, afinidad por el sustrato, etc. Se piensa que su papel fundamental es el de digerir nutrientes y que la elevada variabilidad interespecifica observada obedece a la adaptación que sufre el nematodo al nicho ecológico que ocupa (Rheman y Jasmer 1999). Se ha expresado *in vitro*, mediante un sistema heterólogo, una catepsina B del intestino de *Ancylostoma caninum*, con actividad hemoglobinolítica. Dicha actividad es óptima cuando actúa tras una catepsina D (proteasa aspártica) del mismo parásito (Williamson et al., 2004), por lo que se las sitúa a ambas en la cascada enzimática que digiere la hemoglobina en este parásito.

En *Ca. elegans* se expresan genes de catepsina B en el tubo digestivo de la larva y del adulto, y la misma catepsina se expresa también en el intestino de *Ha. contortus* (Ray y McKerrow 1992; Pratt et al., 1992; Britton et al., 1998) relacionándose con la digestión de nutrientes (Ray y McKerrow 1992). Es más, se ha insertado el promotor del gen de esta catepsina B de *Ha. contortus* en *Ca. elegans* y se ha demostrado que los mecanismos que controlan la distribución espacial de esta proteasa se conservan entre nematodos parásitos y de vida libre (Britton et al., 1999). Anteriormente ya se había sugerido que además de la similitud estructural, existiera una homología funcional entre las catepsinas B de nematodos, las cuales podrían tener un papel importante en la nutrición de éstos (Pratt et al., 1992).

2.3.1.2. Catepsina L

Las catepsinas L son menos abundantes en cuanto a su nivel de expresión (Loukas et al., 1998; Tort et al., 1999). Parece que están implicadas además de en la digestión de nutrientes, en procesos de embriogénesis y muda sobre todo (Koiwa et al., 2000; Hashmi et al., 2002; Britton y Murray 2002), aunque también se han relacionado con procesos de invasión tisular y evasión de la respuesta inmunológica en nematodos parásitos (Tort et al., 1999). Muchas de estas catepsinas L tienen homólogas en *Ca. elegans*, lo que sugiere que quizá estén

implicadas en funciones conservadas en diferentes especies de nematodos, aunque no se sabe mucho acerca de sus funciones precisas (Hashmi et al., 2002). En *B. pahangi* y *B. malayi* (Guiliano et al., 2004) se ha estudiado una serie de catepsinas L, que al compararlas con sus correspondientes en *On. volvulus* y *Ca. elegans* (Lustigman et al., 1996; Lizotte-Waniewski et al., 2000; Hashmi et al., 2002), se ha llegado a la conclusión de que también están implicadas en el remodelado de la cutícula y de la cubierta del huevo en las filarias.

En *On. volvulus* se han descrito catepsinas L y Z (están muy relacionadas) que intervienen directamente en la muda de la L3 (Lustigman et al., 1996). En *Ca. elegans* se ha estudiado a fondo una catepsina L (*Ce-CPL-1*) que es esencial para su desarrollo y embriogénesis, y al inhibir su expresión se detiene el desarrollo de hasta un 98% de los embriones (Britton y Murray 2002), y también se ha hallado en la cubierta del huevo y en la cutícula de *On. volvulus* (*Ov-CPL-1*), por lo que parece conservada en los nematodos, de lo que se desprende la gran importancia de esta proteasa, probablemente con idéntica función en otros muchos nematodos. Se expresa durante el desarrollo embrionario y postembrionario en el intestino, epidermis, esófago, gónadas y en la periferia del huevo, cerca de su cubierta. Aparece durante el periodo intermuda, aproximadamente 4 horas antes de la muda y después su producción desciende a los niveles basales. Por todo esto se piensa que podría estar implicada en el procesamiento de productos empleados en la síntesis de la cubierta del huevo o en la degradación de ésta, y así mismo en la cutícula, y otras funciones. De este modo, se sugiere que la *Ce-CPL-1* degrade las proteínas del vitelo para dejar disponibles los aminoácidos necesarios para el desarrollo embrionario y para la síntesis o maduración de la cubierta del huevo y, posteriormente en la remodelación de la cutícula de la larva durante la muda. También podría actuar en el adulto, durante el crecimiento tras la última muda, degradando la cutícula vieja y procesando la nueva o digiriendo las proteínas de anclaje cuticular. Finalmente, también podría actuar indirectamente, procesando y activando otras enzimas u hormonas implicadas en la muda (Hashmi et al., 2002).

De todas formas estos datos están sujetos a una cierta incertidumbre, porque Rehman y Jasmer (Rehman y Jasmer 1999) afirman que parece que en *To. canis* y otros nematodos como las uncinarias, existen modificaciones en las catepsinas L que las llevan a mostrar actividad de catepsina B, lo cual conduce a pensar que tanto los sustratos convencionales como los inhibidores para la subclase de la proteasa sólo ofrecen una información provisional, al menos en nematodos.

2.4. Metaloproteasas

Dentro de las metaloproteasas o metalopeptidasas son tan habituales las endoproteasas (EC 3.4.24) como las exopeptidasas. Reciben este nombre porque poseen un ión metálico coordinado en su centro activo, frecuentemente un catión divalente de zinc, aunque puede ser

también de cobalto o manganeso, entre otros. Este ión es capaz de polarizar el enlace peptídico, antes de romperse, mediante el ataque nucleofílico del hidroxilo proveniente del agua. Una característica muy común es la presencia de los residuos catalíticos de glutamato y de histidina.

Las metalopeptidasas intervienen en la invasión de los tejidos del hospedador por el parásito, ya que son capaces de degradar la matriz extracelular (Haffner et al., 1998). En *Strongyloides stercoralis* se ha demostrado que una zinc-endometaloproteasa secretada por la larva participa en la penetración de la piel del mamífero hospedador. Esta metaloproteasa es muy potente y ataca a los componentes principales de la matriz extracelular dérmica (elastina, colágenos y glicoproteínas). La penetración a través de la piel se ve inhibida por inhibidores específicos para metalopeptidasas (McKerrow et al., 1990). Además esta proteasa mantiene su actividad proteolítica tras una inmunoprecipitación con IgG, lo que indica la ausencia de inmunogenicidad de su centro activo, lo que supondría una gran ventaja evolutiva orientada a la infestación del hospedador (Brindley et al., 1995). En un órgano secretor de *Trichuris suis* existe también una zinc- metaloproteasa implicada en la degradación de los tejidos del hospedador durante la invasión (Hill et al., 1993).

En *Ha. contortus* se ha descrito un complejo de varias metaloproteasas asociadas a sus microvellosidades intestinales que mediante inmunización confiere a las ovejas una protección moderada (Smith et al., 1999). Este complejo, además de presentar actividad hemoglobinolítica, puede estar implicado en la evasión del sistema inmunológico degradando eotaxinas, evitando así la llegada de eosinófilos al lugar donde se ha fijado el parásito (Culley et al., 2000).

En *Ascaris suum* se ha relacionado una aminometalopeptidasa liberada, al medio de cultivo, con el proceso de muda, ya que su concentración es máxima en el momento del paso de L3 a L4 (Rhoads et al., 1997), y la presencia de amastatín (inhibidor de aminopeptidasas) evita que el 34% de los individuos se desprenda de la cutícula de L3, sin embargo esto no frena el desarrollo; posteriormente esta misma aminopeptidasa se ha hallado en el intestino del adulto, donde posee una gran actividad que se relaciona con la digestión (Rhoads y Fetterer 1998). En *B. pahangi* (Hong et al., 1993), *D. immitis* (Richer et al., 1992; Richer et al., 1993) y *On. volvulus* (Lustigman et al., 1996) también se han detectado aminopeptidasas en los procesos de muda. En la L3 infectiva de *Ha. contortus* hay una endometaloproteasa que degrada una región anular de la cutícula de la L2, para que se desprende y dejar lugar para la cutícula de la L3 (Gamble et al., 1989).

La primera actividad metaloendoproteasa descrita en nematodos fue en los productos de E/S de *Ancylostoma caninum* en 1983 (Hotez y Cerami 1983), siendo capaz de degradar fibrinógeno y plasminógeno, por lo que se pensaba que evitaba la coagulación de la sangre del hospedador. Más recientemente se ha descrito el ADN complementario de una metaloproteasa que se expresa en el lumen intestinal, la Ac-MEP-1, y que es probablemente la responsable de la actividad anteriormente mencionada (Jones y Hotez 2002). En este mismo parásito, hay otra metaloproteasa, presente tanto en los productos de E/S como en extractos de larvas y adultos, que también evita la coagulación de la sangre al inhibir la precipitación de fibrina, pero además

se piensa que pueda estar implicada en la penetración de tejidos debido a su actividad elastinolítica (Hotez y Cerami 1983; Hotez et al., 1985; Hotez et al., 1990).

2.5. Serín proteasas

Las serín proteasas o serín peptidasas (EC 3.4.21) poseen en su centro activo un residuo de serina, junto con otro de aspartato e histidina, que participa en una catálisis de tipo covalente, en la que se forma un complejo enzima-sustrato intermedio con una unión covalente. El grupo hidroxilo de la serina es el que lleva a cabo el ataque nucleofílico, formándose así el complejo covalente.

Las serín proteasas también están presentes en los nematodos, y se piensa que, junto con las metaloproteasas, son las principales responsables de la invasión de tejidos del hospedador por el parásito (McKerrow 1989; McKerrow et al., 1990; Sakanari y McKerrow 1990; Cohen et al., 1991). Se han identificado serín proteasas en diferentes nematodos parásitos, como *Ne. americanus* (Kumar y Pritchard 1992b), *D. immitis* (Tamashiro et al., 1987), *On. volvulus* (Lackey et al., 1989), *Ascaris suum* (Knox y Kennedy 1988), *To. canis* (Robertson et al., 1989), *Anisakis simplex* (Matthews 1984; Sakanari y McKerrow 1990) y *Trichinella spiralis* (Todorova 2000). Un ejemplo de cómo las serín proteasas son buenas candidatas para la degradación de los tejidos del hospedador lo exponen Morris y Sakanari (Morris y Sakanari 1994) al relacionar una serín proteasa extracelular presente en la bacteria patógena *Dichelobacter nodosus* que destruye los tejidos de su hospedador (degradando elastina, queratina y colágeno), con una serín proteasa de los productos de E/S de la larva de *Anisakis simplex* en cultivo *in vitro* con actividad similar.

En los productos de E/S de la L3 infectiva de *Ne. americanus* se ha detectado actividad serín proteasa capaz de degradar inmunoglobulinas G, A y M (Kumar y Pritchard 1992b), lo que podría ayudar al parásito, durante su entrada, a protegerse de los anticuerpos generados mediante la respuesta inmunitaria del hospedador.

2.6. Inhibidores de proteasas en nematodos parásitos

Se han descrito inhibidores de proteasas en nematodos parásitos. Se sabe poco sobre las funciones de estos inhibidores, aunque presumiblemente serían importantes en las relaciones parásito-hospedador. Esta relación parece estar clara en dos casos al menos:

En las uncinarias parece que una de las funciones es actuar como anticoagulante, inhibiendo varias serín proteasas implicadas en la coagulación de la sangre del hospedador (Capello et al., 1993; Capello et al., 1995; Stassens et al., 1996); en *Ascaris* spp. (Keilová y Tomásek 1972; Abu-Erreish y Peanasky 1974; Gronenborn et al., 1990), parásito intestinal, en el

que se cree que juegan un papel de protección del tubo digestivo del parásito frente a las enzimas digestivas del hospedador (Martzen et al., 1990; Hawley y Peanasky 1992). En estos mismos parásitos (Homandberg y Peanasky 1976; Homandberg et al., 1989) se han purificado inhibidores de carboxipeptidasa, que podrían tener el mismo papel. Otros inhibidores encontrados en *Ascaris* spp. (Babin et al., 1984; Peanasky et al., 1984) y *Anisakis simplex* (Morris y Sakanari 1994; Nguyen et al., 1999), podrían participar en la protección del tracto gastrointestinal del parásito frente a las enzimas que se encuentra éste mientras atraviesa los tejidos del hospedador.

En la filaria *On. volvulus* podrían jugar un papel regulador durante la muda, la embriogénesis y la espermatogénesis (Ford et al., 2005). En el parásito intestinal *Trichuris suis*, los inhibidores podrían estar implicados en un mecanismo de defensa para eludir la respuesta inmunitaria, mediada por proteasas, de los mastocitos asociados a la mucosa intestinal del hospedador (Rhoads et al., 2000). En la filaria *B. malayi* se ha demostrado que ciertos inhibidores que produce son capaces de inhibir la proliferación de las células T impidiendo el procesamiento del antígeno para su presentación por parte de las células presentadoras del antígeno del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) (Manoury et al., 2001). *Ni. brasiliensis* modula la respuesta inmunitaria también al nivel del procesamiento de antígenos en la célula presentadora del antígeno (Dainichi et al., 2001).

3. CATABOLISMO GLUCOLÍTICO Y FIJACIÓN DE CO₂

El medio en el que se desarrolla un endoparásito es el interior de otro organismo, siendo las condiciones que se encuentra el parásito muy diferentes del medio ambiente exterior. Según Barrett (Barrett 1981a) el metabolismo de los helmintos parásitos difiere del de los mamíferos en ciertos aspectos importantes:

- los sustratos que los helmintos pueden catabolizar están limitados a los carbohidratos en la mayoría de las especies, siendo la única fuente de energía, principalmente la glucosa (en el músculo de *Ascaris* sp. se ha visto que los aminoácidos no constituyen una fuente de energía),
- la acetil-coenzima A no ocupa el mismo papel central que en el metabolismo de los mamíferos, siendo el fosfoenolpiruvato (PEP) la clave metabólica. Los organismos aerobios como los mamíferos rentabilizan al máximo la obtención de energía mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Mientras que muchos helmintos intestinales son anaerobios facultativos y tienen una baja o nula actividad de éste ciclo,
- la degradación de sustratos no se produce completamente hasta CO₂ y agua, sino que es habitual la excreción de productos finales complejos, normalmente ácidos orgánicos.

Los carbohidratos son posiblemente la única fuente energética para los helmintos y puede ser almacenada en forma de glucógeno o de trehalosa. En efecto, en *H. aduncum* se ha visto que en las "larvas" (los autores no especifican qué estadio larvario) la principal forma de almacenamiento es la trehalosa, mientras que en el adulto ya ha sido consumida y en éste se almacena principalmente glucógeno (Zoltowska et al., 2002).

Las rutas metabólicas que pueden seguir los carbohidratos han sido muy bien estudiadas en *Ascaris* sp. En este parásito la glucosa, que se almacena principalmente como glucógeno, entra en la glucólisis y va degradándose y transformándose hasta llegar a PEP. Éste puede seguir dos caminos. En uno de ellos la piruvato quinasa (PK) genera piruvato y luego lactato mediante la lactato deshidrogenasa (LDH); esta vía es muy habitual en los parásitos que se alimentan de sangre como las uncinarias o las microfilarias y a menudo refleja un ambiente con acceso a fuentes ilimitadas de glucosa y rico en oxígeno. Estos parásitos no fijan CO₂ y lo excretan junto al lactato y acetato, por lo que se denominan fermentadores homolácticos. Esta vía es menos activa en *As. suum* ya que los niveles de PK son muy bajos.

En el segundo camino, el piruvato es captado por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), y mediante el concurso de IDP (la PEPCK de *Ascaris* sp. a diferencia de la de vertebrados es más activa con IDP que con GDP, siendo inactiva con ADP) y CO₂, se carboxila transformándose en oxalacetato (OAA) y generándose ITP. Luego el OAA se reduce y pasa a malato por la acción de la malato deshidrogenasa (MDH). El malato entonces entra en la mitocondria a través de un sistema dependiente de fosfato, donde ocurre lo que se denomina la

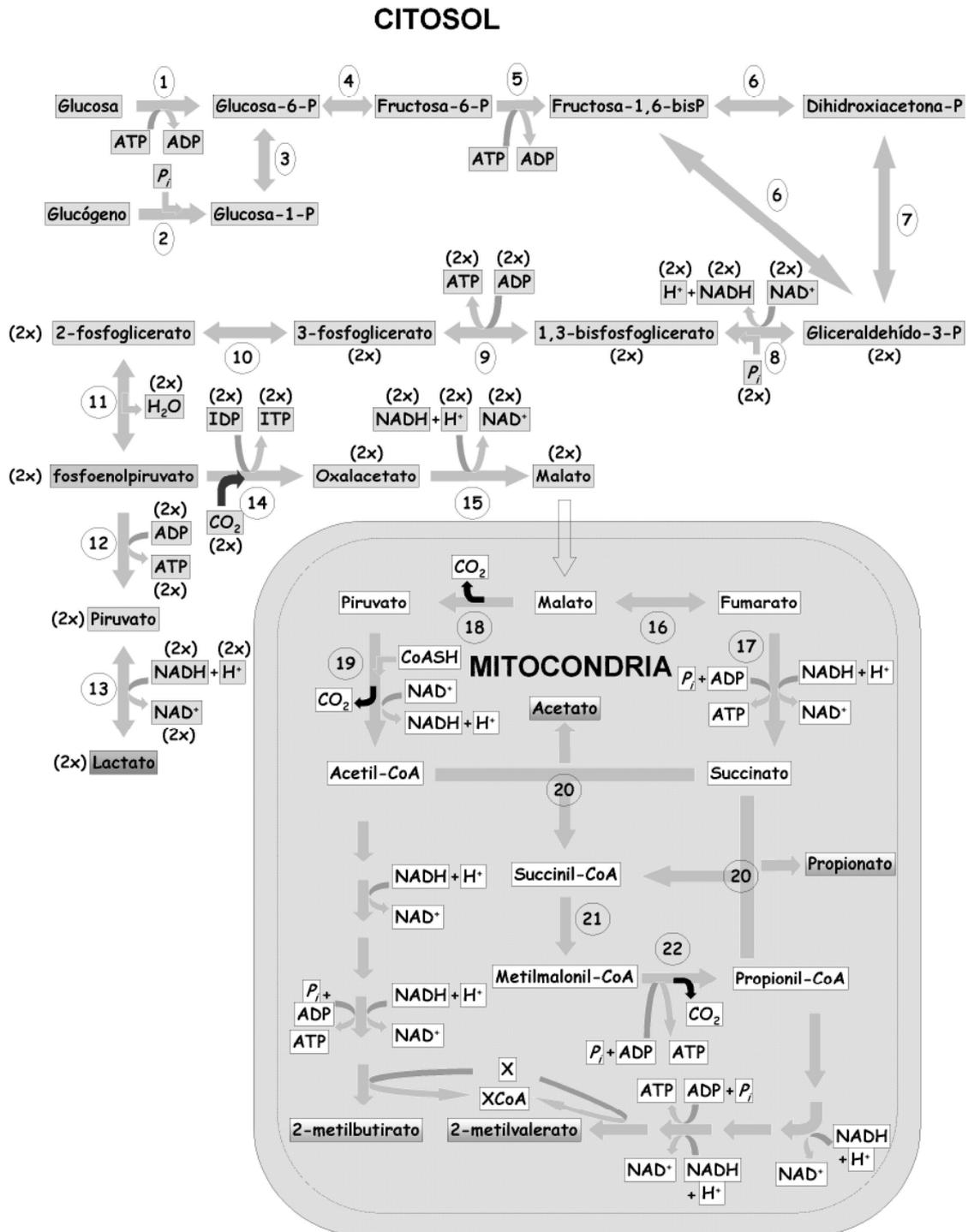
dismutación del malato. Este punto es una bifurcación metabólica dentro de la mitocondria, donde la ruta diverge en dos ramificaciones. Por un lado el malato se transformará en fumarato y por el otro en piruvato. Así, una fracción del malato sufre una descarboxilación oxidativa hasta piruvato mediante una enzima málica (EM) dependiente de NAD⁺ (en contraste con los vertebrados, en los que la EM es citoplásmica y NADP⁺ dependiente) y generando equivalentes de reducción en forma de NADH. Estos equivalentes de reducción son empleados por la otra fracción del malato que es transformado a fumarato por la fumarasa, la cual mantiene en equilibrio el balance malato/fumarato. El fumarato se reduce a succinato por la fumarato reductasa, que es un complejo enzimático asociado a la membrana y a otros complejos respiratorios de transporte de electrones. Aunque también existe actividad succinato deshidrogenasa, en la membrana mitocondrial de *As. suum* la actividad fumarato reductasa (esta actividad la realiza el complejo II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial) con respecto a la succinato deshidrogenasa es 400 veces mayor (las mitocondrias aerobias catalizan la reducción de fumarato NADH-dependiente lentamente). En definitiva, el exceso de poder reductor en forma de NADH empuja al complejo II (y a la β -oxidación) en sentido opuesto al que se observa en los orgánulos aerobios (Kita 1992; Duran et al., 1993; Ma et al., 1993; Komuniecki y Harris 1995). La reducción de fumarato a succinato deriva electrones hacia los citocromos de una cadena de transporte electrónico parcial, generándose ATP.

Por cada mol de hexosa oxidada en el citosol se generan 4 moles de nucleótidos trifosfatados, 2 de los cuales proceden de la actividad de la PEPCK, quedando patente su gran importancia en la obtención de energía por parte de *As. suum*.

Landsperger y Harris (Landsperger y Harris 1976) comprobaron en *As. suum* que la EM actúa como reguladora del proceso de la dismutación, de manera que según lo que necesite el parásito, poder reductor o ATP, el malato se transforma en piruvato o succinato respectivamente.

De esta forma estos nematodos utilizan parte del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (desde succinato hasta OAA), aunque en dirección inversa, por lo que puede ser descrito como un ciclo de los ácidos tricarbóxicos parcial e inverso. Los primeros productos del catabolismo de los carbohidratos son el piruvato y el succinato. Sin embargo, los principales productos de excreción de *As. suum* son ácidos orgánicos volátiles de cadena corta, procedentes de diferentes descarboxilaciones, condensaciones con coenzima A y reducciones sobre el piruvato y el succinato. Al final se genera mayoritariamente una mezcla racémica de 2-metilvalerato y 2-metilbutirato, los cuales son los aceptores finales de los electrones egresados de la cadena de transporte electrónico. Aparecen también otros productos como acetato o propionato, pero son minoritarios. Solamente del 7 al 8% de los ácidos excretados por *As. suum* no son volátiles, constituyendo el lactato menos del 0,04%, lo que es indicativo de su anaerobiosis facultativa. La principal ruta metabólica para los carbohidratos en *Ascaris* spp. implica por tanto la fijación de CO₂ mediante la carboxilación del PEP transformándolo en OAA, que posteriormente se reduce a malato (Barrett 1981a).

Figura A5. Esquema en el que se indica el catabolismo glucolítico en helmintos (el de la mitocondria se corresponde con el músculo de *As. suum*). Fuente: (Barrett 1981a). (1) Hexoquinasa; (2) Fosforilasa; (3) Fosfoglucomutasa; (4) Glucosa fosfato isomerasa; (5) Fosfofructoquinasa; (6) Aldolasa; (7) Triosa fosfato isomerasa; (8) Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; (9) Fosfoglicerato quinasa; (10) Fosfoglicerato mutasa; (11) Enolasa; (12) Piruvato quinasa; (13) Lactato deshidrogenasa; (14) Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; (15) Malato deshidrogenasa; (16) Fumarasa; (17) Fumarato reductasa; (18) Enzima málica; (19) Complejo piruvato deshidrogenasa; (20) Acilcoenzima A transferasa; (21) Metilmalonilcoenzima A mutasa; (22) Metilmalonilcoenzima A descarboxilasa.



3.1. La relación PK/PEPCK

Es lógico que las condiciones del medio en donde se desarrolla el parásito tengan influencia o condicionen la forma de metabolizar y aprovechar los nutrientes disponibles. La presión de CO₂ es un parámetro importante a la hora de caracterizar un ambiente, al igual que otros como la presión de O₂, el potencial de oxidorreducción, el pH, la presión osmótica o la temperatura.

El CO₂ presenta una presión de 0,3 mm Hg en el aire, siendo en los tejidos animales mucho más elevada. En la sangre y tejidos de los vertebrados terrestres ronda los 40 mm Hg y en los vertebrados acuáticos, a causa de la gran solubilidad del anhídrido carbónico en el agua, la presión es menor, entre 2 y 10 mm Hg. En los invertebrados se tiene menos conocimiento, aunque en insectos se han registrado medidas entre 23 y 48 mm Hg.

El intestino de los mamíferos registra unas presiones de CO₂ extremadamente altas, entre 500 y 700 mm Hg en el intestino delgado de mamíferos rumiantes, y entre 20 y 600 mm Hg en el de mamíferos no rumiantes y aves. Estos niveles de CO₂ tan elevados podrían suponer un serio problema para la regulación ácido/base en los helmintos intestinales y se ha sugerido que las rutas de fijación de CO₂ encontradas en helmintos podrían ser consecuencia de la gran cantidad de CO₂ ambiental en la que se encuentran inmersos y no necesariamente como adaptación a una escasa disponibilidad de oxígeno (Barrett 1981b).

El metabolismo de *Ascaris* sp. está diferenciado en dos fases principales, una aerobia durante la fase de vida libre en el desarrollo embrionario dentro del huevo, y otra anaerobia en el tracto gastrointestinal del hospedador (Saz et al., 1968). Así las fases que se desarrollan dentro del huevo son aerobias obligadas, ya que de lo contrario, la acumulación de los ácidos finales de la glucólisis llegaría a ser tóxica.

Durante el desarrollo de la fase infectiva en el huevo se utiliza el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la cadena de transporte electrónico mitocondrial para la producción de energía. El hospedador se infesta al ingerir el huevo con la larva desarrollada, una vez en el intestino, eclosiona, atraviesa la pared intestinal, migra a través de los tejidos y luego regresa por vía pulmonar al tracto gastrointestinal en donde se desarrolla hasta adulto. En el intestino la L4 pierde ya la capacidad para metabolizar los nutrientes aeróbicamente, pero aun así todavía muestra actividades propias de un metabolismo aerobio, como es la de la citocromo oxidasa. La L3 es sensible a venenos respiratorios como el cianuro, mientras que la L4 y el adulto no (Komuniecki y Vanover 1987).

Durante las fases de L3 y L4 parece que existe un periodo de transición de un tipo de metabolismo a otro, ya que se ha visto que tienen poblaciones diferenciadas de mitocondrias, unas que funcionan aeróbicamente y otras anaeróbicamente (Vanover-Dettling y Komuniecki 1989). Vanover-Dettling y Komuniecki (Komuniecki y Vanover 1987; Vanover-Dettling y Komuniecki 1989) creen que la pérdida de sensibilidad al cianuro y la producción de ácidos orgánicos ramificados como productos finales son características propias del músculo del adulto

de *As. suum*. El metabolismo del adulto es similar al de otros helmintos intestinales, caracterizado porque no se produce una oxidación completa de los nutrientes, pero se utilizan algunos componentes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos así como de la cadena de transporte electrónico.

Dentro de las fases parásitas de los helmintos podemos distinguir dos situaciones distintas. Por un lado aquella en la que se fija CO_2 y se dispone de un ciclo de los ácidos tricarbóxicos parcial y en sentido contrario; por otro aquella que se basa principalmente en la glucólisis. Esta división no es estricta y en realidad se solapan ambos tipos. No existe una correlación clara entre el tipo de metabolismo presentado y las relaciones filogenéticas entre los helmintos parásitos. Ni tampoco una correlación obvia entre el nicho que ocupa el parásito y su tipo de metabolismo. Sin embargo, la mayoría de los parásitos intestinales fijan CO_2 , mientras que la mayoría de los fermentadores homolácticos son parásitos sanguíneos o tisulares (Barrett 1981a).

La mayoría de los helmintos parásitos parece que tienen la capacidad tanto de fijar CO_2 como de producir lactato. Así la relación PK/PEPCK puede dar una idea de cual es la principal ruta de utilización *in vivo*, si la actividad de ambas enzimas se ha medido en condiciones óptimas. La PK y la PEPCK son puntos potenciales para la regulación, por lo que debería haber un punto de control al nivel del PEP para regular el flujo metabólico hacia una ruta u otra dependiendo de las condiciones ambientales y fisiológicas. En efecto, existe una correlación bastante buena entre los productos finales del metabolismo de los carbohidratos y la relación PK/PEPCK. Los parásitos que se basan principalmente en la glucólisis presentan una relación que está entre 2 y 10, mientras que aquellos que se basan en la fijación CO_2 presentan una relación que está entre 0,01 y 0,5 (Barrett 1981a).

Algunos autores también sostienen que el tamaño del parásito está correlacionado con el tipo de metabolismo. Los nematodos con una gran sección transversal tienden a ser anaerobios mientras que los pequeños tienen más facilidad para obtener oxígeno a través de la mucosa y pueden ser más aerobios (<http://www.faculty.pnc.edu/jcamp/parasit/nematode.html>).

Por todo esto no es extraño observar que el CO_2 actúa como un estímulo para muchos helmintos parásitos del tracto gastrointestinal en alguna o varias de sus fases de desarrollo. Generalmente afecta a la fase infectiva y le sirve para reconocer el nuevo ambiente al que ha llegado la larva, reactivar su desarrollo al estado adulto en el interior de su hospedador definitivo y cerrar su ciclo vital efectuando la puesta de huevos fertilizados (Rogers 1960; Petronijević et al., 1985; Dávila et al., 2006).

Tabla A2. Relación PK/PEPECK de algunos helmintos parásitos (Barrett 1981a)

Especie	Relación PK/PEPCK	Principal producto final
<i>Ascaris lumbricoides</i>	0,04	2-Metilbutirato, 2-metilvalerato
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	0,05	Propionato, acetato
<i>Moniezia expansa</i>	0,1	Succinato, lactato
<i>Hymenolepis diminuta</i>	0,2	Succinato, lactato
<i>Fasciola hepatica</i>	0,25-0,4	Propionato, acetato
<i>Trichinella spiralis</i> (larva)	0,3	<i>n</i> -Valerato
<i>Moniliformis dubius</i>	0,34	Etanol
<i>Setaria cervi</i>	0,4	Lactato
<i>Dictyocaulus viviparus</i>	1,0	Lactato
<i>Schistocephalus solidus</i> (pleroceroide)	1,7	Acetato, propionato
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	2,0	Lactato
<i>Litomosoides carinii</i>	2,8	Lactato, acetato
<i>Chandlerella hawkingi</i>	8,5	Lactato
<i>Schistosoma mansoni</i>	5-10	Lactato
<i>Dirofilaria immitis</i>	10,6	Lactato

Así muchos nematodos desencadenan la activación del proceso de muda *in vitro* y el consecuente desarrollo a elevadas presiones de CO₂, similares a las que se dan en el tracto gastrointestinal del hospedador (Rogers 1960; Petronijević et al., 1985). Esto mismo se ha visto que ocurre en *H. aduncum* (Iglesias et al., 2002) y en otro anisákido próximo, también acuático, *Anisakis simplex* (Sommerville y Davey 1976; Iglesias et al., 1997; Iglesias et al., 2001). Es más, en *An. simplex* se ha observado que descienden estrepidamente las tasas de muda y supervivencia y no se completa el desarrollo *in vitro* desde L3 hasta adulto cuando no hay un aporte de CO₂ al medio ambiente (aire) en el que se cultiva (Iglesias et al., 1997; Iglesias et al., 2001; Dávila et al., 2006).

Por lo que además de estímulo, aparentemente también es un requerimiento para su desarrollo y supervivencia. De hecho se ve que la actividad de las enzimas fijadoras de CO₂, PEPCK y PEPC, en los parásitos cultivados con CO₂ presentan su mayor actividad durante la M3 y, en general, la actividad siempre es mayor que la exhibida por aquellos parásitos cultivados con aire sin CO₂ añadido (Dávila et al., 2006).

El PEP es un punto clave para el metabolismo de los carbohidratos en helmintos, que está directamente implicado en la asimilación de CO₂ en los helmintos fijadores. Las enzimas que intervienen en la ruta metabólica tras este punto pueden dar una idea de cómo sucede la fijación. Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH), enzima málica (EM), piruvato carboxilasa (PC), piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH) son algunas enzimas relacionadas con el metabolismo del PEP.

3.2. Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), EC: 4.1.1.32

La PEPCK es una carboxilasa que descarboxila OAA y adiciona un grupo fosforilo al sustrato a partir de GTP o ITP, generando PEP (la reacción es reversible).

La PEPCK ha sido una de las enzimas más estudiadas en los parásitos. En protozoos como *Trypanosoma cruzi* (Cataldi de Flombaum et al., 1977; Cazzulo et al., 1980) o *Crithidia fasciculata* (Cazzulo et al., 1980); en acantocéfalos como *Moniliformis dubius* (Cornish et al., 1981); en cestodos como *Hymenolepis diminuta* (Wilkes et al., 1981) o *Moniezia expansa* (Behm y Bryant 1975); y en nematodos como *Setaria digitata* (Banu et al., 1991) o *As. suum*.

La PEPCK de *As. suum* ha sido objeto de varios estudios. van den Bossche y Borgers (Van den Bossche y Borgers 1973) han estudiado la distribución celular de varias enzimas, determinando que la mayor parte se encuentra en el citoplasma (78,1%), y el resto en el núcleo, la mitocondria y los microsomas de *As. suum*. Annabaeva y Soprunov (Annabaeva y Soprunov 1975) determinan las condiciones óptimas para medir la actividad PEPCK en *As. suum* y en *Fasciola hepatica*. Wilkes y colaboradores (Wilkes et al., 1981) purifican la enzima de *Hymenolepis diminuta* y determinan sus propiedades bioquímicas y las condiciones óptimas para la determinación de su actividad. Y Rohrer y colaboradores (Rohrer et al., 1986) la aíslan en *As. suum*, la caracterizan, y estudian su comportamiento frente a diversos efectores como el Mg²⁺, Mn²⁺, ATP, ITP o GTP.

En estudios de fijación de CO₂, la PEPCK ha sido determinada en *Anisakis simplex* durante su desarrollo *in vitro*, desde L3 hasta adulto (Dávila et al., 2006), y en *H. aduncum* durante la muda M3 (Iglesias et al., 2005).

3.3. Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), EC: 4.1.1.31

La PEPC es una carboxilasa capaz de descarboxilar OAA sin utilizar nucleótidos trifosfatados para adicionar fosfato al sustrato, generando PEP (la reacción es irreversible).

Loiseau y colaboradores (Loiseau et al., 1993) purificaron la enzima, midieron su actividad y estudiaron su inhibición en la filaria *Molinema dessetae*.

En *Anisakis simplex*, la PEPC ha sido determinada durante su desarrollo *in vitro* desde L3 hasta adulto (Dávila et al., 2006), y en *H. aduncum* durante la muda M3 (Iglesias et al., 2005).

3.4. Malato deshidrogenasa (MDH), EC: 1.1.1.37

La MDH es una oxidoreductasa que utiliza NAD⁺ y actúa sobre el grupo hidroxilo del malato, generando OAA (la reacción es reversible).

Bueding y Saz (Bueding y Saz 1968) determinan la actividad MDH en músculo de adulto de *As. suum*, y Saz y colaboradores (Saz et al., 1968) la determinan en la L3 completa. Existen tres isoformas citoplasmáticas y otra mitocondrial. Su expresión está diferenciada durante el desarrollo y parece que consta de dos subunidades sujetas a un control genético diferente (Zee y Zinkham 1968). Es un punto de regulación para la síntesis de glucógeno, y es inhibida por el antihelmíntico mebendazol (Tejada et al., 1987). Andrade y colaboradores (Andrade et al., 1983) purifican la MDH citosólica de *To. canis*, y encuentran que es muy poco activa oxidando malato pero no reduciendo OAA con el cual se inhibe a concentraciones elevadas, por lo que aparentemente es muy similar a la de *Ascaris* sp. Además de en estos dos parásitos también se ha estudiado en otros dos ascáridos, *Toxocara cati* y *Toxascaris leonina*, y se ha visto que la isoforma mitocondrial es menos activa, con diferencias de actividad entre sexos (León et al., 1988).

3.5. Enzima málica (EM), EC: 1.1.1.39

La EM es una oxidoreductasa que utiliza NADP⁺ y actúa sobre el grupo hidroxilo del malato, a la vez que lo descarboxila generando piruvato (la reacción es reversible).

Existen numerosos trabajos en los que se determina la actividad enzimática de la EM en dirección descarboxilante sobre diversos organismos. Todos ellos coinciden en la necesidad de la presencia de NADP⁺ (EC: 1.1.1.40) como cofactor enzimático, que en el transcurso de la reacción se reduce a NADPH. McKelvey y Fioravanti (McKelvey y Fioravanti 1984; McKelvey y Fioravanti 1985) determinan los requerimientos y la actividad de esta enzima en dirección descarboxilante para *Hymenolepis diminuta* llegando a la conclusión de que es necesario la presencia del sistema NADPH:NAD⁺ transhidrogenasa para que la EM pueda funcionar, al igual que ocurre en la filaria *Se. digitata* (Unnikrishnan y Raj 1995). Fioravanti (Fioravanti 1982) determina la necesidad de la presencia de NADPH para la actuación de la EM de *Hymenolepis microstoma*, al igual que ocurre en bacterias como *Escherichia coli* (Brown y Cook 1981) o en protozoos como *Trypanosoma cruzi* (Cazzulo et al., 1977).

Pero la EM juega también un papel importante en la fijación de CO₂, y en este sentido existen trabajos que hacen referencia a ello. Cataldi de Flombaum y colaboradores (Cataldi de Flombaum et al., 1977) y Cazzulo y colaboradores (Cazzulo et al., 1980) determinan la actividad enzimática de la EM en dirección carboxilante para *Trypanosoma cruzi* y *Cr. fasciculata*, utilizando NADPH como cofactor enzimático que se oxidaría a NADP⁺. Sin embargo, en un parásito cercano filogenéticamente a *H. aduncum*, como es *As. suum*, se ha comprobado que la EM es dependiente de NADH, como se ha comentado anteriormente, tanto en sentido carboxilante como descarboxilante, hecho que podría tener alguna implicación para la EM de *Ascaris* sp. como blanco farmacológico, y por ello es objeto de numerosos estudios. También se ha determinado el mecanismo cinético de la enzima (Landsperger et al., 1978; Park et al., 1984;

Mallick et al., 1991) y su localización mitocondrial (Köhler et al., 1983). Además juega un papel muy importante en la regulación de las reacciones de la dismutación del malato en la mitocondria (Landsperger y Harris 1976).

3.6. Piruvato carboxilasa (PC), EC: 6.4.1.1

La PC es una ligasa que carboxila piruvato e hidroliza ATP (la reacción es reversible).

La PC parece poco frecuente en helmintos, y sólo se ha detectado una actividad muy baja en los cestodos *M. expansa* y *Echinococcus granulosus*. No ha sido detectada en *As. suum* (Barrett 1981a) ni en *An. simplex* (Dávila et al., 2006).

3.7. Piruvato quinasa (PK), EC: 2.7.1.40

La piruvato quinasa es una transferasa que fosforila al grupo hidroxilo del piruvato a partir de ATP (la reacción es irreversible).

Bueding y Saz (Bueding y Saz 1968) determinan la actividad PK en músculo de adulto de *As. suum* y en otros parásitos como *Hymenolepis diminuta* y *Schistosoma mansoni*. Saz y colaboradores (Saz et al., 1968) la determinan en la L3 completa de *As. suum*, siendo similar a la del adulto. En *Trichinella spiralis* se ha visto que está implicada, junto con la PEPCK y la isocitrato deshidrogenasa, en la regulación del cambio de metabolismo anaerobio a aerobio cuando la larva infectiva entra en el hospedador. Cuando el hospedador muere, la larva se libera de la célula nodriza y se expone al contenido estomacal de otro hospedador, estas actividades y su patrón de expresión cambian (Janssen et al., 1998). En *Ca. elegans* se ha visto que los niveles elevados de PK junto con otras enzimas están relacionados con la regulación de las rutas que se dan durante el metabolismo anaerobio en la fase de resistencia, la larva dauer (Holt y Riddle 2003). El antihelmíntico centperazina para filarias inhibe la PK y otras enzimas del metabolismo de carbohidratos en *Setaria cervi* (Hussain et al., 1990).

3.8. Lactato deshidrogenasa (LDH), EC: 1.1.1.27

La LDH es una oxidorreductasa que utiliza NAD⁺ y actúa sobre el grupo hidroxilo del lactato, generando piruvato (la reacción es reversible).

Bueding y Saz (Bueding y Saz 1968) determinan la actividad LDH en músculo de adulto de *As. suum*, y Saz y colaboradores (Saz et al., 1968) la determinan en la L3 completa, y observan que la actividad es sustancialmente menor que en el adulto, a pesar de la poca cantidad de lactato que aparece como producto final del metabolismo de los carbohidratos del

ascárido. Zenka y Prokopic (Zenka y Prokopic 1983) miden su actividad en el fluido perientérico del adulto y ven que es muy similar a la que se halla en el suero humano. Lee (Lee 1969) determina la actividad durante el desarrollo de huevos fertilizados de *As. lumbricoides* y encuentra que la mayor actividad se da en el estadio de mórula. El filaricida centperazina también inhibe la LDH en *Se. cervi* (Hussain et al., 1990).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Las larvas de tercer estadio del parásito *Hysterothylacium aduncum* empleadas en nuestros estudios se han recogido de jurel (*Trachurus trachurus*), un hospedador natural de este nematodo. Los jureles se han adquirido en Mercadona (de Granada y Almería). El pescado procedía del puerto de Vigo y fue capturado en el Atlántico Nororiental.

1.1. Aislamiento e identificación de los parásitos

Una vez en el laboratorio, con ayuda de unas pinzas y tijeras apropiadas, se realiza una disección completa de los jureles siguiendo la línea alba desde el ano, pasando por el abdomen, hasta la cavidad torácica. A continuación se extrae el tracto digestivo y el contenido de la cavidad corporal, que se depositan en una placa de Petri con solución salina de NaCl al 0,9%, a una temperatura de 6-8 °C, para su examen. Tras unos 30 minutos, con un pincel y una aguja enmangada se procede al aislamiento y recogida de las larvas de *H. aduncum* libres en la placa. Seguidamente todos los parásitos se lavan varias veces con solución salina en una nueva placa de Petri, luego se colocan en un pocillo alemán y se procede a su identificación con ayuda de un microscopio estereoscópico. Las L3 de *H. aduncum* se identifican observando los labios y diente en la zona cefálica y la espina en la zona caudal característicos de L3, la morfología de esófago y ventrículo, así como el tamaño del apéndice ventricular y del ciego intestinal que son ligeramente desiguales (figura M1).

1.2. Axenización de los parásitos

Una vez aislados e identificados los parásitos, deben ser axenizados pues contienen gran cantidad de microorganismos que pueden crecer y multiplicarse en el medio de mantenimiento, afectando al desarrollo normal del parásito.

El proceso de axenización se realiza en la cámara de flujo laminar. Para ello se dispone una batería de pocillos alemanes, previamente enjuagados con etanol de 70°, añadiendo en cada uno 2 ml de solución antibiótica y antimicótica.

Con la ayuda de una aguja enmangada dispuesta a modo de anzuelo, se depositan y se dejan sumergidas en cada pocillo con la solución antibiótica y antimicótica hasta 10 larvas, durante 30 min al cabo de los cuales el parásito está listo para su pase a un medio de mantenimiento estéril.

Para la axenización de los parásitos se ha empleado una solución antibiótica y antimicótica con la siguiente composición para un volumen de 10 ml (Iglesias et al., 1997) :

Sulfato de gentamicina	80 mg
Anfotericina B	0,625 mg
Penicilina G sódica	10000 U.I.
Sulfato de estreptomicina	10 mg
PBS (Phosphate-Buffered Saline)*	c.s.p. 10 ml

(*) Composición PBS: NaCl 137 mM + KCl 2,7 mM + NaH₂PO₄ 1,4 mM + Na₂HPO₄ 4,3 mM (pH 7,4)

Una vez preparada, se esteriliza por filtración, con filtros esterilizados montados con membranas de un tamaño de poro de 0,22 µm de diámetro. Todo el proceso se realiza en el interior de una cámara de flujo laminar. Después se recoge en alícuotas de 10 ml que se congelan a -20 °C y protegidas de la luz.

2. CULTIVO DE *Hysterothylacium aduncum*

2.1. Medio de cultivo

El medio para el cultivo de los parásitos es RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 20% (v/v) inactivado por calor (56 °C durante 30 min), al que se añade pepsina (EC: 3.4.23.1) comercial (en polvo, de la casa Guinama, Valencia, España) al 1% p/v, a pH 4,0 ajustado con HCl comercial (diluido) (Iglesias et al., 2002). Una vez preparado el medio se esteriliza por filtración, con filtros esterilizados montados con membranas de un tamaño de poro de 0,22 µm de diámetro. Todo el proceso se realiza en el interior de una cámara de flujo laminar. Se recoge en frascos de vidrio borosilicado de alta pureza con ausencia absoluta de iones pesados, previamente esterilizados en el autoclave. Se congela a -20 °C hasta su empleo tras tomar una muestra control. La muestra control (1 ml por cada 100 ml de medio preparado) se coloca en tubos estériles de 30 ml con falda y fondo cónico, se incuba a 37 °C durante 72 horas. Pasado este tiempo se extrae con cuidado una gota del medio incubado, y se examina entre porta y cubreobjetos en el microscopio óptico. Si se observa la presencia de microorganismos se deberá repetir la filtración hasta que el control de negativo.

2.2. Cultivo *in vitro* de los parásitos

La cámara de flujo laminar es uno de los elementos más importantes para que se lleve a buen término, tanto la preparación de los medios de cultivo y solución antibiótica y antimicótica, como la propia puesta en cultivo de los parásitos. Por ello es muy importante su limpieza frecuente y en general su mantenimiento en condiciones asépticas.

Es aconsejable que antes de su utilización se limpie con un germicida, o en su defecto, con etanol de 70° e irradiarla con luz ultravioleta desde una hora antes de trabajar.

Además de todo ello, se dispone de un mechero de gas que permanece encendido para asegurar la esterilidad de los objetos con que se trabaja.

El mantenimiento se realiza en una placa estéril de poliestireno (casa TPP, Trasadingen, Suiza) de 24 pocillos, con una capacidad máxima de 3 ml cada uno. Con la ayuda de una jeringa y aguja estériles de un solo uso, se extrae la alícuota de medio de cultivo que se va a utilizar y con sumo cuidado se reparte 1 ml por pocillo.

Una vez dispuesto el medio, en cada uno de los pocillos se añaden 10 µl de solución antibiótica y antimicótica mediante una jeringa de 1 ml, con el objeto de eliminar posibles contaminaciones producidas en el transcurso de las operaciones, o procedentes del parásito. A continuación se deposita un parásito por pocillo con la ayuda de una aguja enmangada a modo de anzuelo, que se conserva en metanol. Después se tapa la placa previo ligero flameado.

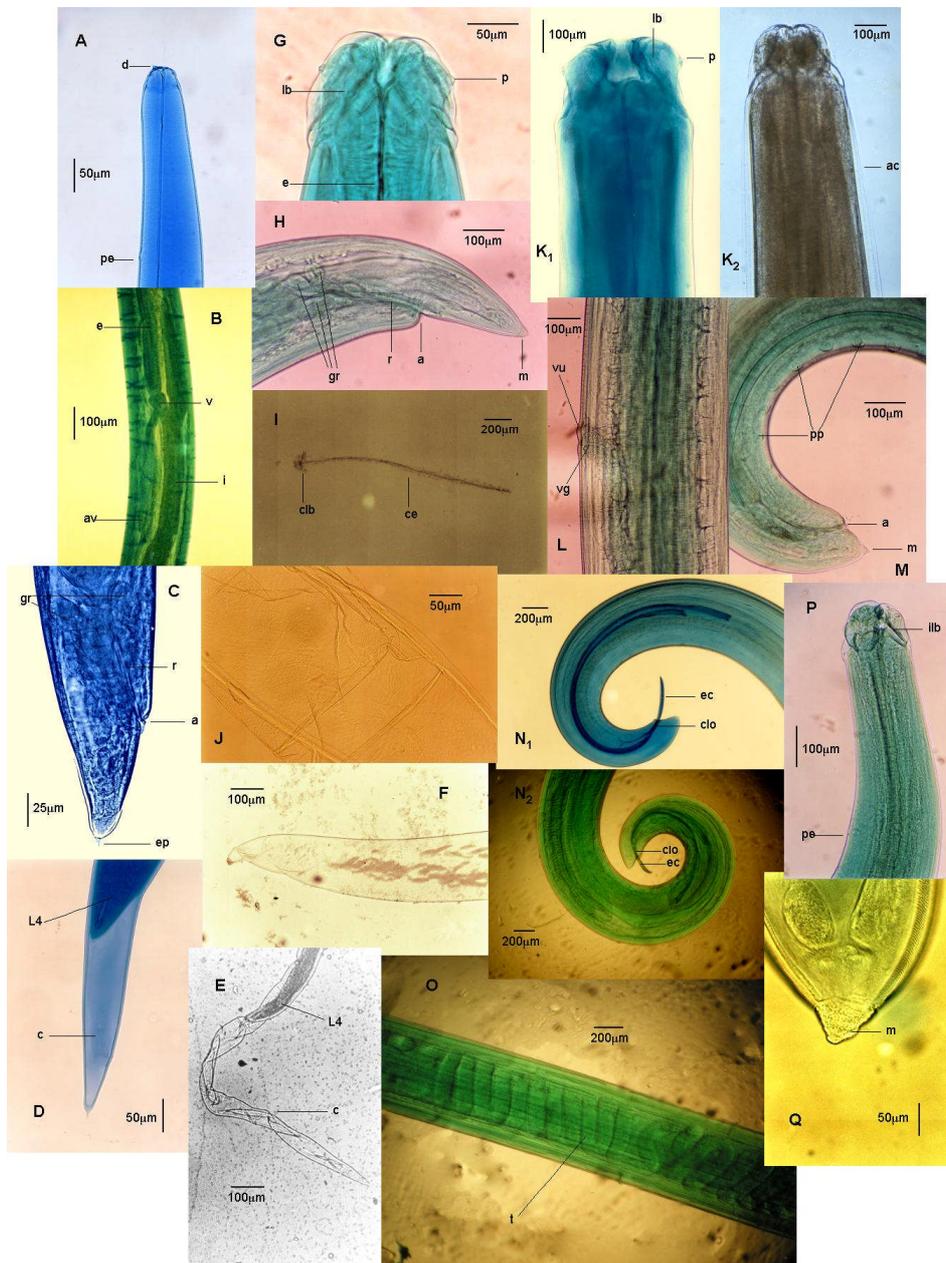
Es conveniente, antes de realizar cualquier operación que implique peligro de contaminación, realizar un rápido flameado del material teniendo en cuenta su resistencia térmica.

Como consecuencia del consumo de nutrientes y sobre todo por el vertido de los productos de deshecho del parásito, se hace necesaria una renovación semanal del medio de cultivo (Iglesias et al., 2002); el medio agotado se retira con una pipeta Pasteur estéril y se repone medio fresco con el procedimiento anteriormente descrito.

A cada parásito se le sigue el crecimiento y desarrollo para asegurarnos de que está aparentemente sano a la hora de tomarlo como muestra y en la fase de desarrollo que se busca. Este seguimiento se hace observándolo 2-3 veces a la semana y antes de cambiarle el medio, mediante un microscopio óptico invertido. Se observa la movilidad, evolución y estado de desarrollo de cada uno de los parásitos. Si observamos que el parásito tiene alguna estructura dañada o lesionada se descarta.

En el comienzo del cultivo todas las larvas utilizadas se encuentran en el tercer estadio larvario (L3). Los parásitos que pasan al cuarto estadio larvario (L4), tras la tercera muda (M3), se identifican en el mismo pocillo donde son cultivados por las características morfológicas diferenciadoras con respecto a la L3, como carencia del diente, mucrón con muchas espinas, cutícula con algo más de relieve en sus estriaciones, labios más desarrollados, presencia de interlabios, entre otras (Petter y Maillard 1988), así como la presencia de los restos de la cutícula de L3, procedentes de la ecdisis, en el fondo del pocillo.

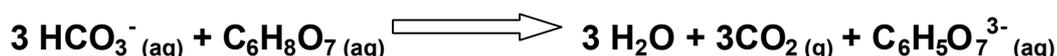
Figura M1. Características de *H. aduncum*. **A)** Parte anterior de la L3. **B)** Ciego intestinal y apéndice ventricular de la L3. **C)** Parte posterior de la L3. **D)** Parte posterior de una larva durante la M3. **E)** Larva desprendiéndose de la cutícula de la M3. **F)** Cutícula procedente de la M3. **G)** Parte anterior de la L4. **H)** Parte posterior de la L4. **I)** Cutícula de labios, boca y esófago procedente de la M4. **J)** Cutícula procedente de la M4. **K₁)** Parte anterior del adulto. **K₂)** Alas cervicales en la parte anterior del adulto. **L)** Detalle de la vulva y la vagina de una hembra adulta. **M)** Papilas en la parte posterior de un macho adulto. **N₁)** y **N₂)** Espículas en la parte posterior de dos machos adultos. **O)** Testículo en una macho adulto. **P)** Interlabio y poro excretor en el adulto. **Q)** Parte posterior del adulto. (a: ano; ac: ala cervical; av: apéndice ventricular; c: cutícula; ce: cutícula del esófago; ci: ciego intestinal; clb: cutícula de los labios; clo: cloaca; d: diente; e: esófago; ec: espícula; ep: espina; gr: glándulas rectales; i: intestino; ilb: interlabio; lb: labio; m: mucrón; p: papila; pp: papilas preanales; pe: poro excretor; r: recto; t: testículo; v: ventrículo; vg: vagina; vu: vulva). Fuente (Iglesias 1999; Iglesias et al., 2002).



El paso a la última fase de desarrollo, adulto, se detecta por la presencia de los restos de la ecdisis de la M4, por el mayor desarrollo de los labios y una cutícula con la estriación más pronunciada.

El desarrollo típico del parásito en cultivo *in vitro* suele ocurrir del siguiente modo: se siembra la L3 recién aislada del hospedador; entre los 4 y 6 días siguientes muda a L4; el adulto juvenil surge tras la M4 que sufre la L4 después de entre 18 y 25 días en cultivo; el adulto juvenil tras 35 días de iniciar el cultivo ya ha madurado.

El cultivo tiene lugar en un incubador a 15 °C, en humedad y con una atmósfera modificada con un 5% de CO₂, lo cual se consigue poniendo las placas en el incubador dentro de un recipiente de cierre hermético, junto a un vaso con agua, en el que se disuelven el NaHCO₃ y el ácido cítrico necesarios. Para obtener una presión de CO₂ del 5% hacen falta 2,08 mmoles de CO₂ por litro de aire, lo que se consigue con 2,08 mmoles de NaHCO₃ y 0,69 mmoles de ácido cítrico por litro de aire. La reacción es la siguiente:



2.3. Tratamiento aplicado a los parásitos para los experimentos de actividad proteolítica

Para medir las distintas actividades proteolíticas se han recogido o cultivado y recuperado parásitos en los siguientes tiempos y fases larvarias:

- Larva 3 recién aislada del hospedador (L3 0h)
- Larva 3 tras 48 horas en cultivo (L3 48h)
- Larva 4 tras 14 días en cultivo (L4)
- Adulto juvenil tras 21 días en cultivo (L5J)
- Adulto maduro tras 42 días en cultivo (L5)

Además, para comprobar si la presencia de pepsina en el medio de cultivo afecta a la actividad proteolítica, se hizo un control en el que se mantuvieron los parásitos en cultivo sin pepsina durante la última semana antes de recogerlos. Para el control de la L3 48h, se mantuvieron sin pepsina desde el inicio del cultivo hasta su recogida a las 48 horas.

Los parásitos, tras recogerlos del cultivo se lavan durante 20 min en solución salina (NaCl al 0,9% p/v) y se congelan a -80° C. La L3 recién aislada del hospedador (L3 0h), como no se pone en cultivo se mantiene en solución salina (a 6-8 °C) hasta su identificación en el microscopio estereoscópico, tras lo cual se congela a -80° C.

2.4. Tratamiento aplicado a los parásitos para los experimentos de fijación de CO₂

Para medir la actividad de enzimas relacionadas con la fijación de CO₂ se han recogido o cultivado y recobrado parásitos en los siguientes tiempos y fases larvarias:

- Larva 3 recién aislada del hospedador (L3 0h)
- Larva 3 tras 48 horas en cultivo (L3 48h)
- Larva 4 tras 12 días en cultivo (L4)
- Adulto juvenil tras 26 días en cultivo (L5J)
- Adulto maduro tras 61 días en cultivo (L5)

Los parásitos, tras tomarlos del cultivo, se lavan durante 20 min en solución salina (NaCl al 0,9% p/v) y se congelan a -80° C. La L3 recién aislada del hospedador (L3 0h), como no se pone en cultivo se mantiene en solución salina (a 6-8 °C) hasta su identificación en el microscopio estereoscópico, tras lo cual se congela a -80° C.

3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SOLUBLE DE *Hysterothylacium aduncum*

3.1. Obtención del extracto soluble para los experimentos de actividad proteolítica

Los experimentos de actividad proteolítica se llevaron a cabo en su mayor parte en el laboratorio del Dr. Manuel Díaz López (área de Zoología del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad de Almería). La técnica de obtención del extracto fue esencialmente igual a la descrita para los experimentos de fijación de CO₂, pero hay algunas variaciones con respecto a ésta.

La homogeneización se hizo con agua desionizada en lugar de tampón. Primero se disgregó la muestra con un pistón de teflón, luego se añadió el agua y seguidamente se sonicó para homogeneizar completamente. La sonicación fue a 15 micrones de amplitud, dando un pulso cada segundo por cada 10 µl de agua añadida para hacer el extracto, y en baño de hielo. La cantidad de agua y el número de parásitos varió según el ensayo previamente puesto a punto. Terminada la homogeneización se procedió a una separación en una microfuga a 18000 g durante 30 min y a 4 °C. Tras el centrifugado se recoge el sobrenadante, en el cual se encuentra la fracción soluble citosólica.

Tras la obtención del extracto, se procedió inmediatamente a la determinación de la actividad proteolítica correspondiente. El volumen de extracto utilizado para cada ensayo se

decidió mantener fijo, en lugar de adicionar una cantidad de proteína fija. Esto fue así debido al estrecho margen para variar la cantidad de extracto que se añade a los ensayos, en las placas de microtitulación en las que se realizaron las determinaciones de actividad proteolítica; y para no afectar a la estabilidad de la actividad enzimática del extracto con el paso del tiempo debido a la gran cantidad de muestras que se había de procesar en una misma sesión. Como todos los extractos se preparaban con la misma cantidad de parásitos por volumen de agua, eran de esperar concentraciones similares de proteína para todos los extractos. Luego se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford (Bradford 1976), con un reactivo de elaboración propia. Para un volumen total de 500 ml la composición es la siguiente:

Azul Coomassie® G	50 mg
Etanol	25 ml
H ₃ PO ₄ (85%)	50 ml
NaOH (1 N)	25 ml
H ₂ O	c.s.p. 500 ml

La concentración de proteínas se determinó mediante un espectrofotómetro lector de placas de microtitulación. Se utilizó para determinar la concentración una recta patrón con albúmina bovina que fue desde 25 hasta 500 µg/ml con 7 diluciones distintas, de las cuales se ponían 10 µl, a las que se les añadieron 190 µl del reactivo de Bradford, hasta un volumen final de 200 µl. Se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min y después se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una λ de 595 nm. A continuación se llevó a cabo la medida de las muestras problema del extracto. El procedimiento fue el mismo, y se utilizaron diluciones 1/40 y 1/20 de los extractos de L3 0h (30 individuos/ml extracto), L3 48h (25 individuos/ml extracto), L4 (12 individuos/ml extracto), L5J (6 individuos/ml extracto) y L5 (3 individuos/ml extracto).

La curva patrón de albúmina se ajusta mediante una regresión lineal de Y en X, quedando una expresión del tipo: $y = mx + b$. Siendo Y la variable absorbancia (A) y X la variable concentración de albúmina (en mg/ml). Así, para hallar la concentración de proteína (en mg/ml) en cada dilución de la muestra problema deberemos realizar la siguiente operación:

$$P = (A - b)/m$$

Donde:

P: concentración de proteína, en mg/ml.

A: absorbancia.

b: ordenada en el origen de la curva patrón de albúmina.

m: pendiente de la curva patrón de albúmina.

3.2. Obtención del extracto soluble para los experimentos de fijación de CO₂

El extracto soluble se obtuvo por homogeneización y centrifugación. Para la homogeneización se pusieron los parásitos necesarios en un tubo Eppendorf que se colocó en hielo picado. Luego el tubo se ató con un sedal para pesca de nailon y se sumergió en nitrógeno líquido durante 20 segundos. Después se descongeló y se disgregó y homogeneizó la muestra con un pistón de teflón apropiado. Seguidamente se adicionaron 0,1 ml de tampón Tris: Sacarosa: Glutación (0.01M:0.25M:0.001M) pH 7,4 (Vargas Morales 1978). Se realizaron tres ciclos de congelación y descongelación, y al final se añadieron 0,4 ml más de tampón (0,5 ml en total), manteniéndose siempre durante el proceso y hasta su utilización en hielo picado. El extracto obtenido se centrifugó a 45000 g durante 30 min y a 4 °C. Tras el centrifugado nos quedamos con el sobrenadante, que contiene la fracción soluble citosólica.

Se determinó la concentración de proteína mediante la técnica de Bradford (microensayo) (Bradford 1976). Se utilizó para determinar la concentración una recta patrón con albúmina bovina que iba desde 1 hasta 25 µg/ml con 5 diluciones distintas en un volumen de 0,8 ml, a las que se añade el reactivo de Bradford (comercial), hasta un volumen final de 1 ml. Se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y después se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una λ de 595 nm. Tras esto, se realizó la medida de las muestras problema del extracto. El procedimiento fue el mismo y se utilizaron diluciones 1/200, 1/100 y 1/50 de los extractos de L3 0h (20 individuos), L3 48h (15 individuos), L4 (10 individuos) y L5J (5 individuos); y para los extractos de L5 (5 individuos) diluciones 1/400, 1/200 y 1/100. La concentración se halló de igual modo que en el caso anterior.

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LOS EXPERIMENTOS DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

4.1. Curva de pH para la actividad proteasa general con un sustrato fluorógeno

Las curvas de pH se han hecho con el sustrato fluorógeno BODIPY[®] TR-X caseína (Molecular Probes-Invitrogen). Este sustrato es un derivado de la caseína conjugado con un fluoróforo (BODIPY[®] TR-X) emisor de fluorescencia roja, e insensible a los cambios de pH. Se prepara (viene liofilizado) en una solución madre a una concentración de 1 mg/ml en bicarbonato sódico 100 mM (pH 8,3) y azida sódica 2 mM y se conserva a 4 °C durante un máximo de cuatro

semanas. Se utiliza el par de longitudes de onda de 584 nm (excitación) y 620 nm (emisión) para medir la fluorescencia generada.

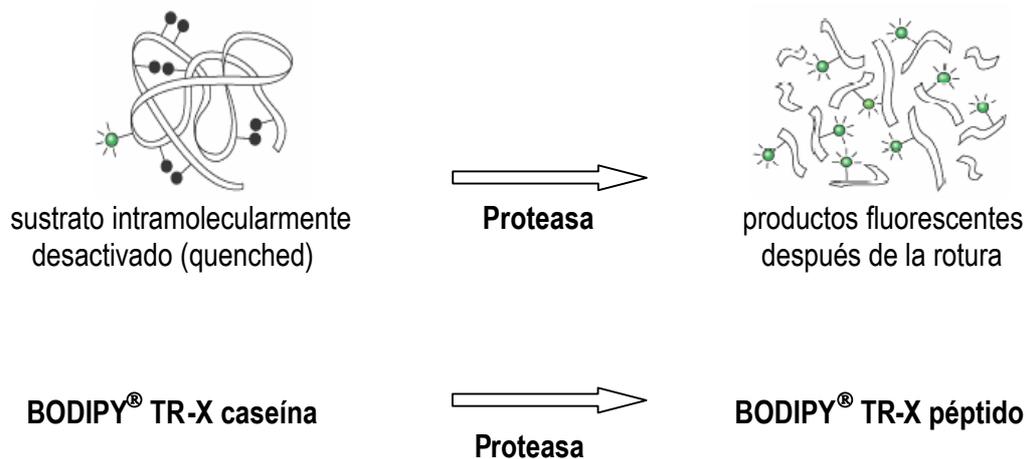
Se ha hecho cada curva de pH de actividad proteasa general desde pH 2,0 hasta 7,5, a intervalos de medio punto de pH. Se utilizó un sistema discontinuo de tampones, después de haber puesto a punto la técnica con distintos sistemas de tamponado, basada en el protocolo suministrado por la casa Molecular Probes-Invitrogen. Como ningún tampón ofrecía un intervalo efectivo de tamponamiento suficientemente amplio para cubrir todo el rango de pH requerido (pH 2,0-7,5), en la puesta a punto se probaron varios tampones, y se eligieron aquellos con los que más actividad se medía. Aunque los intervalos de pH de cada tampón no se solapan, en la puesta a punto sí se solaparon y se comprobó que no se dieran cambios bruscos en la medida de actividad al cambiar de un tampón a otro. Los distintos tampones seleccionados son los siguientes (Stoll y Blanchard 1990):

- pH 2,0-4,0: Gly-HCl 50 mM
- pH 4,5-5,5: AcOH:AcO⁻ 50 mM
- pH 6,0-6,5: Na₂HPO₃:NaH₂PO₃ (tampón fosfato) 50 mM
- pH 7,0-7,5: Tris-HCl 50 mM

Estos mismos tampones también se han preparado añadiéndoles DTT en una concentración de 6,5 mM. El DTT es un agente que crea un ambiente reductor propicio para la acción de las cisteín proteasas (Sarath et al., 2001). En la puesta a punto del método se probaron también los siguientes tampones: tampón cacodilato 50 mM (pH 5,5-7,5), tampón citrato 50 mM (pH 5,5-6,5), PIPES 50 mM (pH 6,0-6,5) y tampón fosfato 50 mM (pH 7,0-7,5).

Cada ensayo se ha realizado en placas de microtitulación negras para fluorescencia, con un volumen final de 200 µl, a 37 °C, haciendo lecturas (Ex:584nm/Em:620nm) cada 2 minutos, durante al menos, 100 minutos. El BODIPY TR-X caseína se prepara en una solución extemporánea con el tampón que se vaya a utilizar para cada ensayo.

La técnica se fundamenta en que la proteína que actúa como sustrato (caseína) tiene unidos una serie de grupos de un compuesto fluorescente (BODIPY TR-X) a lo largo de toda la molécula, y al quedar cerca unos de otros se evita la emisión de fluorescencia (desactivado - quenched-). Cuando las distintas proteasas digieren la caseína se generan pequeños péptidos con el grupo fluorescente, que al quedar alejados de los otros grupos son capaces de emitir fluorescencia al ser excitados.



Fuente: Molecular Probes-Invitrogen

A continuación se indica el protocolo seguido para llevar a cabo la reacción, en el que se exponen los reactivos en el orden en que son añadidos. Para un volumen final de 200 μ l:

Solución madre	Blanco (μ l)	Muestra (μ l)	Concentración final
Extracto	0	20	
H ₂ O	20	0	
Tampón (0,05M)	80	80	44,75 mM
BODIPY TR-X caseína (10 μ g/ml)	100	100	5 μ g/ml

El DTT queda a una concentración final de 5,8 mM en los ensayos en que se usa. El sustrato está disuelto en tampón.

La concentración de proteína del extracto es variable, ya que se decidió poner un volumen fijo para los todos los extractos, sin diluir (ver apartado IV 3.1.).

- Cálculos:

Para calcular la actividad del extracto se toman los primeros 60 min de la recta resultante tras representar la fluorescencia (URF) frente al tiempo (min), y se calcula la pendiente (Δ URF/min), y realizando además los siguientes cálculos:

$$A_{enz} = \frac{\Delta URF/t}{V \cdot P}$$

Donde:

Aenz: actividad enzimática, dada en unidades relativas de fluorescencia (URF) por minuto y mg de proteína (URF/min · mg).

ΔURF: variación de las unidades relativas de fluorescencia durante la reacción.

t: tiempo transcurrido para la variación de URF, en minutos.

V: volumen del extracto añadido, en ml.

P: cantidad de proteína por volumen de extracto, en mg prot/ml.

4.2. Ensayos de inhibición a distintos pH con un sustrato fluorógeno general para proteasas

Se han hecho ensayos de inhibición con distintos inhibidores específicos del mecanismo de la reacción de hidrólisis del enlace peptídico. Los ensayos de inhibición se han llevado a cabo con el mismo sustrato que las curvas de pH, el fluorógeno BODIPY TR-X caseína, y basándose en las mismas indicaciones para medir la actividad proteolítica (ver apartado IV 4.1.). La metodología para medir la inhibición se ha diseñado basándose en modificaciones hechas sobre los métodos descritos por Salvesen (Salvesen y Nagase 2001), Beynon (Beynon y Salvesen 2001) y García Carreño (García-Carreño 1992).

Las inhibiciones se han llevado a cabo a pH 3,0, 4,0, 5,5 y 7,0. Se han elegido estos pH porque se corresponden con los óptimos de actividad proteolítica observados en los resultados de las curvas de pH con los sustratos BODIPY TR-X caseína, Z-RR-AMC, Z-FR-AMC y DQ-colágeno tipo I (ver apartados V 1.1., V 1.3. y V 1.4.), excepto el pH 3,0. Este pH se ha escogido para obtener más datos sobre la actividad de las proteasas aspárticas en la región más ácida, y ante nuestra falta de disponibilidad de sustratos específicos para éstas, se ha optado por un ensayo de inhibición con PpA.

Se han utilizado tres inhibidores específicos para el mecanismo de acción de proteasas (aspárticas, cisteínicas y serínicas), y un quelante de cationes principalmente divalentes (para las metaloproteasas). Los tres inhibidores son el pepstatín A (para peptidasas aspárticas; reversible; probado a pH 3,0, 4,0 y 5,5), el E64 (para las cisteín proteasas; irreversible; con DTT en el medio; probado a pH 4,0, 5,5 y 7,0) y el AEBSF (para las serín proteasas; irreversible; probado a pH 5,5 y 7,0). El inactivador es la 1,10-fenantrolina (quela cationes divalentes necesarios para las metaloproteasas; empleado a pH 4,0, 5,5 y 7,0).

Para cada ensayo de inhibición se ha preparado un control con una enzima sobre la que actúe el inhibidor, al mismo pH. Para los ensayos con pepstatín A se ha utilizado como control pepsina (EC: 3.4.23.1); para E64 se ha utilizado papaína (EC: 3.4.22.2); para AEBSF, α -quimotripsina (EC: 3.4.21.1); y para 1,10-fenantrolina, termolisina (EC: 3.4.24.27). Los tampones utilizados para estas enzimas han sido los mismos que los empleados en el ensayo al que controlan, salvo para la quimotripsina y la termolisina que requieren la presencia de iones calcio para su actividad. La quimotripsina requiere que en el tampón haya CaCl_2 a 20 mM, y la termolisina a 1 mM.

El pepstatín A se prepara a 4 mM en metanol y calentando; la 1,10-fenantrolina a 400 mM en metanol; de este modo, en el ensayo, el metanol queda a una concentración final de 0,5% (v/v).

Los ensayos de inhibición requieren que el inhibidor se incube durante el mismo tiempo que se vaya a dejar transcurrir la reacción o al menos durante 45 min a temperatura ambiente, antes de añadir el sustrato e iniciar la reacción. Esto tiene como finalidad que el inhibidor se una al centro activo de su proteasa diana y sature los centros activos libre de la competencia del sustrato. Se incuban tanto los ensayos con inhibidor como los que no lo llevan (actividad total y enzimas control) para que todos estén en las mismas condiciones.

La inhibición se mide en porcentaje de actividad mostrada en presencia del inhibidor respecto a la actividad medida sin éste. Para ello se miden ambas a la vez.

Salvo estas nuevas consideraciones el ensayo se fundamenta y se realiza igual que un ensayo de actividad proteasa general.

A continuación se indica el protocolo seguido para llevar a cabo la reacción, en el que se exponen los reactivos en el orden en el que son añadidos. La concentración de proteína del extracto es variable, ya que se decidió poner un volumen fijo para los todos los extractos, sin diluir (ver apartado IV 3.1.). El protocolo a seguir es el siguiente, para un volumen final de 200 μ l:

Solución madre	Blanco actividad (μl)	Muestra actividad (μl)	Blanco inhibición (μl)	Muestra inhibición (μl)	Concentración final
Extracto o Enzima control: - Pepsina (640 U/ml) - Termolisina (8,4 U/ml) - Papaína (2,4 U/ml) - Quimotripsina (10 U/ml)	0	20	0	20	64 U/ml 0,84 U/ml 0,24 U/ml 1 U/ml
H ₂ O	20	0	20	0	
Solvente del inhibidor: - H ₂ O - MetoH _(aq) (5% v/v)	20	20	0	0	0,5 %
Inhibidor: - PpA (0,0002 M) - PHEN (0,02 M) - E64 (0,0005 M) - AEBSF (0,01 M)	0	0	20	20	0,02 mM 2 mM 0,05 mM 1 mM
Tampón (0,05M)	60	60	60	60	39,75 mM
(Incubación)		(45 min)			
BODIPY TR-X caseína (10 μg/ml)	100	100	100	100	5 μg/ml

Los ensayos para E64 y sus controles (tanto la actividad normal como su enzima control) llevan DTT en el tampón, que queda a una concentración final de 5,2 mM. El sustrato está disuelto en tampón.

- Cálculos:

Para calcular el porcentaje de inhibición se realizan las siguientes operaciones sobre las actividades del extracto obtenidas sin inhibidor y con inhibidor:

$$\%I = 100 - \left(\frac{\Delta URF_i/t}{\Delta URF_A/t} \times 100 \right)$$

Donde:

%I: porcentaje de inhibición.

ΔURF_i : variación de las unidades relativas de fluorescencia en presencia del inhibidor.

ΔURF_A : variación de las unidades relativas de fluorescencia en ausencia del inhibidor.

t: tiempo transcurrido para la variación de URF, en minutos.

4.3. Curvas de pH con sustratos fluorógenos específicos para catepsinas B (EC: 3.4.22.1) y B/L (EC: 3.4.22.15)

Para medir la actividad específica se puso a punto el método basándose en los trabajos de Dalton (Dalton et al., 1996) y Loukas (Loukas et al., 1998). Las curvas de pH se han realizado con dos sustratos fluorógenos distintos, uno específico para catepsina B, el Z-RR-MCA, y otro específico para catepsinas B y L, el Z-FR-MCA (Molecular Probes-Invitrogen). Estos sustratos son derivados peptídicos de la AMC, emisor de fluorescencia verde. Se preparan disolviéndolos en DMSO a 10 mM, de modo que en el ensayo el DMSO queda a una concentración final del 1% (v/v). Se utiliza el par de longitudes de onda de 355 nm (Ex) y 460 nm (Em) para medir la fluorescencia generada.

Se ha hecho cada curva de pH de actividad catepsina B desde pH 3,0 hasta 7,0, y con el sustrato para catepsinas B y L desde pH 3,0 hasta 8,0, a intervalos de medio punto de pH. Se utilizó un sistema discontinuo de tampones, pues ninguno ofrecía un intervalo efectivo de tamponación suficientemente amplio para cubrir todo el rango de pH requerido y se equilibró la fuerza iónica (I) de todos los tampones con NaCl hasta 0,25 M (Dalton et al., 1996; Yasuda et al., 1999). La fuerza iónica de una solución se calcula con la siguiente fórmula:

$$I = 1/2 \sum_{i=1}^n Z_i^2 c_i$$

Donde:

Z_i: carga de cada especie iónica *i* en solución.

c_i: concentración de cada especie iónica *i* en solución, en mol/l.

Todos los tampones llevaban DTT a 1mM. Los distintos tampones utilizados para cubrir todo el intervalo de pH en el que se ha medido la actividad son los siguientes:

- pH 2,0-3,5: Gly HCl 100 mM + DTT (1 mM) + NaCl (I=0,25)
- pH 4,0-5,5: AcOH:AcO⁻ 100mM + DTT (1 mM) + NaCl (I=0,25)
- pH 6,0-8,0: Na₂HPO₃:NaH₂PO₃ (tampón fosfato) 100 mM + DTT (1 mM) + NaCl (I=0,25)

En la puesta a punto del método se ha hecho una curva de velocidad variando la concentración de sustrato (Z-RR-MCA o Z-FR-AMC) desde 2,5 hasta 200 μM a pH 5,5.

Cada ensayo se ha realizado en placas de microtitulación negras para fluorescencia, en un volumen final de 200 μl, a 37 °C, haciendo lecturas (Ex:355nm/Em:460nm) cada 2 minutos durante, al menos, 100 minutos. Los dos sustratos se preparan del mismo modo, en una solución extemporánea con el tampón que se vaya a utilizar para cada ensayo.

La técnica se fundamenta en que el grupo fluorógeno (-MCA) está situado en el lugar P¹

del sustrato de una proteasa, y al ser hidrolizado por ésta, se libera AMC que es fluorescente.



A continuación se indica el protocolo seguido para llevar a cabo la reacción, en el que se exponen los reactivos en el orden en el que son añadidos. La concentración de proteína del extracto es variable, ya que se decidió poner un volumen fijo para los todos los extractos, sin diluir. El protocolo a seguir es el siguiente, para un volumen final de 200 μl :

Solución madre	Blanco (μl)	Muestra (μl)	Concentración final
Extracto	0	20	
H₂O	20	0	
Tampón (0,1 M)	80	80	89 mM
Z-RR-MCA (0,001 M) o Z-FR-MCA (0,001 M)	100	100	0,1 mM

El DTT queda a una concentración final de 0,89 mM. Los sustratos se usan disueltos en tampón.

Para comprobar que eran cisteín proteasas las enzimas que degradan los sustratos, se hizo un ensayo para cada uno de los sustratos con E64 a 10 μM , inhibidor de cisteín proteasas.

Para calcular la cantidad de sustrato transformado en función de la fluorescencia medida se hace una curva patrón de AMC utilizando 5 diluciones crecientes desde 0,5 mM hasta 15 mM, en las mismas condiciones que los ensayos enzimáticos.

- Cálculos:

La curva patrón de AMC se ajusta mediante una regresión lineal de Y en X, quedando una expresión del tipo: $y = mx + b$. Siendo Y la variable fluorescencia (URF) y X la variable concentración de AMC (en μM). Así, para hallar la concentración de AMC (en μM) en cada punto de lectura del ensayo deberemos realizar la siguiente operación:

$$\text{AMC} = (\text{URF} - b)/m$$

Donde:

AMC: concentración de AMC, en μM .

URF: unidades relativas de fluorescencia.

b: ordenada en el origen de la curva patrón de AMC.

m: pendiente de la curva patrón de AMC.

Para calcular la actividad del extracto se toma la zona de máxima pendiente y se realizan los siguientes cálculos:

$$AE = \frac{\Delta\text{AMC}/t \cdot V_1}{V_2 \cdot P}$$

Donde:

AE: actividad específica, dada en nmoles de sustrato transformado por minuto y mg de proteína (nmol/min · mg).

ΔAMC : variación de la concentración de AMC, en μM .

t: tiempo transcurrido para la variación de AMC, en minutos.

V_1 : volumen final de la mezcla de reacción, en ml.

V_2 : volumen del extracto añadido, en ml.

P: cantidad de proteína por volumen de extracto, en mg prot/ml.

4.4. Curva de pH con un sustrato fluorógeno para colagenasas

Las curvas de pH se han hecho con el sustrato fluorógeno DQ™ colágeno tipo I de piel bovina (Molecular Probes-Invitrogen). Este sustrato es un derivado de colágeno tipo I conjugado con un fluoróforo (fluoresceína-5-isotiocianato). Se prepara (viene liofilizado) en una solución madre a una concentración de 1 mg/ml con azida sódica 2 mM y se conserva a 4 °C durante un máximo de cuatro semanas. Se utiliza el par de longitudes de onda de 485 nm (Ex) y 538 nm (Em) para medir la fluorescencia generada.

Se puso a punto la técnica basándose en el protocolo suministrado por la casa Molecular Probes-Invitrogen. Se ha hecho cada curva de pH de actividad colagenasa general desde pH 6,0 hasta 8,0, a intervalos de medio punto de pH. Se utilizó un sistema discontinuo de tampones, pues ninguno ofrecía un intervalo efectivo de tamponamiento suficientemente amplio para cubrir todo el rango de pH requerido, y se equilibró la fuerza iónica de todos los tampones con NaCl hasta

$I = 0,15 \text{ M}$ (ver apartado IV 4.3.). Todos los tampones llevaban CaCl_2 5 mM. Los distintos tampones utilizados para cubrir todo el intervalo de pH en el que se ha medido la actividad son los siguientes (Stoll y Blanchard 1990):

- pH 6,0-6,5: PIPES·NaOH 50 mM + CaCl_2 5 mM + NaCl ($I = 0,15 \text{ M}$)
- pH 7,0-8,0: Tris·HCl 50 mM + CaCl_2 5 mM + NaCl ($I = 0,15 \text{ M}$)

Cada ensayo se ha realizado en placas de microtitulación negras para fluorescencia, en un volumen final de 200 μl , a 37 °C, haciendo lecturas (Ex:485nm/Em:538nm) cada 2 minutos durante al menos 100 minutos. El

DQ-colágeno tipo I de piel bovina se prepara en una solución extemporánea con el tampón que se vaya a utilizar para cada ensayo.

La fluorescencia del DQ-colágeno tiene el mismo fundamento que la de BODIPY TR-X caseína. Se diferencia en la proteína que sirve como sustrato, que es más específica para el tipo de proteasa que la hidroliza, y que el conjugado es más sensible a los cambios de pH que el BODIPY TR-X caseína.

A continuación se indica el protocolo seguido para llevar a cabo la reacción, en el que se exponen los reactivos en el orden en el que son añadidos. La concentración de proteína del extracto es variable, ya que se decidió poner un volumen fijo para los todos los extractos sin diluir (ver apartado IV 3.1.). El protocolo a seguir es el siguiente, para un volumen final de 200 μl :

Solución madre	Blanco (μl)	Muestra (μl)	Concentración final
Extracto	0	20	
H_2O	20	0	
Tampón (0,05M)	80	80	43,75 mM
DQ-colágeno tipo I (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	100	100	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$

El CaCl_2 queda a una concentración de 4,375 mM. El sustrato está disuelto en tampón.

- Cálculos:

Para calcular la actividad del extracto se toma la zona de máxima pendiente y se realizan los siguientes cálculos:

$$A_{enz} = \frac{\Delta URF/t}{V \cdot P}$$

Donde:

Aenz: actividad enzimática, dada en unidades relativas de fluorescencia por minuto y mg de proteína (URF/min·mg).

ΔURF: variación de las unidades relativas de fluorescencia por minuto.

t: tiempo transcurrido para la variación de URF, en minutos.

V: volumen del extracto añadido, en ml.

P: cantidad de proteína por volumen de extracto, en mg prot/ml.

4.5. Ensayos de inhibición a pH óptimo con un sustrato fluorógeno general para colagenasas

Se han llevado a cabo ensayos de inhibición con distintos inhibidores específicos del mecanismo de la reacción de hidrólisis del enlace peptídico. Los ensayos de inhibición se han hecho con el mismo sustrato que las curvas de pH, con el sustrato fluorógeno DQ-colágeno tipo I de piel bovina, y basándose en las mismas indicaciones para medir la actividad proteolítica (ver apartado IV 4.4.). La metodología para medir la inhibición se ha diseñado basándose en modificaciones hechas sobre los métodos descritos por Salvesen (Salvesen y Nagase 2001), Beynon (Beynon y Salvesen 2001) y García Carreño (García-Carreño 1992).

Las inhibiciones se han llevado a cabo a los pH óptimos para actividad colagenasa (ver apartado V 1.4.): 6,5 para L3 0h y L3 48h, y 7,0 para el resto de estados de desarrollo de *H. aduncum*. Se han utilizado dos inhibidores y un inactivador. Los dos inhibidores son el E64 y el AEBSF, y el inactivador es la 1,10-fenantrolina. Para cada ensayo de inhibición se ha hecho un control con una enzima sobre la que actúe el inhibidor, al mismo pH. Para los ensayos con E64 se ha utilizado papaína (EC: 3.4.22.2); para AEBSF, α-quimotripsina (EC: 3.4.21.1); y para 1,10-fenantrolina, colagenasa tipo IV (EC: 3.4.24.3) de *Clostridium histolyticum*.

Los fundamentos y la metodología de los ensayos son análogos a los realizados con BODIPY TR-X caseína (ver apartado IV 4.1.).

A continuación se indica el protocolo seguido para llevar a cabo la reacción, en el que se exponen los reactivos en el orden en el que son añadidos. La concentración de proteína del extracto es variable, ya que se decidió poner un volumen fijo para los todos los extractos, sin

diluir (ver apartado IV 3.1.). El protocolo a seguir es el siguiente, para un volumen final de 200 µl:

Solución madre	Blanco actividad (µl)	Muestra actividad (µl)	Blanco inhibición (µl)	Muestra inhibición (µl)	Concentración final
Extracto o Enzima control: - Colagenasa IV (10U/ml) - Papaína (2,4 U/ml) - Quimotripsina (10 U/ml)	0	20	0	20	1 U/ml 0,24 U/ml 1 U/ml
H ₂ O	20	0	20	0	
Solvente del inhibidor: - H ₂ O - MetOH _(aq) (5% v/v)	20	20	0	0	0,5 %
Inhibidor: - Phen (0,02 M) - E64 (0,0005 M) - AEBSF (0,01 M)	0	0	20	20	2 mM 0,05 mM 1 mM
Tampón (0,05M)	60	60	60	60	38,75 mM
(Incubación)			(45 min)		
DQ-colágeno tipo I (50 µg/ml)	100	100	100	100	25 µg/ml

El CaCl₂ queda a una concentración de 3,875 mM. El sustrato está disuelto en tampón.

- Cálculos:

Para calcular el porcentaje de inhibición se realizan las siguientes operaciones sobre las actividades del extracto obtenidas sin inhibidor y con inhibidor:

$$\%I = 100 - \left(\frac{\Delta URF_I/t}{\Delta URF_A/t} \times 100 \right)$$

Donde:

I%: porcentaje de inhibición.

ΔURF_I : variación de las unidades relativas de fluorescencia en presencia del inhibidor.

ΔURF_A : variación de las unidades relativas de fluorescencia en ausencia del inhibidor.

t: tiempo transcurrido para la variación de URF, en minutos.

4.6. Electroforesis (zimograma)

Se ha realizado una electroforesis alcalina en un sistema discontinuo (Davis 1964) en PAGE (Laemmli 1970), con el fin de detectar actividad proteasa en una muestra de *H. aduncum*, modificando la técnica descrita por Díaz López y colaboradores (Díaz-López et al., 1998). Una de las modificaciones ha sido prescindir de SDS en los tampones de muestra y de electroforesis, para evitar una desnaturalización irreversible de las proteasas separadas. Otra modificación consiste en el empleo de gelatina como sustrato para las proteasas (Morris y Sakanari 1994). La gelatina se copolimeriza junto con la poliacrilamida. El tampón de electroforesis se pone granizado y la cubeta de electroforesis se sumerge en líquido anticongelante a una temperatura de -4 °C, para mantener frío el sistema y contrarrestar el calor generado por la corriente eléctrica, y evitar que las proteasas estén activas o se desnaturalicen.

De muestra se han puesto 15 µl de un extracto soluble obtenido a partir de 30 L3 0h en 50 µl de agua, junto con el mismo volumen de tampón de muestra sin β-mercaptoetanol, para no romper los puentes disulfuro, y sin hervir para no desnaturalizar la muestra.

Las condiciones de la electroforesis han sido las siguientes:

Gel almacenador (volumen final: 5 ml)	% final de PAA (acrilamida:bisacrilamida(30:8))	3,5
	Tampón del gel almacenador	0,125 M Tris ·HCl, pH 6,8
	PSA al 10 % (µl)	30
	TEMED (µl)	6
Gel separador (volumen final: 10 ml)	% final de PAA	7
	Tampón del gel separador	0,375 M Tris ·HCl, pH 8,8
	PSA al 10 % (ml)	50
	TEMED (ml)	6
	% final de gelatina	0,125
Tampón de electroforesis	0,025 M Tris, 0,192 M Gly, pH 8,3	
Tampón de muestra (diluido 1:1 con la muestra)	0,125 M Tris ·HCl, pH 6,8, 20% glicerol, 0,04% azul de bromofenol	
Tamaño del gel	7,3 x 8 x 0,075 cm	
Temperatura del sistema	4 °C	
Voltaje (constante)/gel	100 V	
Tiempo de electroforesis/electromovilidad en el gel separador del frente con colorante	1 h/6 cm	

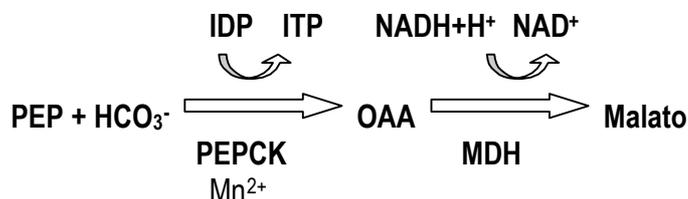
Tras la electroforesis, el gel se incuba para que las proteasas digirieran la gelatina copolimerizada, y luego se fija y tiñe para revelar la actividad. Las condiciones son las siguientes:

Tampón de incubación	Tris ·HCl 0,1M + CaCl ₂ 0,02M pH 7,0
Temperatura de incubación	37 °C
Tiempo de incubación	6,5-18 h
Solución de fijación	TCA 12%
Tiempo de fijación	35 min
Solución de tinción	0,1% Azul Coomassie R-250 en MetOH:AcOH:H ₂ O 5:2:5
Solución de desteñido	MetOH:AcOH:H ₂ O 3:1:6

5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LOS EXPERIMENTOS DE FIJACIÓN DE CO₂

5.1. Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), EC: 4.1.1.32

Su actividad específica se mide siguiendo el método empleado por Iglesias y colaboradores modificado (Iglesias et al., 2005), basado en un sistema acoplado de MDH ·NAD⁺/NADH. En la reacción de carboxilación del PEP mediante el concurso del IDP resulta en OAA e ITP. Luego el OAA es reducido a malato por la MDH (EC: 1.1.1.37) utilizando como agente reductor NADH que es oxidado a NAD⁺. Este último paso provoca una reducción de la absorbancia, que se mide en el espectrofotómetro a 340 nm, y a 15 °C.



Excepto el tampón y las sales que actúan de cofactor iónico divalente (MnCl₂), el resto de reactivos son de preparación extemporánea. El ión HCO₃⁻ actúa como fuente de la carboxilación del sustrato principal, PEP, por eso, antes de dispensarlo, se gasean 10 ml de la solución madre HCO₃⁻ con CO₂ durante 3 min a 0,95 bar de presión para que quede saturada de CO₂.

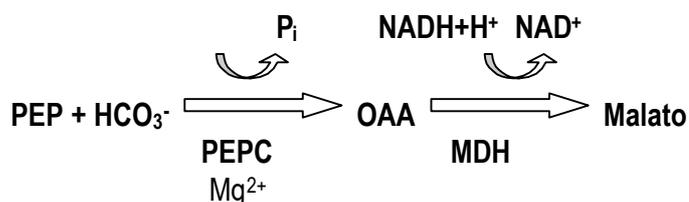
Una vez que está todo preparado se dispensan todos los reactivos en el orden en el que figuran en el protocolo excepto el IDP, que se añadirá al final, justo antes de medir, como iniciador de la reacción. Antes de iniciar la reacción se deja equilibrar durante el tiempo necesario para que alcance la temperatura adecuada y dejar que se consuman los reactivos capaces de iniciar la reacción presentes en la mezcla de reacción procedentes del extracto y se sigue en el espectrofotómetro. Una vez que todo está a punto se inicia la reacción añadiendo IDP y se sigue espectrofotométricamente durante 10 min.

A continuación se indica el protocolo seguido para llevar a cabo la reacción, en el que se exponen los reactivos en el orden en que son añadidos. Para un volumen final de 1 ml:

Solución madre	Blanco (μl)	Ciego (μl)	Muestra (μl)	Concentración final
Tris HCl (0,1 M; pH 7,4)	320	320	320	32 mM
MnCl ₂ (0,03 M)	32	32	32	0,96 mM
β-NADH (0,01 M)	50	50	50	0,5 mM
PEP (0,06 M)	33	33	33	2 mM
MDH (32 U/ml)	50	50	50	1,6 U/ml
Extracto	0	c.s.p.25 μg prot	c.s.p.25 μg prot	25 μg prot/ml
H ₂ O	330	c.s.p.1000	c.s.p.1000	
NaHCO ₃ (0,1 M)	160	160	160	16 mM
IDP (0,03 M)	50	0	50	1,5 mM

5.2. Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), EC: 4.1.1.31

Su actividad específica se mide siguiendo el método empleado por Cataldi de Flombaum modificado (Cataldi de Flombaum et al., 1977), basado en un sistema acoplado de MDH · NAD⁺/NADH. En la reacción de carboxilación del PEP resultan OAA y P_i. Luego el OAA es reducido a malato por la MDH (EC: 1.1.1.37) utilizando como agente reductor NADH que es oxidado a NAD⁺. Este último paso provoca una desaparición de absorbancia que se mide en el espectrofotómetro a 340 nm, y a 15 °C.



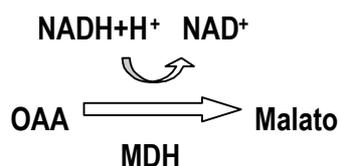
Se sigue el mismo procedimiento que para medir la PEPCK, adaptado para esta reacción, en la que el iniciador es el PEP.

A continuación se indica el protocolo seguido para llevar a cabo la reacción, en el que se exponen los reactivos en el orden en que son añadidos. Para un volumen final de 1 ml:

Solución madre	Blanco (μl)	Ciego (μl)	Muestra (μl)	Concentración final
(Tris:Maleato)·NaOH (0,1 M:0,1M; pH 6,0)	320	320	320	32 mM:32mM
MgCl ₂ (0,03 M)	100	100	100	3 mM
β-NADH (0,01 M)	50	50	50	0,5 mM
MDH (100 U/ml)	100	100	100	10 U/ml
Extracto	0	c.s.p.25 μg prot	c.s.p.25 μg prot	25 μg prot/ml
H ₂ O	170	c.s.p.1000	c.s.p.1000	
NaHCO ₃ (0,1 M)	160	160	160	16 mM
PEP (0,12 M)	100	0	100	12 mM

5.3. Malato deshidrogenasa (MDH). EC: 1.1.1.37

Su actividad específica se mide siguiendo el método modificado de la página web de Worthington Biochemical Corporation (<http://www.worthington-biochem.com/MDH/default.html>), basado en la desaparición de NADH medida espectrofotométricamente a 340 nm. En la reacción el OAA es reducido a malato por la MDH utilizando como agente reductor NADH que a su vez es oxidado a NAD⁺. La reacción se lleva a cabo a 15 °C.



Los reactivos se preparan disolviéndolos en tampón y después se sigue el mismo método que para los ensayos anteriores. Una vez que todo está a punto se inicia la reacción añadiendo OAA y se sigue espectrofotométricamente durante 10 min.

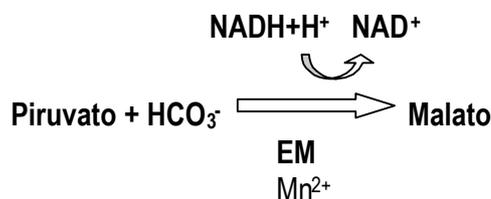
A continuación se indica el protocolo seguido para llevar a cabo la reacción, en el que se exponen los reactivos en el orden en que son añadidos. Para un volumen final de 1 ml:

Solución madre	Blanco (μl)	Ciego (μl)	Muestra (μl)	Concentración final
KH₂PO₄ KOH (0,1 M; pH 7,4)	800	c.s.p.1000	c.s.p.1000	95-100 mM
β-NADH (0,0025M)	100	100	100	0,25 mM
Extracto	0	c.s.p.25 μg prot	c.s.p.25 μg prot	25 μg prot/ml
OAA (0,2 M)	100	0	100	20 mM

5.4. Enzima málica (EM). EC: 1.1.1.39

Su actividad específica se mide siguiendo el método empleado por Cataldi de Flombaum modificado (Cataldi de Flombaum et al., 1977), teniendo en cuenta los trabajos de Park (Park et al., 1984) y Mallick (Mallick et al., 1991), basado en la oxidación del NADH. En la reacción de carboxilación del piruvato participa como agente reductor NADH, el cual lo reduce resultando malato. La oxidación de NADH provoca una desaparición de absorbancia que se mide en el espectrofotómetro a 340 nm, y a 15 °C.

Se procede del mismo modo que para el resto de ensayos, y una vez que todo está listo se inicia la reacción añadiendo piruvato y se sigue espectrofotométricamente durante 10 min.



A continuación se indica el protocolo seguido para llevar a cabo la reacción, en el que se exponen los reactivos en el orden en que son añadidos. Para un volumen final de 1 ml:

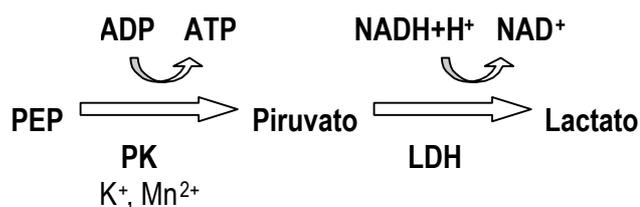
Solución madre	Blanco (μl)	Ciego (μl)	Muestra (μl)	Concentración final
Tris HCl (0,1 M; pH 7,4)	320	320	320	32 mM
MnSO ₄ (0,04 M)	50	50	50	2 mM
β-NADH (0,01 M)	50	50	50	0,5 mM
ATP (0,015 M)	100	100	100	1,5 mM
MDH (50 U/ml)	100	100	100	5 U/ml
H ₂ O	170	c.s.p.1000	c.s.p.1000	
Extracto	0	c.s.p.25 μg prot	c.s.p.25 μg prot	25 μg prot/ml
NaHCO ₃ (0,1 M)	160	160	160	16 mM
Piruvato (0,32 M)	50	0	50	16 mM

Como para medir LDH se utilizan los mismos reactivos que para PC, excepto NaHCO₃, ATP y MDH, la actividad PC será la diferencia entre la actividad de PC medida por este método menos la de la LDH en las mismas condiciones y sin los reactivos no necesarios.

5.6. Piruvato quinasa (PK), EC: 2.7.1.40

Su actividad específica se mide siguiendo el método empleado por Bueding modificado (Bueding y Saz 1968) teniendo en cuenta los trabajos de Valentine (Valentine y Tanaka 1966), basado en el sistema acoplado de LDH-NAD⁺/NADH. En la reacción de desfosforilación del PEP mediante el concurso del ADP resultan piruvato y ATP. Luego el piruvato es reducido a lactato por la LDH (EC: 1.1.1.27) utilizando como agente reductor NADH que es oxidado a NAD⁺. Este último paso provoca una reducción de la absorbancia que se mide en el espectrofotómetro a 340 nm, y a 15 °C.

Se procede del mismo modo que para el resto de ensayos, y una vez que todo está listo se inicia la reacción añadiendo PEP y se sigue durante 10 min.



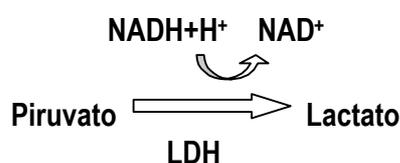
A continuación se indica el protocolo seguido para llevar a cabo la reacción, en el que se exponen los reactivos en el orden en que son añadidos. Para un volumen final de 1 ml:

Solución madre	Blanco (µl)	Ciego (µl)	Muestra (µl)	Concentración final
(EtOH) ₃ N HCl (0,03 M; pH 7,5)	300	300	300	9 mM
MnSO ₄ (0,004 M)	100	100	100	0,4 mM
KCl (1 M)	100	100	100	100 mM
ADP (0,01 M)	100	100	100	1 mM
β-NADH (0,002 M)	100	100	100	0,2 mM
LDH (100 U/ml)	100	100	100	10 U/ml
Extracto	0	c.s.p.25 µg prot	c.s.p.25 µg prot	25 µg prot/ml
H ₂ O	100	c.s.p.1000	c.s.p.1000	
PEP (0,01 M)	100	0	100	1 mM

5.7. Lactato deshidrogenasa (LDH), EC: 1.1.1.27

Su actividad específica se mide siguiendo el método modificado de la página web de Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/enzyme%20assay/l2625enz.pdf>), basado en los trabajos de Bergmeyer (Bergmeyer y Bernt 1974), y que tiene su fundamento en la desaparición de NADH medida en el espectrofotómetro a 340 nm. En la reacción, el piruvato es reducido a lactato por la LDH utilizando como agente reductor NADH que a su vez es oxidado a NAD⁺. La reacción se lleva a cabo a 15 °C.

Los reactivos se preparan disolviéndolos en tampón, y después se opera del mismo modo que para el resto de ensayos, y una vez que todo está preparado se comienza la reacción añadiendo piruvato y se sigue durante 10 min.



A continuación se indica el protocolo seguido para llevar a cabo la reacción, en el que se exponen los reactivos en el orden en que son añadidos. Para un volumen final de 1 ml:

Solución madre	Blanco (μl)	Ciego (μl)	Muestra (μl)	Concentración final
NaH₂PO₄ NaOH (0,1 M; pH 7,5)	800	c.s.p.1000	c.s.p.1000	95-100 mM
β-NADH (0,002M)	100	100	100	0,2 mM
Extracto	0	c.s.p.25 μg prot	c.s.p.25 μg prot	25 μg prot/ml
Piruvato (0,069 M)	100	0	100	6,9 mM

- Cálculos

Para calcular la actividad específica de cada enzima se realizan las siguientes operaciones:

$$AE = \frac{\Delta A/t \cdot V_1 \cdot 10^9}{6,22 \cdot 10^6 \cdot 1 \cdot V_2 \cdot P}$$

Donde:

AE: actividad específica, dada en nmoles de sustrato transformado por minuto y mg de proteína (nmol/min · mg).

ΔA: variación de la absorbancia durante la reacción.

t: tiempo transcurrido para la variación de A, en minutos.

V₁: volumen final de la mezcla de reacción, en ml.

10⁹: factor de conversión para expresar el resultado en nmoles (10⁹ nmol/mol).

6,22 · 10⁶: coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm de λ, [ε] cm²/mol.

1: espesor que atraviesa la luz a través de la solución reactiva, en cm.

V₂: volumen del extracto añadido, en ml.

P: cantidad de proteína por volumen de extracto, en mg prot/ml.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se han procesado en un ordenador personal, utilizando el programa SPSS versión 14.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.). El nivel de significación global se ha fijado en $p < 0,05$.

La variable dependiente o respuesta es continua, y corresponde en cada caso a las distintas actividades enzimáticas medidas en el extracto proteico, con las diferentes metodologías vistas hasta ahora, según el tipo de actividad enzimática que se pretendía medir.

Las variables independientes son categóricas, y se corresponden con los distintos tratamientos aplicados en los experimentos llevados a cabo para medir cada actividad enzimática. Son:

- 1) el **estado de desarrollo** del parásito (para todas las actividades enzimáticas),
- 2) la presencia o ausencia de **pepsina** en el medio de mantenimiento del parásito antes de la recogida de la muestra (para el caso de mediciones relacionadas con actividades proteolíticas),
- 3) el **pH** del ensayo enzimático (para el caso de mediciones relacionadas con actividades proteolíticas) y
- 4) la presencia o ausencia de un agente tiorreductor (**DTT**) en el ensayo enzimático (para el caso de las mediciones para la determinación de actividad proteolítica mediante BODIPY TR-X caseína como sustrato).

Se ha analizado si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las diferentes variables independientes mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una, dos, tres o cuatro vías según el experimento y el número de variables en consideración.

El requerimiento principal para el análisis de la varianza, una distribución normal de la variable, se comprueba mediante dos pruebas para la normalidad, la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de significación de Lilliefors y la prueba de Shapiro-Wilk. En ambas, la hipótesis nula es que hay normalidad y si la significación estadística es de $p < 0,20$ no se acepta la hipótesis nula y se rechaza que exista normalidad en la distribución que sigue la variable. Para saber si la variable sigue una distribución normal se ha utilizado como apoyo la observación de histogramas y gráficos Q-Q (se representan los valores (en cuantiles) observados frente a los esperados (en valores z) si la variable siguiese una distribución normal perfecta).

En los casos en los que el tamaño de muestra de la variable analizada es de $n > 30$ se ha admitido que la variable sigue una distribución normal si se cumplen las siguientes condiciones (Martínez González y Sánchez Villegas 2001):

- 1°. Prácticamente el 100% de los valores deben estar en el intervalo comprendido entre la media y 3 desviaciones típicas por encima y por debajo.
- 2°. La distribución debe ser simétrica. El valor absoluto de la asimetría debe ser menor que dos veces su error típico.
- 3°. La distribución debe ser mesocúrtica. El valor absoluto de la curtosis debe ser menor que dos veces su error típico.

Cuando la variable no sigue una distribución normal se ha llevado a cabo una transformación logarítmica de ésta y después se han aplicado las pruebas de normalidad descritas.

Cuando las condiciones de normalidad no se cumplen, ni siquiera con una transformación logarítmica, para hallar las diferencias estadísticamente significativas entre grupos se ha aplicado la prueba no paramétrica para k muestras independientes de Kruskal-Wallis (que se basa en la comparación de las medianas).

Cuando se han encontrado diferencias estadísticamente significativas dentro de la variable independiente correspondiente al estado de desarrollo mediante el ANOVA, se han efectuado comparaciones múltiples por parejas *a posteriori* (*post hoc*), aplicando la prueba de Bonferroni (basada en el estadístico *t* de Student, que corrige el nivel de significación observado por el hecho de que se realizan comparaciones múltiples), con el fin de identificar entre qué estados de desarrollo existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de actividad enzimática medida. se ha aplicado la prueba T2 de Tamhane (prueba conservadora de comparación por parejas basada en una prueba *t*) que asume varianzas desiguales, cuando al aplicar la prueba de Levene para la homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) hay significación estadística y por tanto no se acepta la hipótesis nula de igualdad de varianzas.

Cuando se han encontrado diferencias estadísticamente significativas dentro de la variable independiente correspondiente al estado de desarrollo mediante la prueba de Kruskal-Wallis, se han efectuado comparaciones múltiples por parejas *a posteriori* (*post hoc*), aplicando la prueba de la U de Mann-Whitney (prueba no paramétrica para comparar medias de dos grupos independientes) aplicando la corrección de Bonferroni (mediante la cual sólo se consideran significativos aquellos valores de $p < 0,05/k$, donde 0,05 es el error "α" global y "k" el número de comparaciones efectuadas) (Martínez González 2001).

V. RESULTADOS

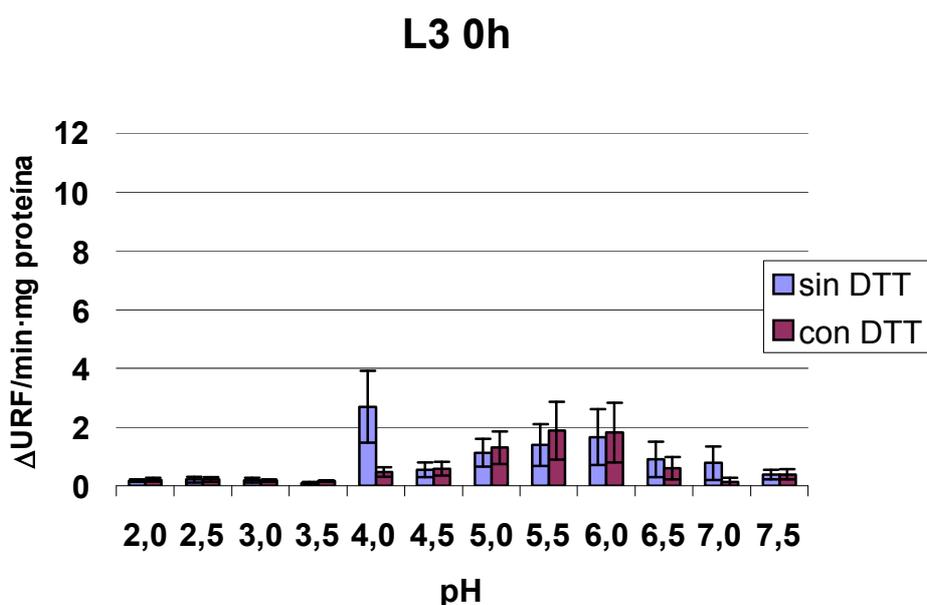
1. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN *Hysterothylacium aduncum*

1.1. Actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína

A continuación se muestran las actividades enzimáticas en función del pH, medidas con BODIPY TR-X caseína y expresadas como $\Delta\text{URF}/\text{min}\cdot\text{mg} \pm \text{ES}$ (unidades relativas de fluorescencia emitida por min y mg de proteína).

1.1.1. Larva 3 recién aislada del hospedador (L3 0h)

Figura R1. Actividad enzimática ($\Delta\text{URF}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) de la L3 de *H. aduncum* recogida del pescado (L3 0h), en función del pH y DTT (5,8 mM), empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

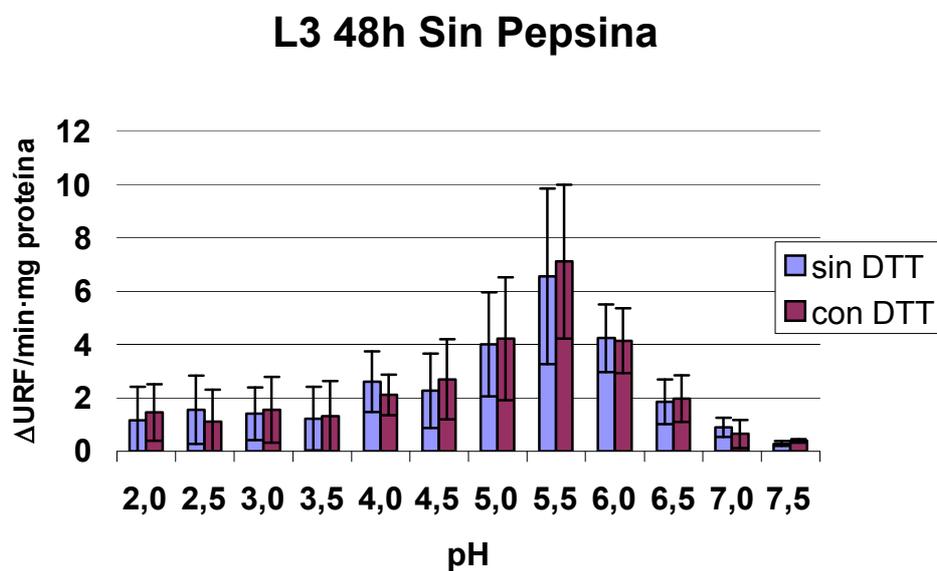


pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
sin DTT	0,17	0,21	0,19	0,09	2,69	0,55	1,12	1,39	1,65	0,90	0,78	0,38
DTT	$\pm 0,05$	$\pm 0,10$	$\pm 0,09$	$\pm 0,03$	$\pm 1,22$	$\pm 0,25$	$\pm 0,47$	$\pm 0,72$	$\pm 0,95$	$\pm 0,61$	$\pm 0,57$	$\pm 0,16$
con DTT	0,21	0,21	0,18	0,15	0,47	0,58	1,30	1,88	1,81	0,60	0,13	0,39
DTT	$\pm 0,06$	$\pm 0,08$	$\pm 0,05$	$\pm 0,03$	$\pm 0,16$	$\pm 0,23$	$\pm 0,55$	$\pm 0,99$	$\pm 1,02$	$\pm 0,38$	$\pm 0,14$	$\pm 0,18$

Se observan varios picos en la curva de pH, es decir óptimos de actividad proteasa: uno, con la máxima actividad, a pH 4,0 (sin DTT), y otro a pH 5,5 con DTT y a 6,0 sin él. No hay diferencias significativas entre la actividad enzimática con DTT y sin él (ANOVA 2 vías, $p=0,170$) en el conjunto de la curva de pH.

1.1.2. Larva 3 tras 48 horas de cultivo (L3 48h)

Figura R2. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) de la L3 de *H. aduncum* tras 48 horas de cultivo, sin pepsina, en función del pH y DTT (5,8 mM), empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

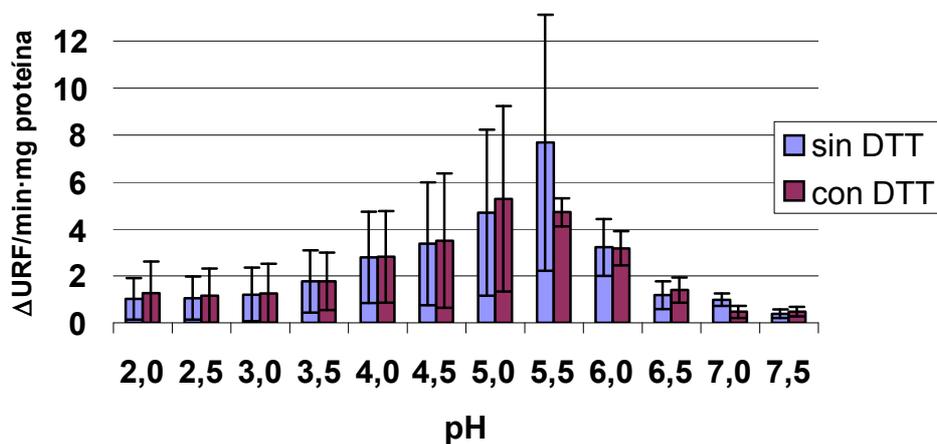


pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
sin DTT	1,16 $\pm 1,26$	1,55 $\pm 1,27$	1,40 $\pm 0,99$	1,22 $\pm 1,19$	2,60 $\pm 1,13$	2,26 $\pm 1,39$	4,00 $\pm 1,94$	6,55 $\pm 3,28$	4,23 $\pm 1,26$	1,86 $\pm 0,84$	0,89 $\pm 0,36$	0,29 $\pm 0,09$
con DTT	1,45 $\pm 1,05$	1,11 $\pm 1,20$	1,55 $\pm 1,23$	1,31 $\pm 1,32$	2,12 $\pm 0,76$	2,70 $\pm 1,51$	4,21 $\pm 2,30$	7,10 $\pm 2,87$	4,14 $\pm 1,22$	1,96 $\pm 0,87$	0,65 $\pm 0,53$	0,39 $\pm 0,08$

Se observan dos óptimos, uno a pH 4,0 y otro a 5,5 (máxima actividad). No hay diferencias significativas entre la actividad enzimática con DTT y sin él en L3 48h sin pepsina (K-W, $p=0,973$).

Figura R3. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) de la L3 de *H. aduncum* tras 48 horas de cultivo con pepsina, en función del pH y DTT (5,8 mM), empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L3 48h Con Pepsina

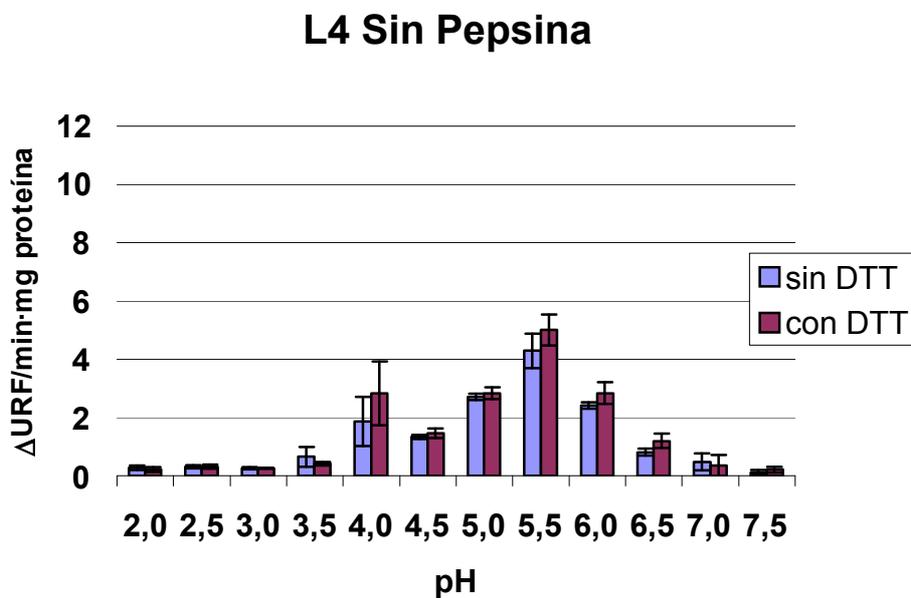


pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
sin DTT	1,01 $\pm 0,88$	1,05 $\pm 0,92$	1,21 $\pm 1,14$	1,77 $\pm 1,33$	2,80 $\pm 1,95$	3,37 $\pm 2,61$	4,70 $\pm 3,54$	7,68 $\pm 5,46$	3,21 $\pm 1,21$	1,19 $\pm 0,59$	0,98 $\pm 0,29$	0,39 $\pm 0,17$
con DTT	1,28 $\pm 1,33$	1,16 $\pm 1,17$	1,25 $\pm 1,3$	1,78 $\pm 1,25$	2,81 $\pm 1,96$	3,50 $\pm 2,87$	5,29 $\pm 3,96$	4,71 $\pm 0,60$	3,18 $\pm 0,73$	1,40 $\pm 0,53$	0,47 $\pm 0,25$	0,48 $\pm 0,21$

Sólo se observa un óptimo, a pH 5,5. La actividad enzimática es similar a la de la L3 48h sin pepsina (ANOVA 3 vías, $p=0,767$). No hay diferencias significativas entre la actividad enzimática con DTT y sin él (ANOVA 1 vía, $p=0,750$) en L3 48h con pepsina.

1.1.3. Larva 4 (L4)

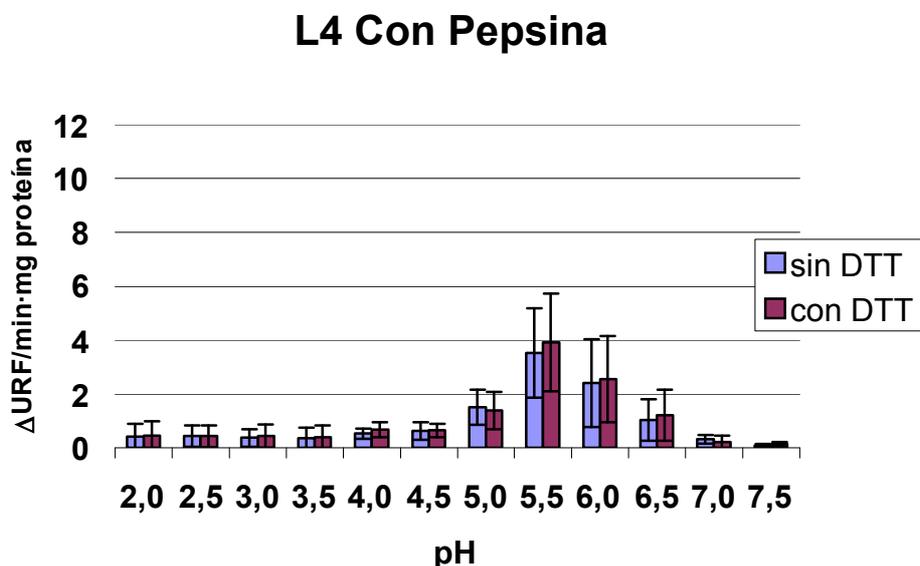
Figura R4. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) de la L4 de *H. aduncum* tras 14 días de cultivo, sin pepsina durante una semana antes de recogerla, en función del pH y DTT (5,8 mM), empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
sin DTT	0,27	0,31	0,25	0,66	1,86	1,33	2,71	4,28	2,41	0,81	0,48	0,11
DTT	$\pm 0,07$	$\pm 0,05$	$\pm 0,04$	$\pm 0,34$	$\pm 0,84$	$\pm 0,07$	$\pm 0,11$	$\pm 0,59$	$\pm 0,11$	$\pm 0,12$	$\pm 0,29$	$\pm 0,08$
con DTT	0,22	0,31	0,25	0,42	2,83	1,47	2,84	5,00	2,83	1,19	0,35	0,21
DTT	$\pm 0,08$	$\pm 0,08$	$\pm 0,01$	$\pm 0,06$	$\pm 1,09$	$\pm 0,17$	$\pm 0,20$	$\pm 0,52$	$\pm 0,37$	$\pm 0,25$	$\pm 0,37$	$\pm 0,10$

Se observan dos óptimos, uno con la actividad máxima a pH 5,5, y otro a pH 4,0. No hay diferencias significativas entre la actividad enzimática con DTT y sin él (ANOVA 1 vía, $p=0,898$) en L4 sin pepsina.

Figura R5. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) de la L4 de *H. aduncum* tras 14 días de cultivo con pepsina, en función del pH y DTT (5,8 mM), empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

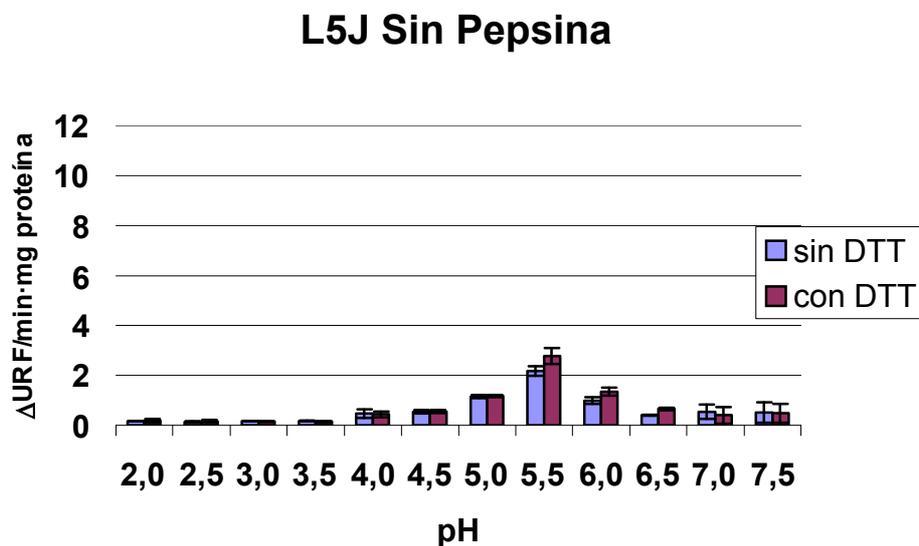


pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
sin DTT	0,42 $\pm 0,47$	0,43 $\pm 0,40$	0,37 $\pm 0,33$	0,36 $\pm 0,39$	0,52 $\pm 0,20$	0,63 $\pm 0,33$	1,51 $\pm 0,66$	3,52 $\pm 1,66$	2,41 $\pm 1,63$	1,03 $\pm 0,78$	0,32 $\pm 0,17$	0,08 $\pm 0,06$
con DTT	0,46 $\pm 0,52$	0,43 $\pm 0,41$	0,43 $\pm 0,43$	0,40 $\pm 0,44$	0,67 $\pm 0,27$	0,65 $\pm 0,24$	1,39 $\pm 0,69$	3,91 $\pm 1,82$	2,55 $\pm 1,61$	1,20 $\pm 0,95$	0,23 $\pm 0,24$	0,14 $\pm 0,08$

Sólo se observa un óptimo a pH 5,5. La actividad enzimática de L4 con pepsina es menor que la de la L4 sin pepsina (K-W, $p=0,027$). No hay diferencias significativas entre la actividad enzimática con DTT y sin él (K-W, $p=0,874$) en L4 con pepsina.

1.1.4. Adulto juvenil (L5J)

Figura R6. Actividad enzimática (Δ URF/min \cdot mg proteína) del adulto juvenil de *H. aduncum* tras 21 días de cultivo, sin pepsina durante una semana antes de recogerlo, en función del pH y DTT (5,8 mM), empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

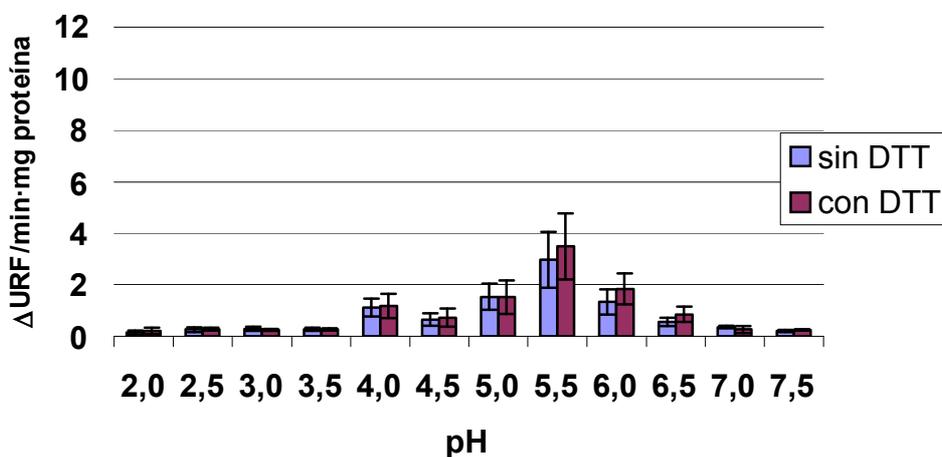


pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
sin DTT	0,17	0,13	0,17	0,18	0,47	0,54	1,16	2,18	0,98	0,40	0,54	0,51
DTT	$\pm 0,01$	$\pm 0,03$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,17$	$\pm 0,07$	$\pm 0,07$	$\pm 0,19$	$\pm 0,14$	$\pm 0,03$	$\pm 0,27$	$\pm 0,40$
con DTT	0,18	0,16	0,15	0,14	0,44	0,55	1,17	2,77	1,35	0,66	0,40	0,48
DTT	$\pm 0,07$	$\pm 0,05$	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,12$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$	$\pm 0,32$	$\pm 0,15$	$\pm 0,05$	$\pm 0,33$	$\pm 0,37$

Solamente se observa un óptimo, a pH 5,5. No hay diferencias significativas entre la actividad enzimática con DTT y sin él (ANOVA 1 vía, $p=0,952$) en L5J sin pepsina.

Figura R7. Actividad enzimática (Δ URF/min mg proteína) del adulto juvenil de *H. aduncum* tras 21 días de cultivo con pepsina, en función del pH y DTT (5,8 mM), empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L5J Con Pepsina



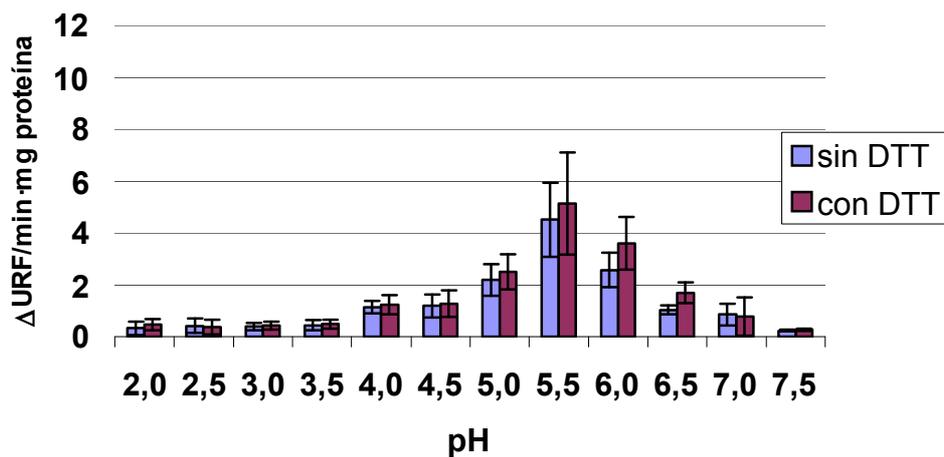
pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
sin DTT	0,14 \pm 0,09	0,26 \pm 0,09	0,28 \pm 0,08	0,27 \pm 0,06	1,11 \pm 0,35	0,65 \pm 0,23	1,53 \pm 0,51	2,97 \pm 1,08	1,33 \pm 0,48	0,57 \pm 0,17	0,35 \pm 0,14	0,21 \pm 0,04
con DTT	0,20 \pm 0,12	0,28 \pm 0,06	0,24 \pm 0,04	0,27 \pm 0,04	1,17 \pm 0,47	0,72 \pm 0,35	1,52 \pm 0,65	3,49 \pm 1,28	1,84 \pm 0,61	0,86 \pm 0,29	0,26 \pm 0,13	0,25 \pm 0,01

El óptimo con la actividad máxima es a pH 5,5, y se puede apreciar otro óptimo de actividad a pH 4,0. La Actividad enzimática de L5J con pepsina es algo mayor que la de L5J cultivado sin pepsina, aunque no presentan diferencias significativas (ANOVA 3 vías, $p=0,082$). Tampoco hay diferencias significativas entre la actividad enzimática con DTT y sin él (K-W, $p=0,933$) en L5J con pepsina.

1.1.5. Adulto (L5)

Figura R8. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) del adulto de *H. aduncum* tras 42 días de cultivo, sin pepsina durante una semana antes de recogerlo, en función del pH y DTT (5,8 mM), empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L5 Sin Pepsina

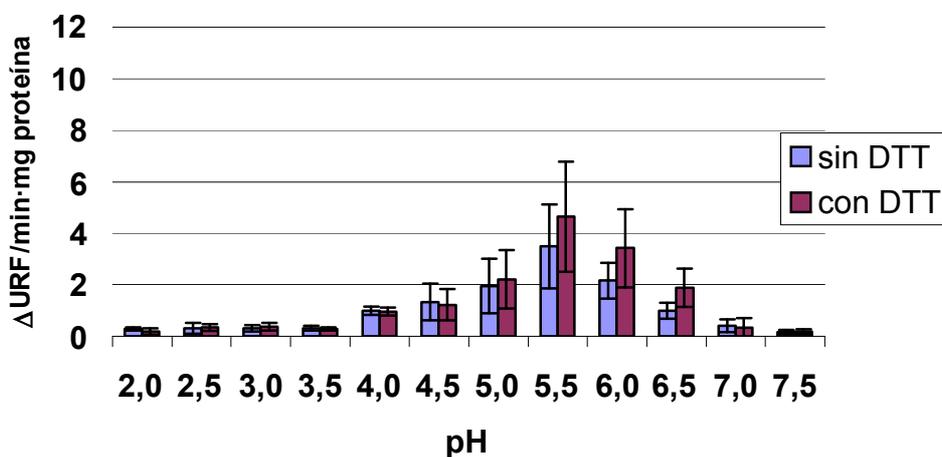


pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
sin DTT	0,32 $\pm 0,25$	0,41 $\pm 0,27$	0,40 $\pm 0,15$	0,44 $\pm 0,20$	1,13 $\pm 0,24$	1,18 $\pm 0,44$	2,19 $\pm 0,60$	4,50 $\pm 1,43$	2,57 $\pm 0,67$	1,03 $\pm 0,18$	0,85 $\pm 0,39$	0,23 $\pm 0,03$
con DTT	0,47 $\pm 0,22$	0,37 $\pm 0,29$	0,42 $\pm 0,15$	0,48 $\pm 0,18$	1,22 $\pm 0,37$	1,26 $\pm 0,51$	2,50 $\pm 0,67$	5,12 $\pm 1,97$	3,60 $\pm 1,02$	1,69 $\pm 0,40$	0,78 $\pm 0,74$	0,27 $\pm 0,05$

Solamente se observa un óptimo, a pH 5,5. No hay diferencias significativas entre la actividad enzimática con DTT y sin él (K-W, $p=0,604$) en L5 sin pepsina.

Figura R9. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) del adulto de *H. aduncum* tras 42 días de cultivo con pepsina, en función del pH y DTT (5,8 mM), empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L5 Con Pepsina



pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
sin DTT	0,29 \pm 0,07	0,32 \pm 0,20	0,31 \pm 0,13	0,31 \pm 0,10	0,99 \pm 0,17	1,33 \pm 0,71	1,95 \pm 1,06	3,50 \pm 1,63	2,16 \pm 0,69	1,00 \pm 0,30	0,42 \pm 0,16	0,16 \pm 0,08
con DTT	0,19 \pm 0,13	0,34 \pm 0,14	0,37 \pm 0,15	0,29 \pm 0,05	0,96 \pm 0,15	1,23 \pm 0,61	2,22 \pm 1,14	4,64 \pm 2,14	3,42 \pm 1,51	1,88 \pm 0,75	0,33 \pm 0,37	0,20 \pm 0,08

El óptimo se presenta a pH 5,5. La actividad enzimática de L5 con pepsina es algo menor que la de la L5 cultivada sin pepsina, aunque no hay diferencias significativas (K-W, $p=0,163$). Tampoco hay diferencias significativas entre la actividad enzimática con DTT y sin él (K-W, $p=0,915$) en L5 con pepsina.

1.1.6. Comparación estadística de la actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína entre los grupos

Se ha comparado estadísticamente la actividad proteasa obtenida de las distintas fases de desarrollo del parásito considerando a la vez toda la actividad medida en la curva de pH, es decir, teniendo en cuenta todo el conjunto, a todos los pH.

1.1.6.1. Comparación en función de la pepsina

Se observa que entre las distintas fases de desarrollo de los parásitos cultivados **sin pepsina** existen diferencias significativas (K-W, $p < 0,001$). La L3 48h sin pepsina presenta la mayor actividad enzimática de todas las cultivadas sin pepsina, con diferencias significativas en los contrastes *a posteriori* mediante la U M-W: L3 48h>L3 0h $p < 0,001$; L3 48h>L5J $p < 0,001$. Mientras que entre las distintas fases de desarrollo de los parásitos cultivados sin pepsina, L5J sin pepsina presenta la menor actividad enzimática de todas (diferencias significativas encontradas al realizar los contrastes *a posteriori* mediante la U M-W las siguientes: L3 48h>L5J $p < 0,001$; L4>L5J $p = 0,003$; L5>L5J $p < 0,001$).

También existen diferencias significativas entre las distintas fases de desarrollo de los parásitos cultivados **con pepsina** (K-W, $p < 0,001$). La L3 48h con pepsina presenta la mayor actividad enzimática de todas (diferencias significativas halladas en los contrastes *a posteriori* mediante la U M-W: L3 48h>L4 $p < 0,001$; L3 48h>L5J $p < 0,001$; L3 48h>L5 $p = 0,002$).

1.1.6.2. Comparación en función del ditiotreitól (DTT)

En el grupo de curvas de pH realizadas **sin DTT** se muestran diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de los distintos estados de desarrollo (K-W, $p = 0,000$), siendo la de L3 48h la de mayor actividad enzimática (U M-W: L3 48h>L3 0h $p = 0,002$; L3 48h>L4 $p < 0,001$; L3 48h>L5J $p < 0,001$; L3 48h>L5 $p < 0,001$).

Entre los ensayos realizados en **presencia de DTT** también hay diferencias significativas (K-W, $p < 0,001$), siendo igualmente la actividad enzimática de L3 48h la mayor (U M-W: L3 48h>L3 0h $p < 0,001$; L3 48h>L4 $p = 0,002$; L3 48h>L5J $p < 0,001$).

1.1.6.3. Comparación entre estados de desarrollo independientemente de pepsina y DTT

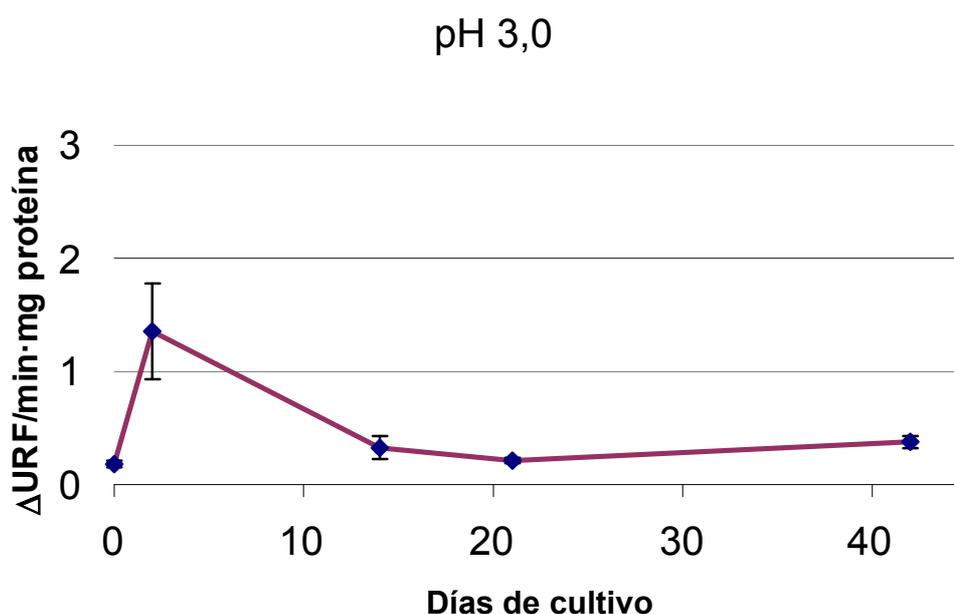
Al comparar todos los estados de desarrollo entre sí, sin diferenciar entre los cultivados con pepsina y sin ella, existen diferencias significativas (K-W, $p < 0,001$). La actividad enzimática de L3 48h (cultivada con y sin pepsina) es la mayor de todos los estados de desarrollo, y al realizar los contrastes *a posteriori* mediante la U M-W las diferencias son significativas (L3 48h>L3 0h $p < 0,001$; L3 48h>L4 $p < 0,001$; L3 48h>L5J $p < 0,001$; L3 48h>L5 $p < 0,001$). También se ha encontrado en los contrastes *a posteriori* que la actividad enzimática de L5 es mayor que la de L5J (U M-W: L5>L5J $p = 0,002$).

1.1.7. Actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína a lo largo del desarrollo de *H. aduncum* fijando el pH

En esta sección se representan los datos de los apartados anteriores (ver apartados V 1.1.1.-V 1.1.5.) representados en función del estado de desarrollo.

1.1.7.1. pH 3,0

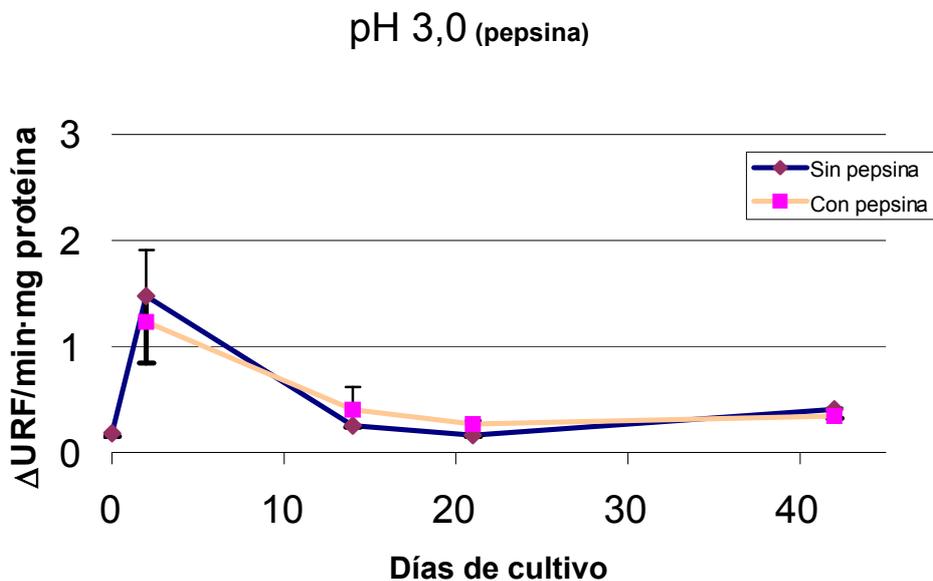
Figura R10. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) a pH 3,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 4-12 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Aenz \pm ES	0,18 \pm 0,03	1,35 \pm 0,42	0,33 \pm 0,10	0,21 \pm 0,02	0,38 \pm 0,05

Existen diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de los estados de desarrollo a pH 3,0 (K-W, $p < 0,001$). Como se puede observar la actividad máxima corresponde a la L3 48h, y se han encontrado diferencias significativas en los contrastes *a posteriori* mediante la U M-W: L3 48h > L5J $p = 0,001$.

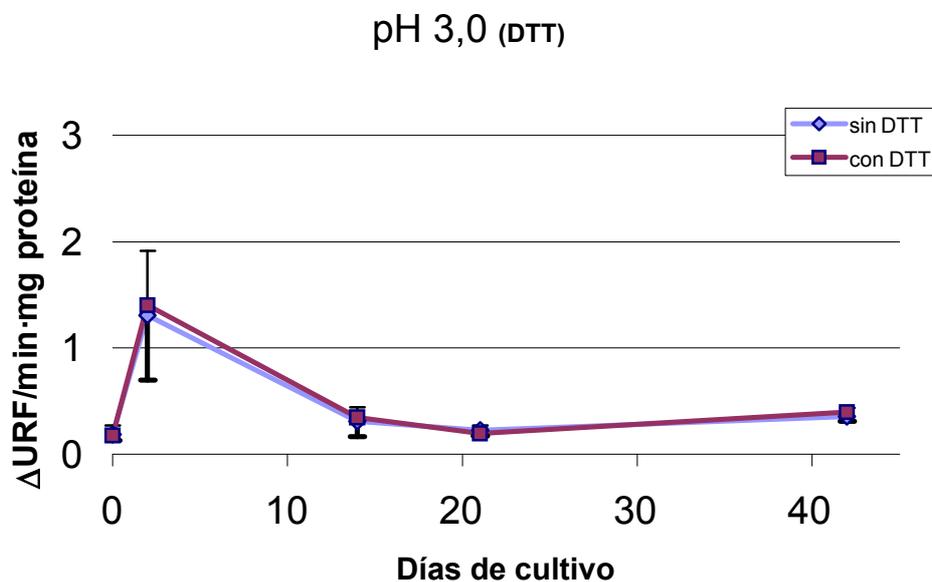
Figura R11. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) a pH 3,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 4-6 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Sin Pepsina	0,18 \pm 0,03	1,48 \pm 0,63	0,25 \pm 0,02	0,16 \pm 0,01	0,41 \pm 0,08
Con Pepsina	—	1,23 \pm 0,68	0,40 \pm 0,22	0,26 \pm 0,04	0,34 \pm 0,08

No existen diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de los parásitos cultivados con pepsina y sin ella (K-W, $p=0,941$) a pH 3,0.

Figura R12. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) a pH 3,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la presencia de DTT en el ensayo, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-6 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

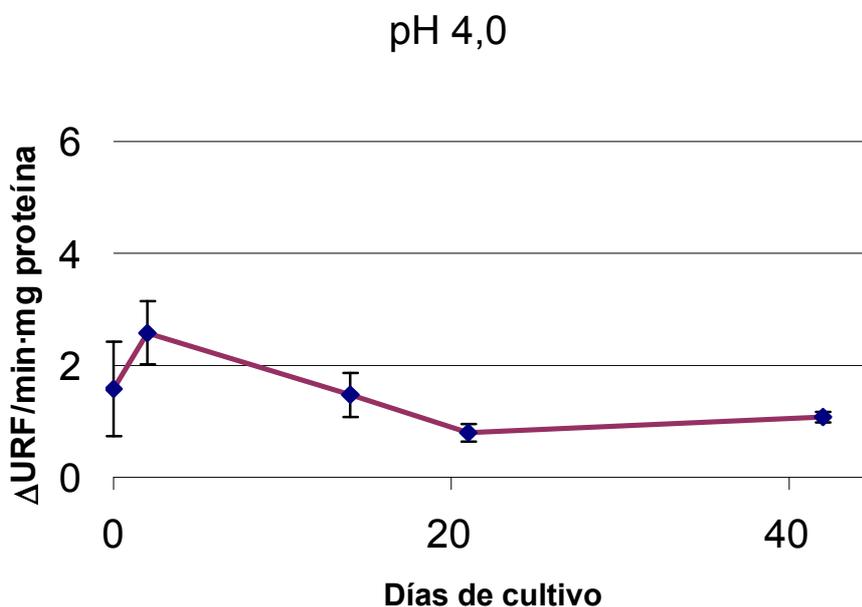


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Sin DTT	0,19 \pm 0,09	1,31 \pm 0,60	0,31 \pm 0,13	0,23 \pm 0,04	0,35 \pm 0,08
Con DTT	0,18 \pm 0,05	1,40 \pm 0,71	0,34 \pm 0,18	0,20 \pm 0,03	0,40 \pm 0,09

No existen diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de los ensayos realizados con DTT sin él (K-W, $p=0,956$) a pH 3,0.

1.1.7.2. pH 4,0

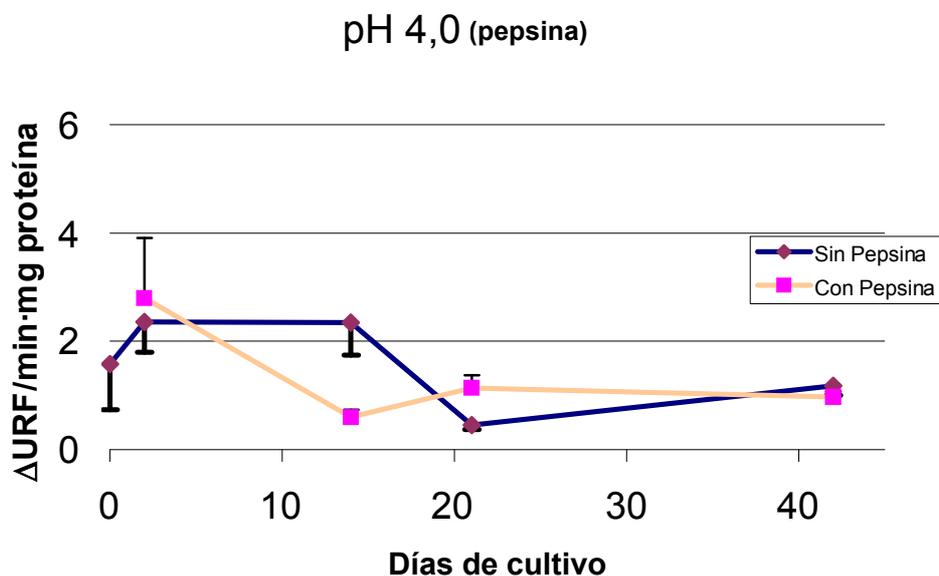
Figura R13. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) a pH 4,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 4-12 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Aenz \pm ES	1,58 \pm 0,84	2,58 \pm 0,57	1,47 \pm 0,39	0,80 \pm 0,16	1,08 \pm 0,10

Existen diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de los estados de desarrollo a pH 4,0 (ANOVA 3 vías, $p=0,004$). Como se puede observar la actividad máxima corresponde a la L3 48h (diferencias significativas en los contrastes realizados *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni: L3 48h>L5J $p=0,005$).

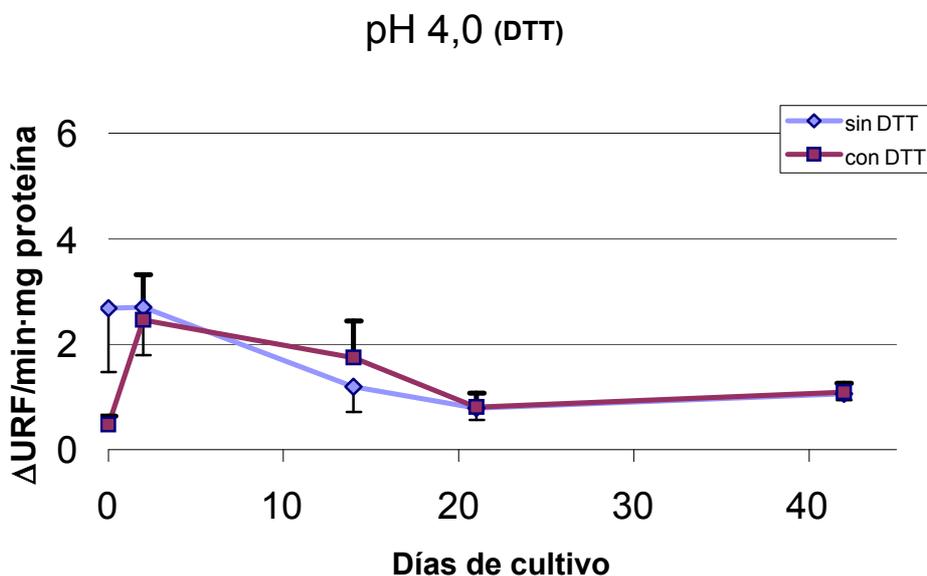
Figura R14. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) a pH 4,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 4-6 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Sin Pepsina	1,58±0,84	2,36±0,56	2,34±0,60	0,45±0,09	1,18±0,18
Con Pepsina	—	2,80±1,10	0,60±0,14	1,14±0,24	0,98±0,09

A pH 4,0 no existen diferencias significativas entre la actividad enzimática mostrada al cultivar con pepsina o sin pepsina (ANOVA 3 vías, $p=0,345$), pero existen interacciones estadísticamente significativas (ANOVA 3 vías, $p=0,001$) entre las variables pepsina en el cultivo y estado de desarrollo. Como se ve en el gráfico, al representar las actividades enzimáticas durante el desarrollo en presencia o ausencia de pepsina, las líneas no transcurren paralelas entre sí, lo que indica una interacción entre ambas variables (Martínez González y Calasanz Abínzano 2001). Destaca sobre todo la interacción negativa que hay en el paso de L3 48h a L4.

Figura R15. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) a pH 4,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la presencia de DTT en el ensayo, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-6 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

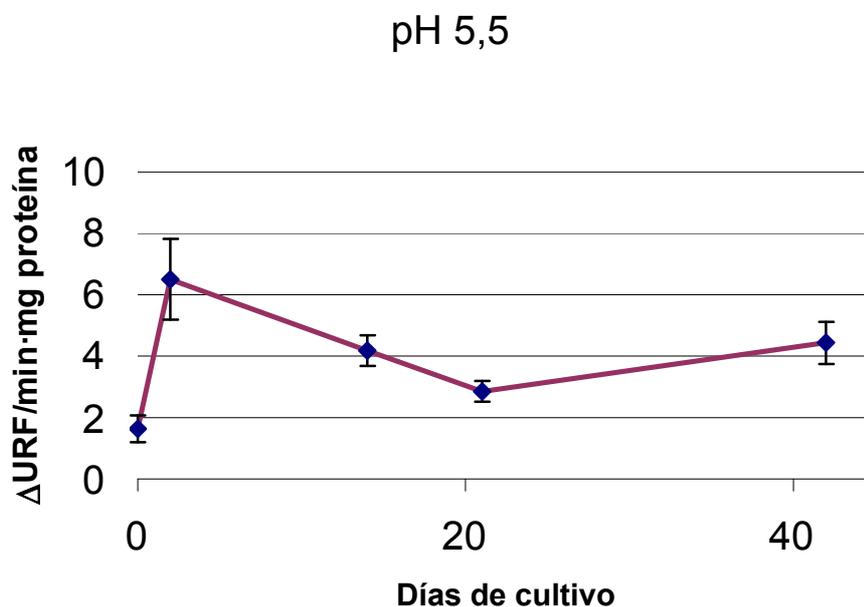


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Sin DTT	2,69±1,22	2,70±0,90	1,19±0,47	0,79±0,22	1,06±0,12
Con DTT	0,47±0,16	2,46±0,86	1,75±0,69	0,80±0,27	1,09±0,17

A pH 4,0 no existen diferencias significativas entre la actividad enzimática mostrada en los ensayos realizados con DTT y sin él (ANOVA 3 vías, $p=0,266$).

1.1.7.3. pH 5,5

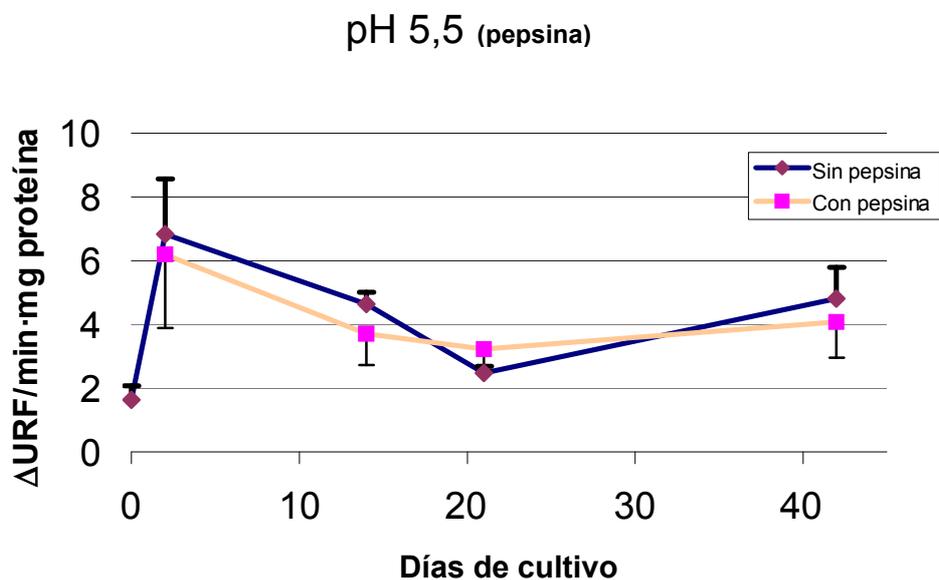
Figura R16. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) a pH 5,5 durante el desarrollo de *H. aduncum*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 4-12 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Aenz \pm ES	1,63 \pm 0,44	6,51 \pm 1,32	4,18 \pm 0,50	2,85 \pm 0,34	4,44 \pm 0,69

Existen diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de los diferentes estados de desarrollo (ANOVA 3 vías, $p=0,002$). La actividad mínima corresponde a L3 0h (diferencias significativas en los contrastes *a posteriori* realizados mediante la prueba de Bonferroni: L3 0h<L3 48h $p=0,001$; L3 0h<L4 $p=0,030$; L3 0h<L5 $p=0,025$) y la máxima actividad enzimática corresponde a la L3 48h (diferencias significativas en los contrastes *a posteriori* llevados a cabo mediante la prueba de Bonferroni: L3 48h>L3 0h $p=0,001$; L3 48h>L5J $p=0,010$).

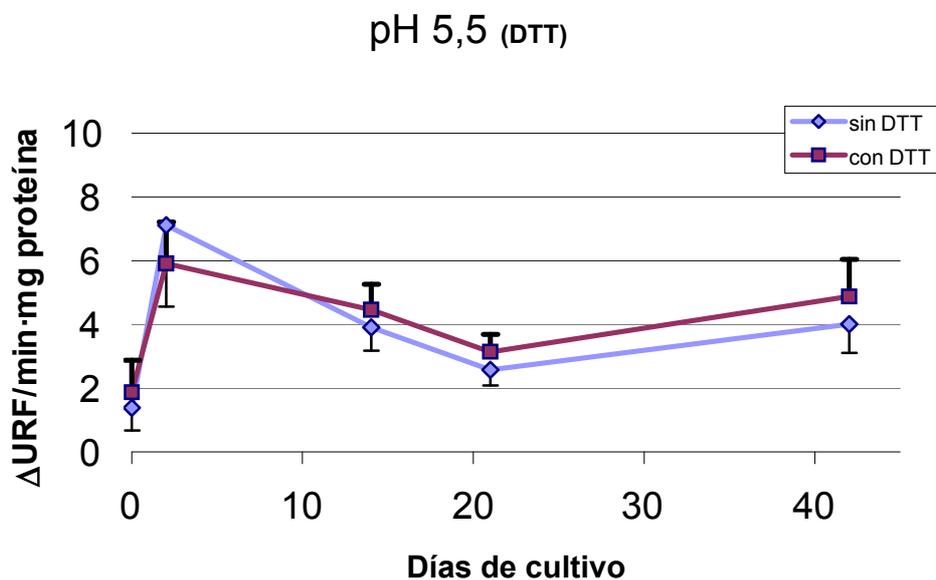
Figura R17. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) a pH 5,5 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-6 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Sin Pepsina	1,63±0,44	6,82±1,75	4,64±0,36	2,47±0,21	4,81±0,98
Con Pepsina	—	6,19±2,31	3,71±0,99	3,23±0,68	4,07±1,11

No existen diferencias entre las actividades enzimáticas de los cultivados con pepsina y sin ella (ANOVA 3 vías, $p=0,340$).

Figura R18. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) a pH 5,5 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la presencia de DTT en el ensayo, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-6 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

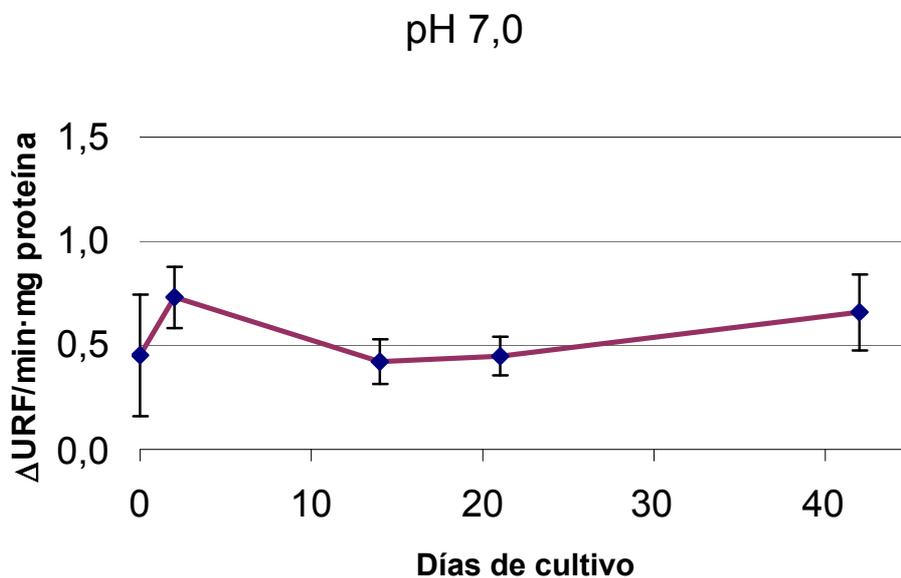


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Sin DTT	1,39±0,72	7,11±2,56	3,90±0,73	2,57±0,48	4,00±0,90
Con DTT	1,88±0,99	5,90±1,31	4,45±0,80	3,13±0,55	4,88±1,17

No existen diferencias entre las actividades enzimáticas de los ensayos con DTT o sin él (ANOVA 3 vías, $p=0,394$).

1.1.7.4. pH 7,0

Figura R19. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 4-12 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

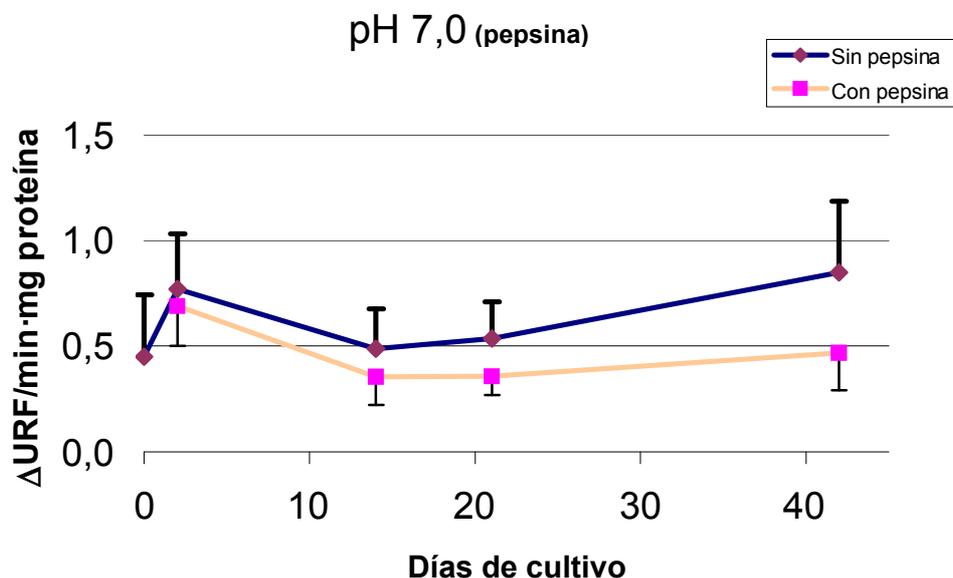


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Aenz \pm ES	0,45 \pm 0,29	0,73 \pm 0,15	0,42 \pm 0,11	0,45 \pm 0,09	0,66 \pm 0,18

No hay diferencias significativas (K-W, $p=0,284$) entre las actividades enzimáticas a pH 7,0 de los estados de desarrollo estudiados.

Como se puede observar la actividad enzimática sube desde L3 0h al máximo que corresponde a la L3 48h. Luego se observa otro ascenso de la actividad enzimática durante el estado adulto, desde L5J hasta L5.

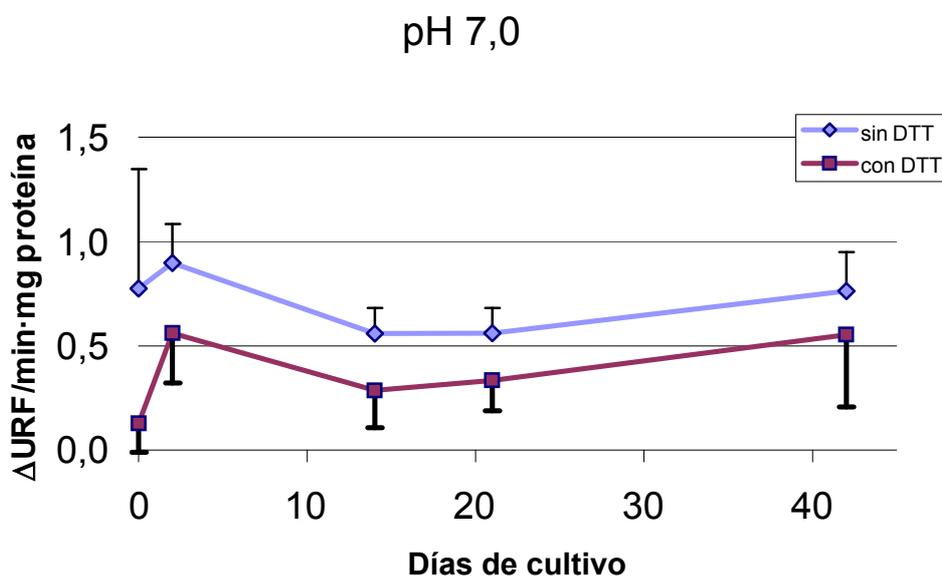
Figura R20. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 4-6 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Sin Pepsina	0,45±0,29	0,77±0,26	0,49±0,19	0,54±0,17	0,85±0,34
Con Pepsina	—	0,69±0,19	0,35±0,13	0,36±0,09	0,47±0,18

No hay diferencias significativas entre la actividad enzimática de los parásitos cultivados con y sin pepsina a pH 7,0 (K-W, $p=0,295$).

Figura R21. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la presencia de DTT en el ensayo, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-6 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
sin DTT	0,78±0,57	0,90±0,19	0,56±0,12	0,56±0,12	0,76±0,19
con DTT	0,13±0,14	0,56±0,24	0,29±0,18	0,33±0,15	0,55±0,35

A pH 7,0 existen diferencias significativas entre el ensayo con DTT y sin él, siendo más baja la actividad con DTT (K-W, $p=0,008$).

1.1.8. Resumen de los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína

Tabla R1. Actividad enzimática (Δ URF/min·mg proteína) durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de pH, DTT (5,8 mM) y pepsina en cultivo, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

		ESTADO DE DESARROLLO									
		L3 0h		L3 48h(2 días)		L4(14 días)		L5J(21 días)		L5(42 días)	
		Sin Pepsina	Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina
sin DTT	pH										
	2,0	0,17 \pm 0,05	1,16 \pm 1,26	1,01 \pm 0,88	0,27 \pm 0,07	0,42 \pm 0,47	0,17 \pm 0,01	0,14 \pm 0,09	0,32 \pm 0,25	0,29 \pm 0,07	
	2,5	0,21 \pm 0,10	1,55 \pm 1,27	1,05 \pm 0,92	0,31 \pm 0,05	0,43 \pm 0,40	0,13 \pm 0,03	0,26 \pm 0,09	0,41 \pm 0,27	0,32 \pm 0,20	
	3,0	0,19 \pm 0,09	1,40 \pm 0,99	1,21 \pm 1,14	0,25 \pm 0,04	0,37 \pm 0,33	0,17 \pm 0,01	0,28 \pm 0,08	0,40 \pm 0,15	0,31 \pm 0,13	
	3,5	0,09 \pm 0,03	1,22 \pm 1,19	1,77 \pm 1,33	0,66 \pm 0,34	0,36 \pm 0,39	0,18 \pm 0,02	0,27 \pm 0,06	0,44 \pm 0,20	0,31 \pm 0,10	
	4,0	2,69 \pm 1,22	2,60 \pm 1,13	2,80 \pm 1,95	1,86 \pm 0,84	0,52 \pm 0,20	0,47 \pm 0,17	1,11 \pm 0,35	1,13 \pm 0,24	0,99 \pm 0,17	
	4,5	0,55 \pm 0,25	2,26 \pm 1,39	3,37 \pm 2,61	1,33 \pm 0,07	0,63 \pm 0,33	0,54 \pm 0,07	0,65 \pm 0,23	1,18 \pm 0,44	1,33 \pm 0,71	
	5,0	1,12 \pm 0,47	4,00 \pm 1,94	4,70 \pm 3,54	2,71 \pm 0,11	1,51 \pm 0,66	1,16 \pm 0,07	1,53 \pm 0,51	2,19 \pm 0,60	1,95 \pm 1,06	
	5,5	1,39 \pm 0,72	6,55 \pm 3,28	7,68 \pm 5,46	4,28 \pm 0,59	3,52 \pm 1,66	2,18 \pm 0,19	2,97 \pm 1,08	4,50 \pm 1,43	3,50 \pm 1,63	
	6,0	1,65 \pm 0,95	4,23 \pm 1,26	3,21 \pm 1,21	2,41 \pm 0,11	2,41 \pm 1,63	0,98 \pm 0,14	1,33 \pm 0,48	2,57 \pm 0,67	2,16 \pm 0,69	
	6,5	0,90 \pm 0,61	1,86 \pm 0,84	1,19 \pm 0,59	0,81 \pm 0,12	1,03 \pm 0,78	0,40 \pm 0,03	0,57 \pm 0,17	1,03 \pm 0,18	1,00 \pm 0,30	
	7,0	0,78 \pm 0,57	0,89 \pm 0,36	0,98 \pm 0,29	0,48 \pm 0,29	0,32 \pm 0,17	0,54 \pm 0,27	0,35 \pm 0,14	0,85 \pm 0,39	0,42 \pm 0,16	
7,5	0,38 \pm 0,16	0,29 \pm 0,09	0,39 \pm 0,17	0,11 \pm 0,08	0,08 \pm 0,06	0,51 \pm 0,40	0,21 \pm 0,04	0,23 \pm 0,03	0,16 \pm 0,08		
con DTT	2,0	0,21 \pm 0,06	1,45 \pm 1,05	1,28 \pm 1,33	0,22 \pm 0,08	0,46 \pm 0,52	0,18 \pm 0,07	0,20 \pm 0,12	0,47 \pm 0,22	0,19 \pm 0,13	
	2,5	0,21 \pm 0,08	1,11 \pm 1,20	1,16 \pm 1,17	0,31 \pm 0,08	0,43 \pm 0,41	0,16 \pm 0,05	0,28 \pm 0,06	0,37 \pm 0,29	0,34 \pm 0,14	
	3,0	0,18 \pm 0,05	1,55 \pm 1,23	1,25 \pm 1,25	0,25 \pm 0,01	0,43 \pm 0,43	0,15 \pm 0,02	0,24 \pm 0,04	0,42 \pm 0,15	0,37 \pm 0,15	
	3,5	0,15 \pm 0,03	1,31 \pm 1,32	1,78 \pm 1,25	0,42 \pm 0,06	0,40 \pm 0,44	0,14 \pm 0,03	0,27 \pm 0,04	0,48 \pm 0,18	0,29 \pm 0,05	
	4,0	0,47 \pm 0,16	2,12 \pm 0,76	2,81 \pm 1,96	2,83 \pm 1,09	0,67 \pm 0,27	0,44 \pm 0,12	1,17 \pm 0,47	1,22 \pm 0,37	0,96 \pm 0,15	
	4,5	0,58 \pm 0,23	2,70 \pm 1,51	3,50 \pm 2,87	1,47 \pm 0,17	0,65 \pm 0,24	0,55 \pm 0,06	0,72 \pm 0,35	1,26 \pm 0,51	1,23 \pm 0,61	
	5,0	1,30 \pm 0,55	4,21 \pm 2,30	5,29 \pm 3,96	2,84 \pm 0,20	1,39 \pm 0,69	1,17 \pm 0,05	1,52 \pm 0,65	2,50 \pm 0,67	2,22 \pm 1,14	
	5,5	1,88 \pm 0,99	7,10 \pm 2,87	4,71 \pm 0,60	5,00 \pm 0,52	3,91 \pm 1,82	2,77 \pm 0,32	3,49 \pm 1,28	5,12 \pm 1,97	4,64 \pm 2,14	
	6,0	1,81 \pm 1,02	4,14 \pm 1,22	3,18 \pm 0,73	2,83 \pm 0,37	2,55 \pm 1,61	1,35 \pm 0,15	1,84 \pm 0,61	3,60 \pm 1,02	3,42 \pm 1,51	
	6,5	0,60 \pm 0,38	1,96 \pm 0,87	1,40 \pm 0,53	1,19 \pm 0,25	1,20 \pm 0,95	0,66 \pm 0,05	0,86 \pm 0,29	1,69 \pm 0,40	1,88 \pm 0,75	
7,0	0,13 \pm 0,14	0,65 \pm 0,53	0,47 \pm 0,25	0,35 \pm 0,37	0,23 \pm 0,24	0,40 \pm 0,33	0,26 \pm 0,13	0,78 \pm 0,74	0,33 \pm 0,37		
7,5	0,39 \pm 0,18	0,39 \pm 0,08	0,48 \pm 0,21	0,21 \pm 0,10	0,14 \pm 0,08	0,48 \pm 0,37	0,25 \pm 0,01	0,27 \pm 0,05	0,20 \pm 0,08		

1.1.9. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína

Variable	Contrastes	Aenz	
		Significación	
Estado (K-W)		<0,001*	
	L3 0h	L3 48h	<0,001*
	(U M-W)	L4	0,218
		L5J	0,889
		L5	0,026
		L3 48h	L3 0h
	(U M-W)	L4	<0,001*
		L5J	<0,001*
		L5	<0,001*
		L4	L3 0h
	(U M-W)	L3 48h	<0,001*
		L5J	0,108
		L5	0,271
L5J		L3 0h	0,889
(U M-W)	L3 48h	<0,001*	
	L4	0,108	
	L5	0,002*	
	L5	L3 0h	0,026
(U M-W)	L3 48h	<0,001*	
	L4	0,271	
	L5J	0,002*	
	Pepsina (K-W)		0,406
DTT (K-W)		0,948	

Tabla R2. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de Kruskal-Wallis y las comparaciones múltiples *a posteriori* realizadas entre los “estados de desarrollo” mediante la prueba de la U de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni. Estas pruebas se han realizado teniendo en cuenta todos los valores de actividad enzimática frente a BODIPY TR-X caseína en conjunto. El nivel de significación es de 0,05. En la U M-W como son 10 comparaciones el nivel de significación queda corregido a 0,005. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Aenz L3 0h	Aenz L3 48h	Aenz L4	Aenz L5J	Aenz L5
	Significación (ANOVA 2 vías)	Significación (ANOVA 3 vías)	Significación (K-W)	Significación (ANOVA 3 vías)	Significación (K-W)
Pepsina		0,767	0,027*	0,082	0,163
DTT	0,170	0,802	0,816	0,685	0,679
pH	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Pepsina-DTT		0,783		0,794	
Pepsina-pH		0,996		0,157	
DTT-pH	0,060	0,964		0,902	
Pepsina-DTT-pH		0,999		1,000	

Tabla R3. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de Kruskal-Wallis y ANOVA de 2 y 3 vías realizadas en los grupos de la variable “estado de desarrollo”. El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Aenz L3 48h (Sin Pepsina)	Aenz L4 (Sin Pepsina)	Aenz L5J (Sin Pepsina)	Aenz L5 (Sin Pepsina)
	Significación (K-W)	Significación (ANOVA 1 vía)	Significación (ANOVA 1 vía)	Significación (K-W)
DTT	0,973	0,898	0,952	0,604

Variable	Aenz L3 48h (Con Pepsina)	Aenz L4 (Con Pepsina)	Aenz L5R (Con Pepsina)	Aenz L5 (Con Pepsina)
	Significación (ANOVA 1 vía)	Significación (K-W)	Significación (K-W)	Significación (K-W)
DTT	0,750	0,874	0,933	0,915

Tabla R4. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de Kruskal-Wallis y ANOVA de 1 vía realizadas en los grupos resultantes por las combinaciones de las variables “estado de desarrollo” y “pepsina”. El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Contrastes	Aenz Sin Pepsina	Aenz Con Pepsina	Aenz Sin DTT	Aenz Con DTT
		Significación	Significación	Significación	Significación
Estado (K-W)		<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
	L3 0h L3 48h (U M-W)	<0,001*		0,002*	<0,001*
	L4	0,022		0,631	0,205
	L5J	0,709		0,687	0,595
	L5	0,007		0,294	0,039
	L3 48h L3 0h (U M-W)	<0,001*		0,002*	<0,001*
	L4	0,009	<0,001*	<0,001*	0,002*
	L5J	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,003*
	L5	0,012	0,002*	0,002*	0,022
	L4 L3 0h (U M-W)	0,022		0,631	0,205
	L3 48h	0,009	<0,001*	<0,001*	0,002*
	L5J	0,003*	0,585	0,216	0,292
	L5	0,795	0,219	0,465	0,417
	L5J L3 0h (U M-W)	0,709		0,687	0,595
	L3 48h	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,003*
	L4	0,003*	0,585	0,216	0,292
	L5	<0,001*	0,326	0,030	0,027
	L5 L3 0h (U M-W)	0,007		0,294	0,039
	L3 48h	0,012	0,002*	0,002*	0,022
	L4	0,795	0,219	0,465	0,417
	L5J	<0,001*	0,326	0,030	0,027
Pepsina (K-W)				0,482	0,621
DTT (K-W)		0,968	0,925		

Tabla R5. Valores “p” de significación de las distintas pruebas, realizadas en los grupos de las variables “pepsina” o “DTT”, de Kruskal-Wallis y las comparaciones múltiples *a posteriori* realizadas entre los “estados de desarrollo” mediante la prueba de la U de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni. El nivel de significación es de 0,05. En la U M-W como son 10 comparaciones, el nivel de significación queda corregido a 0,005, excepto en el grupo “Con Pepsina”, que son 6 comparaciones y el nivel de significación es 0,0083. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Contrastes	Aenz pH 3,0	Aenz pH 4,0	Aenz pH 5,5	Aenz pH 7,0
		Significación (K-W)	Significación (ANOVA 3 vías)	Significación (ANOVA 3 vías)	Significación (K-W)
Estado		0,005*	0,004*	0,002*	0,284
	L3 0h L3 48h	(U) 0,013	(B) 1,000	(B) 0,001*	
	L4	(U) 0,521	(B) 1,000	(B) 0,030	
	L5J	(U) 0,446	(B) 1,000	(B) 0,626	
	L5	(U) 0,103	(B) 1,000	(B) 0,025*	
	L3 48h L3 0h	(U) 0,013	(B) 1,000	(B) 0,001*	
	L4	(U) 0,008	(B) 0,259	(B) 0,836	
	L5J	(U) 0,001*	(B) 0,005*	(B) 0,010*	
	L5	(U) 0,198	(B) 0,313	(B) 0,978	
	L4 L3 0h	(U) 0,521	(B) 1,000	(B) 0,030*	
	L3 48h	(U) 0,008	(B) 0,259	(B) 0,836	
	L5J	(U) 0,799	(B) 1,000	(B) 0,896	
	L5	(U) 0,160	(B) 1,000	(B) 1,000	
	L5J L3 0h	(U) 0,446	(B) 1,000	(B) 0,626	
	L3 48h	(U) 0,001*	(B) 0,005*	(B) 0,010*	
	L4	(U) 0,799	(B) 1,000	(B) 0,896	
	L5	(U) 0,024	(B) 1,000	(B) 0,765	
	L5 L3 0h	(U) 0,103	(B) 1,000	(B) 0,025*	
	L3 48h	(U) 0,198	(B) 0,313	(B) 0,978	
	L4	(U) 0,160	(B) 1,000	(B) 1,000	
	L5J	(U) 0,024	(B) 1,000	(B) 0,765	
Pepsina		0,941	0,345	0,340	0,295
DTT		0,956	0,266	0,394	0,008*
Estadio-Pepsina			0,001*	0,704	
Estadio-DTT			0,137	0,990	
Pepsina-DTT			0,996	0,834	
Estadio-Pepsina-DTT			0,985	0,972	

Tabla R6. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de Kruskal-Wallis y ANOVA de 3 vías realizadas en los grupos de la variable “pH” para los valores 3,0, 4,0, 5,5 y 7,0. Las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los “estados de desarrollo” se han realizado mediante la prueba Bonferroni o la U de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni. El nivel de significación es de 0,05. En la U M-W, como son 10 comparaciones, el nivel de significación queda corregido a 0,005. (U) Contrastes *a posteriori* realizados mediante la prueba de U M-W. (B) Contrastes *a posteriori* realizados mediante la prueba de Bonferroni. (*) Valores significativos estadísticamente.

1.2. Inhibición de la actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína mediante inhibidores específicos durante el desarrollo de *H. aduncum*

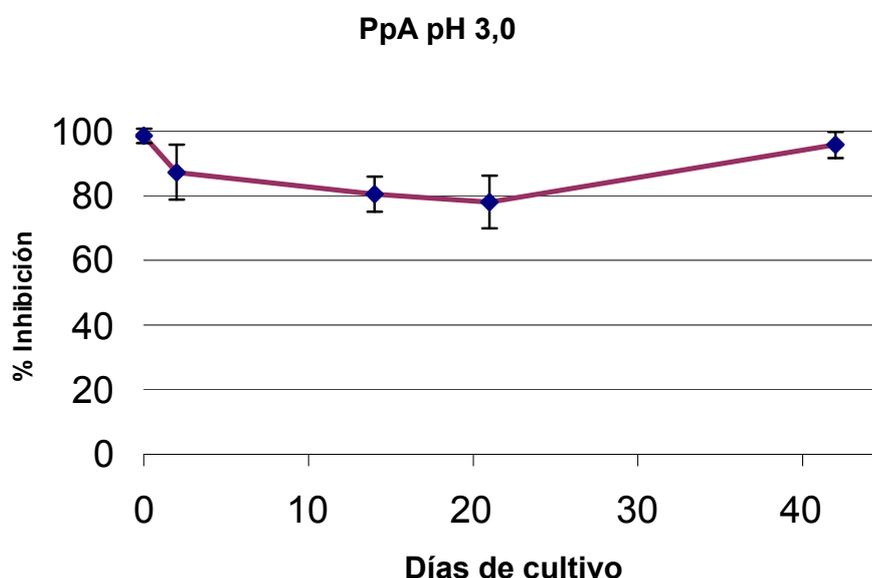
A continuación se muestran los valores de inhibición de la actividad proteasa general con BODIPY TR-X caseína, mediante inhibidores específicos. Los valores de inhibición están expresados en porcentaje de inhibición \pm ES con respecto a la actividad sin inhibidor.

1.2.1. Inhibición a pH 3,0

Este pH se ha escogido para obtener más datos sobre la actividad de las proteasas aspárticas en la región más ácida, y ante nuestra falta de disponibilidad de sustratos específicos para éstas, se ha optado por un ensayo de inhibición con PpA.

1.2.1.1. Pepstatín A (pH 3,0)

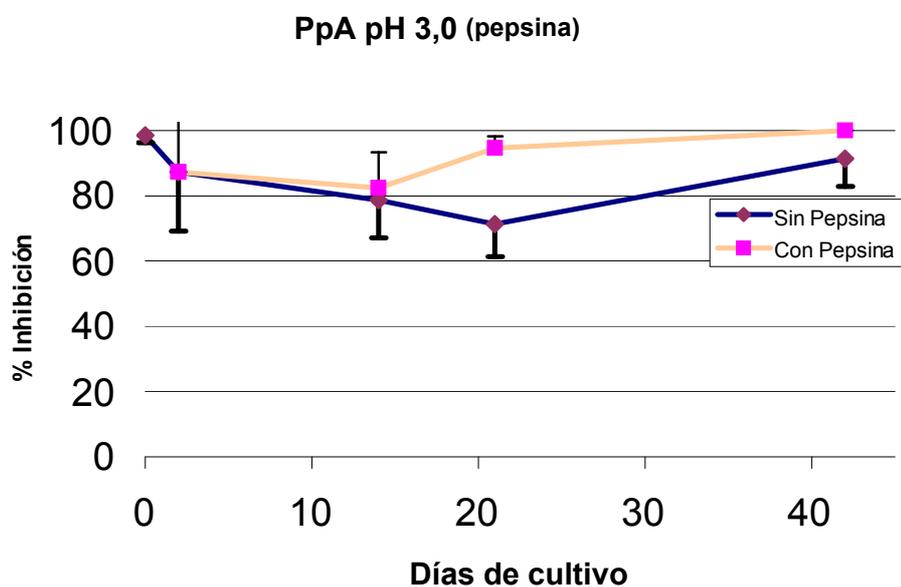
Figura R22. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 3,0 durante el desarrollo de *H. aduncum* [empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml)], mediante el uso de pepstatín A como inhibidor. Cada dato es la media de 2-7 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición \pm ES	98,46 \pm 2,18	87,23 \pm 8,51	80,48 \pm 5,44	77,97 \pm 8,13	95,66 \pm 4,04

Se observa que la inhibición, que es total en L3 0h, va bajando hasta L5J y vuelve a subir hasta ser casi total de nuevo en adulto maduro (L5), aunque no existen diferencias significativas entre los distintos estados de desarrollo (K-W, $p=0,156$).

Figura R23. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 3,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml), mediante el uso de pepstatín A como inhibidor. Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado ± ES.



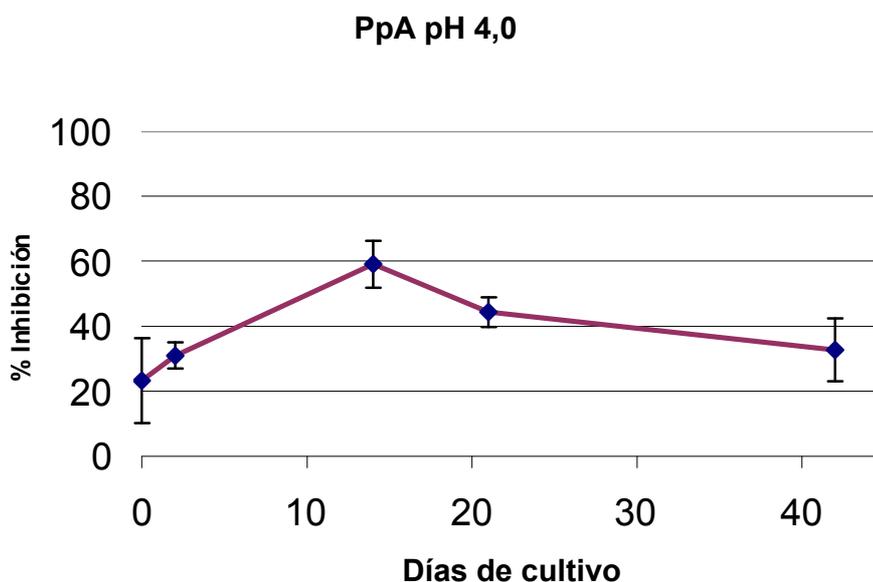
Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	98,46±2,18	87,25±18,03	78,55±11,47	71,30±9,97	91,32±8,47
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	87,22±18,08	82,42±10,94	94,65±3,58	100,00±0,00

No existen diferencias significativas entre los parásitos cultivados con pepsina o sin ella (K-W, $p=0,189$), aunque se aprecia una ligera diferencia (no significativa; K-W, $p=0,121$) en L5J.

1.2.2. Inhibición a pH 4,0

1.2.2.1. Pepstatín A (pH 4,0)

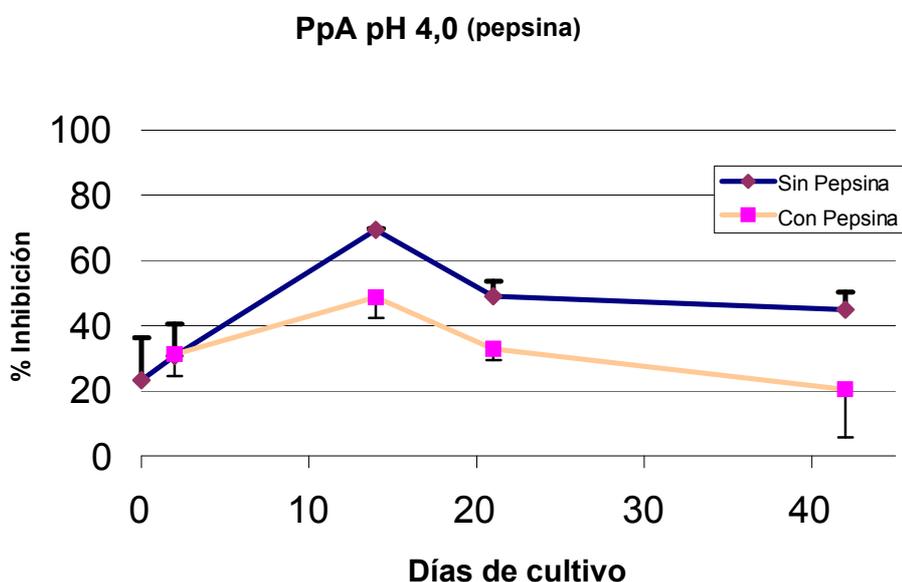
Figura R24. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 4,0 durante el desarrollo de *H. aduncum* [empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml)], mediante el uso de pepstatín A como inhibidor. Cada dato es la media de 2-7 experimentos realizados en duplicado ± ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES	23,23±13,14	31,01±3,99	59,05±7,21	44,35±4,53	32,67±9,67

En conjunto existen diferencias significativas entre estados de desarrollo (ANOVA 1 vía, $p=0,012$). Aquí ocurre todo lo contrario que a pH 3,0, sube desde L3 0h hasta L4, que es el estadio que presenta una mayor inhibición, en torno al 60%, por PpA a pH 4,0 (diferencias significativas en los contrastes *a posteriori* llevados a cabo mediante la prueba de Bonferroni: $L4 > L3\ 0h\ p=0,036$; $L4 > L3\ 48h\ p=0,049$), y vuelve a bajar hasta adulto maduro (L5).

Figura R25. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 4,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml), mediante el uso de pepstatín A como inhibidor. Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado ± ES.

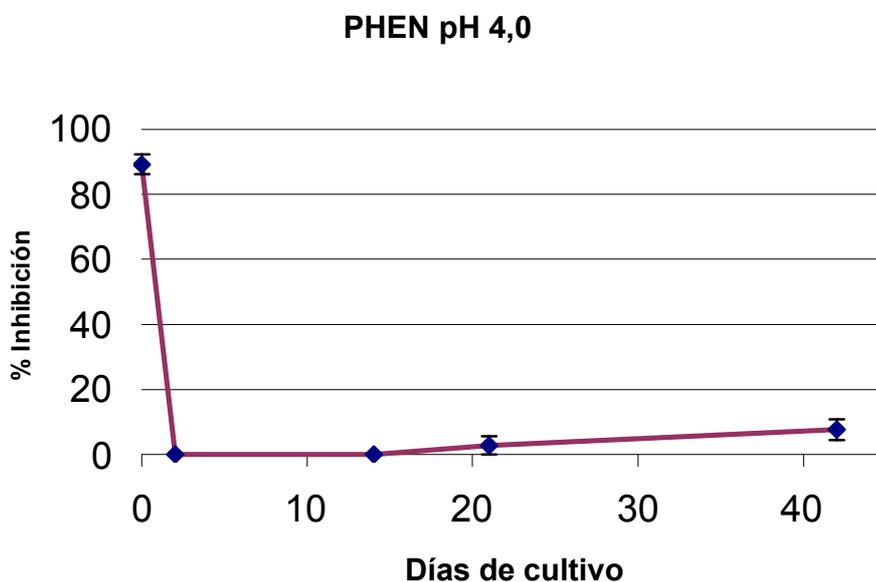


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	23,23±13,14	30,79±9,84	69,38±0,45	48,98±4,69	44,88±5,42
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	31,23±6,78	48,73±6,42	32,77±3,32	20,47±14,68

No existen diferencias significativas entre el grupo mantenido sin pepsina en el momento de la recogida y el cultivado con pepsina (ANOVA 1 vía, $p=0,111$), pero la inhibición es menor en los cultivados con pepsina. Para el estadio L5J al tener mayor número de experimentos, las diferencias significativas entre los cultivados con pepsina y sin ella son dudosas, ya que la significación estadística es K-W, $p=0,053$, muy próxima al nivel de significación global establecido en $p<0,05$. La inhibición máxima es en torno al 70% en L4 sin pepsina.

1.2.2.2. 1,10-fenantrolina (pH 4,0)

Figura R26. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 4,0 durante el desarrollo de *H. aduncum* [empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml)], mediante el uso de 1,10-fenantrolina como inhibidor. Cada dato es la media de 2-7 experimentos realizados en duplicado ± ES.

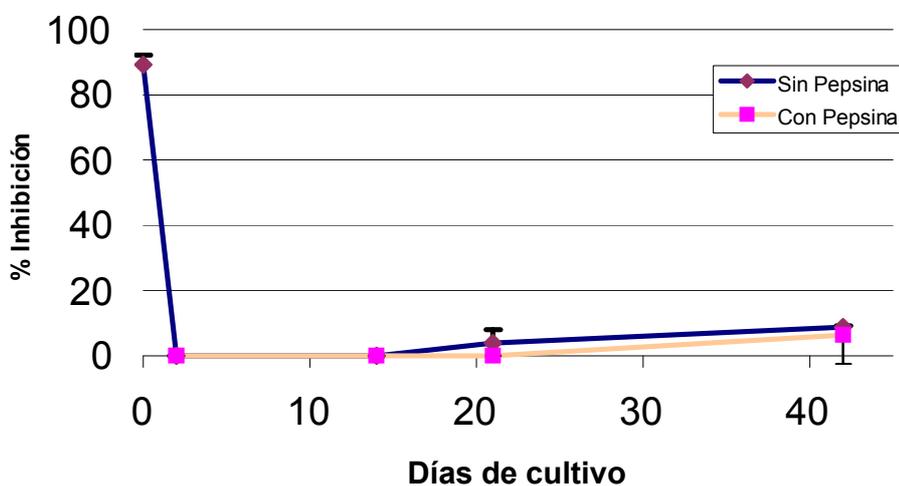


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES	89,26 ± 2,98	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,82 ± 2,82	7,63 ± 3,14

Se observa que la inhibición es muy elevada en L3 0h y nula o muy baja en el resto de estados de desarrollo. En el adulto maduro (L5) existe una inhibición en torno al 8%. Existen diferencias significativas entre los estados de desarrollo (K-W, $p=0,015$). Sin embargo, en los contrastes *a posteriori* no se han hallado; el valor de “p” entre L3 0h y L5J esta más cercano a la significación estadística (U M-W, $p=0,056$) debido a que para L5J hay más potencia estadística porque se ha realizado un mayor número de experimentos; sin embargo al excluir de la comparación los estados L3 0h y L5, las diferencias significativas desaparecen (K-W, $p=0,294$).

Figura R27. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 4,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml), mediante el uso de 1,10-fenantrolina como inhibidor. Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado ± ES.

PHEN pH 4,0 (pepsina)

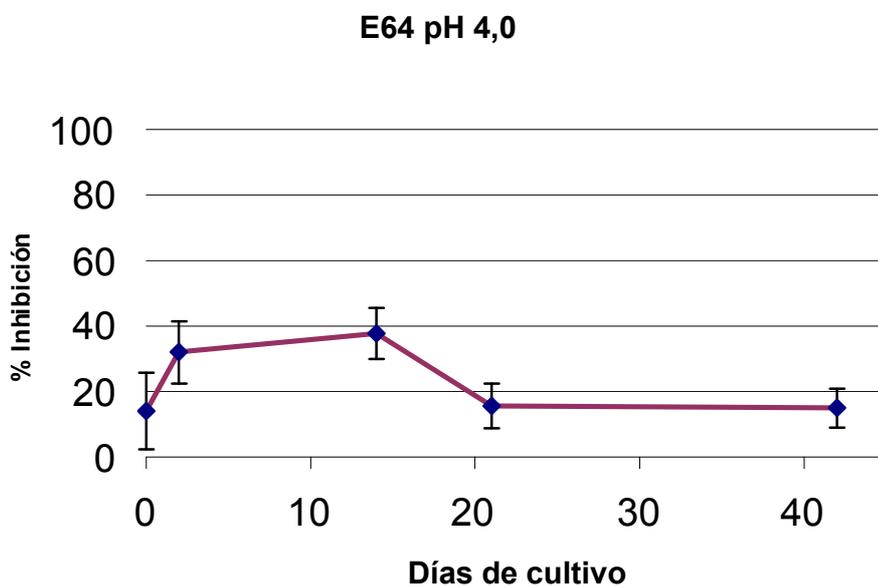


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	89,26±2,98	0,00±0,00	0,00±0,00	3,95±4,07	8,83±0,28
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	6,43±9,10

No existen diferencias significativas entre los parásitos cultivados con pepsina y sin ella (K-W, p=0,131).

1.2.2.3. E64 (pH 4,0)

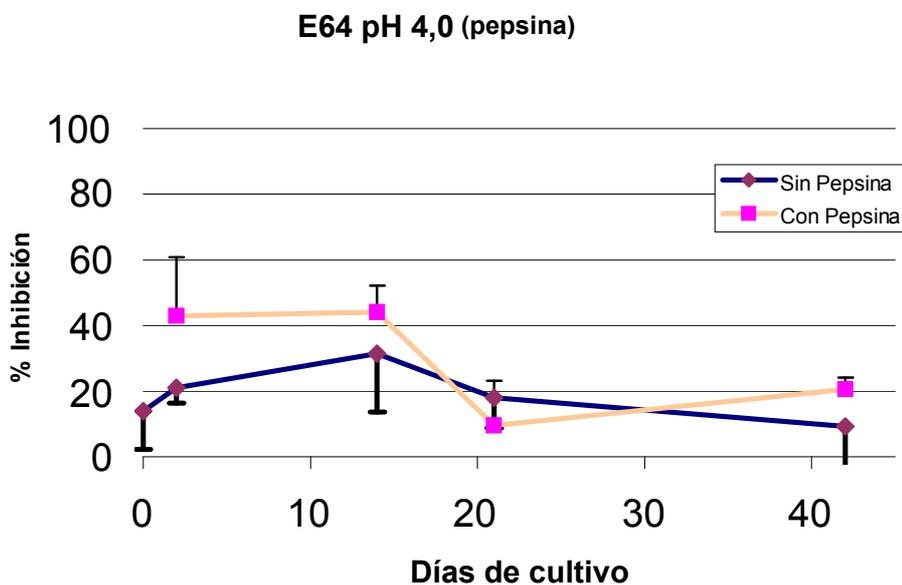
Figura R28. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 4,0 durante el desarrollo de *H. aduncum* [empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml)], mediante el uso de E64 como inhibidor. Cada dato es la media de 2-7 experimentos realizados en duplicado ± ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES	13,96±11,70	31,98±9,55	37,73±7,79	15,65±6,80	14,90±5,90

Se observa que los valores de inhibición están por debajo del 50%, subiendo desde L3 0h hasta L4, y bajando hasta adulto maduro (L5). No existen diferencias significativas entre los distintos estados de desarrollo (ANOVA 2 vías, $p=0,126$).

Figura R29. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 4,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml), mediante el uso de E64 como inhibidor. Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado ± ES.



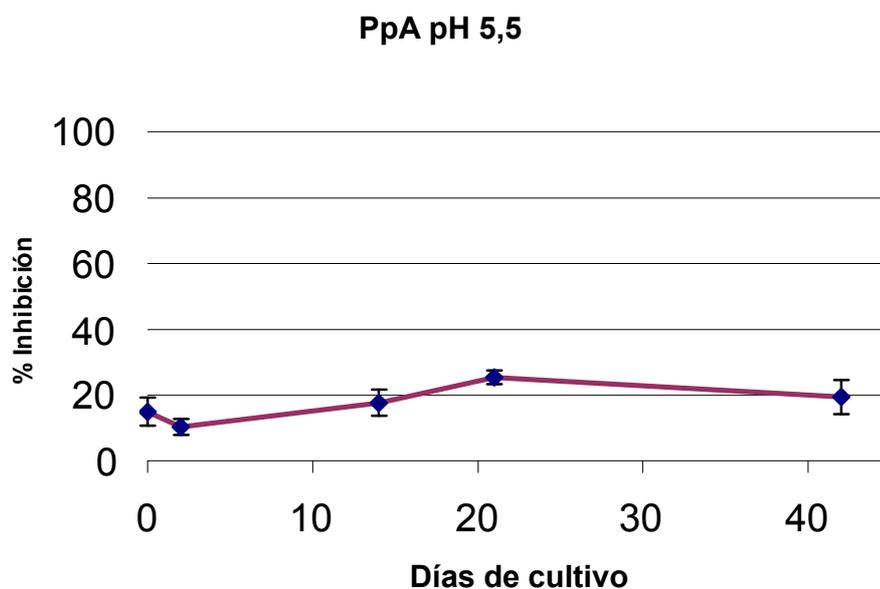
Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	13,96±11,70	21,04±4,62	31,44±17,88	18,07±9,28	9,29±13,13
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	42,93±17,91	44,03±8,21	9,61±13,59	20,52±3,86

En general los parásitos cultivados con pepsina presentan una mayor inhibición, excepto en L5J. Pero no existen diferencias significativas entre los cultivados con pepsina o sin ella (ANOVA 2 vías, $p=0,214$).

1.2.3. Inhibición a pH 5,5

1.2.3.1. Pepstatín A (pH 5,5)

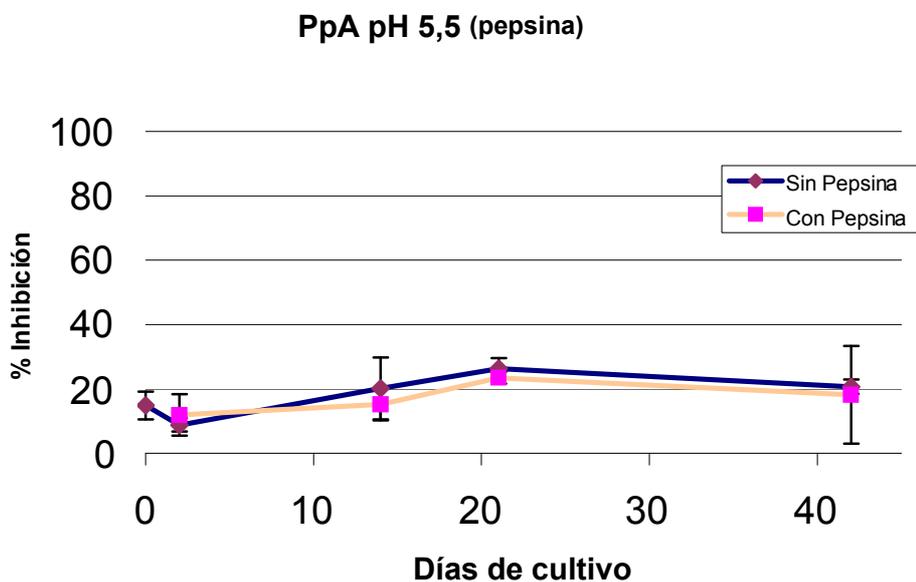
Figura R30. Porcentaje de inhibición de la actividad a pH 5,5 proteolítica durante el desarrollo de *H. aduncum* [empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml)], mediante el uso de pepstatín A como inhibidor. Cada dato es la media de 2-6 experimentos realizados en duplicado ± ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES	14,91±4,29	10,36±2,46	17,68±3,94	25,37±2,07	19,46±5,20

La inhibición es baja, entre 10 y 25%, y existen diferencias significativas entre los distintos estados de desarrollo (ANOVA 1 vía, $p=0,024$). El mayor porcentaje de inhibición se presenta en L5J (con diferencias significativas en los contrastes *a posteriori* llevados a cabo mediante la prueba de Bonferroni: L5J>L3 48h $p=0,018$).

Figura R31. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 5,5 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml), mediante el uso de pepstatín A como inhibidor. Cada dato es la media de 2-4 experimentos realizados en duplicado ± ES.

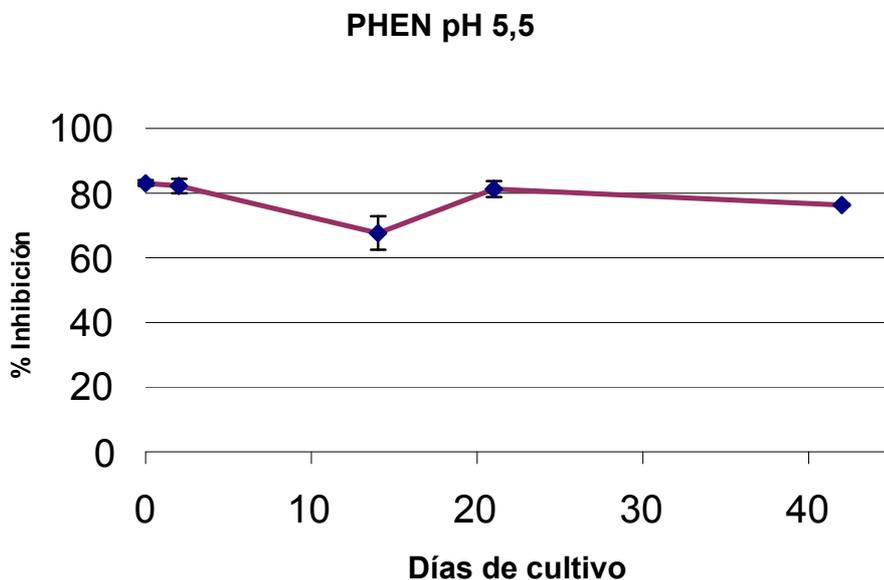


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	14,91±4,29	8,83±2,00	20,14±9,58	26,34±3,21	20,74±2,22
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	11,89±6,41	15,23±4,90	23,42±1,79	18,17±15,23

No existen diferencias significativas entre los parásitos cultivados con pepsina o sin ella (ANOVA 1 vía, $p=0,518$).

1.2.3.2. 1,10-fenantrolina (pH 5,5)

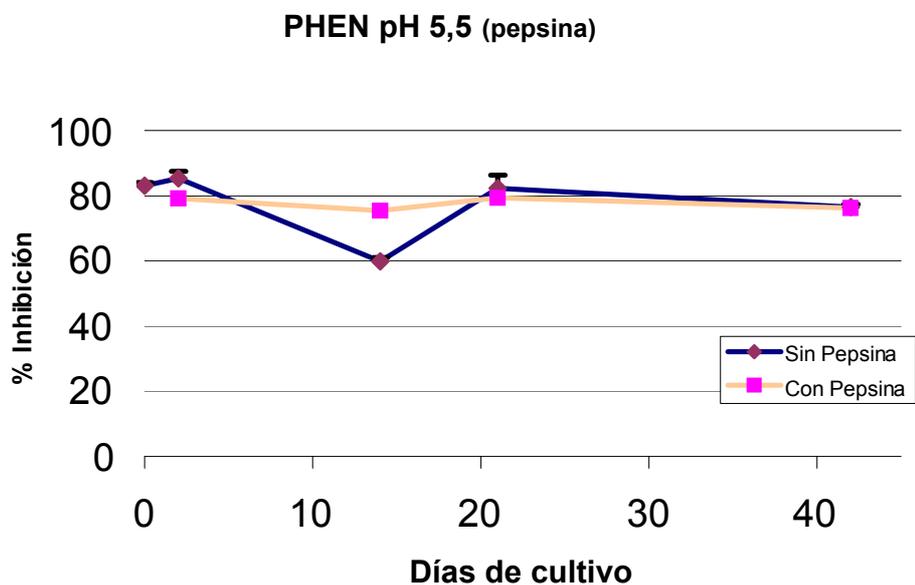
Figura R32. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 5,5 durante el desarrollo de *H. aduncum* [empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml)], mediante el uso de 1,10-fenantrolina como inhibidor. Cada dato es la media de 2-6 experimentos realizados en duplicado ± ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES	83,09±0,89	82,19±2,22	67,61±5,18	81,23±2,51	76,37±0,30

La inhibición es alta, por encima del 80% en L3 0h, L3 48h y L5J, y por debajo en los otros estados de desarrollo, con diferencias significativas (K-W, $p=0,023$). Aunque en los contrastes realizados *a posteriori* no se han hallado diferencias entre estados de desarrollo. Al volver a comparar los grupos de estados de desarrollo excluyendo L4, las diferencias significativas desaparecen (K-W, $p=0,111$).

Figura R33. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 5,5 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml), mediante el uso de 1,10-fenantrolina como inhibidor. Cada dato es la media de 2-4 experimentos realizados en duplicado ± ES.

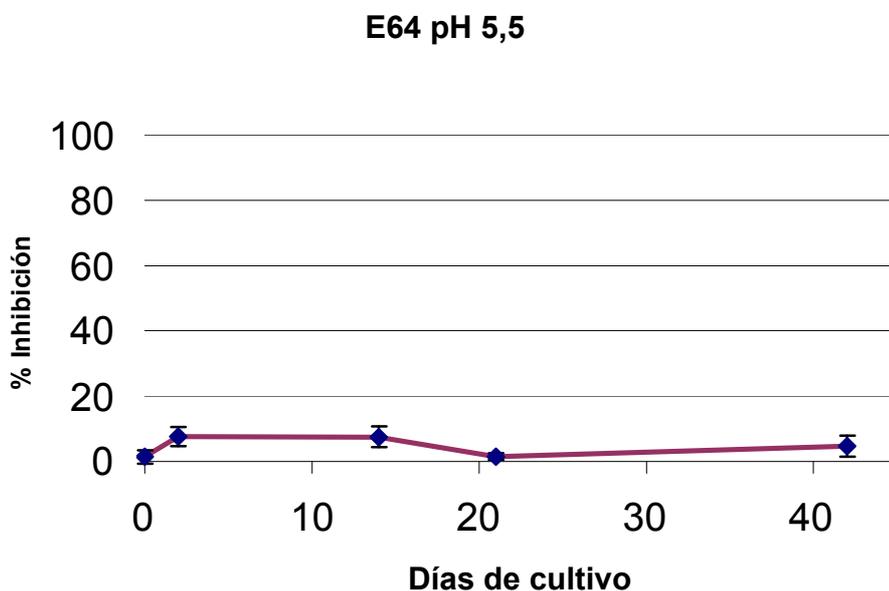


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	83,09±0,89	85,32±2,12	59,87±1,06	82,21±4,03	76,57±0,75
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	79,05±0,64	75,35±1,09	79,28±0,20	76,17±0,25

No se han encontrado diferencias significativas Entre los parásitos cultivados con pepsina y sin ella (K-W, p=0,280).

1.2.3.3. E64 (pH 5,5)

Figura R34. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 5,5 durante el desarrollo de *H. aduncum* [empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml)], mediante el uso de E64 como inhibidor. Cada dato es la media de 2-6 experimentos realizados en duplicado ± ES.

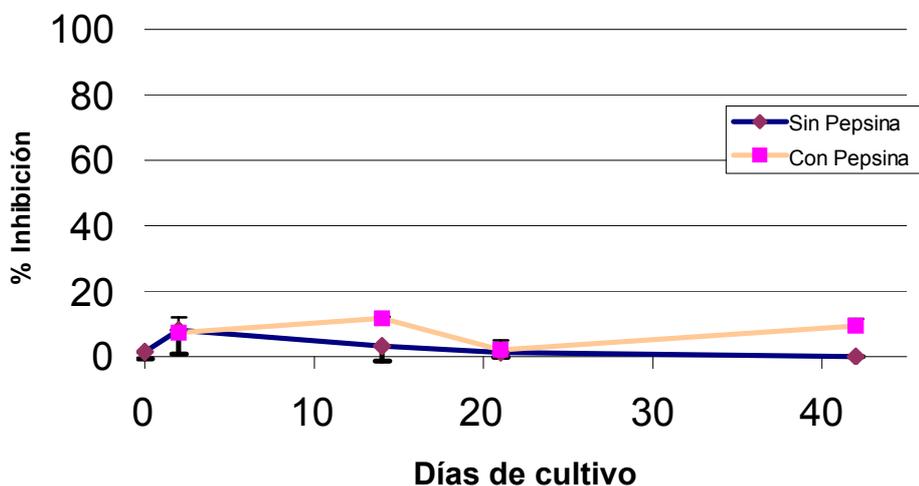


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES	1,43±2,02	7,69±2,92	7,55±3,22	1,52±1,06	4,72±3,22

La inhibición es baja, por debajo del 10%. No existen diferencias significativas entre los distintos estados de desarrollo (K-W, $p=0,199$).

Figura R35. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 5,5 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml), mediante el uso de E64 como inhibidor. Cada dato es la media de 2-4 experimentos realizados en duplicado ± ES.

E64 pH 5,5 (pepsina)

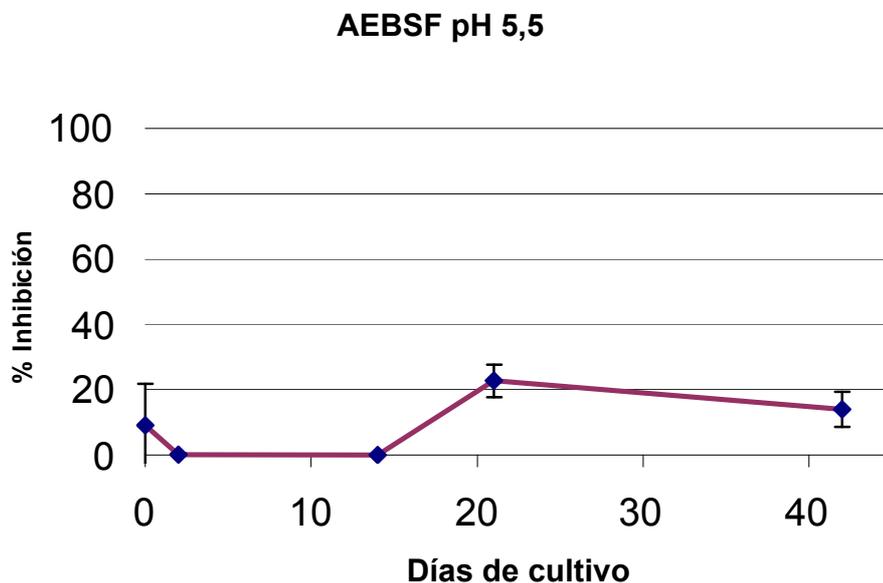


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	1,43±2,02	8,12±7,27	3,33±4,70	1,23±1,42	0,00±0,00
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	7,26±4,81	11,77±0,42	2,09±2,96	9,44±2,07

Existen diferencias significativas (K-W, p=0,023) entre los parásitos cultivados con pepsina y sin ella.

1.2.3.4. AEBSF (pH 5,5)

Figura R36. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 5,5 durante el desarrollo de *H. aduncum* [empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml)], mediante el uso de AEBSF como inhibidor. Cada dato es la media de 2-11 experimentos realizados en duplicado ± ES.

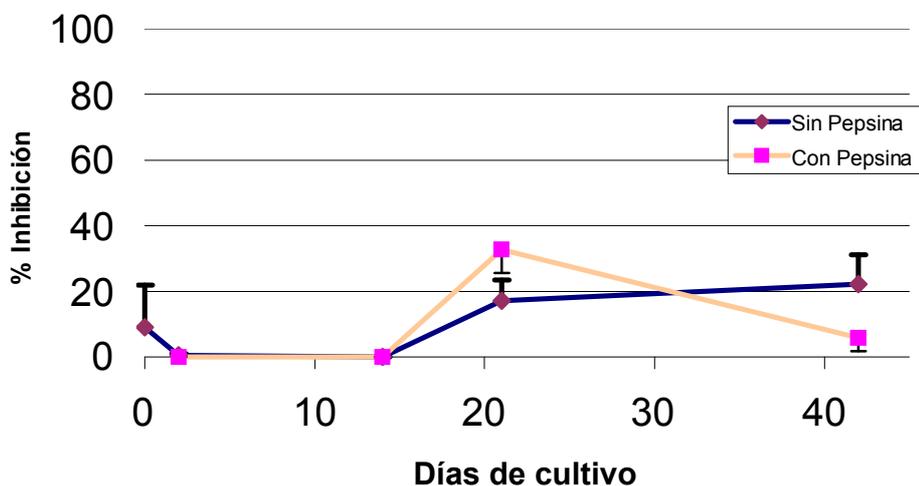


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES	9,06±12,82	0,22±0,26	0,00±0,00	22,76±5,00	14,01±5,32

La inhibición es baja, en torno al 20% o menor. Existen diferencias significativas entre los distintos estados de desarrollo (K-W, $p=0,018$). Aunque en los contrastes realizados *a posteriori* no se han hallado diferencias significativas entre estados de desarrollo. Al volver a comparar los grupos de estados de desarrollo excluyendo a L5J, las diferencias significativas desaparecen (K-W $p=0,150$). También dos de los contrastes *a posteriori* mediante la U de M-W (en este caso para los contrastes *a posteriori* realizados mediante la prueba de la U de Mann-Whitney se aplica la corrección de Bonferroni –ver apartado IV 6.–) para L5J están próximos a la significación estadística (L5J>L3 48h, $p=0,010$; L5J>L4, $p=0,008$).

Figura R37. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 5,5 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml), mediante el uso de AEBSF como inhibidor. Cada dato es la media de 2-7 experimentos realizados en duplicado ± ES.

AEBSF pH 5,5 (pepsina)



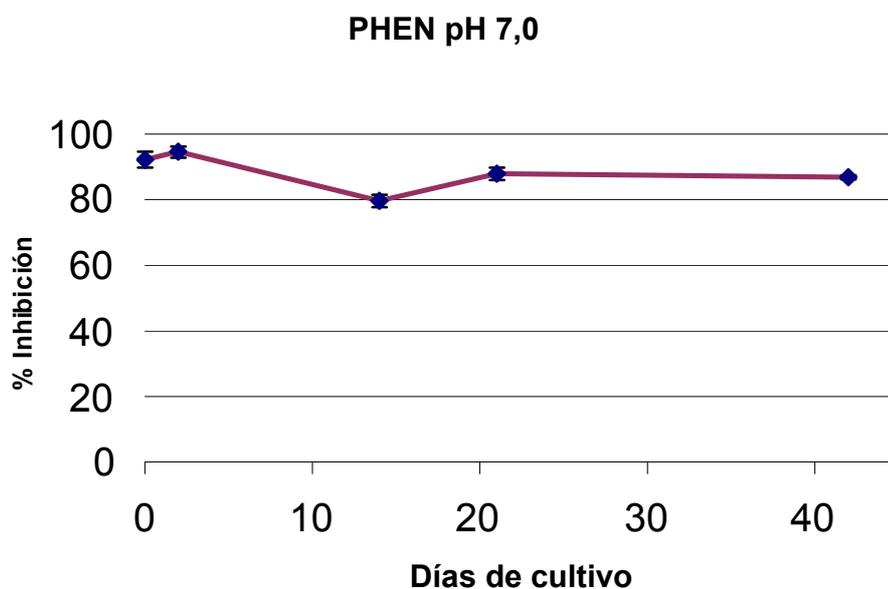
Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	9,06±12,82	0,45±0,63	0,00±0,00	17,10±6,33	22,17±8,87
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	0,00±0,00	0,00±0,00	32,66±6,99	5,85±4,01

No se han encontrado diferencias significativas entre los cultivados con pepsina y sin ella (K-W, $p=0,679$).

1.2.4. Inhibición a pH 7,0

1.2.4.1. 1,10-fenantrolina (pH 7,0)

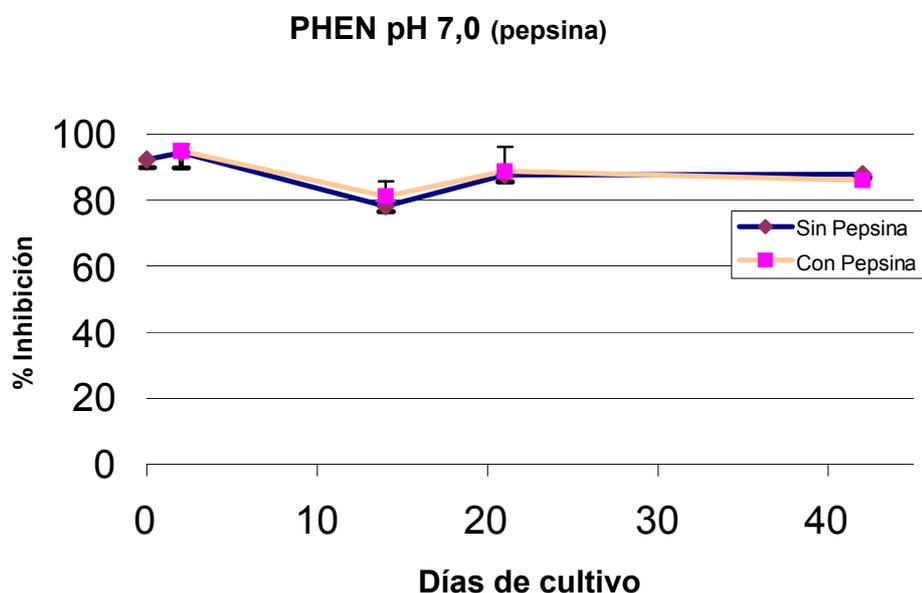
Figura R38. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum* [empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml)], mediante el uso de 1,10-fenantrolina como inhibidor. Cada dato es la media de 2-7 experimentos realizados en duplicado ± ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES	92,25±2,41	94,59±1,68	79,64±1,90	87,92±1,91	86,85±0,68

La inhibición es muy elevada, $\geq 80\%$. Se han encontrado diferencias significativas entre los distintos estados de desarrollo (ANOVA 1 vía, $p < 0,001$); L3 48h es el estado que presenta mayor inhibición y L4 el que menos, siendo diferentes estadísticamente al realizar los contrastes *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni (L3 0h>L4 $p=0,008$; L3 48h>L4 $p < 0,001$; L5J>L4 $p=0,017$).

Figura R39. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml), mediante el uso de 1,10-fenantrolina como inhibidor. Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado ± ES.

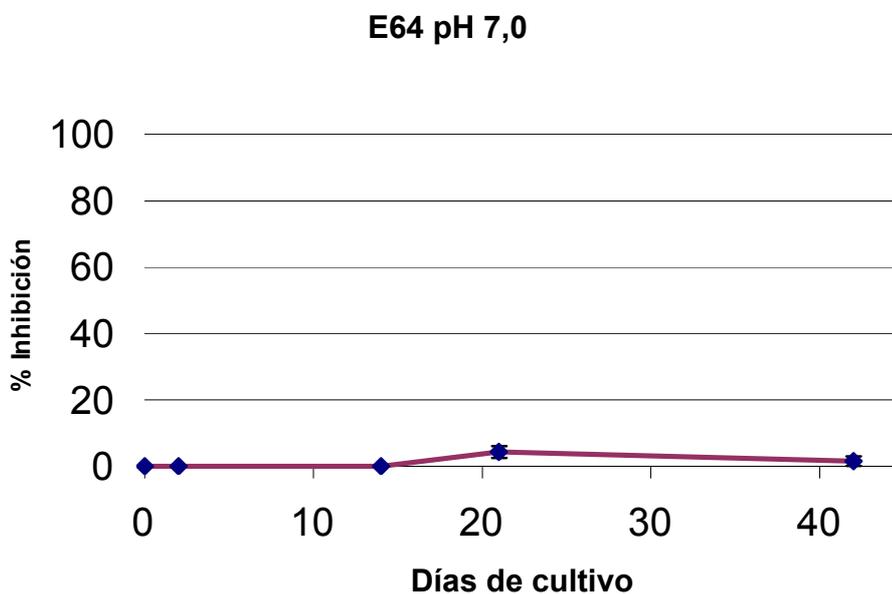


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	92,25±2,41	94,35±4,62	78,16±1,59	86,62±2,16	87,77±0,88
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	94,83±1,97	81,13±4,58	88,67±7,40	85,94±0,09

No se han encontrado diferencias significativas entre los parásitos cultivados con pepsina o sin ella (ANOVA 1 vía, $p=0,916$).

1.2.4.2. E64 (pH 7,0)

Figura R40. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum* [empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml)], mediante el uso de E64 como inhibidor. Cada dato es la media de 2-6 experimentos realizados en duplicado ± ES.

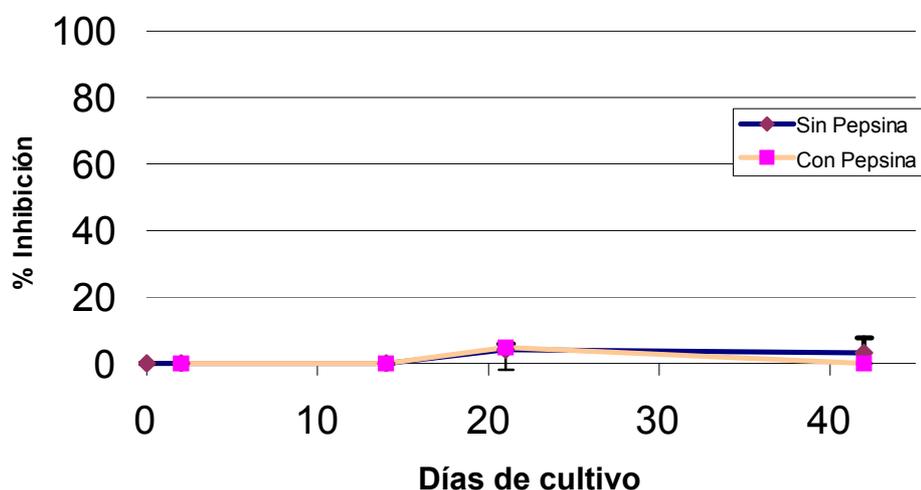


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,33±1,74	1,58±1,41

La inhibición es nula salvo en el adulto (L5J y L5), que presenta una ligera inhibición, aunque no existen diferencias significativas entre los distintos estados de desarrollo (K-W, $p=0,084$).

Figura R41. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml), mediante el uso de E64 como inhibidor. Cada dato es la media de 2-4 experimentos realizados en duplicado ± ES.

E64 pH 7,0 (pepsina)

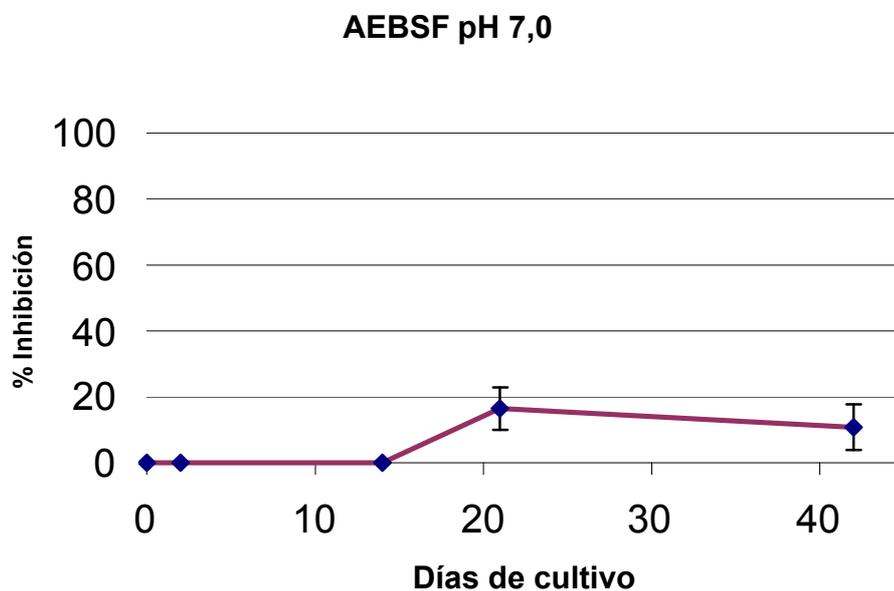


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,13±1,84	3,15±4,46
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	0,00±0,00	0,00±0,00	4,73±6,69	0,00±0,00

No existen diferencias significativas entre los parásitos cultivados con pepsina y sin ella (K-W, p=0,417).

1.2.4.3. AEBSF (pH 7,0)

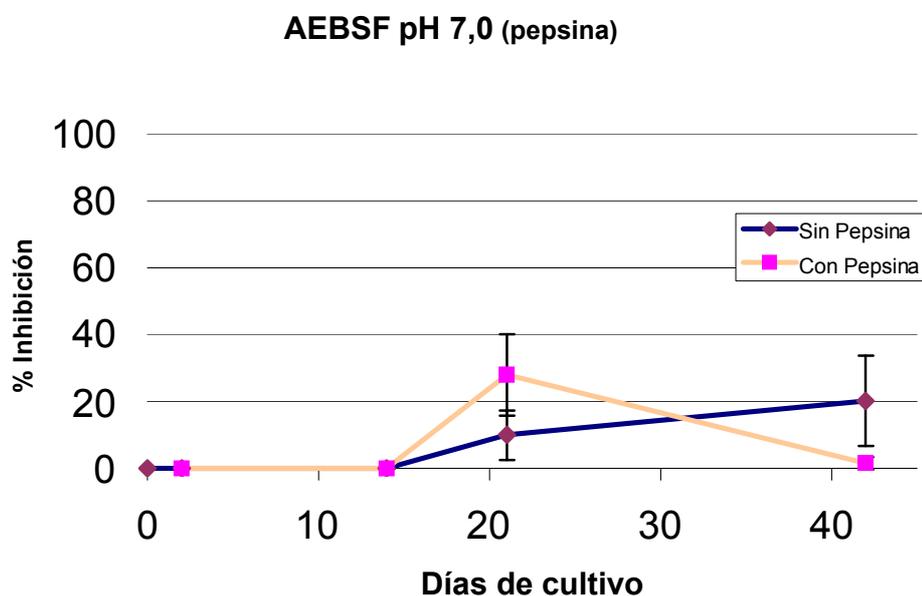
Figura R42. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum* [empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml)], mediante el uso de AEBSF como inhibidor. Cada dato es la media de 2-11 experimentos realizados en duplicado ± ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	16,48±6,43	10,85±6,93

La inhibición es nula salvo en el adulto (L5J y L5), que presenta una baja inhibición, aunque no existen diferencias significativas entre los estados de desarrollo (K-W, p=0,221).

Figura R43. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml), mediante el uso de AEBSF como inhibidor. Cada dato es la media de 2-7 experimentos realizados en duplicado ± ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	9,95±7,40	20,17±13,45
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	0,00±0,00	0,00±0,00	27,92±12,22	1,53±1,77

No existen diferencias significativas entre los parásitos cultivados con pepsina o sin ella (K-W, $p=0,653$).

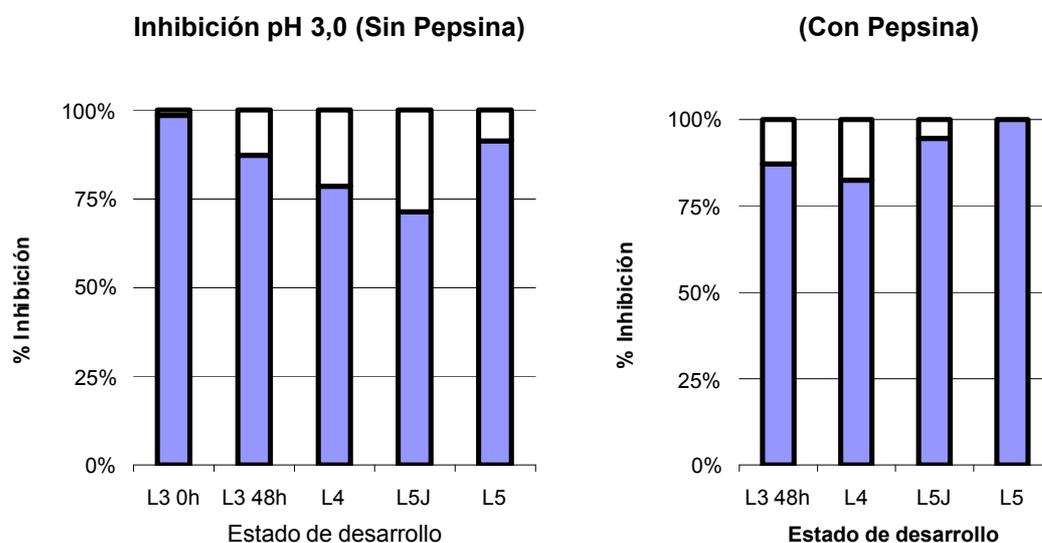
1.2.5. Inhibición acumulada de cada tipo de actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína a lo largo del desarrollo de *H. aduncum* según el pH

En esta sección se representan los datos de los apartados anteriores (ver apartados V 1.2.1.-V 1.2.4.) acumulados.

1.2.5.1. pH 3,0

Este pH se ha escogido para obtener más datos sobre la actividad de las proteasas aspárticas en la región más ácida, y ante nuestra falta de disponibilidad de sustratos específicos para éstas, se ha optado por un ensayo de inhibición con PpA.

Figura R44. Porcentajes acumulados de inhibición de la actividad proteolítica a pH 3,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml), y como inhibidor PpA. Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado.

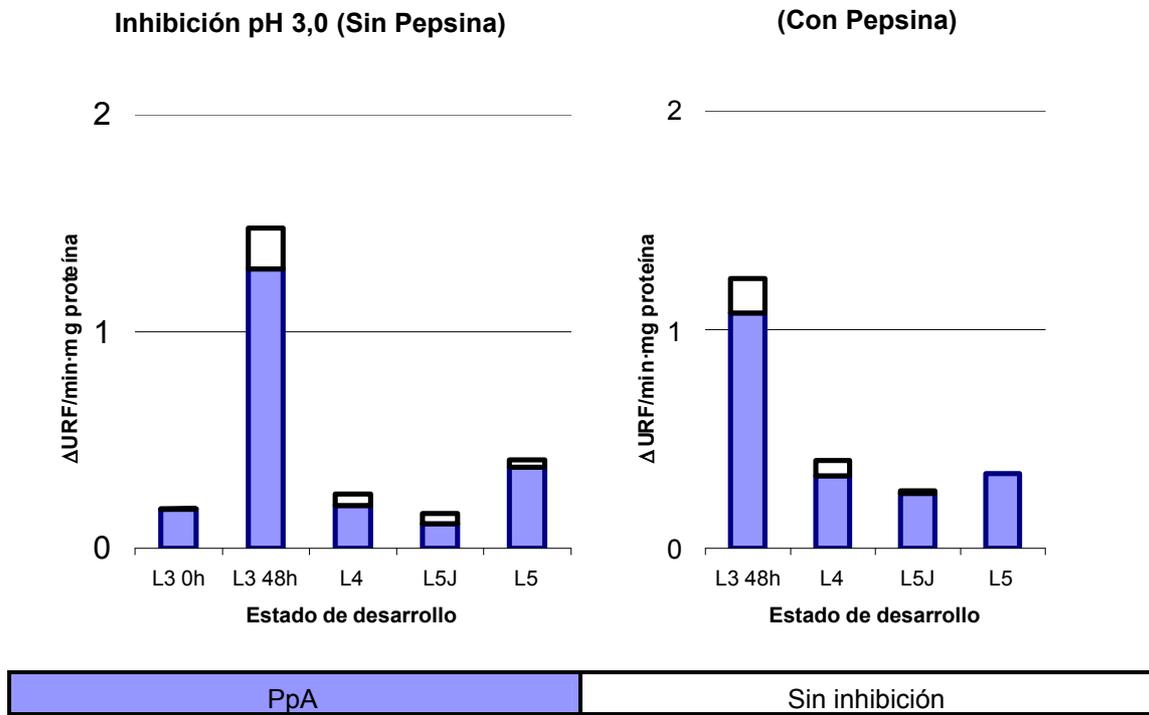


PpA	Sin inhibición
-----	----------------

		L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
PpA	Sin Pepsina	98,46	87,25	78,55	71,30	91,32
	Con Pepsina	—	87,22	82,42	94,65	100,00
Aenz no inhibida	Sin Pepsina	1,54	12,75	21,45	28,70	8,68
	Con Pepsina	—	12,78	17,58	5,35	0,00

A pH 3,0 se observa que L4 es la fase de desarrollo con respecto a las demás en la que es menor el porcentaje de inhibición debida a PpA, siendo muy alta no obstante (en torno al 80 %).

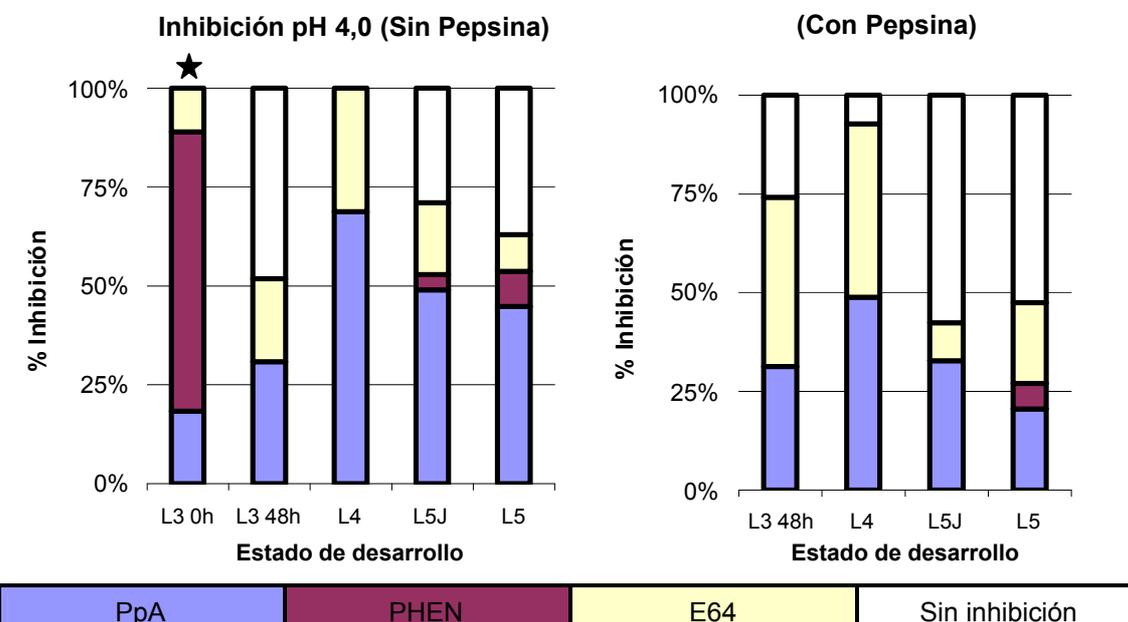
Figura R45. Contribución de las proteasas aspárticas según el porcentaje de inhibición medido, a la actividad (Δ URF/min·mg proteína) proteolítica a pH 3,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado.



A pH 3,0 la Aenz no es muy alta, siendo la mayor en L3 48h, y en todos los estados de desarrollo se corresponde, prácticamente la totalidad, con una actividad proteasa tipo aspártica, ya que es inhibida por PpA.

1.2.5.2. pH 4,0

Figura R46. Porcentajes acumulados de inhibición de la actividad proteolítica a pH 4,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml). Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado.

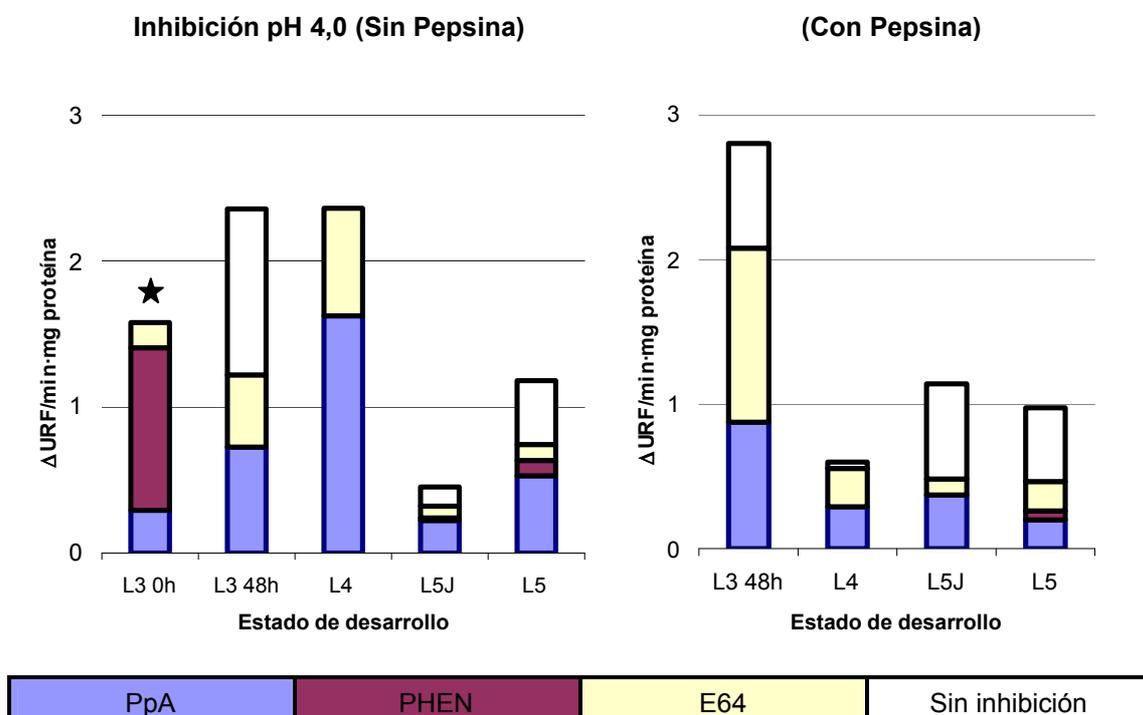


		L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
PpA	Sin Pepsina	23,23	30,79	69,38	48,98	44,88
	Con Pepsina	—	31,23	48,73	32,77	20,47
PHEN	Sin Pepsina	89,26	0,00	0,00	3,95	8,83
	Con Pepsina	—	0,00	0,00	0,00	6,43
E64	Sin Pepsina	13,96	21,04	31,44	18,07	9,29
	Con Pepsina	—	42,93	44,03	9,61	20,52
Aenz no inhibida	Sin Pepsina	0,00	48,17	0,00	29,00	37,00
	Con Pepsina	—	25,84	7,24	57,62	52,58

(#) En L3 0h a pH 4,0 la inhibición con PHEN es prácticamente total, sin embargo también se han medido inhibiciones debidas a PpA y E64, así que para hacer la representación gráfica se han sumado todos los porcentajes y se ha ajustado a 100.

A pH 4,0, parte de la actividad proteolítica no se ha podido determinar a que tipo pertenece, excepto en L4 y L3 0h.

Figura R47. Contribución de cada tipo de proteasa según el porcentaje de inhibición medido, a la actividad (Δ URF/min \cdot mg proteína) proteolítica a pH 4,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado.

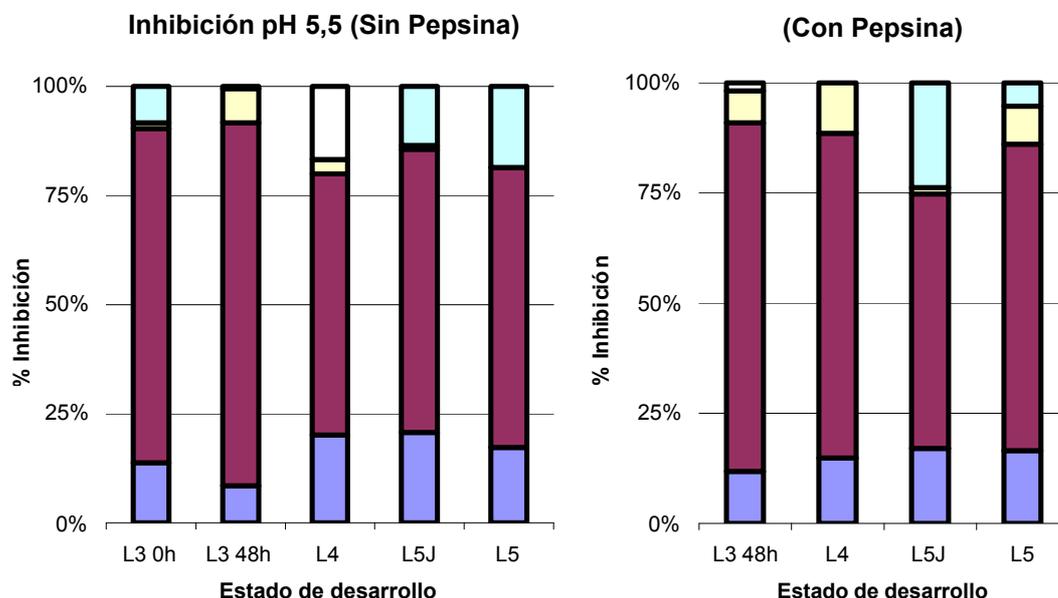


(#) En L3 0h a pH 4,0 la inhibición con PHEN es prácticamente total, sin embargo también se han medido inhibiciones debidas a PpA y E64, así que para hacer la representación gráfica se han sumado todos los porcentajes y se ha ajustado a 1,58 URF/min \cdot mg proteína.

A pH 4,0 a pesar de que la Aenz en L4 con pepsina es mayor que la de su control sin pepsina [a este pH no existen diferencias significativas entre las actividades enzimáticas al cultivar con pepsina o sin pepsina (ANOVA 3 vías, $p=0,345$), pero existen interacciones estadísticamente significativas (ANOVA 3 vías, $p=0,001$) entre las variables pepsina en el cultivo y estado de desarrollo (ver apartado V 1.1.7.2.)], el perfil mostrado por los distintos tipos de inhibición es similar, siendo la actividad aspártica la más relevante, seguida por la cisteínica. La actividad metaloproteasa solamente aparece en L5 y en L3 0h, mientras que es nula o poco relevante (L5) en el resto de los estados de desarrollo cultivados. En L3 0h supone la práctica totalidad de la actividad mostrada a pH 4,0, habiéndose medido también actividades aspártica y cisteínica, pero siendo estas poco relevantes.

1.2.5.3. pH 5,5

Figura R48. Porcentajes acumulados de inhibición de la actividad proteolítica a pH 5,5 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml). Cada dato es la media de 2-7 experimentos realizados en duplicado.

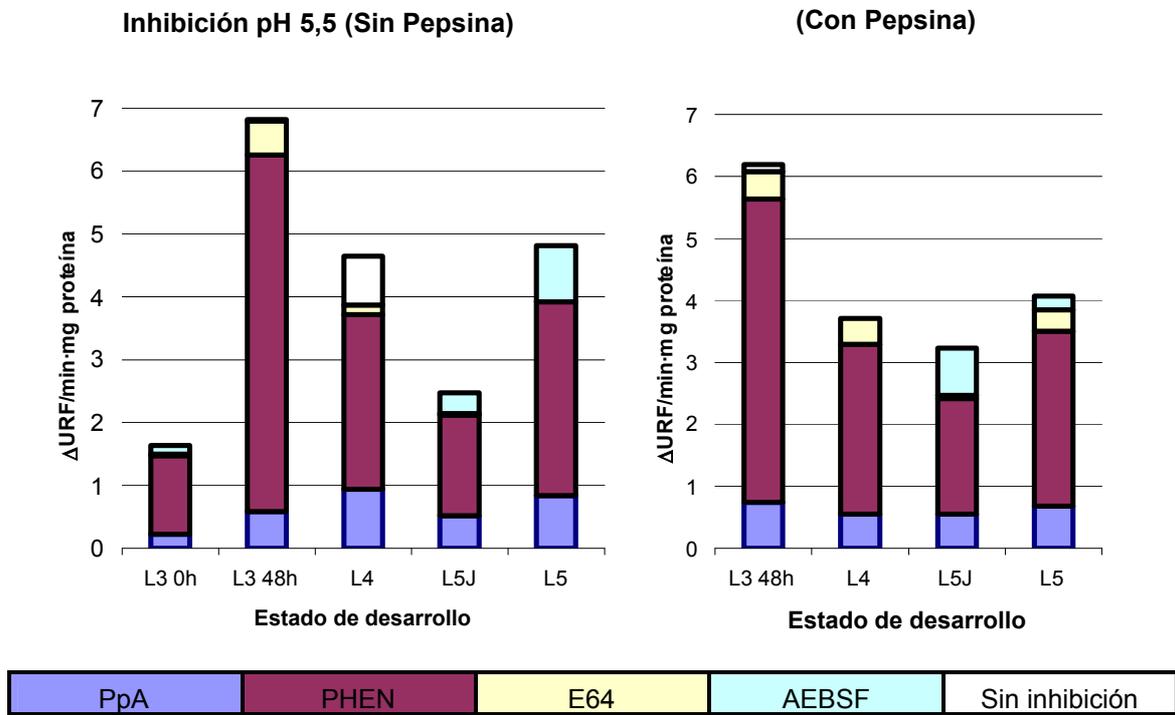


PpA	PHEN	E64	AEBSF	Sin inhibición
-----	------	-----	-------	----------------

		L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
PpA	Sin Pepsina	14,91	8,83	20,14	26,34	20,74
	Con Pepsina	—	11,89	15,23	23,42	18,17
PHEN	Sin Pepsina	83,09	85,32	59,87	82,21	76,57
	Con Pepsina	—	79,05	75,35	79,28	76,17
E64	Sin Pepsina	1,43	8,12	3,33	1,23	0,00
	Con Pepsina	—	7,26	11,77	2,09	9,44
AEBSF	Sin Pepsina	9,06	0,45	0,00	17,10	22,17
	Con Pepsina	—	0,00	0,00	32,66	5,85
Aenz no inhibida	Sin Pepsina	0,00	0,00	16,66	0,00	0,00
	Con Pepsina	—	1,80	0,00	0,00	0,00

A pH 5,5 la actividad metaloproteasa está presente en mayor proporción en todos en los estados de desarrollo, en detrimento de los otros tres tipos.

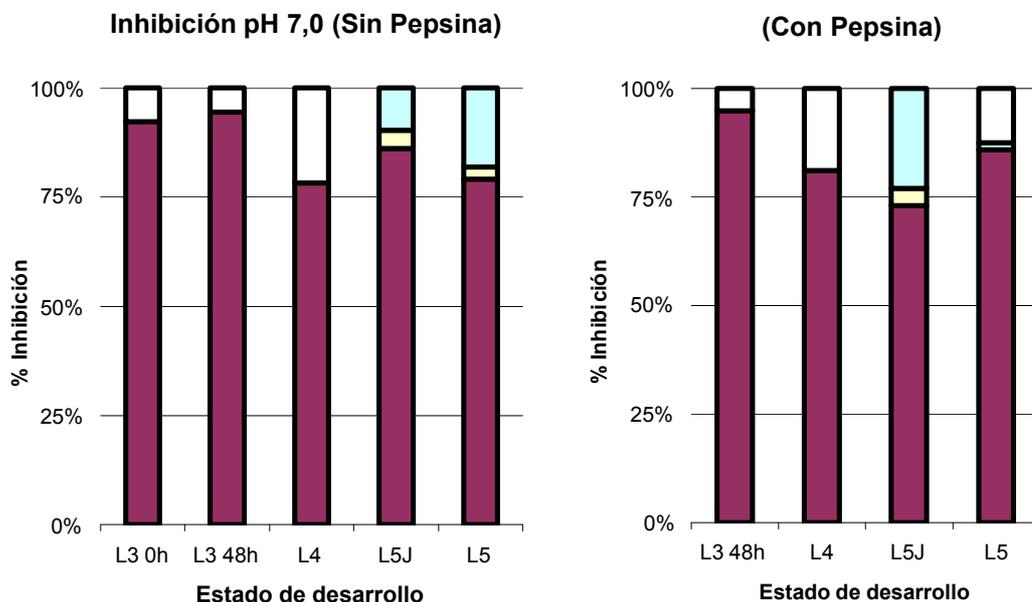
Figura R49. Contribución de cada tipo de proteasa según el porcentaje de inhibición medido, a la actividad (Δ URF/min·mg proteína) proteolítica a pH 5,5 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-7 experimentos realizados en duplicado.



A pH 5,5 se observa que la actividad más relevante es de tipo metaloproteasa, en todos los estados de desarrollo. Tras esta actividad están, y por este orden, la aspártica, la cisteínica y la serínica.

1.2.5.4. pH 7,0

Figura R50. Porcentajes acumulados de inhibición de la actividad proteolítica a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml). Cada dato es la media de 2-7 experimentos realizados en duplicado.

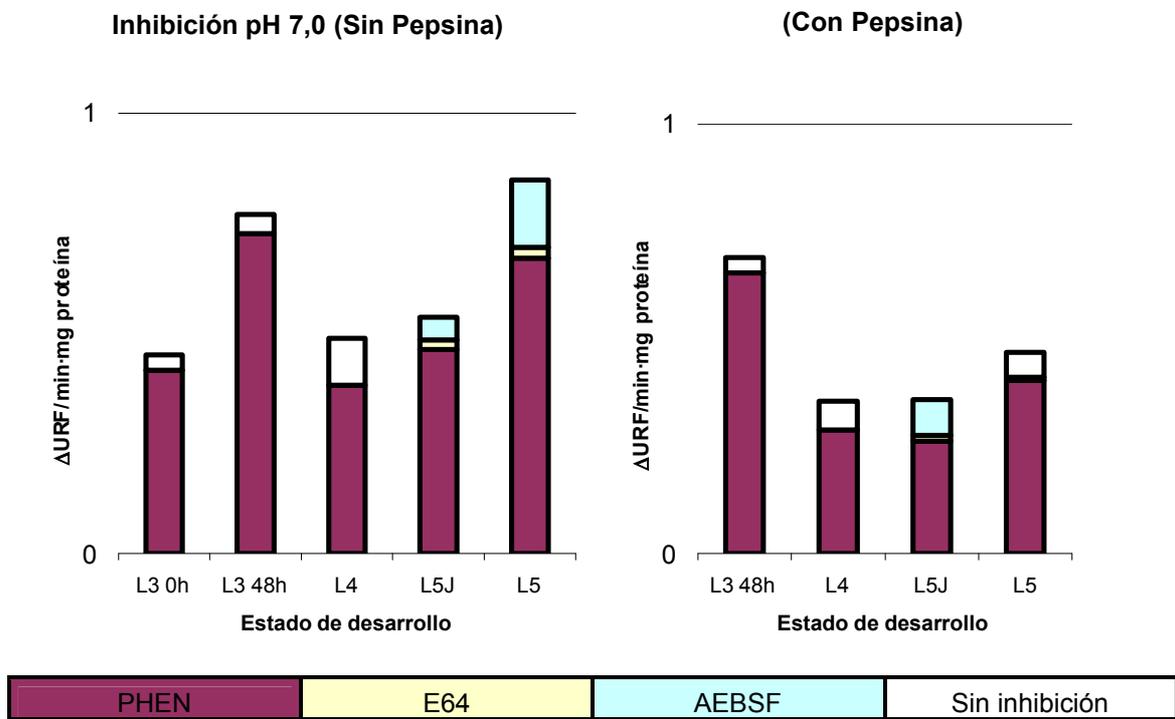


PHEN	E64	AEBSF	Sin inhibición
------	-----	-------	----------------

% Aenz inhibida		L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
PHEN	Sin Pepsina	92,25	94,35	78,16	87,62	87,77
	Con Pepsina	—	94,83	81,13	88,67	85,94
E64	Sin Pepsina	0,00	0,00	0,00	4,13	3,15
	Con Pepsina	—	0,00	0,00	4,73	0,00
AEBSF	Sin Pepsina	0,00	0,00	0,00	9,95	20,17
	Con Pepsina	—	0,00	0,00	27,92	1,53
Aenz no inhibida	Sin Pepsina	7,75	5,65	21,84	0,00	0,00
	Con Pepsina	—	5,17	18,87	0,00	12,53

A pH 7,0 la actividad metaloproteasa es la mayoritaria en todos en los estados de desarrollo.

Figura R51. Contribución de cada tipo de proteasa según el porcentaje de inhibición medido, a la actividad (Δ URF/min·mg proteína) proteolítica a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato BODIPY TR-X caseína (5 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-7 experimentos realizados en duplicado.



A pH 7,0 la Aenz es muy baja, siendo la actividad metaloproteasa la que está presente en mayor proporción en todos en los estados de desarrollo.

1.2.6. Resumen de los datos obtenidos de inhibición de la actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína

Tabla R7. Porcentaje de inhibición de la Aenz con el sustrato BODIPY TR-X caseína (5 µg/ml) mediante el uso de inhibidores específicos, durante el desarrollo de *H. aduncum*, y en función de la presencia de pepsina en cultivo. Cada dato es la media de 2-7 experimentos realizados en duplicado ± ES.

Inhibidor		ESTADO DE DESARROLLO									
		L3 0h		L3 48h(2 días)		L4(14 días)		L5J(21 días)		L5(42 días)	
		Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina
PpA (pH 3,0)	98,46 ±2,18	87,25 ±18,03	87,22 ±18,08	78,55 ±11,47	82,42 ±10,94	71,30 ±9,97	94,65 ±3,58	91,32 ±8,47	100,00 ±0,00		
	23,23 ±13,14	30,79 ±9,84	31,23 ±6,78	69,38 ±0,45	48,73 ±6,42	48,98 ±4,69	32,77 ±3,32	44,88 ±5,42	20,47 ±14,68		
PpA (pH 4,0)	14,91 ±4,29	8,83 ±2,00	11,89 ±6,41	20,14 ±9,58	15,23 ±4,90	26,34 ±3,21	23,42 ±1,79	20,74 ±2,22	18,17 ±15,23		
PHEN (pH 4,0)	89,26 ±2,98	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	3,95 ±4,07	0,00 ±0,00	8,83 ±0,28	6,43 ±9,10		
	83,09 ±0,89	85,32 ±2,12	79,05 ±0,64	59,87 ±1,06	75,35 ±1,09	82,21 ±4,03	79,28 ±0,20	76,57 ±0,75	76,1 7±0,25		
PHEN (pH 5,5)	92,25 ±2,41	94,35 ±4,62	94,83 ±1,97	78,16 ±1,59	81,13 ±4,58	87,62 ±2,16	88,67 ±7,40	87,77 ±0,88	85,94 ±0,09		
E64 (pH 4,0)	13,96 ±11,70	21,04 ±4,62	42,93 ±17,91	31,44 ±17,88	44,03 ±8,21	18,07 ±9,28	9,61 ±13,59	9,29 ±13,13	20,52 ±3,86		
	1,43 ±2,02	8,12 ±7,27	7,26 ±4,81	3,33 ±4,70	11,77 ±0,42	1,23 ±1,42	2,09 ±2,96	0,00 ±0,00	9,44 ±2,07		
E64 (pH 5,5)	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	4,13 ±1,84	4,73 ±6,69	3,15 ±4,46	0,00 ±0,00		
AEBSF (pH 5,5)	9,06 ±12,82	0,45 ±0,63	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	17,10 ±6,33	32,66 ±6,99	22,17 ±8,87	5,85 ±4,01		
	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	9,95 ±7,40	27,92 ±12,22	20,17 ±13,45	1,53 ±1,77		
AEBSF (pH 7,0)	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00		

1.2.7. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de inhibición de la actividad proteolítica frente a BODIPY TR-X caseína

Variable	Inhibidor y pH	Inhibición L3 48h	Inhibición L4	Inhibición L5J	Inhibición L5
		Significación (K-W)	Significación (K-W)	Significación (K-W)	Significación (K-W)
Pepsina	PpA (pH 3,0)	0,683	0,439	0,121	0,102
	PpA (pH 4,0)	1,000	0,121	0,053	0,121
	PHEN (pH 4,0)	1,000	1,000	0,334	1,000
	E64 (pH 4,0)	0,121	0,439	0,688	0,439
	PpA (pH 5,5)	1,000	0,439	0,643	1,000
	PHEN (pH 5,5)	0,121	0,121	0,355	0,439
	E64 (pH 5,5)	1,000	0,121	0,784	0,102
	AEBSF (pH 5,5)	0,317	1,000	0,089	0,139
	PHEN (pH 7,0)	1,000	0,439	0,699	0,121
	E64 (pH 7,0)	1,000	1,000	0,814	0,317
	AEBSF (pH 7,0)	1,000	1,000	0,180	0,321

Tabla R8. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de Kruskal-Wallis y realizadas en los grupos de la variable “estado de desarrollo” y para cada inhibidor entre los cultivados con “pepsina” y sin ella, excepto L3 0h que no ha sido cultivado. El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Contrastes	PpA (pH 3,0)	PpA (pH 4,0)	PHEN (pH 4,0)	E64 (pH 4,0)
		Significación	Significación	Significación	Significación
Estado		(K-W) 0,156	(A1) 0,012*	(K-W) 0,015*	(A2) 0,090
	L3 0h L3 48h		(B) 1,000	(U) 0,133	
	L4		(B) 0,036*	(U) 0,133	
	L5J		(B) 0,456	(U) 0,056	
	L5		(B) 1,000	(U) 0,133	
	L3 48h L3 0h		(B) 1,000	(U) 0,133	
	L4		(B) 0,049*	(U) 1,000	
	L5J		(B) 0,990	(U) 0,527	
	L5		(B) 1,000	(U) 0,114	
	L4 L3 0h		(B) 0,036*	(U) 0,133	
	L3 48h		(B) 0,049*	(U) 1,000	
	L5J		(B) 0,714	(U) 0,527	
	L5		(B) 0,073	(U) 0,114	
	L5J L3 0h		(B) 0,456	(U) 0,056	
	L3 48h		(B) 0,990	(U) 0,527	
	L4		(B) 0,714	(U) 0,527	
L5		(B) 1,000	(U) 0,230		
L5 L3 0h		(B) 1,000	(U) 0,133		
L3 48h		(B) 1,000	(U) 0,114		
L4		(B) 0,073	(U) 0,114		
L5J		(B) 1,000	(U) 0,230		
Pepsina		(K-W) 0,189	(A1) 0,111	(K-W) 0,131	(A2) 0,219
Estado-Pepsina					(A2) 0,242

Tabla R9. Valores “p” de significación de las distintas pruebas Kruskal-Wallis y ANOVA de 2 vías realizadas a los valores para los inhibidores PpA (pH 3,0), PpA (pH 4,0), PHEN (pH 4,0) y E64 (pH 4,0). Las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los “estados de desarrollo” se han realizado mediante la prueba Bonferroni o la U de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni. El nivel de significación es de 0,05. En la U M-W como son 10 comparaciones el nivel de significación queda corregido a 0,005. (*) Valores significativos estadísticamente. (A1) y (A2) Valores obtenidos mediante la prueba del ANOVA 1 y 2 vías, respectivamente. (B) Valor obtenido mediante la prueba de Bonferroni. (U) Valor obtenido mediante la prueba de la U de Mann-Whitney.

Variable	Contrastes	PpA (pH 5,5)	PHEN (pH 5,5)	E64 (pH 5,5)	AEBSF (pH 5,5)	
		Significación	Significación	Significación	Significación	
Estado		(A1) 0,024*	(K-W) 0,023*	(K-W) 0,199	(K-W) 0,029*	
	L3 0h L3 48h	(B) 1,000	(U) 1,000		(U) 0,533	
	L4	(B) 1,000	(U) 0,133		(U) 0,533	
	L5J	(B) 0,541	(U) 1,000		(U) 0,178	
	L5	(B) 1,000	(U) 0,133		(U) 0,711	
	L3 48h L3 0h	(B) 1,000	(U) 1,000		(U) 0,533	
	L4	(B) 1,000	(U) 0,029		(U) 0,686	
	L5J	(B) 0,018*	(U) 0,914		(U) 0,028	
	L5	(B) 0,532	(U) 0,029		(U) 0,154	
	L4 L3 0h	(B) 1,000	(U) 0,133		(U) 0,533	
	L3 48h	(B) 1,000	(U) 0,029		(U) 0,686	
	L5J	(B) 0,711	(U) 0,038		(U) 0,016	
	L5	(B) 1,000	(U) 0,114		(U) 0,109	
	L5J L3 0h	(B) 0,541	(U) 1,000		(U) 0,178	
	L3 48h	(B) 0,018*	(U) 0,914		(U) 0,028	
	L4	(B) 0,711	(U) 0,038		(U) 0,016	
	L5	(B) 1,000	(U) 0,114		(U) 0,161	
	L5 L3 0h	(B) 1,000	(U) 0,133		(U) 0,711	
	L3 48h	(B) 0,532	(U) 0,029		(U) 0,154	
	L4	(B) 1,000	(U) 0,114		(U) 0,109	
	L5J	(B) 1,000	(U) 0,114		(U) 0,161	
	Pepsina		(A1) 0,518	(K-W) 0,280	(K-W) 0,023*	(K-W) 0,598
	Estado-Pepsina					

Tabla R10. Valores “p” de significación de las distintas pruebas Kruskal-Wallis y ANOVA de 2 vías realizadas a los valores para los inhibidores PpA (pH 5,5), PHEN (pH 5,5), E64 (pH 5,5) y AEBSF (pH 5,5). Las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los “estados de desarrollo” se han realizado mediante la prueba Bonferroni o la U de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni. El nivel de significación es de 0,05. En la U M-W como son 10 comparaciones el nivel de significación queda corregido a 0,005. (*) Valores significativos estadísticamente. (A1) Valor obtenido mediante la prueba del ANOVA 1 vía. (B) Valor obtenido mediante la prueba de Bonferroni. (U) Valor obtenido mediante la prueba de la U de Mann-Whitney.

Variable	Contrastes	PHEN (pH 7,0)	E64 (pH 7,0)	AEBSF (pH 7,0)
		Significación	Significación	Significación
Estado		(A1) <0,001*	(K-W) 0,084	(K-W) 0,221
	L3 0h L3 48h	(B) 1,000		
	L4	(B) 0,008*		
	L5J	(B) 1,000		
	L5	(B) 0,961		
	L3 48h L3 0h	(B) 1,000		
	L4	(B) 0,000*		
	L5J	(B) 0,081		
	L5	(B) 0,068		
	L4 L3 0h	(B) 0,008*		
	L3 48h	(B) 0,000*		
	L5J	(B) 0,017*		
	L5	(B) 0,106		
	L5J L3 0h	(B) 1,000		
	L3 48h	(B) 0,081		
	L4	(B) 0,017*		
	L5	(B) 1,000		
	L5 L3 0h	(B) 0,961		
	L3 48h	(B) 0,068		
	L4	(B) 0,106		
L5J	(B) 1,000			
Pepsina		(A1) 0,916	(K-W) 0,417	(K-W) 0,653
Estado-Pepsina				

Tabla R11. Valores “p” de significación de las distintas pruebas Kruskal-Wallis y ANOVA de 2 vías realizadas a los valores para los inhibidores PHEN (pH 7,0), E64 (pH 7,0) y AEBSF (pH 7,0). Las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los “estados de desarrollo” se han realizado mediante la prueba Bonferroni o la U de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni. El nivel de significación es de 0,05. En la U M-W como son 10 comparaciones el nivel de significación queda corregido a 0,005. (*) Valores significativos estadísticamente. (A1) Valor obtenido mediante la prueba del ANOVA 1 vía. (B) Valor obtenido mediante la prueba de Bonferroni.

1.3. Actividad proteolítica frente a Z-FR-AMC y Z-RR-AMC, para las catepsinas L y B

A continuación se muestran las actividades específicas medidas con el sustrato para las catepsinas B/L (Z-FR-AMC) y B (Z-RR-AMC), en función del pH, y expresadas como AE \pm ES (en nanomoles de sustrato transformado por min y mg de proteína).

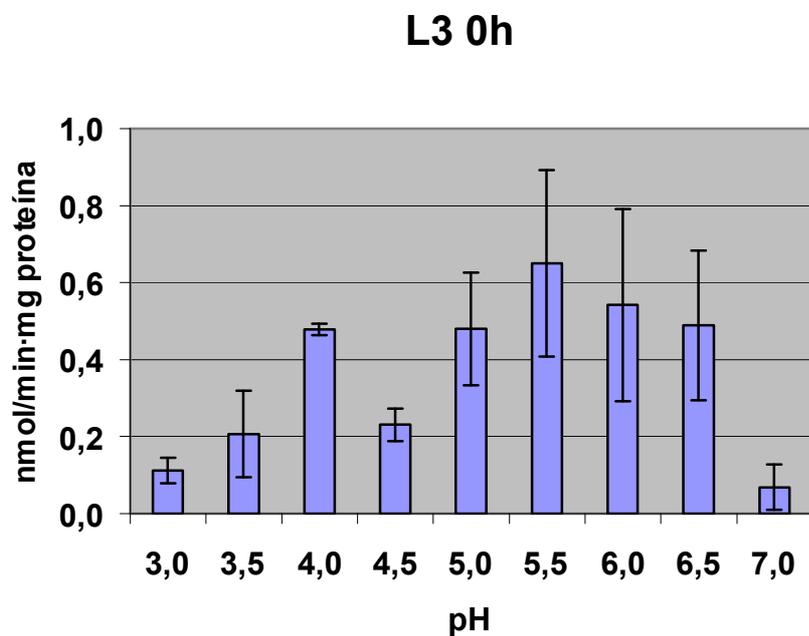
Cuando se pone E64 en el ensayo, para comprobar que la actividad se debe a proteasas cisteínicas, la actividad se reduce a los niveles de fondo, lo que quiere decir que la actividad observada es debida a cisteín proteasas.

1.3.1. Z-FR-AMC

A continuación se muestran las actividades específicas medidas con el sustrato para las catepsinas B/L (Z-FR-AMC), en función del pH, y expresadas como AE \pm ES (en nanomoles de sustrato transformado por min y mg de proteína).

1.3.1.1. Larva 3 recién aislada del hospedador (L3 0h)

Figura R52. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) de la L3 de *H. aduncum* recogida del pescado (L3 0h), en función del pH, empleando como sustrato Z-FR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



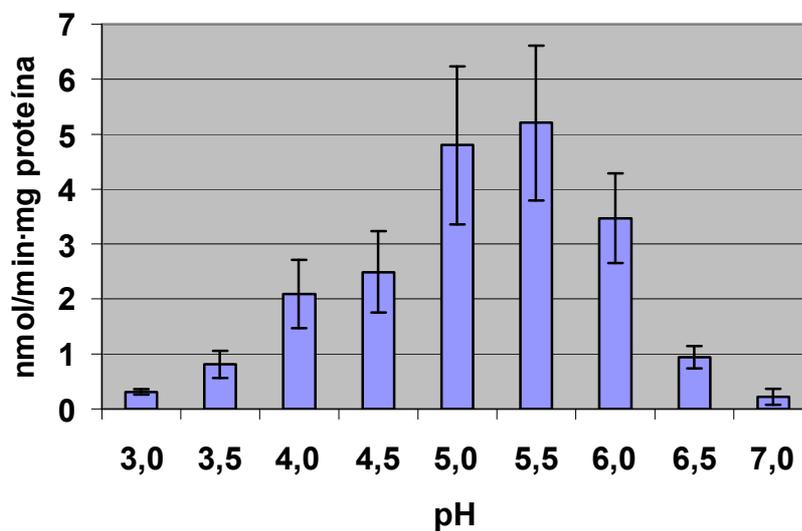
pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
AE \pm ES	0,11 \pm 0,03	0,21 \pm 0,11	0,48 \pm 0,02	0,23 \pm 0,04	0,48 \pm 0,15	0,65 \pm 0,24	0,54 \pm 0,25	0,49 \pm 0,19	0,07 \pm 0,06

El óptimo es a pH 5,5, y se observa otro óptimo con menor actividad a pH 4,0.

1.3.1.2. Larva 3 tras 48 horas de cultivo (L3 48h)

Figura R53. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) de la L3 de *H. aduncum* tras 48 horas de cultivo, cultivada sin pepsina, en función del pH, empleando como sustrato Z-FR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L3 48h Sin Pepsina

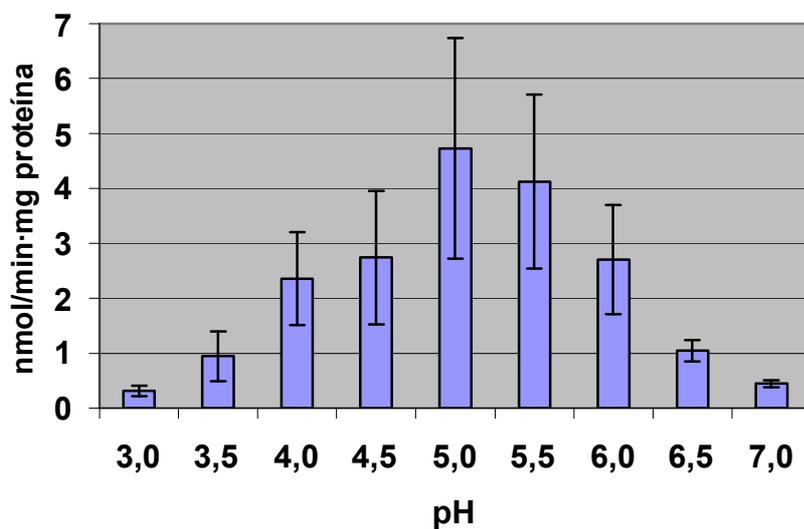


pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
AE \pm ES	0,31 \pm 0,05	0,81 \pm 0,25	2,09 \pm 0,62	2,49 \pm 0,74	4,80 \pm 1,44	5,20 \pm 1,41	3,47 \pm 0,82	0,94 \pm 0,21	0,22 \pm 0,15

El óptimo es a pH 5,5.

Figura R54. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) de la L3 de *H. aduncum* tras 48 horas de cultivo con pepsina, en función del pH, empleando como sustrato Z-FR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L3 48h Con Pepsina

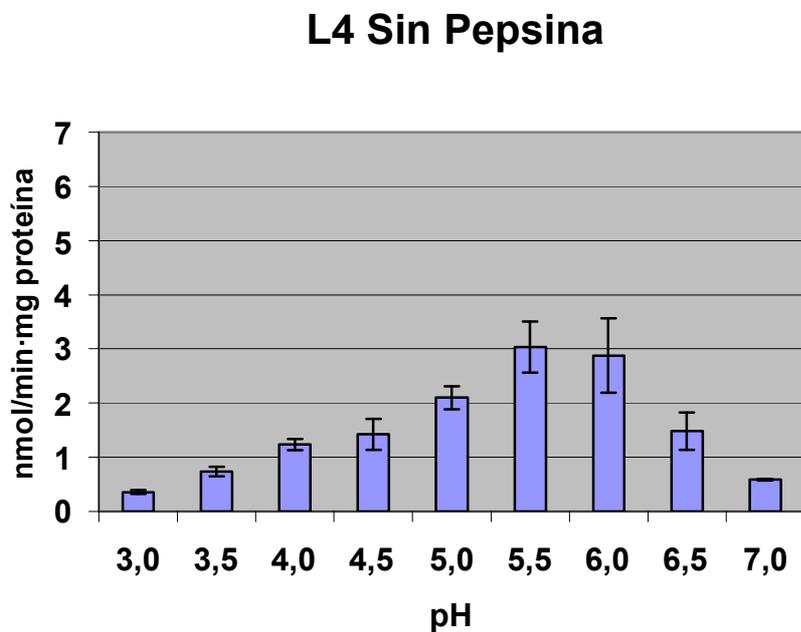


pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
AE \pm ES	0,31 \pm 0,10	0,95 \pm 0,45	2,36 \pm 0,85	2,74 \pm 1,21	4,73 \pm 2,00	4,12 \pm 1,59	2,70 \pm 1,00	1,04 \pm 0,19	0,44 \pm 0,06

El óptimo es a pH 5,0. La AE es similar a la de L3 48h cultivada sin pepsina y no han encontrado diferencias significativas (K-W, $p=0,647$).

1.3.1.3. Larva 4 (L4)

Figura R55. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) de la L4 de *H. aduncum* tras 14 días de cultivo, cultivada sin pepsina durante una semana antes de recogerla, en función del pH, empleando como sustrato Z-FR-AMC (100 µM). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado ± ES.

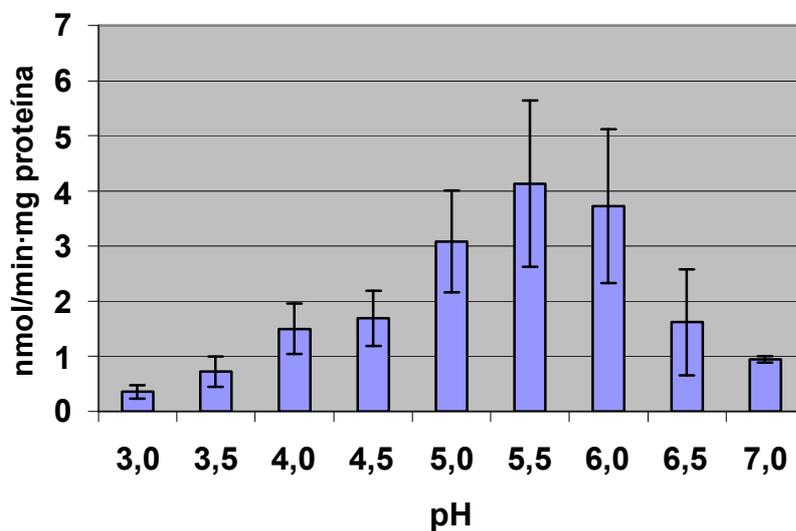


pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
AE ± ES	0,36 ±0,03	0,74 ±0,09	1,23 ±0,11	1,42 ±0,28	2,10 ±0,21	3,03 ±0,47	2,87 ±0,69	1,48 ±0,34	0,58 ±0,01

El óptimo es a pH 5,5.

Figura R56. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) de la L4 de *H. aduncum* tras 14 días de cultivo con pepsina, en función del pH, empleando como sustrato Z-FR-AMC (100 µM). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado ± ES.

L4 Con Pepsina

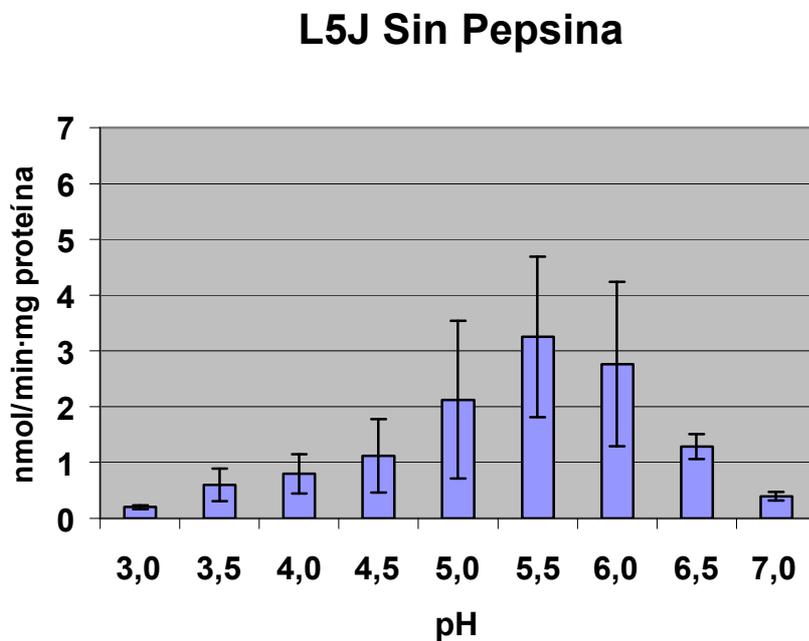


pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
AE ± ES	0,35 ±0,12	0,72 ±0,27	1,50 ±0,46	1,69 ±0,50	3,08 ±0,92	4,13 ±1,51	3,72 ±1,39	1,62 ±0,96	0,95 ±0,06

El óptimo es a pH 5,5. La AE es mayor que en la L4 cultivada sin pepsina, pero no existen diferencias significativas (ANOVA 1 vía, $p=0,490$).

1.3.1.4. Adulto juvenil (L5J)

Figura R57. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) del adulto juvenil de *H. aduncum* tras 21 días de cultivo, cultivado sin pepsina durante una semana antes de recogerlo, en función del pH, empleando como sustrato Z-FR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

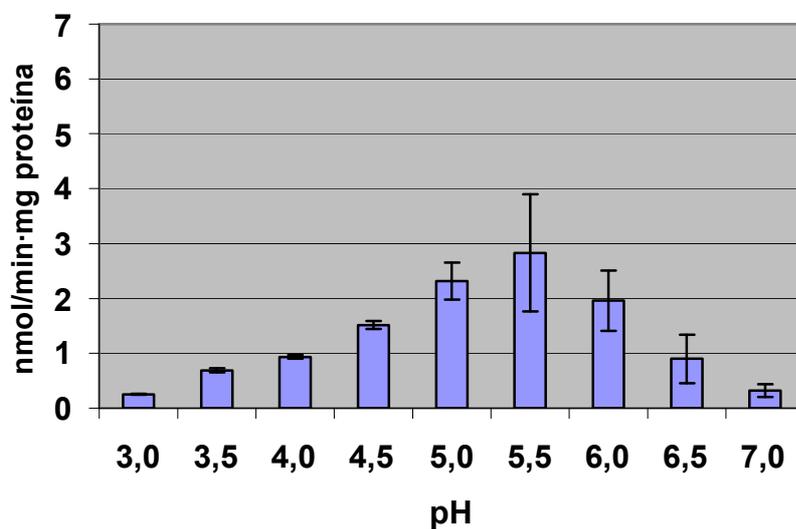


pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
AE \pm ES	0,20 \pm 0,03	0,60 \pm 0,29	0,80 \pm 0,36	1,12 \pm 0,66	2,13 \pm 0,66	3,25 \pm 1,41	2,77 \pm 1,44	1,28 \pm 0,22	0,40 \pm 0,08

El óptimo es a pH 5,5.

Figura R58. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) del adulto juvenil de *H. aduncum* tras 21 días de cultivo con pepsina, en función del pH, empleando como sustrato Z-FR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L5J Con Pepsina

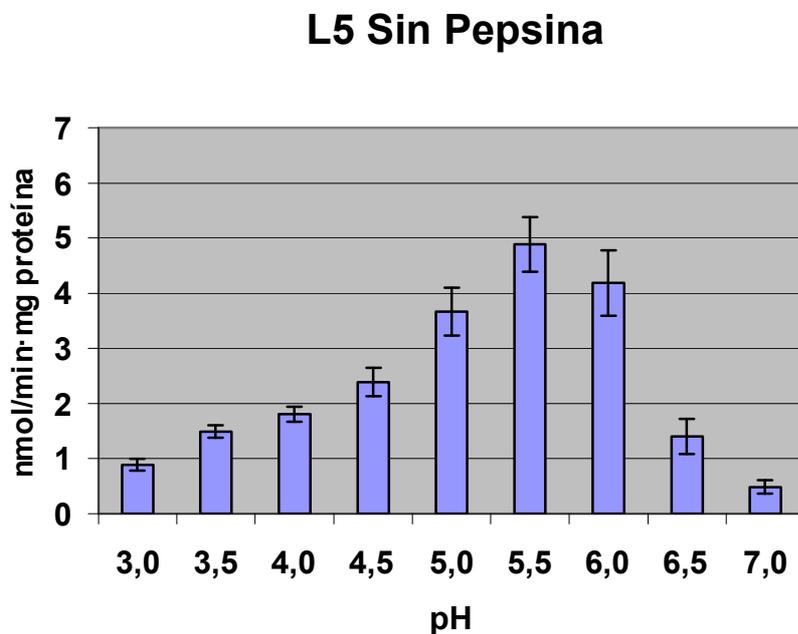


pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
AE \pm ES	0,25 \pm 0,01	0,69 \pm 0,04	0,94 \pm 0,04	1,52 \pm 0,08	2,32 \pm 0,34	2,83 \pm 1,07	1,96 \pm 0,55	0,90 \pm 0,44	0,32 \pm 0,12

El óptimo es a pH 5,5. No existen diferencias significativas con la L5J sin pepsina (ANOVA 1 vía, $p=0,949$).

1.3.1.5. Adulto (L5)

Figura R59. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) del adulto de *H. aduncum* tras 42 días de cultivo, cultivado sin pepsina durante una semana antes de recogerlo, en función del pH, empleando como sustrato Z-FR-AMC (100 µM). Cada dato es la media de 4 experimentos realizados en duplicado ± ES.

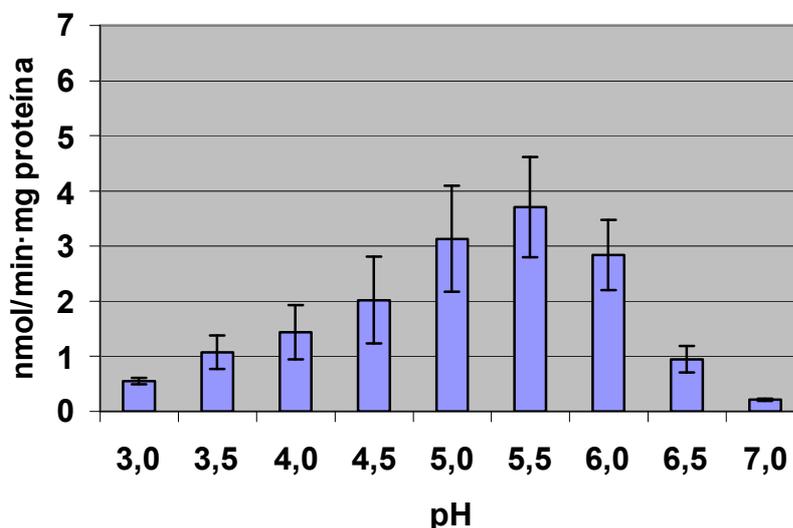


pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
AE ± ES	0,89 ±0,10	1,49 ±0,11	1,81 ±0,13	2,39 ±0,26	3,67 ±0,44	4,88 ±0,49	4,19 ±0,59	1,40 ±0,32	0,49 ±0,12

El óptimo es a pH 5,5.

Figura R60. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) del adulto de *H. aduncum* tras 42 días de cultivo con pepsina, en función del pH, empleando como sustrato Z-FR-AMC (100 µM). Cada dato es la media de 4 experimentos realizados en duplicado ± ES.

L5 Con Pepsina



pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
AE ± ES	0,55 ±0,06	1,07 ±0,30	1,44 ±0,50	2,02 ±0,79	3,13 ±0,96	3,71 ±0,91	2,84 ±0,64	0,95 ±0,24	0,21 ±0,02

El óptimo es a pH 5,5. La actividad específica es algo menor que la de L5 sin pepsina, pero no existen diferencias significativas (ANOVA 1 vía, $p=0,057$).

1.3.1.6. Comparación estadística de la actividad proteolítica frente a Z-FR-AMC entre los grupos

Se ha comparado estadísticamente la AE frente al sustrato Z-FR-AMC para catepsinas B/L de las distintas fases de desarrollo del parásito considerando a la vez toda la actividad medida en la curva de pH.

1.3.1.6.1. Comparación en función de la pepsina

No se han encontrado diferencias significativas al comparar los grupos cultivados sin pepsina y con pepsina (K-W, $p=0,638$).

Al comparar las distintas fases de desarrollo de los parásitos cultivados **sin pepsina** se observa que existen diferencias significativas (K-W, $p<0,001$). La L3 0h (sin pepsina) presenta la menor AE de todo el grupo sin pepsina, con diferencias significativas en los contrastes *a posteriori* mediante la prueba de la U M-W con la corrección de Bonferroni (L3 0h<L3 48h

$p < 0,001$; L3 0h < L4 $p < 0,001$; L3 0h < L5J $p = 0,001$; L3 0h < L5 $p < 0,001$). Sin embargo no existen diferencias significativas entre las distintas fases de desarrollo de los parásitos cultivados **con pepsina** (ANOVA 1 vía, $p = 0,612$).

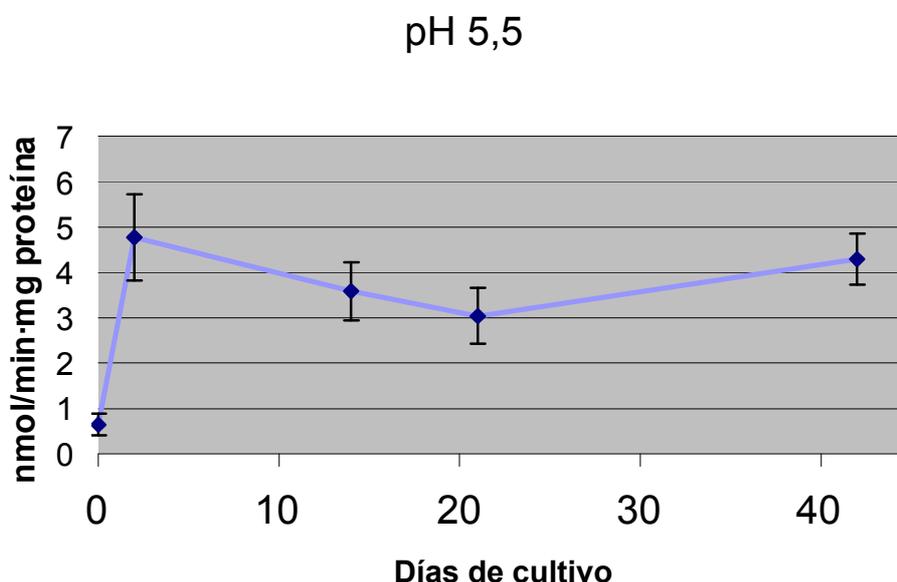
1.3.1.6.2. Comparación entre estados de desarrollo independientemente de la pepsina

Al comparar todos los estados de desarrollo entre sí, sin diferenciar entre los cultivados con pepsina y sin ella, también existen diferencias significativas (K-W, $p < 0,001$), y la AE de L3 0h es la menor de todos (diferencias significativas al realizar los contrastes *a posteriori* mediante la prueba de la U M-W con la corrección de Bonferroni: L3 0h < L3 48h $p < 0,001$; L3 0h < L4 $p < 0,001$; L3 0h < L5J $p < 0,001$; L3 0h < L5 $p < 0,001$).

1.3.1.7. **Actividad proteolítica frente a Z-FR-AMC a lo largo del desarrollo de H. aduncum fijando el pH**

En esta sección se representan los datos de los apartados anteriores (ver apartados V 1.3.1.1.-V 3.1.1.5.) representados en función del estado de desarrollo.

Figura R61. Actividad específica a pH 5,5 (nmol/min·mg proteína) durante el desarrollo de *H. aduncum*, empleando como sustrato Z-FR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 2-8 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

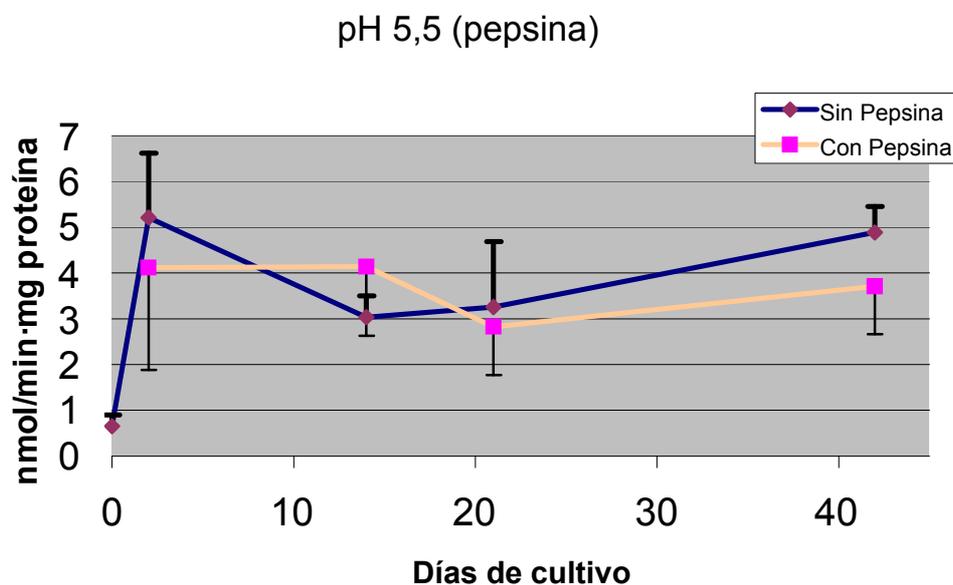


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
AE \pm ES	0,65 \pm 0,24	4,77 \pm 0,95	3,58 \pm 0,64	3,04 \pm 0,61	4,30 \pm 0,56

Como se puede observar la AE sube de inmediato a partir de L3 0h hasta el máximo que corresponde a la L3 48h, para luego mantenerse hasta el adulto maduro. Existen diferencias significativas entre los distintos estados de desarrollo (ANOVA 2 vías, $p < 0,001$), siendo la AE de

L3 0h significativamente menor (diferencias significativas encontradas al realizar la prueba de Bonferroni: L3 0h<L3 48h $p<0,001$; L3 0h<L4 $p=0,001$; L3 0h<L5J $p=0,004$; L3 0h<L5 $p<0,001$).

Figura R62. Actividad específica a pH 5,5 (nmol/min-mg proteína) durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato Z-FR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 2-4 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Sin Pepsina	0,65±0,24	5,20±1,41	3,03±0,47	3,25±1,44	4,88±0,57
Con Pepsina	—	4,12±2,24	4,13±1,51	2,83±1,07	3,71±1,05

No existen diferencias significativas entre los parásitos cultivados con pepsina y sin pepsina a pH 5,5 (ANOVA 2 vías, $p=0,393$).

1.3.1.8. Resumen de los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a Z-FR-AMC

Tabla R12. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función del pH y de la pepsina en cultivo, empleando como sustrato Z-FR-AMC (100 µM). Cada dato es la media de 2-4 experimentos realizados en duplicado ± ES.

pH	ESTADO DE DESARROLLO										
	L3 0h			L3 48h(2 días)		L4(14 días)		L5J(21 días)		L5(42 días)	
	Sin Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	
3,0	0,11 ±0,03	0,31 ±0,05	0,31 ±0,10	0,36 ±0,03	0,35 ±0,12	0,20 ±0,03	0,25 ±0,01	0,89 ±0,10	0,55 ±0,06		
3,5	0,21 ±0,11	0,81 ±0,25	0,95 ±0,45	0,74 ±0,09	0,72 ±0,27	0,60 ±0,29	0,69 ±0,04	1,49 ±0,11	1,07 ±0,30		
4,0	0,48 ±0,02	2,09 ±0,62	2,36 ±0,85	1,23 ±0,11	1,50 ±0,46	0,80 ±0,36	0,94 ±0,04	1,81 ±0,13	1,44 ±0,50		
4,5	0,23 ±0,04	2,49 ±0,74	2,74 ±1,21	1,42 ±0,28	1,69 ±0,50	1,12 ±0,66	1,52 ±0,08	2,39 ±0,26	2,02 ±0,79		
5,0	0,48 ±0,15	4,80 ±1,44	4,73 ±2,00	2,10 ±0,21	3,08 ±0,92	2,13 ±1,41	2,32 ±0,34	3,67 ±0,44	3,13 ±0,96		
5,5	0,65 ±0,24	5,20 ±1,41	4,12 ±1,59	3,03 ±0,47	4,13 ±1,51	3,25 ±1,44	2,83 ±1,07	4,88 ±0,49	3,71 ±0,91		
6,0	0,54 ±0,25	3,47 ±0,82	2,70 ±1,00	2,87 ±0,69	3,72 ±1,39	2,77 ±1,47	1,96 ±0,55	4,19 ±0,59	2,84 ±0,64		
6,5	0,49 ±0,19	0,94 ±0,21	1,04 ±0,19	1,48 ±0,34	1,62 ±0,96	1,28 ±0,22	0,90 ±0,44	1,40 ±0,32	0,95 ±0,24		
7,0	0,07 ±0,06	0,22 ±0,15	0,44 ±0,06	0,58 ±0,01	0,95 ±0,06	0,40 ±0,08	0,32 ±0,12	0,49 ±0,12	0,21 ±0,02		

1.3.1.9. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a Z-FR-AMC

Variable	Contrastes	AE	
		Significación	
Estado (K-W)		<0,001*	
	L3 0h (U) L3 48h	L4	<0,001*
		L5J	<0,001*
		L5	<0,001*
	L3 48h (U) L3 0h	L4	0,987
		L5J	0,159
		L5	0,528
	L4 (U) L3 0h	L3 48h	0,987
		L5J	0,102
		L5	0,549
	L5J (U) L3 0h	L3 48h	0,159
		L4	0,102
		L5	0,022
L5 (U) L3 0h	L3 48h	0,528	
	L4	0,549	
	L5J	0,022	
Pepsina (K-W)		0,638	

Tabla R13. Valores “p” de significación de la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones múltiples *a posteriori* realizadas entre los “estados de desarrollo” mediante la prueba de la U de Mann-Whitney (U) con la corrección de Bonferroni. Estas pruebas se han realizado teniendo en cuenta todos los valores de AE frente a Z-FR-AMC en conjunto. El nivel de significación es de 0,05. En la U M-W como son 10 comparaciones el nivel de significación queda corregido a 0,005. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	AE L3 48h	AE L4	AE L5J	AE L5
	Significación (K-W)	Significación (ANOVA 1 vía)	Significación (ANOVA 1 vía)	Significación (ANOVA 1 vía)
Pepsina	0,647	0,490	0,949	0,057

Tabla R14. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de Kruskal-Wallis y del ANOVA de 1 vía realizadas a los grupos de la variable “estado de desarrollo”. El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Contrastes	AE Sin Pepsina	AE Con Pepsina	
		Significación	Significación	
Estado		(K-W) <0,001*	(A1) 0,612	
	L3 0h	L3 48h	(U) <0,001*	
		L4	(U) <0,001*	
		L5J	(U) 0,001*	
		L5	(U) <0,001*	
	L3 48h	L3 0h	(U) <0,001*	
		L4	(U) 0,517	
		L5J	(U) 0,247	
		L5	(U) 0,405	
	L4	L3 0h	(U) <0,001*	
		L3 48h	(U) 0,517	
		L5J	(U) 0,339	
		L5	(U) 0,069	
	L5J	L3 0h	(U) 0,001*	
		L3 48h	(U) 0,247	
		L4	(U) 0,339	
		L5	(U) 0,013	
	L5	L3 0h	(U) <0,001*	
		L3 48h	(U) 0,405	
		L4	(U) 0,069	
L5J		(U) 0,013		

Tabla R15. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de Kruskal-Wallis del ANOVA de 1 vía (A1), realizadas a cada grupo de la variable “pepsina”, y las comparaciones múltiples *a posteriori* realizadas entre los estados de desarrollo mediante la prueba de la U de Mann-Whitney (U) con la corrección de Bonferroni. El nivel de significación es de 0,05. En la U M-W como son 10 comparaciones el nivel de significación queda corregido a 0,005. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Contrastes	AE pH 5,5
		Significación (ANOVA 2 vías)
estado		<0,001*
	L3 0h L3 48h	(B) <0,001*
	L4	(B) 0,001*
	L5J	(B) 0,004*
	L5	(B) <0,001*
	L3 48h L3 0h	(B) <0,001*
	L4	(B) 1,000
	L5J	(B) 1,000
	L5	(B) 1,000
	L4 L3 0h	(B) 0,001*
	L3 48h	(B) 1,000
	L5J	(B) 1,000
	L5	(B) 1,000
	L5J L3 0h	(B) 0,004*
	L3 48h	(B) 1,000
	L4	(B) 1,000
	L5	(B) 1,000
	L5 L3 0h	(B) <0,001*
	L3 48h	(B) 1,000
	L4	(B) 1,000
	L5J	(B) 1,000
Pepsina		0,393
Estado-Pepsina		0,522

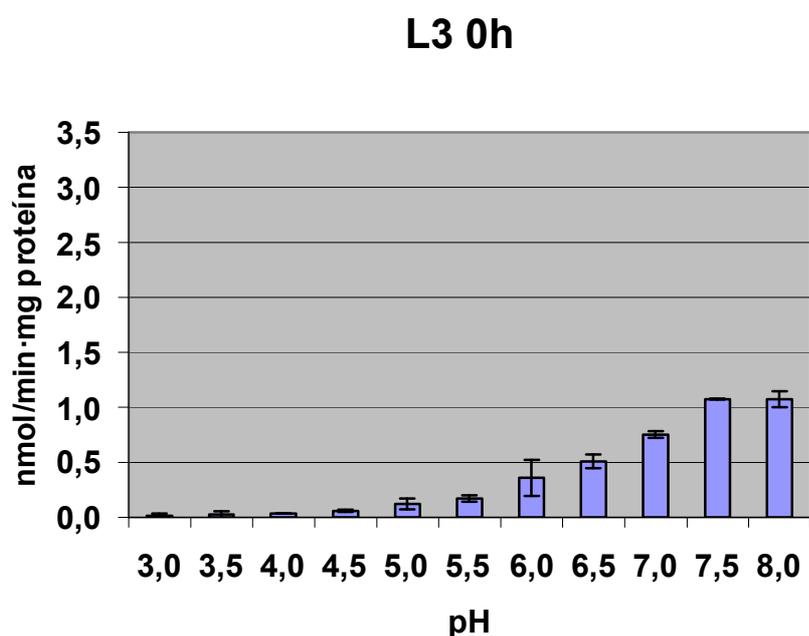
Tabla R16. Valores “p” de significación de la prueba del ANOVA de 2 vías realizadas al grupo de valores a pH 5,5. Las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los “estados de desarrollo” se han realizado mediante la prueba Bonferroni (B). El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

1.3.2. Z-RR-AMC

A continuación se muestran las actividades específicas medidas con el sustrato para catepsina B (Z-RR-AMC), en función del pH, y expresadas como AE \pm ES (en nanomoles de sustrato transformado por min y mg de proteína).

1.3.2.1. Larva 3 recién aislada del hospedador (L3 0h)

Figura R63. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) de la L3 de *H. aduncum* recogida del pescado (L3 0h), en función del pH, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



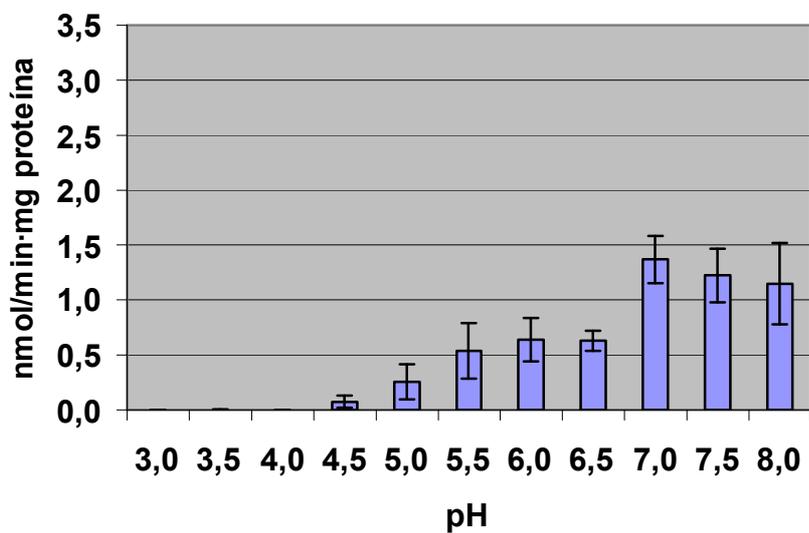
pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
AE \pm ES	0,01 \pm 0,02	0,02 \pm 0,03	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,12 \pm 0,05	0,17 \pm 0,03	0,36 \pm 0,16	0,51 \pm 0,06	0,75 \pm 0,03	1,08 \pm 0,00	1,08 \pm 0,07

El óptimo está entre los pH 7,5 y 8,0.

1.3.2.2. Larva 3 tras 48 horas de cultivo (L3 48h)

Figura R64. Actividad específica (nmol/min-mg proteína) de la L3 de *H. aduncum* tras 48 horas de cultivo, cultivada sin pepsina, en función del pH, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L3 48h Sin Pepsina

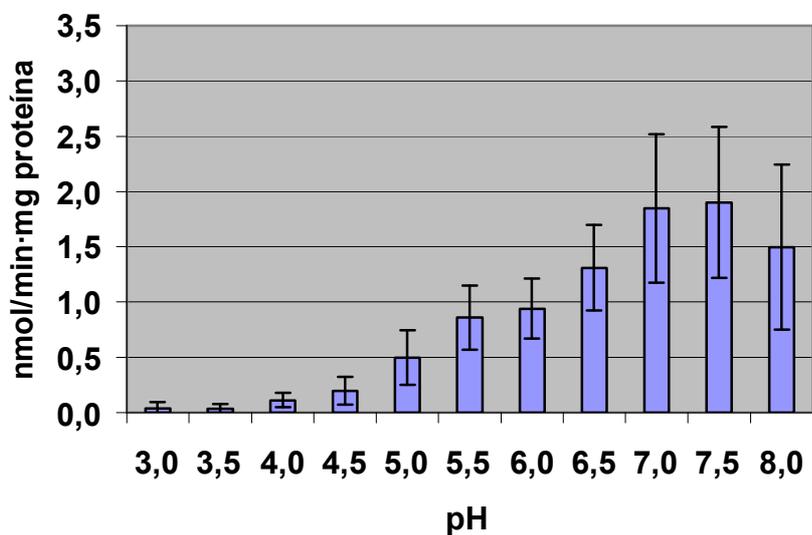


pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
AE \pm ES	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,07 \pm 0,06	0,26 \pm 0,16	0,54 \pm 0,25	0,64 \pm 0,20	0,63 \pm 0,09	1,37 \pm 0,21	1,22 \pm 0,25	1,15 \pm 0,37

El óptimo es a pH 7,0.

Figura R65. Actividad específica (nmol/min-mg proteína) de la L3 de *H. aduncum* tras 48 horas de cultivo con pepsina, en función del pH, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L3 48h Con Pepsina

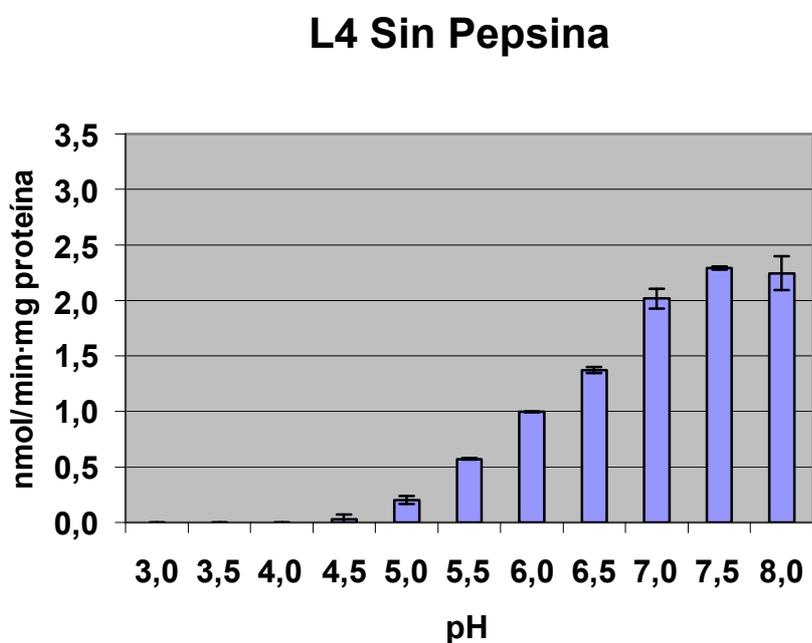


pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
AE \pm ES	0,04 \pm 0,06	0,03 \pm 0,04	0,11 \pm 0,06	0,20 \pm 0,12	0,50 \pm 0,25	0,86 \pm 0,29	0,94 \pm 0,27	1,31 \pm 0,39	1,85 \pm 0,67	1,90 \pm 0,68	1,50 \pm 0,75

El óptimo es a pH 7,5. La AE es mayor que en la cultivada sin pepsina, aunque no hay diferencias significativas (K-W, $p=0,109$).

1.3.2.3. Larva 4 (L4)

Figura R66. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) de la L4 de *H. aduncum* tras 14 días de cultivo, cultivada sin pepsina durante una semana antes de recogerla, en función del pH, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 µM). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado ± ES.

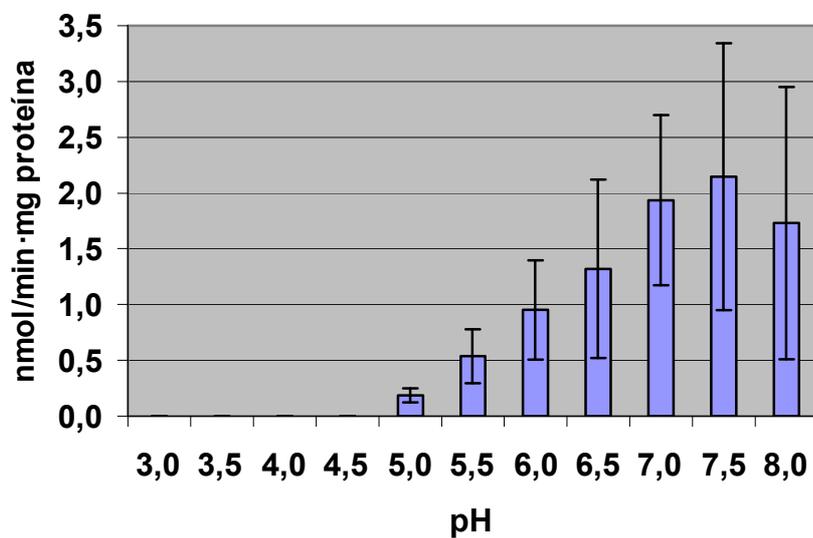


pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
AE ± ES	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,03 ±0,04	0,20 ±0,04	0,57 ±0,01	1,00 ±0,00	1,37 ±0,03	2,02 ±0,09	2,29 ±0,01	2,25 ±0,15

El óptimo es a pH 7,5.

Figura R67. Actividad específica (nmol/min · mg proteína) de la L4 de *H. aduncum* tras 14 días de cultivo con pepsina, en función del pH, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 µM). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado ± ES.

L4 Con Pepsina



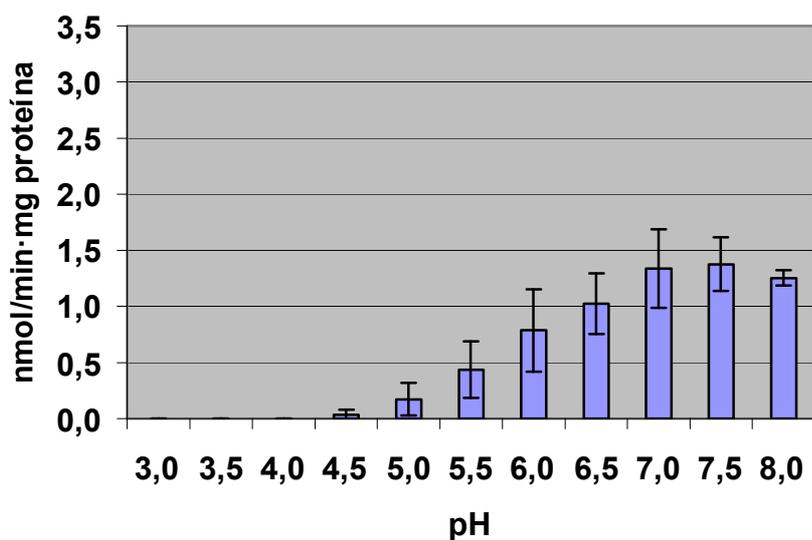
pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
AE ± ES	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,19 ±0,06	0,54 ±0,24	0,95 ±0,45	1,32 ±0,80	1,94 ±0,76	2,14 ±1,20	1,73 ±1,22

El óptimo es a pH 7,5. No existen diferencias significativas en la AE con L4 sin pepsina (K-W, $p=0,774$).

1.3.2.4. Adulto juvenil (L5J)

Figura R68. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) del adulto juvenil de *H. aduncum* tras 21 días de cultivo, cultivado sin pepsina durante una semana antes de recogerlo, en función del pH, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L5J Sin Pepsina

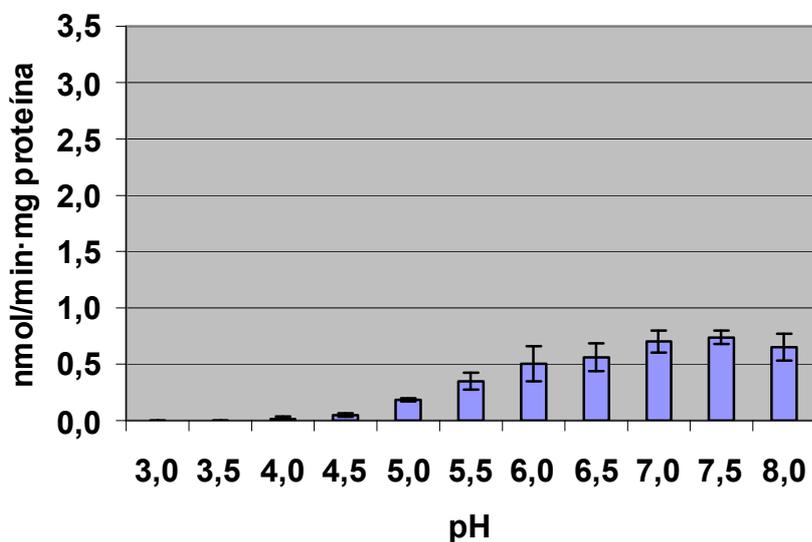


pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
AE \pm ES	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,03 \pm 0,05	0,17 \pm 0,14	0,44 \pm 0,25	0,79 \pm 0,37	1,03 \pm 0,27	1,34 \pm 0,35	1,38 \pm 0,24	1,25 \pm 0,07

El óptimo es a pH 7,5.

Figura R69. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) del adulto juvenil de *H. aduncum* tras 21 días de cultivo con pepsina, en función del pH, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L5J Con Pepsina



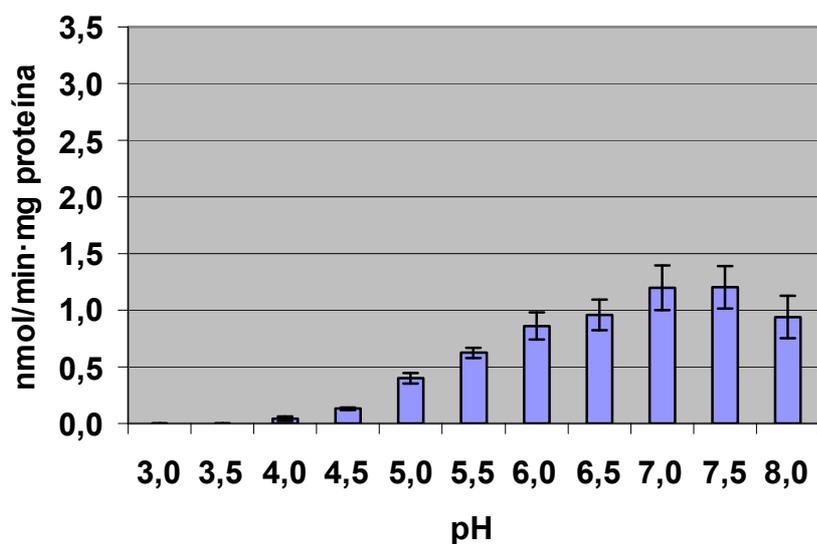
pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
AE \pm ES	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,02 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02	0,18 \pm 0,01	0,35 \pm 0,08	0,50 \pm 0,16	0,56 \pm 0,12	0,70 \pm 0,10	0,74 \pm 0,06	0,65 \pm 0,12

El óptimo es a pH 7,5. La AE es menor que en la cultivada sin pepsina, pero no existen diferencias significativas (K-W, $p=0,349$).

1.3.2.5. Adulto (L5)

Figura R70. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) del adulto de *H. aduncum* tras 42 días de cultivo, cultivado sin pepsina durante una semana antes de recogerlo, en función del pH, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 µM). Cada dato es la media de 4 experimentos realizados en duplicado ± ES.

L5 Sin Pepsina

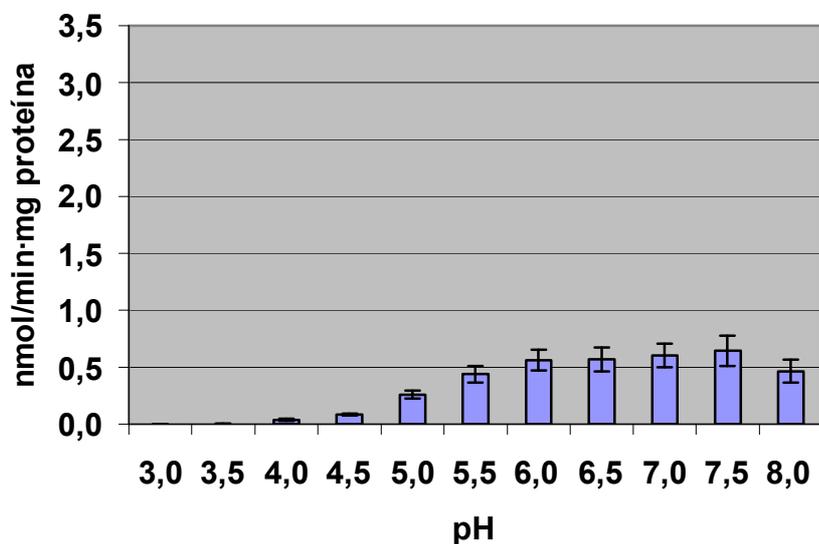


pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
AE ± ES	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,04 ±0,02	0,13 ±0,01	0,40 ±0,05	0,62 ±0,04	0,86 ±0,12	0,96 ±0,13	1,20 ±0,20	1,20 ±0,19	0,94 ±0,19

El óptimo está entre los pH 7,0 y 7,5.

Figura R71. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) del adulto de *H. aduncum* tras 42 días de cultivo con pepsina, en función del pH, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 µM). Cada dato es la media de 4 experimentos realizados en duplicado ± ES.

L5 Con Pepsina



pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
AE ± ES	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,04 ±0,01	0,08 ±0,01	0,26 ±0,04	0,44 ±0,07	0,56 ±0,09	0,57 ±0,10	0,60 ±0,10	0,64 ±0,13	0,46 ±0,10

El óptimo es a pH 7,5. La actividad específica es menor que la de L5 cultivada sin pepsina (con diferencias significativas: K-W, $p=0,031$).

1.3.2.6. Comparación estadística de la actividad proteolítica frente a Z-RR-AMC entre los grupos

Se han comparado estadísticamente las AE frente al sustrato Z-RR-AMC para catepsina B de las distintas fases de desarrollo del parásito considerando a la vez toda la actividad medida en la curva de pH.

1.3.2.6.1. Comparación en función de la pepsina

No se han encontrado diferencias significativas al comparar los grupos cultivados sin pepsina y con pepsina (K-W, $p=0,465$).

Al comparar las distintas fases de desarrollo de los parásitos cultivados **sin pepsina** no se observa que existan diferencias significativas (K-W, $p=0,739$). Y en los parásitos cultivados **con pepsina** tampoco existen diferencias significativas entre las distintas fases de desarrollo (K-W, $p=0,072$).

1.3.2.6.2. Comparación entre estados de desarrollo independientemente de la pepsina

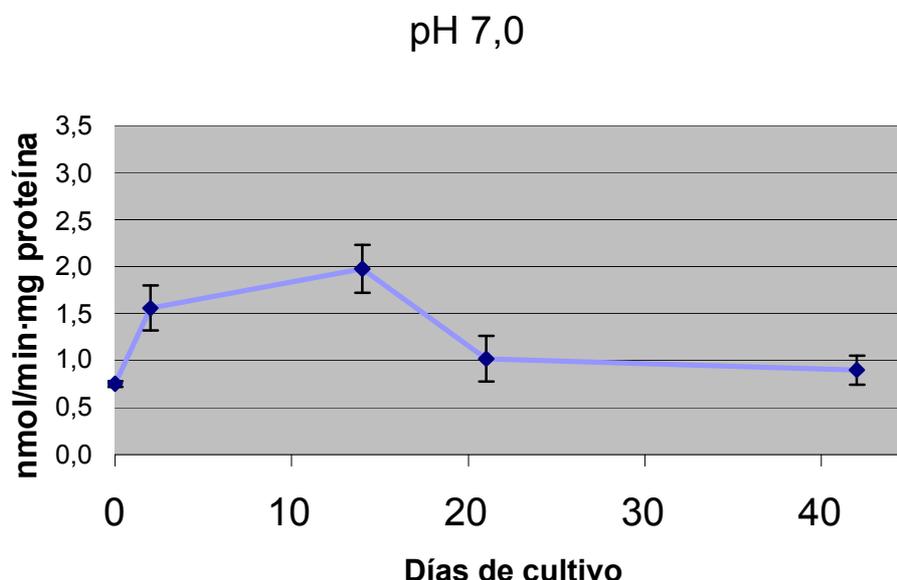
Al comparar todos los estados de desarrollo entre sí, sin diferenciar entre los cultivados con pepsina y sin ella, no existen diferencias significativas (K-W, $p=0,512$).

1.3.2.7. **Actividad proteolítica frente a Z-RR-AMC a lo largo del desarrollo de H. aduncum fijando el pH**

En esta sección se representan los datos de los apartados anteriores (ver apartados V 1.3.2.1.-V 3.2.1.5.) representados en función del estado de desarrollo.

1.3.2.7.1. pH 7,0

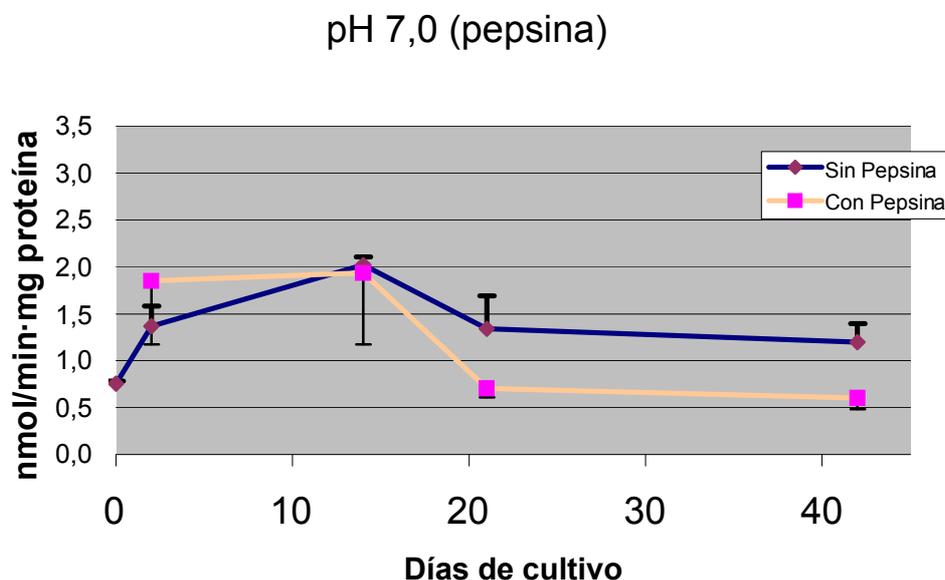
Figura R72. Actividad específica a pH 7,0 (nmol/min·mg proteína) durante el desarrollo de *H. aduncum*, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 μM). Cada dato es la media de 2-8 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
AE \pm ES	0,75 \pm 0,03	1,56 \pm 0,24	1,98 \pm 0,26	1,02 \pm 0,24	0,90 \pm 0,16

A pH 7,0 existen diferencias significativas entre los diferentes estados de desarrollo (ANOVA 2 vías, $p<0,001$). La actividad sube del mínimo en L3 0h (diferencias significativas en los contrastes *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni: L3 48h>L5 $p=0,016$) hasta la máxima actividad en L4 (diferencias significativas halladas en los contrastes *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni: L4>L3 0h $p=0,014$; L4>L5J $p=0,027$; L4>L5 $p=0,002$). Después baja de nuevo en el adulto juvenil, y se mantiene hasta el adulto maduro.

Figura R73. Actividad específica a pH 7,0 (nmol/min·mg proteína) durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 2-4 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



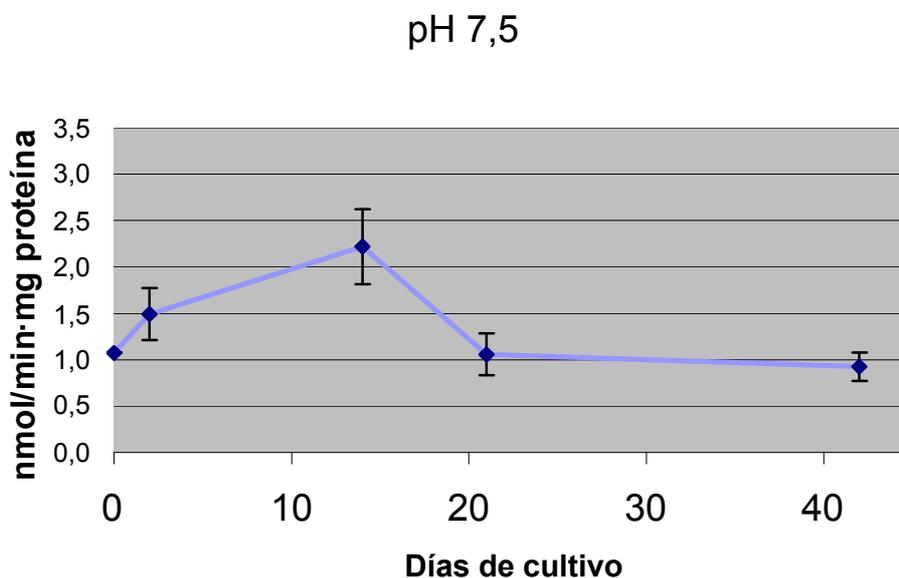
Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Sin Pepsina	0,75±0,03	1,37±0,21	2,02±0,09	1,34±0,35	1,20±0,20
Con Pepsina	—	1,85±0,67	1,94±0,76	0,70±0,10	0,60±0,12

A pH 7,0 existen diferencias significativas (ANOVA 2 vías, $p=0,040$) entre las AE de los parásitos cultivados sin pepsina, cuyo promedio es mayor, y los cultivados con pepsina. Además también existe interacción entre la variable estado de desarrollo y la AE a pH 7,0 de catepsina B (ANOVA 2 vías, $p=0,033$).

Al analizar los valores de los grupos sin pepsina y con pepsina a pH 7,0 por separado, se observa que en el grupo sin pepsina no existen diferencias significativas entre los estados de desarrollo (ANOVA 1 vía, $p=0,155$). En el grupo cultivado con pepsina sí hay diferencias significativas entre los estados de desarrollo (ANOVA 1 vía, $p=0,013$) y, en las comparaciones *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni, se ve que L5 presenta una actividad significativamente menor: $L5 < L3$ 48h $p=0,044$; $L5 < L4$ $p=0,038$).

1.3.2.7.2. pH 7,5

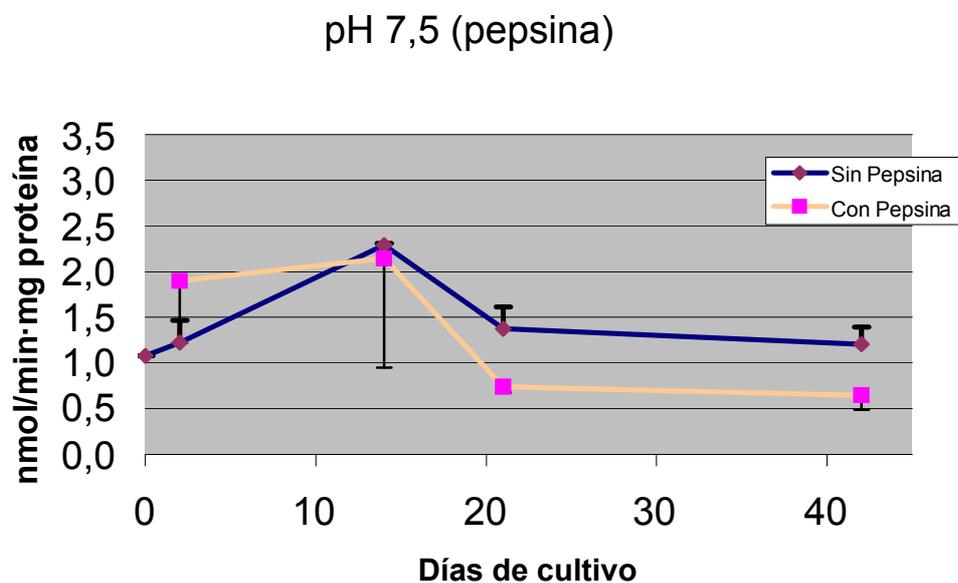
Figura R74. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) durante el desarrollo de *H. aduncum* a pH 7,5, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 µM). Cada dato es la media de 2-8 experimentos realizados en duplicado ± ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
AE ± ES	1,08±0,00	1,49±0,28	2,22±0,40	1,06±0,23	0,92±0,15

Como se puede observar, el perfil de la AE a pH 7,5 es muy similar a la de a pH 7,0 , sube progresivamente a partir de L3 0h hasta el máximo que corresponde a la L4, para luego bajar de nuevo en el adulto. Existen diferencias significativas entre estados de desarrollo (ANOVA 2 vías, $p=0,003$), pero sin embargo al realizar los contrastes *a posteriori* no se han hallado diferencias significativas entre ningún estado. Al excluir el estado de desarrollo L4 de la prueba del ANOVA de 2 vías, se obtiene un valor $p=0,049$, que está en el límite de la significación estadística, lo que indicaría que L4 es el más diferente, pues desaparecen las diferencias al no tenerlo en cuenta.

Figura R75. Actividad específica a pH 7,5 (nmol/min·mg proteína) durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 μ M). Cada dato es la media de 2-4 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Sin Pepsina	1,08±0,00	1,22±0,25	2,29±0,01	1,38±0,24	1,20±0,19
Con Pepsina	—	1,90±0,68	2,14±1,20	0,74±0,06	0,64±0,15

A pH 7,5 no existen diferencias significativas entre las AE de los parásitos cultivados sin pepsina y los cultivados con pepsina (ANOVA 2 vías, $p=0,114$). En cambio la interacción entre las variables estado de desarrollo y pepsina está al límite de la significación estadística (ANOVA 2 vías, $p=0,050$).

1.3.2.8. Resumen de los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a Z-RR-AMC

Tabla R17. Actividad específica (nmol/min·mg proteína) durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función del pH y de la pepsina en cultivo, empleando como sustrato Z-RR-AMC (100 µM). Cada dato es la media de 2-4 experimentos realizados en duplicado ± ES.

pH	ESTADO DE DESARROLLO											
	L3 0h			L3 48h(2 días)			L4(14 días)		L5J(21 días)		L5(42 días)	
	Sin Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	
3,0	0,01 ±0,02	0,00 ±0,00	0,04 ±0,06	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	
3,5	0,02 ±0,03	0,00 ±0,00	0,03 ±0,04	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	
4,0	0,03 ±0,00	0,00 ±0,00	0,11 ±0,06	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,02 ±0,02	0,04 ±0,02	0,04 ±0,02	0,04 ±0,01	0,04 ±0,01	
4,5	0,06 ±0,01	0,07 ±0,06	0,20 ±0,12	0,03 ±0,04	0,00 ±0,00	0,03 ±0,05	0,05 ±0,02	0,13 ±0,01	0,08 ±0,01	0,08 ±0,01	0,08 ±0,01	
5,0	0,12 ±0,05	0,26 ±0,16	0,50 ±0,25	0,20 ±0,04	0,19 ±0,06	0,17 ±0,14	0,18 ±0,01	0,40 ±0,05	0,26 ±0,04	0,26 ±0,04	0,26 ±0,04	
5,5	0,17 ±0,03	0,54 ±0,25	0,86 ±0,29	0,57 ±0,01	0,54 ±0,24	0,44 ±0,25	0,35 ±0,08	0,62 ±0,04	0,44 ±0,07	0,44 ±0,07	0,44 ±0,07	
6,0	0,36 ±0,16	0,64 ±0,20	0,94 ±0,27	1,00 ±0,00	0,95 ±0,45	0,79 ±0,37	0,50 ±0,16	0,86 ±0,12	0,56 ±0,09	0,56 ±0,09	0,56 ±0,09	
6,5	0,51 ±0,06	0,63 ±0,09	1,31 ±0,39	1,37 ±0,03	1,32 ±,80	1,03 ±0,27	0,56 ±0,12	0,96 ±0,13	0,57 ±0,10	0,57 ±0,10	0,57 ±0,10	
7,0	0,75 ±0,03	1,37 ±0,21	1,85 ±0,67	2,02 ±0,09	1,94 ±0,76	1,34 ±0,35	0,70 ±0,10	1,20 ±0,20	0,60 ±0,10	0,60 ±0,10	0,60 ±0,10	
7,5	1,08 ±0,00	1,22 ±0,25	1,90 ±0,68	2,29 ±0,01	2,14 ±1,20	1,38 ±0,24	0,74 ±0,06	1,20 ±0,19	0,64 ±0,13	0,64 ±0,13	0,64 ±0,13	
8,0	1,08 ±0,07	1,15 ±0,37	1,50 ±0,75	2,25 ±0,15	1,73 ±1,22	1,25 ±0,07	0,65 ±0,12	0,94 ±0,19	0,46 ±0,10	0,46 ±0,10	0,46 ±0,10	

1.3.2.9. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a Z-RR-AMC

Variable	Contrastes	AE
		Significación
Estado	(K-W)	0,512
Pepsina	(K-W)	0,465

Tabla R18. Valores “p” de significación de la prueba de Kruskal-Wallis. Estas pruebas se han realizado teniendo en cuenta todos los valores de AE frente a Z-RR-AMC en conjunto. El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	AE L3 48h	AE L4	AE L5J	AE L5
	Significación (K-W)	Significación (K-W)	Significación (K-W)	Significación (K-W)
Pepsina	0,109	0,774	0,349	0,031*

Tabla R19. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de Kruskal-Wallis realizadas a cada grupo de la variable “estado de desarrollo”. El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	AE Sin Pepsina	AE Con Pepsina
	Significación (K-W)	Significación (K-W)
Estado	0,739	0,072

Tabla R20. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de Kruskal-Wallis, realizadas a cada grupo de la variable “pepsina”. El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Contrastes	AE pH 7,0	AE pH 7,5	
		Significación (ANOVA 2 vías)	Significación (ANOVA 2 vías)	
Estado		<0,001*	0,003*	
	L3 0h	L3 48h	(B) 0,091	(B) 1,000
		L4	(B) 0,014*	(B) 0,288
		L5J	(B) 1,000	(B) 1,000
		L5	(B) 1,000	(B) 1,000
	L3 48h	L3 0h	(B) 0,091	(B) 1,000
		L4	(B) 1,000	(B) 0,803
		L5J	(B) 0,276	(B) 1,000
		L5	(B) 0,016*	(B) 0,136
	L4	L3 0h	(B) 0,014*	(B) 0,288
		L3 48h	(B) 1,000	(B) 0,803
		L5J	(B) 0,027*	(B) 0,054
		L5	(B) 0,002*	(B) 0,003
	L5J	L3 0h	(B) 1,000	(B) 1,000
		L3 48h	(B) 0,276	(B) 1,000
		L4	(B) 0,027*	(B) 0,054
		L5	(B) 1,000	(B) 1,000
	L5	L3 0h	(B) 1,000	(B) 1,000
		L3 48h	(B) 0,016*	(B) 0,136
		L4	(B) 0,002*	(B) 0,003
L5J		(B) 1,000	(B) 1,000	
Pepsina		0,040*	0,114	
Estado-Pepsina		0,033*	0,050*	

Tabla R21. Valores “p” de significación de la prueba del ANOVA de 2 vías realizadas a los grupos pH 7,0 y 7,5. Las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los “estados de desarrollo” se han realizado mediante la prueba Bonferroni (B). El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Contrastes	AE pH 7,0 Sin Pepsina	AE pH 7,0 Con Pepsina
		Significación (ANOVA 1 vía)	Significación (ANOVA 1 vía)
Estado		0,155	0,013*
	L3 0h L3 48h L4 L5J L5		
	L3 48h L3 0h L4 L5J L5		(B) 1,000 (B) 0,175 (B) 0,044*
	L4 L3 0h L3 48h L5J L5		(B) 1,000 (B) 0,149 (B) 0,038*
	L5J L3 0h L3 48h L4 L5		(B) 0,175 (B) 0,149 (B) 1,000
	L5 L3 0h L3 48h L4 L5J		(B) 0,044* (B) ,038* (B) 1,000

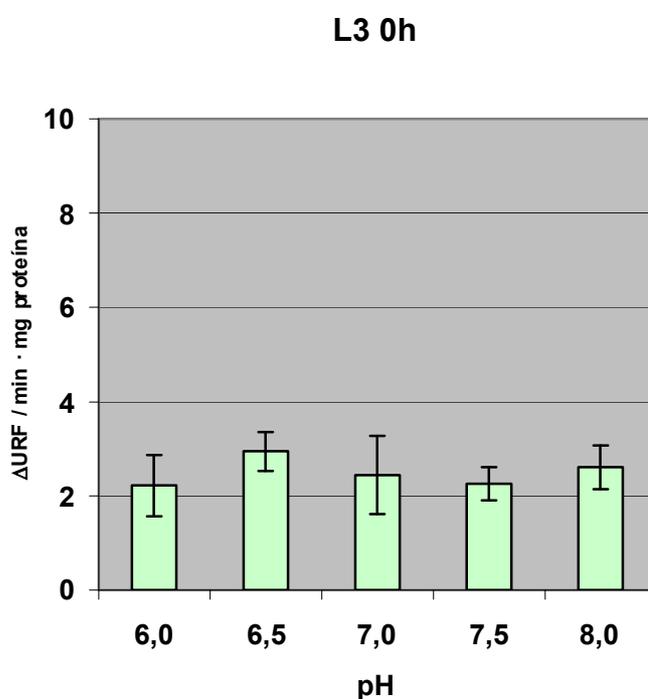
Tabla R22. Valores “p” de significación de la prueba del ANOVA de 1 vía realizadas a los grupos de la variable “pepsina” a pH 7,0. Las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los “estados de desarrollo” se han realizado mediante la prueba Bonferroni (B). El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

1.4. Actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I

A continuación se muestran las actividades enzimáticas en función del pH, medidas con DQ-colágeno tipo I y expresadas como $\Delta\text{URF}/\text{min} \cdot \text{mg} \pm \text{ES}$ (unidades relativas de fluorescencia emitida por min y mg de proteína).

1.4.1. Larva 3 recién aislada del hospedador (L3 0h)

Figura R76. Actividad colagenasa ($\Delta\text{URF}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína) de la L3 de *H. aduncum* recogida del pescado (L3 0h), en función del pH, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

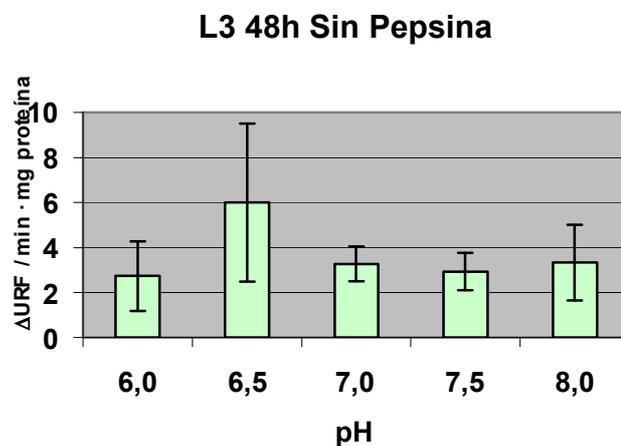


pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Aenz \pm ES	2,22 \pm 0,65	2,94 \pm 0,41	2,44 \pm 0,83	2,25 \pm 0,35	2,61 \pm 0,46

La actividad máxima es a pH 6,5 y se observa otra subida de actividad a pH 8,0.

1.4.2. Larva 3 tras 48 horas de cultivo (L3 48h)

Figura R77. Actividad colagenasa (Δ URF/min·mg proteína) de la L3 de *H. aduncum* tras 48 horas de cultivo, cultivada sin pepsina, en función del pH, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

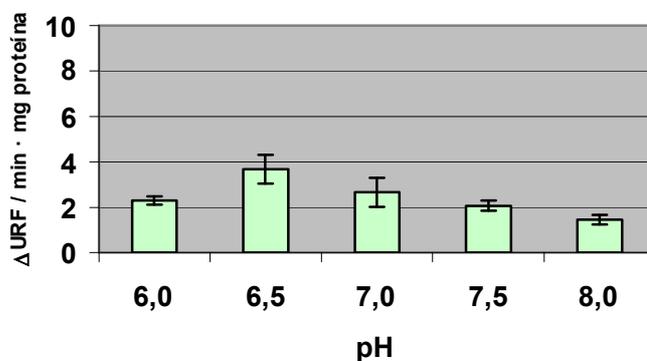


pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Aenz \pm ES	2,73 \pm 1,54	6,00 \pm 3,51	3,27 \pm 0,77	2,94 \pm 0,83	3,34 \pm 1,68

El óptimo es a pH 6,5, y se observa otra subida de actividad a pH 8,0, de forma similar que en L3 0h.

Figura R78. Actividad colagenasa (Δ URF/min·mg proteína) de la L3 de *H. aduncum* tras 48 horas de cultivo con pepsina, en función del pH, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L3 48h Con Pepsina

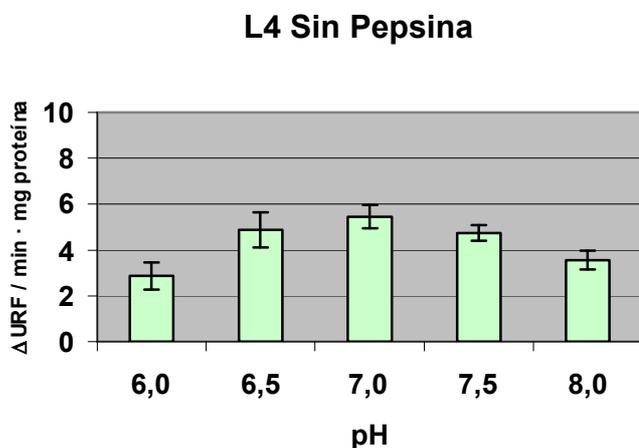


pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Aenz \pm ES	2,28 \pm 0,19	3,68 \pm 0,64	2,66 \pm 0,65	2,06 \pm 0,22	1,45 \pm 0,22

El óptimo es a pH 6,5. La actividad en conjunto es menor que en la L3 48h cultivada sin pepsina, aunque no existen diferencias significativas entre los dos grupos (ANOVA 1 vía, $p=0,059$).

1.4.3. Larva 4 (L4)

Figura R79. Actividad colagenasa (Δ URF/min · mg proteína) de la L4 de *H. aduncum* tras 14 días de cultivo, cultivada sin pepsina durante una semana antes de recogerla, en función del pH, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

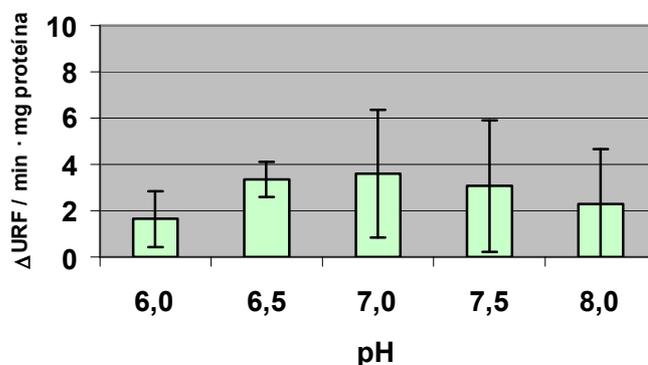


pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Aenz \pm ES	2,87 \pm 0,60	4,88 \pm 0,76	5,46 \pm 0,51	4,74 \pm 0,33	3,55 \pm 0,41

En la L4 sin pepsina el óptimo de actividad enzimática se desplaza hasta el pH 7,0.

Figura R80. Actividad colagenasa (Δ URF/min \cdot mg proteína) de la L4 de *H. aduncum* tras 14 días de cultivo con pepsina, en función del pH, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L4 Con Pepsina

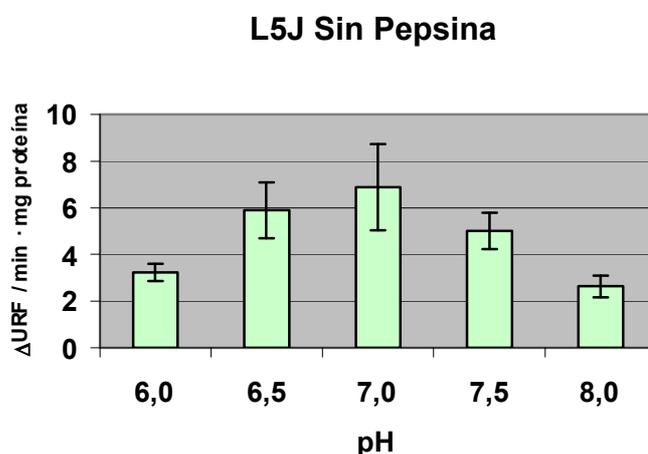


pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Aenz \pm ES	1,65 \pm 1,20	3,36 \pm 0,76	3,61 \pm 2,76	3,07 \pm 2,84	2,31 \pm 2,35

En la L4 cultivada con pepsina el óptimo de actividad enzimática también es a pH 7,0. La actividad enzimática de L4 con pepsina es significativamente menor que la de la L4 sin pepsina (ANOVA 1 vía, $p=0,035$).

1.4.4. Adulto juvenil (L5J)

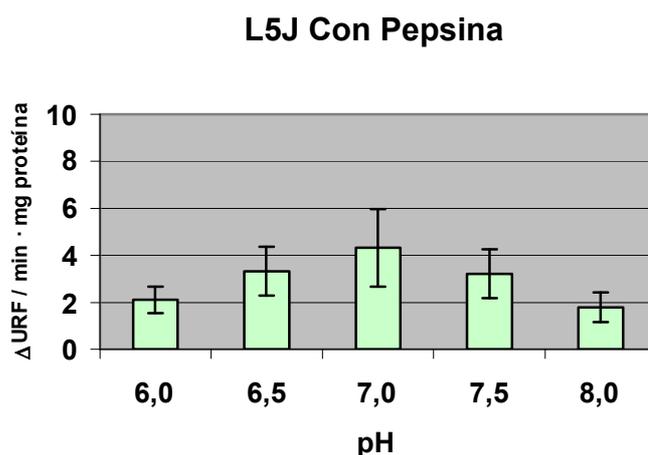
Figura R81. Actividad colagenasa (Δ URF/min \cdot mg proteína) del adulto juvenil de *H. aduncum* tras 21 días de cultivo cultivado sin pepsina durante una semana antes de recogerlo, en función del pH, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Aenz \pm ES	3,24 \pm 0,37	5,89 \pm 1,20	6,88 \pm 1,85	5,02 \pm 0,77	2,63 \pm 0,47

En L5J sin pepsina, el óptimo de actividad enzimática es a pH 7,0.

Figura R82. Actividad colagenasa (Δ URF/min \cdot mg proteína) del adulto juvenil de *H. aduncum* tras 21 días de cultivo con pepsina, en función del pH, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

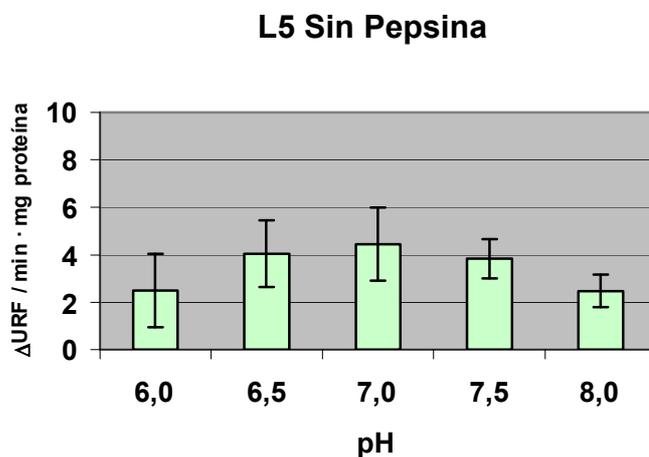


pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Aenz \pm ES	2,10 \pm 0,57	3,32 \pm 1,04	4,32 \pm 1,66	3,21 \pm 1,05	1,78 \pm 0,64

En la L5J con pepsina el óptimo de actividad enzimática es a pH 7,0. No hay diferencias significativas con la actividad enzimática de la L5J sin pepsina (ANOVA 1 vía, $p=0,181$).

1.4.5. Adulto (L5)

Figura R83. Actividad colagenasa (Δ URF/min·mg proteína) del adulto de *H. aduncum* tras 42 días de cultivo, cultivado sin pepsina durante una semana antes de recogerlo, en función del pH, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

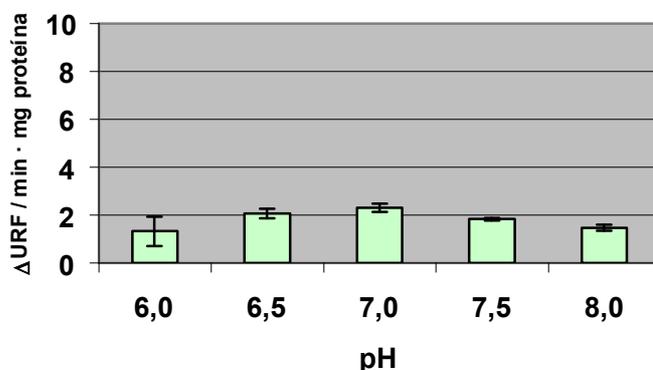


pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Aenz \pm ES	2,50 \pm 1,55	4,04 \pm 1,41	4,44 \pm 1,54	3,83 \pm 0,83	2,47 \pm 0,68

En L5 sin pepsina el óptimo de actividad enzimática es a pH 7,0.

Figura R84. Actividad colagenasa (Δ URF/min·mg proteína) del adulto de *H. aduncum* tras 42 días de cultivo con pepsina, en función del pH, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

L5 Con Pepsina



pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Aenz \pm ES	1,33 \pm 0,61	2,06 \pm 0,20	2,32 \pm 0,17	1,84 \pm 0,06	1,47 \pm 0,12

En L5 con pepsina el óptimo de actividad enzimática también es a pH 7,0. La actividad enzimática es significativamente menor que la de la L5 cultivada sin pepsina (ANOVA 1 vía, $p=0,001$).

1.4.6. Comparación estadística de la actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I entre los grupos

Se ha comparado estadísticamente la actividad colagenasa obtenida de las distintas fases de desarrollo del parásito considerando a la vez toda la actividad medida en la curva de pH.

1.4.6.1. Comparación en función de la pepsina

Se han encontrado diferencias significativas al comparar los grupos cultivados sin pepsina y con pepsina (ANOVA 2 vías, $p<0,001$), siendo mayor la actividad enzimática en los grupos sin pepsina.

De entre las distintas fases de desarrollo de los parásitos cultivados **sin pepsina** se observa que existen diferencias significativas (ANOVA 1 vía, $p=0,006$). La L3 0h (sin pepsina) presenta la menor actividad enzimática de todo el grupo y L5J la mayor, con diferencias significativas en los contrastes *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni (L3 0h<L4 $p=0,021$; L3 0h<L5J $p=0,008$).

También existen diferencias significativas entre las distintas fases de desarrollo de los parásitos cultivados **con pepsina** (ANOVA 1 vía, $p=0,034$). La L5J presenta la mayor actividad

enzimática de todas, con diferencias significativas en los contrastes *a posteriori* mediante la prueba T2 de Tamhane (prueba para varianzas desiguales L5J>L5 p=0,005).

1.4.6.2. Comparación entre estados de desarrollo independientemente de la pepsina

Existen diferencias significativas se comparan todos los estados de desarrollo entre sí, sin diferenciar entre los cultivados con pepsina y sin ella (ANOVA 2 vías, p=0,001). La actividad enzimática de L5J es la mayor de todos los estados de desarrollo, con diferencias significativas al realizar los contrastes *a posteriori* mediante la prueba T2 de Tamhane (L5J>L3 0h p=0,004; L5J>L5 p=0,012).

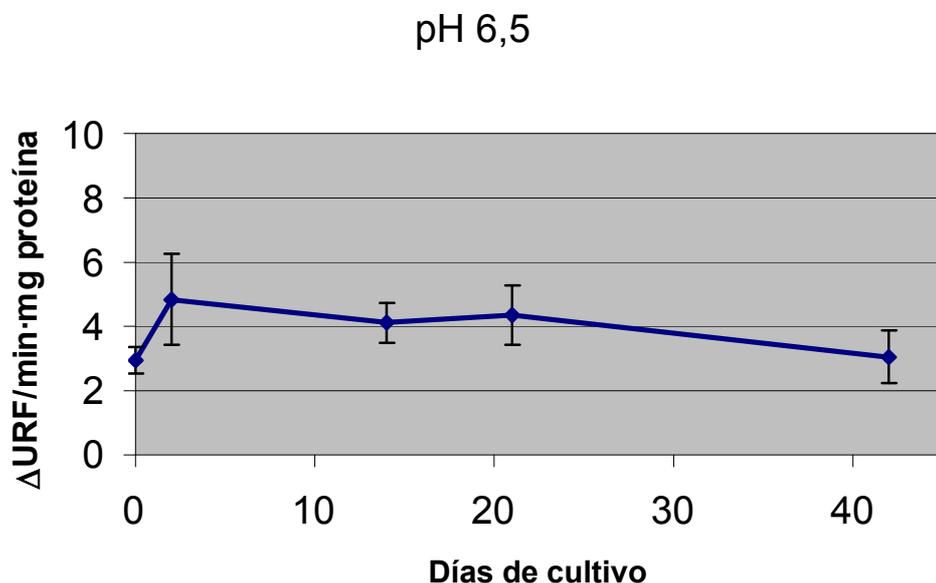
1.4.7. Actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I a lo largo del desarrollo de *H. aduncum* fijando el pH

En esta sección se representan los datos de los apartados anteriores (ver apartados V.1.4.1.-V.1.4.5.) representados en función del estado de desarrollo.

De los resultados del apartado anterior (figuras R76-R84), se observa que el pH 6,5 es el óptimo solamente de la L3, siendo 7,0 en los otros estados de desarrollo.

1.4.7.1. pH 6,5

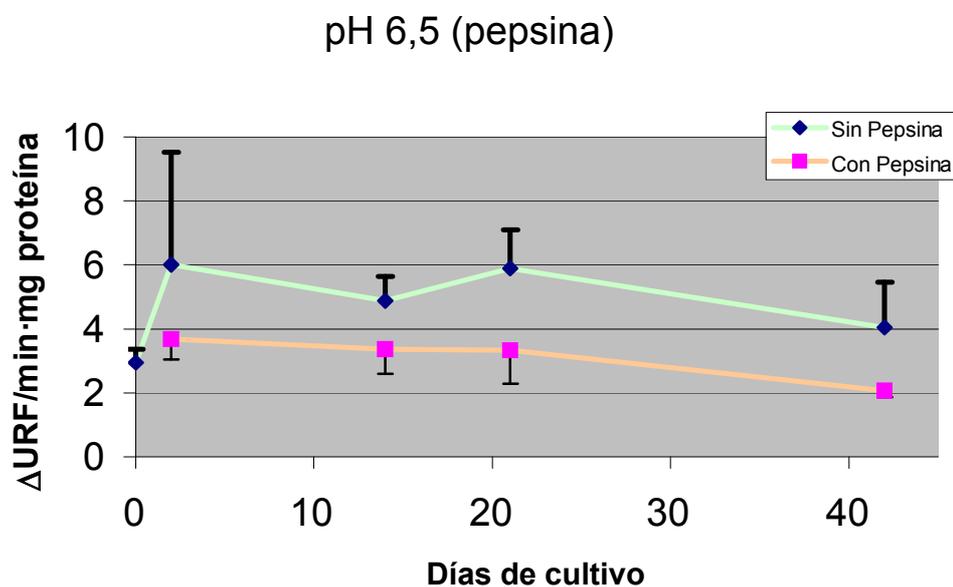
Figura R85. Actividad colagenasa (Δ URF/min mg proteína) a pH 6,5 durante el desarrollo de *H. aduncum*, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Aenz \pm ES	2,94 \pm 0,41	4,84 \pm 1,42	4,12 \pm 0,62	4,35 \pm 0,92	3,05 \pm 0,81

La actividad máxima corresponde a L3 48h, y se ha encontrado que existen diferencias significativas entre los estados de desarrollo (ANOVA 2 vías, $p=0,048$), sin embargo no se han encontrado al realizar los contrastes *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni (hay que tener en cuenta que la significación en el ANOVA 2 vías está al límite de la significación estadística).

Figura R86. Actividad colagenasa (Δ URF/min mg proteína) a pH 6,5 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

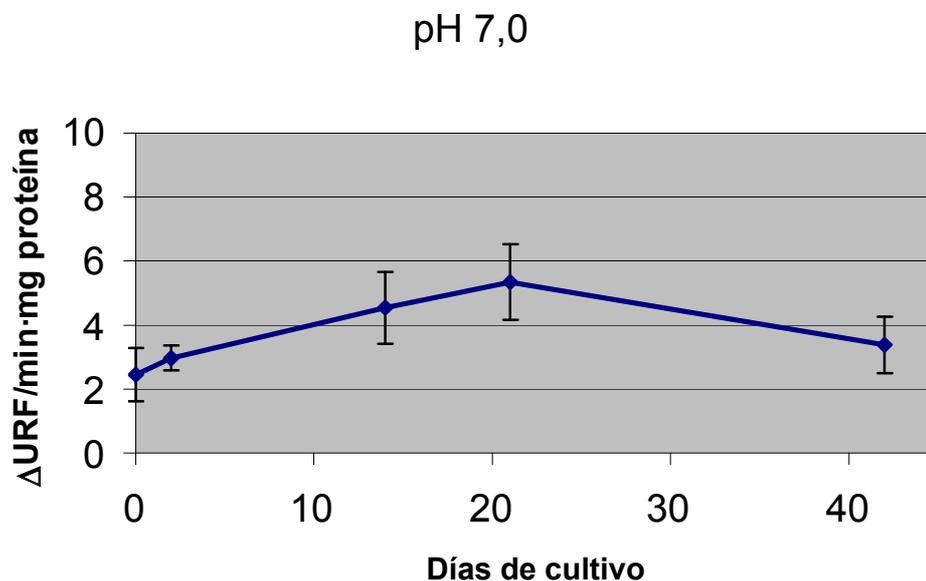


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Sin Pepsina	2,94 \pm 0,41	6,00 \pm 3,51	4,88 \pm 0,76	5,89 \pm 1,20	4,04 \pm 1,41
Con Pepsina	—	3,68 \pm 0,64	3,36 \pm 0,76	3,32 \pm 1,04	2,06 \pm 0,20

La actividad colagenasa de los parásitos cultivados con pepsina es significativamente más baja que en los cultivados sin ella (ANOVA 2 vías, $p=0,011$). No se han encontrado diferencias significativas entre los estados de desarrollo de los parásitos cultivados sin pepsina (ANOVA 1 vía, $p=0,381$), ni entre los cultivados con pepsina (K-W, $p=0,139$).

1.4.7.2. pH 7,0

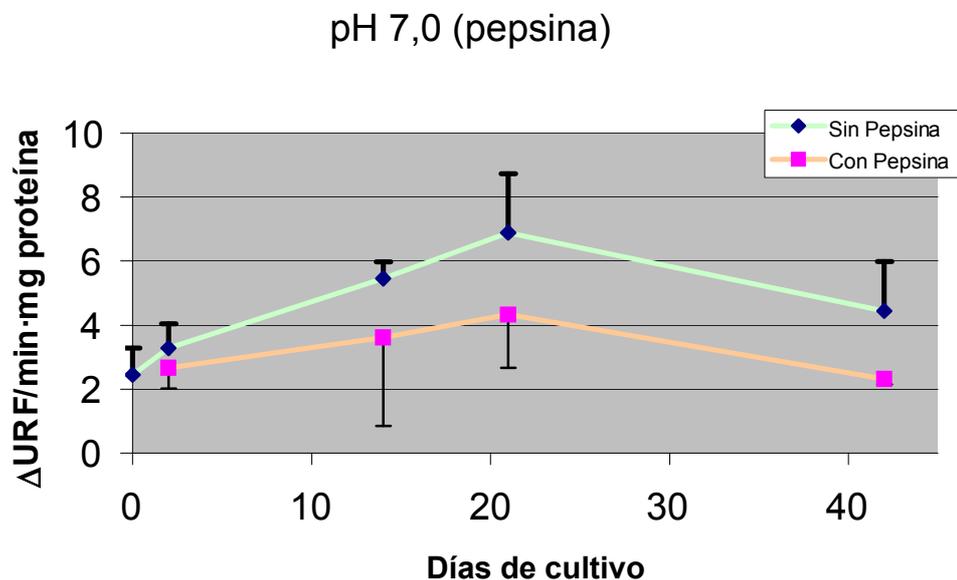
Figura R87. Actividad colagenasa (Δ URF/min·mg proteína) a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Aenz \pm ES	2,44 \pm 0,83	2,97 \pm 0,39	4,53 \pm 1,12	5,34 \pm 1,18	3,38 \pm 0,88

El pH 7,0 es el óptimo para la actividad enzimática de L4 y adulto. L5J presenta la máxima actividad, pero no se han encontrado diferencias significativas entre los estados de desarrollo (K-W, $p=0,078$).

Figura R88. Actividad colagenasa (Δ URF/min mg proteína) a pH 7,0 durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
Sin Pepsina	2,44 \pm 0,83	3,27 \pm 0,77	5,46 \pm 0,51	6,88 \pm 1,85	4,44 \pm 1,54
Con Pepsina	—	2,66 \pm 0,65	3,61 \pm 2,76	4,32 \pm 1,66	2,32 \pm 0,17

A pH 7,0 no existen diferencias significativas entre los parásitos cultivados con pepsina y sin ella (K-W, $p=0,286$). Se observa que la actividad máxima corresponde a la L5J cultivada sin pepsina, aunque no se han encontrado diferencias significativas dentro del grupo sin pepsina entre los estados de desarrollo (K-W, $p=0,131$), ni entre los cultivados con pepsina (K-W, $p=0,392$).

1.4.8. Resumen de los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I

Tabla R23. Actividad collagenasa (Δ URF/min mg proteína) durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función del pH y de la pepsina en cultivo, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-3 experimentos realizados en duplicado \pm ES.

pH	ESTADO DE DESARROLLO									
	L3 0h		L3 48h(2 días)		L4(14 días)		L5J(21 días)		L5(42 días)	
	Sin Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	
6,0	2,22 \pm 0,65	2,73 \pm 1,54	2,28 \pm 0,19	2,87 \pm 0,60	1,65 \pm 1,20	3,24 \pm 0,37	2,10 \pm 0,57	2,50 \pm 1,55	1,33 \pm 0,61	
6,5	2,94 \pm 0,41	6,00 \pm 3,51	3,68 \pm 0,64	4,88 \pm 0,76	3,36 \pm 0,76	5,89 \pm 1,20	3,32 \pm 1,04	4,04 \pm 1,41	2,06 \pm 0,20	
7,0	2,44 \pm 0,83	3,27 \pm 0,77	2,66 \pm 0,65	5,46 \pm 0,51	3,61 \pm 2,76	6,88 \pm 1,85	4,32 \pm 1,66	4,44 \pm 1,54	2,32 \pm 0,17	
7,5	2,25 \pm 0,35	2,94 \pm 0,83	2,06 \pm 0,22	4,74 \pm 0,33	3,07 \pm 2,84	5,02 \pm 0,77	3,21 \pm 1,05	3,83 \pm 0,83	1,84 \pm 0,06	
8,0	2,61 \pm 0,46	3,34 \pm 1,68	1,45 \pm 0,22	3,55 \pm 0,41	2,31 \pm 2,35	2,63 \pm 0,47	1,78 \pm 0,64	2,47 \pm 0,68	1,47 \pm 0,12	

1.4.9. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de la actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I

Variable	Contrastes	Aenz
		Significación
Estado (A2)		0,001*
	L3 0h (T) L3 48h	0,976
	L4	0,880
	L5J	0,004*
	L5	1,000
	L3 48h (T) L3 0h	0,976
	L4	1,000
	L5J	0,148
	L5	0,968
	L4 (T) L3 0h	0,880
	L3 48h	1,000
	L5J	0,833
	L5	0,858
	L5J (T) L3 0h	0,004*
	L3 48h	0,148
	L4	0,833
	L5	0,012*
	L5 (T) L3 0h	1,000
	L3 48h	0,968
	L4	0,858
	L5J	0,012*
Pepsina (A2)		<0,001*
Estado-Pepsina (A2)		0,363

Tabla R24. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de ANOVA 2 vías (A2) y las comparaciones múltiples *a posteriori* realizadas entre los “estados de desarrollo” mediante la prueba de la T2 de Tamhane (T). Estas pruebas se han realizado teniendo en cuenta todos los valores de actividad enzimática frente a DQ-colágeno tipo I en conjunto. El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Aenz L3 48h	Aenz L4	Aenz L5J	Aenz L5
	Significación (ANOVA 1 vía)			
Pepsina	0,059	0,035*	0,181	0,001*

Tabla R25. Valores “p” de significación de la prueba del ANOVA de 1 vía realizadas en los grupos de la variable “estado de desarrollo”. El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Contrastes	Aenz Sin Pepsina	Aenz Con Pepsina
		Significación	Significación
Estado (A1)		0,006*	0,034*
	L3 0h L3 48h	(B) 0,699	
	L4	(B) 0,021*	
	L5J	(B) 0,008*	
	L5	(B) 0,973	
	L3 48h L3 0h	(B) 0,699	(T) 1,000
	L4	(B) 1,000	(T) 0,186
	L5J	(B) 0,860	(T) 0,327
	L5	(B) 1,000	(T) 0,327
	L4 L3 0h	(B) 0,021*	(T) 1,000
	L3 48h	(B) 1,000	(T) 0,591
	L5J	(B) 1,000	(T) 0,944
	L5	(B) 1,000	(T) 0,944
	L5J L3 0h	(B) 0,008*	(T) 0,186
	L3 48h	(B) 0,860	(T) 0,591
	L4	(B) 1,000	(T) 0,005*
	L5	(B) 0,614	(T) 0,005*
	L5 L3 0h	(B) 0,973	(T) 0,327
	L3 48h	(B) 1,000	(T) 0,944
	L4	(B) 1,000	(T) 0,944
	L5J	(B) 0,614	(T) 0,005*

Tabla R26. Valores “p” de significación de la prueba del ANOVA 1 vía, realizadas en cada grupo de la variable “pepsina”, y las comparaciones múltiples *a posteriori* realizadas entre los “estados de desarrollo” mediante la prueba de Bonferroni (B) y la de la T2 de Tamhane (T). (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Contrastes	Aenz pH 6,5	Aenz pH 7,0
		Significación (ANOVA 2 vías)	Significación (K-W)
Estado		0,048*	0,078
	L3 0h L3 48h	(B) 1,000	
	L4	(B) 1,000	
	L5J	(B) 0,586	
	L5	(B) 1,000	
	L3 48h L3 0h	(B) 1,000	
	L4	(B) 1,000	
	L5J	(B) 1,000	
	L5	(B) 0,464	
	L4 L3 0h	(B) 1,000	
	L3 48h	(B) 1,000	
	L5J	(B) 1,000	
	L5	(B) 1,000	
	L5J L3 0h	(B) 0,586	
	L3 48h	(B) 1,000	
	L4	(B) 1,000	
	L5	(B) 0,204	
	L5 L3 0h	(B) 1,000	
	L3 48h	(B) 0,464	
	L4	(B) 1,000	
	L5J	(B) 0,204	
Pepsina		0,011*	0,286
Estado-Pepsina		0,860	

Tabla R27. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de Kruskal-Wallis y ANOVA de 2 vías realizadas en la variable “pH” a los valores 6,5 y 7,0. Las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los “estados de desarrollo” se han realizado mediante la prueba Bonferroni (B). El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Aenz pH 6,5 (Sin Pepsina)	Aenz pH 6,5 (Con Pepsina)	Aenz pH 7,0 (Sin Pepsina)	Aenz pH 7,0 (Con Pepsina)
	Significación (ANOVA 1 vía)	Significación (K-W)	Significación (K-W)	Significación (K-W)
Estado	0,381	0,139	0,131	0,392

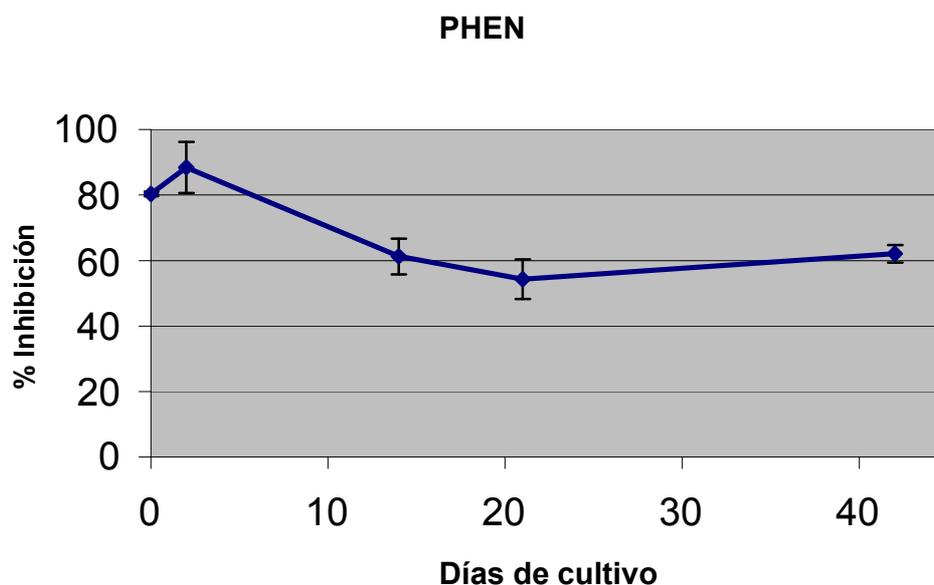
Tabla R28. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de Kruskal-Wallis y ANOVA de 1 vía para la variable “estado de desarrollo” realizadas en los grupos de la variable “pepsina” y “pH” (a 6,5 y 7,0). El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

1.5. Inhibición de la actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I mediante inhibidores específicos durante el desarrollo de *H. aduncum*

A continuación se muestran los valores de inhibición de la actividad colagenasa con DQ-colágeno tipo I como sustrato, mediante inhibidores específicos. Los valores de inhibición están expresados en porcentaje de inhibición \pm ES con respecto a la actividad sin inhibidor.

1.5.1. 1,10-fenantrolina

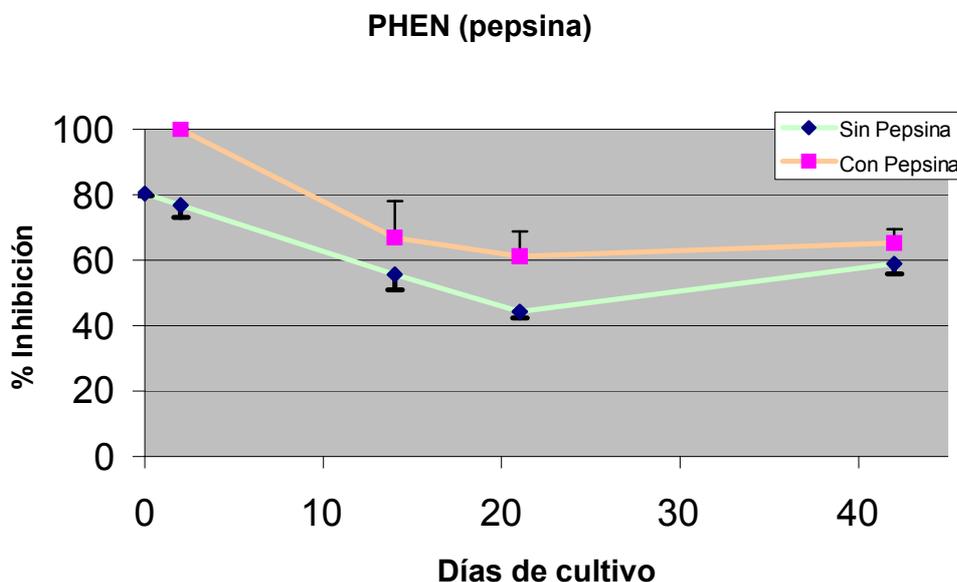
Figura R89. Porcentaje de inhibición de la actividad colagenasa a pH óptimo (6,5 en L3 y 7,0 en L4 y adulto) durante el desarrollo de *H. aduncum*, empleando como sustrato DQ-colágeno (25 μ g/ml), y como inhibidor 1,10-fenantrolina. Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición \pm ES	80,31 \pm 0,68	88,41 \pm 7,83	61,24 \pm 5,50	54,32 \pm 6,05	62,03 \pm 2,74

La mayor inhibición es en L3 48h, y luego baja, manteniéndose en torno al 60% para los siguientes estados de desarrollo. En conjunto existen diferencias significativas entre los estados de desarrollo (ANOVA 2 vías, $p < 0,001$). La L3 presenta la mayor actividad metaloproteasa (PHEN), hallándose diferencias significativas mediante los contrastes *a posteriori* realizados con la prueba de Bonferroni (L3 0h > L5 $p = 0,009$; L3 48h > L4 $p = 0,006$; L3 48h > L5J $p < 0,001$; L3 48h > L5 $p = 0,009$).

Figura R90. Porcentaje de inhibición de la actividad colagenasa a pH óptimo (6,5 en L3 y 7,0 en L4 y adulto) durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato DQ-colágeno (25 µg/ml), y como inhibidor 1,10-fenantrolina. Cada dato es la media de 2-3 experimentos realizados en duplicado ± ES.

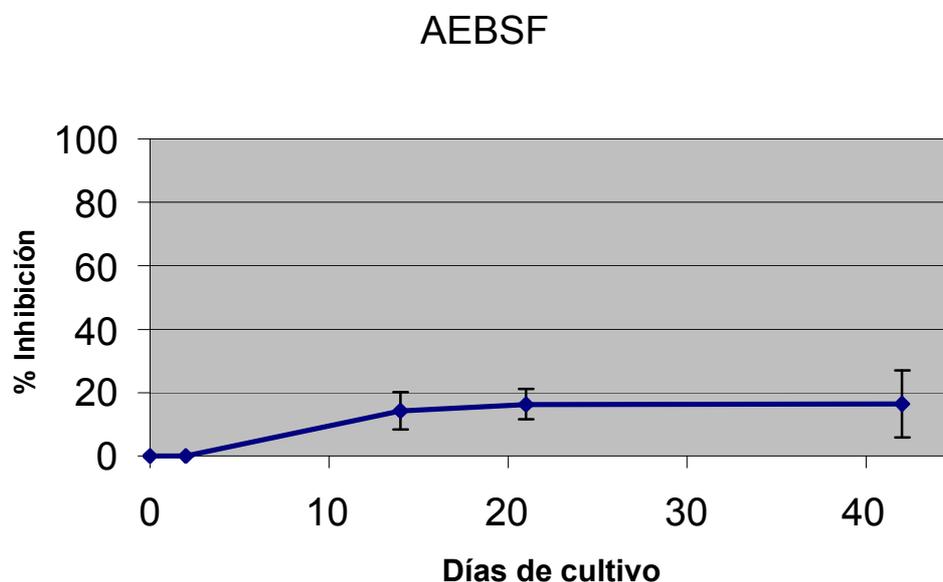


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	80,31±0,68	76,83±3,84	55,62±4,72	44,20±1,98	58,87±3,09
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	100,00±0,00	66,86±11,13	61,06±7,76	65,20±4,22

Se observa que la inhibición es total en L3 48h cultivada con pepsina, y luego baja para los siguientes estados de desarrollo. Existen diferencias significativas entre los estados de desarrollo cultivados con pepsina (ANOVA 1 vía, $p=0,043$), sin embargo en los contrastes *a posteriori* no se han hallado diferencias. En cambio para los cultivados sin pepsina la inhibición es significativamente menor (ANOVA 2 vías, $p=0,002$), aunque presenta el mismo perfil. También existen diferencias significativas entre los distintos estados de desarrollo sin pepsina (ANOVA 1 vía, $p<0,001$), observándose que L3 presenta la mayor inhibición. Al realizar los contrastes *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni se observan diferencias significativas de las L3 con el resto de los estados de desarrollo (L3 0h>L4 $p=0,010$; L3 0h>L5J $p=0,001$; L3 0h>L5 $p=0,022$; L3 48h>L4 $p=0,018$; L3 48h>L5J $p=0,002$; L3 48h>L5 $p=0,043$; L5>L5J $p=0,032$).

1.5.2. AEBSF

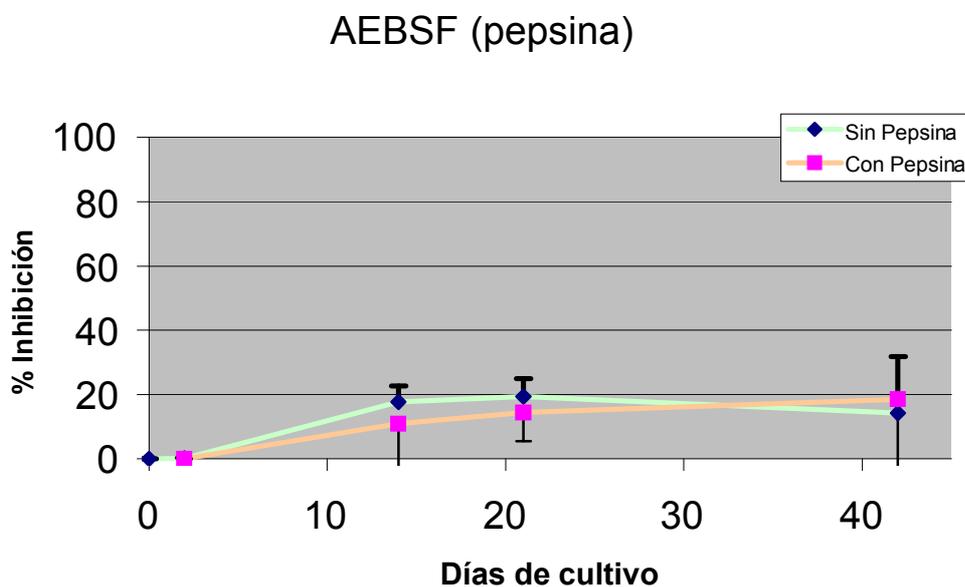
Figura R91. Porcentaje de inhibición de la actividad colagenasa a pH óptimo (6,5 en L3 y 7,0 en L4 y adulto) durante el desarrollo de *H. aduncum*, empleando como sustrato DQ-colágeno (25 µg/ml), y como inhibidor AEBSF. Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado ± ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES	0,00±0,00	0,07±0,09	14,29±5,87	16,34±4,85	16,39±10,58

Se observa que la inhibición es nula en L3, y luego sube hasta el 16% para los siguientes estados de desarrollo, existiendo diferencias significativas entre ellos (K-W, $p=0,134$).

Figura R92. Porcentaje de inhibición de la actividad colagenasa a pH óptimo (6,5 en L3 y 7,0 en L4 y adulto) durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato DQ-colágeno (25 µg/ml), mediante el uso de AEBSF como inhibidor. Cada dato es la media de 2-3 experimentos realizados en duplicado ± ES.



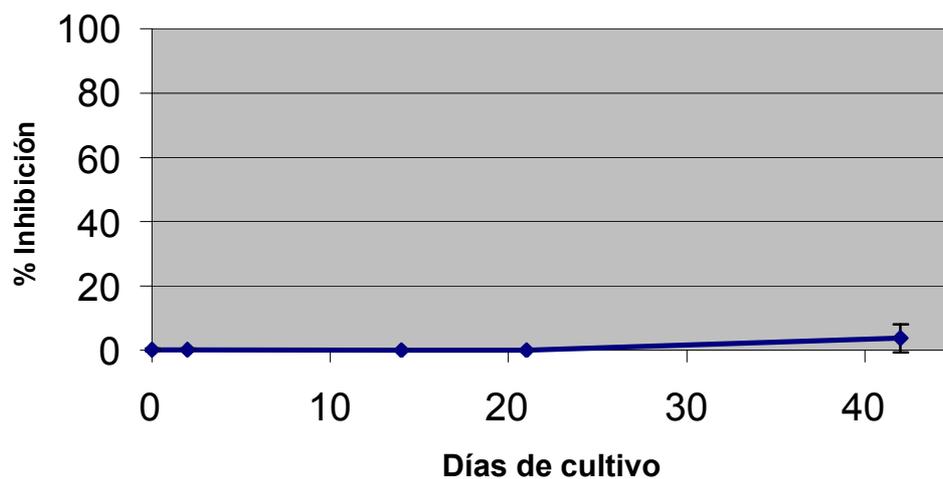
Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	0,00±0,00	0,15±0,21	17,66±5,11	19,36±5,66	14,29±17,49
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	0,00±0,00	10,92±15,45	14,33±8,86	18,49±26,16

No existen diferencias significativas entre los parásitos cultivados con pepsina o sin ella (K-W, $p=0,703$).

1.5.3. E64

Figura R93. Porcentaje de inhibición de la actividad colagenasa a pH óptimo (6,5 en L3 y 7,0 en L4 y adulto) durante el desarrollo de *H. aduncum*, empleando como sustrato DQ-colágeno (25 µg/ml), y como inhibidor E64. Cada dato es la media de 2-5 experimentos realizados en duplicado ± ES.

E-64

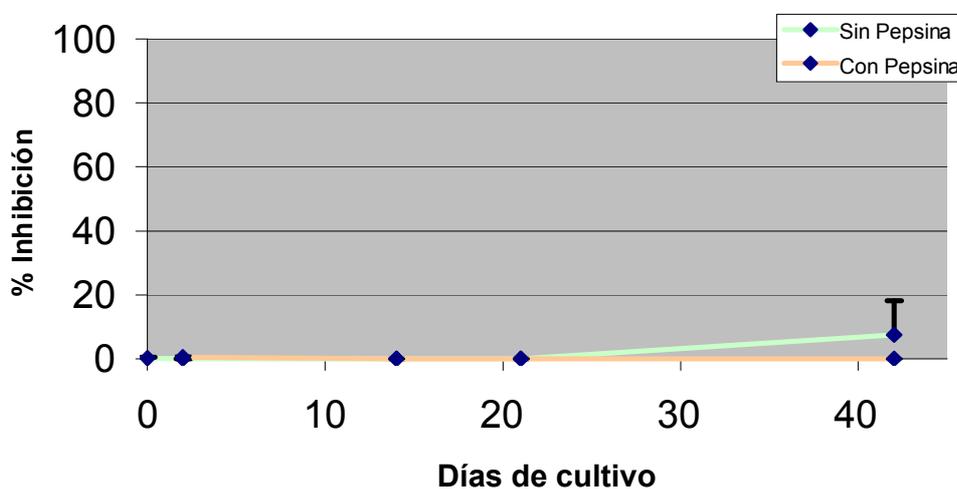


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES	0,23±0,33	0,21±0,24	0,00±0,00	0,00±0,00	3,75±4,33

La inhibición es prácticamente nula salvo en L5, que es muy ligera. No existen diferencias significativas entre los distintos estados de desarrollo (K-W, $p=0,493$).

Figura R94. Porcentaje de inhibición de la actividad colagenasa a pH óptimo (6,5 en L3 y 7,0 en L4 y adulto) durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato DQ-colágeno (25 µg/ml), mediante el uso de E64 como inhibidor. Cada dato es la media de 2-3 experimentos realizados en duplicado ± ES.

E-64 (pepsina)



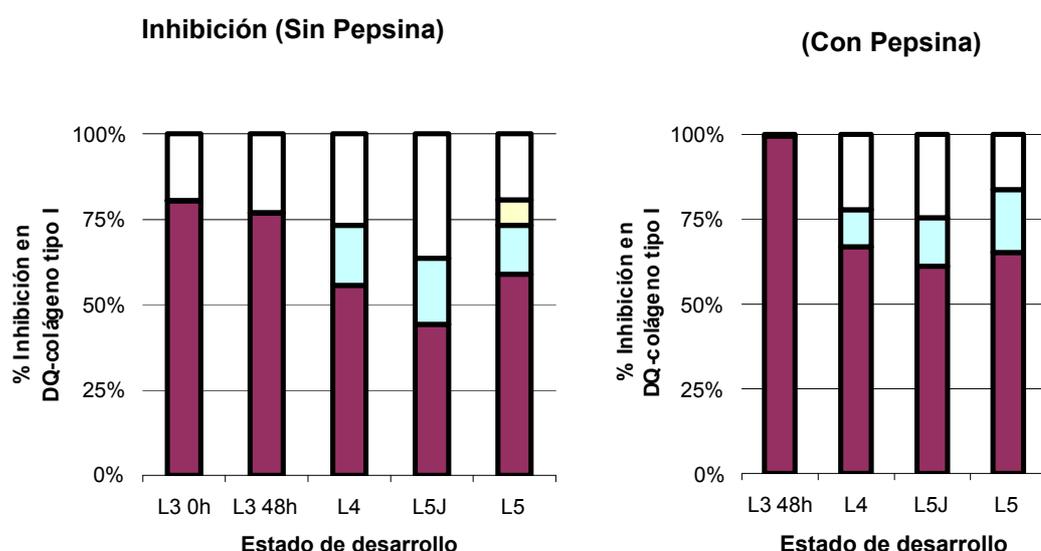
Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
% Inhibición ± ES (Sin Pepsina)	0,23±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	7,50±10,61
% Inhibición ± ES (Con Pepsina)	—	0,42±0,60	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

No existen diferencias significativas entre los parásitos cultivados con pepsina y sin pepsina (K-W, $p=0,607$).

1.5.4. Inhibición acumulada de cada tipo de actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I a lo largo del desarrollo de *H. aduncum*

En esta sección se representan los datos de los apartados anteriores (ver apartados V 1.5.1.-V 1.5.3.) acumulados.

Figura R95. Porcentajes acumulados de los distintos tipos de inhibición de la actividad colagenasa a pH óptimo (6,5 en L3 y 7,0 en L4 y adulto) durante el desarrollo de *H. aduncum*, en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 µg/ml). Cada dato es la media de 2-3 experimentos realizados en duplicado.

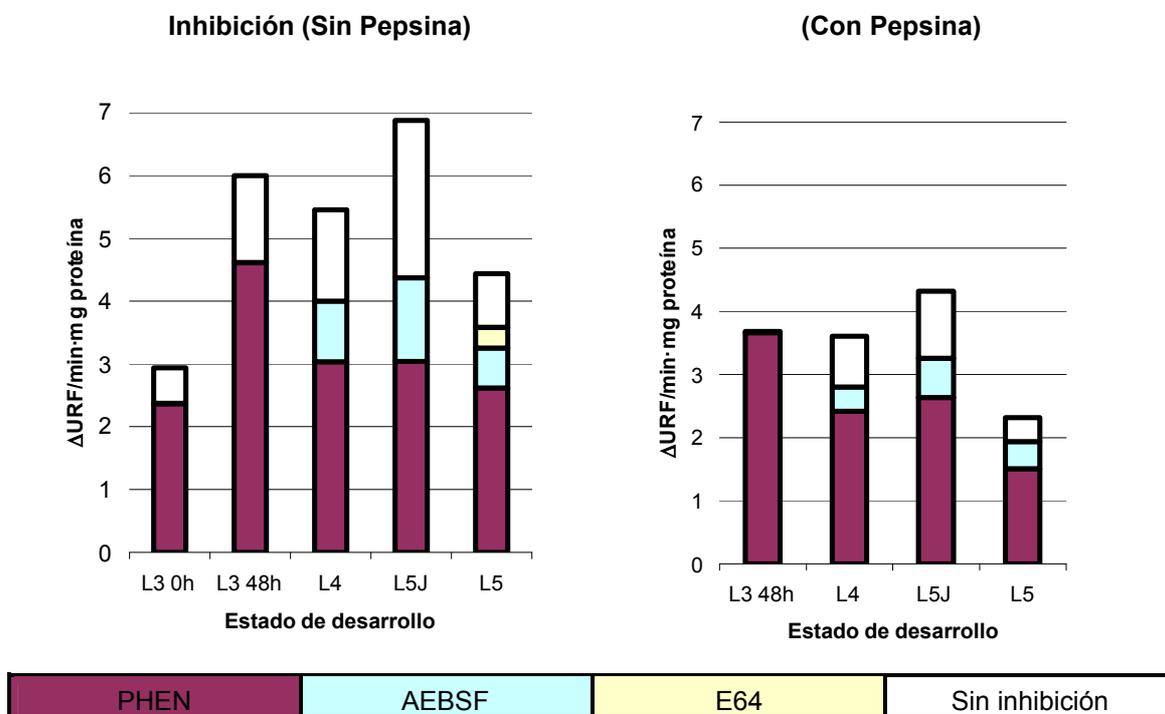


PHEN	AEBSF	E64	Sin inhibición
------	-------	-----	----------------

% Aenz inhibida		L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (14 días)	L5J (21 días)	L5 (42 días)
PHEN	Sin Pepsina	80,31	76,83	55,62	44,20	58,87
	Con Pepsina	—	100,00	66,86	61,06	65,20
AEBSF	Sin Pepsina	0,00	0,15	17,66	19,36	14,29
	Con Pepsina	—	0,00	10,92	14,33	18,49
E64	Sin Pepsina	0,23	0,00	0,00	0,00	7,50
	Con Pepsina	—	0,42	0,00	0,00	0,00
Aenz no inhibida	Sin Pepsina	19,46	23,02	26,72	36,44	19,34
	Con Pepsina	—	0,00	22,22	24,61	16,31

Se observa que L3 es el estado en el que la actividad metaloproteasa (inhibida por PHEN) tiene mayor peso, siendo >75%. En los otros estadios se completa con actividad tipo serín proteasa (inhibida por AEBSF).

Figura R96. Contribución de cada tipo de colagenasa según el porcentaje de inhibición medido, a la actividad (Δ URF/min·mg proteína) colagenolítica durante el desarrollo de *H. aduncum* a pH óptimo (6,5 en L3 y 7,0 en L4 y adulto), en función de la pepsina en el cultivo *in vitro*, empleando como sustrato DQ-colágeno tipo I (25 μ g/ml). Cada dato es la media de 2-3 experimentos realizados en duplicado.



La Aenz más alta se corresponde con L5J, y la principal actividad es de tipo metaloproteasa (inhibida por PHEN), en ambos grupos. En L4 y el adulto existe también algo de actividad serín proteasa (inhibida por AEBSF), siendo irrelevante la actividad proteasa de tipo cisteínico (inhibida por E64).

1.5.5. Resumen de los datos obtenidos de inhibición de la actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I

Tabla R29. Porcentaje de inhibición de la actividad colagenasa empleando DQ-colágeno tipo I (15 µg/ml) como sustrato, mediante el uso de inhibidores específicos, durante el desarrollo de *H. aduncum*, y en función de la pepsina en cultivo. Cada dato es la media de 2-3 experimentos realizados en duplicado ± ES.

ESTADO DE DESARROLLO										
Inhibidor	L3 0h		L3 48h(2 días)		L4(14 días)		L5J(21 días)		L5(42 días)	
	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina	Sin Pepsina	Con Pepsina
PHEN	80,31 ±0,68	76,83 ±3,84	100,00 ±0,00	55,62 ±4,72	66,86 ±11,13	44,20 ±1,98	61,06 ±7,76	58,87 ±3,09	65,20 ±4,22	
AEBSF	0,00 ±0,00	0,15 ±0,21	0,00 ±0,00	17,66 ±5,11	10,92 ±15,45	19,36 ±5,66	14,33 ±8,86	14,29 ±17,49	18,49 ±26,16	
E64	0,23 ±0,33	0,00 ±0,0	0,42 ±0,60	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,0	7,50 ±10,61	0,00 ±0,00	

1.5.6. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de inhibición de la actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I

Variable	Inhibidor	Inhibición L3 48h	Inhibición L4	Inhibición L5J	Inhibición L5
		Significación (K-W)	Significación (K-W)	Significación (K-W)	Significación (K-W)
Pepsina	PHEN	0,102	0,121	0,083	0,121
	AEBSF	0,317	1,000	0,564	1,000
	E64	0,317	1,000	1,000	0,317

Tabla R30. Valores “p” de significación de las distintas pruebas de Kruskal-Wallis realizadas en los grupos de la variable “estado de desarrollo” para cada inhibidor. El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

		PHEN	AEBSF	E64	
Variable	Contrastes	Significación	Significación	Significación	
Estado		(A2) <0,001*	(K) 0,134	(K) 0,493	
	L3 0h	L3 48h	(B) 1,000		
		L4	(B) 0,117		
		L5J	(B) 0,009*		
		L5	(B) 0,168		
	L3 48h	L3 0h	(B) 1,000		
		L4	(B) 0,006*		
		L5J	(B) <0,001*		
		L5	(B) 0,009*		
	L4	L3 0h	(B) 0,117		
		L3 48h	(B) 0,006*		
		L5J	(B) 0,942		
		L5	(B) 1,000		
	L5J	L3 0h	(B) 0,009*		
		L3 48h	(B) <0,001*		
		L4	(B) 0,942		
		L5	(B) 0,597		
	L5	L3 0h	(B) 0,168		
L3 48h		(B) 0,009*			
L4		(B) 1,000			
L5J		(B) 0,597			
Pepsina		(A2) 0,002*	(K) 0,703	(K) 0,607	
Estado-Pepsina		(A2) 0,499			

Tabla R31. Valores “p” de significación de las distintas pruebas Kruskal-Wallis (K) y ANOVA de 2 vías (A2) realizadas a los grupos de los inhibidores PHEN, AEBSF y E64. Las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los “estados de desarrollo” se han realizado mediante la prueba Bonferroni (B). El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

Variable	Contrastes	PHEN (Sin Pepsina)	PHEN (Con Pepsina)	
		Significación	Significación	
Estado(A1)		<0,001*	0,043*	
	L3 0h (B)	L3 48h	1,000	
		L4	0,010*	
		L5J	0,001*	
		L5	0,022*	
	L3 48h (B)	L3 0h	1,000	
		L4	0,018*	0,189
		L5J	0,002*	0,062
		L5	0,043*	0,161
	L4 (B)	L3 0h	0,010*	
		L3 48h	0,018*	0,189
		L5J	0,082	1,000
		L5	1,000	1,000
	L5J (B)	L3 0h	0,001*	
		L3 48h	0,002*	0,062
		L4	0,082	1,000
		L5	0,032*	1,000
	L5 (B)	L3 0h	0,022*	
		L3 48h	0,043*	0,161
		L4	1,000	1,000
L5J		0,032*	1,000	

Tabla R32. Valores “p” de significación de las pruebas del ANOVA de 1 vía (A1) realizadas a los grupos PHEN sin pepsina y PHEN con pepsina. Las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los “estados de desarrollo” se han realizado mediante la prueba Bonferroni (B). El nivel de significación es de 0,05. (*) Valores significativos estadísticamente.

1.6. Electroforesis (zimograma de enzimas proteolíticas)

La electroforesis (zimograma) se realizó sobre una muestra de L3 0h de *H. aduncum* no desnaturalizada (ver sección de IV 4.6.). Cuando la incubación para la lisis de la gelatina por las enzimas proteolíticas existentes en el extracto fue de 6,5 horas, las bandas fueron más visibles que cuando se prolongó el tiempo de incubación hasta 18 horas. Se observan 3 bandas.

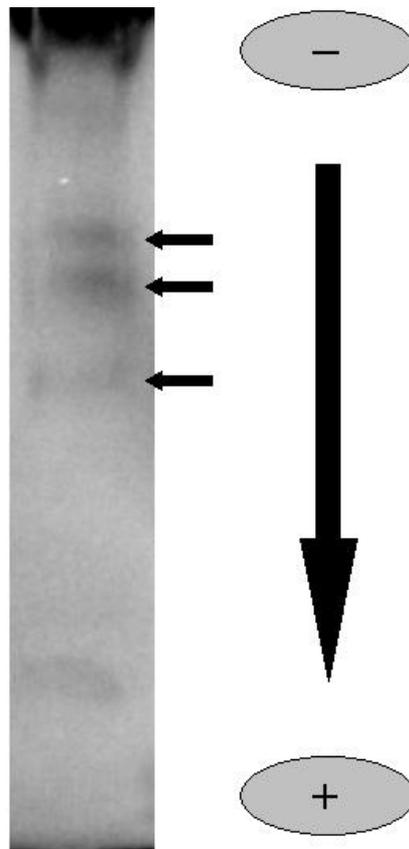


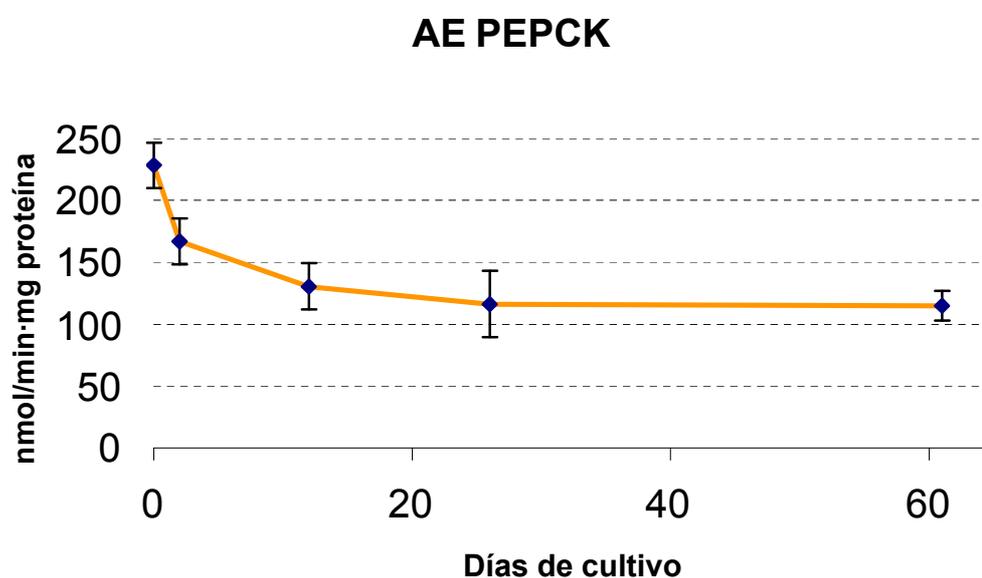
Figura R97. Zimograma (en negativo) realizado en gel de poliacrilamida (7%) copolimerizada con gelatina (0,125%) de un extracto de L3 0h de *H. aduncum* sin desnaturalizar, incubado 6,5 h para la lisis de la gelatina, a pH 7,0 y a 37 °C, y revelado con Azul Coomassie.

2. FIJACIÓN DE CO₂ DURANTE EL DESARROLLO DE *Hysterothylacium aduncum*

A continuación se muestra la actividad específica de cada una de las enzimas expresada como AE ± ES (en nanomoles de sustrato transformado por min y mg de proteína).

2.1. PEPCK (EC: 4.1.1.49)

Figura R98. Actividad específica (AE) de PEPCK en *H. aduncum* durante su desarrollo *in vitro*. Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en triplicado ± ES.

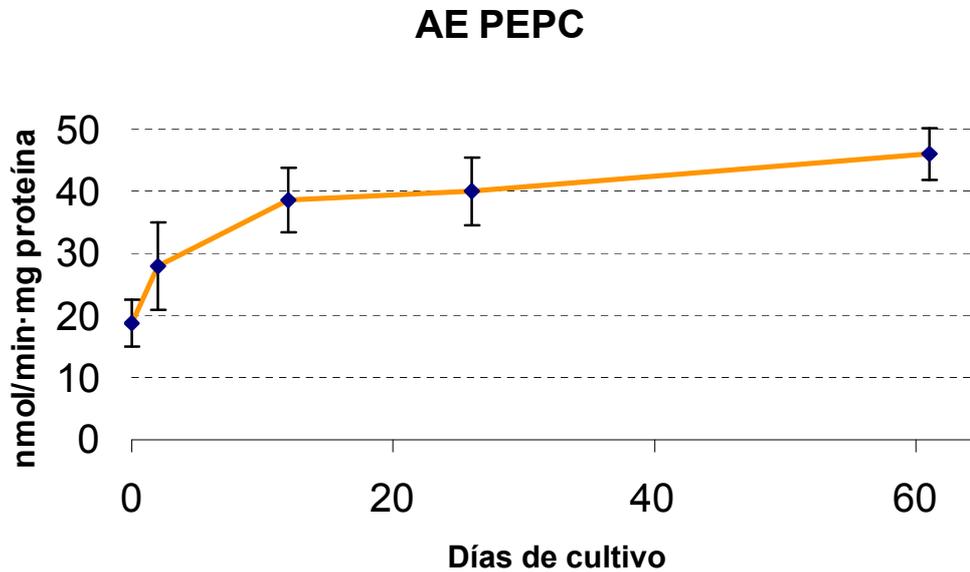


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (12 días)	L5J (26 días)	L5 (61 días)
AE ± ES	228,3 ± 18,2	167,1 ± 18,6	130,6 ± 18,8	116,4 ± 26,8	114,9 ± 11,9

Existen diferencias significativas entre las AE la PEPCK, en sentido carboxilante, de los distintos estados de desarrollo estudiados (ANOVA 1 vía, $p=0,001$). La actividad máxima corresponde a la L3 0h (diferencias significativas encontradas en los contrastes *a posteriori* realizados mediante la prueba de Bonferroni: L3 0h>L4 $p=0,011$; L3 0h>L5J $p=0,004$; L3 0h>L5 $p=0,002$).

2.2. PEPC (EC: 4.1.1.31)

Figura R99. Actividad específica (AE) de PEPC en *H. aduncum* durante su desarrollo *in vitro*. Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en triplicado \pm ES.

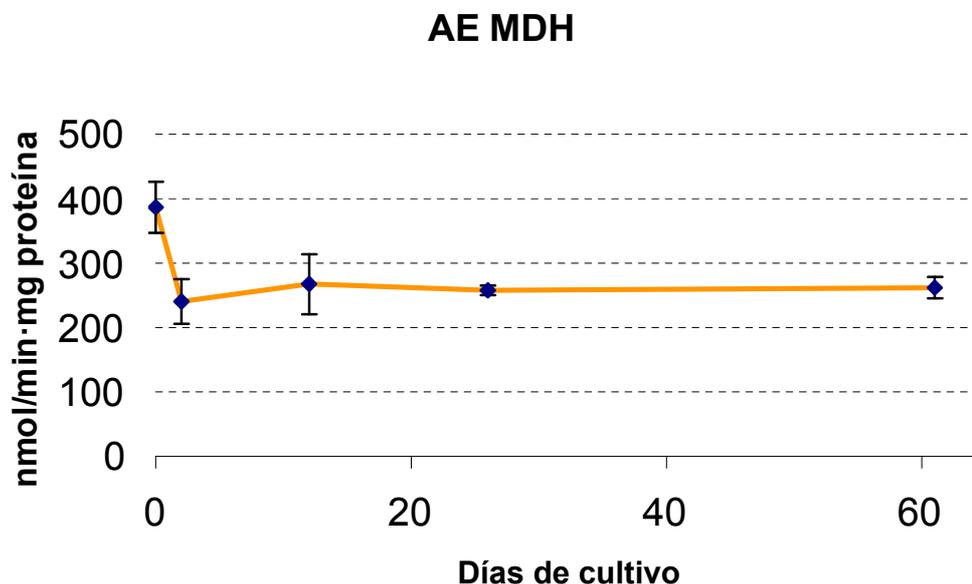


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (12 días)	L5J (26 días)	L5 (61 días)
AE \pm ES	18,8 \pm 3,8	27,9 \pm 7,0	38,6 \pm 5,2	39,9 \pm 5,4	46,0 \pm 4,1

Existen diferencias significativas entre las AE de los distintos estados de desarrollo (ANOVA 1 vía, $p=0,010$). Se observa que la actividad máxima corresponde al adulto (L5) (diferencias significativas halladas en los contrastes realizados *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni: sólo en L5>L3 0h $p=0,015$); aumenta rápidamente desde L3 0h hasta L4, y prosigue aumentando gradualmente hasta adulto.

2.3. MDH (EC: 1.1.1.37)

Figura R100. Actividad específica (AE) de MDH en *H. aduncum* durante su desarrollo *in vitro*. Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en triplicado \pm ES.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (12 días)	L5J (26 días)	L5 (61 días)
AE \pm ES	386,9 \pm 39,8	240,4 \pm 34,5	267,6 \pm 46,6	257,8 \pm 7,4	262,1 \pm 16,6

Como se puede observar la actividad máxima, en sentido reductor, corresponde a la L3 0h, y desciende rápidamente a L3 48h, permaneciendo estable a partir de ahí hasta adulto. No hay diferencias significativas entre los distintos estados de desarrollo (ANOVA 1 vía, $p=0,173$).

2.4. EM (EC: 1.1.1.39)

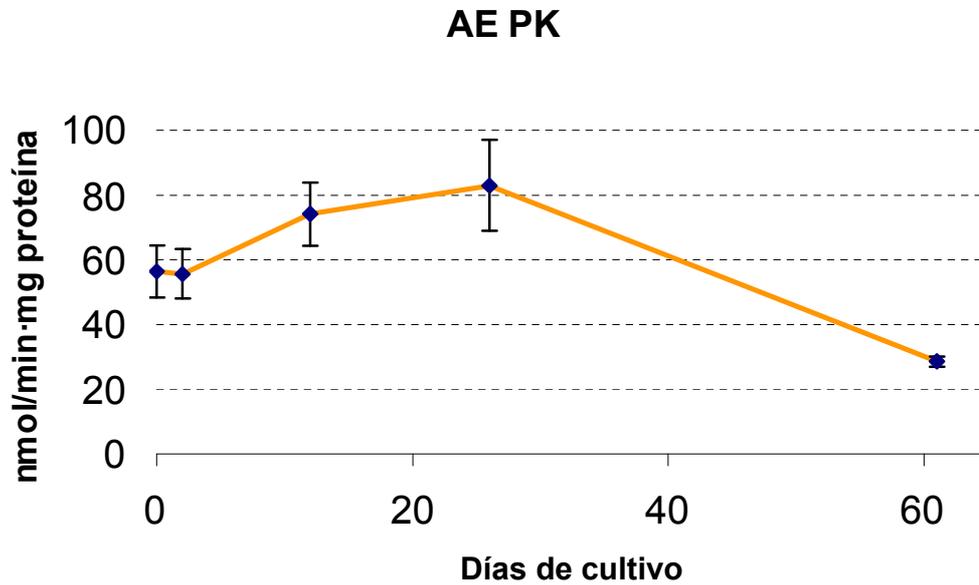
No se detectó actividad EM en sentido carboxilante para ningún estado de desarrollo, en nuestras condiciones experimentales.

2.5. PC (EC: 6.4.1.1)

No se detectó actividad PC en sentido carboxilante para ningún estado de desarrollo, en nuestras condiciones experimentales.

2.6. PK (EC: 2.7.1.40)

Figura R101. Actividad específica (AE) de PK en *H. aduncum* durante su desarrollo *in vitro*. Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en triplicado \pm ES.

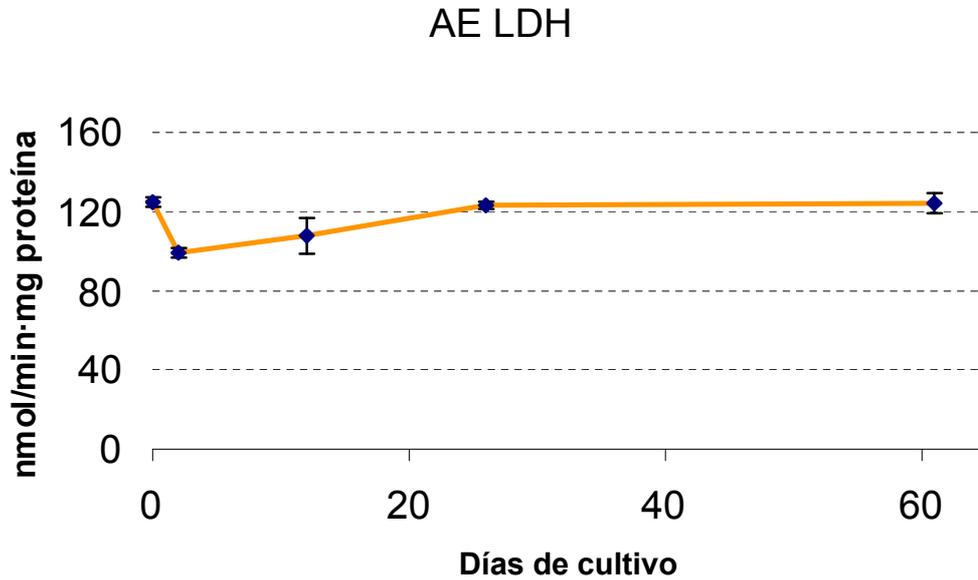


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (12 días)	L5J (26 días)	L5 (61 días)
AE \pm ES	56,4 \pm 8,1	55,7 \pm 7,7	74,1 \pm 9,8	82,0 \pm 14,0	28,6 \pm 1,6

Existen diferencias significativas entre las AE de los estados de desarrollo estudiados (ANOVA 1 vía, $p=0,003$). La actividad aumenta desde L3 0h hasta la L5J, que presenta la máxima actividad, y desciende hasta su nivel más bajo con el adulto maduro (L5) (diferencias significativas en los contrastes realizados *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni: L5<L4 $p=0,007$; L5<L5J $p=0,004$).

2.7. LDH (EC: 1.1.1.27)

Figura R102. Actividad específica (AE) de PK en *H. aduncum* durante su desarrollo *in vitro*. Cada dato es la media de 3 experimentos realizados en triplicado \pm ES.

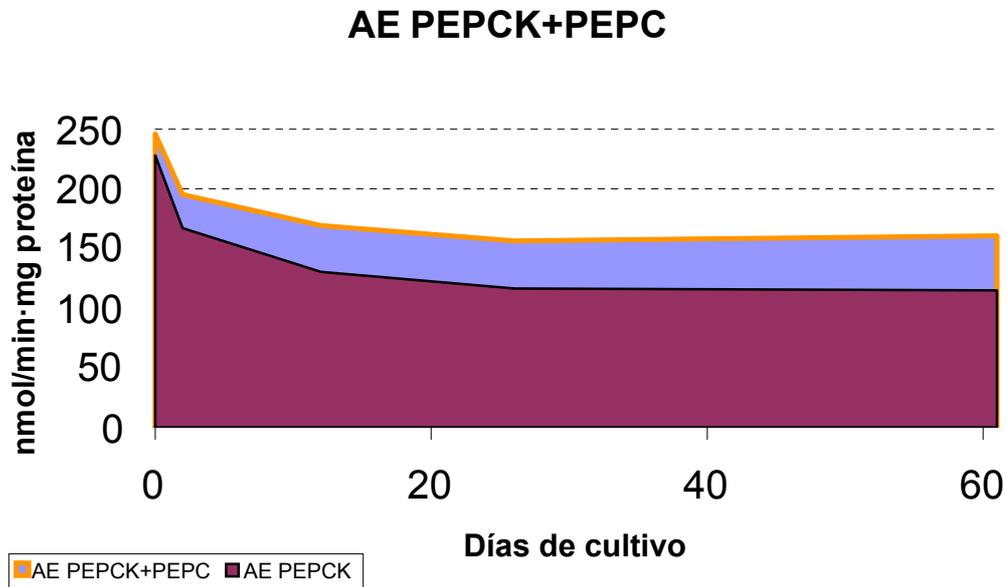


Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (12 días)	L5J (26 días)	L5 (61 días)
AE \pm ES	124,7 \pm 2,4	99,2 \pm 2,4	107,7 \pm 9,0	123,1 \pm 1,8	124,2 \pm 5,1

Existen diferencias significativas entre la AE de los distintos estados de desarrollo (ANOVA 1 vía, $p=0,010$). La actividad desciende al mínimo en L3 48h tras empezar el cultivo (diferencias significativas en los contrastes *a posteriori* de la prueba de Bonferroni: L3 48h < L3 0h $p=0,031$; L3 48h < L5 $p=0,023$), y vuelve al mismo nivel aumentando progresivamente hasta adulto juvenil, manteniéndose a partir de ahí.

2.8. Fijación de CO₂ MEDIDA

Figura R103. Suma de las AE de PEPCK y PEPC en *H. aduncum* durante su desarrollo *in vitro*.



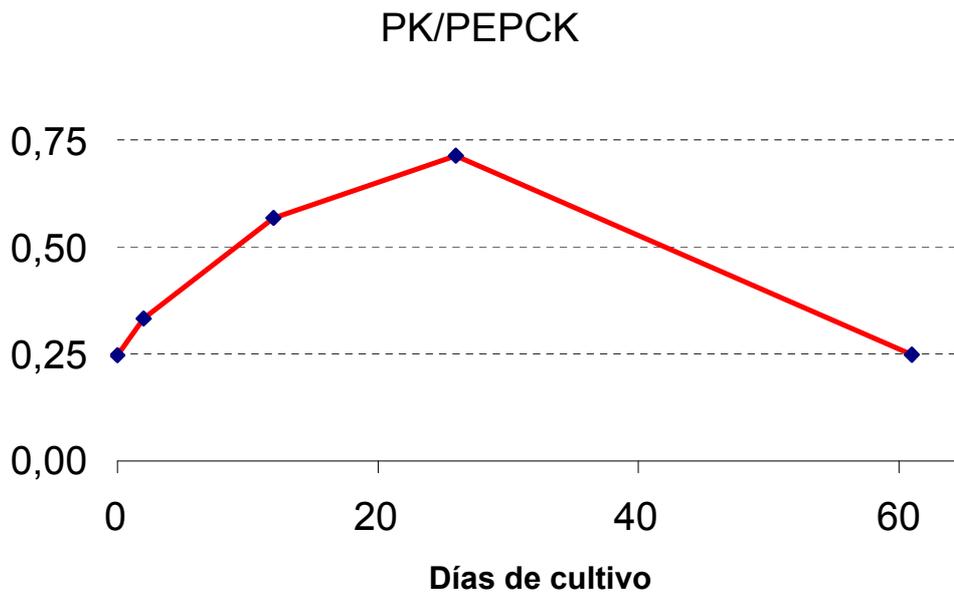
Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (12 días)	L5J (26 días)	L5 (61 días)
AE	245,9	195,0	169,1	156,3	160,8

En esta figura se representa la fijación de CO₂ como suma de las actividades de las enzimas carboxilantes detectadas (PEPCK y PEPC). El patrón de la suma de ambas AE es muy similar al presentado por la PEPCK, que es la enzima que más peso tiene en la fijación. La relación PEPCK/PEPC varía desde 24:2 en L3 0h a 5:2 en L5. La fijación es más elevada en la L3 0h y baja progresivamente hasta el adulto donde se mantiene constante.

2.9. Relación PK/PEPCK

Según Barret (Barrett 1981a), la relación de actividades enzimáticas PK/PEPCK medidas bajo condiciones óptimas, es indicativa de la predominancia del metabolismo glucolítico (relación = [2-10]) o de la fijación de CO₂ (relación = [0,01-0,5]) en los helmintos parásitos.

Figura R104. Relación entre PK y PEPCK, durante el desarrollo *in vitro* de *H. aduncum*.



Estados de desarrollo	L3 0h (0 días)	L3 48h (2 días)	L4 (12 días)	L5J (26 días)	L5 (61 días)
PK/PEPCK	0,25	0,33	0,57	0,71	0,25

En esta gráfica se representa la relación PK/PEPCK a lo largo del desarrollo de *H. aduncum*. Se observa una relación máxima hacia la mitad del tiempo de desarrollo (L5J), siendo mínima al principio (L3 0h) y al final (L5) del mismo.

2.10. Resumen de los datos de AE obtenidos de enzimas relacionadas con la fijación de CO₂

	ESTADO DE DESARROLLO				
	L3 0h(0 días)	L3 48h(2 días)	L4(14 días)	L5J(21 días)	L5(42 días)
PEPCK	228,3 ± 18,2	167,1 ± 18,6	130,6 ± 18,8	116,4 ± 26,8	114,9 ± 11,9
PEPC	18,8 ± 3,8	27,9 ± 7,0	38,6 ± 5,2	39,9 ± 5,4	46,0 ± 4,1
MDH	386,9 ± 39,8	240,4 ± 34,5	267,6 ± 46,6	257,8 ± 7,4	262,1 ± 16,6
EM	no detectada	no detectada	no detectada	no detectada	no detectada
PC	no detectada	no detectada	no detectada	no detectada	no detectada
PK	56,4 ± 8,1	55,7 ± 7,7	74,1 ± 9,8	82,0 ± 14,0	28,6 ± 1,6
LDH	124,7 ± 2,4	99,2 ± 2,4	107,7 ± 9,0	123,1 ± 1,8	124,2 ± 5,1
PEPCK+PEPC	245,9	195,0	169,1	156,3	160,8
PK/PEPCK	0,25	0,33	0,57	0,71	0,25

Tabla R33. Valores medios de AE de todas las enzimas relacionadas con la fijación de CO₂ medidas, durante el desarrollo *in vitro* de *H. aduncum*.

2.11. Resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos de AE de las enzimas relacionadas con la fijación de CO₂

		PEPCK: ANOVA 1 p=0,001*	PEPC: ANOVA 1 p=0,010*	MDH: ANOVA 1 p=0,173	PK: ANOVA 1 p=0,003*	LDH: ANOVA 1 p=0,010*
Estado (contrastes)		Significación	Significación		Significación	Significación
L3 0h	L3 48h	(B) 0,193	(B) 1,000		(B) 1,000	(B) 0,031*
	L4	(B) 0,011*	(B) 0,111		(B) 0,798	(B) 0,403
	L5J	(B) 0,004*	(B) 0,051		(B) 0,265	(B) 1,000
	L5	(B) 0,002*	(B) 0,015*		(B) 0,127	(B) 1,000
L3 48h	L3 0h	(B) 0,193	(B) 1,000		(B) 1,000	(B) 0,031*
	L4	(B) 1,000	(B) 1,000		(B) 0,699	(B) 1,000
	L5J	(B) 0,448	(B) 0,730		(B) 0,235	(B) 0,084
	L5	(B) 0,299	(B) 0,179		(B) 0,144	(B) 0,023*
L4	L3 0h	(B) 0,011*	(B) 0,111		(B) 0,798	(B) 0,403
	L3 48h	(B) 1,000	(B) 1,000		(B) 0,699	(B) 1,000
	L5J	(B) 1,000	(B) 1,000		(B) 1,000	(B) 0,794
	L5	(B) 1,000	(B) 1,000		(B) 0,007*	(B) 0,371
L5J	L3 0h	(B) 0,004*	(B) 0,051		(B) 0,265	(B) 1,000
	L3 48h	(B) 0,448	(B) 0,730		(B) 0,235	(B) 0,084
	L4	(B) 1,000	(B) 1,000		(B) 1,000	(B) 0,794
	L5	(B) 1,000	(B) 1,000		(B) 0,004*	(B) 1,000
L5	L3 0h	(B) 0,002*	(B) 0,015*		(B) 0,127	(B) 1,000
	L3 48h	(B) 0,299	(B) 0,179		(B) 0,144	(B) 0,023*
	L4	(B) 1,000	(B) 1,000		(B) 0,007*	(B) 0,371
	L5J	(B) 1,000	(B) 1,000		(B) 0,004*	(B) 1,000

Tabla R34. Valores “p” de significación de los ANOVA 1 vía y las comparaciones múltiples *a posteriori* realizadas mediante la prueba de Bonferroni (B), basadas en las medias observadas. El nivel de significación es de 0,05. Como en MDH no hay diferencias significativas con el ANOVA 1 vía, no se han hecho los contrastes *a posteriori*. (*) Valores significativos estadísticamente.

VI. *DISCUSIÓN*

1. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DURANTE EL DESARROLLO DE *Hysterothylacium aduncum*

1.1. Actividad proteolítica general

Además del CO₂, existen otros estímulos en el ambiente de cultivo que afectan al parásito, como son la temperatura, el pH y el potencial redox del medio (Rogers 1961; Rogers 1962; Rogers y Sommerville 1968; Sommerville y Davey 1976). Con respecto a *Hysterothylacium aduncum* está demostrado que en el medio de cultivo RPMI 1640 + 20% SBF1 se desarrolla mejor a pH 4,0, aunque su desarrollo puede completarse también a pH 7,2. Cuando se añade una proteasa digestiva al medio de cultivo, el desarrollo mejora a pH 4,0 con pepsina que a pH 7,2 con tripsina (Iglesias et al., 2002). Pues bien, en las curvas de pH óptimo para proteasas realizadas con un sustrato inespecífico y general para todas las proteasas, BODIPY TR-X caseína, se observa que los óptimos de actividad están en los pH 5,5 y 4,0, siendo el primero en el que se observa más actividad en todos los estados de desarrollo del parásito (figuras R1-R9), excepto en la larva 3 recién aislada del pez hospedador (L3 0h), en la que es a pH 4,0 (figura R1). Es muy interesante, pues, que esta actividad, que es de tipo metaloproteasa, aparezca sólo en L3 0h (figuras R26, R46, R47), y que su pH óptimo sea 4,0, ya que éste está próximo al que se va a encontrar la L3 al llegar al estómago del pez hospedador, ya sea intermediario/paraténico o definitivo. En el pez, como también ocurre en otros vertebrados, el pH de las diferentes regiones del tracto gastrointestinal va desde un pH ácido en el estómago (pH ≈ 3,0), pasando por un pH neutro en los ciegos pilóricos (pH ≈ 7,0) a un pH creciente y progresivamente más alcalino (pH ≈ 7,8 - 8,5) a lo largo del intestino hasta llegar al recto. Las especies de peces que se alimentan de forma constante ingieren grandes cantidades de agua (Guillaume y Choubert 1999) que junto al alimento tienden a elevar el pH ácido del estómago, por lo que un pH próximo a 4,0 puede constituir una señal que estimule a la L3 a continuar su ciclo vital.

Ahora bien, aquí se abren varias posibilidades, puesto que solamente a partir de un determinado tamaño (≥3 mm) la L3 es capaz de infestar al hospedador definitivo y continuando su desarrollo hasta adulto, y además sólo se encuentran L3 a partir de 3 mm en adelante en el tracto gastrointestinal (Køie 1993). Iglesias y colaboradores (Iglesias et al., 2002) proponen que la L3 ingerida junto al pez presa (hospedador intermediario/paraténico) permanece libre en el tracto digestivo tras la digestión, y si la larva tiene el suficiente grado de desarrollo (≥3 mm) permanecerá en el estómago, lo que le facilitaría el desarrollo hasta adulto maduro (pH ácido y presencia de pepsina). Si la L3 en el estómago no tiene el grado adecuado de desarrollo podría pasar al intestino, en donde el pH neutro y alcalino junto con la tripsina inhibirían la M3, por lo que atravesaría la mucosa intestinal hasta el mesenterio y la cavidad abdominal, que son las

áreas más frecuentemente ocupadas por la L3 de *H. aduncum*. En esta localización la L3 puede madurar y, en este hospedador o en uno nuevo si ese ha sido depredado, retornar al estómago y completar su desarrollo hasta adulto sexualmente maduro. Andersen (Andersen 1993) propone que ocurre una autoinfección de la L3 desde la cavidad corporal al tracto gastrointestinal para desarrollarse hasta adulto. Argumenta que no se tiene la certeza de cuales son las L3 que se desarrollan directamente a L4 en el tracto gastrointestinal sin pasar previamente por la cavidad visceral, pero que deben de ser pocas ya que deberán estar en un estado de desarrollo muy avanzado, muy próximo a la muda a L4.

La circunstancia de que la L3 0h a pH 4,0 presente actividad metaloproteasa mientras que los otros estados de desarrollo no (figuras R26, R46, R47), podría explicarse si esta proteasa fuese utilizada por la L3 infectiva para penetrar en los tejidos al llegar a un nuevo hospedador, tras los estímulos necesarios. Un argumento a favor de que el pH ácido es adecuado para esta actividad histolítica lo encontramos en el hecho de que se ha descrito la presencia de sendas hialuronidasas que pueden participar en la invasión de tejidos en *Anisakis simplex*, *Ancylostoma caninum* (Hotez et al., 1994) y *Ascaris suum* (Rhoads et al., 2001), siendo los pH óptimos 4,0, 6,0 y 5,0-6,0, respectivamente. *Ascaris* penetra a través del ciego y el colon ascendente (Murrell et al., 1997); *Ancylostoma* lo hace a través de la piel, vasos sanguíneos y pulmones; y *Anisakis* sigue un ciclo muy similar al de *H. aduncum*, utilizando en muchas ocasiones los mismos peces hospedadores intermediarios/paraténicos, los cuales se infestan en ambos casos mediante la ingestión de pequeños crustáceos principalmente, y es posible que el hecho de que el pH óptimo de 4,0 para su hialuronidasa sea indicativo de que penetra a través del estómago (como *H. aduncum*), mientras que en las otras dos hialuronidasas los pH óptimos serían mayores debido a que los otros dos parásitos penetran por regiones con pH más elevados.

An. simplex y *Pseudoterranova decipiens*, anisákidos ambos, liberan serín- y metaloproteasas en los productos de E/S, y se ha propuesto que podrían ser utilizadas por el parásito para la degradación de la matriz celular. En *An. simplex* se ha demostrado que se trata de una aminopeptidasa (metaloproteasa) (Sakanari 1990). *Strongyloides stercoralis* libera metaloproteasas con actividad elastasa capaces de degradar la matriz extracelular de la piel por donde penetra (McKerrow et al., 1990). En *Trichuris suis* se ha localizado una zinc metaloproteasa en un órgano secretor implicada en la degradación de los tejidos del hospedador durante la invasión (Hill et al., 1993). En otros parásitos se han descrito muchas metaloproteasas empleadas para penetrar en los tejidos (McKerrow et al., 2006), y anteriormente ya se ha relacionado la presencia predominante de metaloproteasas, entre las proteasas liberadas *in vitro* por la L3 infectiva, de *Ostertagia ostertagi*, con la entrada en los tejidos de su hospedador (Geldhof et al., 2000).

Si la entrada se produce a través del estómago, las metaloproteasas son buenas candidatas a intervenir en esta invasión, ya que son capaces de trabajar mejor a pH ácidos que las serín proteasas, pues el ión metálico que contienen es capaz de unir moléculas de agua más

acídicamente que ésta, convirtiéndose en fuente de iones hidroxilo aún por debajo del pH neutro. Así el hidroxilo unido al metal se comporta como un potente agente nucleófilo necesario para la catálisis (Núñez de Castro 2001).

Estos datos podrían apuntar a la posibilidad de la autoinfección, en la que la L3 de *H. aduncum* llegaría al estómago del hospedador y pasaría directamente hacia los mesenterios y la cavidad corporal, gracias al pH del medio que estimula y facilita la actividad metaloproteasa que presenta la L3 0h. Este lugar de penetración podría tratarse del estómago, constricción pilórica o ciegos pilóricos, ya que en diversos estudios se han encontrado L3 de este parásito atravesando la mucosa por el ciego pilórico (Andersen 1993), o en la pared intestinal (Køie 1993) en infestaciones experimentales en bacalao. En infestaciones experimentales de la trucha arco iris, la mayoría de las larvas recuperadas se encontraron en zonas de la cavidad visceral próximas a los ciegos pilóricos y la constricción pilórica (Yoshinaga et al., 1987). Luego, la larva regresaría al tracto gastrointestinal si se encuentra en las condiciones necesarias para mudar ahí a L4. Si no es así, podría permanecer en los mesenterios y cavidad corporal hasta alcanzar el desarrollo necesario.

En un parásito del mismo género, *H. analarum*, se sabe que ocurre una autoinfección similar a la sugerida (Rye y Baker 1992). Otro parásito también del mismo género, *H. haze*, es monoxeno y pasa directamente a los tejidos de la cavidad visceral, en donde se desarrolla hasta adulto y deposita los huevos, que se quedan en los tejidos (Yoshinaga et al., 1989). Anderson y Bartlett (Anderson y Bartlett 1993) piensan que parece como si *H. haze* hubiese perdido la capacidad de regresar al tracto gastrointestinal, y que este nematodo es un ejemplo extremo del desarrollo precoz que tienen algunos parásitos en su hospedador impuesto por diversas adquisiciones evolutivas en su ciclo de vida así como en el de sus hospedadores. *As. suum* es también un parásito monoxeno, y cuando los huevos, tras su desarrollo en el medio externo, eclosionan en el intestino de su hospedador, las larvas no penetran inmediatamente, sino que recorren rápidamente el intestino delgado y penetran a través de la mucosa del ciego y el colon ascendente, y en vez de ir hacia los pulmones directamente, primero se acumulan durante 48 horas en el hígado (Murrell et al., 1997). Después, por vía sanguínea, se dirigen hacia los pulmones en donde mudan a L4, y vuelven al tubo digestivo para desarrollarse hasta adulto (Roberts y Janovy, Jr. 2005a). Para explicar esto, se ha sugerido que los ascaridoideos originariamente tenían un ciclo de vida heteroxeno basado en las relaciones presa-depredador de sus hospedadores, por lo tanto tenían al menos dos hospedadores, el intermediario y el hospedador definitivo. Se cree que la migración que emprenden los ascáridos monoxenos emprenden a través de los tejidos de su hospedador actual es una simulación de la migración que realizaban a través de su hospedador intermediario ancestral debido a las reminiscencias que han quedado de este comportamiento de sus ancestros para quedarse en los tejidos de su hospedador intermediario (la presa) donde permanecerían (Roberts y Janovy, Jr. 2005a). Además, parece que la migración de los parásitos gastrointestinales a través de los tejidos del hospedador es beneficiosa, en el sentido que favorece un crecimiento mayor y más rápido que

en los que no migran, incrementando de esta manera su capacidad reproductora (Read y Skorping 1995).

Balbuena y colaboradores (Balbuena et al., 2000) encuentran una gran variabilidad en la localización y rutas que sigue la L3 de *H. aduncum* a través de los tejidos en larvas de arenque infestadas, y propone que la L3 migra en busca de un ambiente óptimo para su desarrollo en el interior de los tejidos del hospedador, y que esta migración está gobernada por su desarrollo ontogénico. La decisión de penetrar y moverse a través de los tejidos del hospedador depende de circunstancias tales como la condición del hospedador y/o la fase de desarrollo del parásito, entre otras. En este sentido, las diferencias de susceptibilidad al parásito entre las distintas especies de hospedadores e, incluso, entre los individuos de la misma especie, condicionan esa decisión [por ejemplo, una respuesta del hospedador aislando al parásito en una cápsula gruesa, puede reducir las posibilidades de desarrollo del mismo (Køie y Fagerholm 1995)]. Así mismo, la capacidad de detectar pequeñas variaciones en las señales que emite el hospedador y de modular su respuesta en función de las mismas van a condicionar la penetración y movimiento de los parásitos por los tejidos del hospedador (Sukhdeo y Sukhdeo 1994). La comprobación de la secreción de hialuronidasa tanto por un nematodo parásito (*As. suum*) (Rhoads et al., 2001) como por uno no parásito (*Caenorhabditis elegans*) (Wilson et al., 1994) permite a Rhoads y colaboradores (Rhoads et al., 2001) permite proponer que esta enzima no sólo actúa facilitando la migración de los acáridos a través de los tejidos de su hospedador por su acción histolítica, sino que el ácido hialurónico debe ser un requerimiento o señal para el desarrollo hasta L4, pues esta molécula participa en el desarrollo celular.

Una razón a favor del paso obligatorio de *H. aduncum* por los tejidos del nuevo hospedador antes de iniciar los cambios que desencadenan la transformación a L4, sería que de este modo el parásito se aseguraría de que completa su desarrollo en el hospedador adecuado, evitando que ocurra en el tracto gastrointestinal de un hospedador que no fuese el idóneo para alcanzar el estado de adulto maduro. En este sentido, Hemmingsen y colaboradores (Hemmingsen et al., 2000) aunque hay un cambio en la dieta del bacalao, volviéndose más piscívoro con la edad, no encuentran diferencias en la abundancia y prevalencia de *H. aduncum* con la edad del bacalao al que parasita. De modo que el bacalao se infestaría tanto comiendo invertebrados como vertebrados. Se ha demostrado que en algunas zonas del Mar del Norte algunos crustáceos del orden *Amphipoda* son hospedadores intermediarios que transmiten la L3 de *H. aduncum* de manera efectiva al bacalao, que es un hospedador definitivo. Estos anfípodos son también presas de otros peces que no son hospedadores definitivos (Klimpel y Rückert 2005), en los cuales el parásito podría intentar completar su desarrollo sin éxito. De este modo, si el parásito hace un paso obligado por los tejidos, tiene la posibilidad de quedarse en la cavidad visceral en el caso de que se halle en un hospedador paraténico (no adecuado para su desarrollo hasta adulto), aún cuando disponga del tamaño necesario para seguir su desarrollo hasta adulto. Debido a la gran cantidad de posibilidades con las que se encuentra el parásito

durante su ciclo vital sería una estrategia plausible pasar primero por los tejidos para decidir después el siguiente paso a tomar en función de las señales que perciba del hospedador.

Las L3 de *H. aduncum* se encuentran sobre todo encapsuladas en los mesenterios, en la cavidad corporal del hospedador (Wootten 1978; Fagerholm 1982; Yoshinaga et al., 1987). Puede ser que en este caso un ambiente reductor, como el del intestino, inhiba la penetración de la L3 infectiva, lo que explicaría por qué se observa una inhibición de la actividad en la L3 0h a pH 4,0 con DTT (figura R1) que no aparece de modo tan pronunciado en ninguna otra fase de desarrollo de las estudiadas en este trabajo. Se ha demostrado anteriormente que un ambiente reductor sirve de estímulo en el desarrollo de los huevos de otro ascaridoideo gastrointestinal, *Ascaridia galli* (Rogers 1961). Køie y Fagerholm (Køie y Fagerholm 1995) proponen para la L3 de *Contracaecum osculatatum* que si la penetración es a través de la pared del tracto intestinal, podría llegar hasta el hígado, a través del sistema circulatorio, donde la larva quedaría encapsulada. Mientras que si lo hace por los ciegos pilóricos terminaría mayoritariamente en el mesenterio, principalmente en las proximidades de los ciegos pilóricos. Esta localización es la que se observa en los jureles utilizados en la obtención de las L3 de *H. aduncum* para los experimentos realizados en este trabajo. Lo mismo ocurre en las infestaciones experimentales en la trucha arco iris (Yoshinaga et al., 1987), aunque Andersen (Andersen 1993) y Køie (Køie 1993) también encuentran las L3 encapsuladas por fuera de la pared intestinal del bacalao. Otra posibilidad para la inhibición observada a pH 4,0 con DTT en L3 0h, quizá más probable, es que los grupos sulfhidrido del DTT formen un complejo con el ión metálico de la/s metaloproteasa/s de la L3 0h a pH 4,0 (figura R26), inactivándola/s, fenómeno ya conocido en otras metaloproteasas (Dunn 2001).

En la L3 0h es donde menos actividad proteolítica a pH 5,5 se ha registrado entre todos los estados de desarrollo (figura R16). Esto es posible que tenga que ver con la forma de vida que hasta ahora había llevado la L3 del parásito. Esto es, primero desarrollándose en el hemocele de artrópodos acuáticos y posteriormente encapsulada en la cavidad visceral de un pez hospedador, preparándose para conseguir un desarrollo y tamaño adecuados para lograr la cualidad de L3 infectiva y poder infestar a su hospedador definitivo (Køie 1993). En *An. simplex*, otro anisákido cuya L3 también se desarrolla en el hemocele de artrópodos marinos y se encapsula en la cavidad corporal de peces antes de infestar a su hospedador definitivo, se ha visto que los productos de E/S liberados durante la fase L4 presentan doble actividad serín proteasa que en la L3, y los extractos de L4 muestran una gran actividad tripsina y quimotripsina, mientras que en los extractos de la L3 no se detectan (Dziekonska-Rynko et al., 2003). Para explicar estas diferencias se ha sugerido que esto podría ser indicativo de la existencia de diferentes mecanismos de nutrición entre las dos fases larvianas (Dziekonska-Rynko et al., 2003), lo que a su vez se relaciona con la circunstancia de que *An. simplex* no ingiere alimento durante la fase de L3 (Dziekonska-Rynko et al., 2003). Efectivamente, tal peculiaridad quedó demostrada por Sommerville y Davey en 1976, al poner en cultivo L3 de *An. simplex* recién aisladas del pez *Leionura atun*, donde aparecen encapsuladas en las vísceras y mesenterios, las

cuales no se alimentaron por vía oral durante los primeros días (Sommerville y Davey 1976). Por otro lado se ha visto que otra larva de nematodo, *Mermis nigrescens*, que habita en el hemocele de artrópodos, toma gran cantidad de nutrientes simples, como glucosa y aminoácidos, a través de la cutícula (Rutherford y Webster 1974; Rutherford et al., 1977), lo que también ocurre aunque en menor proporción en adultos de *Ascaris* sp. (Barrett 1981c). Por tanto las L3 de *H. aduncum* y *An. simplex* muy probablemente absorban también nutrientes simples a través de la cutícula mientras se desarrollan en el hemocele de artrópodos y la cavidad visceral de peces, como sugirieron Iglesias y colaboradores (Iglesias et al., 1997) para *An. simplex* en el cultivo *in vitro*. La L3 de *H. aduncum* reinicia su desarrollo hasta adulto en el tracto gastrointestinal del hospedador definitivo, un pez carnívoro, probablemente un gádido (Punt 1941; Berland 1961), o en las condiciones referidas de cultivo *in vitro* en el laboratorio (Iglesias et al., 2002). En estos hábitats el parásito tiene acceso a grandes cantidades de alimento de origen proteico que puede comenzar a ingerir por la boca, por lo que en los siguientes estados de desarrollo puede comenzar a expresar una actividad proteasa más elevada que en la L3 0h, que le serviría para digerir el alimento en el tubo digestivo.

Desde L3 0h hasta L3 48h se pasa de un mínimo de actividad proteolítica a un máximo a todos los pH (excepto a pH 4,0 sin DTT que es similar a la de L3 0h) (figuras R1-R21), especialmente a pH 5,5 (figura R16) (tabla R1) [con diferencias estadísticamente significativas entre los estados de desarrollo (ver apartado V 1.1.6.) (tablas R2, R5, R6)]. Esta actividad proteolítica a pH 5,5 podría estar relacionada con el desarrollo del parásito en el hospedador definitivo y con la penetración de la pared digestiva del hospedador, siendo, al menos, este incremento simultáneo con estos procesos. Esta alta actividad proteasa, en L3 48h, podría proveer nutrientes para su uso inmediato así como para permitir la acumulación de los mismos como reserva para posteriores fases de desarrollo del parásito.

Por otro lado, aparece un descenso de la actividad proteolítica al alcanzar la L4, y en particular en los parásitos a los que no se les ha retirado la pepsina (figuras R10-R21). Quizá es debido a que en este punto la actividad esté relacionada con la condición nutricional o refleje principalmente este aspecto, y ya no tanto el cambio de fase o desarrollo. La condición nutricional viene dada por el aporte de nutrientes, y las L4 que no se encuentran en un medio con pepsina (aspártica) necesitarían expresar más actividad proteolítica (aspártica) para mudar a adulto que las que se cultivan con pepsina; de este modo tendrían acceso a los nutrientes proteicos no predigeridos por la pepsina.

En los subsiguientes estados de desarrollo, L5J y L5, el descenso se confirma y se mantiene. Es igual para los cultivados con pepsina y sin ella (figuras R10-R21), por lo que ya el parásito no es tan dependiente de la pepsina. En la fase adulta ya se ha sufrido la última muda, y quizá a causa de esto ya no sea tan necesario un aporte tan elevado y continuo de nutrientes proteicos como en L3 48h. El adulto también necesitaría un gran aporte de nutrientes, pero proporcionalmente con respecto a la L3 48h la actividad proteolítica es mucho más baja. La fase adulta podría adaptar su crecimiento y maduración al aporte de nutrientes disponible, e incluso movilizar

reservas que pudieran haberse acumulado durante el cultivo, especialmente cuando se pasa a un medio sin pepsina.

1.1.1. Proteasas aspárticas

No existen diferencias significativas entre la actividad proteasa a pH 4,0 (figura R14) medida al cultivar con o sin pepsina ($p=0,345$); pero existen interacciones estadísticamente significativas ($p=0,001$) (tabla R6) entre las variables pepsina y estado de desarrollo larvario (ver apartado V 1.1.7.2.), ya que las líneas de la figura no transcurren paralelas entre sí, sino que se cruzan, lo que indica una interacción entre ambas variables (Martínez González y Calasanz Abínzano 2001). La interacción principal es la que ocurre en el paso de L3 48h a L4. Aunque como hemos visto no existen diferencias significativas en la variable pepsina a pH 4,0, sí que las hay cuando se compara la actividad proteasa de la L4 independientemente del pH ($p=0,027$) (tabla R3), siendo mayor la actividad enzimática sin pepsina. Esto podría indicar que el parásito depende o necesita para el paso de L3 a L4 un cierto nivel (umbral) de actividad proteolítica (figura R14), ya sea exógena (pepsina adicionada al medio de cultivo) o generada endógenamente.

A pH 4,0 aparecen varios tipos de actividad proteolítica, siendo la principal la que se inhibe con pepstatín A, por tanto de tipo aspártica, con variaciones entre los estados de desarrollo ($p=0,012$) (tabla R9), siendo mayor en L4 (figuras R24, R46, R47). Y es mayor en los parásitos mantenidos sin pepsina para todos los estados de desarrollo excepto para L3 (figura R25). La inhibición máxima (en torno al 70%) ocurre en la L4 sin pepsina (figuras R25, R46, R47). Ésta es la actividad proteasa más importante a pH 4,0. No se observen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo mantenido sin pepsina y el mantenido con pepsina con el ANOVA 1 vía ($p=0,111$) (tabla R9), probablemente por falta de potencia estadística [ya que sin embargo sí se observan diferencias estadísticamente significativas cuando se realiza la comparación mediante el ANOVA 2 vías ($p=0,004$) (resultado no mostrado); se ha empleado el ANOVA de 1 vía porque al analizar los datos mediante el ANOVA de 2 vías no hay homocedasticidad].

Considerando estos datos a pH 4,0, se podría pensar que *H. aduncum* necesita una actividad de tipo aspártico, al menos para el paso de L3 a L4, ya que cuando ésta no existe en el medio parece que la expresa el parásito. De hecho sin pepsina no sólo se retrasa, si no que se inhibe la M4 (Iglesias et al., 2002) [con *An. simplex* también se utilizan medios de cultivo que llevan pepsina o previamente hidrolizados con pepsina (van Banning 1971; Iglesias et al., 2001)]. Es muy posible que esta dependencia de la actividad aspártica tenga que ver con la digestión de nutrientes. La mayoría de las proteasas aspárticas descritas en nematodos se relacionan con los procesos de digestión (Hawdon et al., 1989; Brown et al., 1995; Geldhof et al., 2000; Williamson et al., 2003a; Williamson et al., 2003b), y sólo alguna, además de con la digestión, se relaciona con el desarrollo embrionario de las filarias (Sato et al., 1995). La digestión de nutrientes en

invertebrados ocurre mediante la actuación sinérgica de varios tipos de proteasas, asumiendo en ellos las proteasas aspárticas y cisteínicas de la familia de la papaína el papel que tiene la familia de las tripsinas en los vertebrados (Delcroix et al., 2006). Estos datos hacen pensar que la actividad aspártica es muy importante para *H. aduncum* durante la digestión a pH 4,0.

A pH 5,5 la actividad aspártica representa aproximadamente un 20% del total de la actividad proteolítica mostrada de forma constante durante todos los estados de desarrollo (figura R30). Es posible que se trate de la misma actividad observada a pH 4,0, pues si comparamos la contribución de las proteasas aspárticas al total de actividad medida con BODIPY TR-X caseína a los pH 4,0 y 5,5 (figuras R47, R49), son muy similares, incluso en su distribución a lo largo del desarrollo larvario, siendo en ambos casos L4 sin pepsina el estado de desarrollo que más actividad muestra. Así es posible que el pH óptimo del conjunto de la actividad aspártica de *H. aduncum* se encuentre entre pH 4,0 y 5,5, si acaso más próximo a 4,0.

El hospedador final de *H. aduncum* suele ser un gádido (Punt 1941; Berland 1961), u otro pez carnívoro, el cual se infestará a causa de sus hábitos depredadores. En los peces carnívoros se ha observado que existen unos niveles muy altos de pepsina, mayores que los presentados por los peces omnívoros o herbívoros (Jonas et al., 1983). Esto sirve como un argumento más para explicar la dependencia hacia la pepsina que muestra el parásito, pues podría constituir una señal de reconocimiento de sus hospedadores, en caso de ser ingerido accidentalmente por un pez no carnívoro.

Se ha comprobado que al suministrar HCl (0,18%) a los cerdos neonatos que son infestados con huevos de *As. suum* presentan más parásitos en los pulmones que los controles sin HCl (Jablonowski et al., 1995). Esto podría ser debido a que con el HCl se alcanza un pH más idóneo para una óptima actividad pepsina porcina, y beneficiar de algún modo el desarrollo del parásito. En cobayas infestadas con L3 de *An. simplex*, se observa que al analizar su contenido estomacal, presenta más actividad pepsina el grupo infestado que el que no lo está (Dziekonska-Rynko et al., 1997b). Parece que hay una inducción por el parásito en la producción de pepsina por el hospedador, que podría ser útil para el desarrollo del primero (Iglesias et al., 2001). En nuestros experimentos, esta necesidad de actividad aspártica sería totalmente cubierta por la pepsina adicionada al medio de cultivo.

H. aduncum se serviría de las proteasas del medio limitando así la producción endógena de estas enzimas. Esto es lo que proponen Rhoads y Fetterer (Rhoads y Fetterer 1998) para *As. suum*: este parásito estaría adaptado para ello, pues utiliza una serie de inhibidores específicos de proteasas (para pepsina, gastricsina, carboxipeptidasas A y B, tripsina, quimotripsina y elastasa) en su tubo digestivo para protegerse de las enzimas digestivas del hospedador. El complejo enzima-inhibidor aparentemente es retenido por el parásito y es transportado a otros tejidos, por lo que se ha sugerido que las enzimas del hospedador capturadas podrían ser utilizadas por el parásito para reacciones hidrolíticas reguladas, disminuyendo de este modo aún más la necesidad adicional de producir endoproteasas endógenas (Rhoads y Fetterer 1998).

En *An. simplex* también se han hallado inhibidores de serín proteasas de las mismas familias que en *As. suum*, y se supone que tienen la misma función, aunque tienen menos afinidad por la tripsina bovina que los de *Ascaris* sp., lo que se cree que se debe a las diferencias de hospedador de uno y otro parásito (Morris y Sakanari 1994). Estos inhibidores de *An. simplex* parece que han sufrido muchos cambios evolutivos, debido a una continua adaptación a los cambios que introduce el hospedador, existiendo una gran especificidad para con las proteasas del hospedador (Lu et al., 1998). Es más, *As. suum*, nematodo muy próximo al parásito humano *Ascaris lumbricoides*, vive durante más tiempo en un medio con tripsina de cerdo, su hospedador natural, que en un medio con tripsina humana (Hawley y Peanasky 1992). Esto podría explicar por qué *H. aduncum* no se ve perjudicado por la pepsina porcina empleada en el cultivo, ya que de poseer inhibidores para pepsina, al igual que el también ascaridoideo *As. suum*, la neutralizaría de una manera efectiva, al ser las proteasas aspárticas una clase muy conservada en todos los grupos (Williamson et al., 2003b), mientras que las serín proteasas no lo están tanto, y de hecho el parásito no se desarrolla adecuadamente *in vitro* cuando hay tripsina pancreática porcina en el medio de cultivo (Iglesias et al., 2002).

En el caso de *An. simplex* se ha comprobado que la pepsina porcina favorece su desarrollo en cultivo *in vitro* (Iglesias et al., 2001) y la resiste bien, mientras que la papaína y tripsina bovina afectan negativamente al parásito (Dziekonska-Rynko et al., 1997a). Además, en las cobayas infestadas con L3 de este anisákido, se detecta menos actividad tripsina que en las no infestadas, lo que podría deberse a una represión inducida sobre el hospedador o a una emisión de inhibidores de tripsina por parte del parásito (Dziekonska-Rynko et al., 1997b). Si la reducción de la actividad tripsina del hospedador fuera una estrategia común entre los nematodos intestinales, cuya finalidad fuera la protección del parásito, sería interesante un estudio para la utilización de este rasgo como blanco de la acción terapéutica frente a las nematodosis, que en algunos casos suponen grandes pérdidas económicas y graves problemas sanitarios.

1.1.2. Metaloproteasas

Excepto en L3 0h, en el resto de los estados de desarrollo estudiados, L3 48h, L4, L5J y L5, tanto en los cultivados con pepsina como sin ella, la mayor actividad proteolítica se observa a pH 5,5 (figuras R1-R9), siendo sobre el 80% de tipo metaloproteasa (figuras R32, R48, R49), excepto para la L4 mantenida sin pepsina (inhibición \approx 60%) (figura R33) ($p=0,023$) (tabla R10), que presenta menos actividad metaloproteasa. Esta actividad podría ser de tipo digestivo, y si es cierto que *H. aduncum* depende de la actividad pepsina, como hemos propuesto anteriormente, esta disminución en la actividad metaloproteasa podría darse ante la falta de sustrato suministrado por la pepsina, como ocurre en los niveles de proteasas de *C. elegans* cuando se le obliga a ayunar (Hawdon et al., 1989).

En *Ascaris suum* se ha relacionado una aminometalopeptidasa liberada al medio de cultivo con el proceso de muda (Rhoads et al., 1997), y posteriormente esta misma aminopeptidasa se ha hallado en el intestino del adulto, donde posee una gran actividad que se relaciona con la digestión (Rhoads y Fetterer 1998). En *B. pahangi* (Hong et al., 1993), *D. immitis* (Richer et al., 1992; Richer et al., 1993), *On. volvulus* (Lustigman et al., 1996) y la L3 infectiva de *Ha. contortus* de la L3 (Gamble et al., 1989) también se han detectado aminometalopeptidasas en los procesos de muda. Las metaloproteasas de la L4 de *H. aduncum* pueden ser digestivas e inhibir su expresión ante la falta de sustrato, o también pueden estar implicadas en la muda. La muda M4 tiene lugar a los pocos días cuando el parásito es cultivado en presencia de pepsina (Iglesias et al., 2002).

Es muy posible que la actividad digestiva metaloproteasa de *H. aduncum* no se deba a una sola proteasa, sino que se trate de una mezcla en la que existan proteasas con funciones de muy diversa índole, y una de las principales seguramente se correspondería con el aspecto digestivo. Con respecto a esta función, se podría tratar de una mezcla de exopeptidasas (aminopeptidasas y carboxipeptidasas), oligopeptidasas y algunas endoproteasas, todas de tipo metaloproteasa inhibidas por la 1,10 fenantrolina. Atacarían a los péptidos generados durante la degradación previa realizada sobre las proteínas del SBF1 del medio de cultivo, por la pepsina que se le añade y por la propia actividad aspártica del parásito.

En su medio natural, el tracto gastrointestinal del hospedador definitivo, las metaloproteasas, en los parásitos, completarían la digestión iniciada por la pepsina y otras enzimas del hospedador. Anteriormente esto mismo se ha propuesto para otro ascaridoideo, el adulto de *As. suum*, como ya se ha comentado (Rhoads y Fetterer 1998), en el que la principal actividad digestiva intestinal parece que se debe a una aminometalopeptidasa [activa entre los pH 6,0 y 8,5, siendo el óptimo 7,0 (Rhoads et al., 1997)], aunque se han identificado otras actividades de endoproteasas ácidas (Maki y Yanagisawa 1986). Para *Haemonchus contortus* también se ha descrito otra aminometalopeptidasa intestinal con una importante actividad que se piensa tiene un papel en la digestión (Newton 1995; Smith et al., 1997; Culley et al., 2000).

De esta forma se obtendrían los aminoácidos necesarios para el desarrollo del nematodo, no en vano la mayoría de los aminoácidos esenciales para los mamíferos lo son, probablemente, también para los nematodos. Así, *Caenorhabditis briggsae* y *C. elegans* requieren en su dieta histidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina (o su precursor homocisteína), fenilalanina, treonina, triptófano, valina y arginina (Munn y Munn 2002). *C. elegans* seguramente también capta aminoácidos no esenciales, pues se ha descrito una aminometalopeptidasa citoplasmática e intestinal que ataca a péptidos con prolina en su extremo aminoterminal, y por su estructura se piensa que actúa sobre péptidos de la dieta, posiblemente para obtener prolina necesaria para los colágenos requeridos en la síntesis periódica de la cutícula (Laurent et al., 2001). En los productos de E/S de la L3 y en extractos de L3 y L4 de *An. simplex* se ha detectado actividad arilamidasa (EC 3.4.11.14, aminometalopeptidasa) con un pH óptimo de 7,5, y se ha sugerido que esté relacionada con la muda y/o con la nutrición, siendo

probablemente más importante este último papel ya que su actividad es bastante mayor en los extractos que en los productos de E/S (Ruitenbergh y Loendersloot 1971a; Ruitenbergh y Loendersloot 1971b; Dziekonska-Rynko et al., 2003), y se había descrito previamente en músculo e intestino de *An. simplex* (Ruitenbergh y Loendersloot 1971a; Ruitenbergh y Loendersloot 1971b; Dziekonska-Rynko et al., 2003).

En las uncinarias, como *A. caninum*, se tiene caracterizada en gran medida la cascada de proteasas que actúan sobre la hemoglobina asociadas al tubo digestivo; interviniendo secuencialmente, primero las proteasas aspárticas y después las cisteín proteasas y las metaloproteasas que degradan los péptidos generados por las anteriores, presentando las metaloproteasas un óptimo a pH 2,0 y otro entre 5,0-7,0; también se han identificado aminometalopeptidasas (Williamson et al., 2003b; Williamson et al., 2004), del mismo modo que ocurre en otros parásitos que consumen hemoglobina como *Schistosoma spp.* o *Plasmodium spp.* (Williamson et al., 2003b).

En el nematodo de vida libre *C. elegans*, las catepsinas cisteínicas Ce1 y Ce2 degradan caseína, proteína fácil de digerir, pero necesitan la participación previa de la catepsina D (aspártica) para degradar la mezcla de proteínas del extracto de *C. elegans* y/o inactivar a otras enzimas. La catepsina D es capaz de efectuarlo por sí sola y puede autodigerirse e inactivarse ante la falta de sustrato *in vitro*, sugiriéndose en este caso una autólisis en el lisosoma ante la falta de otras proteínas como sustrato. Efectivamente, es lo que ocurre *in vivo* durante el ayuno, pues tras 4-8 horas sin ingerir alimento descienden primero los niveles de la catepsina D (hasta un 65% menos), y pasadas 24 horas, lo hacen las catepsinas cisteínicas (Sarkis et al., 1988b; Hawdon et al., 1989). Existe sinergia y, aunque salvando las diferencias y con más o menos restricciones, parece ser que en este nematodo también se necesita un orden en el concurso de los distintos tipos de proteasas a la hora de digerir los alimentos, siendo necesario primero la actuación de una proteasa aspártica, la catepsina D, para que puedan actuar a continuación catepsinas cisteínicas.

De este modo es posible que *H. aduncum* al ser un parásito gastrointestinal precise de actividad aspártica externa; previa a la endometaloproteásica y/o exometalopeptidásica y cisteínica endógenas. Como ya se ha dicho, *H. aduncum* no se desarrolla totalmente *in vitro* si no se añade pepsina al medio de cultivo (Iglesias et al., 2002), al igual que *An. simplex* (Iglesias et al., 2001). En el pez hospedador podría tener el mismo requerimiento resuelto por la digestión péptica de la ingesta del pez de la que presumiblemente se alimenta el parásito, dada su ubicación en el hospedador final. Seguramente este orden de actuación que hemos comentado de las proteasas, también se mantiene en *H. aduncum*, pero en su caso parece ser que debido a su modo de vida y hábitat que ocupa dentro de su hospedador -el tracto gastrointestinal-, es posible que haya desarrollado una dependencia de la actividad aspártica que le ofrece el hospedador, para asimilar más eficientemente los nutrientes de origen proteico. Las mayores actividades se presentan a los pH 4,0 y 5,5 en todas las fases larvianas (figuras R1-R9), principalmente aspártica a pH 4,0 y metaloproteasa a pH 5,5, siendo la cisteínica menos

importante en ambos casos (figuras R24, R32, R46-R49) (tabla R7). La digestión podría ser primero a pH 4,0 por las proteasas aspárticas y cisteínicas, para ser completada después a pH 5,5 por las metaloproteasas (presumiblemente serían exopeptidasas que actúan sobre los péptidos resultantes del predigerido) y cisteín proteasas. Sería el mismo orden que se da en *A. caninum* (Williamson et al., 2003b; Williamson et al., 2004).

En *C. elegans* que es de vida libre y por tanto no depende de la actividad de las proteasas aspárticas del tracto digestivo del hospedador, su principal actividad proteolítica es ácida y el 90% se inhibe con pepstatín A (Geier et al., 1999), es decir, es aspártica. *As. suum* presenta un óptimo de actividad proteasa ácida (con hemoglobina como sustrato) a pH 3,5, que se corresponde con actividad carboxipeptidasa aspártica, mientras que con azocaseína como sustrato se presenta un óptimo, en presencia de DTT, a pH 5,6, y se corresponde con cisteín proteasas (Maki y Yanagisawa 1986). En *Trichinella spiralis* se ve que el pH óptimo para la actividad proteolítica del extracto con un sustrato general (azocolágeno) es 5,0 (Criado-Fornelio et al., 1992). Como se ve, los pH óptimos para la actividad proteolítica del extracto de estos nematodos son ácidos y, anteriormente, otros autores ya han escrito sobre la acidez del lumen intestinal de *As. suum* (Van den Bossche y Borgers 1973) y de otros nematodos (Williamson et al., 2003b). Por todo esto se podría pensar que el pH para la función digestiva de estos parásitos estará entre 3,5 y 5,5. Es posible que el lumen del tracto digestivo de *H. aduncum* sea ácido y los pH óptimos de actividad que hemos encontrado de 4,0 y 5,5 se correspondan con el del lumen intestinal donde ocurriría la digestión de nutrientes. Podría existir una zonación con un gradiente de pH, o bien los sucesivos pasos se podrían dar en vacuolas digestivas de las células intestinales con un pH diferente. De este modo podrían actuar primero las proteasas aspárticas (a pH 4,0) y a continuación las cisteín proteasas (a pH 4,0-5,5) y las metaloproteasas (a pH 5,5) (figuras R46-R49).

En los vertebrados la participación de las proteasas de la familia de la tripsina en esta cascada multienzimática es muy importante, pero las cisteín proteasas de la familia de la papaína y las proteasas aspárticas asumen dicho papel en los invertebrados, y se conserva en la evolución de éstos. Actualmente en el modelo que se sugiere para esta red sinérgica de proteasas (no sólo es una cascada, sino que también hay proteasas que pueden activar a los zimógenos de otras) parece conservada en invertebrados y funciona de un modo óptimo en compartimentos en donde se dan pH ácidos, ya sea en el lumen intestinal o en vacuolas dentro de las células del epitelio intestinal (Delcroix et al., 2006).

A pH 7,0 no existen diferencias significativas entre los estados de desarrollo ($p=0,284$) (tabla R6) aunque se aprecia una actividad proteolítica significativamente menor en presencia de DTT ($p=0,008$) (figura R21) (tabla R6) no detectado a otros pH. El ambiente tiorreductor parece inhibir de algún modo la actividad proteolítica a pH neutro. Se sabe que los grupos -SH pueden quelar y formar un complejo con el ión metálico de las metaloproteasas, inactivándolas (Dunn 2001). Es posible que los grupos sulfhidrilo del DTT estén inactivando las metaloproteasas, que

representan la actividad más importante a pH 7,0 (figuras R38, R50, R51). En este sentido, la L3 0h presenta actividad metaloproteasa a pH 4,0 (figura R26) que se inhibe cuando hay DTT en el medio (figura R1). Sin embargo en ninguno de los estadios se inhibe la actividad proteasa a pH 5,5 (figuras R1-R9). Es posible que las metaloproteasas de *H. aduncum* sean más estables a pH 5,5 que a 4,0 y 7,0. La actividad metaloproteasa a pH 5,5 (figura R32) no tiene su equivalente a pH 4,0 (figura R26), aunque sí a pH 7,0 (figura R38), pero dada la escasa actividad medida a pH 7,0 se puede pensar que ésta es residual y que su pH óptimo es próximo a 5,5. Como se ha comentado anteriormente, lo más probable es que el grueso de la actividad metaloproteasa se utilice principalmente para la digestión de los nutrientes que toma el parásito en la ingesta, completando la digestión realizada por la actividad aspártica tanto exógena como endógena, estando enclavada dentro de las redes digestivas sinérgicas que al parecer se dan en los nematodos y otros invertebrados (Williamson et al., 2003b; Williamson et al., 2004; Delcroix et al., 2006).

1.1.3. Cisteín proteasas

La actividad cisteín proteasa a los pH 4,0 y 5,5 presenta el mismo perfil de distribución a lo largo de los distintos estados de desarrollo (figuras R28, R34), es sólo algo mayor a pH 4,0 (figuras R47, R49). De este modo es posible que las cisteín proteasas digestivas [que funcionan a un pH ácido en invertebrados (Delcroix et al., 2006)] tengan su pH óptimo entre 4,0 y 5,5, pero más próximo a 4,0, y estemos viendo las colas laterales de la curva de pH. En los productos de E/S de *Ha. contortus* entre el 40 y el 50% de la actividad proteolítica es sensible a distintos inhibidores específicos de cisteín proteasas y la actividad se incrementa en un 66% con respecto al control al añadir DTT al ensayo (Karanu et al., 1993). Al contrario que en los productos de E/S de *Ha. contortus*, en el extracto de *H. aduncum* no hay incrementos notables en la actividad al añadir DTT (figuras R1-R9, R12, R15, R18, R21), por lo que en este nematodo las cisteín proteasas no parecen tener mucho peso en la actividad proteasa total [a pH 5,5, el de mayor actividad total, la que se inhibe con E64 (cisteínica) representa menos del 10% del total mostrado durante todos los estados de desarrollo (figura R34)], sin embargo presenta oscilaciones a lo largo del desarrollo. La actividad cisteín proteasa a pH 4,0 se eleva tras la puesta del parásito en cultivo, reduciéndose a partir de la última muda (M4) (figuras R28, R46, R47). Las cisteín proteasas han sido relacionadas con todo tipo de procesos, y en este caso es muy probable que durante las fases L3 y L4 estén directamente implicadas en la diferenciación del parásito en el hospedador definitivo, hasta alcanzar la fase adulta, ya sea a través la digestión de nutrientes o mediante otros procesos.

La función de las cisteín proteasas parece muy conservada en los nematodos (Britton et al., 1999; Hashmi et al., 2002), y existen muchos casos en los que se han implicado con el desarrollo larvario (Hashmi et al., 2002; Guiliano et al., 2004; Ford et al., 2005) y en la muda de muchos nematodos (Richer et al., 1992; Hong et al., 1993; Richer et al., 1993; Lustigman et al.,

1996; Rhoads et al., 1998). En *Onchocerca volvulus* se han detectado cisteín proteasas en regiones de separación entre la nueva y vieja cutícula, pero los inhibidores de las cisteín proteasas no evitan la formación de la nueva, en cambio inhiben el desprendimiento de la vieja cutícula (Lustigman et al., 1996). También se ha visto una cisteín proteasa relacionada con la muda de *Toxocara canis* que se expresa de forma constitutiva, por lo que se piensa que además tendrá alguna otra función esencial desconocida (Falcone et al., 2000). Éste parece ser el caso de *H. aduncum*; durante los estadios de L3 y L4 la actividad de las cisteín proteasas se ve estimulada por la presencia de pepsina en el medio de cultivo (figura R29), encontrándose diferencias significativas entre los cultivados con pepsina y sin ella a pH 5,5 ($p=0,023$) (tabla R10). Parece que la actividad cisteínica se expresa de forma constitutiva durante todos los estados de desarrollo. Cuando hay pepsina en el medio aparece más actividad cisteín proteasa durante el desarrollo larvario hasta la última muda, descendiendo de nuevo hasta un nivel constitutivo. La disponibilidad de nutrientes generada por la pepsina y el estado nutricional del parásito podrían influir en esta estimulación de la actividad cisteínica, como sugirieron Hawdon y colaboradores para *C. elegans* (Hawdon et al., 1989).

El patrón de las cisteín proteasas a pH 7,0 es distinto del que encontramos a los pH ácidos. En este caso la actividad no aparece hasta después de la muda a estado adulto (figura R40), por lo que podría estar relacionada con la consecución de la madurez sexual que tiene lugar durante este estadio. Aunque las diferencias no son significativas estadísticamente, dentro del estadio adulto, L5J y L5, se presentan variaciones entre los mantenidos con pepsina o sin ella (figura R41). Desaparece por completo la actividad cisteínica en L5 cuando hay pepsina en el medio, manteniéndose cuando la pepsina no está en el medio de cultivo. Si la actividad está relacionada con la madurez completa del nematodo, pudiera ser que presente su actividad antes de la madurez y no desaparezca hasta que ésta se complete, así en los cultivados sin pepsina el proceso de maduración es más lento y por eso se mantiene. En *C. elegans* y *O. volvulus* se ha descrito una cisteín proteasa, la catepsina Z-1 (CPZ-1), que tiene un papel muy importante en ambos nematodos durante la muda, y su localización es la misma, por lo que se piensa que su papel se conserva en el resto de nematodos. Se localiza en la epidermis de todas las fases larvarias y en el adulto aparece además en el esófago y las gónadas. Al inactivar su expresión provoca malformaciones en las regiones cefálica y caudal de la larva, un desarrollo incorrecto de las gónadas y muerte del embrión (Hashmi et al., 2004).

1.1.4. Serín proteasas

La actividad de tipo serín proteasa, inhibida con AEBSF, tanto a pH 5,5 como a 7,0, no aparece hasta después de la muda a estado adulto (figura R36, R42), por lo que bien podría estar relacionada con la consecución de la madurez sexual. Y dentro de este estadio, L5J y L5, se presentan variaciones entre los mantenidos con pepsina o sin ella (figura R37). Si está relacionada con la madurez completa del nematodo, pudiera ser que, igual que lo propuesto para

las cisteín proteasas a pH 7,0, presente su actividad antes de la madurez y no desaparezca hasta que ésta se complete. Así, en los cultivados sin pepsina, el proceso de maduración es más lento y por eso no desaparece la actividad serínica.

En la filaria *O. volvulus* se han identificado unos inhibidores de serín proteasas que podrían jugar un papel regulador durante la muda, la embriogénesis y la espermatogénesis (Ford et al., 2005), y efectivamente otros inhibidores de serín proteasas están directamente implicados en la maduración de los gametos masculinos durante la espermatogénesis de *C. elegans*, los cuales, si se expresan antes de tiempo provocan la infertilidad del macho (Stanfield y Villeneuve 2006). Aunque no es frecuente la actividad de serín proteasas a pH ligeramente ácido, se han descrito algunas como la catepsina A (o carboxipeptidasa C, EC 4.1.16.5), cuyo pH óptimo está entre 5,6 y 5,9 (Matsuda y Misaka 1975).

1.2. Actividad de las catepsinas L y B

Está documentado que una tripsina purificada de *An. simplex* degrada los sustratos de las catepsinas L y B, tanto Z-RR-AMC como Z-FR-AMC, pero también se observa que su actividad decae rápidamente ante la falta de CaCl_2 en el medio (Morris y Sakanari 1994). Como en estos ensayos no se ha utilizado CaCl_2 , esta circunstancia hace decantarse a favor de que la actividad medida con estos sustratos en *H. aduncum* se corresponda con la de las catepsinas B y L, junto con el hecho de la sensibilidad mostrada ante el inhibidor de cisteín proteasas E64.

En realidad el sustrato Z-FR-AMC según el proveedor (Molecular Probes) es para las catepsinas B y L, pero Dalton y colaboradores (Dalton et al., 1996) trabajando con *Schistosoma mansoni* se refieren a él como sustrato para catepsina L, mientras que Loukas y Maizels (Loukas et al., 1998) en *T. canis* hablan de un sustrato para catepsinas B y L. Sin embargo, parece que hemos medido solamente un tipo de catepsina con Z-FR-AMC, porque al pH óptimo de la catepsina B, pH 7,0 (figuras R63-R71), se mide menos actividad (figuras R52-R60) que con el sustrato específico para catepsina B (Z-RR-AMC), y debería de ser al revés porque con Z-FR-AMC sería la suma de ambas catepsinas.

Las actividades medidas con los sustratos Z-FR-AMC y Z-RR-AMC presentan los pH óptimos, 5,5 y 7,0-7,5 respectivamente (figuras R52-R60, R63-R71), similares a los presentados en extractos de *T. canis* (5,0 y 6,5), pero desplazados ligeramente hacia arriba en la escala de pH. También coinciden en que con Z-FR-AMC es mayor que con Z-RR-AMC, pero los valores medidos son mucho menores (Loukas et al., 1998). Kamata y colaboradores (Kamata et al., 1995) aislaron una cisteín proteasa en *Nippostrongylus brasiliensis* con Z-FR-AMC como

sustrato preferente, y con pH óptimo 5,5. En *A. caninum* Dowd y colaboradores (Dowd et al., 1994) miden actividad con Z-FR-AMC y ninguna con Z-RR-AMC, por lo que concluyen que se trata de una catepsina L, o incluso una catepsina H (se ha documentado que puede utilizar este sustrato). La catepsina L de *A. caninum* es activa entre los pH 5,0 y 9,0, y aunque la actividad proteolítica de las catepsinas B y L se da en medios ácidos (Barrett y Kirschke 1981), hay antecedentes de varias cisteín proteasas liberadas por otros parásitos que son activas a pH neutros y alcalinos (Rege et al., 1989; Mbawa et al., 1992).

Loukas y Maizels (Loukas et al., 1998) proponen que las dos medidas distintas en *T. canis* con Z-FR-AMC y Z-RR-AMC también es posible que se deban a una única enzima que presente actividad frente a ambos sustratos, en la que a pH ácido tenga el residuo de glutamato característico de las catepsinas L protonado y presente una mayor afinidad por la fenilalanina de la posición P₂ del Z-FR-AMC, y a pH neutro o alcalino el mencionado residuo de glutamato permanezca desprotonado virando la afinidad hacia la arginina de la posición P₂ del Z-RR-AMC, aunque como ellos mismos afirman este hecho es difícil de demostrar. Por otro lado, Rehman y Jasmer (Rehman y Jasmer 1999) afirman que en *T. canis* parece que hay modificaciones en su catepsina L que la llevan a mostrar una actividad propia de catepsina B, lo cual parece que ocurre también en otros nematodos como las uncinarias, lo que hace pensar que tanto los sustratos convencionales como los inhibidores específicos de subclase de proteasa solamente ofrecen una información preliminar, al menos en los nematodos. No obstante se ha documentado la presencia tanto de catepsinas B como L en diferentes nematodos, y se ha visto que éstas se encuentran organizadas en varias familias multigénicas, como en *Ha. contortus* y *C. elegans* (Pratt et al., 1990; Rehman y Jasmer 1999; Jasmer et al., 2001; Shompole y Jasmer 2001).

Tal diversidad refleja una gran especialización funcional, o la necesidad de una digestión proteica rápida, o bien ambas cosas, ya que todas estas catepsinas tienen un papel potencial en la digestión de nutrientes. Rehman y Jasmer (Rehman y Jasmer 1999) sugieren que la amplificación selectiva y la evolución de los distintos linajes de catepsinas B han contribuido a las diferencias que hay para estas catepsinas entre los distintos grupos y especies de nematodos, y se piensa que su papel principal es el de digerir nutrientes, por eso existe tanta variabilidad interespecífica (temperatura, pH, sustrato óptimos, etc), para adaptarse al nicho ecológico que ocupa cada nematodo. En cualquier caso, lo más probable es que para *H. aduncum* se trate de enzimas distintas, ya que, observando las curvas de pH, las actividades se solapan y presentan valores diferentes según el sustrato, y ninguna parece que sea la suma de dos actividades (figuras R52-R60, R63-R71).

La actividad específica con Z-FR-AMC en L3 0h presenta dos óptimos, uno a pH 4,0 y otro a pH 5,5 (figura R52), lo cual sorprende si se tiene en cuenta que [con el BODIPY TR-X caseína en la L3 0h a pH 4,0 con DTT] la actividad era muy escasa (figura R1). Por lo que la contribución de la actividad Z-FR-AMC a la actividad proteolítica total debe ser pequeña, al menos en nuestras condiciones experimentales, así como a la actividad cisteín proteasa total

(figura R34). Se puede pensar que esta actividad, con pH óptimo 5,5, podría participar en la digestión, pues como se ha dicho, en estos animales ocurre a pH ácido (Delcroix et al., 2006). Con este perfil de expresión a lo largo del desarrollo (figuras R61, R62) es posible que se trate de una actividad que se expresa de manera constitutiva, con una función digestiva, y podría tratarse de una catepsina B. Las catepsinas B en nematodos están implicadas en la digestión de nutrientes. Hay una catepsina B que se expresa en el tubo digestivo de la larva y adulto de *Ha. contortus* y de *C. elegans*, y que está muy conservada tanto estructural como funcionalmente, por lo que parece que es importante para la nutrición en el filo Nematoda (Pratt et al., 1992; McKerrow 1994; Rehman y Jasmer 1999; Britton et al., 1999).

La actividad específica medida con Z-RR-AMC tiene su óptimo entre los pH 7,0 y 7,5 (figuras R63-R71). A ambos pH existen diferencias estadísticamente significativas entre los estados de desarrollo [$p < 0,001$ a pH 7,0 y $p = 0,003$ a pH 7,5 (tabla R21)], siendo menor la actividad en el cuarto estadio larvario y en el adulto. El perfil a lo largo del tiempo (figuras R72, R74) se asemeja al presentado por la actividad cisteín proteasa sensible a E64 a los pH 4,0 y 5,5 (figuras R28, R34), y probablemente esté también relacionada con el desarrollo anterior a la fase adulta y con las mudas M3 y M4. Si está relacionada con el desarrollo, no es probable que sea desde un punto de vista nutricional y digestivo, ya que su pH óptimo es neutro-alcalino. Las catepsinas L en nematodos están implicadas en el desarrollo. Algunos ejemplos de esto los encontramos en *Brugia pahangi* y *Brugia malayi* (Guiliano et al., 2004), en las que se han estudiado una serie de catepsinas L, que al compararlas con las correspondientes en *O. volvulus* y *C. elegans* (Lizotte-Waniewski et al., 2000; Hashmi et al., 2002), se ha llegado a la conclusión de que están implicadas en el remodelado de la cutícula y la cubierta del huevo. La función de esta actividad se conserva entre especies muy distintas de nematodos, estando quizás conservada en todo el filo. Puesto que, como ya hemos mencionado, algunas catepsinas L presentan actividad frente a un sustrato propio de catepsina B en nematodos (Rehman y Jasmer 1999), podríamos estar midiendo una catepsina L que, como las aquí citadas, podría estar implicada en el remodelado de tejidos del parásito.

1.3. Actividad proteolítica frente a DQ-colágeno tipo I

La actividad colagenasa ayuda a las células tumorales a invadir otros tejidos. Las colagenasas 1, 2 y 3 degradan los colágenos tipo I, II, III y VII, y se expresan en las células tumorales en grandes cantidades. La gelatinasa A también presenta actividad colagenasa y degrada los colágenos tipo I, IV y V, además de gelatina, y es expresada por las células tumorales de forma constitutiva (Elnor 2002). El sustrato utilizado en este trabajo, colágeno tipo I,

lo encontramos normalmente en el tejido conectivo del tracto gastrointestinal, por lo que si el parásito es capaz de degradarlo tiene la potencialidad de degradar la matriz extracelular, como hacen las células tumorales en los procesos de metástasis, y moverse por los tejidos del hospedador, pudiendo ser liberadas las colagenasas una vez que el extremo anterior del parásito haya avanzado lo suficiente en el tejido y el pH ácido del estómago no le afecte. También pueden ser utilizadas por el parásito a la hora de regresar al tracto digestivo tras permanecer en la cavidad visceral. En la L3 de *H. aduncum* hemos demostrado actividad colagenasa con un pH óptimo ligeramente ácido (pH 6,0), mientras que en los otros estados de desarrollo, L4 y adulto, es neutro (pH 7,0) (figuras R76-R84). Esto podría estar relacionado con la migración tisular en la L3, pero no en el resto de estados de desarrollo ya que éstos no migran a través de los tejidos.

Las colagenasas también pueden participar en el proceso de formación de la nueva cutícula de los nematodos y en la degradación de la antigua, aunque han de ser activadas y secretadas antes de su acción (Lee 2002). Cuando *Ha. contortus* se libera de la cutícula de la segunda muda, en el fluido contenido entre la nueva cutícula y la antigua se ha detectado una colagenasa que degrada las vainas de cutícula aisladas del *Ha. contortus* (Rogers y Brooks 1976; Rogers 1982; Sommerville 1982). Posteriormente se descubre que se trata de una metaloproteasa (Gamble et al., 1989), al igual que la mayoría de las colagenasas que hemos medido para *H. aduncum* en este trabajo (figuras R89, R95, R96). Existen otras proteasas con actividad colagenasa implicadas en los procesos de muda que presentan distintas funciones, como la degradación de las proteínas que anclan la cutícula a la epidermis subyacente (apolisis) (McKerrow 1994), la digestión de la cutícula reciclando parte de las proteínas que la componen para elaborar una nueva o para facilitar el desprendimiento de la cutícula vieja intacta (ecdisis) (Gamble et al., 1989), o el procesado de propéptidos antes de incorporarse como proteínas a la nueva cutícula (Page 2001).

Los óptimos de actividad colagenasa están entre los pH 6,5 y 7,0, y si pensamos que en el lumen intestinal del parásito hay un pH ácido [como se ha insinuado en otros nematodos (Van den Bossche y Borgers 1973; Williamson et al., 2003b; Delcroix et al., 2006) y como se puede presuponer por los pH óptimos de la actividad proteolítica medida (pH 4,0-5,5) (figuras R1-R9)], la actividad colagenasa medida en este trabajo (pH óptimo 6,5-7,0) presumiblemente no se liberaría al intestino. Es más probable que o bien se libere al exterior (la L3 para atravesar tejidos) y/o actúe en la cutícula desde el interior del parásito (en las mudas M3, M4 y crecimiento del helminto).

Se ve que la actividad colagenasa es mayor cuando no hay pepsina en el medio (figuras R86, R88), con diferencias estadísticamente significativas a pH 6,5 ($p=0,011$) (tabla R27). Parte de esta actividad medida podría estar implicada en la digestión de colágenos para el suministro de los aminoácidos necesarios para los colágenos de la cutícula y otras estructuras, y así se compensaría de este modo el déficit de materia prima impuesto por la carencia de actividad pepsina en el medio de cultivo. La actividad es mayor en la L5J (figura R88); es posible que coincida con el momento de mayor crecimiento del nematodo para generar la cutícula del adulto.

La cutícula crece desde el centro del animal hacia los extremos, conforme crece el adulto, así, en la epidermis de la fase adulta de *As. suum* se han hallado enzimas que participan en la síntesis de colágenos de la cutícula, a pesar de que ya no habrá más mudas (Chvapil et al., 1970).

La mayor actividad colagenasa de tipo metaloproteasa (figura R90) a lo largo de todo el desarrollo del parásito en presencia de pepsina ($p=0,002$) (tabla R31), excepto cuando se alcanza la fase de adulto maduro, nos sugiere que esta actividad puede estar relacionada con los procesos de muda, crecimiento y maduración del parásito, al menos en cultivo.

Cuando se ha realizado la electroforesis, en gel de poliacrilamida copolimerizada con gelatina, de un extrato de *H. aduncum*, se han observado 3 bandas (figura R97), que muy posiblemente correspondan a colagenasas. Aunque alguna de ellas podría deberse a alguna serín proteasa con actividad gelatinolítica, como se ha observado en *An. simplex* (Morris y Sakanari 1994), ya que hemos detectado inhibición de la actividad colagenasa con AEBSF en *H. aduncum* (figura R91).

2. CATABOLISMO GLUCOLÍTICO Y FIJACIÓN DE CO₂ DURANTE EL DESARROLLO DE *Hysterothylacium aduncum*

Rogers (Rogers 1962) sugirió que una importante adaptación al parasitismo es la suspensión del desarrollo en el momento de la fase infectiva, junto con el requerimiento de que el hospedador proporcione el estímulo para la reactivación del desarrollo del parásito. En muchos casos estos estímulos son de tipo fisicoquímico, como la temperatura, la presión de CO₂ y el pH (Rogers 1958; Rogers 1966; Sommerville 1966). Muchos helmintos parásitos requieren una determinada presión de CO₂ en el ambiente, que actúa como estímulo en su desarrollo. En los nematodos este estímulo con mucha frecuencia afecta a la fase infectiva, a la que le sirve para reconocer el ambiente propicio en donde debe desarrollarse y completar su maduración y su ciclo de vida.

La fase infectiva de *H. aduncum* es la L3 aislada del pez y puesta en cultivo. Muchos nematodos gastrointestinales activan su muda y posterior desarrollo *in vitro* con una presión de CO₂ similar a la existente en el tracto digestivo del hospedador natural (Rogers 1960; Petronijević et al., 1985), como ocurre en otros nematodos anisákidos (Sommerville y Davey 1976; Mercer et al., 1986; Iglesias et al., 1997; Iglesias et al., 2001; Dávila et al., 2006). De hecho, en *An. simplex*, se ha observado que hay un descenso de la supervivencia de las larvas cuando la fase gaseosa del medio en el cual son cultivadas es aire, frente a cuando existe una presión del 5% de CO₂ en aire (Iglesias et al., 1997; Iglesias et al., 2001; Dávila et al., 2006). Y

en *H. aduncum* se ha observado que la presencia de CO₂ estimula la M3 y el desarrollo del parásito en el medio de cultivo (Iglesias et al., 2002). Esta situación podría estar relacionada con el hecho de que en los fluidos intestinales de muchos peces teleósteos los niveles del ión bicarbonato son elevados (Grosell et al., 2001), y en general es conocido que en el tracto gastrointestinal de los vertebrados, la presencia de CO₂ es significativa (Barrett 1981b). *Ascaris* spp., a pesar de desarrollarse en el huevo con un metabolismo aeróbico, completa su desarrollo en el tracto gastrointestinal de su hospedador cambiando a un metabolismo anaeróbico (Barrett 1981a). Este metabolismo se da también en otros helmintos intestinales, y podría darse también en *H. aduncum*, pues se desarrolla a adulto en el tracto gastrointestinal y se sabe que fija CO₂, mediante las enzimas PEPCK y PEPC, al menos durante su muda M3 (Iglesias et al., 2005). Se ha sugerido que en los helmintos gastrointestinales la fijación de CO₂ es una respuesta adaptativa a la alta pCO₂ que hay en el tracto digestivo (Barrett 1981a). Esta situación puede ser la que se dé en *H. aduncum*. La fijación de CO₂ le sirve al parásito además para la generación de energía a partir de la degradación de los carbohidratos, pues se genera nucleótido trifosfatado, como ocurre en otros helmintos gastrointestinales (Barrett 1981a).

Si observamos el conjunto de la actividad fijadora de CO₂ medida (figura R103), el patrón es similar al que ofrece la PEPCK (figuras R98), debido a su mayor contribución en relación a la PEPC (figuras R99), que compensa la disminución de la actividad PEPCK conforme avanza el desarrollo. En cualquier caso se ha sugerido que es la principal responsable de la fijación de CO₂ en *An. simplex* e *H. aduncum* (Iglesias et al., 2005).

Existen diferencias estadísticamente significativas en la actividad PEPCK entre los estados de desarrollo ($p=0,001$) (tabla R34), siendo más relevante la AE en la L3 0h (figura R98), como ya se había comprobado previamente al estudiar la actividad de esta enzima durante la muda M3 (Iglesias et al., 2005). Esta situación podría deberse a que la L3 0h hasta el momento del aislamiento habitaba en la cavidad peritoneal del pez, un lugar en donde la pCO₂ es baja, pues en la sangre y tejidos de los vertebrados acuáticos es más baja que en los terrestres a causa de la solubilidad del CO₂ en el agua (Barrett 1981b). La baja presión de este gas en ese entorno puede provocar que la L3 0h necesite expresar una mayor cantidad de PEPCK para captar el CO₂ que necesite. Por otro lado, si la L3 de *H. aduncum*, como la de *Ascaris* sp., tuviese elementos característicos del metabolismo aerobio (Komuniecki y Vanover 1987), podría utilizar el oxígeno disponible en la cavidad peritoneal para obtener energía, por lo que esta no sería una razón fundamental para fijar CO₂. Desde este punto de vista la elevada actividad de PEPCK en L3 0h, quizá por una alta expresión de la enzima, serviría para fijar CO₂ a una baja presión y también le serviría a la larva para reaccionar inmediatamente en cuanto se encuentre en un ambiente con una elevada pCO₂, como son el intestino de su hospedador definitivo o nuestro cultivo *in vitro*. Tras la activación del desarrollo en la L3, la actividad decae progresivamente hasta alcanzar el estado adulto, en el que se mantiene constante. En *An. simplex* se ha medido dicha actividad y se repite esta misma situación con unos valores similares (Iglesias et al., 2005; Dávila et al., 2006), sin embargo en *As. suum* (también *in vitro*) L3 y adulto

tienen valores similares pero en la L4 hay un incremento significativo con respecto a la L3 (Vanover-Dettling y Komuniecki 1989).

Hemos medido también actividad PEPC. Esta enzima supone una vía alternativa a la PEPCK para la fijación de CO₂, mientras que PC y EM (en sentido carboxilante) no se han detectado (ver apartados V 2.4., V 2.5. y tabla R33). Para PEPC se da el caso contrario que para la PEPCK. Aunque existen diferencias estadísticamente significativas entre los estados de desarrollo ($p=0,010$) (tabla R34), en este caso la actividad en la L3 0h es mínima (figura R99). Parece que a diferencia de la PEPCK no participa en la recepción de la señal que supone el CO₂, sino que aparece en respuesta a la nueva situación en la que se encuentra el parásito (activación del desarrollo en un ambiente con CO₂), contribuyendo a la fijación de CO₂. Así, la PEPC va aumentando los niveles de actividad conforme el nematodo avanza en su desarrollo. Quizá esta enzima, que produce OAA, cubre la demanda de éste para síntesis de aminoácidos u otros destinos, en una ruta sin producción de nucleótidos trifosfatados.

Para la MDH no se han hallado diferencias significativas entre los distintos estados de desarrollo ($p=0,173$) (tabla R34). Pero observando la AE durante el desarrollo (figura R100) se ve que la mayor actividad aparece en L3 0h, y en el resto se mantiene aproximadamente constante. Es un perfil similar al de la PEPCK (figura R98). Al ser la AE de la MDH más elevada, se puede consumir todo el OAA generado en la carboxilación del PEP, permitiendo que la fijación de CO₂ continúe realizándose. Además, al consumir OAA también contribuye a regenerar NAD⁺, participando en la regulación del balance redox ($[NADH]/[NAD^+]$) del citosol como ocurre en *A. suum* (Barrett 1981a). Este escenario es factible ya que la MDH en helmintos generalmente tiene mucha más tendencia a reducir OAA que a oxidar malato (Oya et al., 1965; Prichard y Schofield 1968; Rotmans 1978; Pappas y Schroeder 1979), mientras que en los tejidos del hospedador se da la situación contraria (Prichard y Schofield 1968). En otros helmintos como *Ha. contortus* (Ward y Schofield 1967) o *S. mansoni* (Rotmans 1978) esta enzima es mucho más abundante en el citoplasma que en la mitocondria y, de hecho, en *As. lumbricoides* el 96,9% de la actividad ocurre en el citosol (Barrett y Beis 1973), como posiblemente ocurra en *H. aduncum*. Dubinský y Ryboš (Dubinský y Ryboš 1981) señalan que una característica de la MDH en helmintos es que varía según la presión de oxígeno del lugar en donde vive el parásito, siendo menor la actividad en donde la pO₂ es más elevada. La AE de la MDH en *H. aduncum*, se puede considerar moderada o ligeramente elevada (figura R100). Es más elevada que la más alta de *S. mansoni* (vive en los vasos sanguíneos) (Bueding y Saz 1968) y más baja que en *Syphacia muris* (vive en el ciego intestinal) (Van den Bossche et al., 1971). En cualquier caso, nosotros cultivamos en presencia de O₂ (el que se halla en el aire), es decir, que si es cierto que el O₂ inhibe la actividad MDH, probablemente medimos menos actividad de la que debe darse en condiciones naturales.

Según Barret (Barrett 1981a), la relación de las actividades enzimáticas PK/PEPCK medidas bajo condiciones óptimas, es indicativa de la predominancia del metabolismo glucolítico (relación = [2-10]) o de la fijación de CO₂ (relación = [0,01-0,5]) en los helmintos parásitos. Así,

H. aduncum parece que es fijador de CO₂, puesto que esta relación permanece por debajo de 0,5 excepto en los estados de L4 y L5J, donde es inferior a 0,75 (figura R104). Este comportamiento está más en relación con la variación de la actividad PK (figura R101) que con la disminución real de la capacidad fijadora de CO₂ (figuras R98, R103). En la L3 y adulto de *As. suum* los valores determinados de PK son mucho menores que los encontrados para estos mismos estadios en *H. aduncum*, pero siguen el mismo patrón (Saz et al., 1968; Bueding y Saz 1968). En *H. aduncum* la PK incrementa su actividad paralelamente al avance del desarrollo de la larva, hasta alcanzar el estadio adulto, justo a partir de éste y durante el cual desciende a su nivel más bajo, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los estados de desarrollo ($p=0,003$) (tabla R34). Es probable que en esos momentos de su desarrollo en que la actividad PK es más alta, el consumo de glucosa sea más elevado y se use el PEP, sobrante de la fijación, por la PK para cubrir una mayor demanda de energía causada, entre otros motivos, por el crecimiento del parásito, la maduración sexual y la formación de huevos. El metabolismo de los carbohidratos de *An. simplex* está asociado a la actividad de las glucosidasas, que son más activas durante la fase de L4 que durante la L3 (Dziekonska-Rynko et al., 2003). Zóltowska y colaboradores (Zóltowska et al., 2000) y Łopieńska y colaboradores (Lopienka et al., 2001) observaron que la α -amilasa presenta dos veces más de actividad en la L4 que en la L3, por lo que relacionan el cambio de hospedador poiquilotermo (intermediario/paraténico) a otro homeotermo (definitivo) con la posible movilización de las reservas endógenas de carbohidratos. Este cambio de hospedador implica necesariamente el desarrollo hasta adulto y maduración en el hospedador definitivo. En las hembras de *H. aduncum* el crecimiento es mayor y el proceso de maduración más largo que en los machos, como ocurre en *An. simplex* (van Banning 1971), debido a la producción de huevos, por lo que la movilización de reservas y la demanda de energía será también mayor. Es más en *An. simplex*, *C. osculatum* y *P. decipiens* se ha demostrado que el tamaño de la hembra adulta está correlacionado con su fecundidad (Marcogliese 1997; Herreras 2006). En este sentido, se ha demostrado que en el ovario de *As. suum* las reservas de glucógeno son bastante mayores que en el testículo (Dubinský et al., 1980), y que los huevos emplean el glucógeno como reserva energética (Barrett et al., 1970). Una gran producción de huevos es una estrategia de supervivencia en otras especies de ascaridoideos (Wharton 2002), y seguramente en *H. aduncum* también lo sea, pues su producción es considerable (Iglesias 1999), como en otros anisákidos (Marcogliese 1997; Herreras 2006). Hembras grávidas de *H. aduncum* aisladas de blenio (*Zoarces viviparus*) estuvieron poniendo huevos durante un mes en agua de mar esterilizada, tras lo cual murieron (Køie 1993), por lo que debieron de sobrevivir sin nutrientes durante ese tiempo gracias a las reservas acumuladas con anterioridad.

La actividad LDH es la responsable de la producción de lactato, a partir de piruvato, en el parásito. La actividad baja de L3 0h a L3 48h, para luego subir hasta los niveles iniciales (figura R102), en los que se mantiene. A pesar de estas variaciones en todo momento la actividad está por encima de la mostrada por la PK, por lo que se podría retirar todo el piruvato generado por la

PK (figura R101), en caso de que aquél no sea derivado hacia otra ruta. En otros nematodos la LDH participa junto con la MDH en la regulación del balance redox ($[NADH]/[NAD^+]$) en el citoplasma (Barrett 1981a), y de igual modo podría actuar en *H. aduncum*. Los valores de actividad LDH son mayores que los hallados en la L3 de *As. suum*, mientras que para el adulto son algo menores (Saz et al., 1968). En *As. suum* también va de menos a más entre la L3 y el adulto, pero la variación entre ambas fases es mucho mayor que en *H. aduncum*. A pesar de que se mide una AE de LDH en el adulto de *As. suum* significativa, en cambio el lactato no aparece como producto final, aunque sí lo hace en *Parascaris equorum*, otro ascárido gastrointestinal (de équido) (Barrett 1981a).

Como ya hemos comentado, bajo nuestras condiciones experimentales no se ha detectado actividad EM carboxilante en *H. aduncum*, a pesar de que previamente se había detectado en nuestro laboratorio mediante electroforesis en gel de almidón dos isoenzimas en sentido descarboxilante (Iglesias 1999). No debe desempeñar ningún papel en la fijación de CO₂, aunque en su sentido descarboxilante tiene un rol muy importante en la dismutación del malato en la mitocondria de los helmintos gastrointestinales como *As. suum* (Landsperger y Harris 1976; Barrett 1981a).

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1.- Todas las fases de desarrollo estudiadas de *Hysterothylacium aduncum* muestran actividad proteasa con unos pH óptimos situados entre 4,0 y 6,0. Esta actividad proteolítica es la primera vez que se describe.

2.- La fase L3 0h de *H. aduncum* presenta una actividad proteolítica de tipo metaloproteasa cuyo pH óptimo es 4,0, no presente en las otras fases de desarrollo del parásito estudiadas. Esta actividad es coherente con la fisiología del parásito que en esta fase es capaz de atravesar la mucosa gástrica a pH ácido, para pasar a la cavidad peritoneal de su pez hospedador intermediario o paraténico.

3.- Las fases de desarrollo de *H. aduncum* desde L3-48h hasta adulto maduro (L5) muestran actividad proteolítica a cualquier pH de la escala ácida ensayado, siendo siempre mayor en la fase L3-48h. En esta actividad proteolítica predomina la expresión de aspártico proteasas a los pH más ácidos (3,0-4,0) y de metaloproteasas a los pH entre 5,5 y 7,0. Esta situación es compatible con la fisiología del parásito, ya que esta actividad proteolítica parece tener una función digestiva, útil tanto al pH ácido del estómago como al menos ácido del inicio del intestino, para todas las fases cuyo hábitat es el tracto gastrointestinal.

4.- Todas las fases de desarrollo de *H. aduncum* muestran actividad catepsina B/L, descrita por vez primera en este parásito.

5.- Todas las fases de desarrollo de *H. aduncum* muestran actividad colagenasa, siendo la primera vez que se describe.

6.- Las fases L3 0h y L3 48h presentan su máxima actividad colagenasa a pH 6,5, mientras que las fases L4 y adulta la presentan a pH 7,0. Cuando el parásito se cultiva en presencia de pepsina, la actividad se reduce en más de un tercio, indicando que la ausencia de pepsina estimula la expresión o la actividad colagenasa. La máxima actividad colagenasa tiene lugar en la fase adulta juvenil (L5J). El pH óptimo de esta actividad es consistente, al menos en la fase L3, con su papel histolítico para atravesar los tejidos del hospedador y llegar a la cavidad peritoneal o desde ésta al lumen intestinal.

7.- El componente mayoritario de la actividad colagenasa es de tipo metaloproteasa, aunque en las fases L4 y adulta entre el 10 y el 20% de actividad es de tipo serín proteasa.

8.- Todas las fases de desarrollo de *H. aduncum* muestran capacidad fijadora de CO₂ gracias a la actividad de los enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31) y, sobre todo, fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK; EC 4.1.1.32), especialmente en las primeras fases del

desarrollo (L3). Es la primera vez que se describe la actividad de estas enzimas en la fase adulta del parásito.

9.- No se ha demostrado actividad piruvato carboxilasa (PC; EC 6.4.1.1) ni enzima málica (EM; EC 1.1.1.39) en sentido carboxilante, en ninguna de las fases de desarrollo de *H. aduncum*, por lo que se puede concluir que estas enzimas no están implicados en la fijación de CO₂ de este helminto, al menos en las fases estudiadas, a pesar de haberse demostrado previamente la existencia de actividad enzima málica descarboxilante en este parásito.

10.- Es la primera vez que se describe actividad piruvato quinasa (PK; EC 2.7.1.40), lactato deshidrogenasa (LDH; EC 1.1.1.27) y malato deshidrogenasa (MDH; EC 1.1.1.37) en *H. aduncum*, habiéndose detectado en todas las fases de desarrollo estudiadas.

11.- Podemos calificar *H. aduncum*, al menos en las fases estudiadas, como helminto fijador de CO₂, en contraste con su capacidad fermentadora, de acuerdo con la ratio de actividades PK/PEPCK propuesta por Barrett en 1981. En este sentido, la razón de actividades LDH/MDH, complementaria a la anterior, avala esta conclusión al mantenerse siempre por debajo de 0,5 durante el desarrollo estudiado.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Erreish G.M. y Peanasky R.J. (1974) Pepsin inhibitors from *Ascaris lumbricoides*. Isolation, purification, and some properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 249: 1558-1565.
- Adroher F.J., Valero A., Ruíz-Valero J. y Iglesias L. (1996) Larval anisakids (Nematoda: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada (Spain). *Parasitology Research*, 82: 253-256.
- Álvarez F., Iglesias R., Paramá A.I., Leiro J. y Sanmartín M. (2002) Abdominal macroparasites of commercially important flatfishes (Teleostei: Scophthalmidae, Pleuronectidae, Soleidae) in northwest Spain (ICES IXa). *Aquaculture*, 213: 31-53.
- Andersen K. (1993) *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1862) infection in cod from the Oslofjord: seasonal occurrence of third- and fourth-stage larvae as well as adult worms. *Parasitology Research*, 79: 67-72.
- Anderson R.C. (2000) Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission, C.A.B. International, Oxon.
- Anderson R.C. y Bartlett C.M. (1993) The significance of precocity in the transmission of the nematode parasites of vertebrates. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, 71: 1917-1922.
- Andrade C.M., Ferreira M.F. y Ribeiro L.P. (1983) Cytosolic malate dehydrogenase in muscle extracts of *Toxocara canis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75B: 147-152.
- Annabaeva G.D. y Soprunov F.F. (1975) Das phosphopyruvat-carboxylase-system in den gewebe von *Ascaris suum* und *Fasciola hepatica*. *Angewandte Parasitologie*, 16: 170-176.
- Babin D.R., Peanasky R.J. y Goos S.M. (1984) The isoinhibitors of chymotrypsin/elastase from *Ascaris lumbricoides*: the primary structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 232: 143-161.
- Balbuena J.A., Karlsbakk E., Kvenseth A.M., Saksvik M. y Nylund A. (2000) Growth and emigration of third-stage larvae of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in larval herring *Clupea harengus*. *The Journal of Parasitology*, 86: 1271-1275.
- Balbuena J.A., Karlsbakk E., Saksvik M., Kvenseth A.M. y Nylund A. (1998) New data on the early development of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda, Anisakidae). *The Journal of Parasitology*, 84: 615-617.
- Banu M.J., Dhandayuthapani S. y Nellaiappan K. (1991) Intermediary carbohydrate metabolism in the adult filarial worm *Setaria digitata*. *International Journal for Parasitology*, 21: 795-799.
- Barrett, A.J. (2001) Proteolytic enzymes: Nomenclature and classification. En: *Proteolytic enzymes* (2nd ed.) (A Practical Approach, vol. 247), Beyon, R. J. and Bond, J. S. ed. Oxford University Press. New York. pp. 1-21.
- Barrett A.J. y Kirschke H. (1981) Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods in Enzymology*, 80 Pt C: 535-561.

- Barrett J. (1981a) Catabolism and energy production. En: Biochemistry of parasitic helminths, (Barrett J., ed.), pp. 72-148, Macmillan Publishers Ltd., London.
- Barrett J. (1981b) Introduction to parasite biochemistry. En: Biochemistry of parasitic helminths, (Barrett J., ed.), pp. 1-11, Macmillan Publishers Ltd., London.
- Barrett J. (1981c) Nutrition and biosynthesis. En: Biochemistry of parasitic helminths, (Barrett J., ed.), pp. 149-244, Macmillan Publishers Ltd., London.
- Barrett J. y Beis I. (1973) The redox state of the free nicotinamide-adenine dinucleotide couple in the cytoplasm and mitochondria of muscle tissue from *Ascaris lumbricoides* (Nematoda). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 44A: 331-340.
- Barrett J., Ward C.W. y Fairbairn D. (1970) The glyoxylate cycle and the conversion of triglycerides to carbohydrates in developing eggs of *Ascaris lumbricoides*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 35: 577-586.
- Behm C.A. y Bryant C. (1975) Studies of regulatory metabolism in *Moniezia expansa*: the role of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *International Journal for Parasitology*, 5: 347-354.
- Bergmeyer H.U. y Bernt E. (1974) UV assay for lactate dehydrogenase with pyruvate and NADH. En: *Methods of enzymatic analysis*, (Bergmeyer H.U., ed.), pp. 574-578, Verlag-Chemie Academic Press, New York.
- Berland B. (1961) Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*, 2: 1-52.
- Berland B. (1987) Helminth problems in sea-water aquaculture. En: *Parasites and diseases in natural waters and aquaculture in Nordic countries*, (Stenmark E. & Malmberg G., eds.), pp. 56-62, Zoo-tax, Naturhistoriska Riksmuseet, Stockholm, Sweden.
- Berti P.J. y Storer A.C. (1995) Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *Journal of Molecular Biology*, 246: 273-283.
- Beynon, R.J. & Salvesen, G. (2001) Commercially available proteinase inhibitors. En: *Proteolytic Enzymes (2nd ed.) (A Practical Approach, vol. 247)*, Beynon, R. J. and Bond, J. S. ed. Oxford University Press. New York. pp. 317-330.
- Bird A.F. y Bird J. (1991) *The structure of nematodes*, 2^a edn., Academic Press, San Diego CA.
- Bond J.S. y Butler P.E. (1987) Intracellular proteases. *Annual Review of Biochemistry*, 56: 333-364.
- Bradford M.M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bricknell I.R., Bron J.E. y Bowden T.J. (2006) Diseases of gadoid fish in cultivation: a review. *ICES Journal of Marine Science*, 63: 253-266.
- Brindley P.J., Gam A.A., McKerrow J.H. y Neva F.A. (1995) Ss40: the zinc endopeptidase secreted by infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. *Experimental Parasitology*, 80: 1-7.

- Britton C., McKerrow J.H. y Johnstone I.L. (1998) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* gut cysteine protease gene *cpr-1*: requirement for GATA motifs. *Journal of Molecular Biology*, 283: 15-27.
- Britton C. y Murray L. (2002) A cathepsin L protease essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 122: 21-33.
- Britton C., Redmond D.L., Knox D.P., McKerrow J.H. y Barry J.D. (1999) Identification of promoter elements of parasite nematode genes in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 103: 171-181.
- Brown A., Burleigh J.M., Billett E.E. y Pritchard D.I. (1995) An initial characterization of the proteolytic enzymes secreted by the adult stage of the human hookworm *Necator americanus*. *Parasitology*, 110: 555-563.
- Brown D.A. y Cook R.A. (1981) Role of metal cofactors in enzyme regulation. Differences in the regulatory properties of the *Escherichia coli* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate specific malic enzyme, depending on whether magnesium ion or manganese ion serves as divalent cation. *Biochemistry*, 20: 2503-2512.
- Bueding E. y Saz H.J. (1968) Pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities of *Ascaris* muscle, *Hymenolepis diminuta* and *Schistosoma mansoni*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 24: 511-518.
- Bush A.O., Fernández J.C., Esch G.W. y Seed R. (2001) Nematoda: the roundworms. En: Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites, pp. 160-196, Cambridge University Press, Cambridge.
- Caffrey C.R. y Ryan M.F. (1994) Characterisation of proteolytic activity of excretory-secretory products from adult *Strongylus vulgaris*. *Veterinary Parasitology*, 52: 285-296.
- Capello M., Clyne L.P., McPhedran P. y Hotez P.J. (1993) *Ancylostoma* Factor Xa inhibitor: Partial purification and its identification as a major hookworm-derived anticoagulant in vitro. *The Journal of Infectious Diseases*, 167: 1474-1477.
- Capello M., Vlasuk G.P., Bergum P.W., Huang S. y Hotez P.J. (1995) *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: A hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 6152-6156.
- Carvajal J., González L. y Toledo G. (1995) New record of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in salmonid cultured in sea farms from southern Chile. *Research and Reviews in Parasitology*, 55: 195-197.
- Cataldi de Flombaum M.A., Cannata J.J.B. y Cazzulo J.J. (1977) CO₂-fixing enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 58B: 67-69.
- Cazzulo J.J. (2003) Amino acid and protein metabolism. En: *Molecular Medical Parasitology*, (Marr J.J., Nilsen T.W. & Komuniecki R.W., eds.), pp. 171-197, Academic Press, London.

- Cazzulo J.J., Juan S.M. y Segura E.L. (1977) The malic enzyme from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of General Microbiology*, 99: 237-241.
- Cazzulo J.J., Valle E., Docampo R. y Cannata J.J. (1980) Intracellular distribution of carbon dioxide-fixing enzymes in *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. *Journal of General Microbiology*, 117: 271-274.
- Chenoweth J.F., Mc Gladdery S.E., Sindermann C.J., Sawyer T.K. y Bierr J.W. (1986) An investigation into the usefulness of parasites as tags for herring (*Clupea harengus*) stocks in the western north Atlantic, with emphasis on use of the larval nematode *Anisakis simplex*. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 7: 25-33.
- Chvapil M., Boucek M. y Ehrlich E. (1970) Differences in the protocollagen hydroxylase activities from *Ascaris* muscle and hypodermis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 140: 11-18.
- Cohen F.E., Gregoret L.M., Amiri P., Aldape K., Railey J. y McKerrow J.H. (1991) Arresting tissue invasion of a parasite by protease inhibitors chosen with the aid of computer modeling. *Biochemistry*, 30: 11221-11229.
- Cornish R.A., Wilkes J. y Mettrick D.F. (1981) A study of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Moniliformis dubius* (Acanthocephala). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2: 151-166.
- Criado-Fornelio A., de Armas-Serra C., Giménez-Pardo C., Casado-Escribano N., Jiménez-González A. y Rodríguez-Caabeiro F. (1992) Proteolytic enzymes from *Trichinella spiralis* larvae. *Veterinary Parasitology*, 45: 133-140.
- Culley F.J., Brown A., Conroy D.M., Sabroe I., Pritchard D.I. y Williams T.J. (2000) Eotaxin is specifically cleaved by hookworm metalloproteases preventing its action *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Immunology*, 165: 6447-6453.
- Dainichi T., Maekawa Y., Ishii K., Zhang T., Nashed B.F., Sakai T., Takashima M. y Himeno K. (2001) Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response. *Infection and Immunity*, 69: 7380-7386.
- Dalton J.P., Brindley P.J., Knox D.P., Brady C.P., Hotez P.J., Donnelly S., O'Neill S.M., Mulcahy G. y Loukas A. (2003) Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *International Journal for Parasitology*, 33: 621-640.
- Dalton J.P., Clough K.A., Jones M.K. y Brindley P.J. (1996) Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity*, 64: 1328-1334.
- Davey K.G. (1968) Molting in a parasitic nematode, *Phocanema decipiens*. IV. Ecdysis and its control. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, 46: 893-898.
- Dávila C., Malagón D., Valero A., Benítez R. y Adroher F.J. (2006) *Anisakis simplex*: CO₂-fixing enzymes and development throughout the *in vitro* cultivation from third larval stage to adult. *Experimental Parasitology*, 114: 10-15.
- Davis B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121: 404-427.

- Deardorff T.L. y Overstreet R.M. (1980) Review of *Hysterothylacium* and *Iheringascaris* (both previously = *Thynnascaris*) (Nematoda: Anisakidae) from the northern Gulf of Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 93: 1035-1079.
- Delcroix M., Sajid M., Caffrey C.R., Lim K.C., Dvorak J., Hsieh I., Bahgat M., Dissous C. y McKerrow J.H. (2006) A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 39316-39329.
- Díaz-López M., Moyano-López F.J., Alarcón-López F.J., García-Carreño F.L. y Navarrete del Toro M.A. (1998) Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electroforesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121b: 369-377.
- Dowd A.J., Dalton J.P., Loukas A.C., Prociw P. y Brindley P.J. (1994) Secretion of cysteine proteinase activity by the zoonotic hookworm *Ancylostoma caninum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51: 341-347.
- Drake L.J., Bianco A.E., Bundy D.A. y Ashall F. (1994) Characterization of peptidases of adult *Trichuris muris*. *Parasitology*, 109: 623-630.
- Dubinský P. y Ryboš M. (1981) Activity of malate dehydrogenase in the reproductive organs and muscles of *Ascaris suum*. *Helminthologia*, 18: 205-213.
- Dubinský P., Ryboš M. y Turceková L'. (1980) Distribution of glycogen in *Ascaris suum* and *Parascaris equorum* (Nematoda) males and females. *Zoologischer Anzeiger, Jena*, 204: 137-153.
- Dunn, B.M. (2001) Determination of protease mechanism. En: *Proteolytic enzymes (2nd ed.) (A Practical Approach, vol. 247)*, Beyon, R. J. and Bond, J. S. ed. Oxford University Press. New York. pp. 77-104.
- Duran E., Komuniecki R.W., Komuniecki P.R., Wheelock M.J., Klingbeil M.M., Ma Y.C. y Johnson K.R. (1993) Characterization of cDNA clones for the 2-methyl branched-chain enoyl-CoA reductase. An enzyme involved in branched-chain fatty acid synthesis in anaerobic mitochondria of the parasitic nematode *Ascaris suum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 22391-22396.
- Dziekońska-Rynko J., Rokicki J. y Jabłonowski Z. (1997a) The impact of animal and plant proteases on nematoda 3rd stage *Anisakis simplex* larvae. *Oceanological Studies*, 1: 103-107.
- Dziekońska-Rynko J., Rokicki J. y Jabłonowski Z. (1997b) Wpływ zarażenia larwami III stadium *Anisakis simplex* na aktywność proteaz w przewodzie pokarmowym świnek morskich [The influence of infection with III larval satage of *Anisakis simplex* on the activity of proteases in alimentary tract of guinea pigs]. *Wiadomosci Parazytologiczne*, 43: 425-430.
- Dziekonska-Rynko J., Rokicki J. y Jablonowski Z. (2003) Activity of selected hydrolases in excretion-secretion products and homogenates from L3 and L4 larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) parasiting herring. *Acta ichthyologica et piscatoria*, 33: 125-135.
- Elnor S.G. (2002) Human retinal pigment epithelial lysis of extracellular matrix: functional urokinase plasminogen activator receptor, collagenase, and elastase. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 100: 273-299.

- Esch G.W. y Fernández J.C. (1993) A functional biology of parasitism: ecological and a evolutionary implications, Chapman & Hall, London.
- Fagerholm H.P. (1982) Parasites of fish in Finland: IV. Nematodes. Acta Academiae Aboensis, Series B, 40: 1-128.
- Falcone F.H., Tetteh K.K., Hunt P., Blaxter M.L., Loukas A. y Maizels R.M. (2000) The new subfamily of cathepsin-Z-like protease genes includes *Tc-cpz-1*, a cysteine protease gene expressed in *Toxocara canis* adults and infective stage larvae. Experimental Parasitology, 94: 201-207.
- Fernández-Caldas E., Quirce S., Marañón F., Díez Gómez M.L., Gijón Botella H. y López Román R. (1998) Allergic cross-reactivity between third stage larvae of *Hysterothylacium aduncum* and *Anisakis simplex*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 101: 554-555.
- Fioravanti C.F. (1982) Mitochondrial malate dehydrogenase, decarboxylating ("malic" enzyme) and transhydrogenase activities of adult *Hymenolepis microstoma* (Cestoda). The Journal of Parasitology, 68: 213-220.
- Ford L., Guiliano D.B., Oksov Y., Debnath A.K., Liu J., Williams S.A., Blaxter M.L. y Lustigman S. (2005) Characterization of a novel filarial serine protease inhibitor, *Ov-SPI-1*, from *Onchocerca volvulus*, with potential multifunctional roles during development of the parasite. The Journal of Biological Chemistry, 280: 40845-40856.
- Gamble H.R., Purcell J.P. y Fetterer R.H. (1989) Purification of a 44 kilodalton protease which mediates the ecdysis of infective *Haemonchus contortus* larvae. Molecular and Biochemical Parasitology, 33: 49-58.
- García-Carreño F.L. (1992) Protease inhibition in theory and practice. Biotechnology Education, 3: 145-150.
- Geier G., Banaj H.J., Heid H., Bini L., Pallini V. y Zwilling R. (1999) Aspartyl proteases in *Caenorhabditis elegans*. Isolation, identification and characterization by a combined use of affinity chromatography, two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and databank analysis. European Journal of Biochemistry, 264: 872-879.
- Geldhof P., Claerebout E., Knox D.P., Agneessens J. y Vercruyse J. (2000) Proteinases released in vitro by the parasitic stages of the bovine abomasal nematode *Ostertagia ostertagi*. Parasitology, 121: 639-647.
- González L. (1998) The life cycle of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in Chilean marine farms. Aquaculture, 162: 173-186.
- González L. y Carvajal J. (1994) Parásitos en los cultivos marinos de salmónidos en el sur de Chile. Revista de Investigación Pesquera, 38: 87-96.
- Gronenborn A.M., Nilges M., Peanasky R.J. y Clore G.M. (1990) Sequential resonance assignment and secondary structure determination of the *Ascaris* trypsin inhibitor, a member of a novel class of proteinase inhibitors. Biochemistry, 29: 183-189.

- Grosell M., Laliberte C.N., Wood S., Jensen S.B. y Wood C.M. (2001) Intestinal HCO₃⁻ secretion in marine teleost fish: evidence for an apical rather than a basolateral Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24: 81-95.
- Guiliano D.B., Hong X., McKerrow J.H., Blaxter M.L., Oksov Y., Liu J., Ghedin E. y Lustigman S. (2004) A gene family of cathepsin L-like proteases of filarial nematodes are associated with larval molting and cuticle and eggshell remodeling. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 136: 227-242.
- Guillaume J. y Choubert G. (1999) Physiologie digestive et digestibilité des nutriments chez les poissons. En: *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*, (Guillaume J., Kaushik S., Bergot P. & Métailler R., eds.), pp. 489-INRA-IFREMER, Versailles (France).
- Haffner A., Guilavogui A.Z., Tischendorf F.W. y Brattig N.W. (1998) *Onchocerca volvulus*: microfilariae secrete elastinolytic and males nonelastinolytic matrix-degrading serine and metalloproteases. *Experimental Parasitology*, 90: 26-33.
- Harrop S.A., Prociv P. y Brindley P.J. (1996) *Acasp*, a gene encoding a cathepsin D-like aspartic protease from the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 227: 294-302.
- Hartwich G. (1957) Zur systematik der nematoden-superfamilien Ascaridoidea. *Zoologische Jahrbücher*, 3: 1171-1212.
- Hartwich G. (1974) Key to the genera of the Ascaridoidea. C.I.H. Keys to the nematode parasites of vertebrates, (Anderson R.C., Chabaud A.G., & Willmott S., eds.) Commonwealth Agriculture Bureaux,
- Hartwich G. (1975) Schlauchwürmer, Nematelminthes rund- oder fadenwürmer, Nematoda parasitische rundwürmer von Wirbeltieren I. Rhabditida und Ascaridida (=Die Tierwelt Deutschlands, Teil 62), Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- Hashmi S., Britton C., Liu J., Guiliano D.B., Oksov Y. y Lustigman S. (2002) Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 3477-3486.
- Hashmi S., Zhang J., Oksov Y. y Lustigman S. (2004) The *Caenorhabditis elegans* cathepsin Z-like cysteine protease, Ce-CPZ-1, has a multifunctional role during the worms' development. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 6035-6045.
- Hawdon J.M., Emmons S.W. y Jacobson L.A. (1989) Regulation of proteinase levels in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Preferential depression by acute or chronic starvation. *The Biochemical Journal*, 264: 161-165.
- Hawdon J.M., Jones B.F., Perregaux M.A. y Hotez P.J. (1995) *Ancylostoma caninum*: metalloprotease release coincides with activation of infective larvae in vitro. *Experimental Parasitology*, 80: 205-211.
- Hawley J. y Peanasky R.J. (1992) *Ascaris suum*: are trypsin inhibitors involved in species specificity of Ascarid nematodes? *Experimental Parasitology*, 75: 112-118.

- Hemmingsen W., Halvorsen O. y MacKenzie K. (2000) The occurrence of some metazoan parasites of Atlantic cod, *Gadus morhua* L., in relation to age and sex of the host in Balsfjord (70 degrees N), North Norway. *Polar Biology*, 23: 368-372.
- Herreras M.V. (2006) Ecología de *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) en la marsopa común (*Phocoena phocoena*) y otros hospedadores. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Valencia (España).
- Hill D.E., Gamble H.R., Rhoads M.L., Fetterer R.H. y Urban J.F., Jr. (1993) *Trichuris suis*: a zinc metalloprotease from culture fluids of adult parasites. *Experimental Parasitology*, 77: 170-178.
- Hoeppli R. (1933) On histolytic changes and extra-intestinal digestion in parasitic infection. *Lingnam Science Journal*, 12, (Supl.): 1-11.
- Holt S.J. y Riddle D.L. (2003) SAGE surveys *C. elegans* carbohydrate metabolism: evidence for an anaerobic shift in the long-lived dauer larva. *Mechanisms of Ageing and Development*, 124: 779-800.
- Homandberg G.A., Litwiller R.D. y Peanasky R.J. (1989) Carboxypeptidase inhibitors from *Ascaris suum*: the primary structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 270: 153-161.
- Homandberg G.A. y Peanasky R.J. (1976) Characterization of proteins from *Ascaris lumbricoides* which bind specifically to carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 251: 2226-2233.
- Hong X., Bouvier J., Wong M.M., Yamagata G.Y. y McKerrow J.H. (1993) *Brugia pahangi*: identification and characterization of an aminopeptidase associated with larval molting. *Experimental Parasitology*, 76: 127-133.
- Hotez P.J., Capello M., Hawdon J., Beckers C. y Sakanari J.A. (1994) Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*: possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. *The Journal of Infectious Diseases*, 170: 918-926.
- Hotez P.J. y Cerami A. (1983) Secretion of a proteolytic anticoagulant by *Ancylostoma* hookworms. *The Journal of Experimental Medicine*, 157: 1594-1603.
- Hotez P.J., Haggerty J., Hawdon J., Milstone L., Gamble H.R., Schad G. y Richards F. (1990) Metalloproteases of infective *Ancylostoma* hookworm larvae and their possible functions in tissue invasion and ecdysis. *Infection and Immunity*, 58: 3883-3892.
- Hotez P.J. y Pritchard D.I. (1995) Hookworm infection. *Scientific American*, 272: 68-74.
- Hotez P.J., Trang N.L., McKerrow J.H. y Cerami A. (1985) Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 260: 7343-7348.
- Hsu H.F. (1933) Study on the oesophageal glands of parasitic nematoda superfamily Ascaroidea. *Chinese Medical Journal*, 47: 1247-1288.

- Huang W.Y. (1988) Anisakidés et anisakidoses humaines. Deuxième partie: Enquête sur les anisakidés de poissons commerciaux du marché parisien. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 63: 197-208.
- Huby F., Mallet S. y Hoste H. (1999) Role of acetylcholinesterase (AChE) secreted by parasitic nematodes on the growth of the cell line from epithelial origin HT29-D4. *Parasitology*, 118 (Pt 5): 489-498.
- Hurst R.J. (1984) Marine Invertebrate Hosts of New-Zealand Anisakidae (Nematoda). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 18: 187-196.
- Hussain H., Shukla O.P., Ghatak S. y Kaushal N.A. (1990) Enzymes of PEP-succinate pathway in *Setaria cervi* and effect of anthelmintic drugs. *Indian Journal of Experimental Biology*, 28: 871-875.
- Iglesias L. (1999) Estudios biológicos sobre *Anisakis simplex s.s e Hysterothylacium aduncum aduncum*. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Granada (España).
- Iglesias L., Malagón D., Valero A., Benítez R. y Adroher F.J. (2005) CO₂-fixing enzymes during moulting from third larval to fourth larval stage of *Anisakis simplex* and *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitology Research*, 96: 212-215.
- Iglesias L., Valero A. y Adroher F.J. (1997) Some factors which influence the in vitro maintenance of *Anisakis simplex* (Nematoda). *Folia Parasitologica*, 44: 297-301.
- Iglesias L., Valero A., Benítez R. y Adroher F.J. (2001) *In vitro* cultivation of *Anisakis simplex*: pepsin increase survival and moulting from fourth larval to adult stage. *Parasitology*, 123: 285-291.
- Iglesias L., Valero A., Gálvez L., Benítez R. y Adroher F.J. (2002) *In vitro* cultivation of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) from 3rd-stage larvae to egg-laying adults. *Parasitology*, 125: 467-475.
- Jablonowski Z., Romaniuk K., Piechocki D., Zoltowska K., Lukaszewicz-Babecka J. y Dziekonska-Rynko I.J. (1995) [Effect of hydrochloric acid on invasion of *Ascaris suum*; enzyme activity in the digestive system and serum of newborn piglets] (original en polaco). *Wiadomosci Parazytologiczne*, 41: 413-419.
- Janssen C.S., Tetley L. y Kennedy M.W. (1998) Developmental activation of infective *Trichinella spiralis* larvae. *Parasitology*, 117 (Pt 4): 363-371.
- Jasmer D.P., Roth J. y Myler P.J. (2001) Cathepsin B-like cysteine proteases and *Caenorhabditis elegans* homologues dominate gene products expressed in adult *Haemonchus contortus* intestine. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 116: 159-169.
- Jolodar A. y Miller D.J. (1998) Identification of a novel family of non-lysosomal aspartic proteases in nematodes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1382: 13-16.
- Jonas E., Ragyanski M., Olah J. y Borros L. (1983) Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis*, L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix*, VAL) and omnivorous (*Cyprinus carpio*, L.) fishes. *Aquaculture*, 30: 145-154.

- Jones B.F. y Hotez P.J. (2002) Molecular cloning and characterization of *Ac-mep-1*, a developmentally regulated gut luminal metalloendopeptidase from adult *Ancylostoma caninum* hookworms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 119: 107-106.
- Kamata I., Yamada M., Uchikawa R., Matsuda S. y Arizono N. (1995) Cysteine protease of the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* preferentially evokes an IgE/IgG1 antibody response in rats. *Clinical and Experimental Immunology*, 102: 71-77.
- Karanu F.N., Rurangirwa F.R., McGuire T.C. y Jasmer D.P. (1993) *Haemonchus contortus*: identification of proteases with diverse characteristics in adult worm excretory-secretory products. *Experimental Parasitology*, 77: 362-371.
- Karlsbakk E., Otterlei E., Hoie H. y Nylund A. (2001) Parasites of cultured cod (*Gadus morhua*) postlarvae fed natural zooplankton. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 21: 63-70.
- Karlsbakk E., Skajaa K. y Nylund A. (2003) Parasites of cultured herring (*Clupea harengus*) larvae fed natural zooplankton. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23: 25-34.
- Keilová H. y Tomásek V. (1972) Effect of pepsin inhibitor from *Ascaris lumbricoides* on cathepsin D and E. *Biochimica et Biophysica Acta*, 284: 461-464.
- Kita K. (1992) Electron-transfer complexes of mitochondria in *Ascaris suum*. *Parasitology Today*, 8: 155-159.
- Klimpel S. y Rückert S. (2005) Life cycle strategy of *Hysterothylacium aduncum* to become the most abundant anisakid fish nematode in the North Sea. *Parasitology Research*, 97: 141-149.
- Knox D.P. y Kennedy M.W. (1988) Proteinases released by the parasitic larval stages of *Ascaris suum*, and their inhibition by antibody. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 28: 207-216.
- Knox D.P., Redmond D.L. y Jones D.G. (1993) Characterization of proteinases in extracts of adult *Haemonchus contortus*, the ovine abomasal nematode. *Parasitology*, 106: 395-404.
- Knox D.P., Skuce P.J., Newlands G.F. y Redmond D.L. (2001) Nematode gut peptidases, proteins and vaccination. En: *Parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology*, (Kennedy M.W. & Harnett W., eds.), pp. 247-268, CABI Publishing, Wallingford-Oxon.
- Köhler P., Gisler J., Bachmann R. y Wild P. (1983) The localization of fumarase and malic enzyme in muscle mitochondria of *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 9: 329-336.
- Køie M. (1993) Aspects of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, 71: 1289-1296.
- Køie M. y Fagerholm H.P. (1995) The life cycle of *Contraecaecum osculatum* (Rudolphi, 1802) *sensu stricto* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in view of experimental infections. *Parasitology Research*, 81: 481-489.

- Koiwa H., Shade R.E., Zhu-Salzman K., D'Urzo M.P., Murdock L.L., Bressan R.A. y Hasegawa P.M. (2000) A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). FEBS Letters, 471: 67-70.
- Komuniecki P.R. y Vanover L. (1987) Biochemical changes during the aerobic-anaerobic transition in *Ascaris suum* larvae. Molecular and Biochemical Parasitology, 22: 241-248.
- Komuniecki R. y Harris B.G. (1995) Carbohydrate and energy metabolism in helminths. En: Biochemistry and molecular biology of parasites, (Marr J.J. & Müller M., eds.), pp. 49-66,
- Kumar S. y Pritchard D.I. (1992a) Secretion of metalloproteases by living infective larvae of *Necator americanus*. The Journal of Parasitology, 78: 917-919.
- Kumar S. y Pritchard D.I. (1992b) The partial characterization of proteases present in the excretory/secretory products and exsheathing fluid of the infective (L3) larva of *Necator americanus*. International Journal for Parasitology, 22: 563-572.
- Kumar S. y Pritchard D.I. (1993) New observations on proteases of the human hookworm *Necator americanus*. Biochemistry and Molecular Biology International, 30: 13-19.
- Lackey A., James E.R., Sakanari J.A., Resnick S.D., Brown M., Bianco A.E. y McKerrow J.H. (1989) Extracellular proteases of *Onchocerca*. Experimental Parasitology, 68: 176-185.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- Landsperger W.J., Fodge D.W. y Harris B.G. (1978) Kinetic and isotope partitioning studies on the NAD⁺-malic enzyme from *Ascaris suum*. The Journal of Biological Chemistry, 253: 1868-1873.
- Landsperger W.J. y Harris B.G. (1976) NAD⁺-malic enzyme. Regulatory properties of the enzyme from *Ascaris suum*. The Journal of Biological Chemistry, 251: 3599-3602.
- Laurent V., Brooks D.R., Coates D. y Isaac R.E. (2001) Functional expression and characterization of the cytoplasmic aminopeptidase P of *Caenorhabditis elegans*. European Journal of Biochemistry, 268: 5430-5438.
- Lee C.H. (1969) Studies on lactic dehydrogenase activities in developmental stages of fertilized eggs of *Ascaris Lumbricoides*. Kisaengchunghak Chapchi (The Korean Journal of Parasitology), 7: 43-47.
- Lee D.L. (1996) Why do some nematode parasites of the alimentary tract secrete acetylcholinesterase? International Journal for Parasitology, 26: 499-508.
- Lee D.L. (2002) Cuticle, moulting and exsheathment. En: The biology of nematodes, (Lee D.L., ed.), pp. 171-209, Taylor & Francis, Florence, KY, USA.
- Lee H.F., Chen I.L. y Lin R.P. (1973) Ultrastructure of the excretory system of *Anisakis* larva (Nematoda: Anisakidae). The Journal of Parasitology, 59: 289-298.

- León P., Monteoliva M. y Sánchez-Moreno M. (1988) Isoenzymes of malate dehydrogenase (E.C.1.1.1.37) of adult nematodes. *International Journal for Parasitology*, 18: 65-68.
- Lewert R.M. y Lee C.L. (1956) Quantitative studies of the collagenase-like enzyme of cercariae of *Schistosoma mansoni* and the larvae of *Strongyloides ratti*. *Journal of Infectious Diseases*, 99: 1-14.
- Lizotte-Waniewski M., Tawe W., Guiliano D.B., Lu W., Liu J., Williams S.A. y Lustigman S. (2000) Identification of potential vaccine and drug target candidates by expressed sequence tag analysis and immunoscreening of *Onchocerca volvulus* larval cDNA libraries. *Infection and Immunity*, 68: 3491-3501.
- Loiseau P.M., Gayral P. y Petek F. (1993) Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Molinema dessetae* (Nematoda: Filarioidea). *Parasitology*, 106 (Pt 1): 55-61.
- Łopieńska E., Żółtowska K. y Rokicki J. (2001) Porównanie własności α -amylazy z larw trzeciego i czwartego stadium *Anisakis simplex* [The comparison of properties of α -amylase from the third and fourth stage of *Anisakis simplex* larvae]. *Wiadomości Parazytologiczne*, 47: 323-327.
- Loukas A., Selzer P.M. y Maizels R.M. (1998) Characterisation of *Tc-clp-1*, a cathepsin L-like cysteine protease from *Toxocara canis* infective larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 92: 275-289.
- Lu C.C., Nguyen T., Morris S., Hill D. y Sakanari J.A. (1998) *Anisakis simplex*: mutational bursts in the reactive site centers of serine protease inhibitors from an ascarid nematode. *Experimental Parasitology*, 89: 257-261.
- Lustigman S. (1993) Molting, enzymes and new targets for chemotherapy of *Onchocerca volvulus*. *Parasitology Today*, 9: 294-297.
- Lustigman S., McKerrow J.H., Shah K., Lui J., Huima T., Houngh M. y Brotman B. (1996) Cloning of a cysteine protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 30181-30189 (Errata en: *The Journal of Biological Chemistry* 1997;272:4645).
- Lustigman S., Zhang J., Liu J., Oksov Y. y Hashmi S. (2004) RNA interference targeting cathepsin L and Z-like cysteine proteases of *Onchocerca volvulus* confirmed their essential function during L3 molting. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 138: 165-170.
- Ma Y.C., Funk M., Dunham W.R. y Komuniecki R. (1993) Purification and characterization of electron-transfer flavoprotein: ridoquinone oxidoreductase from anaerobic mitochondria of the adult parasitic nematode, *Ascaris suum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 20360-20365.
- Maki J. y Yanagisawa T. (1986) Demonstration of carboxyl and thiol protease activities in adult *Schistosoma mansoni*, *Dirofilaria immitis*, *Angiostrongylus cantonensis* and *Ascaris suum*. *Journal of Helminthology*, 60: 31-37.
- Mallick S., Harris B.G. y Cook P.F. (1991) Kinetic mechanism of NAD:malic enzyme from *Ascaris suum* in the direction of reductive carboxylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 2732-2738.

- Manoury B., Gregory W.F., Maizels R.M. y Watts C. (2001) *Bm-CPI-2*, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. *Current Biology*, 11: 447-451.
- Marcogliese D.J. (1996) Larval parasitic nematodes infecting marine crustaceans in eastern Canada. 3. *Hysterothylacium aduncum*. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 63: 12-18.
- Marcogliese D.J. (1997) Fecundity of sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infecting grey seals (*Halichoerus grypus*) in the Gulf of St. Lawrence, Canada: Lack of density-dependent effects. *International Journal for Parasitology*, 27: 1401-1409.
- Martínez González M.A. (2001) Comparación de más de dos medias: Análisis de la varianza (ANOVA). En: *Biostatística amigable*, (Martínez González M.A., de Irala Estévez J. & Faulín Fajardo F., eds.), pp. 289-341, Díaz de Santos, Madrid.
- Martínez González M.A. y Calasanz Abinzano M.J. (2001) Análisis de la varianza avanzado y modelos lineales generalizados. En: *Biostatística amigable*, (Martínez González M.A., de Irala Estévez J. & Faulín Fajardo F., eds.), pp. 343-382, Díaz de Santos, Madrid.
- Martínez González M.A. y Sánchez Villegas A. (2001) Probabilidad. Distribuciones de probabilidad y sus aplicaciones. En: *Bioestadística amigable*, (Martínez González M.A., de Irala Estévez J. & Faulín Fajardo F., eds.), pp. 61-116, Díaz de Santos, Madrid.
- Martzen M.R., McMullen B.A., Smith N.E., Fujikawa K. y Peanasky R.J. (1990) Primary structure of the major pepsin inhibitor from the intestinal parasitic nematode *Ascaris suum*. *Biochemistry*, 29: 7366-7372.
- Matsuda K. y Misaka E. (1975) Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. II. Comparative studies on multiple forms of cathepsin A. *Journal of Biochemistry*, 78: 31-39.
- Matthews B.E. (1984) The source, release and specificity of proteolytic enzyme activity produced by *Anisakis simplex* larvae (Nematoda: Ascaridida) *in vitro*. *Journal of Helminthology*, 58: 175-185.
- Mbawa Z.R., Gumm I.D., Shaw E. y Lonsdale-Eccles J.D. (1992) Characterisation of a cysteine protease from bloodstream forms of *Trypanosoma congolense*. *European Journal of Biochemistry*, 204: 371-379.
- McKelvey J.R. y Fioravanti C.F. (1984) Coupling of "malic" enzyme and NADPH:NAD transhydrogenase in the energetics of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 77B: 737-742.
- McKelvey J.R. y Fioravanti C.F. (1985) Intramitochondrial localization of fumarate reductase, NADPH---NAD transhydrogenase, 'malic' enzyme and fumarase in adult *Hymenolepis diminuta*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 17: 253-263.
- McKerrow J.H. (1989) Parasite proteases. *Experimental Parasitology*, 68: 111-115.
- McKerrow J.H. (1994) Cysteine proteases of parasites: a remarkable diversity of function. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 2: 437-444.

- McKerrow J.H. (1999) Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *International Journal for Parasitology*, 29: 833-837.
- McKerrow J.H., Brindley P., Brown M., Gam A.A., Staunton C. y Neva F.A. (1990) *Strongyloides stercoralis*: identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae. *Experimental Parasitology*, 70: 134-143.
- McKerrow J.H., Caffrey C.R., Kelly B., Loke P. y Sajid M. (2006) Proteases in parasitic diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1: 497-536.
- McKerrow J.H., Engel J.C. y Caffrey C.R. (1999) Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 7: 639-644.
- Measures L.N. y Hong H. (1995) The number of molts in the egg of sealworm, *Pseudoterranova Decipiens* (Nematoda: Ascaridoidea): an ultrastructural study. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 156-160.
- Mercer J.G., Munn A.E., Smith J.W. y Rees H.H. (1986) Cuticle production and ecdysis in larval marine ascaridoid nematodes *in vitro*. *Parasitology*, 92: 711-720.
- Monroy F.G., Cayzer C.J., Adams J.H. y Dobson C. (1989) Proteolytic enzymes in excretory-secretory products from adult *Nematospiroides dubius*. *International Journal for Parasitology*, 19: 129-131.
- Moravec F. y Nagasawa K. (2000) Some anisakid nematodes from marine fishes of Japan and the North Pacific Ocean. *Journal of Natural History*, 34: 1555-1574.
- Moravec F., Nagasawa K. y Urawa S. (1985) Some fish nematodes from fresh water in Hokkaido, Japan. *Folia Parasitologica*, 32: 305-316.
- Morris S.R. y Sakanari J.A. (1994) Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex*. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 27650-27656.
- Munn E.A. y Greenwood C.A. (1984) The occurrence of submicrovillar endotube (modified terminal web) and associated cytoskeletal structures in the intestinal epithelia of nematodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 306: 1-18.
- Munn E.A. y Munn P.D. (2002) Feeding and digestion. En: *The biology of nematodes*, (Lee D.L., ed.), pp. 211-232, Taylor & Francis, Florence, KY, USA.
- Murrell K.D., Eriksen L., Nansen P., Slotved H.C. y Rasmussen T. (1997) *Ascaris suum*: a revision of its early migratory path and implications for human ascariasis. *The Journal of Parasitology*, 83: 255-260.
- Navone G.T., Sardella N.H. y Timi J.T. (1998) Larvae and adults of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda: Anisakidae) in fishes and crustaceans in the South West Atlantic. *Parasite*, 5: 127-136.

- Newton S.E. (1995) Progress on vaccination against *Haemonchus contortus*. International Journal for Parasitology, 25: 1281-1289.
- Nguyen T.T., Qasim M.A., Morris S.R., Lu C.C., Hill D., Laskowski M.Jr. y Sakanari J.A. (1999) Expression and characterization of elastase inhibitors from the ascarid nematodes *Anisakis simplex* and *Ascaris suum*. Molecular and Biochemical Parasitology, 102: 79-89.
- Norris D.E. y Overstreet R.M. (1976) The public health implications of larval *Thynnascaris* nematodes from shellfish. Journal of Milk and Food Technology, 39: 47-54.
- Núñez de Castro I. (2001) Catálisis enzimática. En: Enzimología, pp. 69-99, Pirámide, Madrid.
- Overstreet R.M. y Meyer G.W. (1981) Hemorrhagic lesions in stomach of rhesus monkey caused by a piscine ascaridoid nematode. The Journal of Parasitology, 67: 226-235.
- Oya H., Kikuchi G., Bando T. y Hayashi H. (1965) Muscle tricarboxylic acid cycle in *Ascaris lumbricoides* var. *suis*. Experimental Parasitology, 17: 229-240.
- Page A.P. (2001) The nematode cuticle: synthesis, modification and mutants. En: Parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology, (Kennedy M.W. & Harnett W., eds.), pp. 167-194, CABI Publishing, Wallingford-Oxon.
- Pappas P.W. y Schroeder L.L. (1979) *Hymenolepis microstoma*: lactate and malate dehydrogenases of the adult worm. Experimental Parasitology, 47: 134-139.
- Park S.H., Kiick D.M., Harris B.G. y Cook P.F. (1984) Kinetic mechanism in the direction of oxidative decarboxilation for NAD-malic enzyme from *Ascaris suum*. Biochemistry, 23: 5446-5453.
- Peanasky R.J., Bentz Y., Homandberg G.A., Minor S.T. y Babin D.R. (1984) The isoinhibitors of chymotrypsin/elastase from *Ascaris lumbricoides*: the reactive site. Archives of Biochemistry and Biophysics, 232: 135-142.
- Petronijević T., Rogers W.P. y Sommerville R.I. (1985) Carbonic acid as the host signal for the development of parasitic stages of nematodes. International Journal for Parasitology, 15: 661-667.
- Petter A.J. (1969) Enquête sur les nematodes des sardines pêchées dans la région nantaise Rapport possible avec les granulomes eosinophiles observés chez l'homme dans la région. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, 44: 25-36.
- Petter A.J. y Cabaret J. (1995) Ascaridoid nematodes of teleostean fishes from the Eastern North Atlantic and seas of the North of Europe. Parasite Journal de la Société Française de Parasitologie, 2: 217-230.
- Petter A.J. y Maillard C. (1988) Larves d'Ascarides parasites de poissons en Méditerranée occidentale. Bulletin du Muséum National d'Histoire naturelle, 4 sér., 10 sec.A N°2: 347-369.
- Platzer E.G. (1980) Nematodes as biological control agents. California Agriculture, 34: 27-

- Pratt D., Armes L.G., Hageman R., Reynolds V., Boisvenue R.J. y Cox G.N. (1992) Cloning and sequence comparisons of four distinct cysteine proteases expressed by *Haemonchus contortus* adult worms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51: 209-218.
- Pratt D., Cox G.N., Milhausen M.J. y Boisvenue R.J. (1990) A developmentally regulated cysteine protease gene family in *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 43: 181-192.
- Prichard R.K. y Schofield P.J. (1968) A comparative study of the tricarboxylic acid cycle enzymes in *Fasciola hepatica* and rat liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 25: 1005-1019.
- Punt A. (1941) Recherches sur quelques nematode parasites de poissons de la mer du nord. *Bulletin du Muséum Royale d'Histoire naturelle de Belgique*, 98: 1-110.
- Ray C. y McKerrow J.H. (1992) Gut-specific and developmental expression of a *Caenorhabditis elegans* cysteine protease gene. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51: 239-249.
- Read A.F. y Skorping A. (1995) The evolution of tissue migration by parasitic nematode larvae. *Parasitology*, 111: 359-371.
- Rege A.A., Herrera P.R., López M. y Dresden M.H. (1989) Isolation and characterization of a cysteine proteinase from *Fasciola hepatica* adult worms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 35: 89-95.
- Rehman A. y Jasmer D.P. (1998) A tissue specific approach for analysis of membrane and secreted protein antigens from *Haemonchus contortus* gut and its application to diverse nematode species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 97: 55-68.
- Rehman A. y Jasmer D.P. (1999) Defined characteristics of cathepsin B-like proteins from nematodes: inferred functional diversity and phylogenetic relationships. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 102: 297-310.
- Rhoads M.L. y Fetterer R.H. (1997) Extracellular matrix: A tool for defining the extracorporeal function of parasite proteases. *Parasitology Today*, 13: 119-122.
- Rhoads M.L. y Fetterer R.H. (1998) Purification and characterisation of a secreted aminopeptidase from adult *Ascaris suum*. *International Journal for Parasitology*, 28: 1681-1690.
- Rhoads M.L., Fetterer R.H., Hill D.E. y Urban J.F.Jr. (2000) *Trichuris suis*: a secretory chymotrypsin/elastase inhibitor with potential as an immunomodulator. *Experimental Parasitology*, 95: 36-44.
- Rhoads M.L., Fetterer R.H. y Urban J.F., Jr. (1997) Secretion of an aminopeptidase during transition of third- to fourth-stage larvae of *Ascaris suum*. *The Journal of Parasitology*, 83: 780-784.
- Rhoads M.L., Fetterer R.H. y Urban J.F., Jr. (1998) Effect of protease class-specific inhibitors on in vitro development of the third- to fourth-stage larvae of *Ascaris suum*. *The Journal of Parasitology*, 84: 686-690.

- Rhoads M.L., Fetterer R.H. y Urban J.F., Jr. (2001) Release of hyaluronidase during *in vitro* development of *Ascaris suum* from the third to fourth larval stage. *Parasitology Research*, 87: 693-697.
- Richer J.K., Hunt W.G., Sakanari J.A. y Grieve R.B. (1993) *Dirofilaria immitis*: effect of fluoromethyl ketone cysteine protease inhibitors on the third- to fourth-stage molt. *Experimental Parasitology*, 76: 221-231.
- Richer J.K., Sakanari J.A., Frank G.R. y Grieve R.B. (1992) *Dirofilaria immitis*: proteases produced by third- and fourth-stage larvae. *Experimental Parasitology*, 75: 213-222.
- Roberts L.S. y Janovy J., Jr. (2005a) Nematodes: Ascaridida, intestinal large roundworms. En: Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' *Foundations of Parasitology*, 7^a edn., (Roberts L.S. & Janovy J., Jr., eds.), pp. 431-444, McGraw-Hill, New York.
- Roberts L.S. y Janovy J., Jr. (2005b) Phylum Nematoda: form, function, and classification. En: Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' *Foundations of Parasitology*, 7^a edn., (Roberts L.S. & Janovy J., Jr., eds.), pp. 367-396, McGraw-Hill, New York.
- Robertson B.D., Bianco A.T., McKerrow J.H. y Maizels R.M. (1989) *Toxocara canis*: proteolytic enzymes secreted by the infective larvae *in vitro*. *Experimental Parasitology*, 69: 30-36.
- Rocka A. (2006) Helminths of Antarctic fishes: Life cycle biology, specificity and geographical distribution. *Acta Parasitologica*, 51: 26-35.
- Rogers W.P. (1958) The physiology of the hatching of eggs of *Ascaris lumbricoides*. *Nature*, (Lond), 181: 1410-1411.
- Rogers W.P. (1960) The physiology of infective process of nematode parasites: the stimulus from the animal host. *Proceedings of the Royal Society, Series B*, 152: 367-386.
- Rogers W.P. (1961) The physiology of hatching of eggs of *Ascaridia galli*. *Journal of Helminthology*, R.T. Leiper Supplement: 151-156.
- Rogers W.P. (1962) The nature of parasitism. The relationship of some metazoan parasites to their hosts, Academic Press, New York.
- Rogers W.P. (1966) Reversible inhibition of a receptor governing infection with some nematodes. *Experimental Parasitology*, 19: 15-20.
- Rogers W.P. (1982) Enzymes in the exsheathing fluid of nematodes and their biological significance. *International Journal for Parasitology*, 12: 495-502.
- Rogers W.P. y Brooks F. (1976) Zinc as a co-factor for an enzyme involved in exsheathment of *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 6: 315-319.
- Rogers W.P. y Sommerville R.I. (1968) The infectious process, and its relation to the development of early parasitic stages of nematodes. *Advances in Parasitology*, 6: 327-348.
- Rohrer S.P., Saz H.J. y Nowak T. (1986) Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from the parasitic helminth *Ascaris suum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 261: 3049-3055.

- Rokicki J. (2005) Możliwość zamknięcia cyklu rozwojowego *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) i *Contraecaecum rudolphii* (Hartwich, 1964) (Nematoda) w wodach Zalewu Wiślanego [The possibility of completing the life cycle of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) and *Contraecaecum rudolphii* (Hartwich, 1964) (Nematoda) at the waters of Vistula Lagoon]. *Wiadomości Parazytologiczne*, 51: 239-241.
- Rotmans J.P. (1978) *Schistosoma mansoni*: purification and characterization of malate dehydrogenases. *Experimental Parasitology*, 46: 31-48.
- Ruitenbergh E.J. y Loendersloot H.J. (1971a) Enzymhistochemisch onderzoek van *Anisakis* sp. larven. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 96: 247-260.
- Ruitenbergh E.J. y Loendersloot H.J. (1971b) Histochemical properties of excretory organ of *Anisakis* sp. larva. *The Journal of Parasitology*, 57: 1149-1150.
- Ruíz-Valero J., Valero A., Adroher F.J. y Ortega J.E. (1992) Presencia de ascáridos en peces comerciales de frecuente consumo en Granada. En: *In Memoriam al Profesor Doctor D. F. de P. Martínez Gómez*, (Hernández S., ed.), pp. 335-349, Universidad de Córdoba, Córdoba (España).
- Rutherford T.A. y Webster J.M. (1974) Transcuticular uptake of glucose by the entomophilic nematode, *Mermis nigrescens*. *The Journal of Parasitology*, 60: 804-808.
- Rutherford T.A., Webster J.M. y Barlow J.S. (1977) Physiology of nutrient uptake by the entomophilic nematode *Mermis nigrescens* (Mermithidae). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, 55: 1773-1781.
- Rye L.A. y Baker M.R. (1992) The life history of *Hysterothylacium analarum* Rye and Baker, 1984 (Nematoda, Anisakidae) in *Lepomis gibbosus* (Pisces, Centrarchidae) in Southern Ontario, Canada. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, 70: 1576-1584.
- Sajid M. y McKerrow J.H. (2002) Cysteine proteases of parasitic organism. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120: 1-21.
- Sakanari J.A. (1990) *Anisakis* - from the platter to the microfuge. *Parasitology Today*, 6: 323-327.
- Sakanari J.A. y McKerrow J.H. (1990) Identification of the secreted neutral proteases from *Anisakis simplex*. *The Journal of Parasitology*, 76: 625-630.
- Salvesen, G. & Nagase, H. (2001) Inhibition of proteolytic enzymes. En: *Proteolytic Enzymes* (2nd ed.) (A Practical Approach, vol. 247), Beyon, R. J. and Bond, J. S. ed. Oxford University Press. New York. pp. 105-130.
- Sanmartín M.L., Quinteiro P. y Ubeira F.M. (1989) Nematode parasites of commercially important fish in NW Spain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 7: 75-77.
- Sarath, G., Zeece, M.G. & Penheiter, A.R. (2001) Protease assay methods. En: *Proteolytic Enzymes* (2nd ed.) (A Practical Approach, vol. 247), Beyon, R. J. and Bond, J. S. ed. Oxford University Press. New York. pp. 45-76.

- Sarkis G.J., Ashcom J.D., Hawdon J.M. y Jacobson L.A. (1988a) Decline in protease activities with age in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 45: 191-201.
- Sarkis G.J., Kurpiewski M.R., Ashcom J.D., Jen-Jacobson L. y Jacobson L.A. (1988b) Proteases of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 261: 80-90.
- Sato K., Yamaguchi H., Waki S., Suzuki M. y Nagai Y. (1995) *Dirofilaria immitis*: immunohistochemical localization of acid proteinase in the adult worm. *Experimental Parasitology*, 81: 63-71.
- Saz H.J., Lescure O.L. y Bueding E. (1968) Biochemical observations of *Ascaris Suum* lung-stage larvae. *The Journal of Parasitology*, 54: 457-461.
- Schanbacher L.M. y Beames C.G., Jr. (1978) Factors in the movement of hexose across the intestine of *Ascaris suum*. *The Journal of Parasitology*, 64: 89-92.
- Schechter I. y Berger A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27: 157-162.
- Selzer P.M., Pingel S., Hsieh I., Ugele B., Chan V.J., Engel J.C., Bogyo M., Russell D.G., Sakanari J.A. y McKerrow J.H. (1999) Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: Lessons from a parasite target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 11015-11022.
- Shompole S. y Jasmer D.P. (2001) Cathepsin B-like cysteine proteases confer intestinal cysteine protease activity in *Haemonchus contortus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 2928-2934.
- Smith S.K., Pettit D., Newlands G.F., Redmond D.L., Skuce P.J., Knox D.P. y Smith W.D. (1999) Further immunization and biochemical studies with a protective antigen complex from the microvillar membrane of the intestine of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology*, 21: 187-199.
- Smith T.S., Graham M., Munn E.A., Newton S.E., Knox D.P., Coadwell W.J., McMichael-Phillips D., Smith H., Smith W.D. y Oliver J.J. (1997) Cloning and characterization of a microsomal aminopeptidase from the intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1338: 295-306.
- Soleim O. (1984) A synopsis of the genera *Thynnascaris* and *Contraecaecum* (Nematoda, Ascaridoidea) with an emendation of the generic definitions. *Acta Parasitologica Polonica*, 29: 85-96.
- Sommerville R.I. (1966) The development of *Haemonchus contortus* to the fourth stage *in vitro*. *The Journal of Parasitology*, 52: 127-136.
- Sommerville R.I. (1982) The mechanics of moulting. En: *Aspects of parasitology*, (Meerovitch E., ed.), pp. 407-433, Montreal: the Institute of Parasitology, McGill University, Montreal.
- Sommerville R.I. y Davey K.G. (1976) Stimuli for cuticle formation and ecdysis *in vitro* of infective larva of *Anisakis* sp. (Nematoda: Ascaridoidea). *International Journal for Parasitology*, 6: 433-439.

- Stanfield G.M. y Villeneuve A.M. (2006) Regulation of sperm activation by SWM-1 is required for reproductive success of *C. elegans* males. *Current Biology*, 16: 252-263.
- Stassens P., Bergum P.W., Gansemans Y., Jespers L., Laroche Y., Huang S., Maki S., Messens J., Lauwereys M., Cappello M., Hotez P.J., Lasters I. y Vlasuk G.P. (1996) Anticoagulant repertoire of hookworm *Ancylostoma caninum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 2149-2154.
- Stoll, V.S. & Blanchard, J.S. (1990) Buffers: Principles and Practice. En: *Guide to Protein Purification (Methods in Enzymology, vol. 182)*, Deutscher, M. P. ed. Academic Press, Inc. San Diego. pp. 24-38.
- Sukhdeo M.V.K. y Sukhdeo S.C. (1994) Optimal habitat selection by helminths within the host environment. *Parasitology*, 109: 41-55.
- Takahashi K., Masuuchi S., Nakamura T., Ogura M. y Arima T. (1977) On a nematode from *Acanthogobius flavimanus* (2). Annual report of ecological survey of fisheries and shell-fishes in the inner area of Tokio Bay (Publicación de la Estación Metropolitana de Pesquerías Experimental de Tokio), 276: 89-93.
- Tamashiro W., Rao M. y Scott A. (1987) Proteolytic cleavage of IgG and other protein substrates by *Dirofilaria immitis* microfilarial enzymes. *The Journal of Parasitology*, 73: 149-154.
- Tejada P., Sánchez-Moreno M., Monteoliva M. y Gómez-Banqueri H. (1987) Inhibition of malate dehydrogenase enzymes by benzimidazole anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 24: 269-274.
- Todorova V.K. (2000) Proteolytic enzymes secreted by larval stage of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Folia Parasitologica*, 47: 141-145.
- Todorova V.K. y Stoyanov D.I. (2000) Partial characterization of serine proteinases secreted by adult *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*, 86: 684-687.
- Tort J., Brindley P.J., Knox D.P., Wolfe K.H. y Dalton J.P. (1999) Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Advances in Parasitology*, 43: 161-266.
- Unnikrishnan L.S. y Raj R.K. (1995) Transhydrogenase activities and malate dismutation linked to fumarate reductase system in the filarial parasite *Setaria digitata*. *International Journal for Parasitology*, 25: 779-785.
- Valentine W.N. y Tanaka K.R. (1966) Pyruvate kinase: clinical aspects. *Methods in Enzymology*, 9: 468-473.
- Valero A., Martín-Sánchez J., Reyes-Muelas E. y Adroher F.J. (2000) Larval anisakids parasitizing the blue whiting, *Micromesistius poutassou*, from Motril Bay in the Mediterranean region of southern Spain. *Journal of Helminthology*, 74: 361-364.
- van Banning P. (1971) Some notes on a successful rearing of the herring-worm, *Anisakis marina* L. (Nematoda: Heterocheilidae). *International Council for the Exploration of the Sea. Journal du Conseil*, 34: 84-88.
- van den Bossche H. y Borgers M. (1973) Subcellular distribution of digestive enzyme in *Ascaris suum* intestine. *International Journal for Parasitology*, 3: 59-65.

- van den Bossche H., Schaper J. y Borgers M. (1971) Some aspects of the carbohydrate metabolism of *Syphacia muris*, the rat pinworm. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 38B: 43-52.
- Vanover-Dettling L. y Komuniecki P.R. (1989) Effect of gas phase on carbohydrate metabolism in *Ascaris suum* larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36: 29-39.
- Vargas Morales A.M. (1978) Acidosis láctica y gluconeogénesis renal durante el ejercicio. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Granada (España).
- Vermeil C., Petter A.J., Morin O., Bodic M.F., Guegan J. y Kerneis J.P. (1975) Les granulomes eosinophiles signales et Bretagne represententils une forme d' anisakiase? Les larves de *Thynnascaris aduncum* ne permettent pas d' obtenir experimentalement ces granulomes. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 68: 79-83.
- Ward C.W. y Schofield P.J. (1967) Comparative activity and intracellular distribution of tricarboxylic acid cycle enzymes in *Haemonchus contortus* larvae and rat liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 23: 335-359.
- Wharton D.A. (2002) Nematode survival strategies. En: *The biology of nematodes*, (Lee D.L., ed.), pp. 389-412, Taylor & Francis, Florence, KY, USA.
- Wilkes J., Cornish R.A. y Mettrick D.F. (1981) Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *The Journal of Parasitology*, 67: 832-840.
- Williamson A.L., Brindley P.J., Abbenante G., Datu B.J., Prociv P., Berry C., Girdwood K., Pritchard D.I., Fairlie D.P., Hotez P.J., Zhan B. y Loukas A. (2003a) Hookworm aspartic protease, Na-APR-2, cleaves human hemoglobin and serum proteins in a host-specific fashion. *Journal of Infectious Diseases*, 187: 484-494.
- Williamson A.L., Brindley P.J., Abbenante G., Prociv P., Berry C., Girdwood K., Pritchard D.I., Fairlie D.P., Hotez P.J., Dalton J.P. y Loukas A. (2002) Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potential contribution to host specificity. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 16: 1458-1460.
- Williamson A.L., Brindley P.J., Knox D.P., Hotez P.J. y Loukas A. (2003b) Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends in Parasitology*, 19: 417-423.
- Williamson A.L., Lecchi P., Turk B.E., Choe Y., Hotez P.J., McKerrow J.H., Cantley L.C., Sajid M., Craik C.S. y Loukas A. (2004) A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 35950-35957.
- Willstätter R. y Bamann E. (1929) Über die proteasen der magenschleimhaut. Erste abhandlung über die enzyme der leukozyten. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 180: 127-143.
- Wilson R., Ainscough R., Anderson K., Baynes C., Berks M., Bonfield J., Burton J., Connell M., Copsey T., Cooper J. y otros (1994) 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature*, 368: 32-38.
- Wootton R. (1978) The occurrence of larval anisakid nematodes in small gadoids from Scottish waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 58: 347-356.

- Yagi K., Nagasawa K., Ishikura H., Nakagawa A., Sato N., Kikuchi K. y Ishikura H. (1996) Female worm *Hysterothylacium aduncum* excreted from human: a case report. *Japanese Journal of Parasitology*, 45: 12-23.
- Yasuda Y., Kageyama T., Akamine A., Shibata M., Kominami E., Uchiyama Y. y Yamamoto K. (1999) Characterization of new fluorogenic substrates for the rapid and sensitive assay of cathepsin E and cathepsin D. *The Journal of Biochemistry*, 125: 1137-1143.
- Yoshinaga T., Ogawa K. y Wakabayashi H. (1987) Experimental life cycle of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in fresh water. *Fish Pathology*, 22: 243-251.
- Yoshinaga T., Ogawa K. y Wakabayashi H. (1989) Life cycle of *Hysterothylacium haze* (Nematoda: Anisakidae: Raphidascaridinae). *Journal of Parasitology*, 75: 756-763.
- Young C.J., McKeand J.B. y Knox D.P. (1995) Proteinases released in vitro by the parasitic stages of *Teladorsagia circumcincta*, an ovine abomasal nematode. *Parasitology*, 110: 465-471.
- Zee D.S. y Zinkham W.H. (1968) Malate dehydrogenase in *Ascaris suum*: Characterization, ontogeny, and genetic control. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 126: 574-584.
- Ženka J. y Prokopic J. (1983) Activities of some enzymes in the perienteric fluid of *Ascaris suum*. *Folia Parasitologica*, 30: 373-376.
- Żółtowska K., Łopieńska E. y Rokicki J. (2000) Content of carbohydrates and activity of sugar metabolism enzymes present in III larvae of *Anisakis simplex*. *Acta Parasitologica*, 45: 186-
- Żółtowska K., Łopieńska E., Rokicki J. y Dmitryjuk M. (2002) The enzymes of glycogen and trehalose catabolism from *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae). *Folia Parasitologica*, 49: 239-242.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) en 2007 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/>).
- Dr. Joe Camp (Purdue University North Central), en 2007 (<http://www.faculty.pnc.edu/jcamp/parasit/nematode.html>).
- Sigma-Aldrich, en 2007 (<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/enzyme%20assay/l2625enz.pdf>).
- Worthington Biochemical Corporation, en 2007 (<http://www.worthington-biochem.com/MDH/default.html>).