

Comunicación corta  
**MODELACIÓN POR HOMOLOGÍA DE LA CATEPSINA B DE  
*Fasciola hepatica***

**D. Naranjo\*, Heydi Díaz de Arce \*, E. Pérez\*, P.A. Valiente\*\*\*, R.Carrasco\*\* y Siomara Martínez\***

*Laboratorios de Biología Molecular\* y Virología Animal\*, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: dany@censa.edu.cu; \*\*Centro de Química Farmacéutica (CQF), C.P. 11600, Apartado 16042, Rpto. Atabey, Ave. 21 & Calle 200, La Habana, Cuba; \*\*\*Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25, No. 455, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba*

**RESUMEN:** Se aborda la modelación por homología de una proteína que puede ser blanco potencial en la terapia de la fasciolosis. La catepsina B de *Fasciola hepatica* es una cisteína proteasa de excreción-secreción presente en los estadios juveniles del parásito. En una primera fase de este estudio proponemos un modelo tridimensional por homología de la catepsina B, utilizando como moldes catepsinas B de humano y rata (1PBH, 2PBH y 3PBH, 1MIR) del PDB (protein data bank). Se chequeó su calidad por el WHAT IF y se obtuvo una energía final total de -6750.96 KJ/mol por el campo de fuerza GROMOS96. Además se identificaron su sitio activo (Cys 104, His 275, Asn 295) y los aminoácidos que lo estabilizan por puentes de hidrógeno (Val 107, Phe 250, Gly 302), así como se predijo su estructura secundaria. El modelo tridimensional puede emplearse para realizar tamizaje virtual utilizando programas de docking y bases de datos de compuestos químicos virtuales del tipo “aceptores de Michael”.

(Palabras clave: *Fasciola hepatica*; catepsina B; modelación por homología; PDB)

---

**COMPARATIVE PROTEIN STRUCTURE MODELLING OF CATHEPSIN B FROM  
*Fasciola hepatica***

**ABSTRACT:** Cathepsin B was selected as a possible new therapeutic target of *Fasciola hepatica*. This is a cystein excretion protease present in the early phases of the parasite. First, we propose a three-dimensional model by homology of the cathepsin B of *F.hepatica*, by using as templates cathepsins B of human and rat (1PBH, 2PBH and 3PBH, 1MIR) from PDB (protein data bank). Its quality was checked by WHAT IF and a total final energy was -6750.96 KJ/mol as measure by GROMOS96. The active site (Cys 104, His 275, Asn 295) and amino acids involved in its stabilization by hydrogen bonds (Val 107, Phe 250, Gly 302), were identified. Also its secondary structure was predicted. The three-dimensional model could be employed in order to perform virtual screening by means of docking programs and data bases of virtual chemical compounds of the type “Michael acceptors”.

(Key words: *Fasciola hepatica*; cathepsin B proteases; comparative protein structure modelling; protein data bank)

---

La infección causada por el trematodo *Fasciola hepatica* es una enfermedad de importancia médico veterinaria (17). En Cuba, la fasciolosis hepática es enzoótica en los ganados bovino y ovino. El interés

en esta parasitosis, considerada por varios autores como emergente, es debido al elevado número de casos reportados en humanos en algunos países de zonas tropicales y subtropicales (18).

Los efectos secundarios de los fármacos existentes -de precios elevados-, la persistencia en los alimentos, la generación de resistencia por parte del parásito que ha llevado a la falla terapéutica, y la necesidad de desarrollar compuestos contra estadios inmaduros o intrahepáticos de *F. hepatica* que eviten la patología asociada a la migración a través del parénquima o la vía biliar; pone de manifiesto la urgente necesidad de contar con nuevas moléculas para combatir esta enfermedad.

Entre los principales candidatos antigénicos para la protección contra *Fasciola hepatica* están las proteasas secretadas por este parásito (22, 29); mayoritariamente de la familia de las cisteíno proteasas (5). En el estado adulto se producen al menos cinco actividades tipo catepsina L y dos actividades tipo catepsina B (9), de las que algunas están codificadas por familias multigénicas (33).

La catepsina B es una cisteíno proteasa de la familia de la papaina. Es un candidato potencial para el desarrollo de fármacos contra la fasciolosis, puesto que la neutralización de su actividad puede reducir la capacidad del estadio juvenil de establecer la infección y por lo tanto, se pudiera eliminar la enfermedad antes de que se produzcan daños en el hígado del hospedero por la migración de los parásitos (24).

En los hospederos definitivos del parásito la catepsina B está ocluida en los lisosomas; y junto a otras catepsinas está implicada en la degradación de proteínas, activación de zimógenos, procesamiento de antígenos, metabolismo y apoptosis. La catepsina B está relacionada con un gran número de enfermedades en humanos como el cáncer, artritis reumatoide, osteoporosis y Alzheimer (2).

Las funciones de la catepsina B están aun en procesos de investigación y han sido obstaculizados por la carencia de la proteína para el estudio, a partir de su fuente natural, puesto que la misma se produce en cantidades pequeñas por los estadios juveniles (24). Además, no está disponible su información estructural, así como para la vasta mayoría de las secuencias de proteínas.

Para el diseño racional de fármacos se necesita información estructural, que se determina por cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o modelación por homología. Por consiguiente, constituye una necesidad suplir esta carencia y es por esto que los métodos computacionales para la predicción de estructuras de proteínas, como la modelación comparativa, han ganado en popularidad desde hace pocos años (27, 31, 32).

El objetivo de este trabajo es la modelación por homología de la catepsina B, para realizar futuros

ensayos *in silico* con sustancias tipo aceptores de Michael; que están reportados como inhibidores irreversibles, y forman un enlace covalente estable con el grupo tiol del sitio activo de las cisteíno proteasas (15).

Como material inicial de trabajo se empleó la secuencia aminoacídica del precursor de la catepsina B (38070 Da) con número de acceso Q8I7B2 en la base de datos UNIPROT (14). A partir de esta secuencia se identificaron las proteínas con mayores por cientos de similitud -homólogas-, de estructuras resueltas en la base de datos PDB (Protein Data Bank), mediante un BLAST (Basic Local Alignment Tool) (1) versión 2.0. Los patrones de homología utilizados son las estructuras de las proteínas catepsinas B de humano y de rata, en presencia o ausencia de inhibidor: 1PBH (Resolución 3.2 Å) (34), 1MIR\_A (Resolución 2.8 Å) (4), 1GMY\_Å (Resolución 1.9 Å) (6) y 1THE\_A (Resolución 1.9 Å) (12).

Se identificaron los aminoácidos involucrados en el sitio activo por el servidor Catalytic Site Atlas (11) versión 2.1.8 y se predijeron los residuos funcionales mediante el PSI-BLAST (26) con el empleo de todas las bases de datos no redundantes.

La alineación múltiple de secuencias se obtuvo por el CLUSTAL W 1.8 (30) y el modelo de homología fue construido por el servidor SWISS-MODEL (27). Además se obtuvo un modelo por defecto en el servidor del SWISS-MODEL, y empleó como patrones las proteínas 1PBH, 2PBH y 3PBH (Resolución 3.3 Å) (34) y 1MIR (Cadenas A y B, Resolución 2.8 Å) (4) para un total de 5 patrones. Los ficheros de los modelos fueron almacenados y editados como texto en el programa bloc de notas de Microsoft y desde aquí directamente importadas al programa WHAT IF v.19 (36). Fueron optimizados por el campo de fuerza de GROMOS96 (200 ciclos "steepest" descendentes y 300 ciclos de gradientes conjugados). La asignación de estructura secundaria se realizó a través del programa DSSP (13). Todas las manipulaciones gráficas y de estructura fueron hechas en el programa Swiss PDB Viewer (DeepView) (8).

Se seleccionaron las estructuras patrón con los siguientes valores de identidad/similitud para las estructuras patrón: 1PBH 50/65 %, 1MIR 49/66 %, 1GMY 57/ 69%, 1THE 55/ 69 %. Estos valores de las estructuras cristalográficas, con homologías mayores al 65% e identidad superiores o igual al 49%, se consideran suficientes para realizar un modelo por homología. Para dos proteínas con una identidad de secuencia  $\geq 50\%$ , la desviación cuadrática media de los átomos del esqueleto del núcleo es aproximadamente  $\leq 1.0$  Å, y no existen diferencias estructurales relevantes fuera de la región del núcleo.

```

Pro-catB      VVVQAAPNEKPFQFEPFSDELIIHYINEKSGASWKAAPSSRFINIEHFKQHLGLLEETPEER 60
1PBH_        -----MRSRPSFHPLSDELVNYVN-KRNTTWQAGHNFYVNDMSYKRLKCGTFLGGP--- 50
2PBH_        -----MRSRPSFHPLSDELVNYVN-KRNTTWQAGHNFYVNDMSYKRLKCGTFLGGP--- 50
3PBH_        -----MRSRPSFHPLSDELVNYVN-KRNTTWQAGHNFYVNDMSYKRLKCGTFLGGP--- 50
1MIR_A       -----HDKPSFHPLSDDMINYIN-KQNTTWQAGRNFYVNDISYKLLKCGTVLGGP--- 49
1MIR_B       -----HDKPSFHPLSDDMINYIN-KQNTTWQAGRNFYVNDISYKLLKCGTVLGGP--- 49
1GMY_A       -----
1THE_A       -----
1QDQ_A       -----

Pro-catB      QTRRPTVRYNVSDNDLPESFDAREKWPLCRSIRQIPDQSSCGSCWAVAVGVGAMSDRVCIH 120
1PBH_        --KPPQRMFTEDLKLPAFDAREQWPQCPTIKEIRDQSGSCSWAFGAVEAISDRICIH 108
2PBH_        --KPPQRMFTEDLKLPAFDAREQWPQCPTIKEIRDQSGSCSWAFGAVEAISDRICIH 108
3PBH_        --KPPQRMFTEDLKLPAFDAREQWPQCPTIKEIRDQSGSCSWAFGAVEAISDRICIH 108
1MIR_A       --KLPERVGFSEDINLPESFDAREQWSNCPTIAQIRDQSGSCSSWAFGAVEAMSDRICIH 107
1MIR_B       --KLPERVGFSEDINLPESFDAREQWSNCPTIAQIRDQSGSCSSWAFGAVEAMSDRICIH 107
1GMY_A       -----KLPASFDAREQWPQCPTIKEIRDQSGSCSWAFGAVEAISDRICIH 46
1THE_A       -----FSEDINLPESFDAREQWSNCPTIAQIRDQSGSCSWAFGAVEAMSDRICIH 51
1QDQ_A       -----LPESFDAREQWPNCPTIKEIRDQSGSCSWAFGAVEAISDRICIH 45
                * * * * * : * : * : * * * * * . * * * * * : * * * * *

Pro-catB      SNGMMQPELSAIDLVSCC-SYCGNGCQGGSPPAAWDYWWRNGIVTGGTLENPTGCLPYPF 179
1PBH_        TNAHVSVEVSAEDLLTCCGSMCGDGCNGGYPAEAWNFWTRKGLVSGGLYESHVGCRPYSI 168
2PBH_        TNAHVSVEVSAEDLLTCCGSMCGDGCNGGYPAEAWNFWTRKGLVSGGLYESHVGCRPYSI 168
3PBH_        TNAHVSVEVSAEDLLTCCGSMCGDGCNGGYPAEAWNFWTRKGLVSGGLYESHVGCRPYSI 168
1MIR_A       TNGRVNVEVSAEDLLTCCGIQCGDGCNGGYPGAWNFWTRKGLVSGGVYNSHIGCLPYTI 167
1MIR_B       TNGRVNVEVSAEDLLTCCGIQCGDGCNGGYPGAWNFWTRKGLVSGGVYNSHIGCLPYTI 167
1GMY_A       TNAHVSVEVSAEDLLTCCGSMCGDGCNGGYPAEAWNFWTRKGLVSGGLYESHVGCRPYSI 106
1THE_A       TNGRVNVEVSAEDLLTCCGIQCGDGCNGGYPGAWNFWTRKGLVSGGVYNSHIGCLPYTI 111
1QDQ_A       SNGRVNVEVSAEDMLTCCGGECGDGCNGGEPSGAWNFWTKKGLVSGGLYNSHVGCRPYSI 105
                : * . : . * : * * * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Pro-catB      PQCRHPPGSRSQLNPCPRYTYPTPSCYPYCQAGYDKTYEKDKVYGKTSYNVDRHEYTIMEE 239
1PBH_        PPCEHHVNGSRP-PCTGEGD-TPKCSKICEPGYSPTYKQDKHYGYNSYSVSNSEKDIMAE 226
2PBH_        PPCEHHVNGSRP-PCTGEGD-TPKCSKICEPGYSPTYKQDKHYGYNSYSVSNSEKDIMAE 226
3PBH_        PPCEHHVNGSRP-PCTGEGD-TPKCSKICEPGYSPTYKQDKHYGYNSYSVSNSEKDIMAE 226
1MIR_A       PPCEHHVNGARP-PCTGEGD-TPKCNKMCEAGYSTSYKEDKHYGYTSYSVSDSEKEIMAE 225
1MIR_B       PPCEHHVNGARP-PCTGEGD-TPKCNKMCEAGYSTSYKEDKHYGYTSYSVSDSEKEIMAE 225
1GMY_A       PPCEHHVNGSRP-PCTGEGD-TPKCSKICEPGYSPTYKQDKHYGYNSYSVSNSEKDIMAE 164
1THE_A       PPCEHHVNGARP-PCTGEGD-TPKCNKMCEAGYSTSYKEDKHYGYTSYSVSDSEKEIMAE 169
1QDQ_A       PPCEHHVNGSRP-PCTGEGD-TPKCSKTCEPGYSPSYKEDKHFGCSSYSVANNEKEIMAE 163
                * * * * . : : * * . * * * * * : * * * * : * * * * * * * * * *

Pro-catB      IMKNGPVEAGFIVYTDFAVYKSGIYHHVSGRYAGKHAIRIIGWGVENGVKYWLTANSWNV 299
1PBH_        IYKNGPVEGAFSVYSDFLLYKSGVYQHVTGEMMGGHAIRILGWGVENGTPYWLVANSWNT 286
2PBH_        IYKNGPVEGAFSVYSDFLLYKSGVYQHVTGEMMGGHAIRILGWGVENGTPYWLVANSWNT 286
3PBH_        IYKNGPVEGAFSVYSDFLLYKSGVYQHVTGEMMGGHAIRILGWGVENGTPYWLVANSWNT 286
1MIR_A       IYKNGPVEGAFTVFSDFLTYKSGVYKHEAGDVMGGHAIRILGWGIENGVPYWLVANSWNA 285
1MIR_B       IYKNGPVEGAFTVFSDFLTYKSGVYKHEAGDVMGGHAIRILGWGIENGVPYWLVANSWNA 285
1GMY_A       IYKNGPVEGAFSVYSDFLLYKSGVYQHVTGEMMGGHAIRILGWGVENGTPYWLVANSWNT 224
1THE_A       IYKNGPVEGAFTVFSDFLTYKSGVYKHEAGDVMGGHAIRILGWGIENGVPYWLVANSWNA 229
1QDQ_A       IYKNGPVEGAFSVYSDFLLYKSGVYQHVSGEIMGGHAIRILGWGVENGTPYWLVANSWNT 223
                * * * * * . * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Pro-catB      GWGENGYFRILRGTDDECRIESIVVAGMPRLQKNITNHH 337
1PBH_        DWGDNGFFKILRGQDHCGIESEVVAGIPRTD----- 317
2PBH_        DWGDNGFFKILRGQDHCGIESEVVAGIPRTD----- 317
3PBH_        DWGDNGFFKILRGQDHCGIESEVVAGIPRTD----- 317
1MIR_A       DWGDNGFFKILRGENHCGIESEIVAGIPRTQQYWGRF- 322
1MIR_B       DWGDNGFFKILRGENHCGIESEIVAGIPRTQQYWGRF- 322
1GMY_A       DWGDNGFFKILRGQDHCGIESEVVAGIPRTDQYWEKI- 261
1THE_A       DWGDNGFFKILRGENHCGIESEIVAGIPRTQ----- 260
1QDQ_A       DWGDNGFFKILRGQDHCGIESEIVAGMPCT----- 253
                . * * * * * : * * * * * : * * * * *

```

FIGURA 1. Alineamiento múltiple de secuencia. / Sequence multiple alignment.

El alineamiento múltiple de secuencia muestra un patrón continuo (Figura 1) sin brechas significativas. Se conservan la cisteína 104, la histidina 275 y la asparagina 295, entre ellos forman la tríada catalítica. En el caso de la proteína 1MIR no se conserva la cisteína porque está mutada por una serina. Estas proteínas pertenecen a la familia de las peptidasas C1, que se caracterizan por la díada catalítica Cys e His, aunque otros residuos son importantes en la catálisis; en este caso, la Gln 98 favorece la formación de la cavidad del oxianión, mientras que la Asn 295 orienta el anillo imidazol de la His catalítica. También como residuos funcionales conservados se encuentran las Cys 89, 101, 104, 137, 138, 141, 145, 174, 182, 194 y 204; Gly 142, 144, 148 y 244; Asp 219 y 255; Trp 86, 105, la Arg 83 y la His 275.

Es de interés para el diseño de un inhibidor selectivo, el entorno de la histidina 275, GKHAIRIIGWG, ya que a su extremo amino se enlaza una lisina, no conservada en las demás secuencias, por su condición de aminoácido básico; a diferencia de la glicina, conservada en esta posición para las restantes secuencias.

La energía final del modelo por defecto, calculada por GROMOS96 fue de -6527.277 KJ/mol/kJ/mol, con lo que es más estable que el primer modelo obtenido, con una energía final total de -6750.96 KJ/mol.

La calidad del modelo obtenido por defecto se verificó mediante el uso del mapa de Ramachandran (Figura 2), donde la mayoría de los aminoácidos se encontraron en las conformaciones posibles de las cadenas polipeptídicas. En este mapa se obtuvieron once aminoácidos fuera de las zonas de plegamiento permitidas. La Asn 298 pertenece a una lámina beta, la Leu 329 a una hélice; mientras que Asn 8, Gln 12, Phe 13, Glu 14, Thr 56, Ser 99, Asn 122, Thr 201, y Gln330, se encuentran dentro de lazos donde los pro-

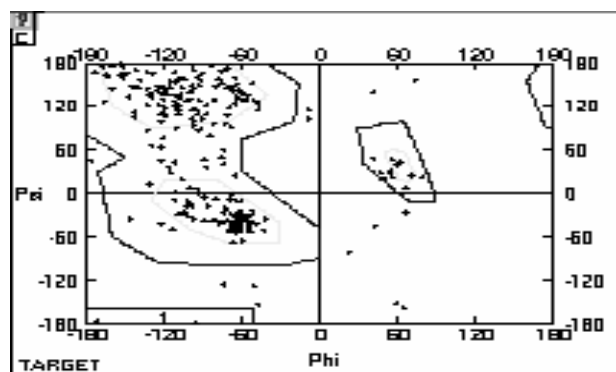


FIGURA 2. Mapa de Ramachandran./ *Ramachandran's Map.*

pios patrones poseen divergencias, y por lo tanto sus posiciones presentan desviaciones comprensibles de los valores normales. A pesar de la amplia flexibilidad de estas regiones se puede afirmar que el modelo puede ser considerado como válido, siempre y cuando estas zonas erróneas no intervengan directamente con el objetivo por el que se obtiene. Con relación a los lazos, la catepsina B se destaca en la familia de la papaina por la presencia de un lazo de oclusión sobre el sitio activo; en el que se encuentra conservada una Histidina (His184). En el caso de mamíferos existe un dímero de histidinas, que intervienen en el mecanismo de reacción por la formación de puentes de hidrógenos entre el sustrato y los NH de los grupos imidazol de estos residuos (2).

En la estructura secundaria más probable (Figura 3) es significativo el extremo N-terminal donde predominan las hojas beta, mientras que hacia el extremo C-terminal son las hélices. Los aminoácidos del sitio activo se encuentran formando lazos.

Los aminoácidos involucrados en el sitio activo, en el modelo obtenido ocupan las posiciones 104, 275

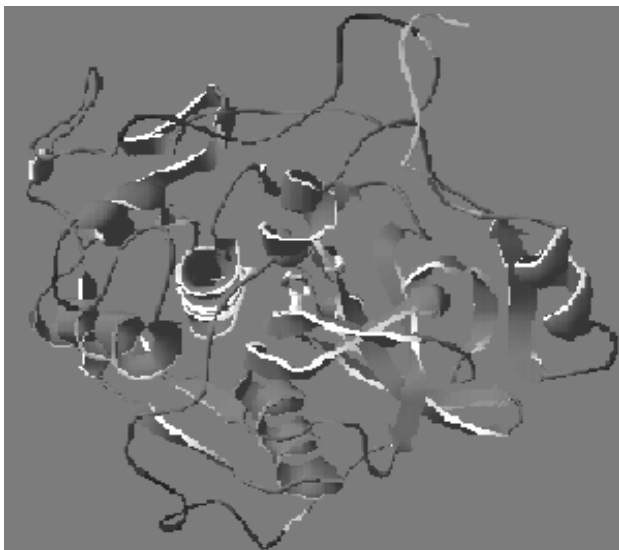
```

VVVQAAPNEKPQFEPFSDELIHYINEKSGASWKAAPSSRFINIEHFKQHLGLLEETPEERQ
EEEEH          HHHHHH          EEEEE          HHHHHHHH          HHHHH
TRRPTVRYNVSDNDLPESFDAREKWPLCRSIRQIPDQSSCGSCWAVAGVGAMSDRVCIH
EE          EE          HHHHHHHHHH          EEEE
SNGMMQPELSAIDLVSCCSYCGNGCQGGSPPAAWDYWWRNGIVTGGTLENPTGCLPYFPF
184 EEEEE HHHHHHHHH          HHHHHHHHH          EEEEEEEEEEEEEEE
QCRHPGSRSQLNPCPRYTYPTPSCYPYCQAGYDKTYEKDKVYGKTSYNVDRHEYTIMEEI
          EEE EEEEE          HHHHHHHH
MKNGPVEAGFIVY TDFAVYKSGIYHHVSGRYAGKHAIIRIIGWGVENGVKYWLTA NSWN
HH          EEEEEEEEE HHHH          EEEEE          EEEEEEE          EEEEE
VGWGENGYFRILRGTDECRIES IVVAGMPRLQKNITNHH
          EEEEE          EEE HHH          HHHHHH

```

FIGURA 3. Estructura secundaria del modelo por el programa DSSP: E, hoja beta; H hélice./ *Model secondary structure according to DSSP: E, strands; H, helices.*

y 295 (Figura 4); que a su vez están estabilizados por puentes de hidrógeno con la valina 107, fenilalanina 250 y glicina 302 (Figura 5).



**FIGURA 4.** Estructura del modelo de la catepsina B./ *Cathepsin B model structure.*

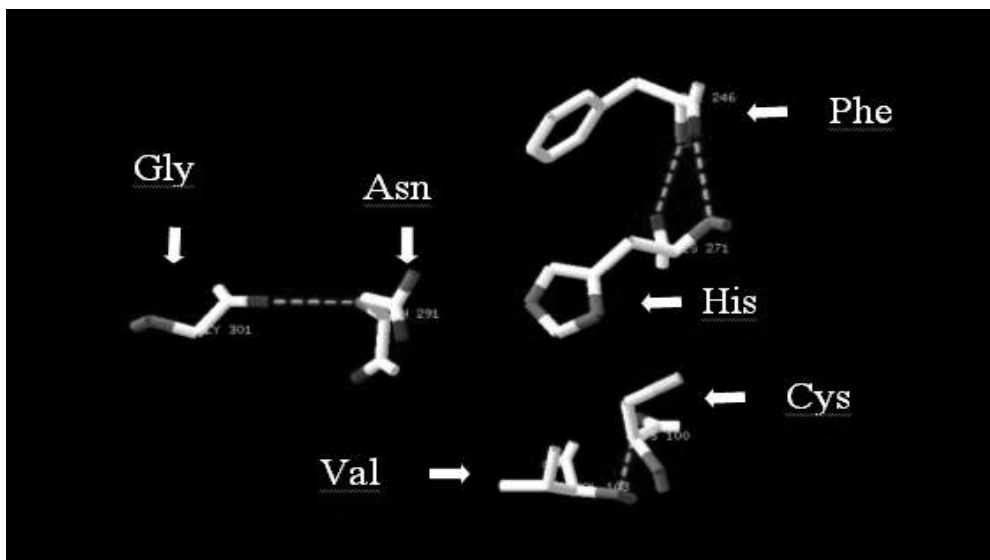
La modelación por homología o modelación comparativa es un modo en desarrollo paulatino, eficiente de obtener información acerca de una proteína de interés (16). Una vez obtenido el modelo, puede ser útil para diseñar mutantes en pruebas de hipótesis sobre la función proteica (3,38), identificar el sitio activo y sitios de unión (28), identificar, diseñar y desarrollar ligandos a un sitio de unión determinado (23), mode-

lar la especificidad de un sustrato (39), predecir epítopos antigénicos (25), simular docking proteína-proteína (35), inferir función a partir de potenciales electrostáticos calculados (19), facilitar emplazamientos moleculares en estructuras determinadas por rayos X (10), refinar modelos basados en construcciones por RMN (21), examinar y desarrollar alineamientos de estructuras y secuencias (37), confirmar relaciones estructurales remotas (7,20), y racionalizar observaciones experimentales conocidas.

Contamos con un modelo de la catepsina B que evaluará sustancias tipo aceptores de Michael en un tamizaje virtual con estudios de docking. El hecho de utilizar como uno de los moldes la catepsina B humana puede tener un doble enfoque, terapéutico sobre el parásito o inhibitorio sobre la enzima humana - lisosomal, que se sobre expresa en procesos de metástasis-.

## REFERENCIAS

1. Altschul, S.F.; Gish, W.; Millar, W.; Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
2. Atsushi, Y.; Tomoo, K.; Miyagawa, H.; Takaoka, Y.; Sumiya, S.; Kitamura, K. e Ishida, T. (2000): Molecular dynamics simulations of bovine cathepsin B and its complex with CAO74. *Chem. Pharm. Bull.* 48(4): 480-485.
3. Boissel, J.P.; Lee, W.R.; Presnell, S.R.; Cohen, F.E. y Bunn, H.F. (1993): Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a



**FIGURA 5.** Sitio activo en el modelo de la catepsina B./ *Active site in Cathepsin B model structure.*

- model of tertiary structure. *J. Biol. Chem.* 268:15983-93.
4. Cygler, M.; Sivaraman, J.; Grochulski, P.; Storer, A.C. y Mort, J.S. (1996): Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure.* 4: 405.
  5. Dalton, J.P. y Hefferman, M. (1989): Thiol protease released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35: 161-166.
  6. Greenspan, P.D.; Clark, K.L.; Tommasi, R.A.; Cowen, S.D.; Mcquire, L.W.; Farley, D.L.; Van, D.J.H.; Goldberg, R.L.; Zhou, H.; Du, Z.; Fitt, J.J.; Coppa, D.E.; Fang, Z.; Macchia, W.; Zhu, L.; Capparelli, M.P.; Goldstein, R.; Wigg, A.M.; Doughty, J.R.; Bohacek, R. y Knap, A.K. (2001): Identification of dipeptidyl nitriles as potent and selective inhibitors of cathepsin B through structure-based drug design. *J. Med. Chem.* 44: 4524.
  7. Guenther, B.; Onrust, R.; Sali, A.; O'Donnell, M. y Kuriyan, J. (1997): Crystal structure of the subunit of the clamp-loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell.* 91: 335-45.
  8. Guex, N. y Peitsch, M.C. (1997): The Swiss-PdbViewer and SWISS-MODEL, an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis.* 18: 2714-2723.
  9. Heussler, V.T. y Dobbelaere, D.A.E. (1994): Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64: 11-23.
  10. Howell, P.L.; Almo, S.C.; Parsons, M.R.; Hajdu, J. y Petsko, G.A. (1992): Structure determination of turkey egg-white lysozyme using Laue diffraction data. *Acta Crystallogr. B* 48:200-7.
  11. James, W.; Gail, J.; Craig, T. y Janet, M. (2005): Using a library of structural templates to recognize catalytic sites and explore their evolution in homologous families. *J. Mol. Biol.* 347: 565-81.
  12. Jia, Z.; Hasnain, S.; Hiramata, T.; Lee, X.; Mort, J.S.; To, R. y Huber, C.P. (1995): Crystal structures of recombinant rat cathepsin B and a cathepsin B-inhibitor complex. Implications for structure-based inhibitor design. *J. Biol. Chem.* 270: 5527.
  13. Kabasch, W. y Sander, C. (1983): Secondary structure definition by the program DSSP, updated CMBI version by ElmK. *Biopolymers.* 22: 2577-2637.
  14. Khaznadji, E.; Peloille, M. y Moire, N. (2002): Functional expression and characterization of a novel cathepsin B from *Fasciola hepatica*. Submitted to the EMBL/GenBank/DBJ databases.
  15. Kunakbaeva, Z.; Carrasco, R. y Rozas, I. (2003): An approximation to the mechanism of inhibition of cysteine proteases: nucleophilic sulphur addition to Michael acceptors type compounds. *J. Mol. Struct. (Theochem).* 626: 209-216.
  16. Marc, A.; Martí, R.; Ashley, C.; Stuart, A. F.; Roberto, S.; Francisco, M. y Sali, A. (2000): Comparative protein structure modelling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:291-325.
  17. Marcel, R.P. y Sarracent, M. J. (2004): Mecanismo de acción del anticuerpo monoclonal ES-78 contra la fasciolosis. *Rev. cubana Med. Trop.* 56(3):203-7.
  18. Mas-Coma, S.; Esteban, J.G. y Bargues, M.D. (1999): Epidemiology of human fascioliasis: A review and proposed new classification. *Bull WHO.* 77: 340-6.
  19. Matsumoto, R.; Sali, A.; Ghildyal, N.; Karplus, M.; y Stevens, R.L. (1995): Packaging of proteases and proteoglycans in the granules of mast cells and other hematopoietic cells. A cluster of histidines in mouse mast cell protease-7 regulates its binding to heparin serglycin proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 270: 19524-31.
  20. Miwa, J.M.; Ibanez, T.I.; Crabtree, G.W.; Sánchez, R.; Sali, A.; Role, L.W. y Heintz, N. (1999): Lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron.* 23: 105-14.
  21. Modi, S.; Paine, M.J.; Sutcliffe, M.J.; Lian, L.; Primrose, W.U.; Wolfe, C.R. y Roberts, G.C.K. (1996): A model for human cytochrome P450 2D6 based on homology modelling and NMR studies of substrate binding. *Biochemistry* 35: 4540-50.

22. Mulcahy, G. y Dalton, J.P. (2001): Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res. Vet. Sci.* 70: 83-86.
23. Ring, C.S.; Sun, E.; McKerrow, J.H.; Lee, G.K.; Rosenthal, P.J.; Kuntz, I.D. y Cohen, F.E. (1993): Structure-based inhibitor design by using protein models for the development of antiparasitic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 3583-87.
24. Ruby, H. P.; Law, P. M.; Smooker, J. A.; Piedrafita, I.D; Rebecca, P.; Nicholas, J.; Kennedy, J. C.; Whisstock, R. N. y Spithill, T.W. (2003): Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infect. Immun.* 71(12): 6921-6932.
25. Sali, A.; Matsumoto, R.; McNeil, H.P.; Karplus, M. y Stevens, R.L. (1993): Threedimensional models of four mouse mast cell chymases. Identification of proteoglycan-binding regions and protease-specific antigenic epitopes. *J. Biol. Chem.* 268: 9023-34.
26. Schäffer, A.; Aravind, L.; Madden, S.; John, L.; Spouge, Y.; Eugene, V. y Altschul, S.F. (2001): "Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements". *Nucleic Acids Res.* 29: 2994-3005.
27. Schwede, T. y Kopp, J. (2003): SWISS-MODEL: An automated protein homology-modelling server. *Nucleic Acids Research.* 31: 3381-3385.
28. Sheng, Y.; Sali, A.; Herzog, H.; Lahnstein, J. y Krilis, S. (1996): Modelling, expression and site-directed mutagenesis of human 2-glycoprotein I. Identification of the major phospholipid binding site. *J. Immunol.* 157: 3744-51.
29. Spithill, T.W. y Dalton, J.P. (1998): Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitol. Today.* 14: 224-228.
30. Thompson, J.D.; Plewnial, F.; Thierry, J. y Poch, O. (2000): Rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches. *Nucleic Acid Research.* 28(15): 2919-2926.
31. Tramontano, A. y Leplae, R. (2001): Analysis and assessment of comparative modelling predictions in CASP4. *Proteins.* 5:22-38.
32. Tramontano, A. (2003): Of Men and Machines. *NATURE Structural Biology.* 10(2): 87-90.
33. Trap, C. y Boireau, P. (2000): Les protéases chez les helminthes. *Res. Vet.* 31: 461-471.
34. Turk, D.; Podobnik, M.; Kuhelj, R.; Dolinar, M. y Turk, V. (1996): Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett.* 384: 211.
35. Vakser, I.A. (1997): Evaluation of GRAMM low-resolution docking methodology on the hemagglutinin-antibody complex. *Proteins. (Suppl.)* 1: 226-30.
36. Vriend, G. (1990): WHAT IF: a molecular and drug design program. *Mol. Graph.* 8(1):52-6; 29.
37. Wolf, E.; Vassilev, A.; Makino, Y.; Sali, A.; Nakatani, Y. y Burley, S.K. (1998): Crystal structure of a GCN5-related N acetyltransferase: *Serratia marcescens* aminoglycoside 3-N-acetyltransferase. *Cell.* 94: 51-61.
38. Wu, G.; Fiser, A. Kuile; B.; Sali, A. y Müller, M. (1999): Convergent evolution of *Trichomonas vaginalis* lactate dehydrogenase from malate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 6285-90.
39. Xu, L.Z.; Sánchez, R.; Sali, A. y Heintz, N. (1996): Ligand specificity of brain lipid binding protein. *J. Biol. Chem.* 271: 24711-19.

(Recibido 17-11-2005; Aceptado 22-8-2006)