

## ARTICULO

**Efecto del tratamiento con praziquantel sobre la actividad de la fosfatasa alcalina, fosfatasa acida, superoxido dismutasa en extractos crudos y productos de excreción-secreción de gusanos de *Schistosoma mansoni***

Emilia E Barrios<sup>1,2</sup>, Jesús Rodríguez<sup>1</sup>, Naim Richani<sup>1</sup>, Wolfan Araque<sup>1</sup>, Juan F Quintana<sup>1,3</sup>, Lisset Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Helmintología del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMoIP). Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

<sup>2</sup> Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

<sup>3</sup> Centre for Infection, Immunity and Evolution, Ashworth Laboratories, University of Edinburgh, West Mains Road, Edinburgh EH9-3JT, UK.

**Correspondencia:** Emilia Barrios

**E-mail:** [barrios.emilia@gmail.com](mailto:barrios.emilia@gmail.com)

## RESUMEN

Venezuela se encuentra entre los países sudamericanos afectados por la esquistosomiasis y la quimioterapia con praziquantel (PZQ) es la principal estrategia de control. Se determinó el efecto cuantitativo del tratamiento con praziquantel sobre la actividad de la Fosfatasa Alcalina (ALP), Fosfatasa Acida (ACP) y Superóxido Dismutasa (SOD), en antígenos solubles (ASG) y productos de excreción-secreción (PESG) de gusanos hembras y machos condición control (ASGH<sub>c</sub>, ASGM<sub>c</sub>, PESGH<sub>c</sub> and PESGM<sub>c</sub>) o incubados con PZQ *in vitro* (ASGM<sub>pzq</sub>, ASGH<sub>pzq</sub>, PESGM<sub>pzq</sub> and PESGH<sub>pzq</sub>). Las proteínas totales se determinaron por colorimetría, la SOD y ACP mediante espectrofotometría y la ALP por fluorometría. Se encontró una mayor concentración de proteínas en las ASG de gusanos no tratados, y en las preparaciones obtenidas luego de la incubación con PZQ *in vitro*, en los PESG, un incremento en la

actividad ACP en los ASG y PESG preparados con gusanos no-tratados, y una disminución de dicha actividad en los ASG y PESG tratados. La SOD, evidenció en los ASG una disminución estadísticamente significativa en los gusanos tratados. La concentración de la ALP disminuyó significativamente en los ASG y PESGH de gusanos tratados en relación a los gusanos no tratados. En conclusión, se observó una disminución en las proteínas totales, actividades enzimáticas ACP y SOD, y concentración de ALP, en ASG y PESG obtenidos con gusanos tratados.

**Palabras clave:** praziquantel, enzimas, *Schistosoma mansoni*.

## ABSTRACT

**Effect of Treatment with Praziquantel on the activity of alkaline phosphatase acid phosphatase, superoxide dismutase in Crude Extracts and Excretion-secretion Products of *Schistosoma mansoni* worms.**

Venezuela is among South American countries affected by schistosomiasis and chemotherapy with praziquantel (PZQ) is the main control strategy. We determined the quantitative effect of treatment with PZQ on alkaline phosphatase activity (ALP), acid phosphatase (ACP) and superoxide dismutase (SOD) in soluble antigens of worms (SWAP) and excretion-secretion products (EEP) of male and female worms (SMWAP<sub>c</sub>, SFWAP<sub>c</sub>, ESPWM<sub>c</sub> and ESPWH<sub>c</sub>) or incubated with PZQ *in vitro* (SMWAP<sub>pzq</sub>, SFWAP<sub>pzq</sub>, ESPWM<sub>pzq</sub> and ESPWH<sub>pzq</sub>). Total proteins were determined by colorimetry, SOD and ACP by spectrophotometry and fluorometry ALP. There was higher protein concentration in the untreated worms EG, and the preparations obtained after incubation with PZQ *in vitro*, in the EG, an increase in ACP activity in the EG and PG prepared with non-treated worms and a decrease of such activity on the EG and treated PG. On the other hand, SOD activity, the EG showed statistical significance in the treated worms. In the PG showed the same behavior, but those differences were not statistically significant. Similarly, there was a decrease in the concentration of ALP noticeable in the EG and worm PGh treated worms relative to untreated statistically significant. In conclusion, we observed a decrease in total protein, ACP and SOD enzyme activities and concentration of ALP, and EG in PG treated worms.

**Keys Words:** Praziquantel, enzymes, *Schistosoma mansoni*, crude extracts, excretory-secretory products.

## INTRODUCCIÓN

La Esquistosomiasis, también conocida como Bilharziasis, es una parasitosis producida por trematodos digenéticos de la familia *Schistosomatidae*, prevalentes en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, afectando más de doscientos millones de personas (1). En América del Sur, el agente causal es *Schistosoma mansoni* y en Venezuela el área endémica comprende la región centro norte del país, con una extensión de 15 mil Km<sup>2</sup>, lo que corresponde al 1,6 % del territorio nacional (1,2)

La infección en el humano ocasiona una enfermedad endémica frecuentemente de forma crónica leve, la cual se presenta de manera asintomática u oligoasintomática. En otros individuos, las lesiones ocurren en el hígado y en estas las formas graves presentan cuadros clínicos con hepato-esplenomegalia, hipertensión portal y fibrosis hepática (2).

El mecanismo de transmisión se inicia con la mala disposición de las heces con los huevos de las personas infectadas en el medio ambiente, favoreciendo la eclosión de estos y la liberación de las larvas denominadas miracidios. Estas infectan al caracol hospedador intermediario, *Biomphalaria glabrata*, en el cual la multiplicación y transformación del parásito da origen a las cercarias, las cuales abandonan al molusco e infectan a su hospedador definitivo (el hombre o mamíferos roedores), a través de la piel, transformándose en esquistosómulo. En el sistema porta hepático los gusanos adultos diferenciados sexualmente se aparean y la hembra en el canal ginecóforo del macho se traslada a los plexos hemorroidales intestinales y deposita los huevos (2).

Los adultos del *S. mansoni* alargados, cilíndricos y curvos hacia la parte posterior, miden entre 1 y 2 cm de longitud. El macho posee una apertura longitudinal llamada canal

ginecóforo, el cual aloja a la hembra. Externamente el parásito se encuentra recubierto por capas de células multinucleadas formando un sincitio, denominado tegumento. Durante la transformación de cercarias a esquistosómulo, la superficie externa del tegumento se modifica desde una capa celular única que contiene un glucocalix, a una membrana doble.

Las proteínas encontradas en el exterior de la doble membrana, entre ellas enzimas como la Fosfatasa Alcalina (ALP) y la Fosfatasa Acida (ACP) permiten absorber moléculas encontradas en la circulación sanguínea del hospedador definitivo y además son específicamente reconocidas por los anticuerpos de humanos y animales infectados, siendo de utilidad para diagnóstico y confirmación de la infección en zonas de baja transmisión, donde la sensibilidad de la mayoría de las pruebas conocidas tiende a disminuir debido a la baja carga parasitaria infectante (3).

El tubo digestivo incompleto de estos gusanos, determina que se alimenten, excreten sus desechos y secreten productos metabólicos a través de un orificio único. Enzimas relacionadas con mecanismos de inmunoevasión de la respuesta inmune del hospedador, como la Superóxido Dismutasa (SOD), y por tanto, una molécula con potencial utilidad en vacunación, forman parte de los productos de excreción-secreción (4-6).

El PZQ (2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino (2,1-alfa) isoquinolin-4-uno) es un derivado de la pirazinoisoquinolina, empleado en el tratamiento de la esquistosomiasis y ensayos *in vitro* muestran que el PZQ produce contracción muscular o parálisis y daño, debido a cambios en el flujo del calcio en la membrana tegumental externa, aumentando la permeabilidad. El PZQ interfiere con el transporte de iones inorgánicos puesto

que la parálisis ocasionada en el gusano adulto se acompaña un aumento en el influjo de calcio y disminución del influjo de sodio y potasio. Adicionalmente, el tegumento del gusano es dañado y en consecuencia se exponen nuevos antígenos en la superficie del parásito (7, 8).

Además el PZQ produce cambios en los hidratos de carbono, proteínas, metabolismo de los nucleótidos; y en la actividad de enzimas parasitarias como la SOD, ACP y ALP (9). La preparación comercial es una mezcla compuesta por partes iguales de isómeros levógiros y dextrógiros, de los cuales, solo los primeros tienen actividad biológica *in vivo* e *in vitro* (10). Se absorbe vía oral y es hidroxilado a nivel hepático, el  $t_{max}$  es de 1 hora y la sobrevivencia plasmática de 0,8 a 1,2 horas (11). El mecanismo preciso de acción del PZQ no se ha identificado, algunos autores sugieren que el PZQ interfiere con el transporte de iones inorgánicos y que la rapidez con la que daña el tegumento del parásito, se relaciona con alteración en la homeostasis del calcio (12), específicamente a nivel de canales de calcio (13). Otros autores demostraron que la acumulación de calcio no es el único factor que determina los efectos del PZQ en gusanos, al parecer la alteración de la fluidez en la membrana tegumental (14) y la reducción de las concentraciones de glutatión, permite que la respuesta inmune del hospedador contribuya en la eliminación del gusano, y la unión a la actina de los esquistosomas ocasiona la interrupción en el tegumento o la inhibición de la captación de nucleósidos (15). De 726 genes inducidos en gusanos adultos expuestos a 50 µg de PZQ/ml por hasta 4 h y analizados por ensayos de microarreglos, 347 disminuyeron abundantemente, 131 fueron expresados con éxito y dos de las categorías más importantes de las moléculas identificadas 40% correspondieron a genes asociados a adhesión y 27 % procesos celulares. Curiosamente entre los grupos de genes inducidos en respuesta al

tratamiento con PZQ, 4% correspondieron a actividad antioxidante, entre ellos a un precursor de la superóxido dismutasa extracelular (8),

La concentración de PZQ requerida para matar los esquistosomas adultos *in vitro* es más alta que la máxima concentración plasmática alcanzada en humanos. Se estimó que la concentración en plasma es de 0,3 µg/ml, luego de 2 horas de la administración oral de 46 mg de PZQ/Kg de peso. Mientras para producir el mismo efecto *in vitro* es 0,5 µg/ml pero el gusano debe exponerse toda la noche al fármaco (16).

Resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación demuestran que la actividad ALP no es modificada por el tratamiento con praziquantel y la actividad SOD se alteró en antígenos solubles, mas no en productos de excreción del gusano, a consecuencia del tratamiento (17). No obstante, dicho estudio evaluó cualitativamente la presencia de esta actividad, lo que sugiere que pequeñas fluctuaciones pudieron no ser detectadas. Por lo tanto, es de interés realizar estudios o evaluaciones cuantitativas sobre las enzimas SOD, ALP y ACP en Productos de Excreción-Secreción (PES) y Extractos Crudos del Gusano (ECG) de *S. mansoni* que permitan establecer alteraciones en la actividad de estas por su papel clave en el metabolismo del parásito. En este sentido, se determinó el efecto cuantitativo del tratamiento con PZQ, sobre la actividad ALP, ACP, SOD en extractos crudos y productos de excreción de gusanos adultos de *S. mansoni*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de los estadios de *S. mansoni*. En esta investigación se empleó el aislado Puerto Rico de *S. mansoni*, mantenido viable por pases sucesivos entre *B. glabrata* y hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*), en el

Laboratorio de Helminetos del Instituto BioMoIP. Los hámsters con 7 semanas de infección con 1000 cercarías de *S. mansoni*, fueron perfundidos y los gusanos recogidos de la vena porta hepática (18, 19) se conservaron en medio RPMI1640 pH 7.

Gusanos adultos de *S. mansoni*. En el estudio experimental se emplearon gusanos hembras y machos ( $n=1 \times 10^5$ ), obtenidos del ciclo de mantenimiento de *S. mansoni* los cuales se utilizaron en la preparación de los Productos de Excreción-Secreción de gusanos (PESG), hembras (PESGH) y machos (PESGM) producidos por el gusano *in vitro* y en los Extractos Crudos de Gusanos o antígenos solubles de gusanos (ASG), hembras (ASGH) y machos (ASGM).

Tratamiento de ratones con PZQ. A ratones NRMI jóvenes machos se les administró una dosis de PZQ de 40 mg/kg de peso, vía intragástrica, se esperó 1 hora y 30 min para la metabolización de la droga en el ratón. Posteriormente se extrajo la sangre mediante punción cardíaca. Se retrajo el coágulo a 37 °C por 10 minutos y se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos, para separar el suero con el metabolito activo del PZQ.

Producción de antígenos solubles y productos de excreción-secreción. Los gusanos machos y hembras ( $n=1000$ ), obtenidos del ciclo de mantenimiento de *S. mansoni* fueron colocados en un medio comercial RPMI1640 pH 7 en frío. En la condición con el PZQ, los gusanos machos y hembras se incubaron una hora a 37 °C en el suero con el metabolito activo de la droga y se lavaron tres veces con medio. En la condición control, se sustituyó el suero con RPMI1640 y ambas condiciones se incubaron en medio, dos horas a 37 °C con agitación. Luego se centrifugó por 30 minutos a 14000 rpm a 4 °C. Los sobrenadantes o Productos de Excreción-Secreción de Gusanos (PESG) obtenidos de las hembras y machos incubados

en ausencia de la droga, PESGM<sub>c</sub> y PESGH<sub>c</sub> y en presencia de esta, PESGM<sub>pzq</sub> y PESGH<sub>pzq</sub> (20).

Los gusanos incubados y centrifugados fueron macerados con un homogenizador de tejidos de teflón. El homogenato obtenido se centrifugó a 14000 rpm por dos horas a 4 °C y los sobrenadantes o antígenos solubles de gusanos (ASG) de hembras y machos incubados en RPMI1640 (ASGM<sub>c</sub> y ASGH<sub>c</sub>) e incubados en RPMI1640 con PZQ (ASGM<sub>pzq</sub> y ASGH<sub>pzq</sub>). Los ASG y PESG fueron recolectados, se dializaron contra agua durante 12 h a 4 °C y fueron guardados a -20 °C hasta su uso, dentro de la misma semana de obtención (21) y previa determinación enzimática se les hizo la de proteínas totales, empleando el método de Bradford modificado por Spector (22).

Determinación de las enzimas. En la determinación de la superóxido dismutasa (SOD), se empleó un método de detección indirecta, basado en el método de reducción del anión superóxido, el cual guarda una relación directa con la xantina oxidasa e inversamente proporcional a la SOD, con el kit para superóxido dismutasa de Calbiochem (USA) siguiendo instrucciones del fabricante. La lectura de la actividad de la reacción fue mérida a partir de una curva construida con patrones de actividad SOD (0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 UI/ml). A los patrones y muestras se les adicionó la sal de tetrazolio y se inició la reacción enzimática en con la adición de Xantina oxidasa, seguida de incubación 20 min a temperatura ambiente y lectura a 450 nm (23).

En la determinación de la actividad Fosfatasa Acida (ACP) se empleo como sustrato 4-nitrofenil fosfato en medio ácido y una solución estándar de *p*-nitrofenol (10 mM), en medio alcalino (SIGMA, USA). Para la determinación los PESG y ASG fueron diluidos 1:2 con agua



destilada, y se incubaron por 30 minutos a 37 °C con solución sustrato y se leyó la absorbancia a 405 nm en el lector de Elisa, y se calculó la actividad con la siguiente fórmula:

$$U/mL = \frac{[A \text{ [muestra]} - A \text{ [blanco]}] \times 0,05 \times 0,3 \times FD}{A \text{ [estándar]} \times \text{tiempo} \times V \text{ enz}}$$

A [muestra]: absorbancia de la muestra; A [blanco]: absorbancia del blanco; 0,05: concentración de 4-nitrofenol en solución estándar; 0,3: 0.3 mL, el volumen total del ensayo en la placa de 96 pozos, incluyendo la solución Stop; FD: factor de dilución de la muestra estándar; A del [estándar]: absorbancia del estándar; Tiempo: tiempo de incubación a 37 °C en minutos; V enz: volumen de la muestra enzimática añadida al ensayo en mL.

En la evaluación de la fosfatasa alcalina (ALP) se preparó una solución sustrato de 4-metil-lumbeliferil-fosfato (10mM) en H<sub>2</sub>O desionizada (SIGMA, USA), y se incubó con los PESG y ASG o control enzimático (100 µg/ml), por 15 minutos a 37 °C y se leyó la reacción fluorimétrica con un filtro de absorción de 360 nm y de emisión de 440 nm en el fluorímetro.

**Análisis de los datos.** Los datos cuantitativos de las determinaciones enzimáticas, se expresaron como el promedio ± desviación estándar.

La comparación de las determinaciones en hembras y machos pre y post-incubación con PZQ se realizó mediante una prueba T de Student, y valores de p menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. En el análisis estadístico se empleó el programa STATISTIC versión 9.

## RESULTADOS

La determinación de proteínas totales de PESG y ASG, reveló una mayor concentración de proteínas en las preparaciones provenientes de

gusanos no tratados en los ASGM<sub>c</sub> y ASGM<sub>c</sub>, y en las preparaciones obtenidas luego de la incubación con PZQ *in vitro*, en los ASGM<sub>PZQ</sub> y ASGH<sub>PZQ</sub> (Tabla 1).

**Tabla 1.** Concentración de proteínas totales en ASG y PESG en 1000 gusanos hembras o machos, expresados como el promedio ± desviación estándar.

Tipo de preparación	concentración de proteínas (µg.mL <sup>-1</sup> ) X±DS
ASGM <sub>c</sub>	1831,6 ±916,2
ASGM <sub>pzq</sub>	1596,9±861,1
ASGH <sub>c</sub>	542±203,8
ASGH <sub>pzq</sub>	508,8±388,1
PESGM <sub>c</sub>	371,6±272,8
PESGM <sub>pzq</sub>	1908,8±422,8
PESGH <sub>c</sub>	199±45,4
PESGH <sub>pzq</sub>	2183,2±1566,3

Al evaluar la actividad enzimática de la ACP en los ASG y PESG se encontró un incremento en los ASG y PESG preparados con gusanos no tratados, y una disminución de dicha actividad en los ASG y PESG tratados (Tabla 2), observándose diferencias estadísticamente significativas en los ASG preparados con gusanos tratados y no tratados, mientras que en los PESG tales diferencias no son significativas.

**Tabla 2.** Actividad ACP en los ASG y PESG adultos machos y hembras, antes y después del tratamiento con PZQ.

Tipo de preparación	Actividad (UI.mL <sup>-1</sup> )		p
	Media	Desviación estándar	
ASGM <sub>c</sub>	0,00032	0,00065	1x10 <sup>-10</sup>
ASGM <sub>pzq</sub>	0,00003	0,00000	
ASGH <sub>c</sub>	0,00002	0,00001	2,80x10 <sup>-4</sup>
ASGH <sub>pzq</sub>	0,00003	0,00000	
PESGM <sub>c</sub>	0,00663	0,00765	4,42x10 <sup>-1</sup>
PESGM <sub>pzq</sub>	0,00490	0,00506	
PESGH <sub>c</sub>	0,00202	0,00109	7,33x10 <sup>-1</sup>
PESGH <sub>pzq</sub>	0,00176	0,00131	

p < 0,05 es significativa

El análisis de las actividades enzimáticas para la SOD, mostró en los ASG una disminución estadísticamente significativamente en los gusanos tratados.

En los PESG se observó el mismo comportamiento, pero dichos resultados no fueron estadísticamente significativos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Actividad SOD en los ASG y PESG de adultos machos y hembras, antes y después del tratamiento con PZQ.

Tipo de preparación	Actividad (UI.mL <sup>-1</sup> )		<i>p</i>
	Media	Desviación estándar	
ASGM <sub>c</sub>	0,28320	0,20699	8x10 <sup>-6</sup>
ASGM <sub>pzq</sub>	0,44160	0,00695	
ASGH <sub>c</sub>	0,29160	0,02142	6,6x10 <sup>-4</sup>
ASGH <sub>pzq</sub>	0,45220	0,02208	
PESGM <sub>c</sub>	0,19000	0,02113	9,41x10 <sup>-1</sup>
PESGM <sub>pzq</sub>	0,16220	0,02031	
PESGH <sub>c</sub>	0,14760	0,08981	2,06x10 <sup>-2</sup>
PESGH <sub>pzq</sub>	0,14100	0,02263	

*p* < 0,05 es significativa

En conjunto con la ACP y la SOD se evaluó la actividad enzimática de la ALP donde se evidenció la disminución notable de la actividad enzimática en los ASG Y PESH de gusanos tratados en relación a los gusanos no tratados, (tabla 4) obteniendo datos estadísticamente significativos que demuestran que la acción farmacológica empleada es efectiva.

En los PESGM se evidencia el incremento de la actividad enzimática en los gusanos tratados, pero los datos no son estadísticamente significativos.

**Tabla 4.** Concentración de ALP en los ASG y PESG adultos machos y hembras, antes y después del tratamiento con PZQ.

Tipo de preparación	Concentración (µg.mL <sup>-1</sup> )		<i>p</i>
	Media	Desviación estándar	
ASGM <sub>c</sub>	1,09829	0,04307	5,30x10 <sup>-5</sup>
ASGM <sub>pzq</sub>	0,96957	0,36276	
ASGH <sub>c</sub>	0,78629	0,16078	2,58x10 <sup>-2</sup>
ASGH <sub>pzq</sub>	0,52300	0,44442	
PESGM <sub>c</sub>	0,10700	0,22657	6,17x10 <sup>-1</sup>
PESGM <sub>pzq</sub>	0,12457	0,28040	
PESGH <sub>c</sub>	1,68128	0,43168	1x10 <sup>-6</sup>
PESGH <sub>pzq</sub>	0,11371	0,02520	

*p* < 0,05 es significativa

## DISCUSIÓN

Los extractos crudos y productos de excreción-secreción de *S. mansoni*, se caracterizan por su gran contenido enzimático, relacionado con mecanismos de inmunoevasión de la respuesta inmune y antigenicidad. El presente estudio determinó el efecto del tratamiento con PZQ sobre enzimas del parásito presentes en ambas preparaciones.

Al inicio del estudio se determinaron las proteínas totales de PG y EG, encontrándose una mayor concentración de proteínas en las preparaciones provenientes de gusanos no tratados en los EG, y en las preparaciones obtenidas luego de la incubación con PZQ *in vitro*, en los PG (Tabla 1).

El efecto del tratamiento sobre las proteínas totales en los extractos crudos del parásito se relacionan con estudios recientes que demuestran el papel de las P- glicoproteínas (SMDR2) y las proteínas asociadas a multiresistencia a drogas (MRP1) que se encuentran en el sistema excretor del gusano de *Schistosoma mansoni*, asociadas a resistencia a fármacos, puesto que la expresión de estas proteínas se altera en los gusanos expuestos a praziquantel (PZQ), y se expresa en niveles más altos en los gusanos de las cepas con susceptibilidad reducida al fármaco (24). Además, el tratamiento pudiera afectar genes como el Gen MEG que en *S. mansoni* induce la variación en las proteínas secretadas por el tegumento, relacionadas a la interacción inmune con el hospedador (25). En consecuencia, los hallazgos encontrados en el presente estudio pueden tener implicaciones no solo a nivel de tratamiento quimioterapéutico, además pueden estar relacionados con eventos de interacción con el sistema inmune del hospedador.

Todas las enzimas lisosomales como la ACP son activadas en condiciones específicas por el catabolismo creciente del tejido fino, por lo tanto, el aumento de la fosfatasa ácida está relacionada con el aumento en el catabolismo de los tejidos (26), como resultado del aumento de los productos del metabolismo del gusano *S. mansoni* por tanto, la disminución de la ACP en ASG y PESG observada en nuestro estudio, indican indirectamente que el PZQ altera este metabolismo enzimático, ocasionando una disminución del metabolismo

del parásito que afecta la producción y secreción-excreción de esta enzima. En relación a las isoenzimas de la ACP se conoce que su actividad es afectada por diferentes agentes como el mercurio (bovino y porcino) y herbicidas (plantas) (27,28), constituyendo importantes flancos de control de plantas que compiten con los cultivos de interés alimenticio.

Desde el enfoque del presente estudio, la disminución de la ACP constituye uno de los elementos claves mediante los cuales, el PZQ afecta la capacidad del parásito de contrarrestar la respuesta celular y humoral del hospedador, alterando la hidrólisis de fosfomonoésteres y liberación de fosfato inorgánico del parásito (29), un mecanismo altamente relacionado con el influjo de  $Ca^{+2}$  en respuesta a la despolarización de la membrana tegumental y por ende la contracción muscular, la secreción, y la expresión genética (29).

El análisis de las actividades enzimáticas para la SOD, mostró en los ASG una disminución estadísticamente significativamente en los gusanos tratados. Un efecto similar en menor magnitud se observa en los PESG, y demuestra que uno de los efectos del tratamiento con PZQ, posiblemente relacionado con su efectividad, consiste en la disminución de enzimas claves para la defensa del parásito contra radicales tóxicos que producen las células del sistema inmune, lo que sugiere que al evaluar el uso de enzimas antioxidantes como la SOD en diseños de vacunas o terapia inmune en los pacientes infectados debe tomarse en cuenta el estatus en cuanto a tratamiento del paciente, puesto que en individuos recientemente tratados, puede no tener la misma efectividad el empleo de vacunas elaboradas con ADN codificante para la SOD, con la finalidad de estimular la producción de anticuerpos capaces de reducir de manera constante la carga parasitaria del *S. mansoni*, disminuyendo la infección existente

(30). No obstante, otras alternativas tales como la sustitución de la Leu132 y la Val135 en la Superóxido Dismutasa Citosólica del parásito (SmCtSOD), postuladas para inducir cambios en la conformación, distribución de las cargas electrostáticas y la disminución de la protección del parásito pudieran ser de mayor utilidad como herramienta inmunoterapéutica, en pacientes con historia de reinfecciones postratamiento (31). Por otra parte, estos resultados coinciden con estudios realizados *in vivo*, en los cuales se demuestra que el tratamiento combinado de PZQ y pentoxifilina producen disminución en los niveles séricos de citoquinas pro-fibróticas (TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) y de las enzimas hepáticas antioxidantes, glutatión peroxidasa, glutatión-S-transferasa, glutatión reductasa y SOD (32)

En cuanto a la actividad enzimática de la ALP se observa la disminución notable de la actividad enzimática en los ASG y PESG, particularmente significativo en los PESGH, hallazgos de fundamental interés puesto que durante la infección por *S. mansoni* ocurre un aumento en la excreción de la ALP como producto del catabolismo del parásito, lo que se refleja en la persona infectada con un aumento de la enzima en sistema porta venoso hepático, y constituye un elemento estimulador de la respuesta inmune del hospedador, por lo cual la ALP es considerada altamente inmunógena y es empleada como antígeno en el diagnóstico serológico (33).

Además, recientemente se demostró que la ALP se ubica en la capa externa tegumental de *S. mansoni*, y que mediante mecanismo que generan adenosina, el parásito es capaz de modular la respuesta inmunitaria del hospedador contra el, como demuestran estudios en los cuales al suprimir el ARN de la ALP disminuye la producción de adenosina, y la capacidad del parásito para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador (34). Ambos

estudios reflejan la importancia de esta enzima de *S. mansoni* para la supervivencia y como marcador diagnóstico, resaltando que cualquier estrategia quimioterapéutica, inmunoterapéutica o de vacunación debe medir el efecto sobre esta enzima.

Similarmente, estudios previos de nuestro grupo de investigación lograron definir a nivel cualitativo el efecto del PZQ sobre la actividad enzimática SOD, ALP y ACP (17) de PESG y PESG, así como la utilidad potencial en el inmunodiagnóstico de antígenos preparados con gusanos y huevos de *S. mansoni* incubados *in vitro* con PZQ (35). En este sentido, los hallazgos del presente estudio contribuyen a definir y comparar en términos cuantitativos el efecto del PZQ sobre enzimas tegumentales y de excreción-secreción, faltaría por caracterizar y definir la contribución que esto tiene sobre la expresión o inhibición de antígenos que puedan favorecer el diagnóstico, permitan evaluar la efectividad del tratamiento en los pacientes infectados y definir posibles variantes enzimáticas relacionadas con la resistencia antihelmíntica descritas en otros metazoarios (36), en *S. mansoni*.

No obstante, los hallazgos del presente contribuyen a comprender los efectos positivos del praziquantel sobre la patogenia de la enfermedad, puesto que las enzimas contribuyen en la evasión de la respuesta inmune y en la estimulación del sistema inmune del hospedador, lo que contribuye en exacerbar la inflamación y consecuentes secuelas. Además reviste importancia porque estas enzimas se encuentran asociadas al tegumento y este se considera un potencial blanco para el desarrollo de vacunas anti-esquistosoma, puesto que se ha logrado reducir el número de huevos en el hígado, la eliminación de huevos en las heces, número de granulomas hepáticos y adultos empleando antígenos tegumentales del estadio esquistosómico (37), por lo que una

combinación de quimioterapia con inmunoterapia podría aumentar la protección contra la esquistosomiasis, en el humano.

En conclusión, en el presente estudio se encontró una disminución en las proteínas totales, actividades enzimáticas ACP y SOD y la concentración de la ALP de extractos crudos y productos de excreción de *S. mansoni* preparados con gusanos tratados con PZQ *in vitro*, particularmente significativos en los PESGM postratamiento para la ACP, en los ASG para la SOD y en ASG y PESGH para la ALP.

**AGRADECIMIENTO.** Los autores agradecen el apoyo técnico a las Asistentes de investigación, Olga Ojeda y Jennifer Ayala.

**FINANCIAMIENTO.** El trabajo fue financiado por los Proyectos de Investigación CDCH-UC N° 00220-08 y CDCHUC N° 2010-004.

## REFERENCIAS

1. Gryseels B. Schistosomiasis. Infect Dis Clin North Am. 2012 Jun;26(2):383-97.
2. King CH, Dangerfield-Cha M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. Chronic Illness 2008; 4: 65-79
3. Ash LR, Orihel TC. Quinta edición. Madrid, España: Panamericana, 2010.
4. Cesari I, Ballen D, Mendoza L, Matos C. Detection of *Schistosoma mansoni* membrane antigens by immunoblot analysis of sera of patients from low-transmission areas. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12(2): 280-286.
5. Botero D, Retrepo M, Rodrigo A, Parra G. Parasitosis Humanas (4ta edición) Medellín: Colombia, 2005.
6. Tran M, Freitas T, Cooper L, Gase S, Gatton M, Jones M, Lovas E, Pearce EJ, Loukas A. Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. PloS Pathogens 2010; 6(4):1-10.



7. Carvalho C, Cook R, Wang C, Oliveira R, Bailey N, Egilmez N, Mathiowitz E, Philip T. Cross-reactivity of *Schistosoma mansoni* cytosolic superoxide dismutase, a protective vaccine candidate, with host superoxide dismutase and identification of parasite-specific B epitopes. *Infect Immun* 2004; 72(5):2635-2647.
8. Pica-Mattoccia L, Cioli D. Sex-and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *Int J Parasitol* 2004; 34: 527-533.
9. Aragon AD, Imani TAM, Blackburn VE, Cupit PM, Melman SD, Goronga T, Webb T, Loker E, Cunnigham C. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. *Mol Biochem Parasitology* 164: 57-65.
10. Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21: 659-667.
11. Manual Merck. Praziquantel. Consulta: 12/02/2012. Disp en: MANUALMERCK:<http://www.merckmanuals.com/professional/lexicomp/praziquantel.html>.
12. Caffrey CR. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Current Opinion in Chemical Biology* 2007; 11: 433-439.
13. Harder A, Goossens J, Andrews P. Influence of praziquantel and Ca<sup>2+</sup> on the bilayer-isotropic-hexagonal transition of model membranes. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 29:55-9.
14. Lima SF, Vieira LQ, Harder A, Kusel JR. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 1994; 109:57-64.
15. Ribeiro F, Coelho PM, Vieira LQ, Watson DG, Kusel JR. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 1998; 116:229-36.
16. Andrews PA. A summary of the efficacy of praziquantel against schistosomes in animal experiments and notes on its mode of action. *Arzneimittel-Forschung* 1981; 31: 530-41.
17. Barreto O, Blanco R, Barrios EE, Sánchez L, Araque W, Delgado V, Pinto V. Efecto *in vitro* del praziquantel sobre la actividad enzimática de superóxido dismutasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina en gusanos adultos de *Schistosoma mansoni*. *Memorias VII Congreso de Investigación y 1er Congreso Internacional de la Universidad de Carabobo* 2010. Tomo III: 2007-2010.
18. Araque W, Barrios E, Rodríguez P, Delgado V, Finol H. Ultrastructural study of the *in vitro* interaction between *Biomphalaria glabrata* hemocytes and *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98, 905-908.
19. Barrios E, Finol H, Delgado V, Araque W. *Schistosoma mansoni*: Cambios ultraestructurales durante la transformación del miracidio *in vitro*. *Salus* 2004; 8, 12-19.
20. Abdulla M-H, Lim K-C, McKerrow JH, Caffrey CR. Proteomic Identification of IPSE/alpha-1 as a Major Hepatotoxin Secreted by *Schistosoma mansoni* Eggs. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(10): e1368.doi:10.1371/journal.pntd.0001368.
21. Ramajo Hernández A. Análisis de los proteomas y glicoproteomas del tegumento y de los productos de excreción-secreción de *Schistosoma bovis*. Estudio de la interacción del parásito con el sistema fibrinolítico del hospedador. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca, Salamanca: España. 2008.
22. Spector T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. *Annal Biochem* 1981; 86:142-146.
23. Lee S, Moon S-O, Kim W, Sung MJ, Kim DH, Kang KP, Jang YB, Lee JE. Protective role of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid in cisplatin-induced renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2085-2095.
24. Kasinathan RS, Morgan WM, Greenberg RM. *Schistosoma mansoni* express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (SmMRP1) in juvenile worms and in response to praziquantel. *Mol Biochem Parasitol* 2011; 173(1): 25-31.
25. DeMarco R, Mathieson W, Manuel SJ, Dillon PG, Curwen RS, Ashton PD, Ivans AC, Berriman M, Almeida SV, Wilson RA. Protein variation in blood-dwelling schistosome worms generated by differential splicing of micro-exon gene transcripts. *Genome Res* 2010; 20:1112-112.
26. Hamed MA. Potency of detergents in enhancing *Schistosoma mansoni* tegumental antigens. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5(3):209-215.
27. Guija E, Soberón M, Haak-Mares H. Mecanismo de acción de las fosfatasa ácidas de bajo peso molecular. *An Fac Med Lima* 2007; 68(4): 356-362.

28. Alvear M, López R, Rosas A, Espinoza N. Efecto de la Aplicación de Herbicidas en Condiciones de Campo Sobre Algunas Actividades Biológicas. *Rev Cienc Suelo Nutr Veg* 2006; 6(1): 64-76.
29. Suh B-C, Leal K, Hille B. Modulation of high-voltage activated  $Ca^{+2}$  channels by membrana phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neuron* 2010; 62(2): 224-238.
30. Cook RM, Carvalho-Queiroz C, Wilding G, LoVerde PT. Nucleic Acid Vaccination with *Schistosoma mansoni* Antioxidant Enzyme Cytosolic Superoxide Dismutase and the Structural Protein Filamin Confers Protection against the Adult Worm Stage. *Infect Immun* 2004, p. 6112–6124.
31. Cardoso RM, Silva CH, Ulian de Araújo AP, Tanaka T, Tanaka M, Garratt RC. Structure of the cytosolic Cu,Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Acta Cryst* 2004; 60(9). 1569-1578.
32. El-Lakkany N, Seif el-Din S, Ebeid F. The use of pentoxifylline as adjuvant therapy with praziquantel downregulates profibrogenic cytokines, collagen deposition and oxidative stress in experimental schistosomiasis mansoni. *Exp Parasitol* 2011; 129(2): 152-157.
33. Cesari IM, Ballen DE, Mendoza L, Matos C. Detection of *Schistosoma mansoni* membrane antigens by immunoblot analysis of sera of patients from low-transmission areas. *Clin Vaccine Immunol* 2005; 12: 280-286.
34. Bhardwaj R, Skelly PJ. Characterization of schistosome tegumental alkaline phosphatase (SmAP). *PLOS Negl Trop Dis* 2011. [citado: 2011 Septiembre 25]. Disponible en: e1011.doi:10.1371. journal.pntd.0001011.
35. Barrios EE, Delgado V, Araque W, Pinto V, Ojeda O, Ayala J. Respuesta humoral murina y humana contra antígenos solubles de huevo y excreción-secreción de gusanos de *Schistosoma mansoni*, tratados con praziquantel. *Revista Ibero-Latinoam de Parasitol* 2010 69(2): 178-185.
36. Miranda-Miranda E, Llébano-Hernández E, López-Arellano M E, Mendoza de Gives P, Cossio-Bayugar R. Marcadores enzimáticos como indicadores de resistencia a los antihelmínticos en el nematodo parásito gastroentérico de rumiantes *Haemonchus contortus*. *Bioquímica* 2006; 31:6-12.
37. Martins V P, Pinheiro C S, Figueiredo C P, Assis N R, Morais S B, Caliani M V, Azevedo V, Castro-Borges W, Wilson A, Oliveira SC. Vaccination with enzymatically cleaved GPI-Anchored protein from *Schistosoma mansoni* induces protection against challenge infection. *Clin Dev Immunol* 2012. Doi: 10.1155/2012/962538.