

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
PROFESIONAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**RESPUESTA DE ANTICUERPOS CONTRA LOS ANTIGENOS Sm31/32
DE *S. mansoni*, EVIDENCIADO POR LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT EN LAS
COMUNIDADES DE LOS NARANJOS, CASERIO EL 25 Y SEITIFERO ANTES Y
DESPUÉS DE ADMINISTRAR EL TRATAMIENTO ESPECÍFICO**

Autores:

Aguirre Carmely

Azuaje Irmis

Betancourt Angeli

Tutor Científico:

Prof. Planchart Sandra

Co-tutor:

Prof. Incani Renzo Nino

Asesor Metodológico:

Prof. Calzolaio Vita

Valencia, Noviembre 2007



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
 FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
 ESCUELA DE BIOANALISIS
 DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO PROFESIONAL
 ASIGATURA TRABAJO DE INVESTIGACION

INSTRUCTIVO PARA EVALUAR EL CUARTO LAPSO

Título del Trabajo:

Respuesta de anticuerpos contra los antígenos Sm31/32 de *Schistosoma mansoni*, evidenciado por la técnica de Western Blot en las Comunidades de Los Naranjos, Caserío El 25 y Seitifero antes y después de administrar tratamiento específico.

La calificación obtenida en la presentación y defensa del Trabajo fue:

Estudiante	P. Escrita (30%)	Diseño de la P. (10%)	P. Oral (20%)	Defensa y Discusión (10%)	Total
Br. Aguirre Carmely	19	20	20	20	20
Br. Asuaje Irmis	19	20	20	20	20
Br. Betancourt Angeli	19	20	20	20	20
Br.					

<i>Vita Calzolaio</i> Nombre:	EMILIA E. BARRIOS Nombre:	<i>Yasmin Taus</i> Nombre:
C.I.: 8611413	C.I.: 9636863	C.I.: 7117821
<i>Vita Calzolaio</i> Firma	<i>Emilia E. Barrios</i> Firma	<i>Yasmin Taus</i> Firma

Valencia, 04 de Noviembre de 2007

Instrumento Diseñado por las Profesoras Rosalina González y Yunedy Marcano. Actualizado por las Profesoras Vita Calzolaio y Amarily Perelli



Agradecimientos

Dedicamos esta parte de nuestra vida a Dios Ser Supremo, quien nunca nos ha abandonado y nos ha guiado por el buen camino, a ti Papá Dios!

A nuestros Familiares, quienes han estado en todo momento en nuestro crecimiento personal y profesional, brindando su apoyo, amor y comprensión.

A nuestra querida profesora Sandra Planchart por su asesoramiento científico, por sus substanciales sugerencias durante la redacción de la Tesis y por su amistad.

Al profesor Renzo Nino Incani por su fundamental ayuda en el trabajo así como en sus observaciones críticas en la redacción del trabajo y su disposición permanente e incondicional, mil gracias!

A nuestra profesora Vita Calzolaio por su colaboración, consideración, paciencia y orientación en el trabajo.

Al personal de trabajo del Laboratorio de Bilharzia del Departamento de Parasitología de la Universidad de Carabobo, por abrirnos sus puertas y permitirnos trabajar en sus instalaciones y tratarnos como un miembro mas en un clima de amistad, respeto, confianza y colaboración.

A todas las personas especiales que siempre están incondicionalmente cuando se les necesita.

INDICE

Página

Indice de Cuadros

Indice de Figuras

Indice de Gráficos

Resumen

INTRODUCCION

Objetivo General

Objetivos Específicos

METODOLOGIA

Tipo Investigación

Población

Muestra

Procedimiento Metodológico

Instrumentos de Recolección

Análisis de los Datos

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

INDICE DE CUADROS

Número de la tabla	Descripción	Página
1	Comparación de las diferentes respuestas de anticuerpos en sueros de pacientes de las comunidades Caserío El 25, Los Naranjos y Seitifero, que responden a los antígenos de ESVA del <i>S. mansoni</i> ; pre-tratamiento, 3 meses y 12 meses después.	
2	Comparación de la respuesta de anticuerpos contra antígenos de ESVA del <i>S. mansoni</i> entre las comunidades en estudio; pre-tratamiento, 3 meses y 12 meses después.	
3	Comparación de la respuesta de anticuerpos de suero de pacientes infectados con <i>S. mansoni</i> que responden a los antígenos de ESVA de diferentes pesos moleculares en las comunidades de Los Naranjos, Caserío El 25 y Seitifero antes, 3 meses y 12 meses post-tratamiento.	

INDICE DE FIGURAS

Número de la figura	Descripción	Página
1	Western blot de sueros de pacientes de la comunidad Caserío El 25 infectados con <i>S. mansoni</i> , contra antígenos del regúrgito de vermes adultos, 1: control positivo; 2-3: controles negativos; 4-9 pacientes pre-tratamiento; 10-15: pacientes post-3 meses; 16-21 pacientes post-12 meses.	
2	Western blot de sueros de pacientes de la comunidad de Los Naranjos infectados con <i>S. mansoni</i> , contra antígenos del regúrgito de vermes adultos, 1: control positivo; 2-3: controles negativos; 4-9 pacientes pre-tratamiento; 10-15: pacientes post-3 meses; 16-21 pacientes post-12 meses	
3	Western blot de sueros de pacientes de la comunidad Seitifero infectados con <i>S. mansoni</i> , contra antígenos del regúrgito de vermes adultos, 1: control positivo; 2-3: controles negativos; 4-9 pacientes pre-tratamiento; 10-15: pacientes post-3 meses; 16-21 pacientes post-12 meses.	

INDICE DE GRÁFICOS

Número del gráfico	Descripción	Página
1	Distribución de frecuencia del reconocimiento de los antígenos de excreción-secreción de vermes adultos (ESVA) de <i>S. mansoni</i> por Western blot de sueros de personas (37 en cada condición) con esquistosomiasis provenientes de la Comunidad Caserío El 25, Estado Carabobo Octubre 2007.	
2	Distribución de frecuencia del reconocimiento de los antígenos de excreción-secreción de vermes adultos (ESVA) de <i>S. mansoni</i> por Western blot de sueros de personas (36 en cada condición) con esquistosomiasis provenientes de la Comunidad Los Naranjos, Estado Carabobo Octubre 2007.	
3	Distribución de frecuencia del reconocimiento de los antígenos de excreción-secreción de vermes adultos (ESVA) de <i>S. mansoni</i> por Western blot de sueros de personas (28 en cada condición) con esquistosomiasis provenientes de la Comunidad Seitífero, Estado Carabobo Octubre 2007.	

RESUMEN

RESPUESTA DE ANTICUERPOS CONTRA LOS ANTIGENOS Sm31/32 DE *S. mansoni*, EVIDENCIADO POR LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT EN LAS COMUNIDADES DE LOS NARANJOS, CASERIO EL 25 Y SEITIFERO ANTES Y DESPUÉS DE ADMINISTRAR EL TRATAMIENTO ESPECÍFICO

Autores: Carmely Aguirre; Irmis Azuaje y Angeli Betancourt.

Tutores: Profs Sandra Planchart y Renzo Incani.

Asesor: Prof Vita Calzolaio.

Realizado en el Laboratorio de Bilharzia del Departamento de Parasitología de la Universidad de Carabobo y Financiado por el CDCH.

La esquistosomiasis causada por *S. mansoni* representa un problema de salud pública en diversos países del continente americano, entre ellos Venezuela, considerada actualmente como una zona hipoendémica. Existen sitios que representan focos de importancia epidemiológica como lo son las comunidades de Los Naranjos (zona alta transmisión activa) Caserío El 25 (zona de baja transmisión activa) y Seitifero (zona de baja transmisión interrumpida) del estado Carabobo. En diversos estudios los antígenos Sm31/32 son considerados altamente inmunogénicos y específicos de la enfermedad, es por esto que en nuestro estudio el objetivo fue evaluar la respuesta de anticuerpos contra un preparado antigénico de excreción-secreción de vermes adultos (ESVA) de *S. mansoni* incubados en PBS mediante la técnica de Western blot. Se trabajó con 303 sueros de pacientes con esquistosomiasis provenientes de las comunidades antes mencionadas y que resultaron positivos para las pruebas diagnósticas Kato-Katz y PPCO, quienes habían sido tratados con Praziquantel y Oxamniquina en diferentes esquemas de tratamiento. Al comparar la respuesta de anticuerpos entre las comunidades se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas antes del tratamiento ($p = 0,002$) y 12 meses después ($p = 0,01$). La intensidad de la respuesta hacia los diferentes antígenos de ESVA se aprecia diferente entre las tres comunidades, así como en las diferentes condiciones (Pre-tratamiento, 3 meses y 12 meses post-tratamiento). En relación a las bandas Sm31/32 de interés en este estudio se notó que el reconocimiento de los sueros hacia estos antígenos fue intensa antes del tratamiento y se mantuvo aun después del mismo, con ligeras diferencias no significativas ($p = 0,82$). Dentro de este marco podemos inferir que un año no es suficiente para determinar cura serológica en pacientes infectados con *S. mansoni* y esto podría indicar la existencia de vermes residuales que continúan expulsando antígenos al medio circundante, induciendo así la producción de anticuerpos.

PALABRAS CLAVE: Esquistosomiasis, Antígeno, Anticuerpo, Inmunogénico.

INTRODUCCIÓN

La esquistosomiasis es una parasitosis que afecta, según la Organización Mundial de la Salud a más de 200 millones de personas en el mundo, con una tasa de mortalidad de 750 mil por año. Se pueden presentar desde casos asintomáticos hasta cuadros agudos con fiebre, urticaria y otras reacciones alérgicas, que progresa hacia un estado crónico caracterizado por fibrosis hepática e hipertensión portal (Rey, 2001).

Esta enfermedad es causada por tremátodes del género *Schistosoma*, el cual abarca cinco especies: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, y *S. mekongi*. Los parásitos de este género presentan una amplia distribución en América, África y Asia, disponiéndose cada especie en regiones específicas, dependiendo principalmente de la especie de caracol que actúe como su hospedador intermediario. Por ello, *S. mansoni* está distribuido en África, Península Arábiga, América del Sur y el Caribe; *S. japonicum* en Indonesia, China y Filipinas, causando ambas esquistosomiasis intestinal y *S. haematobium*, en regiones del norte de África y el medio oriente, causando esquistosomiasis urinaria. Las especies de *S. intercalatum* y *S. mekongi* son menos frecuentes, registrándose la primera solo en seis países de África Ecuatorial y la segunda con distribución limitada a la cuenca del Río Mekong en Indochina.

La esquistosomiasis causada por *S. mansoni* representa un problema de salud pública en diversos países del continente americano como Puerto Rico, República Dominicana y Brasil. Actualmente, Venezuela es considerada una zona hipoendémica, es decir con baja prevalencia y morbilidad, debido principalmente al éxito obtenido con el programa de control establecido en 1943 por el anterior Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, el cual logró reducir la prevalencia en el área endémica del 14,6 % entre los años 1943 - 1960 a aproximadamente 1 % en 1996, (Incani, 1987; Alarcón de Noya y col, 1992, 1999). El área endémica de esquistosomiasis en Venezuela está circunscrita a la región centro norte del país, abarcando los Estados Miranda, Aragua, Carabobo, Guárico y Vargas.

Esta circunstancia de baja morbilidad, trae a su vez problemas a nivel diagnóstico para el seguimiento y control de las comunidades. Así, los métodos de diagnóstico coprológico disminuyen su sensibilidad en aproximadamente un 60%. Por otra parte, los métodos serológicos asociados a la detección de anticuerpos circulantes, que aunque de mayor sensibilidad, presentan la desventaja que sus niveles permanecen en circulación por mucho tiempo e incluso años luego de curarse el paciente. Por lo tanto, estos métodos no son apropiados para discriminar entre exposiciones previas e infecciones activas, así como tampoco para evaluar la eficacia de la quimioterapia, ni para justificar la administración de un nuevo tratamiento, lo que conlleva a un subregistro de la enfermedad.

En este estudio es de interés particular considerar la situación actual de la esquistosomiasis en el estado Carabobo, en el cual se encuentran zonas que representan focos de importancia epidemiológica, los cuales han sido previamente evaluados por los métodos de diagnóstico Kato-Katz, la Prueba de Precipitación Circunmoval (PPCO) y la Reacción de anticuerpos fluorescentes (RIAF) (García y col, 1997).

Entre las comunidades que referimos destacan: El Valle de los Naranjos, sitio de alta transmisión activa con una prevalencia de 46,1% por Kato-Katz y 59,8% por PPCO (Sánchez y col, 1997); Caserío El 25, zona de baja transmisión activa, cuya prevalencia por Kato-Katz fue de 0,45% y 11,2% por PPCO (Incani y col, 1999); y Seitifero-Valle de Manaure, lugar de baja transmisión e interrumpida, con una prevalencia de 6,8% por Kato-Katz y 33,1% por PPCO (García y col, 1997).

En el estudio realizado por García y col (2006), en la comunidad de Los Naranjos, luego de que fueran tratadas con Praziquantel (PZQ) y Oxamniquina (OX) en dosis combinada, se realizó un seguimiento de 3 meses, 6 meses, 1 año y 2 años post tratamiento, observándose negativización en PPCO, sin embargo en la prueba diagnóstica de RIAF, no se observó la seroconversión. Los métodos de diagnóstico PPCO y RIAF se realizaron también en las comunidades Caserío El 25 y Seitifero, que se estudiaron conjuntamente con Los Naranjos, donde la carga parasitaria era menor en ambas. El tratamiento aplicado fue solamente de PZQ en dosis fraccionada para el Caserío El 25 y en dosis repetida para

Seitífero; obteniéndose en ambas comunidades una negativización significativa para estas pruebas.

Por esta ambigüedad, surge la hipótesis de que tal vez, las dosis de PZQ y OX administradas, no son suficientes para una comunidad de alta intensidad parasitaria, o que la cepa circulante sea tolerante a una de las dos drogas, quedando en ambas circunstancias, vermes residuales que aún siguen expulsando antígenos al medio circundante. Estos antígenos, de origen intestinal en su mayoría, serían los responsables de la presencia de anticuerpos reactivos que son observados en la RIAF.

Autores como Alarcón de Noya (1992), Valli (1999) y Planchart (2006) han reportado la presencia de anticuerpos contra antígenos de origen intestinal de los vermes adultos del *Schistosoma mansoni*, entre ellos productos de excreción-secreción como las enzimas cistein proteinasas Sm31/32, por las técnicas de ELISA y Western blot en pacientes con esquistosomiasis, a su vez Ruppel (1991), demostró la presencia de estos antígenos en suero de roedores, demostrándose que estas enzimas son de gran utilidad para el diagnóstico específico de esta parasitosis.

Existen numerosos estudios realizados para la detección de antígenos, anticuerpos o ambos, que a su vez permiten evaluar la eficacia del tratamiento esquistosomicida, entre los cuales destacan:

Un ensayo realizado por Ruppel y col (1991) en Alemania, en el cual se infectaron ratones con cercarias de *S. mansoni* o *S. japonicum*, que luego fueron tratados con dos dosis de PZQ entre 1 y 2 meses después. Al inicio del ensayo los ratones tenían un elevado nivel de anticuerpos contra las proteínas del verme adulto Sm31/32 (con actividad de catepsina B y hemoglobinas). Se realizó un monitoreo de los anticuerpos al cabo de 1 año del tratamiento, por Western Blot y por ELISA empleando antígenos purificados de Sm31/32. Alrededor de 34 ratones infectados sobrevivieron al final de los experimentos, 14 tenían entre 1 y 4 vermes residuales malformados, mientras que un ratón albergaba 8. En la mayoría de los ratones sin vermes detectables, los anticuerpos anti-Sm31/32 comenzaron a

descender unos pocos meses después de la quimioterapia. En otros animales con este grupo de vermes residuales malformados, el descenso de anticuerpos no se observó o disminuyó levemente; de esta manera ellos determinaron que la presencia de vermes, es suficiente para mantener títulos elevados de anticuerpos.

En Venezuela, Alarcón de Noya y col (2002) desarrollaron un ensayo inmunoenzimático, ELISA modificado, en el cual el antígeno soluble del huevo fue tratado con metaperiodato de sodio (SMP-ELISA) para eliminar los epítopes glicosilados responsable de las reacciones cruzadas (o falsos positivos). Obtuvieron una especificidad de 97% y sensibilidad de 99%. Por otro lado, este mismo grupo, sintetizó los péptidos de las enzimas: catepsina B (Sm31), cistein proteinasa lisosomal (Sm32) y catepsina D (Sm45), enzimas de excreción-secreción altamente inmunogénicas. Ellos combinaron dos péptidos provenientes del Sm31 y la evaluación mostró una sensibilidad de 96% y cuando los analizaron independientemente llegaron a un 100% de especificidad. El aumento de anticuerpos contra péptidos provenientes del Sm31 y Sm32 están siendo evaluados en conejos, con diferentes ensayos basados en la captura de antígenos.

Noya y col (2003) en Venezuela, desarrollaron métodos de inmunodiagnóstico basados en la detección de anticuerpos y de antígenos circulantes utilizando la estrategia de la síntesis química, para luego elaborar péptidos derivados de la catepsina B (Sm31) y la asparginil endopeptidasa (Sm32). En sus resultados, tres de los péptidos de la Sm31 fueron reconocidos por el 49% de los pacientes y de ellos el IMT-180, lo fue por el 86%, exhibiendo además una alta especificidad (100%). Dos de los péptidos de la Sm31 y tres de la Sm32 indujeron en conejos, el reconocimiento de las respectivas moléculas.

Cesari y col (2002) en Venezuela, aplicaron el Inmunoensayo de la Fosfatasa Alcalina (IEFA) para detectar la presencia de anticuerpos anti-fosfatasa alcalina de la membrana de los vermes adultos de *S. mansoni*. Ellos evaluaron la utilidad del IEFA para el diagnóstico epidemiológico de la esquistosomiasis mansoni, comparándola con la PPCO, ELISA (con antígeno de huevo) y Western Blot, permitiendo este último evaluar la respuesta inmune contra otros antígenos de membrana diferentes a la Fosfatasa Alcalina.

Trabajaron con una población de 1514 sueros de personas de tres comunidades diferentes del área endémica del interior de Venezuela y 322 sueros del área capitalina de Caracas. Obtuvieron una sensibilidad de 91,1 – 96,8% con respecto a la PPCO y de 60,8 – 80,9% con respecto a la ELISA. El IEFA fue 100% específico con los sueros de sujetos residentes en localidades no endémicas. Sus resultados mostraron que el IEFA es una técnica sensible y específica para detectar seropositividad en zonas endémicas, con baja o pasada transmisión, lo que permite su aplicación como alternativa en la pesquisa epidemiológica de la esquistosomiasis mansoni en zonas hipoendémicas.

Así más tarde, este mismo grupo (Cesari y col 2005) mostraron que los antígenos de membrana del verme adulto de *S. mansoni* obtenidos en un extracto de *n*-butanol (EB) empleando la técnica de Western blot, presentaban algunas diferencias en el número, intensidad y frecuencia de reconocimiento de estos antígenos entre los sueros de pacientes de las comunidades en estudio con respecto a los niveles de transmisión de la esquistosomiasis. La población utilizada fueron pacientes infectados con *S. mansoni* provenientes de diferentes comunidades de los estados Carabobo (José Leonardo Chirinos y Belén), Vargas (Caraballeda) y Aragua (San Sebastián de los Reyes). Demostrándose la existencia de antígenos de masa molecular entre 28-24 kDa que aparecieron como inmunodominantes y fueron reconocidos por sueros positivos para *S. mansoni* de todos los lugares, con frecuencias de reconocimiento variables entre 57,5 y 97,5%. Los resultados obtenidos mostraron una alta sensibilidad de 98,1% y una especificidad de 96,1% para el Inmunoblotting con antígeno EB de membrana, siendo utilizada como prueba confirmatoria para el inmunodiagnóstico de esquistosomiasis en áreas de baja transmisión.

En este mismo sentido se encuentra el trabajo de García y col (2006), el cual consistió en evaluar la eficacia de diferentes esquemas de tratamiento esquistosomicida mediante la negativización de la reacción indirecta de anticuerpos fluorescentes (RIAF). Ellos estudiaron 111 individuos infectados con *S. mansoni* provenientes de tres áreas endémicas del Edo. Carabobo y a quienes les administraron un esquema terapéutico diferente. En el Caserío El 25, PZQ en dosis fraccionada (60mg/Kgp), los Naranjos, PZQ y OX en dosis combinada (40mg/Kgp y 20mg/Kgp respectivamente) y PZQ mas placebo en

dosis única (40mg/Kgp) y la comunidad de Seitifero, PZQ en dosis repetida (40mg/Kgp trimestralmente), evaluándose por RIAF en pre y post-tratamiento. Ellos observaron la negativización a los tres y doce meses post- tratamiento, cuando se utilizó el esquema de dosis fraccionada. El mismo resultado lo obtuvieron a los doce meses post-tratamiento cuando administraron PZQ a dosis repetida. Cuando compararon las tasas de negativización alcanzadas con los diferentes esquemas de tratamiento, no observaron diferencias significativas con excepción de aquellas logradas con la administración de una dosis de PZQ en el esquema de dosis repetida, en la comunidad de Seitifero que fueron mayores a las encontradas en Los Naranjos, con la administración de PZQ, ya sea de dosis combinada con Ox o en dosis única. Por todo esto, consideraron importante la investigación de los factores que determinen la respuesta de los individuos infectados al tratamiento esquistosomicida para diseñar nuevos esquemas quimoterapéuticos más adecuados y eficaces.

En un análisis realizado por Planchart y col (2007), en el que se prepararon antígenos del regurgito del verme adulto de *S. mansoni in vitro*, para lo cual incubaron los vermes a diferentes temperaturas según protocolos establecidos. Este regurgito fue evaluado por Western blot con sueros de personas de la comunidad de Los Naranjos y con ratones infectados con *S. mansoni*. Los resultados así obtenidos mostraron un duplete inmunogénico de 31 y 32 kDa específico para *S. mansoni*, probablemente relacionado con las cistein proteinasas Sm31 y Sm32 del intestino, ya que en estos extractos antigénicos fue detectada actividad enzimática tipo catepsina B (Sm31). Por todo esto ellos consideraron de importancia seguir las evaluaciones de estos antígenos identificados para desarrollar una alternativa diagnóstica conveniente.

El género *Schistosoma* se distingue de otros de la clase Tremátoda y sub-clase Digenea, por presentar sexos separados, acentuado dimorfismo sexual y por que los machos poseen menos de 10 masas testiculares situadas detrás de la ventosa ventral (Rey, 2001). El macho mide 10-12 mm. de longitud, siendo su cuerpo ancho en las dos porciones: una anterior, corta, en la cual se encuentran las dos ventosas, oral y ventral, la otra posterior,

larga, donde se observa el canal ginecóforo. El tubo digestivo es visible en algunos ejemplares.

La hembra es un poco mas larga, 12-16 mm., mas fina, el ovario situado en la mitad anterior del cuerpo, útero corto, vulva detrás de la ventosa ventral y el tubo digestivo es bien aparente. Para ambos sexos, en el fondo de la ventosa anterior se encuentra la boca, único orificio que comunica el tubo digestivo con el medio exterior, esto se debe a que los trematodes carecen de ano.

Este parásito pertenece a la sub-clase Digenea, los cuales son heteroxenos, cumple su ciclo vital en dos hospedadores, uno invertebrado molusco planorbidae del género *Biomphalaria* y otro, vertebrado representado por el hombre o mamíferos roedores (McLaren y col, 1976; Rey, 2001). En las vénulas del sistema porta los adultos en cópula permanente viajan hacia las terminaciones de las venas mesentéricas inferiores donde oviponen. . Estos huevos necesitan unos 10 días en los tejidos para terminar de madurar y así formar la larva, llamada miracidio. Ya formado éste, el huevo tiene un período de vida no mayor de 12 días dentro de los tejidos, después del cual perece si no alcanza la luz intestinal y sale al medio ambiente con las heces. Al entrar en contacto con aguas dulces, en dependencia de la temperatura (óptima 28°C) y de la acción de la luz, ocurre la eclosión, liberándose los miracidios (Rey, 2001).

El miracidio tiene un periodo de vida en el agua de 24 a 48 horas aproximadamente, la mayoría de ellos mueren o pierden su viabilidad en 8-12 horas, si no encuentran antes su hospedador intermediario; que en Venezuela es el caracol del género *Biomphalaria*, especie *Biomphalaria glabrata*. Éste penetra en el molusco adhiriéndose a sus partes blandas, luego sufre una transformación morfológica a esporoquiste madre o primario que va a dar lugar a una segunda generación de esporoquistes que posteriormente producen las cercarias (Rey, 2001).

Las cercarias abandonan el molusco y salen al medio exterior, permaneciendo en el agua hasta encontrar un nuevo hospedador. De aquí que son capaces de penetrar en la piel

del hombre, proceso en el cual pierden su cola y es cuando reciben el nombre de esquistosómulos. Estos migran hacia las vénulas cutáneas, corazón derecho, pulmones, capilares arteriolares, capilares venosos, corazón izquierdo y son distribuidos por la circulación arterial sistémica. Es en el hígado donde terminan su crecimiento y en las ramificaciones del sistema porta intrahepático comienza la cópula (Rey, 2001).

El parásito requiere de diferentes factores para su crecimiento y multiplicación en el hospedador (Barrios y col, 2001). Los daños producidos por éste en el humano pueden deberse: al paso de las cercarias por la piel del hombre, a los gusanos adultos dentro de los vasos del sistema porta, en el intestino o dentro del hígado y/o a los huevos a nivel de la pared intestinal, del hígado, del pulmón u otros órganos (Incani, 1996). Ambos, tanto el huevo como el verme adulto liberan productos antigénicos en el hospedador capaces de originar daños en el mismo (Abath y col, 2006).

El verme adulto vivo o al morir puede obstruir los vasos intrahepáticos y ocasionar reacciones inflamatorias; la respuesta del hospedador dependerá de la intensidad de la infección o carga parasitaria, las reinfestaciones y el estado inmunológico del hospedador ya que, tanto el hombre como los animales susceptibles pueden desarrollar una resistencia parcial a la infección por *S. mansoni* que les permite destruir cercarias y esquistosómulos a su paso por lo tejidos.

Existe un foco inflamatorio inducido por el huevo, que se caracteriza por la presencia de un granuloma a su alrededor, donde puede haber células epitelioides, macrófagos, linfocitos, células gigantes y fibroblastos. Las lesiones ocurren fundamentalmente en el hígado, y el individuo puede o no presentar sintomatología intestinal. Este granuloma va disminuyendo su tamaño a medida que aumenta la fibrosis.

En Venezuela, por ser zona de baja endemicidad, la mayoría de los pacientes se encuentran en las etapas clínicas intestinal o hepato-intestinal (Incani, 1996). El periodo intestinal se caracteriza por diarrea con o sin disentería, dolor abdominal y en el hipocondrio derecho, hígado y bazo no palpables. Examen de heces positivo y también

pueden presentarse casos asintomáticos; en el periodo Hepato-intestinal se evidencia una sintomatología intestinal, el mayor porcentaje de casos con diarrea y epigastralgia. Hígado aumentado de volumen. Bazo no palpable. Examen de heces positivo.

Las diferentes formas del parásito en contacto con el hospedador vertebrado, es decir, las cercarias, los esquistosómulos, los vermes adultos de ambos sexos, huevo/miracidio, vierten al medio circundante productos de excreción y secreción (PES) de diferente naturaleza y en cantidades variables, muchos de los cuales se originan internamente y emergen por los orificios naturales (aberturas de conductos glandulares, región oral, poros genitales, poros excretores) y también desde el tegumento en forma soluble y de pequeñas vesículas derivadas de la doble membrana de superficie (Cesari, 1985).

Existe un vasto complejo de proteínas y glicoproteínas enzimáticas en los parásitos, algunas responsables de su metabolismo y otras, de sus procesos de invasión y migración a través de los tejidos. Tales enzimas presentadas al hospedador como PES o cuando el parásito muere, inducen respuestas inmunitarias variadas, conociéndose a todos estos componentes como antígenos.

Una de las enzimas intestinales de los vermes adultos de *S. mansoni*, que digiere la hemoglobina liberada de los glóbulos rojos ingeridos de su hospedero son hemoglobinasas, una de ellas es la sulfhidril (S) proteinasa ácida no azucarada de PM 32 kD, con actividad de asparaginil endopeptidasa; y otra enzima proteolítica de 31 kD tipo catepsina B, la cual es homóloga a la del hígado humano. En análisis por Western blot se revela que los sueros de los pacientes infectados con *S. mansoni*, reaccionan con el polipéptido de 32 y 31 kD respectivamente, lo que enfatiza su valor diagnóstico (Chappell y col, 1988; Klinkert y col, 1989; Cesari, 1990; Dalton y col, 1995).

A través de la técnica ELISA empleando péptidos sintéticos se detectaron anticuerpos contra ambas enzimas en pacientes infectados donde ya no había excreción de huevos (El-Sayed y col, 1998). También se ha determinado la respuesta de anticuerpos

contra estos antígenos por Western blot encontrándose los isotipos IgM, IgA e IgG en un 100% en aquellos pacientes con esquistosomiasis aguda, mientras que en los estados crónicos solo se observó un 10% de IgM e IgA (Valli y col, 1999).

Para el diagnóstico de esta infección, los métodos parasitológicos son la primera opción, estos consisten en la demostración de los huevos en las heces (Doenhoff y col 2004) u otros tejidos del paciente infectado; también están los métodos inmunológicos basados en la detección de anticuerpos contra los componentes del parásito o antígenos circulantes del parásito en el paciente.

Entre las técnicas parasitológicas se encuentran:

(1.-)Kato-Katz: prueba que permite cuantificar el número de huevos por gramos de heces (Katz y col, 1972) Este método ofrece baja sensibilidad cuando la excreción de huevos es inferior a 100 huevos por gramos de heces. (Noya y col, 2002).

(2.-)Biopsia rectal: consiste en tomar una biopsia a nivel de la válvula de Houston, a unos 10 cm del ano, permitiendo visualizar los huevos en la mucosa rectal, además de evaluar su estado evolutivo y viabilidad; este método diagnostica casos negativos por coprología (Rey, 2001).

Los métodos inmunológicos surgieron por la necesidad de estimar la prevalencia real sobre todo en casos que no son diagnosticados por las pruebas parasitológicas y en aquellas infecciones asintomáticas y/o crónicas. Se han empleado muchas pruebas, entre ellas:

(1.-)Inmunoensayo enzimático (ELISA): método de detección de anticuerpos del paciente, donde se hacen reaccionar con antígenos del parásito, este complejo se evidencia con anticuerpo secundario marcado con una enzima. La reacción se revela al agregar un substrato cromogénico adecuado para la enzima, la positividad se evalúa por visualización o por espectrofotometría de la intensidad del color. Su sensibilidad es alta, aunque su especificidad es limitada.

(2.-)Reacción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes (RIAF): método diagnóstico de detección de anticuerpos, que puede utilizar diferentes formas evolutivas del parásito como cercarias, huevos, esquistosómulos o vermes adultos, estos se incuban con el suero del paciente, dando como resultado una reacción antígeno-anticuerpo, que es evidenciado por fluorescencia de estructuras antigénicas, al agregar una anti-inmunoglobulina humana, marcada con una sustancia fluorescente.

(3.-)Inmunoensayo enzimático de la fosfatasa alcalina (IEFA): se basa en la captura de anticuerpos que detectan la enzima fosfatasa alcalina de la superficie tegumental del verme adulto. Para ello los anticuerpos IgG en el suero del paciente son capturados mediante el uso de proteína A de *Staphilococcus aureus* en una placa de ELISA. Posteriormente se incuba esto con un extracto butanólico del verme adulto rico en fosfatasa alcalina; luego se añade el sustrato de la enzima (p-nitrofenolfosfato) y para detener la reacción se agrega hidróxido de sodio o agua destilada fría, la actividad de ésta, se determina por espectrofotometría (Pujol y col, 1989).

(4.-)Prueba de Precipitación Circunmoval (PPCO): consiste en determinar anticuerpos séricos del paciente contra los huevos o sus secreciones, se evidencia por la formación de precipitados alrededor de los huevos viables de *S. mansoni* a partir de dos días de incubación a 37°C. Esta prueba es específica, no observándose reacción cruzada con huevos de otras especies de esquistosoma. La prueba se mantiene positiva durante el curso de la enfermedad, negativizándose después de 8 meses a 1 año del tratamiento (Alarcón de Noya, 1990).

(5.-)Captura de Antígenos Circulantes: consiste en la detección por ELISA de los antígenos circulantes como PES capturados por anticuerpos monoclonales o policlonales previamente producidos contra algún antígeno de interés, de esta forma se logra detectar las infecciones activas lo que permite a su vez evaluar la eficacia de la quimioterapia (Carlier y col, 1975).

(6.-)Western blot: técnica empleada para identificar proteínas antigénicas por su interacción con los anticuerpos específicos circulantes en el suero de los pacientes a evaluarse. Para esto, inicialmente se requiere de la electrotransferencia de las proteínas contenidas en un extracto antigénico, previamente separadas en un gel de poliacrilamida y transferidas a un pedazo de papel de nitrocelulosa. Posteriormente, sobre dicho papel se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo descrita para ELISA, con la diferencia que se utiliza un sustrato quimoluminiscente, revelando contra una placa fotográfica (Karp, 1998).

Existen otras pruebas anteriormente empleadas en el inmunodiagnóstico pero debido a su complejidad, falta de sensibilidad y especificidad han dejado de usarse.

Tratamiento

El control de la esquistosomiasis es mayormente dependiente del uso del Praziquantel (Fenwick y col, 2003). Sin embargo, tanto el Praziquantel como la Oxamniquina son los medicamentos de elección disponibles actualmente en la terapéutica esquistosomicida.

Praziquantel (PZQ)

En el año 1972 se descubrió su actividad antihelmíntica, es un derivado de la pirazoquinolona y su efecto sobre el verme adulto del *S. mansoni* radica en el incremento de su actividad muscular al aumentar la permeabilidad de la membrana al calcio, esto origina la contracción y parálisis espástica, por lo que el parásito pierde su capacidad para adherirse a las paredes de los vasos sanguíneos. Estos resultados se obtienen tras la exposición a bajas concentraciones efectivas, mientras que a una concentración mayor se produce un daño tegumental en forma de vacuolización y vesiculización, que expone mayor variedad de antígenos y se facilita la acción de los mecanismos de defensa del hospedador y como consecuencia ocurre la muerte del verme adulto (Tracy, Webster, 1996).

Oxamniquina (OX)

Derivado de la 2-aminometiltetrahydroquinolina, que ejerce su acción sobre los vermes machos inmaduros y adultos del *S. mansoni*. Esta droga posee actividad anticolinérgica, de tal forma que su acción primaria esta relacionada con la activación enzimática ATP-dependiente de la droga, en esquistosomas susceptibles, produciendo intermediarios que alquilan moléculas esenciales como el ADN (García y col, 2006).

El grupo de trabajo del Laboratorio de Investigación en Bilharzia, del Departamento de Parasitología de la Universidad de Carabobo, determina necesario evaluar en las comunidades de Los Naranjos, Caserío El 25 y Seitifero, el comportamiento de la respuesta de anticuerpos circulantes que reconocen las bandas Sm31/32, antes y después del tratamiento, mediante Western blot, para tener una aproximación más clara de la eficiencia curativa de los esquemas de tratamiento utilizados para las diferentes condiciones epidemiológicas en estudio; ya que como el método de Western blot puede ser más sensible que el RIAF y ofrecer en detalle la diversidad de respuesta de anticuerpos contra los diferentes componentes antigénicos, pudiera definir si se logró o no la cura serológica en los pacientes de las comunidades del Caserío El 25, Seitifero y Los Naranjos.

Considerando que en Venezuela la esquistosomiasis es una parasitosis de baja morbilidad, las pruebas coprológicas no son las mas sensibles para realizar un diagnóstico. En estas zonas de baja endemicidad se omiten casos que podrían actuar como fuentes de infección y a pesar de las medidas de control que se han tomado a nivel nacional para erradicar la enfermedad, se sigue presentando la transmisión de la infección (Cesari y col, 2002).

En vista del limitado uso de los métodos coprológicos, se hace necesaria la aplicación de una estrategia de diagnóstico eficiente, que a su vez permita valorar la respuesta inmunológica a la quimioterapia esquistosomicida. Esto se podría lograr mediante pruebas serológicas que poseen mayor especificidad y sensibilidad.

Por todo lo antes planteado y basado en estudios anteriores es necesario evaluar la respuesta de anticuerpos contra antígenos específicos del *S. mansoni* por el método de Western blot, el cual es una técnica serológica que se considera específica al momento de diagnosticar la enfermedad en zonas hipoendémicas. De esta forma se podrían apoyar las recomendaciones acerca del cambio del esquema quimioterapéutico, por uno más eficaz, donde se observe tanto la cura parasitológica como la serológica, lo cual indica que los pacientes no siguen eliminando huevos por las heces y que hubo disminución de anticuerpos en el suero de los pacientes.

Surge la siguiente interrogante ¿El tratamiento administrado contra la esquistosomiasis es eficiente para lograr la disminución y/o eliminación de la respuesta de anticuerpos circulantes que reconocen los antígenos Sm31/32 de *S. mansoni*, en los pacientes infectados de las comunidades de Los Naranjos, Caserío El 25 y Seitifero, evaluado por Western blot?

Objetivo General

Evaluar la respuesta de anticuerpos contra los antígenos Sm31/32 de *S. mansoni*, evidenciado por la técnica de Western blot en las comunidades de Los Naranjos, Caserío El 25 y Seitifero antes y después de administrar el tratamiento específico.

Objetivos Específicos

- Obtener un preparado antigénico de vermes adultos de *S. mansoni* cepa BH, el cual esté enriquecido con las proteínas enzimáticas Sm31/32 de origen intestinal.
- Determinar la presencia de anticuerpos contra antígenos Sm31/32 en los sueros de pacientes provenientes de las comunidades de Los Naranjos, Caserío El 25 y Seitifero por Western blot antes de la administración de tratamiento.
- Determinar la modificación de la respuesta de anticuerpos contra los antígenos Sm31/32 en los sueros de las comunidades mencionadas, posterior al tratamiento con diferentes esquemas quimioterapéuticos.
- Comparar la respuesta de anticuerpos contra los antígenos Sm31/32 de *S. mansoni* antes y después del tratamiento específico.

METODOLOGÍA

Diseño y Tipo de Investigación

Este trabajo presenta un diseño No Experimental, es decir, que se realizó sin manipulación deliberada de variables (Hernández y col 2003), debido a que se determinó la respuesta de anticuerpos contra antígenos de excreción secreción (Sm31/Sm32) en pacientes con Schistosomiasis mansónica de las comunidades Los Naranjos, Caserío el 25 y Seitifero; de tipo Longitudinal ya que dicha respuesta fue analizada antes y después del tratamiento específico y Descriptiva porque permitió evaluar la eficacia del tratamiento.

Población

La población a estudiar estuvo constituida por individuos infectados con *S. mansoni* provenientes de tres comunidades localizadas al sur de Valencia en el estado Carabobo, caracterizadas por ser zonas de transmisión activa para la enfermedad, utilizando como pruebas diagnósticas Kato-Katz y PPCO.

Muestra

La muestra se conformó por aquellos individuos pertenecientes a las comunidades Los Naranjos, Caserío El 25 y Seitifero, que resultaron positivos para las pruebas diagnósticas Kato-Katz y PPCO.

Procedimiento metodológico

Características de las comunidades:

(1.-)Caserío El veinticinco: zona de baja transmisión activa, ubicada en el Municipio Carlos Arvelo, con una población de 651 habitantes (según censo realizado por el Departamento de Parasitología de la Universidad de Carabobo en el año 1999) con una prevalencia de 0,45% por Kato-Katz y 11,2% por PPCO (Incani et al,1999). De los individuos infectados, sólo 21 recibieron tratamiento con 60mg/Kg de PZQ fraccionado en dos dosis con intervalos de 6 horas, denominado como dosis fraccionada (García y col, 2006).

(2.-)Los Naranjos: área del Valle de los Naranjos considerada de alta transmisión activa, localizada en el Municipio Valencia, consta de 2104 habitantes aproximadamente (según la Dirección de Saneamiento Ambiental y Contraloría Sanitaria, INSALUD), población cuya prevalencia por Kato-Katz es de 46,1% y 59,8% por PPCO (Sánchez y col, 1997). Se les administró tratamiento a 29 individuos, de los cuales 15 recibieron 40mg/Kg de PZQ seguido 5 días después de OX a dosis de 20mg/Kg y 14 individuos recibieron 40mg/kg de PZQ más placebo, dichos tratamientos se definieron como dosis combinada y dosis única (García y col, 2006).

(3.-)Seitifero: territorio de baja transmisión interrumpida, situado en el Valle de Manuare en el Municipio Carlos Arvelo, constituida de 213 habitantes (según censo realizado por Departamento de Parasitología de la Universidad de Carabobo, 1996) con una prevalencia de 6,8% por la prueba Kato-Katz y 33,1% por PPCO. (García y col, 1997). Se eligieron treinta y tres individuos de los cuales sólo 10 recibieron una dosis de 40mg/Kg de PZQ (PZQ40x1), 10 recibieron 2 dosis de (PZQ40x2) y se les suministró 3 dosis de (PZQ40x3) a los 13 individuos restantes con un intervalo de tres meses, esta terapia se designó como dosis repetida (García y col, 2006).

Cabe destacar que a los pacientes que resultaron positivos por PPCO y Kato-Katz se les tomó muestra sanguínea antes y después de la aplicación de su respectivo tratamiento

a los 3 y 12 meses. Estos sueros fueron facilitados por el Departamento de Parasitología de la Universidad de Carabobo.

Obtención de vermes adultos

Se trabajó con la cepa BH de *S. mansoni* que se encuentra en caracoles de la especie *Biomphalaria glabrata* en el Laboratorio de Investigación en Bilharzia de la Universidad de Carabobo, manteniéndose el ciclo en el Departamento de Parasitología, utilizando el molusco como hospedador intermediario y los hámsteres dorados como hospedadores definitivos.

Una vez pasadas las siete semanas de infección, los hámsteres fueron sacrificados, esto se llevó a cabo inyectándoles intraperitonealmente 1ml de solución salina citratada (SSC) la cual actuó como anticoagulante, transcurridos los 15 minutos, se les inyectó una sobre dosis de pentotal (0.5ml a cada hámster), también intraperitonealmente. Posteriormente se les hizo una incisión en la pared abdominal y tórax con el fin de ubicar la vena porta hepática, luego se cortó y se perfundieron los hámsteres a través del ventrículo izquierdo del corazón con SSC, de este modo se obtuvieron los vermes adultos, con los cuales se obtuvo el antígeno.

Preparación del Antígeno de excreción-secreción de vermes adultos (ESVA)

Inicialmente a partir de 57 hámsteres se obtuvo un total de 4.140 vermes adultos, estos fueron lavados con solución salina isotónica (SSI) para eliminar restos de sangre. Luego se sustituyó la SSI por PBS y se incubaron los vermes a 37°C por 45 minutos, así el preparado obtenido es un material rico en sustancias antigénicas del intestino y tegumento del parásito, se consiguió un volumen de 109.5ml de antígeno de ESVA, suspendidos en PBS. Este producto fue dializado, concentrado hasta 3 mL y centrifugado.

El ESVA obtenido fue procesado en electroforesis según las recomendaciones de Laemmli (1970), con 12% de poliacrilamida para el gel de separación y 4% para el gel de apilamiento, a 200 voltios por 45 minutos. Una vez finalizada la corrida se procedió a

colorear el gel con 0,1% de azul brillante de Coomassie R250 en 40% de metanol y 10% de ácido acético durante una hora en agitación constante y a temperatura ambiente. Luego se procedió a decolorar por varios cambios de solución decolorante (40% metanol y 10% ácido acético) por 3 horas.

El gel fue colocado en la cámara de transferencia por 2 horas a 125mA, en solución tampón de 25mM Tris, 192 mM glicina, pH 8, con metanol al 20% (Towbin y col, 1979). El papel de nitrocelulosa sensibilizado fue bloqueado con tampón 0,01 M fosfato salino con Tween 20 (0.05%) y leche descremada al 5% (PBS-T-LD) por 90 minutos en agitación constante a temperatura ambiente; luego se lavó con PBS-T y se cortó en tiras de 2mm de ancho en sentido longitudinal a la corrida.

Las tiras obtenidas fueron identificadas e incubadas durante 90 minutos en agitación con los sueros en estudio. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos con 0,01 M fosfato salino con Tween 20 (0.05%) (PBS-T) para luego incubar con un segundo anticuerpo (anti IgG humana conjugada a peroxidasa-Pierce), diluido 1: 7000 en PBS-T-LD, por 90 minutos, en agitación constante y a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS-T de 15 minutos, las tiras fueron incubadas con Luminol por un lapso de 5 minutos y fueron expuestas en una película fotográfica por un tiempo de dos segundos.

Análisis de Datos.

Los datos obtenidos del presente estudio expuestos en gráficas de frecuencias y analizados por Chi cuadrado como prueba de independencia (Siegel y col, 1995)

RESULTADOS

El antígeno de ESVA obtenido se le determinó su concentración de proteínas a través de la técnica de Bradford, la cual fue de 0,51mg/ml. Luego se tomaron alícuotas de este antígeno para disociarlo con 2-mercaptoetanol, realizándose alrededor de ocho electroforesis, en las cuales el antígeno mostró un número aproximado de 12 bandas; ocho electrotransferencias y quince Western blot, necesarios para procesar el número de pacientes de cada comunidad en estudio (303 muestras totales).

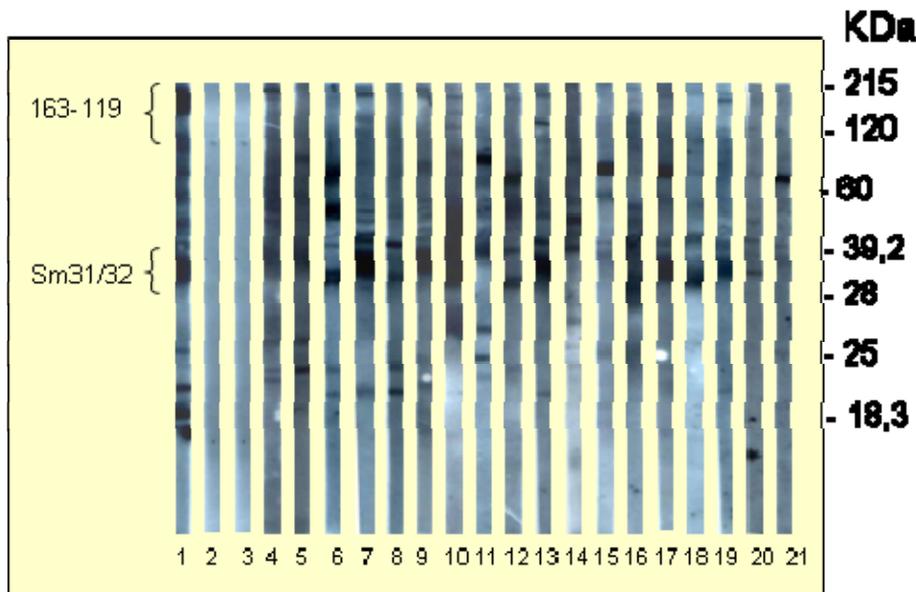
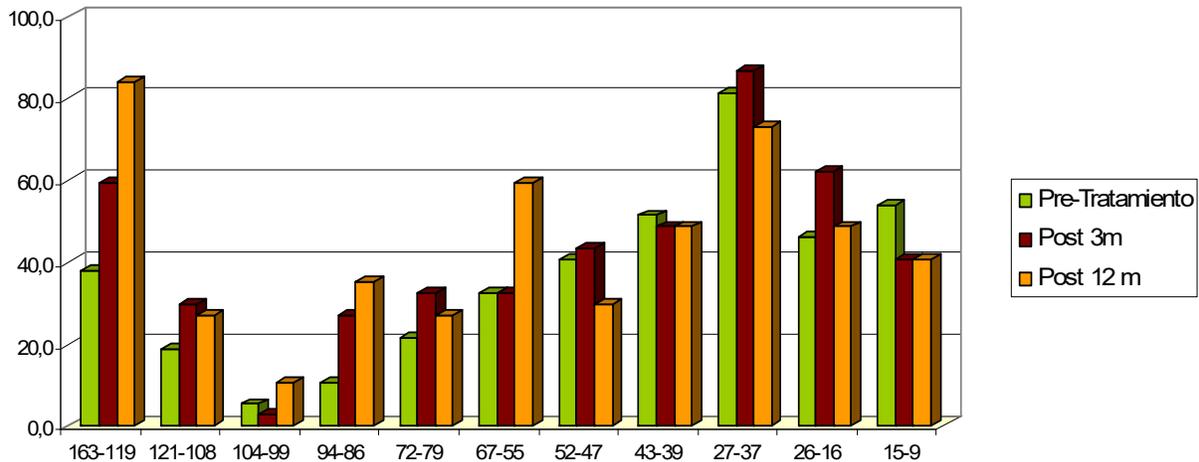


Figura 1: Western blot de sueros de pacientes de la comunidad Caserío El 25 infectados con *S. mansoni*, contra antígenos del regúrgito de vermes adultos, 1: control positivo; 2-3: controles negativos; 4-9 pacientes pre-tratamiento; 10-15: pacientes post-3 meses; 16-21 pacientes post-12 meses.

En la presente foto se observa la elevada respuesta de anticuerpos contra los antígenos de ESVA de *S. mansoni* pre-tratamiento, 3 meses y 12 meses después; destacándose un mayor reconocimiento para aquellos antígenos que se encuentran entre 28-39,2 KDa cuya intensidad se mantiene en la mayoría de los pacientes. Sin embargo existen

otras bandas de menor intensidad que se mantienen al transcurrir el tiempo, como lo son aquellas bandas de 18-25 KDa. La respuesta de anticuerpos contra el resto de los antígenos es variable para cada paciente, debido a que no todos responden de la misma manera, esta disminuye su intensidad al transcurso del tiempo.



Fuente: Datos obtenidos del presente estudio.

Gráfico 1. Distribución de frecuencia del reconocimiento de los antígenos de excreción-secreción de vermes adultos (ESVA) de *S. mansoni* por Western blot de sueros de personas (37 en cada condición) con esquistosomiasis provenientes de la Comunidad Caserío El 25, Estado Carabobo Octubre 2007.

En el gráfico se muestra la respuesta de anticuerpos de los pacientes con esquistosomiasis de la comunidad Caserío El 25, indicando el porcentaje del total de los mismos antes, y después de 3 y 12 meses de tratamiento que reconocieron antígenos de ESVA (Figura 1). En esta comunidad se destaca una mayor tasa de reconocimiento en las bandas de 163-119 KDa de PM, en las cuales se observa un incremento significativo de su respuesta al transcurrir el tiempo ($p = 0,05$), con una prevalencia de un 38%, 60% y 87% respectivamente. Existen rangos de 121-108 KDa, 104-99 KDa, 94-86 KDa y 79-72 KDa, las cuales se presentan con una baja prevalencia pero se mantienen después del año de tratamiento; este caso se repite en las bandas de 52-47 KDa, 45-39 KDa, 26-16 KDa y 15-9

KDa. Las bandas que van de 67-55 KDa no se presentan en todos los pacientes, sin embargo, aumenta su reconocimiento en otras personas a los 12 meses después del tratamiento ($p = 0,02$). También se observa un duplete de 37-27 KDa de peso molecular con una prevalencia de 81% antes del tratamiento, 87% 3 meses después del tratamiento y 70% al año; en este rango se encuentra los antígenos Sm31/32 de gran importancia en el presente estudio, las cuales no presentaron variación significativa ($p = 0,82$).

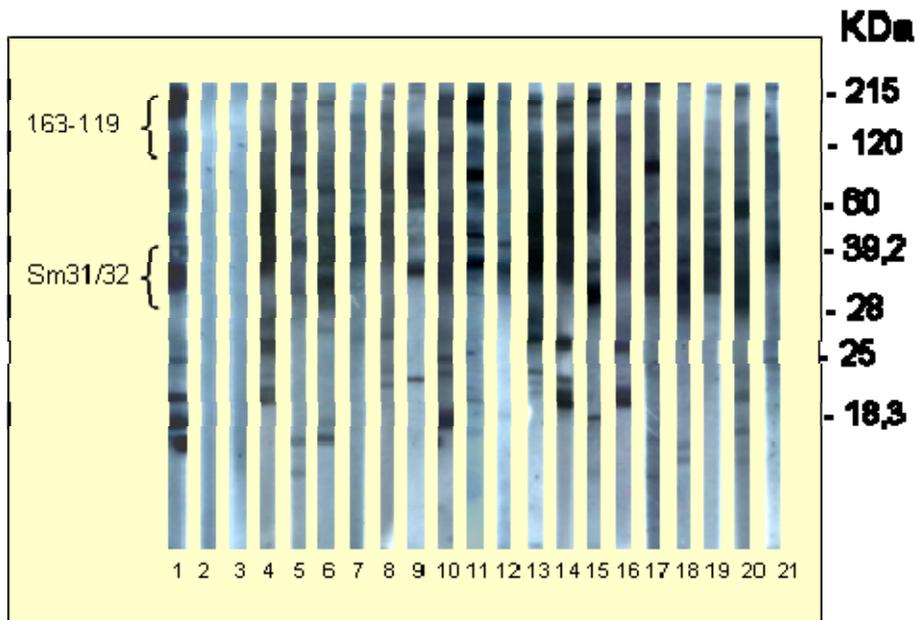
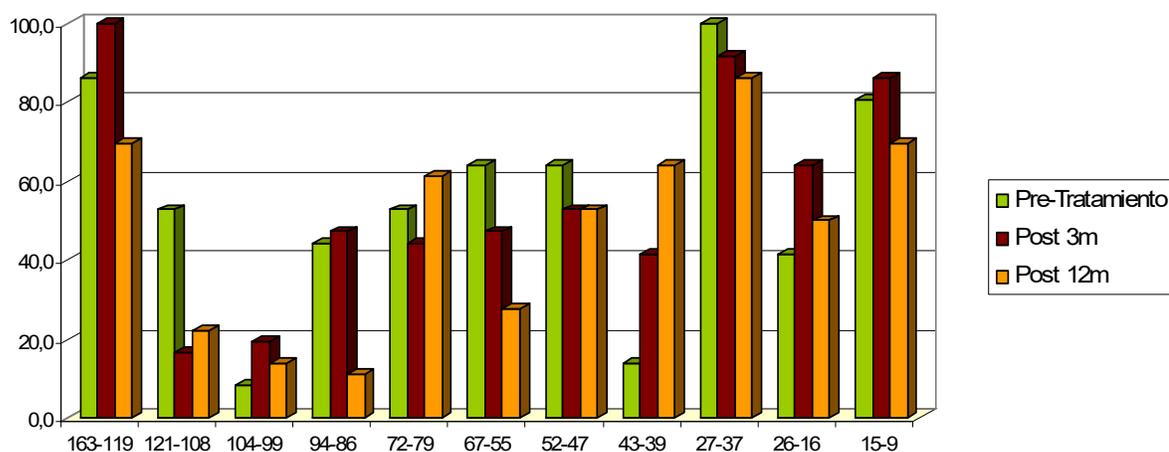


Figura 2: Western blot de sueros de pacientes de la comunidad de Los Naranjos infectados con *S. mansoni*, contra antígenos del regúrgito de vermes adultos, 1: control positivo; 2-3: controles negativos; 4-9 pacientes pre-tratamiento; 10-15: pacientes post-3 meses; 16-21 pacientes post-12 meses.

En esta comunidad se observa una elevada intensidad de reconocimiento de los diferentes antígenos de ESVA, con aparición de nuevas bandas en algunos pacientes después del tratamiento; cabe destacar que existe una mayor intensidad de respuesta para los antígenos de 28 a 39 KDa que se mantiene una vez aplicada la quimioterapia ($p = 0,82$)



Fuente: Datos obtenidos del presente estudio

Gráfico 2. Distribución de frecuencia del reconocimiento de los antígenos de excreción-secreción de vermes adultos (ESVA) de *S. mansoni* por Western blot de sueros de personas (36 en cada condición) con esquistosomiasis provenientes de la Comunidad Los Naranjos, Estado Carabobo Octubre 2007.

En este gráfico se ilustran las barras correspondientes al porcentaje del total de pacientes antes del tratamiento, 3 meses después y posterior a un año, que responden a los diferentes antígenos del ESVA del parásito, evidenciado por Western blot en la comunidad de Los Naranjos (Figura 2). Se observan diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,01$) en las tres condiciones de estudio. Se consideran de mayor importancia las bandas que abarcan un PM de 163-119 KDa (A), el duplete de 37-27 KDa (B) y las bandas ubicadas en el rango de 15-10 KDa (C) debido a su elevada respuesta, con una prevalencia antes del tratamiento de 86%, 100% y 81% respectivamente; a los 3 meses se observa un 100% de prevalencia para A, 92% para B y un 86% para C; por último, al cabo de un año A posee un 69%, B un 86% y C un 69% de prevalencia.

Las barras que esquematizan las bandas que van de 121-108 KDa, 104-99 KDa, 79-72 KDa, 52-47 KDa y 26-16 KDa de PM, no reflejan una diferencia relevante pero se mantiene el reconocimiento de las mismas antes y después del año de tratamiento.

Existe un rango que va desde 94-86 KDa y 67-55 KDa, en las cuales su reconocimiento disminuye a los 12 meses post-tratamiento, caso contrario se observa en las bandas de 43-39 en donde aumenta su prevalencia a 86 % a los 12 meses.

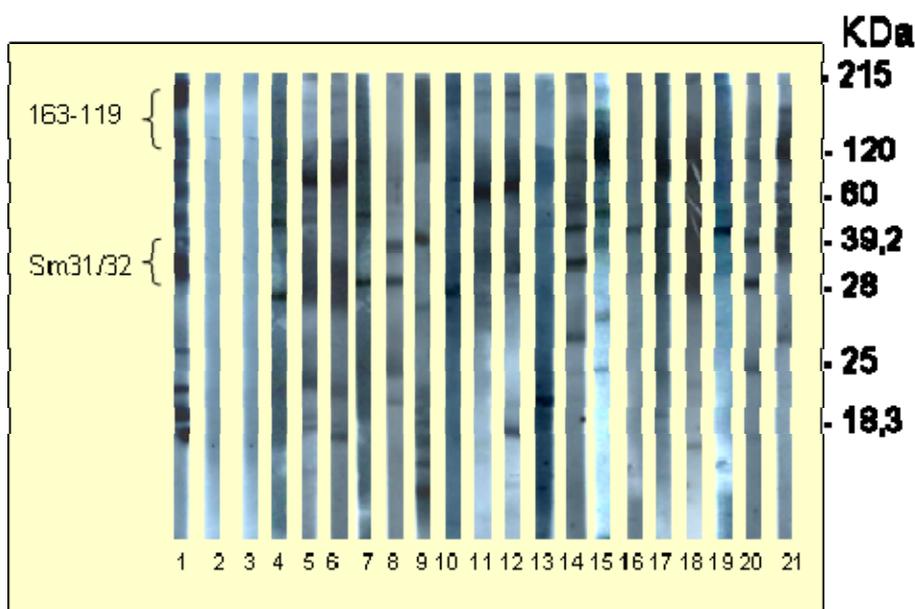
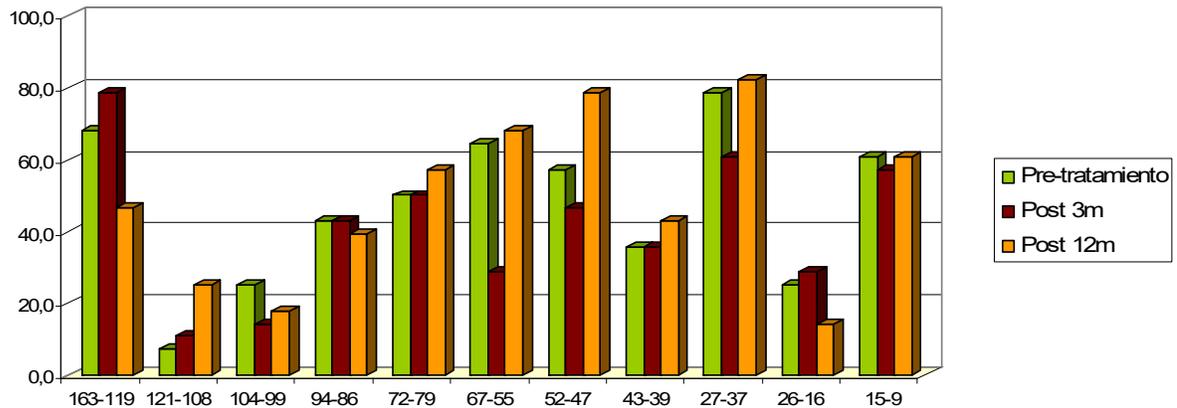


Figura 3: Western blot de sueros de pacientes de la comunidad Seitifero infectados con *S. mansoni*, contra antígenos del regurgito de vermes adultos, 1: control positivo; 2-3: controles negativos; 4-9 pacientes pre-tratamiento; 10-15: pacientes post-3 meses; 16-21 pacientes post-12 meses.

En esta comunidad la respuesta a los antígenos de ESVA no tuvo mucha variación antes y después de la terapia esquistosomicida ya que la mayoría de las bandas se mantuvieron pero con diferente intensidad. Sin embargo, en comparación con las demás comunidades esta respuesta fue menos acentuada.



Fuente: Datos obtenidos del presente estudio

Gráfico 3. Distribución de frecuencia del reconocimiento de los antígenos de excreción-secreción de vermes adultos (ESVA) de *S. mansoni* por Western blot de sueros de personas (28 en cada condición) con esquistosomiasis provenientes de la Comunidad Seitifero, Estado Carabobo Octubre 2007.

En este gráfico se observa la respuesta en porcentaje del total de los pacientes ante los diferentes antígenos de ESVA (antes del tratamiento, 3 y 12 meses post-tratamiento) de la Comunidad de Seitifero (Figura 3). Los PM de 163-119 KDa de PM representan el 68% de prevalencia antes del tratamiento, 79% a los 3 meses y 46% al año. Se observa que anticuerpos contra antígenos de 52-47 KDa de PM acentuaron su respuesta a los 12 meses post-tratamiento (en un 32% por encima de los 3 meses), mientras que la respuesta dirigida contra los antígenos de 67-55 KDa que inicialmente presentaban una prevalencia de 64%, disminuyeron de manera significativa a los 3 meses a un 29%, para luego aumentar a un 68% en un año.

Similar a las comunidades anteriores, se sigue manteniendo la respuesta ante el duplete que abarca 37-27 KDa de PM con una prevalencia de 79% antes del tratamiento,

61% a los 3 meses y un 82% al cabo de 12 meses post-tratamiento. No hay un cambio relevante en el reconocimiento de los antígenos de 121-128 KDa, 104-99 KDa, 94-86 KDa, 79-72 KDa, 45-39 KDa y 26-16 KDa, ya que se mantienen con la misma prevalencia antes y después del tratamiento.

DISCUSIÓN

En el país actualmente la esquistosomiasis tiene bajos niveles de infección y por tanto de morbilidad, como consecuencia se subestima el verdadero número de personas infectadas con esta parasitosis. Como se ha mencionado anteriormente las pruebas coprológicas no son lo suficientemente sensibles para decir que una masa de personas se ha curado completamente después de administrarles el tratamiento específico; por ello se hace necesario realizar pruebas mas sensibles, como son las serológicas, entre ellas PPCO, RIAF, IEFA, ELISA y Western blot.

Un estudio en el año 2006 realizado por García y col, basado en la detección de anticuerpos fluorescentes contra antígenos del tegumento del parásito, aplicado en las comunidades Caserío El 25, zona de baja transmisión, con una prevalencia coprológica de 24.9% (Lara et al, 1987), Los Naranjos, zona de alta transmisión con prevalencia serológica por PPCO de 59.8% (Rodríguez et al, 1998) y Seitifero zona de transmisión interrumpida, 33.1% de prevalencia por PPCO (Incani et al, 1998); mostró que aun después de la aplicación de los diferentes esquemas de tratamiento, existen tasas de negativización variables de acuerdo a la carga parasitaria en las pruebas RIAF y PPCO. Sin embargo, en el presente estudio se demuestra que en aquellos pacientes negativos para RIAF se sigue observando una respuesta contra antígenos de ESVA, confirmando con esto que la técnica del Western blot es mucho mas sensible que la RIAF, porque al presentar esta respuesta indica que todavía existen vermes que están expulsando antígenos de excreción-secreción al medio circundante.

En los gráficos 1, 2 y 3 el comportamiento de los pacientes fue similar en las tres comunidades, manteniéndose la respuesta ante muchos antígenos de ESVA, esta respuesta fue mas significativa para las bandas de 163-119 KDa de PM con un 70.3% de prevalencia.

Otras de las bandas de mayor representación, debido a que se mantuvo su respuesta antes y después del tratamiento, son las que abarcan 37-27 KDa de PM con una prevalencia de 82.6%, en este rango se encuentran incluidos los antígenos Sm31/32 de importancia en

este estudio, que son altamente inmunogénicas y específicas de *S mansoni* demostrado por investigaciones anteriores (Noya y col, 2003; Valli y col, 1999).

A su vez persisten un gran número de bandas que van de 104-99 KDa ($p = 0,36$), 79-72 KDa ($p = 0,85$), 26-16 KDa ($p = 0,88$) y 15-9 KDa ($p = 0,90$) de PM; las cuales tienen diferentes respuestas, es decir, la prevalencia de ellas aumenta o disminuye entre una y otra comunidad, sin mostrar algún cambio estadísticamente significativo; sin embargo, dicha respuesta contra esos antígenos se sigue manteniendo antes y después del tratamiento.

Existe una respuesta contra los antígenos de 121-108 KDa ($p = 0,02$) de PM, la cual no se presenta en todos los pacientes pero la misma se mantiene al cabo de un año. Cabe destacar que estos antígenos no se consideran de gran relevancia debido a que suelen ser componentes somáticos de los vermes los cuales pueden tener reactividad cruzada con otras parasitosis, por lo tanto, poseen poca especificidad por su elevado PM y también por su baja tasa de respuesta.

Al realizar una comparación entre las comunidades en estudio, se observa que existen diferencias en cuanto al reconocimiento de los antígenos de ESVA debido a que presentan diversas cargas parasitarias y los esquemas de tratamiento fueron distintos para ellas.

Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas entre las comunidades en relación a las bandas de 37-27 KDa ($p = 0,82$) ya que la misma se mantiene en la mayoría de los pacientes antes y después de haber aplicado el tratamiento. Cabe destacar que en este rango se encuentran las bandas Sm31/32, enzimas que participan de la digestión de la hemoglobina y que salen al medio circundante en los productos del regurgito “como excreción” ya que el verme al tener un tubo digestivo cerrado se ve obligado a regurgitar cada 4h y de esta forma expulsa a la circulación estas enzimas manteniéndose entonces el nivel de anticuerpos lo que hace pensar que aun se encuentran vermes vivos, independientemente del tratamiento empleado.

Al comparar las bandas que fueron reconocidas por los pacientes en las diferentes comunidades se evidencia una diferencia estadísticamente significativa en las bandas que van de 163-119 KDa ($p = 0,05$), 121-108 KDa ($p = 0,02$), 94-86 KDa ($p = 0,01$), 67-55 KDa ($p = 0,02$), 52-47 KDa ($p = 0,02$) y 39-43 KDa ($p = 0,02$) esto puede deberse a que una vez aplicado el tratamiento surgen dos posibles hipótesis, una en la cual el medicamento aplicado indujo la muerte del parásito y por ello no hay antígenos en circulación que estimulen una respuesta inmunológica razón por la cual el nivel de anticuerpos circulantes disminuiría o desaparecería; y otra en la que aumentan estos antígenos debido a que el medicamento solo lesionó al parásito provocando una mayor exposición de los antígenos manteniéndose en este caso la estimulación de la producción de anticuerpos contra ellos.

CONCLUSIONES

- El procedimiento de Western blot se presenta con mayor sensibilidad que la RIAF y la PPCO para el diagnóstico de la Esquistosomiasis.
- Existen bandas que son reconocidas con mayor prevalencia e intensidad en la mayoría de los pacientes, entre ellas están las que abarcan un peso molecular de 163-119 KDa y 39-28 KDa, es aquí donde se encuentran las Sm31/32. Por el contrario, se pueden observar otras de menor prevalencia en las tres comunidades, como son las de 104-99 KDa y 121-108 KDa.
- La banda Sm31/32 fue reconocida por la mayoría de los pacientes antes y después del tratamiento, indicando con esto que al menos un año no es suficiente para decir que se obtuvo la cura serológica, ya que se ha demostrado que estas bandas son específicas para esta parasitosis.
- A pesar de que a las comunidades en estudio tienen diferentes niveles de infección y esquemas terapéuticos adecuados al mismo, no se observaron diferencias en el reconocimiento del número de bandas, es decir, se mantuvo la respuesta hacia las mismas bandas pero con diferentes índices de prevalencia.
- De las comunidades en estudio, Los Naranjos fue la que tuvo una mayor tasa de respuesta, es decir, fue aquí donde se observó con mayor intensidad el reconocimiento de bandas, esto puede deberse a que la misma es considerada una zona de alta transmisión activa.

Bibliografía

- Abath, F., Morais, C., Montenegro, C.E., Wynn, T., Montenegro, S. (2006). Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends in Parasitology*. 22:85-91.
- Alarcón de Noya, B. y Pujol, H. (1990). Diagnóstico inmunológico de la esquistosomiasis mansoni. *Interciencia*. 15: 95-101
- Alarcón de Noya, B. Noya, O., Balzán, C., Cesari, I.M. (1992) New approaches for the control and eradication of schistosomiasis in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 87 (Suppl.4): 227-231.
- Alarcón de Noya, B. Balzan, C., Arteaga, C., Cesari, I.M., Noya, O. (1999). The last fifteen years of schistosomiasis control in Venezuela: features and evolution. *Men. Inst. Oswaldo Cruz*. 94:139-146.
- Barrios, E., Delgado, V., Araque, W., Márquez, M. (2001). *Schistosoma mansoni*: Transformación de miracidio en su huésped natural y en cultivo. *Salus* 5: 10-17.
- Carlier, Y., Bout, D., Bina, J.C., Camus, D., Figueiredo JFM, Capron, A. (1975). Immunological studies in human schistosomiasis 1. Parasitic antigen in urine. *Am J Trop Med Hyg*. 24: 949-954.
- Cesari, I.M. (1985). El tegumento de *Schistosoma mansoni* y su importancia en la relación hospedador-parasito. *Bol. Dir. Mal. San. Amb*. 25:27-41.
- Cesari, I.M. (1990). Componentes parasitarios de interés para el diagnóstico inmunológico de la esquistosomiasis mansoni. *Interciencia*. 15:373-382.
- Cesari, I.M., Mendoza, L. Ballen, D., Alarcón de Noya, B. (2002). Evaluación del IEFA como técnica de inmunodiagnóstico en el programa de lucha contra la bilharziosis. *Bol. Mal. San. Amb*. 42:29-32.
- Cesari, I., Ballen, D., Mendoza, L., Matos, C. (2005). Detection of *Shistosoma mansoni* membrana antigens by immunoblot analysis of sera of patients from low- transmission areas. *Clin. Diag. Lab. Imm*. 12: 280-286.
- Chappell, C.L. & Dresden, M.H. (1988). Antibody response to a purified parasite proteinase to the (Smw32) in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 39:66-73.
- Dalton, J.P., Holla-Jamriska, L. (1995). Asparaginil endopeptidase activity in adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 111: 575-580.

- Doenhoff, M., Chiodini, P., Hamilton, J. (2004). Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends in Parasitology*. 20: 35-38.
- El-Sayed, L., Ghoneim, H., Demian, S.R., El-Sayed, M.H., Tawfick, N.M., Sakr, I. (1998). Diagnostic significance of *Schistosoma mansoni* proteins Sm31/32 in human schistosomiasis in an endemic area in Egypt. *Trop. Med. Int. Health*. 3:721-727.
- Fenwick, A., Savioli, L., Engels, D., Bergquist, R., Tood, M. (2003). Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. 19:509-514.
- García, F.A., Aular, S.M., Loaiza, L.C., Balzán, C., Incani, R.N. (1997). Frequency and morbidity of schistosomiasis mansoni in a community traditionally endemic, Seitifero-Manaure valley, south Carabobo state. *Acta Cient. Venez.* 48(Spl.1): 172.
- García, N., Isturiz, G., Aular, S & Incani, R.N. (2006). The efficacy of human schistosomicide treatment may depend on the rate of transmission. *Parasitol. Res.* 98: 545-549.
- Hernández, R., Fernández, C y Baptista P. (2003) *Metodología de la Investigación*. México: Mc Graw Hill.
- Incani, R.N. (1987). The Venezuelan experience in control of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.82 (Sppl.4):89-93.
- Incani, R. (1996). *Parasitología*. Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.
- Incani, R.N., Aular, S., Eblen, M., Mendoza, L., Ballen, D., Cesari, I. (1999). Quimioterapia en masa con praziquantel como herramienta de control en la esquistosomiasis mansoni en una comunidad de baja transmisión. *Acta Cient. Venez.* 50(Sup.2).
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1972; 14:397-400)
- Klinkert, M.Q., Fellesein, R., Link, G., Ruppel, A., Beck, E. (1989). Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33:113-122.
- Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*.227:680-685.
- McLaren, D., Hockley, D. (1976). *Schistosoma mansoni*: The occurrence of microvilli on the surface of the tegument during transformation from cercaria to schistosomulum. *Parasitology*. 73: 169-187.

- Noya, O., Alarcón de Noya, B., Losada, S., Colmenares, C., Guzmán, , Lorenzo, MA., Bermúdez. (2002). Laboratory diagnosis of schistosomiasis in areas of low transmission. A review of a line of research. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97 (sup.1): 167-169.
- Noya, O., Guzmán, C., Ballén, D., Bermúdez, H., Zerpa N., Noda, A., Colmenares, C., Losada, S., Alarcón de Noya, B. (2003). Péptidos sintéticos para el diagnóstico y vigilancia epidemiológica en esquistosomosis mansoni. Bol. Mal. San. Amb. 43:39-43.
- Planchart, S. (2005). Esquistosomiasis mansoni experimental y humana. Determinación de antígenos circulantes mediante anticuerpos monoclonales. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.
- Pujol, F., Alarcón de Noya, B., Cesari, I. (1989). Immunodiagnosis of schistosomiasis mansoni with APIA (Alkaline Phosphatase Immunoassay). Immunol Invest. 18: 1071-1080.
- Rey, L. (2001). Parasitología. Editorial Guanabara Koogan. Río de Janeiro.
- Ruppel, A., Xing, Y., Dell, R., Numrich, P. & Shi, Y.E. (1991). *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*: decline of antibodies against diagnostic adult worm antigens (Sm31/32) following praziquantel treatment of mice. Trop. Med. Parasitol. 42: 325-331.
- Sánchez, I.B., Salas, R.M., Rodríguez, R., Aular, S.M., Loaiza, L.C., Balzán, C. & Incani, R.N. (1997). Esquistosomiasis mansoni en el Valle de los Naranjos Estado Carabobo, un foco de alta transmisión. II. Morbilidad. Acta Científica Venezolana. 48 (Sup.1): 171.
- Siegel, S., Castellan, N. (1995). Estadística no paramétrica. Editorial Trillas. Mexico D.F.
- Towbin, H., Staehelin, T., Bordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76:4350-4354.
- Valli, L.C., Kanamura, H.Y., Da Silva, R.M., Ribeiro-Rodrigues, R., Dítese, R. (1999). Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. Am J. Trop. Med. Hyg. 61:302-307.