

Diversidad enzimática de la fracción soluble de un aislado venezolano de adultos *Paragonimus* sp.

Erika Gómez Martínez^{1*}, Diana Ballén², Marcos Tulio Díaz¹, Zoraida Díaz Bello³, Reinaldo Zavala-Jaspe³, Belkisyolé Alarcón de Noya³, Oscar Noya³ & Italo M. Cesari²

Paragonimus sp. es un trematodo que causa inflamación crónica del pulmón en mamíferos carnívoros y en el hombre, constituyendo un problema de salud pública en países asiáticos y latinoamericanos. Los trematodos poseen enzimas que facilitan la penetración y migración en diferentes hospederos a fin de garantizar su ciclo evolutivo. Con el objetivo de evaluar la diversidad enzimática de la fracción soluble (FSPA, 100.000 g) de un aislado venezolano de adultos de *Paragonimus* sp. se realizaron determinaciones enzimáticas a diferentes pH, usando curvas de calibración (A 405 nm vs. nmol) para interpolar la absorbancia de grupos *p*-nitrofenol o *p*-nitroanilina liberados por la hidrólisis de sustratos sintéticos; se utilizaron también sustratos 2-naftilamídicos y 2-naftólicos para determinar esterases, peptidasas, fosfomonoesterasas y glicosidasas. Se demostró que fosfohidrolasas, glicosidasas y peptidasas están presentes en la FSPA, destacándose la β -NAG (0,55 μ mol/h/mg, pH 5,5) y la cistein proteasa (0,4 μ mol/h/mg, pH 5,5) como las actividades más elevadas, señalando la importancia funcional de la actividad glicosídica y peptídica en este parásito, las cuales están probablemente relacionadas con su hábitat y su necesidad de degradación de secreciones pulmonares. Estos resultados representan los primeros estudios enzimáticos registrados en vermes adultos de un aislado venezolano de *Paragonimus* sp. obtenidos del reservorio *Didelphis marsupialis*.

Palabras clave: *Paragonimus* sp., enzimas, trematodos, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La paragonimiasis es un problema de salud pública en países asiáticos y en algunos países de Latinoamérica (Yokogawa, 1965; Alarcón de Noya *et al.*, 1985). Los parásitos migran a través de varios tejidos hospederos hasta alcanzar los pulmones, por lo que igual que la mayoría de los trematodos, *Paragonimus* debe poseer una serie de enzimas necesarias para la invasión, migración y nutrición que lo ayudan a adaptarse y sobrevivir en los diferentes

hábitat hospederos, para cumplir su ciclo y garantizar su persistencia en el tiempo.

Recientes evidencias bioquímicas y proteómicas demuestran que los vermes adultos de *Paragonimus westermani* excretan/secretan proteasas que juegan un papel importante en la nutrición (hemoglobinasas), en la patogénesis de la paragonimiasis y en inmunomodulación de la respuesta del hospedero (Choi *et al.*, 2006; Song & Kim, 1994; Lee *et al.*, 2006); en particular, se describen varias cisteín-proteasas en adultos y distintos estadios de *P. westermani* capaces de hidrolizar sustratos sintéticos tales como CBZ-Phe-Arg-AFC(carboxybenzyl-phenylalanyl-arginyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) a sus respectivos óptimos de pH (Song & Kim, 1994; Na *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). Muchas enzimas de trematodos son antigénicas y han resultado de gran valor diagnóstico (Ikeda *et al.*, 1996. Alarcón de Noya *et al.*, 1997; Cesari *et al.*, 1992; Pujol *et al.*, 1989).

¹ Laboratorio de Parasitología. Departamento de Biomedicina. Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA), Universidad de Oriente, Venezuela.

² Unidad de Trematodiasis. Centro de Microbiología y Biología Celular. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela.

³ Laboratorio de Inmunología. Instituto de Medicina Tropical (IMT) Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

*Autor de correspondencia: eri1578@hotmail.com

Las cisteín proteasas de *P. westermanni* son antígenos inmunodominantes (Lee *et al.*, 2006).

Con el objetivo de evaluar la diversidad enzimática de la fracción soluble (FSPA) de un aislado venezolano de adultos de *Paragonimus sp.* se realizaron determinaciones según Dresden & Asch (1972) y Cesari *et al.* (1998, 2000) a diferentes pH, usando curvas de calibración (A 405 nm vs. nmol) para interpolar la absorbancia de los grupos *p*-nitrofenol o *p*-nitroanilina liberados por la hidrólisis de sustratos sintéticos (Cesari, 1974; Cesari *et al.*, 1998; Dresden & Asch, 1972); también se utilizaron sustratos 2-naftilamídicos y 2-naftólicos para determinar esterasas, peptidasas, fosfomonoesterasas y glicosidasas (API ZYM II, API ZYM 2520, BioMerieux, Marcy L'Etoile, Francia) (Cesari *et al.*, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la fracción soluble (FSPA, 100.000 g) del aislado de vermes adultos de Paragonimus sp.

Los vermes adultos de *Paragonimus sp.* obtenidos de *Didelphis marsupialis* fueron resuspendidos en 50 mM de Tris pH 7,2, a razón de 8 parásitos por cada 3 mL de solución. La preparación fue homogenizada en Potter-Evejhelm a 4°C y ultracentrifugada a 100.000 g por 2 horas a 4°C (ultracentrífuga Beckman modelo L8-M). El sobrenadante (fracción soluble, FSPA) fue dializado contra 50 mM de Tris pH 7,2 durante toda la noche a 4°C (Cesari, 1974; Cesari *et al.*, 1998). Posteriormente, se le realizó la determinación de proteínas por el método de Bradford (1976).

Diversidad enzimática de la fracción soluble (FSPA, 100.000 g)

Para obtener el perfil enzimático de la FSPA de *Paragonimus sp.* se siguió la metodología desarrollada por Dresden & Asch (1972) y Cesari *et al.* (2000). Se realizaron determinaciones enzimáticas a pH ácido y alcalino mediante microensayos en placas MAXISORP (NUNC) fondo plano y un lector de placas SpectraMAX 250 (Molecular Devices). Las actividades enzimáticas detectadas correspondieron a: las fosfomonoesterasas Fosfatasa Ácida (FAc, pH = 5,0) y Fosfatasa Alcalina (FAL, pH = 9,6) utilizando como sustrato *p*-nitrofenil fosfato; las aminopeptidasas Leucín Aminopeptidasa (LAP, pH = 8,0) y L- α -Alanin

Aminopeptidasa (α -AAP, pH = 8,0) utilizando como sustrato L- α -Alanina *p*-nitroanilida; las glicosidasas N-Acetil- β -D-Glucosaminidasa (β -NAG, pH = 5,5) utilizando como sustrato *p*-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, α -manosidasa (α -MAN, pH = 5,5) utilizando como sustrato *p*-nitrofenil- α -D-manósido y N-Acetil- α -D Glucosaminidasa (α -NAG, pH = 5,5) utilizando como sustrato *p*-nitrofenil- α -D-glucósido; y Cisteín-Proteasa (CP, pH = 5,5) utilizando el sustrato sintético CBZ.Phe-Arg-*p*-nitroanilida en presencia de L-cisteína. Los ensayos se leyeron a 405 nm. Se usaron curvas de calibración para interpolar los valores de absorción de la muestra (A vs. nmol) y calcular las distintas actividades. Se utilizó 1 N NaOH para detener la mayoría de las reacciones realizadas a pH ácido con excepción del ensayo de cisteín-proteasa donde se utilizó ácido acético al 20%. Por el contrario, para todas las reacciones realizadas a pH alcalino se utilizó ácido acético al 20%, con excepción del ensayo de Fosfatasa Alcalina donde la reacción se terminó añadiendo 1 N NaOH. La actividad enzimática fue expresada en términos de μ moles o nmoles de sustrato hidrolizado por 1 hora, definiéndose a la actividad específica como la actividad referida a la concentración de proteínas en la muestra (μ mol/h/mg) (Cesari *et al.*, 1983; 1992; 2000).

Galería enzimática API ZYM

Se utilizó una serie de sustratos sintéticos adsorbidos sobre un soporte sólido en el fondo de pocillos dispuestos sobre tiras de plástico (series API ZYM II y API ZYM 2520, BioMerieux, Marcy L'Étoile, France). La serie API ZYM 2520 contenía un conjunto de sustratos 2-naftólicos (2N) y 2-naftilamídicos (2-NA) para la determinación de esterasas (2N-butilato, 2N-fosfato, 2N-caprilato, 2N-miristato), peptidasas (L-Leucil-2NA, L-Valil-2NA, L-Cistil-2NA, N-Benzoil-DL-Arginine-2NA, N-Glutaryl-Fenilalanina-2NA), fosfohidrolasas (2N-fosfato, Naftol-AS-BI-fosfato), glicosidasas (6-Br-2N- α -D-galactopiranosido, 2N- β -D-galactopiranosido, Naftol-AS-BI- β -D-glucurónido, 2N- α -D-glucopiranosido, 6-Br-2N- β -D-glucopiranosido, 1N-acetil- α -D-glucosaminida, 6-Br-2N- α -D-manopiranosido, 2N- α -L-fucopiranosido). La serie API ZYM II contiene un conjunto de sustratos específicos para la determinación de peptidasas (α -L-Glu-2NA, N-Benzil-L-Leu-2NA, S-Benzil-L-Cys-2NA, D-L-Met-2NA, Gly-Gly-HBr-2NA, Gly-L-Phe-2NA, Gly-L-Pro-2NA, L-Leu-Gly-2NA y L-Ser-L-Tyr-2NA). En cada pocillo se colocó

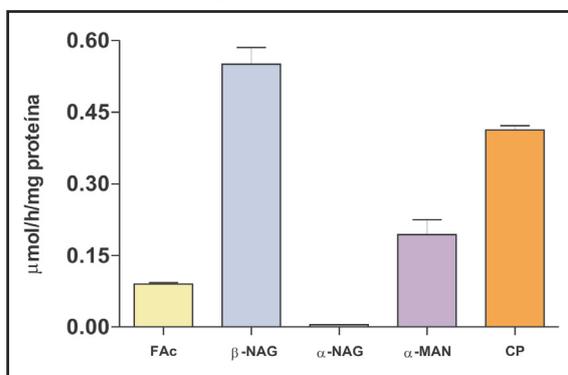
65 μ l de FSPA y las tiras de sustrato se incubaron por 2 horas a 37°C en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se añadieron 35 μ l de reactivo A (2,5 g de Trizma-Base; HCl 37%; 1 g de SDS y 10 ml de agua destilada) y 35 μ l de reactivo B (35 mg de Fast-Blue; 10 ml de 2-metoxietanol). Después de 10 minutos, el sobrenadante de cada pocillo fue transferido a un pocillo correspondiente en una placa de ELISA y se leyó a diferentes longitudes de ondas entre 450 nm y 620 nm según el producto cromogénico liberado (naftilamina o naftol) acomplejados con Fast Blue. Se estableció como unidad de actividad enzimática la cantidad de enzima que produjo, por la hidrólisis del sustrato, una absorción de 0,1 unidades de densidad óptica (DO) a la longitud de onda (nm) utilizada en una hora (U), definiéndose a la actividad específica como la actividad referida a la concentración de proteínas en la muestra (Cesari *et al.*, 2000).

RESULTADOS

Diversidad enzimática de la fracción soluble (FSPA, 100.000 g) de un aislado venezolano de adultos de Paragonimus sp.

Entre las actividades enzimáticas que se detectaron a pH ácido (5,5), la N-acetil- β -D-glucosaminidasa (β -NAG) presentó la actividad específica más alta (0,55 μ mol/h/mg), observándose

Fig. 1. Actividades enzimáticas de la FSPA 100.000 g detectadas a pH ácido (pH 5,5) sobre sustratos sintéticos. FAc: Fosfatasa Ácida; β -NAG: N-Acetil- β -D-Glucosaminidasa; α -NAG: N-Acetil- α -D-Glucosaminidasa; α -MAN: α -manosidasa; CP: Cisteín-Proteasa. Se realizaron dos experimentos independientes por cada actividad enzimática; en la figura se muestra los resultados de un experimento realizado por triplicado y reportado como media \pm DE ($n = 3$).



para la Cisteín-Proteasa (CP) y la α -manosidasa (α -MAN) actividades específicas de 0,41 y 0,19 μ mol/h/mg respectivamente, seguida por la fosfatasa ácida (FAc) (0,09 μ mol/h/mg) (Fig. 1). La N-acetil- α -D-glucosaminidasa (α -NAG) a pH 5,5 fue insignificante.

A pH alcalino, se midió la actividad Elastasa (pH 10) la cual presentó valores muy bajos (0,0012 μ mol/h/mg) y la actividad α -Alanin Aminopeptidasa (α -AAP, pH 8,0; 0,03 μ mol/h/mg). Se midieron también las actividades Leucín Aminopeptidasa (LAP, pH 8,0) y Fosfatasa Alcalina (FAL, pH 9,6), las cuales mostraron valores de 0,015 y 0,014 μ mol/h/mg, respectivamente (Fig. 2). Las actividades alcalinas fueron menos activas que las ácidas (Fig. 1, 2).

Sustratos API ZYM II

La incubación de la FSPA con los derivados 2-naftilamídicos (2NA) de varios amino ácidos y dipéptidos de la serie API ZYM II permitió la detección de hidrólisis sobre L-seril-tirosina (735 U/mg) y glicil-prolina (1305 U/mg). Los otros sustratos no fueron hidrolizados significativamente (Fig. 3).

Sustratos API ZYM 2520

La utilización de esta serie permitió corroborar algunos de los resultados obtenidos en los ensayos

Fig. 2. Actividades enzimáticas en la FS 100.000 g detectadas a pH alcalino. FAL: Fosfatasa Alcalina; α -L-AAP: α -Alanina Aminopeptidasa; LAP: Leucín Aminopeptidasa; Elastasa. Se realizaron dos experimentos independientes por cada actividad enzimática; en la figura se muestra los resultados de un experimento realizado por triplicado y reportado como media \pm DE ($n = 3$).

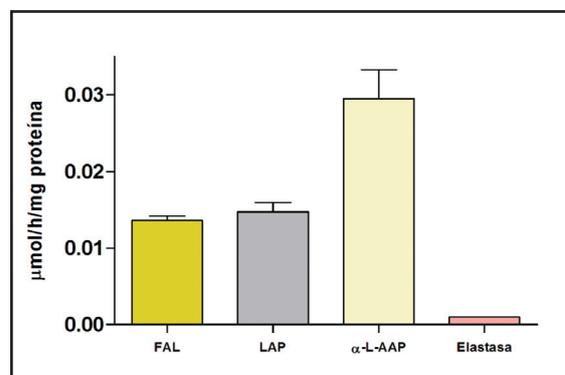
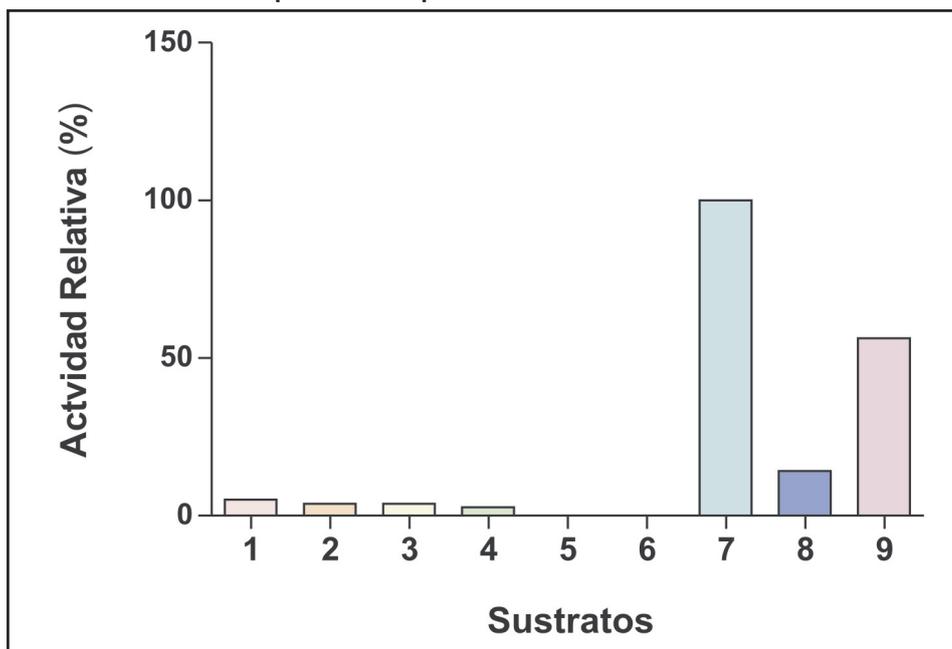


Fig. 3. Actividad enzimática de la FSPA 100.000 g sobre sustratos 2-Naftilamídicos (2-NA) EN API ZYM II. (1) γ -L-Glutaminil-2-NA (piroglutamasa); (2) N-Benzoil-L-Leucil-2-NA (quimiotripsina); (3) S-Benzil-L-Cistil-2-NA (Cistil Endopeptidasa); (4) D-L-Metionil-2-NA (Metionil Aminopeptidasa; (5) Glicil-Glicil-2-NA (glicil-glicina dipeptidasa); (6) Glicil-L-Fenilalanil-2-NA (Glicil-Fenilalanina dipeptidasa); (7) Glicil-L-Prolil-2-NA (Glicil Prolina dipeptidasa); (8) L-Leucil-Glicil-2-NA (Leucil Glicina dipetidasa); (9) L-Seril-L-Tirosil-2-NA (Seril Tirosina dipeptidase). Se realizaron dos experimentos independientes por cada serie de sustratos enzimáticos, una serie de sustratos fue incubada sin fracción enzimática como control; en la figura se muestra los resultados de un experimento representativo.



realizados con los sustratos sintéticos *p*-nitrofenilados o *p*-nitroanilidas (Fig. 1, 2, 4). Las actividades hidrolíticas más elevadas a pH ácido fueron: N-Acetil- β -D-Glucosaminidasa (1625 U/mg), Fosfatasa Ácida (980 U/mg) y Naftol-AS-BI-Fosfohidrolasa (885 U/mg); luego, la Leucil Arilamidasa (355 U/mg) y la β -Galactosidasa (215 U/mg) (Fig. 1). Otras actividades detectadas en esta galería fueron: C8-Lipasa (170 U/mg) y Fosfatasa Alcalina (125 U/mg), seguidas por Cistina-Arilamidasa (115 U/mg) y α -Manosidasa (105 U/mg). No se detectó actividad α -Galactosidasa, β -Glucosidasa, Valina-Arilamidasa y α -Fucosidasa (Fig. 4).

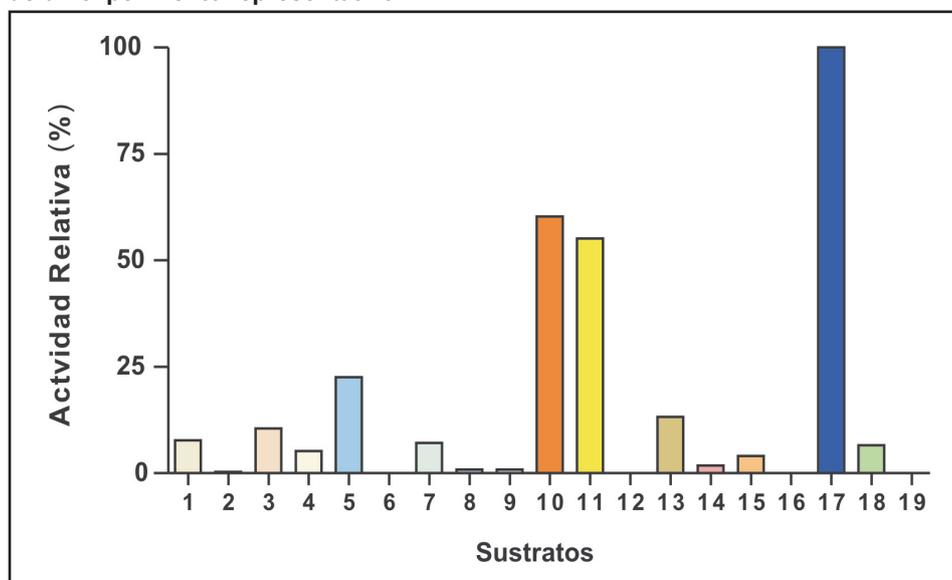
DISCUSIÓN

La importancia de las enzimas en el metabolismo de adaptación de los helmintos está bien establecida (Dresden & Deelder, 1979; Chapman &

Mitchell, 1982; Hotez *et al.*, 1985). Las actividades proteolíticas han sido estudiadas en extractos crudos o en productos de excreción/secreción liberados in vitro de estadios larvales y parásitos adultos de trematodos utilizando sustratos no específicos de proteasas como Azocoll, y sustratos específicos como elastina, fibrina y péptidos sintéticos derivatizados con aminometilcoumarina (Barret, 1980). Cornejo *et al.*, (1994) reportaron la presencia de enzimas proteolíticas liberadas por adultos de *Paragonimus mexicanus*. En Venezuela, ningún estudio se ha realizado sobre las enzimas de especies similares; por ende se decidió evaluar la diversidad enzimática general en la fracción soluble (FSPA) de *Paragonimus sp.*, en la cual se hallaron varias glicosidasas, fosfatasa y peptidasas.

En el presente estudio y bajo las condiciones experimentales descritas, la actividad más relevante que se observó en FSPA fue la glicosidasa N-acetil-

Fig. 4. actividad enzimática de la FSPA 100.000 g sobre sustratos 2-Naftil (2-N) y 2-Naftilamidicos (2-NA) ENAPI ZYM 2520. (1) 2N-fosfato pH 8,0 (Fosfatasa Alcalina); (2) 2N-butirato (C4 Esterasa); (3) 2N-caprilato (C8 Lipasa); (4) 2N- miristato (C14 Lipasa); (5) L-Leu-2-NA (Leucín Aminopeptidasa); (6) L-Val-2-NA (Valil Aminopeptidasa); (7) L-Cys-2-NA (Cisteín Aminopeptidasa); (8) N-benzoil-DL-Arg-2NA (endopeptidasa tipo tripsina); (9) N-glutaril-L-Phe-2NA (endopeptidasa tipo quimiotripsina); (10) 2N-fosfato pH 5,2 (Fosfatasa Ácida); (11) Naftol-AS-BI-fosfato pH 5,2 (Naftol Fosfohidrolasa); (12) 2N- α -D-Gal (α -Galactosidasa); (13) 2N- β -D-Gal (β -Galactosidasa); (14) Naftol-AS-BI- β -D-glucurónido (β -D-Glucuronidasa); (15) 2N- α -D-Glc (α -Glucosidasa); (16) 2N- β -D-Glc (β -Glucosidasa); (17) 1N-Acetil- β -D-Glucosaminida; (18) 2N- α -D-Man (α -Manosidasa); (19) 2N- α -L-Fuc (α -Fucosidasa). Se realizaron dos experimentos independientes por cada serie de sustratos enzimáticos, una serie de sustratos fue incubada sin fracción enzimática como control; en la figura se muestra los resultados de un experimento representativo.



β -D-glucosaminidasa (β -NAG, pH 5,5); esta actividad fue detectada tanto con el sustrato *p*-nitrofenil- β -D-N-acetilglucosaminida (Fig. 1) como con 1-naftil- β -D-N-acetilglucosaminida de la serie API ZYM 1250 (Fig. 4). La β -NAG actúa hidrolizando oligosacáridos donde está involucrada la β -D-N-acetilglucosamina, residuo azucarado que forma parte de muchos polímeros estructurales, entre los que se incluye la mucina (Lehninger & Cox, 1995). A diferencia de β -NAG, no se observó actividad α -N-acetilglucosaminidasa (Fig. 1). En localización intracelular, la β -NAG es una enzima lisosomal; su presencia en las células del túbulo proximal renal contribuye significativamente en la degradación de mucopolisacáridos y glicoproteínas (García *et al.*, 2001). Su alta actividad en FSPA sugiere que los vermes adultos de *Paragonimus* sp. degradan glicoconjugados con cadenas oligosacáridicas unidas por enlace tipo-N (mucinas), en concordancia con los

resultados de Fujino *et al.* (1983) quienes reportaron que las β -glucosaminidasas de jóvenes y adultos de *Paragonimus ohirai* y de *P. westermanni* son muy activas en la degradación y/o en la modulación de glicoconjugados de origen parasitario o hospedero. En otras especies, los estudios realizados con productos de excreción-secreción de *F. hepatica* han sugerido que las β -glucosaminidasas cumplen una función en la degradación de la mucina (Irwin *et al.*, 2004). Otras glicosidasas con actividad relevante fueron la α -Manosidasa y la β -Galactosidasa (Fig. 1, 4). La presencia de estas tres actividades glicosidasas en FSPA (100.000 g) es interesante por cuanto que en *P. ohirai* y *P. westermanni* están involucradas en la degradación secuencial de las mucinas (Fujino *et al.*, 1983) otorgándole por consiguiente al *Paragonimus* sp. esta capacidad. En su estadio adulto en el pulmón, *Paragonimus* entra en contacto con el moco bronquial

y probablemente degrada la mucina presente en este fluido biológico. Otros sustratos para glicosidasas no fueron hidrolizados (no hubo detección significativa de α - o β -Glucosidasa, β -Glucuronidasa, α -Fucosidasa) (Fig. 1, 4), sugiriendo baja actividad de las enzimas correspondientes o que sencillamente no se expresan en los vermes adultos. Fujino *et al.*, 1983 asociaron a las β -Glucuronidasas sólo con vermes juveniles mientras que las β -Galactosidasas se localizaron tanto en vermes jóvenes como en adultos.

En el ámbito de las proteasas, se observó una fuerte actividad Cisteín Proteasa (CP) (Fig. 1). En *Paragonimus sp.* se han descrito varias cisteín proteasas en metacercarias, vermes adultos y huevos. En metacercarias de *P. westermani*, se han descrito tiol proteasas que juegan un papel crucial en el desenquistamiento de las larvas, en la penetración de los tejidos, en la evasión de la helmintoxicidad por eosinófilos y en la inflamación (Yamakami *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2001; Sajid & McKerrow, 2002). En los productos de excreción/secreción (ES) de estas formas parasitarias, originados en la vejiga secretoria, se han caracterizado una CP de 27-kDa y otra de 28-kDa; la de 27-kDa induce la desgranulación de eosinófilos humanos con secreción de una neurotoxina (EDN) y el anión superóxido, mientras que la de 28-kDa facilita la migración de las metacercarias en los tejidos; la desgranulación de los eosinófilos es un evento clave para la eliminación de los helmintos y la inducción de inflamación en el sitio de infección (Chung *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2005; Na *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2008). Estas CP disminuyen dramáticamente durante la maduración en el hospedador definitivo, fenómeno este quizás relacionado con la disminución de la actividad de penetración y migración de la metacercaria dentro del hospedador definitivo (Chung *et al.*, 1997). Park *et al.* (2001) caracterizaron en *P. westermani* una CP similar a la catepsina F de *S. mansoni* localizada principalmente en las glándulas vitelogénicas de los vermes adultos, sugiriendo un posible rol en la producción de huevos de este parásito. Choi *et al.* (2006) caracterizaron una CP con alta homología a la hemoglobinasas de *F. hepatica* y de *S. mansoni* que se expresa en el epitelio intestinal de los vermes adultos de *P. westermani*, sugiriendo una función digestiva sobre la hemoglobina hospedera. En los productos de excreción/secreción (ES) de vermes adultos de *P. mexicanus* se describieron varias bandas en geles de SDS-PAGE con actividad proteolítica tiol-dependiente

activas a pH 4,5 (Cornejo *et al.* 1994). Una CP de 24-kDa presente en adultos de *P. westermani* (PwCP2) fue clonada y sobreexpresada en *E. coli* para ser utilizada en ensayos de diagnóstico; antisueros contra esta CP reconocieron esta proteasa tanto en ES como en extractos solubles de adultos de *P. westermani* (Yang *et al.*, 2004), lo cual sería concordante con la alta actividad CP detectada en nuestros extractos solubles de vermes adultos ya que una parte de los productos de ES del parásito son igualmente integrantes de la FSPA (Yang *et al.*, 2004). El análisis proteómico de productos ES en adultos de *P. westermani* han informado sobre la existencia de 16 CP en estos productos (Lee *et al.*, 2006). En extractos crudos de huevos inmaduros de *P. westermani* se observó alta actividad CP asociada con una banda de 35-kDa que no está presente en metacercarias ni adultos y cuya función no se conoce aún (Kang *et al.*, 1995). Se necesitan estudios ulteriores para conocer la diversidad (isoformas) y las funciones de la actividad CP detectada en el presente estudio.

Una enzima que pertenece al grupo de seril endopeptidasas y que juega un papel importante en ciertas relaciones hospedero-parásito es la elastasa. Esta actividad fue medida usando el sustrato N-succinil-Ala-Ala-Phe-Leu-p-nitroanilida; se detectaron valores muy bajos de actividad (Fig. 2), concordando este resultado con análisis previos los cuales sugieren que la expresión de las elastasas es estadio-específico; por ejemplo, en *S. mansoni* está presente solo en el estadio larval y está relacionada con la degradación de macromoléculas presentes en la piel tales como queratina, laminina, colágeno tipo IV, fibronectina y elastina, y seguramente le sirve al parásito durante la penetración por la piel del hospedero (Pierrot *et al.*, 1996). La elastasa de *S. mansoni*, al ser excretada, estimula el sistema inmunológico del hospedero, encontrándose en el suero de pacientes infectados con esquistosomiasis anticuerpos anti-elatasa (Pierrot *et al.*, 1996), un claro ejemplo de la importancia que tienen los antígenos enzimáticos y su posible aplicación al inmunodiagnóstico (Pujol *et al.*, 1989, Pierrot *et al.*, 1996, Alarcón de Noya *et al.*, 1997, Cesari *et al.*, 1998). No se detectó actividad endopeptidasa sobre sustratos generalmente hidrolizados por serín proteasas (tripsina, quimiotripsina) (Fig. 2, 4).

La actividad exopeptidasa (aminopeptidasas, dipeptidasas) fue significativa en FSPA (Fig. 3, 4). En FSPA, la actividad dipeptidasa fue más elevada que la actividad aminopeptidasa. Los sustratos mayormente

hidrolizados fueron: Gly-Pro-2-NA > Ser-Tyr-2-NA > Leu-Gly-2-NA (Fig. 3). Las N-aminopeptidasas podrían jugar un papel tanto en la fase final de la degradación de di- u oligopéptidos derivados de la digestión de proteínas, como en otros aspectos de la interacción hospedero-parásito. Los sustratos para aminopeptidasas mayormente hidrolizados fueron: p-nitrofenil- α -L-alanina > p-nitrofenil- α -L-leucina (pH 8,0). La α -AAP está generalmente asociada con la absorción de aminoácidos; libera preferencialmente alanina y aminoácidos secuencialmente de la porción N-terminal de péptidos (Lehninger & Cox, 1995). La leucin arilamidasa (detectada también con el sustrato L-leucil-2-naftilamida a pH 7,0) presentó valores medianos de actividad enzimática en la FSPA (Fig. 2, 4). En diferentes especies del género *Schistosoma* la LAP ha sido relacionada con la absorción de nutrientes por la superficie de su tegumento (Cesari *et al.*, 1983). Song *et al.*, (2008) sugieren que en *P. westermani*, la Leucin Aminopeptidasa está presente tanto en el parásito adulto como en la metacercaria y cumple funciones intracelulares relacionadas con el catabolismo final de la hemoglobina, difundiendo pequeños péptidos desde el epitelio intestinal del parásito e hidrolizándolos en aminoácidos libres, igualmente sugieren que esta enzima pudiera tener roles adicionales en la biología de *Paragonimus*.

En cuanto a la actividad fosfohidrolasa, la fosfatasa alcalina dio valores bajos (Fig. 2, 4). Fujino *et al.* (1989) describieron actividad FAL en vermes adultos de *Paragonimus* colectados tanto de perros como de ratas; mientras que la actividad FAc se observó en vermes extraídos de perros pero no de ratas, excepto en gránulos lisosomales del tegumento. La actividad FAc fue más importante que la alcalina y dio resultados positivos tanto con el sustrato p-nitrofenil fosfato como con 2-naftol fosfato en la serie API ZYM. La FAc cataliza la misma reacción que la FAL pero en el intervalo de pH 4,3-6,0 y está ampliamente distribuida en diferentes organismos; es considerada como un marcador lisosomal (Lehninger *et al.*, 1995). La hidrólisis del sustrato naftol-AS-BI-fosfato fue llevada a cabo probablemente por una isoforma de la fosfatasa ácida. La presencia de fosfatasa en vermes adultos de *Paragonimus* sp. reportada en este trabajo (Fig. 2) concuerda con lo descrito en vermes adultos de *P. westermani* cuando se encuentran en un hospedero definitivo como el perro (Fujino *et al.*, 1989). En *S. mansoni*, la FAc se observa en los espacios extracelulares de las invaginaciones del tegumento

de los vermes adultos (Cesari *et al.*, 1981). Entre las diversas funciones del tegumento en los trematodos está absorber y transportar moléculas de origen hospedero; las fosfatasa participan en estos procesos de absorción de nutrientes y están generalmente presente en sitios de intercambio con el ambiente, relacionadas con la introducción y el transporte de carbohidratos al ambiente interno del parásito (Cesari, 1974).

Los resultados obtenidos con los derivados p-nitrofenilados y p-nitronilida de diferentes sustratos enzimáticos en los diferentes ensayos in vitro utilizados para cada enzima fueron en general corroborados en las series enzimáticas de tipo API ZYM. Los resultados descritos en el presente trabajo representan los primeros estudios enzimáticos que se registran en adultos de *Paragonimus* sp. obtenidos en Venezuela de un reservorio silvestre como *Didelphis*. Futuros estudios permitirán profundizar los presentes hallazgos, así como también realizar comparaciones de dichas determinaciones tanto en diferentes preparaciones del parásito como en extractos de excreción-secreción y preparados de huevos, además de la purificación de cada una de ellas, su definición antigénica y su posible aplicación en técnicas de inmunodiagnóstico.

Enzymatic diversity of enzymes in the soluble fraction of adult worms from a Venezuelan isolate of *Paragonimus* sp.

SUMMARY

Paragonimus sp. is a trematode that causes chronic inflammation of the lung in carnivorous mammals and humans, which constitute a public health problem in Asian and Latin American countries. Trematodes have enzymes that facilitate their penetration and migration through different host organs to ensure their life cycle. To evaluate the enzymatic diversity of the soluble fraction (FSPA, 100,000 g) of a Venezuelan isolate of *Paragonimus* sp. adult worms, several enzyme determinations were conducted at different pH. The activities of enzymes releasing p-nitrophenol or p-nitroanilina from the corresponding dye-related synthetic peptides were assessed by interpolating absorbance (A 405 nm) values in the corresponding calibration curve (A 405 nm vs. nmol); on the other hand, absorbances

of 2-naphthylamine and 2-naphthols released from another series of synthetic substrates were read at different wavelengths between 450 nm and 620 nm to assess for the activity of the corresponding hydrolases. Phosphohydrolase, glycosidase and peptidase activities were detected in FSPA, β -N-acetyl- β -D-glucosaminidase (0.55 μ mol/h/mg, pH 5.5) and cysteine protease (0.4 μ mol/h/mg, pH 5.5) being higher than all the other detected activities. These activities are probably related to the adult worm habitat and its need for glycan and peptide degradation of lung secretions. These results represent the first enzymatic study done with a Venezuelan isolate of adult *Paragonimus sp.* worms collected from the common reservoir *Didelphis marsupialis*.

Key words: *Paragonimus sp.*, enzymatic activity, trematodes, Venezuela.

REFERENCIAS

- Alarcón de Noya B., Noya O., Torres J. & Botto C. (1985). A field study of Paragonimiasis in Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 766-769.
- Alarcón de Noya B., Cesari I., Losada S., Colmenares C., Balzán C., Hoebeke J. *et al.* (1997). Evaluation of alkaline phosphatase immunoassay and comparison with other diagnostic methods in areas of low transmission of schistosomiasis. *Acta Trop.* **66**: 69-78.
- Barret A. J. (1980). Fluorometric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. *Biochem. J.* **187**: 909-912.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* **72**: 248-252.
- Cesari I. M. (1974). *Schistosoma mansoni*: distribution and characteristics of alkaline and acid phosphatase. *Exp. Parasitol.* **36**: 405-414.
- Cesari I. M., Simpson A. J. & Evans W. H. (1981). Properties of a series of tegumental membrane-bound phosphohydrolase activities of *Schistosoma mansoni*. *Biochem. J.* **198**: 467-73.
- Cesari I. M., Auriault C. & Capron A. (1983). Aminopeptidase activity in adult *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **69**: 280-284.
- Cesari I. M., Bouty I., Bout D., De Noya B. & Hoebeke J. (1992). Parasites enzymes as tool to investigate immune response. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **87**: 55-65.
- Cesari I. M., Ferrer A., Kombila M., Pichard E., Decam E., Li-Shu Q., *et al.* (1998). Specificity of the solid phase alkaline phosphatase immunocapture assay for the diagnosis of human *Schistosoma mansoni* infection. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**: 38-39.
- Cesari I. M., Ballen D., Perrone T., Oriol O., Hoebeke J. & Bout D. (2000). Enzyme activities in *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen. *J. Parasitol.* **86**: 1137-1140.
- Chapman C. & Mitchell C. (1982). Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* **11**: 165-178.
- Choi J-H., Lee J-H., Yu H-S., Jeong H-J., Kim J., Hong Y. C., *et al.* (2006). Molecular and biochemical characterization of hemoglobinase, a cysteine proteinase in *Paragonimus westermani*. *Korean J. Parasitol.* **44**: 187-196.
- Chung Y. B., Yang H. J., Kang S. Y., Kong Y. & Cho S. Y. (1997). Activities of different cysteine proteases of *Paragonimus westermani* in cleaving human IgG. *Korean J. Parasitol.* **35**: 139-142.
- Chung Y-B., Kita H. & Shin M-H. (2008). A 27 kDa cysteine protease secreted by newly excysted *Paragonimus westermani* metacercariae induces superoxide anion production and degranulation of human eosinophils. *Korean J. Parasitol.* **46**: 95-99.
- Cornejo W., Tantalean M. & Huiza A. (1994). Enzimas proteolíticas liberadas in vitro por adultos de *Paragonimus mexicanus*. *Rev. Per. Med. Trop.* **8**: 57-61.
- Dresden M. & Asch H. (1972). Proteolytic enzymes in extracts of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Biochem. Biophys. Acta.* **289**: 378-384.

- Dresden M. & Deelder A. (1979). *Schistosoma mansoni*: thiol proteinase properties of adult worm hemoglobinase. *Exp. Parasitol.* **48**: 190-197.
- Fujino T., Fukuda K., Hamajima F. & Ishii Y. (1989). Studies on host specificity in *P. westermani*: II Histochemical and cytochemical characterization of metacercariae and worms from rats and dogs. *J. Helminthol.* **63**: 315-327.
- Fujino T., Higo H. & Ishii Y. (1983). Histochemical studies of glycosidase activity in juveniles and adults of the lung *Paragonimus*. *Parasitol.* **86**: 119-126.
- García V., Yanes L. & Callejon A. (2001). Disfunción tubular proximal renal en la diabetes mellitus insulino dependiente. *Nefrol.* **3**: 32-37.
- Hotez P., Trang N., McKerrow J. & Cerami A. (1985). Isolation characterization of a proteolytic enzyme from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. *J. Biol. Chem.* **260**: 7343-7348.
- Ikeda T., Oikawa Y. & Nishiyama T. (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay using cysteine proteinase antigens for immunodiagnosis of human paragonimiasis. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* **55**: 434-437.
- Irwin J., Monrrisey P., Walshe A., O'Neill S., Carrington S., Mattheus E., et al. (2004). Glycosidase activity in the excretory-secretory products of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol.* **129**: 465-472.
- Kang S. Y., Cho M. S., Chung Y. B., Kong Y. & Cho S. Y. (1995). A cysteine protease of *Paragonimus westermani* eggs. *Korean J. Parasitol.* **33**: 323-330.
- Lee E. G., Na B. K., Bae Y. A., Kim S. H., Je E. Y., Ju J. W., et al. (2006). Identification of immunodominant excretory-secretory cysteine proteases of adult *Paragonimus westermani* by proteome analysis. *Proteomics.* **6**: 1290-1300.
- Lehninger N. & Cox. (1995). *Principios de Bioquímica*. 2da edición. Ed. Omega, Barcelona, España.
- Na B. K., Kim S. H., Lee E. G., Kim T. S., Bae Y. A., Kang I. et al. (2006). Critical roles for excretory-secretory cysteine proteases during tissue invasion of *Paragonimus westermani* newly excysted metacercariae. *Cell Microbiol.* **8**: 1034-1046.
- Park H., Hong K., Sakanary J., Choi J., Park S., Kim K., et al. (2001). *Paragonimus westermani*: cloning of a cathepsin F-like cysteine proteinase from the adult worm. *Exp. Parasitol.* **98**: 223-227.
- Pierrot C., Godin C., Liu J., Capron A. & Khalife J. (1996). *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during the parasite life cycle. *Parasitol.* **113**: 519-26.
- Pujol F., Alarcón de Noya B. & Cesari I. (1989). Immunodiagnosis of *Schistosomiasis mansoni* with APIA (alkaline phosphatase immunoassay). *Immunol. Invest.* **18**: 1071-1080.
- Sajid M. & McKerrow J. (2002). Cysteine proteases in parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* **120**: 1-21.
- Shin M. H., Kita H., Park H. Y. & Seoh J. Y. (2001). Cysteine protease secreted by *Paragonimus westermani* attenuates effector functions of human eosinophils stimulated with immunoglobulin G. *Infection and Immunity.* **69**: 1599-1604.
- Shin M. H., Chung Y. B. & Kita H. (2005). Degranulation of human eosinophils induced by *Paragonimus westermani*-secreted protease. *Korean J. Parasitol.* **43**: 33-37.
- Song C. & Kim T. (1994). Characterization of a cysteine proteinase from adult worms of *Paragonimus westermani*. *Korean J. Parasitol.* **32**: 231-241.
- Song S-M., Park J., Kim J., Kim, S. Hong Y., Kong H. & Chung, D. (2008). Identification and characterization of *Paragonimus westermani* leucine aminopeptidase. *Parasitol. Int.* **57**: 334-341.
- Yang H., Chung Y., Kang S., Kong Y. & Cho S. (2002). Excretory bladder: the source of cysteine proteases in *Paragonimus westermani* metacercariae. *Korean J. Parasitol.* **40**: 89-92.
- Yang S. H., Park J. O., Lee J. H., Jeon B. H., Kim W. S., Kim S. I., et al. (2004). Cloning and

characterization of a new cysteine proteinase secreted by *Paragonimus westermani* adult worms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**: 87-92.

Yamakami K, Hamajima F, Akao S. & Tadakuma T. (1995). Purification and characterization of acid cysteine protease from metacercariae of the

mammalian trematode parasite *Paragonimus westermani*. *Eur. J. Biochem.* **233**: 490-497.

Yokogawa M. (1965). *Paragonimus* and paragonimiasis. *Adv. Parasitol.* **3**: 99-158.

Recibido el 23/11/2009
Aceptado el 10/04/2010
