

***Schistosoma mansoni*: respuesta celular hepática de ratones Balb/c infectados unisexualmente**

Emilia E. Barrios¹, Paola Tonino², Víctor Delgado¹, Wolfan Araque¹

¹Laboratorio de Parásitos Intestinales (Centro de BioMolP), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia

²Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Mitsuo Ogura", Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, El Márquez 1070, Caracas 76963, Venezuela

Telefax: +58-241-8673342.

Fax: +58-241-6150184.

E-mail: E. Barrios,
barriose@uc.edu.ve.

Financiamiento: CDCH –UCV (03-10-5113-2003 de PT) Fonacit (2000001901 de VD y Proyecto "Alma mater".

Este trabajo es parte de la tesis doctoral de Emilia Barrios

RESUMEN

La respuesta granulomatosa en animales infectados con *Schistosoma mansoni* es atribuida a la presencia del huevo y aunque los gusanos adultos co-existen en el sistema porta hepático, el papel en la inmunopatología no está claro. Se evaluó la respuesta celular hepática en ratones Balb/c infectados unisexualmente (UNI) con cercarias de *S. mansoni*, mediante histología convencional, inmunofluorescencia para CD4+ y CD8+, inmunohistoquímica e inmunomicroscopía electrónica para macrófagos activados. Los resultados muestran que la infección UNI produjo un infiltrado hepático con una área de $33,9 \pm 18,86 \mu\text{m}^2$ (media \pm DE), constituido por macrófagos, linfocitos, plasmocitos y escasos eosinófilos. En la infección bisexual, la composición celular fue similar pero más intensa con un área de $195,6 \pm 74,4 \mu\text{m}^2$. Las células CD4+ y CD8+ en el hígado se ubicaron entre 2 y 4 cel/ μm^2 cerca del gusano y distante en forma difusa o en grupos, en ambas condiciones de infección. Los macrófagos activados se ubicaron alrededor de los gusanos y en donde se deposita el pigmento esquistosomal. Los resultados sugieren que el gusano adulto es capaz de inducer una respuesta inflamatoria hepática en ausencia del huevo, la cual debe jugar un papel importante en la respuesta producida contra el huevo y tiene implicaciones en la patogénesis de la esquistosomiasis murina.

Palabras clave: *Schistosoma mansoni*, gusano adulto, infección murina unisexual, respuesta inmune

ABSTRACT

***Schistosoma mansoni*: hepatic cellular response of unisexually-infected Balb/c mice**

The granulomatous response in animals infected with *Schistosoma mansoni* is attributed to the host reaction against the eggs, although the role of the adult worm is still controversial. The hepatic inflammatory response was studied in BALB/c mice unisexually (UNI) infected with cercariae of *S. mansoni* by histopathology, immunofluorescence, immunohistochemistry and immunoelectronmicroscopy. The size of inflammatory infiltrate in liver of UNI infected mice, mean \pm SD ($33,9 \pm 18, 86 \mu\text{m}^2$), the cells present included macrophages, lymphocytes, plasmocytes and few eosinophils. CD4+ and CD8+ cells in UNI infected mice were observed (2 to 4 cells/ μm^2) close to the worms and two patterns, either diffuse or in clusters in distant zones, in UNI and bisexual infections (BIS). The activated macrophages were observed close to worms and to schistosomal pigment. The results suggest that the adult worm is capable of inducing hepatic inflammatory response without granuloma formation, which elicit a significant in vivo macrophage and lymphocyte infiltrate, with probable implications in the pathogenesis of the murine schistosomiasis.

Key words: *Schistosoma mansoni*, adult worm, unisexually infected mice, immune response

INTRODUCCIÓN

En humanos la esquistosomiasis es una enfermedad de evolución crónica producida por el tremátode digenético *Schistosoma mansoni*. La morbilidad se atribuye a la presencia de huevos en el hígado e intestino, donde se produce una reacción inflamatoria que da origen a la formación del granuloma (1), y ésta se asocia a las complicaciones clínicas como fibrosis e hipertensión portal (2). La participación del gusano adulto en la respuesta inmune y en la formación del granuloma en el hospedador infectado es poco conocida, aunque la obstrucción de la microcirculación hepatointestinal y la estimulación del sistema inmunológico, como consecuencia del recambio tegumentario parecen jugar un papel importante (3, 4). La esquistosomiasis murina ofrece una alternativa para el estudio de la inmunopatología, así como para conocer la participación de los estadios del parásito y su interacción con el hospedador. La respuesta granulomatosa en ratones con infección unisexual, a los que se le inocularon huevos para simular la condición de una infección natural sugieren que el gusano participa activamente en la patogénesis de la infección (5). Por otra parte, las células T (CD4+), de las subpoblaciones Th2 parecen ser importantes (6, 7).

La co-existencia de gusanos y huevos en el hospedador infectado dificulta identificar el nivel de contribución de cada estadio en la patología. De ahí que la infección unisexual es una alternativa para evaluar la participación del gusano adulto en la respuesta del hospedador (5). En el presente trabajo se identificaron componentes de la respuesta celular hepática en ratones con 8 semanas de infección unisexual con *S. mansoni*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Ratones BALB/c machos de 8 semanas, se infectaron con cercarias de *S. mansoni*, vía subcutánea (1h a temperatura ambiente); estos ratones se dividieron en 3 grupos de 10 ratones cada uno: grupo control no infectado, grupo con infección unisexual (UNI) y grupo con infección bisexual (BIS). Los ratones fueron infectados con 100 cercarias a través de la cola (8). Las cercarias obtenidas de caracoles *Biomphalaria glabrata* aislado Puerto Rico se usaron para la infección de los ratones. Los caracoles se infectaron con un miracidio y 10 miracidios para obtener cercarias de un sexo o de ambos sexos, respectivamente (9, 10).

Respuesta celular inflamatoria. A 8 semanas de infección, los hígados de diez ratones de cada grupo fueron fijados con formalina al 10% en PBS (150 mM, pH 7, 2). Se incluyeron en parafina para realizar cortes de 5 μm que se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Morfometría. Se obtuvo el área promedio del infiltrado inflamatorio en campo de 400X (0,0014 μm^2) a partir de 10 campos microscópicos. La media se estimó en 10 ratones por grupo, con la ayuda de un micrómetro ocular y los datos se expresaron como la media \pm DE.

Detección de macrófagos activados. Secciones hepática de 5 μm de cada grupo (n=10) fueron colocadas en láminas portaobjetos tratadas con poli-L-lisina y procesadas por la técnica de la avidina-biotina-inmunoperoxidasa (11). Los cortes fueron incubados con el anticuerpo policlonal anti-MOMA-2 de rata (Serotec, NC, USA) en una dilución 1:25 en PBS (100mM, pH 7,4) por 45 min a temperatura ambiente. Luego del lavado con PBS, se adicionó el anticuerpo secundario biotinado IgG anti-rata diluido 1:100 en PBS (Serotec, NC, USA), y se incubó por 45 min a temperatura ambiente. A las láminas lavadas en PBS se les adicionó 3-amino-9-etil-carbazol, se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se hizo montaje en gelatina glicerina. En el control negativo, el anticuerpo primario se reemplazó por PBS. Las observaciones se realizaron en un microscopio Zeiss con cámara digital Casio QVE-04.

Linfocitos CD4+ y CD8+. Secciones de tejido hepático se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-CD4+ y anti-CD8+ conjugado a FITC (SIGMA) diluido en azul de Evans 1:2 (0,2 % in PBS, 150 mM pH 7, 4), 30 min a 37°C. Las láminas se lavaron con PBS, se montaron con glicerina (1:9 en carbonato de sodio 60 mM, pH 9), y examinadas al microscopio UV. Como control negativo el anticuerpo monoclonal se sustituyó por azul de Evans. El recuento de CD4+ y CD8+ se hizo en cinco muestras por grupo y los resultados se expresaron en células marcadas por μm^2 .

Inmunolocalización ultraestructural de macrófagos. Cortes de tejido hepático (n=5) fueron fijados con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,1% en PBS (100 mM, pH 7,4), se deshidrataron en etanol de 50, 60 y 70% por 30 min y se embebieron en la resina LR-WHITE (SIGMA). Se empleó la técnica de post-inclusión con el mismo anticuerpo primario empleado en la inmunohistoquímica (12). El anticuerpo secundario consistió en un anti-IgG conjugada a oro coloidal de 10 nm (KPL). Las secciones ultrafinas se

observaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM10 a 75 kV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso granulomatoso inducido por los huevos de *S. mansoni*, en el hospedador vertebrado, está ampliamente documentado (2, 13), y es el

producto de una dinámica de eventos en la maduración del miracidio y de una intensa respuesta celular por parte del hospedador (14), en tanto que la respuesta celular al gusano adulto y sus productos está poco documentada.

En el presente estudio, se observó una respuesta celular hepática en ratones con infección unisexual, caracterizada por un infiltrado inflamatorio de macrófagos, linfocitos, plasmocitos y escasos eosinófilos, en zonas donde se deposita el pigmento esquistosomal o sobre el gusano (Fig 1A), con un área de infiltrado de $33,9 \pm 18,8 \mu\text{m}^2$. Los infiltrados inflamatorios también se observaron alrededor de capilares sinusoidales (Fig 1B)

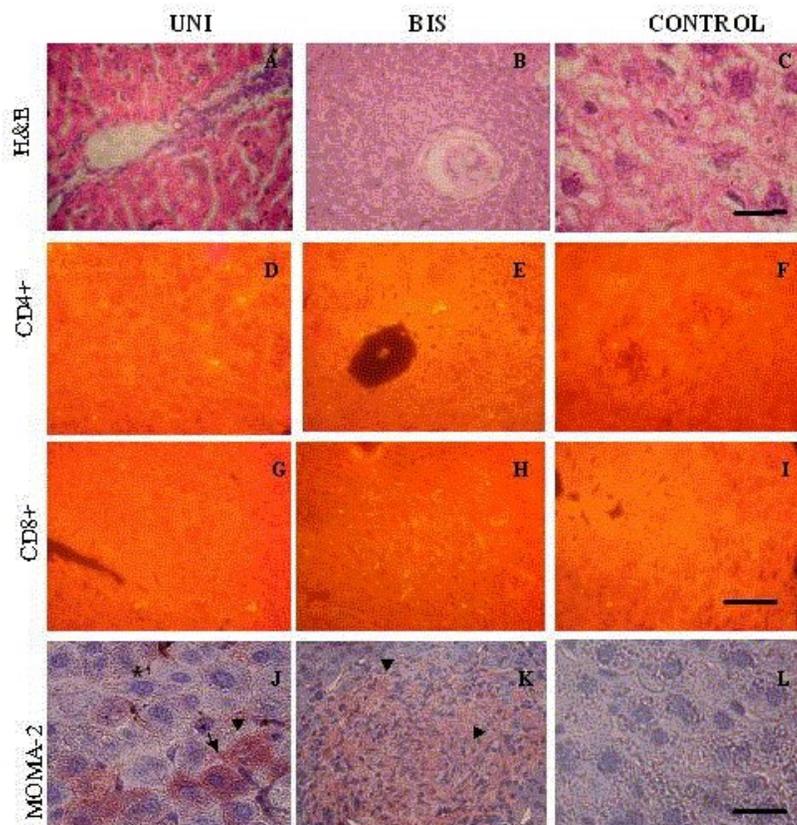


Figura 1. Secciones hepáticas de ratones Balb/c. Respuesta inflamatoria en ratones con infección unisexual por *Schistosoma mansoni* (A), con infección bisexual (B) y ratones no-infectados (C). Teñidos con H&E. Inmunoreacción para CD4+ y CD8+ en infección unisexual (D y G), en la infección bisexual (E y H) y en ratones no-infectados (F e I), respectivamente. Inmunolocalización de MOMA-2 en sitios cercanos al pigmento esquistosomal (J, cabeza de flecha, asterisco), en la periferia del granuloma en la infección bisexual (K, cabeza de flechas) y en ratones no-infectados (L). En A-C, Barra= 50 μm , en D-I, Bar = 25 μm , en J-K, Barra = 10 μm y en L, Barra = 16 μm .

Mientras que en la condición de infección natural, con ambos sexos del parásito (BIS), se evidenció gran cantidad de huevos con el miracidio preservado, y una reacción granulomatosa con predominio de macrófagos, linfocitos, neutrófilos segmentados, células gigantes y epitelioides (Fig 1C); con un área de $195,6 \pm 74,43 \mu\text{m}^2$. Se observaron escasos eosinófilos en ambos grupos experimentales. En contraste, en los ratones no infectados las secciones hepáticas mostraron un aspecto normal (Fig 1D).

El proceso inflamatorio observado en la infección UNI sugiere que el gusano adulto estimula una respuesta celular mediada constituida por los mismos tipos celulares a la inducida en la condición de infección BIS o que en los primeras semanas de la infección se estimule la producción de mediadores relacionados con estas células. Esta respuesta previa debe tener participación en la respuesta granulomatosa que se produce contra el huevo en la infección natural, como lo sugiere el hecho de que las células identificadas en la infección UNI coincidan con las identificadas en desarrollo de la respuesta granulomatosa, puesto que las células epitelioides y gigantes multinucleadas, observadas en la infección natural, constituyen un producto de la ruta de activación de los macrófagos, vía mediadores solubles (15). La similitud en la composición celular del infiltrado hepático en ambas condiciones de infección, podría explicarse en base a que el gusano adulto en su maduración, module la proliferación celular hacia una respuesta exacerbada durante la formación del granuloma, en la infección natural (16) y corroboran estudios de la respuesta celular sobre huevos inoculados en ratones con infección unisexual, los cuales reportan que los gusanos provocan una sensibilización que contribuye al desarrollo de una respuesta celular inducida por huevos inoculados intraperitonealmente, caracterizada por la formación de granulomas grandes (5, 17).

La escasa presencia de eosinófilos en este estudio, contrasta con la observada en la infección natural de otro estudio, que reporta entre la semana 6 y 8 de infección, 3.299 y 4.545 eosinófilos por mm^2 en los granulomas hepáticos (18). Esta diferencia cuantitativa, podría estar determinada por la zona del tejido hepático evaluada, ya que la distribución celular en el tejido en las fases de maduración e involución del granuloma difiere de manera considerable, así como la localización del infiltrado en sitios cercanos a la porta o lóbulos hepáticos (14, 19). Por otro lado, los factores genéticos asociados a las especies murinas empleadas pueden estar involucrados en el tipo de respuesta celular que se presente (20).

La inmunorreactividad de células T, CD4⁺ en secciones hepáticas de ratones con infección UNI, fue difusa en zonas alrededor de los gusanos y de pigmento del parásito (Fig 1D), el patrón de distribución fue irregular y focalizado en

grupos celulares. La distribución de células T, CD8⁺ mostró una inmunorreactividad similar, pero con mayor intensidad (Fig 1G). En la infección bisexual (BIS), la inmunorreactividad para CD4⁺ y CD8⁺ se observó en capas internas del granuloma, cercanas al huevo (Fig 1E y 1H), en similar intensidad. En ratones no infectados, la reacción fue escasa y dispersa para ambos tipos celulares (Fig 1F). En las dos condiciones de infección la cantidad de ambos tipos celulares se ubicaron entre 2 y 4 células/ μm^2 , no se observaron

diferencias estadísticamente significativas entre la infección natural y la unisexual ($p= 0,6$).

La identificación de los macrófagos activados, en hígado de ratones con infección UNI evidencia una importante inmunoreactividad alrededor de los gusanos y en el pigmento esquistosomal (Fig 1J), mientras que en la infección BIS, la inmunorreacción se ubicó en las capas externas del granuloma, áreas fibróticas del infiltrado inflamatorio y en células hepáticas cercanas al granuloma asociadas al pigmento esquistosomal (Fig 1K). En los ratones no-infectados no se observó activación (Fig 1L).

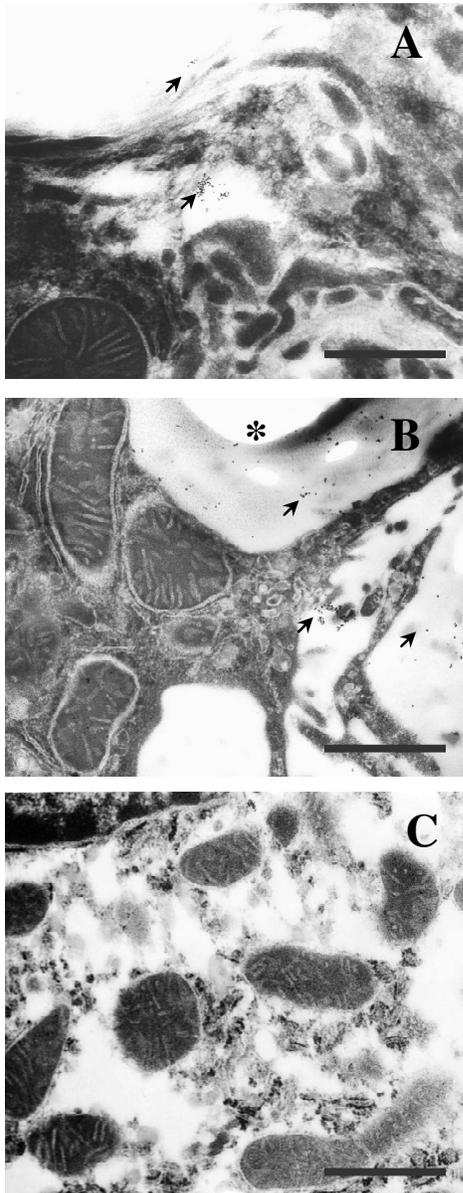


Figura 2. Inmunolocalización de macrófagos en secciones hepáticas alrededor de gusanos (A, flechas cortas), en la infección unisexual, alrededor de huevos de *Schistosoma mansoni* (B, asterisco), en la infección bisexual y en secciones de ratones no-infectados (C). En A, Bar= 0.5 μ m, in B, Bar= 0.3 μ m and in C, Bar= 0.4 μ m.

La inmunomicroscopía electrónica no mostró diferencias con la inmunohistoquímica, en relación con la activación de macrófagos en la infección unisexual (Fig. 2A), pero en la infección BIS el marcaje fue más intenso alrededor del huevo y específicamente en las zonas conocidas como capa de Reynolds y menor reactividad en sitios distantes al huevo (Fig 2B). No se observó marcaje en el tejido de ratones no infectados (Fig. 2C).

Estos resultados reflejan activación específica de macrófagos hepáticos por los gusanos adultos, no sólo al inicio de la infección, sino que el estímulo parecer ser sostenido durante la fase crónica como se aprecia en la infección natural. En relación al huevo el inmunomarcaje ultraestructural indica que la activación de macrófagos puede ubicarse también en las capas internas del granuloma en

asociación con la cáscara del huevo a nivel de la capa de Reynolds (21), lo que sugiere que dicha activación puede ser inducida además de los antígenos solubles del huevo, por elementos inertes de la cubierta.

La población de linfocitos CD4+ en respuesta a un antígeno determinado se puede diferenciar en subpoblaciones Th1 y Th2. Las células Th1 productoras de IL-2 son el principal factor de crecimiento y diferenciación de células T, CD8+ a linfocitos T citolíticos y se asocian a procesos infecciosos mediados por células fagocíticas, mientras que la subpoblación CD4+ son mediadoras de procesos alérgicos, infecciones helmínticas e inhiben la activación de los macrófagos producto de respuesta Th1 (22). En la infección por *Schistosoma*, se demostró que los antígenos solubles del gusano estimulan a la célula de Kupfer y tienen un efecto inhibitorio sobre las respuesta Th1, mientras que los huevos parecen inducir respuestas Th2 (23, 24). La existencia de linfocitos T, CD8+ y CD4+ en proporciones muy similares en la infección UNI, podría sugerir que el gusano adulto estimula ambos tipos de respuesta. Por otra parte, algunos investigadores señalan que los huevos inducen una anergia de célula T, CD4+ y CD8+ durante la infección crónica (25) y esto podría explicar, en el presente estudio, la similitud en el conteo en ambos grupos de infección.

En el estudio anterior, la proliferación de células aisladas del bazo de ratones con infección unisexual frente a mitógenos como la PHA y LPS *in vitro*, refleja inmunosupresión acentuada inducida por el gusano (26). No obstante, nosotros observamos diferentes tipos celulares en el infiltrado hepático asociados a la presencia del gusano adulto en la infección UNI, indicando que la inmunosupresión asociada a elementos estimuladores de la respuesta innata, como son los lipopolisacáridos bacterianos y lectinas no reflejan la respuesta específica de las células de un determinado tejido frente a antígenos de gusano *in vivo*.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que los gusanos adultos son capaces de inducir una respuesta inflamatoria hepática en ausencia del huevo, con un infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos activados contribuyendo de forma independiente a la patogénesis de la esquistosomiasis.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue subvencionado por el Fonacit (N°2000001901), CDCH-UCV (N° 03/59-01), CDCH-UC (N° 873/02 y 99014) y al "Programa Alma Mater"-OPSUM. Los autores agradecen a la Sras. Beatriz Bello, Olga Ojeda, Jennifer Ayala, a los Lic. Viana Pinto y Rubén Toro y a la Sra. Mirtha Romano por su asistencia técnica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cesari IM, Ballen DE, Perrone T, Oriol O, Hoebeke J, Bout D. Enzyme activities in *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen. J Parasitol 2000; 86:1137-1140.
2. Friedman SL. Cirrose hepática e suas principais sequelas. In: Bennett JC, Plum F. eds. Cecil tratado de Medicina Interna. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997. pp. 871-80.
3. Shaker ZA, Kaddah MA, Hanallah SB, El-Khodary MI. Production of monoclonal antibodies against target schistosomal antigen secreted in the urine of *Schistosoma mansoni*-infected patients. Int J Parasitol 1998; 28: 1893-1901.
4. Bogist BJ, Dalton JP, Brady CP, Brindley PJ. Gut-associated immunolocalization of the *Schistosoma mansoni* cysteine proteases, SmCL1 and SmCL2. J Parasitol 2001; 87:237-241.
5. Cheever AW, Lewis FA, Wynn TA. *Schistosoma mansoni*: unisexual infections sensitize mice for granuloma formation around intravenously injected eggs. Parasitol Res 1997; 83: 57-59.
6. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray P, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells Th1s and Th2s. J Exp Med 1998; 187: 129-134.
7. Pereira De Souza HS. Imunoregulaco e mediadores inflamatorios. In: I Imunologia da mucosa intestinal. Elia CC, Souza H.S. (eds.). Sao Paulo, Rio de Janeiro, Brasil. 2001. p.p. 63.
8. Girn ME, Rodríguez-Acosta A. Secretion of macrophage 4 agglutinating factor by schistosome eggs granulomas maintained in vitro. Indian J Med Res 1987; 85:536-538.
9. Araque W, Barrios EE, Rodriguez P, Delgado VS, Finol HJ. Ultrastructural study of the *in vitro* interaction between *Biomphalaria glabrata* hemocytes and *Schistosoma mansoni* miracidia. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 905-908.
10. Barrios E, Finol HJ, Delgado V, Araque W. *Schistosoma mansoni*: Cambios ultraestructurales durante la transformación del miracidio *in vitro*. Salus 2004; 8: 12-19.
11. Tonino P, Finol HJ, Hidalgo C, Sosa L. Angiogenesis y proliferación en tumores malignos del tracto gastrointestinal del humano. Acta Biol. Venez 2001; 21: 1-8.
12. Beesley, JE. Colloidal Gold: A new perspective for cytochemical marking. Oxford University Press. Royal Microscopy Society, Oxford, 1989; pp. 55-58.
13. Rutitzky LI, Ozkaymak E, Rottman JB, Stadecker MJ. Disruption of the ICOS-B7RP-2 costimulatory pathway leads to enhanced hepatic immunopathology and increased gamma interferon production by CD4 cells in murine schistosomiasis. Infect Immun 2003; 71: 4040-4444.
14. Lenzi HL, Kimmel E, Schechman H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, Pacheco R, Mariano M. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: Morphogenetic and biochemical approaches. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93: 141-151.
15. Roitt IM, Delves PJ. Hipersensibilidad. En: Inmunologa fundamentos. Panamericana (eds). Buenos Aires, Argentina. 2003. p.p. 389.
16. Zouain GS, Alves JB, Leite MF, Goes AM. Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. Parasitol Int. 2002; 51, 259-269.
17. Jacobs W, Deelder A, Bogers J, Van De Vijver K, Van Mark E. Schistosomal granuloma modulation III. *Schistosoma haematobium* worms accelerate *S. mansoni* soluble egg antigen-induced hepatic granuloma formation in vivo. Parasitol Res 1999; 85: 905-909
18. Kermanizadeh P., Hagan P. y Crompton DW kinetics of mast cells and eosinophils in the liver of experimental infected with *Schistosoma mansoni*. IAM. 2000; 3, 1-3.

19. Farah IO, Nyindo M, King CL, Hau J. Hepatic granulomatous response to *Schistosoma mansoni* eggs in BALB/c mice and olive baboons (*Papio cynocephalus*). J Comp Pathol 2000; 123:7-14.
20. Rutitzky LI, Hernández HJ, Yim YS, Ricklan DE, Finger E, Mohan C, Peter I, Wakeland EK, Stadecker MJ. Enhanced egg-induced immunopathology correlates with IFN- γ in murine schistosomiasis: identification of two epistatic genetic intervals. J Immunol 2005; 174: 435-440.
21. Nelly PJ, Smith JH, Doughty BL, Kemp M. The ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* egg. Am J Trop Med Hyg 1988; 39: 52-67.
22. Abbas AK, Lichtman A, Pober JS. (2000). Cellular and Molecular Immunology. 552 pp. U.S.A.: W.B. Saunders Company.
23. Hayashi N, Natsui K, Tsutsui H, Osada Y, Mohamed R, Nakano H, Kashiwamura S, Hyodo Y, Takeda K, Akira S, Hada T, Higashino K, Kojima S, Nakanishi K. Kupfer Cells from *Schistosoma mansoni*-infected mice participate in the prompt type 2 differentiation of hepatic T cells response to worm antigens. J Immunol 1999; 163: 6702-6711.
24. Pearce EJ, Pedras-Vasconcelos J. *Schistosoma mansoni* infection induces a type 1 CD8+ cell response. Behring Inst Mitt 1997; 99: 79-84.
25. Smit, P, Walsh CM, Mangan NE, Fallon RE, Sayers JR, McKenzie AN, Fallon PG. *Schistosoma mansoni* works induce anergy of T cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. J Immunol 2004;173: 1240-1248.
26. Diab M, Kamal K, Cavender D, Higashi G. Modulation of cell-mediated immunity in mice with chronic unisexual or bisexual *Schistosoma mansoni* cercarial infection. Ann Trop Med Parasitol 1989; 83: 25-30.