

Schistosoma mansoni: cambios ultraestructurales durante la transformación del miracidio *in vitro*

Emilia E. Barrios¹, Héctor J. Finol², Víctor Delgado¹, Wolfan Araque¹

 (1) Laboratorio de Parásitos Intestinales (Centro-BioMoIP). Grupo de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Carabobo (UCGEI). FCS. Valencia. Telefax: 0241-8673342. E-mail: <u>barrios@uc.edu.ve</u> (2) Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Financiamiento: CDCH-UC Nº3332-00, 19014; FONACIT UCGEI-2000001901

> Advertencia: este trabajo contiene microfotografías que pueden ser de difícil visulización, dependiendo del grado de compresióny la resolución del monitor, por lo que recomendamos ampliar la imagen elegida usando las ventajes que ofrece Acrobat Reader (N del E).

RESUMEN

Schistosoma mansoni: cambios ultraestructurales durante la transformación del miracidio *in vitro*

Se evaluaron los cambios morfológicos y ultraestructurales de la transformación in vitro de miracidios (M) de Schistosoma mansoni aislado Puerto Rico (PR), incubados en RPMI-1640 por 30 min para su transformación a esporoguiste madre (EM), seguido de 16 h en medio Hansen. Se determinó la viabilidad por la integridad del sistema protonefrigial y la exclusión del azul tripano; el tamaño y la morfología se evaluó mediante microscopía de luz y electrónica de transmisión. La microscopía de luz mostró a los 30 min pérdida del movimiento y desprendimiento del epitelio ciliado. Posteriormente los esporoquistes se observan extendidos con movimientos vermiformes v las células en flama activas; con una viabilidad de 76% a los 5 días y 50% al día 11 de cultivo, aumentando su tamaño 3 veces (300 µm) para el día 16. La microscopía electrónica reveló a 24 h de cultivo cambios en composición y distribución del tegumento, observándose polisomas libres y microvellocidades en la capa externa del tegumento, al día 7 la membrana externa del EM se muestra delgada con bolsas germinativas en su interior y gránulos proteicos electrón densos. El sistema protonefrigial está intacto a las 24 h de cultivo, observándose células en flama con 11 pares de microtúbulos periféricos. Se concluye que la transformación in vitro del M en medio axénico se acompaña de cambios importantes en la superficie del tegumento y cambios ultraestructurales.

Palabras clave: *Schistosoma mansoni,* microscopía electrónica de transmisión, miracidio.



ABSTRACT

Schistosoma mansoni: ultrastructural changes during *in vitro* transformation of miracidia

Ultrastructural changes were assessed during in vitro transformation of miracidia (M) of Schistosoma mansoni. Morphological characteristics were based on viability (protonefrigial integrity and uptake of trypan blue dye), larval size and degree of differentiation into mother sporocysts (MS) during incubation in RPMI-1640 by 30 min followed by 7 days in Hansen medium. Light microscopy showed that M first step of transformation occurs within 30 min, with loss of movement and ciliary epidermal plates. Transformed MS are extended, with worm-like movement and active flame cells; viability was 76% at 5 days and 50% at 11 days, and increased three-fold in length reaching 300 μ m during the first 16 days. Transmission Electron Microscopy at 24 h of culture revealed significant structural changes in tegumental composition and distribution; free polysomes and microvilli were found in the external layer of the tegument. At day 7 the external membrane of MS was thin and interior germinative bags were observed, with electron-dense proteic granules. The protonefrigial system remained intact at 24 h of culture, constituted by flame cells with 11 pairs of peripheral microtubules. It is concluded that miracidial transformation in cell-free culture results in surface alteration, and involves ultrastructural changes

Key words: Schistosoma mansoni, transmission electron microscopy, miracidia.

INTRODUCCIÓN

La complejidad biológica de *Schistosoma mansoni* y la elevada especificidad parasitaria, especialmente en los estadios del hospedador invertebrado, se corrobora por el poco éxito alcanzado en los ensayos de simulación *in vitro* en el desarrollo del miracidio (10, 20). Las condiciones *in vitro* de los estadios del vertebrado ha permitido estudiar la diferenciación de cercaria a esquistosómulo (11, 22) hasta el desarrollo de gusanos adultos (19), y a partir de gusanos se logra el mantenimiento y la ovipostura de huevos no viables (2, 4, 23). Mientras que la evolución de estadios del molusco permite alcanzar la transformación miracidio-esporoquiste en medios axénicos (3) y en cocultivos con células de mosquito o embrionarias de caracol; sin completar la diferenciación a cercaria (13, 28).

La estrecha interacción entre los tejidos del molusco y el parásito ha dificultado la descripción ultraestructural del proceso de diferenciación miracidio-esporoquiste en caracoles infectados, determinando discrepancias en relación a la composición del tegumento del esporoquiste (8), al igual que ocurre en cocultivos con células embrionarias de caracol (28).

En el presente trabajo se estudiaron los cambios morfológicos y estructurales de la diferenciación *in vitro* de miracidios de *S. mansoni*.



MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de miracidios y cultivo in vitro

El aislado Puerto Rico de S. mansoni es mantenido en el laboratorio por pases hámster-caracol (Mesocricetus auratus-Biomphalaria glabrata-aislado Puerto Rico). Los huevos fueron obtenidos a partir de hígado e intestino de hámsters con 8 semanas de infección por digestión enzimática con tripsina 0.25% y colagenasa 0.05% en PBS 0.15 mol/L, pH 7.2 y tamizaje a través de mallas de poro decreciente. Los huevos recuperados se lavaron en solución salina hipertónica (1,7%), se resuspendieron en agua y la eclosión se estimuló con luz directa. Los miracidios recolectados se emplearon para cultivo o infección de caracoles de 7-10 mm (7 miracidios/caracol). Los miracidios para cultivos se lavaron con 400mL de agua destilada estéril suplementada con antibióticos (1000 µg de estreptomicina, 1000 UI de penicilina/mL). concentrados en un embudo con papel filtro Whatman No.1 como soporte y aplicando presión positiva baja. Finalmente los miracidios se sedimentaron a (7), se colocaron 30 min en medio RPMI-1640 y posteriormente en 4°C medio de Hansen modificado (suplementado con 20% de suero fetal bovino e hidrolizado de lacto-albúmina), el medio se cambió cada tres días (14).

Microscopía de luz (ML)

Los cultivos fueron observados después de 30 min y cada 24 h en microscopio invertido Zeiss tipo ID03. El porcentaje de viabilidad se determinó por el método de exclusión del azul tripano al 1% en PBS (16). El tamaño (largo y ancho) de esporoquistes se determinó con un micrómetro ocular.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Miracidios frescos o esporoquistes de 24 h y 7 días de incubación se lavaron en PBS estéril por 5 min, 4°C, 1000 x rpm y se fijaron en solución de Karnovsky por 45 min a 4°C (glutaraldehido/formaldehido en solución fosfato de Millonig 330 mOsm/L; pH 7,8). Los sedimentos se lavaron tres veces con fosfato de Millonig por 5 min a 4°C y fijados con tetróxido de osmio al 1% en el mismo buffer por 90 min a 4°C, seguido de deshidratación en etanol de concentraciones crecientes (50, 70, 90 y 100%). La infiltración e inclusión se hizo en óxido de propileno y resina LX-112 (LADD RES:INC, Burlington) respectivamente. Secciones ultrafinas fueron contrastadas con citrato de plomo/acetato de uranilo, observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi, modelo H-500.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los miracidios de *S. mansoni* son estadios acuáticos de vida libre con un tiempo de sobrevida menor a 10 h, debido al agotamiento de las reservas nutritivas en condición aeróbica. Período en que requiere localizar al hospedador invertebrado para continuar la evolución (5, 15). La transformación del miracidio en el molusco se inicia de 24 y 48 h con la pérdida de las placas



epidermales (20), que en condiciones *in vitro* puede ser acelerado con medios que favorezca el aumento de AMPc, dependiente de iones Ca^{+2} (17).

En el presente trabajo se observa al ML que los miracidios recién eclosionados presentan un abundante epitelio ciliado y gran motilidad (Fig. 1), después de 30 min en medio RPMI-1640 pierden las placas epidermales ciliadas, se redondean e inmovilizan. Estas observaciones son compatibles con los primeros eventos de diferenciación a esporoquiste madre (13, 17, 18).

Los estudios ultraestructurales de miracidios y esporoquistes se orientan a la descripción de organelas particulares, pero no bajo una óptica de cambios en el proceso de transformación. En miracidios se han descrito órganos sensoriales (6), glándulas de penetración (27) y tegumento (8); en esporoquistes, células germinativas (28). En este estudio los cambios transformación del miracidio ultraestructurales que ocurren en la а esporoquiste en condiciones in vitro, muestran en el miracidio una membrana externa tegumentaria, recubierta de cilios, con numerosas vacuolas en un citoplasma reticulado (Fig. 2), mas internamente se observa una membrana basal, una muscular irregular, otra rica en mitocondrias con núcleos redondeados de RER y polisomas libres (Fig. 3).



Figura 1. (Panel superior) ML. Epitelio ciliado (cabezas de flechas) y porción anterior (flecha grande) de un miracidio de *Schistosoma mansoni.* Aumento: 400 X.

Figura 2. (Panel medio) TEM. Capa tegumental externa miracidial, cilios (c), gotas lipídicas (v); mitocondrias (m). Aumento: 15000X.

Figura 3. (Panel inferior) TEM. Capa interna tegumental miracidial, zona rica en mitocondrias rodeadas de abundante RER (flecha). Aumento: 15000X.

Después de 12 h de incubación, el 100% de los parásitos ha perdido los cilios, observándose suspendidos en el medio, membranas ciliadas en forma de agregados. Por ML los esporoquistes de 10 días, son alargados con movimientos vermiformes y células en flama activas (Fig. 4). Estas observaciones evolutivas son similares a las descritas en cocultivo miracidio-células embriónicas de caracol (17).

Por MET, el esporoquiste de 24 h muestra un tegumento externo con abundantes microvellocidades, en lugar de la superficie ciliada del miracidio,



que se funden en algunas áreas, vacuolas, mitocondrias y polisomas libres (Fig. 5).



Figura 4. ML. Esporoquiste de 24hs (cabeza de flecha) , Cilios (flecha). Aumento: 200X.

Figura 5. TEM. Capa externa tegumental de esporoquiste de 24hs, microvellocidad (cabeza de flecha), mitocondrias (m). Aumento: 24000X.

Figura 6. TEM. Capa interna tegumental de esporoquiste de 24hs, fibra muscular (flecha), núcleo (N). 24000X.

Figura 7. TEM. Célula en flama de un esporoquiste de 24hs. Conducto único (cabeza de flecha), microtúbulos (estrellas), membrana celular doble (flechas).

Esta capa se continúa con la membrana basal, que a diferencia del miracidio, es más compleja y constituida por: una capa muscular lisa, seguida por la región interna del tegumento, varias capas celulares; donde la superior está representada por células de núcleos grandes, vacuolas autofágicas complejas, figura mielínicas (algunas dentro de la envoltura nuclear), gotas lipídicas y partículas de glucógeno. La segunda capa celular presenta abundantes mitocondrias con gránulos de sales de Ca y RER cisternal o vacuolar, con menos núcleos que en el miracidio (Fig. 6).

En la observación ultraestructural en miracidios y esporoquistes de 24 h se identificó el sistema protonefrigial intacto, constituido por células en flama con 11 pares de microtúbulos periféricos y 2 pares centrales rodeados de una doble membrana o con un conducto que comunica con el exterior (Fig. 7). El sistema protonefrigial en tremátodos constituye un aparato osmorreceptor, cuya función es garantizar la homeostasis e intergridad en la mayoría de los estadios parasitarios (9). Este sistema se ha descrito ultraestructuralmente en cercarias y está compuesto por varias células en flama, donde está presente una unidad secretora; constituída por una célula compuesta de un núcleo y cilios rodeados del cuerpo basal (21, 25).

En esporoquistes de 7 días de evolución, por MET, se observa un tegumento externo delgado y en su interior varias bolsas germinativas constituídas por abundantes gránulos electrón densos de naturaleza protéica (Fig. 8).



Estos gránulos podrían corresponder a enzimas u otras moléculas estadio-específicas, descritas previamente (1). Además, se observan gotas lipídicas con material de inclusión abundante, estructuras vacuoladas abundantes en algunos casos asociadas al RER, figuras mielínicas y estructuras membranosas electrón densas (Fig. 9). Detalles similares se reportaron en esporoquistes madre de 20 días de cocultivo con células embriónicas de caracol (Bge), con bolsas germinativas y rodeadas por un tegumento primitivo con gránulos de inclusión lipídicos (28).



Figura 8. (Panel superior) TEM. Esporoquiste de 7 días de cultivo. Tegumento rodeando las bolsas germinativas (cabezas de flechas), tegumento rudimentario alrededor de esporoquistes (flechas pequeñas). Aumento: 15000 X.

Figura 9. (Panel inferir)TEM. Detalle de esporoquiste de 7 días en cultivo, gránulos de inclusión (flechas). Aumento: 24000 X.

La viabilidad de los esporoquistes, de 5 días de cultivo fue de 85% y la supervivencia de 76%, que declina hasta 50% en el día 11 (Fig. 10). Por otro lado, el largo de los esporoquistes, presentó un incremento de 100 μ m en el día 2 a 300 ± 12,4 μ m el día 16 de cultivo.



Figura 10. Viabilidad (%) de esporoquistes de *Schistosoma mansoni* transformados de miracidios en medio RPMI-1640 (30min) *in vitro* y mantenidos durante 12 días en medio de Hansen (1977). Datos obtenidos de 4 cultivos diferentes



El incremento en longitud de los esporoquistes fue equivalente al observado el día 15 de la infección natural de *B. glabrata* (datos no mostrados) y a los reportados por estudios de El ancho estuvo entre 31-42 μ m durante el período de cultivo (Fig. 11).

El incremento en longitud de los esporoquistes fue equivalente al observado el día 15 de la infección natural de *B. glabrata* (datos no mostrados) y a los reportados por estudios de compatibilidad esporoquistes-factores plasmáticos (24). Los esporoquistes mantenidos *in vitro* en el presente trabajo son similares, en tamaño y estructura, que los reportados en cocultivo con células embriónicas de caracol (28).



El desarrollo de esporoquistes en cultivo y la producción de cercarias parece depender de factores plasmáticos y celulares del molusco. En este sentido, se ha logrado cultivar esporoquistes en medios enriquecidos con factores plasmáticos y se han establecido como óptimas, estas condiciones junto con el empleo de la línea celular Bge. Sin embargo, estudios recientes demuestran alta toxicidad de componentes plasmáticos y sus metabolitos, productos de oxidación de la hemoglobina (4), y productos de excreción-secreción de las células Bge, puesta de manifiesto por alteraciones en la expresión génica de esporoquistes (12), lo que obviamente limita el empleo de ambos abordajes. Este trabajo ofrece alternativas para el desarrollo *in vitro* de esporoquistes de *S. mansoni*, herramienta útil para estudios biológicos sin la participación de componentes celulares no parasitarios.

Se concluye que en condiciones *in vitro* se produce una transformación rápida del miracidio, crecimiento del esporoquiste y mantenimiento de la viabilidad hasta 16 días. Esta transformación es acompañada por cambios ultraestructurales profundos para dar origen al saco germinativo.

Agradecimientos. Los autores agradecen la colaboración en el desarrollo de este trabajo a la Lic. Viana Pinto, Sra. Olga Ojeda y Sra. Jénifer Ayala.



BIBLIOGRAFÍA

- 1. Ballen D, Theron A, Pointier JP, Cesari IM. *Schistosoma mansoni*: Identification of a possible daughter sporocyst alkaline phosphatase. Exp Parasitol 2002; **101**:164-167.
- 2. Basch PF. Development and behavior of cultured *Schistosoma mansoni* fed on human erythrocyte ghosts. Am J Trop Med Hyg 1984; **33**:911-917.
- 3. Basch PF, Di Conza JJ. The miracidium-sporocysts transition in *Schistosoma mansoni*: surface changes *in vitro* with ultrastructural correlation. J Parasitol 1974; **60**:935-941.
- 4. Bender RC, Bixler LM, Lerner JP, Bayne CJ. *Schistosoma mansoni* sporocysts in culture: host plasma hemoglobin contributes to *in vitro* oxidative stress. J Parasitol 2002; **88**:14-18.
- 5. Bogist BJ. Cytochemical localization of peroxidase activity in the miracidium of *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 1975; **61**:621-626.
- 6. Brooker BE. **The sense organs of trematode miracidia**. En: Behavioural aspects of parasite transmission. Canning EU & Wright CA (ed.). Zool J Linnean Soc 1972; **51**:171-180.
- 7. Césari I, Alarcón de Noya B (1987). Esquistosomiasis mansoni: diagnóstico y control. Manual de campo y de laboratorio. CEA-IVIC, p.319.
- 8. Cheng TC, Bier JW. Studies on molluscan schistosomiasis: an analysis of the development of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. Parasitology 1972; **64**:129-141.
- 9. Cheng TC (1978). **Digenea-Los tremátodos digenéticos**. En: Parasitología General. AC (ed). Madrid, España, pp.370-461.
- 10. He YX, Chen L, Ramaswany K. *Schistosoma mansoni, S. haematobium, and S. japonucum:* early events associated with penetration and migration of schistosomula through human skin. Exp Parasitol 2002; **102**:99-108.
- 11. Colley DG, Wikel SK. *Schistosoma mansoni*: simplified method for the production of schistosomules. Exp Parasitol 1974; **35**:44-51.
- 12. Coppin JF, Lefebvre C, Caby S, Cocquerelle C, Vicogne J, Coustau C, Dissous C. Gene expression changes in *Schistosoma mansoni* sporocysts induced by *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. Parasitol Res 2003; **89**:113-119.
- 13. Coustau C, Ataev G, Jourdane J, Yoshino TP. *Schistosoma japonicum: in vitro* cultivation of miracidium to daughter sporocysts using a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line. Exp Parasitol 1997; **87**:77-87.
- 14. Hansen EL (1977). **Culture media for platyhelminths.** In: Handbook series in nutrition and food. Section G, diets and culture media. Rechcilg M (ed.) Academic Press, New York, pp.77-79.
- 15. Homez JH, Soto R, De Soto S, Méndez H, Marmol P (1989). **Platyhelminthes**. En: Parasitologia. Soto R and Tarazon S (ed.), Maracaibo, Venezuela. pp.63-88.
- 16. Kassis I, Aikawa M, Mahmound AF. Mouse-antibody dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J Immunol 1979; **122**:398-405.
- 17. Kawamoto F, Shozawa A, Kumada N, Kojima K. Possible roles of cAMP and Ca+2 in the regulation of miracidial transformation in *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res 1989; **75**:368-374.
- Laursen JP, Yoshino TP. *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line supports *in vitro* miracidial transformation and early larval development of the deer liver fluke, *Fascioloides magna*. Parasitology 1999; **118**:187-194.
- 19. Michalick MS, Gazzinelli G, Pellegrino J. Cultivation of *Schistosoma mansoni* cercarial bodies to adults worms. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1979; **21**:115-118.
- 20. Pan CT. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. Am J Trop Med Hyg 1965; **14**:931-976.
- 21. Ram D, Romano B, Schechter I. Immunochemical studies on the cercarial-specific calcium bindind protein of *Schistosoma mansoni*. Parasitology 1994; **108**:289-300.
- 22. Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mote-Santos TA, Figueiredo EA, Pellegrino J. *Schistosoma mansoni:* defined system for a stepwise transformation of cercaria to schistosomules *in vitro*. Exp Parasitol 1974; **36**:360-372.
- 23. Rupel A, McLaren DJ. *Schistosoma mansoni* surface membrane stability *in vitro* and *in vivo*. Exp Parasitol 1986; **62**:223-236.
- 24. Sapp KK, Loker ES. A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: in vitro interactions between hemocytes and degenean larvae. J Parasitol 2000; **86**:1020-1029.



- 25. Stirewalt MA. Schistosoma mansoni: cercaria to schistosomule. Adv Parasitol 1974; 12:115-182.
- 26. Van Der Kannap WP, Loker ES. Immune mechanisms in trematode-snail interaction. Parasitology today 1990; **6**:175-182.
- 27. Wikel SK, Bogitsh BJ. *Schistosoma mansoni*: penetration apparatus and epidermis of the miracidium. Exp Parasitol 1974; **36**:222-232.
- 28. Yoshino TP, Laursen JR. Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocyts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells. J Parasitol 1995; **81**:714-722.